



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Δ.Π.Μ.Σ. Οινολογία – Αμπελουργία

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εφαρμογή της τεχνικής της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με ανάλυση
κατά Fourier (FT-IR) για την εκτίμηση του τανικού περιεχομένου
γιγάρτων σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο**

ΒΟΣΚΙΔΗ Γ. ΕΛΕΝΗ

Επίβλεψη: Καλλίθρακα Σταματίνα, Επίκουρη καθηγήτρια Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Δ.Π.Μ.Σ. Οινολογία – Αμπελουργία**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εφαρμογή της τεχνικής της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με ανάλυση
κατά Fourier (FT-IR) για την εκτίμηση του τανικού περιεχομένου
γιγάρτων σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο**

ΒΟΣΚΙΔΗ ΕΛΕΝΗ

Επίβλεψη: Καλλίθρακα Σταματίνα, Επίκουρη καθηγήτρια Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καλλίθρακα Σταματίνα, Επίκουρος καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Παππάς Χρήστος, Επίκουρος καθηγητής Γ.Π.Α.

Μπινιάρη Αικατερίνη, Επίκουρος καθηγήτρια Γ.Π.Α.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΕΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ ΣΤΟΥΣ:
Κα Καλλίθρακα Σ., Παππάς Χ., Κυραλέου Μ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Οι φαινολικές ενώσεις	7
1.1. Φλαβονοειδείς ενώσεις	7
1.1.1. Συμπυκνωμένες τανίνες: προανθοκυανιδίνες	8
1.1.2. Προανθοκυανιδίνες: Προκυανιδίνες και προδελφινιδίνες	10
1.1.3. Διμερή προκυανιδίνης (3-φλαβανόλες). Ονοματολογία, στερεοχημεία και διαμόρφωση	10
1.1.4. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών	13
1.1.5. Φλαβονοειδή στο σταφύλι	14
1.1.5.1. Φλαβανόλες	14
1.1.6. Προανθοκυανιδίνες στον οίνο	17
1.2. Επίδραση της ποικιλίας και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην τανική σύνθεση της σταφυλής	17
1.3. Επίδραση του ποτίσματος στο τανικό δυναμικό της σταφυλής	18
1.4. Επίδραση των καλλιεργητικών τεχνικών στην συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών	20
1.5. Επίδραση των φλαβονοειδών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	20
1.6. Βιολογικές ιδιότητες	22
1.6.1. Θεραπευτικές εφαρμογές	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Φασματοσκοπία υπερύθρου – Infrared Spectroscopy, IR	25
2.1. Βασικές αρχές φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR)	25
2.1.1. Αρχή φασματοσκοπίας υπερύθρου	25
2.1.2. Το όργανο και η βαθμονόμησή του	27
2.2. Λειτουργία φασματοφωτομέτρου FT-IR	28
2.3. Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance IR, DRIFT)	30
2.4. Επεξεργασία φασμάτων FT-IR	31
2.4.1. Αυτόματη εξομάλυνση (automatic smooth)	32
2.4.2. Διόρθωση βασικής γραμμής (automatic baseline correct)	32
2.4.3. Μέσος όρος φασμάτων	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Στατιστικές μέθοδοι πολλών μεταβλητών. Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS)	33
3.1. Ο αλγόριθμος PLS	34
3.2. PLS ανάλυση – Βαθμονόμηση (Calibration)	36
3.3. PLS ανάλυση – Επικύρωση (Validation)	38
3.4. PLS ανάλυση – Πρόβλεψη (Prediction)	39
3.5. Επαναληπτικές διαδικασίες Cross Validation και PRESS	40
3.6. Spectrum outlier	40
3.7. Εφαρμογή φασματικών φίλτρων (spectral filters)	40
3.7.1. Ανάπτυξη μοντέλου με χρήση πρώτης παραγώγου	41
3.7.2. Ανάπτυξη μοντέλου με χρήση δεύτερης παραγώγου	41
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πρώτες ύλες: επεξεργασία και αναλύσεις	43
4.1. Τα δείγματα γιγάρτων	43
4.2. Επεξεργασίες και αναλύσεις των γιγάρτων	43

4.3.Σύσταση δειγμάτων σε σχέση με τα στάδια επεξεργασίας	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανάλυση των γιγάρτων σταφυλής με FT-IR	46
5.1.Αποτελέσματα της ανάλυσης των γιγάρτων με FT-IR/DRIFT	46
5.1.1.Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων	46
5.1.2.Κατασκευή αρχικών μοντέλων	51
5.1.2.1.Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών	51
5.1.2.2.Συγκέντρωση στυφών τανινών	53
5.1.2.3.Συγκέντρωση ολικών φαινολών	54
5.1.2.4.Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ	56
5.1.2.5.Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP)	57
5.2.Συσχετισμός και σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με ανάλυση κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR) και την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy – DRIFTS) σε συνδυασμό με χρήση της στατιστικής μεθόδου ανάλυσης πολλών μεταβλητών και της αρχής των ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares – PLS) για την εκτίμηση του τανικού περιεχομένου γιγάρτων σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συσχετισμός των φασμάτων από τα δείγματα των γιγάρτων, με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών, η συγκέντρωση στυφών τανινών, η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες, το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP).

Με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου PLS, καταστρώθηκαν τα μοντέλα συσχέτισης των φασμάτων με τα αποτελέσματα των αναλύσεων και μελετήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) ώστε να εκτιμηθεί η γραμμικότητα των μοντέλων. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά, εμφανίζοντας υψηλές τιμές για το R^2 .

Πιο αναλυτικά, για την ολική συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών, επιλέχθηκε η φασματική περιοχή $1836-748\text{cm}^{-1}$ και με εφαρμογή της $1^{\text{ης}}$ παραγώγου πήραμε $R^2=0,97$. Για την συγκέντρωση των στυφών τανινών επιλέχθηκε η περιοχή $1820-1563\text{cm}^{-1}$ και με εφαρμογή της $2^{\text{ης}}$ παραγώγου προέκυψε $R^2=0,97$. Το μοντέλο για την περιεκτικότητα των ολικών φαινολών έδωσε $R^2=0,95$. Σ' αυτήν την περίπτωση επιλέχθηκαν δύο περιοχές: $1824-1417\text{cm}^{-1}$ και $907-743\text{cm}^{-1}$ με εφαρμογή και στις δύο της $2^{\text{ης}}$ παραγώγου. Στο μοντέλο που καταστρώθηκε για το %G προέκυψε $R^2=0,98$, με εφαρμογή της $2^{\text{ης}}$ παραγώγου στην φασματική περιοχή $1813-607\text{cm}^{-1}$. Τέλος, ο mDP των τανινών έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα με $R^2=0,99$, ενώ επιλέχθηκαν δύο περιοχές: $1832-1416\text{cm}^{-1}$ και $918-739\text{cm}^{-1}$ με εφαρμογή της $2^{\text{ης}}$ παραγώγου.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, διαπιστώνουμε ότι η τεχνική DRIFTS είναι μια γρήγορη, εύκολη και συνάμα αξιόπιστη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού. Τα μοντέλα που καταστρώθηκαν είναι βελτιωμένα και πιο ολοκληρωμένα σε σχέση με αντίστοιχες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η περεταίρω έρευνα για την κατασκευή μοντέλων που θα αφορούν σε πιο διευρυμένες παραμέτρους όπως περιεκτικότητες και σε άλλες χημικές ουσίες, αλλά και σε πιο διευρυμένα δείγματα (οίνοι, φλοιοί και άλλα μορφολογικά μέρη του φυτού της αμπέλου).

ABSTRACT

The aim of this study, was the application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and the diffuse spectroscopic technique (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy - DRIFTS) in conjunction with the use of chemometrics (Partial Least Squares - PLS) in order to estimate the tannic content of grape seeds of the Greek varieties Xinomavro and Mavrotragano.

Specifically, a correlation of the samples' spectras was held, with their corresponding results, due to spectrophotometric and chromatographic methods. The studied parameters were the concentration of condensed tannins, the concentration of astringent tannins, the total phenols content, the galloylation (% G) and the average degree of polymerization (mDP).

By the use of PLS, correlation models were developed between the spectra and the analytical techniques. Due to these models, the coefficient correlation (R^2) was studied, in order to estimate the linear correlation of the models. The results were sufficiently good, displaying high values of R^2 .

More specifically, for the condensed tannins concentration model, the spectral region 1836-748 cm^{-1} was selected and with the application of the first derivative, the R^2 was 0,97. The astringent tannins' concentration model (chosen region 1820-1563 cm^{-1} and application of second derivative) gave a R^2 of 0,97. The model for the total phenols content gave a R^2 of 0,95. In this case, two regions were selected (1824-1417 cm^{-1} and 907-743 cm^{-1}) by applying second derivative to both. The model developed for % G showed a $R^2 = 0,98$, with application of the second derivative in the spectral region 1813-607 cm^{-1} . Finally, the mDP gave the most satisfactory results with a R^2 of 0,99 (chosen region: 1832-1416 cm^{-1} and 918-739 cm^{-1} and application of second derivative).

Due to our results, we concluded that DRIFTS is a quick, easy and yet reliable method of quantification. The model developed to this study are improved and more comprehensive compared with similar studies. As a consequence, there is necessity for further research, in order to construct models that will involve more extensive parameters and samples (wine, grape skins etc.).

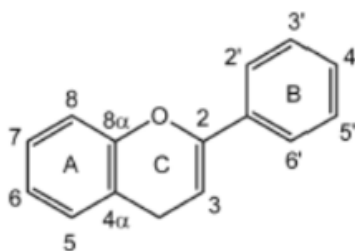
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

1.1. Φλαβονοειδείς ενώσεις

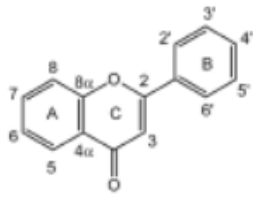
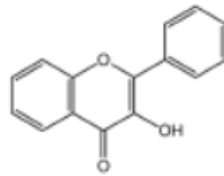
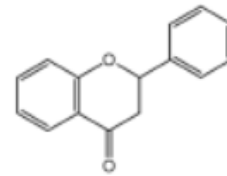
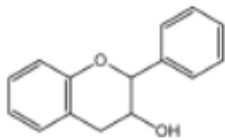
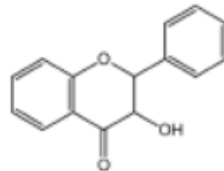
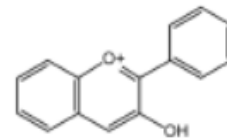
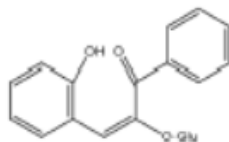
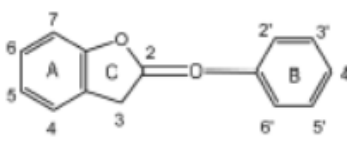
Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια ομάδα φαινολικών δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και χαρακτηρίζονται από τη χημική δομή του φαιτυλοβενζοπυρενίου. Η γενική χημική δομή (Σχ. 1.1) περιλαμβάνει ένα C₁₅ (C₆-C₃-C₆) σκελετό που ενώνεται με ένα βενζοπυρανικό δακτύλιο που με τη σειρά του φέρει έναν αρωματικό δακτύλιο στον δεύτερο άνθρακα (C₂), τον τρίτο (C₃) ή τον τέταρτο (C₄). Ο ετεροκυκλικός βενζοπυρανικός δακτύλιος ονομάζεται και C-δακτύλιος (C-ring), ο αρωματικός δακτύλιος ως A-δακτύλιος και ο φαινολικός δακτύλιος ως το B-δακτύλιος [Aron P. et al., 2008].

Η θέση του δεσμού μεταξύ του πυρανικού και του αρωματικού δακτυλίου, καθορίζει την ομάδα βενζοπυρανίου. Στην ομάδα των 2-φαιτυλοβενζοπυρενίων, περιλαμβάνονται οι φλαβονοειδείς ενώσεις [Aron P. et al., 2008].



Σχήμα 1.1. 2-φαιτυλοβενζοπυρένιο: φλαβονοειδή

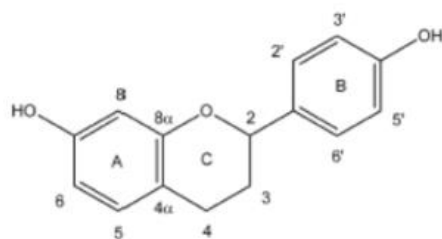
Με βάση τον κορεσμό του C-δακτυλίου και την κατάσταση οξείδωσης, τα 2-φαιτυλοβενζοπυρένια διαχωρίζονται περαιτέρω σε οκτώ ομάδες: φλαβάνες, φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, δι-υδροφλαβονόλες, 3-φλαβανόλες, φλαβαν-4-όλες και φλαβαν-3,4-διόλη (Σχήμα 1.2). Όντας η μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη κατηγορία των μονομερών φλαβονοειδών, οι φλαβάν-3-όλες περιλαμβάνουν τις βασικές και κυριότερες συστατικές μονάδες των συμπυκνωμένων προανθοκυανιδινών [Aron P. et al., 2008].

Flavone**Flavonol****Flavanone****Flavan-3-ol****Flavanonol****Anthocyanidin****Chalcone****Aurone**

Σχήμα 1.2. Φλαβονοειδείς ενώσεις (2-φαιλυλοβενζοπυρένια)

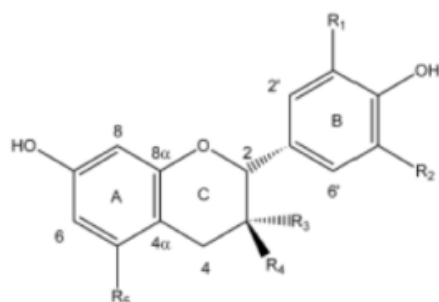
1.1.1. Συμπυκνωμένες τανίνες: προανθοκυανιδίνες

Οι προανθοκυανιδίνες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία πολυμερών φλαβονοειδών ενώσεων, οι οποίες συνίστανται από μονομερή 3-φλαβανόλης και ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες με βάση τον Α-δακτύλιό τους: στη φλωρογλουσινόλη και τη ρεζορσινόλη (phloroglucinol and resorcinol) (Σχ. 1.3). Οι προκυανιδίνες και οι προδελφινιδίνες (οι οποίες και μελετώνται στην παρούσα εργασία), διαθέτουν Α-δακτύλιο τύπου φλωρογλουσινόλης. Οι προκυανιδίνες και οι προδελφινιδίνες (Σχ. 1.4) αντιπροσωπεύουν τις πιο κοινές ομάδες προανθοκυανιδίνης, τύπου φλωρογλουσινόλης που βρίσκονται στη φύση, με τα 3',4'-διυδροξυ και 3', 4', 5'-τριυδροξυ ως υποκαταστάτες του Β-δακτυλίου [Aron P. et al., 2008].



Proanthocyanidin type	3	5	8	3'	5'
Procassinidin	H	H	H	H	H
Probutinidin	H	H	H	OH	H
Proapigeninidin	H	OH	H	H	H
Proluteolinidin	H	OH	H	OH	H
Protricetinidin	H	OH	H	OH	OH
Propelargonidin	OH	OH	H	H	H
Procyanidin	OH	OH	H	OH	H
Prodelphinidin	OH	OH	H	OH	OH
Proguibourtinidin	OH	H	H	H	H
Profisetinidin	OH	H	H	OH	H
Prorobinetinidin	OH	H	H	OH	OH
Proteracacinidin	OH	H	OH	H	H
Promelacacinidin	OH	H	OH	OH	H

Σχήμα 1.3. Χημικοί τύποι προανθοκυανιδινών



2R Flavan-3-ol Monomers	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(+)-afzelechin	H	H	H	OH	OH
(-)-epiafzelechin	H	H	OH	H	OH
(+)-catechin	H	OH	H	OH	OH
(-)-epicatechin	H	OH	OH	H	OH
(+)-gallocatechin	OH	OH	H	OH	OH
(-)-epigallocatechin	OH	OH	OH	H	OH
(+)-fisetinidol	H	OH	H	OH	H
(-)-epifisetinidol	H	OH	OH	H	H
(+)-robinetinidol	OH	OH	H	OH	H

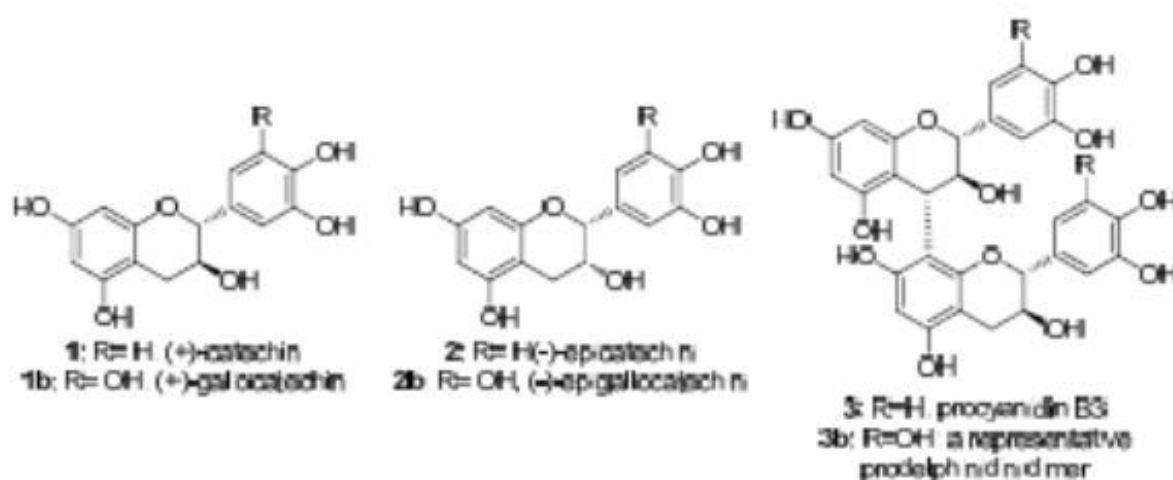
Σχήμα 1.4. Παραδείγματα μονομερών 3-φλαβανολών. Οι περισσότερες 3-φλαβανόλες που συναντώνται στη φύση είναι 2R ισομερή

Τα μονομερή 3-φλαβανολών που συναντώνται κυρίως στο σταφύλι είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη και η γαλλοκατεχίνη.

1.1.2. Προανθοκυανιδίνες: Προκυανιδίνες και προδελφινιδίνες

Τα ανωτέρω διμερή προκυανιδίνης και άλλα ολιγομερή προκυανιδίνης, ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των φλαβονολών ολιγομερών, γνωστά ως προανθοκυανιδίνες.

Οι προανθοκυανιδίνες, αποτελούνται από δύο ομάδες ολιγομερών / πολυμερών 3-φλαβανόλης. Οι προανθοκυανιδίνες περιλαμβάνουν τόσο τις προκυανιδίνες (π.χ. **3**), καθώς και τις προδελφινιδίνες (π.χ. **3b**). Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών, είναι η υδροξυλίωση του Β-δακτυλίου. Τα ολιγομερή / πολυμερή προκυανιδίνης, αποτελούνται από μονομερή που περιέχουν το δύο υδροξύλια ως υποκαταστάτες του Β-δακτυλίου (π.χ. **1**, **2**), ενώ τα ολιγομερή προδελφινιδίνης, χαρακτηρίζονται από την τριυδροξυλίωση του Β-δακτυλίου (π.χ. **1b**, **2b**) (Σχ. 1.5.). [Grant E. et al., 2010]

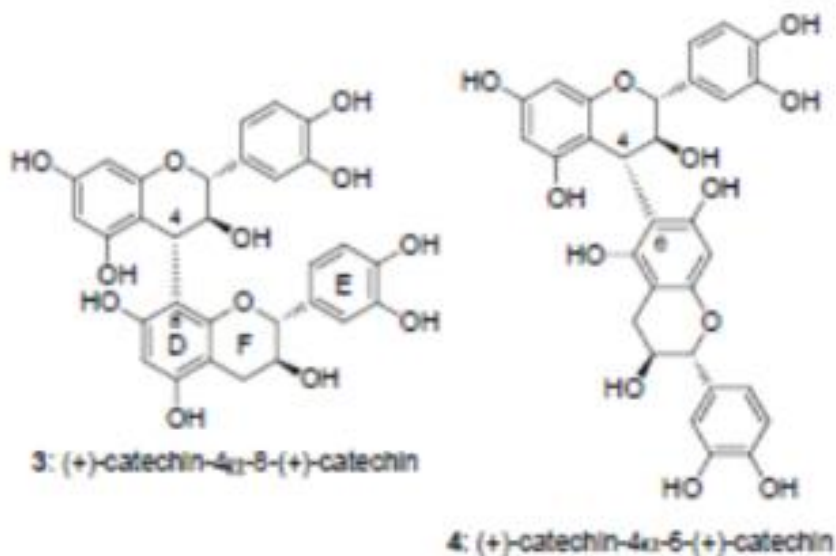


Σχήμα 1.5. μονομερή 3-φλαβανολών και ολιγομερή προκυανιδίνης και προδελφινιδίνης

1.1.3. Διμερή προκυανιδίνης (3-φλαβανόλης). Ονοματολογία, στερεοχημεία και διαμόρφωση

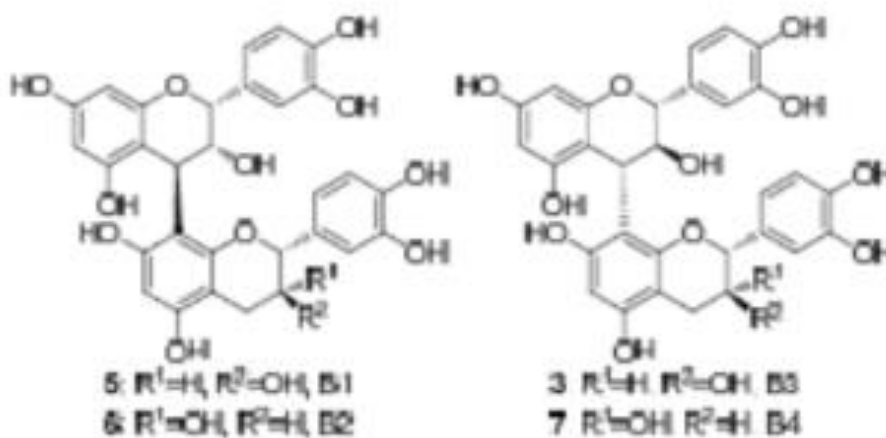
Τα διμερή προκυανιδίνης χαρακτηρίζονται από δύο μονομερή 3-φλαβανόλης που συνδέονται μεταξύ τους με έναν ενδοφλαβονικό δεσμό μεταξύ του τέταρτου άνθρακα C4 του ενός μονομερούς και του C8 ή C6 του δεύτερου μονομερούς. Υπό αυτήν την έννοια, η κατεχίνη-4→8-κατεχίνη, υποδηλώνει ένα διμερές κατεχίνης-κατεχίνης που ενώνεται μεταξύ του τέταρτου του πρώτου και όγδοου άνθρακα του δεύτερου (C4-C8), ενώ κατεχίνη-4→6-κατεχίνη, περιγράφει ένα διμερές κατεχίνης-κατεχίνης που ενώνεται μεταξύ του τέταρτου του πρώτου και έκτου άνθρακα του δεύτερου (C4-C6).

Προκειμένου να μειωθεί η αμφισημία της ονομασίας των δακτυλίων A, B και C από τις μονάδες των μονομερούς, οι ονομασίες A, B, και C συνήθως διατηρούνται για το άνω μονομερές. Οι A, B, και C δακτύλιοι του κάτω μονομερούς στη συνέχεια ορίζονται ως D, E και F δακτύλιοι (Σχ. 1.6) [Grant E et al., 2010].



Σχήμα 1.6. Διμερή προκυανιδίνης 4→8 και 4→6

Τα τέσσερα 4 → 8 διμερή αποτελούμενα από μονομερή κατεχίνης και επικατεχίνης αναφέρονται συχνά ως προκυανιδίνες B1 έως B4 (Σχ.1.7).

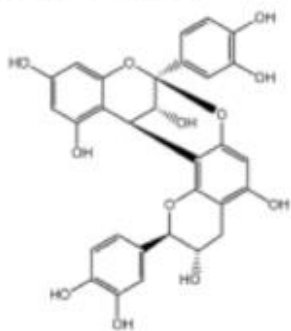


Σχήμα 1.7. Προκυανιδίνες B1 έως B4

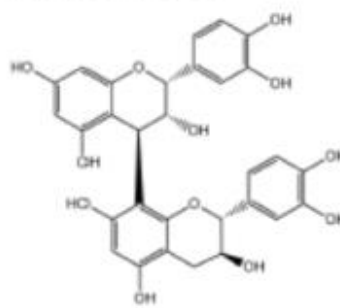
Όλα αυτά τα τέσσερα διμερή εμφανίζουν 3,4-trans στερεοχημεία στη C4 θέση της ενδοφλαβανικής σύνδεσης. Οι ενδοφλαβανικές διασυνδέσεις των προανθοκυανιδινών, ονομάζονται σύμφωνα με το σύστημα α,β, που υπαγορεύεται από τη στερεοχημεία του C4 της "κορυφαίας" μονάδας. Η (R) Στερεοχημεία ορίζεται ως α και η (S) ως β. Ως εκ τούτου, μία 4 → 8 ενδοφλαβανική σύνδεση μεταξύ δύο μονάδων επικατεχίνης (6), η οποία εμφανίζει (S) στερεοχημεία στον C4, ορίζεται ως ενδοφλαβανικός δεσμός 4β → 8. Στερεοχημεία (R) στον C4 (3), ορίζεται ως ενδοφλαβανικός δεσμός 4α → 8. Λαμβάνοντας

όλες τις συμβάσεις ονομασίας υπόψη, η διαμόρφωση **3** είναι επισήμως γνωστή ως (+)-κατεχίνη-4α → 8-(+) -κατεχίνη, ενώ τα υπόλοιπα διμερή ονομάζονται με παρόμοιο τρόπο. [2] Τα διμερή με αυτούς τους τύπους δεσμών ονομάζονται Β'-τύπου και περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: Προκυανιδίνη Β-1 [(-)-επικατεχίνη-(4β→8) - (+)-κατεχίνη], προκυανιδίνη Β-2 [(-)-επικατεχίνη-(4β→8) - (-)-επικατεχίνη], προκυανιδίνη Β-3 [(+) -κατεχίνη-(4α→8) - (+)-κατεχίνη], προκυανιδίνη Β-4 [(+) -κατεχίνη-(4α→8) - (-)-επικατεχίνη] και Β-5, ένα τοποϊσομερές (regioisomer) του Β-2 διμερούς που διαθέτει ένα C-4→C-6 ενδοφλαβανικού (interflavan) δεσμού. Τα τριμερή ή οι προανθοκυανιδίνες τύπου-С», όπως η C-1, αποτελείται από τρεις μονάδες 3-φλαβανόλης που συνδέονται με δύο C-4→C-8 δεσμούς. Μια άλλη ομάδα διμερών προανθοκυανιδινών, Α-τύπου, έχουν πιο άκαμπτη διαμόρφωση από την Β-τύπου λόγω της παρουσίας δύο δεσμών: έναν C-C και έναν C-O. Παραδείγματα Α-προανθοκυανιδινών είναι: Α-1 [(-)-επικατεχίνη (2β→O-7, 4β→8) - (+)-κατεχίνη] και Α-2 [(-)-επικατεχίνη (2β→O-7, 4β→8) - (-)-επικατεχίνη [Aron P. Et al, 2008].

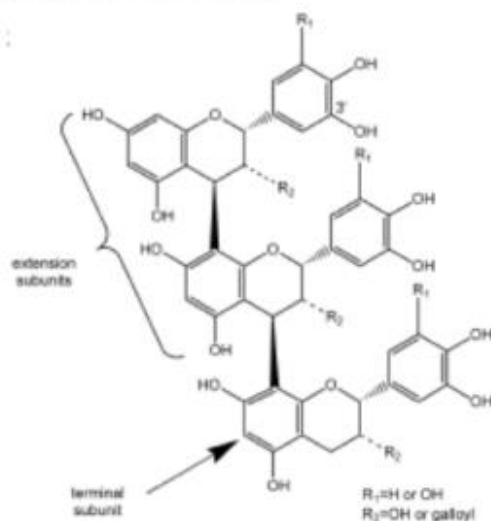
A-type Dimer (A1)



B-type Dimer (B-1)



C-type Proanthocyanidin

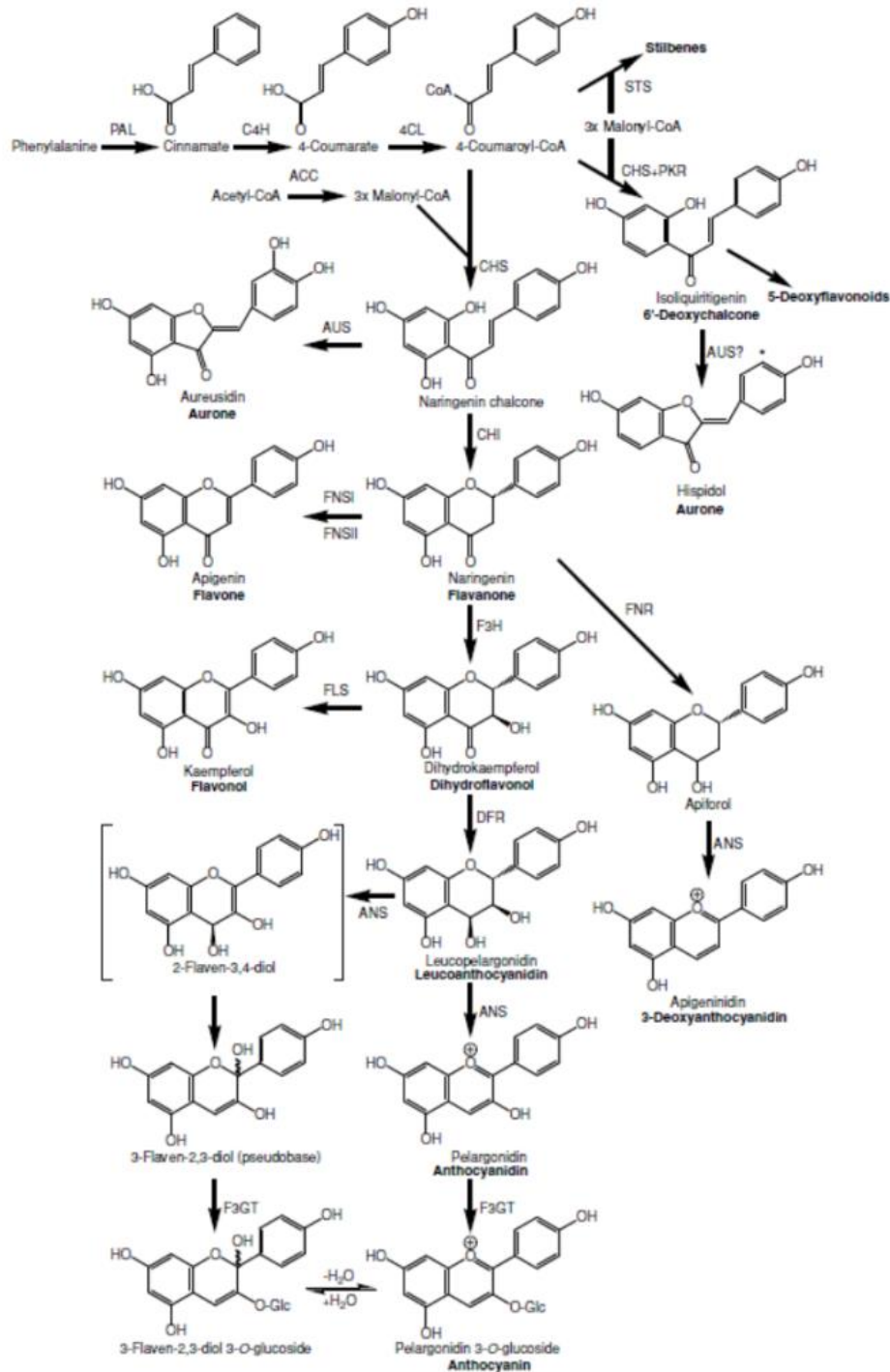


Σχήμα 1. 8. Παραδείγματα προκυανιδινών

Τυπικά η 2,3-trans στερεοχημεία κυριαρχεί κατά την επέκταση των δομικών μονάδων της αλυσίδας, αν και σε μικρό βαθμό εμφανίζεται και 2,3-cis διαμόρφωση. Τα ολιγομερή προανθοκυανιδίνης συνήθως έχουν ως τερματική μονάδα την (+)-κατεχίνη. Τα πολυμερή προανθοκυανιδινών έχουν συνήθως μέσο MW 1000-6000, αλλά μερικές φορές έχουν MW ως και 2000 [Aron P., et al., 2008].

1.1.4. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών είναι μέρος του ευρύτερου φαινυλοπροπανοειδούς (phenylpropanoid) μονοπατιού, μέσω του οποίου παράγονται μια σειρά άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, όπως φαινολικά οξέα, λιγνίνες, λιγνάνες, και σιλβένια. Οι βασικές πρόδρομες ουσίες των φλαβονοειδών είναι η φαινυλαλανίνη, που λαμβάνεται μέσω του σικιμικού μονοπατιού και το συνένζυμο malonyl-CoA που προέρχεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA) (Σχ. 1.9) [Andersen M. et al., 2006].

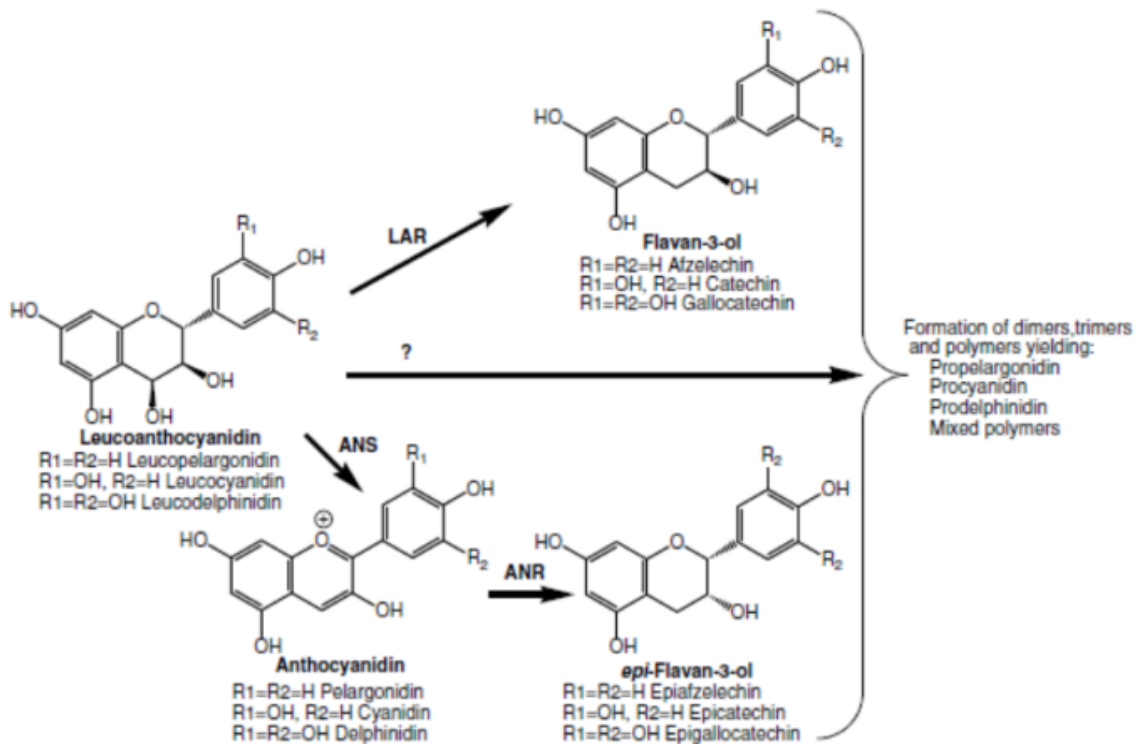


Σχίμα 1.9. Γενικό βιοσυνθετικό μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών και των φλαβονοειδών.

Η βιοσύνθεση των προανθοκυανιδινών ή συμπυκνωμένων ταννινών (PAs) ακολουθεί τη διαδρομή βιοσύνθεσης των ανθοκυανινών από τις χαλκόνες, μέσω των σημείων διακλάδωσης προς σχηματισμό 3-φλαβανόλης [Andersen M., et al., 2006].

Οι 3-φλαβανόλες μπορούν να σχηματιστούν από δύο οδούς βιοσύνθεσης. Είτε από τις λευκοανθοκυανιδίνες είτε από τις ανθοκυανιδίνες (Σχ.1.10). Οι 2,3-trans-3-φλαβανόλες παράγονται από τις λευκοανθοκυανιδίνες μέσω του ενζύμου LAR (leucoanthocyanidin reductase), ενώ οι 2,3-cis-3-φλαβανόλες παράγονται από τις ανθοκυανιδίνες μέσω του ενζύμου ANR (anthocyanidin reductase). [Andersen M., et al., 2006]

Οι βασικές υπομονάδες είναι εκείνες με 3', 4'-διυδροξυλίωση του Β-δακτυλίου (κατεχίνη και επικατεχίνη) ή 3', 4', 5'-τριυδροξυλίωση (γαλλοκατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη). Καθώς οι υπομονάδες για την βιοσύνθεση των PAs σχηματίζονται αργότερα από τις φλαβανόνες στο μονοπάτι, η υδροξυλίωση του Β-δακτυλίου των 3-φλαβανολών είναι πιθανό να καθορίζεται από τη δράση των F3'H (flavanone 3-hydroxylase) και F3', 5'H στις πρόδρομες ουσίες. [Andersen M., et al., 2006]



Σχήμα 1.10. Βιοσυνθετικό μονοπάτι των προανθοκυανιδινών από λευκοανθοκυανιδίνες.

1.1.5. Φλαβονοειδή στο σταφύλι

1.1.5.1. Φλαβανόλες

Οι 3-φλαβανόλες συναντώνται στο σταφύλι ως μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή. Βιοσυντίθενται στον καρπό της σταφυλής και εντοπίζονται κυρίως στα γίγαρτα και τους φλοιούς, ενώ σε ίχνη έχουν εντοπιστεί και στη σάρκα ορισμένων ποικιλιών (π.χ. Alicante Bouchet) ως μονομερή και διμερή. Τα κυριότερα μονομερή είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-

επικατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης [(-)-epicatechin 3-gallate]. Σε σταφύλια του γένους *V. vinifera* έχει βρεθεί και γαλλοκατεχίνη, ενώ γαλλικός εστέρας της κατεχίνης (catechin 3-gallate) και γαλλικός εστέρας γαλλοκατεχίνης (gallocatechin 3-gallate) έχουν βρεθεί σε nonvinifera σταφύλια [Andersen M., et al., 2006].

Οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων σταφυλής έχουν ως δομικές μονάδες την κατεχίνη, την επικατεχίνη και τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (epicatechin 3-gallate) και προκυανιδίνες με μεγάλο ποσοστό γαλλικών εστέρων (galloylated procyanidins). Ένας αριθμός διμερών και τριμερών προκυανιδινών Β-τύπου, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων εστεροποιημένων με το γαλλικό οξύ παραγώγων τους, έχουν εντοπιστεί στο γλεύκος πέραν των C4-C8-συνδεδεμένων διμερών. Η παρουσία προκυανιδίνης A2 έχει επίσης εντοπιστεί, αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως. Τέλος, η αλληλουχία κατεχίνη-γαλλικός εστέρας κατεχίνης (catechin-catechin 3-gallate), προσδιορίστηκε σε non vinifera ποικιλίες. Επιπλέον, διμερή με βάση τόσο την προδελφινιδίνη όσο και την προκυανιδίνη, που προέρχονται από τους φλοιούς της σταφυλής, βρέθηκαν επίσης στον οίνο. Διμερή όπως γαλλοκατεχίνη-γαλλοκατεχίνη, γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη, κατεχίνη-γαλλοκατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη-κατεχίνη επικατεχίνη-γαλλοκατεχίνη και επικατεχίνη-επιγαλλοκατεχίνη εντοπίστηκαν επίσης στον οίνο. Οι μονομερείς και ολιγομερείς φλαβανόλες που έχουν προσδιοριστεί στο σταφύλι και τον οίνο, αναφέρονται στον Πίνακα 1.1. [Andersen M., et al., 2006].

Αυτές οι χαμηλότερου μοριακού βάρους ενώσεις αποτελούν μόνο ένα σχετικά μικρό ποσοστό των προανθοκυανιδινών σταφυλής. Η ετερογένεια των προανθοκυανιδινών αυξάνει με το μήκος της αλυσίδας τους, λόγω της ποικιλομορφίας των συστατικών μονάδων, των θέσεων σύνδεσης και των διαφορετικών αλληλουχιών τους.

Πίνακας 1.1. Φλαβανόλες που εντοπίστηκαν στον καρπό σταφυλής και στον οίνο

	Source
<i>Monomers</i>	
(+)-Catechin	Berries
(-)-Epicatechin	Berries
(-)-Epicatechin gallate	Berries
(+)-Catechin gallate	Berries
(+)-Gallocatechin	Berries
(+)-Gallocatechin gallate	Berries
<i>Additional monomeric units in oligomers and polymers</i>	
(-)-Epigallocatechin	Skins, Stems
(-)-Epigallocatechin gallate	Skins, Stems
<i>Dimers</i>	
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(+)-catechin (B1)	Berries
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin (B2)	Berries
(+)-Catechin-(4α-8)-(+)-catechin (B3)	Berries
(+)-Catechin-(4α-8)-(-)-epicatechin (B4)	Berries
(-)-Epicatechin-(4β-6)-(-)-epicatechin (B5)	Seeds
(+)-Catechin-(4α-6)-(+)-catechin (B6)	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-6)-(+)-catechin (B7)	Seeds
(+)-Catechin-(4α-6)-(-)-epicatechin (B8)	Seeds
(-)-Epigallocatechin-(+)-catechin	Wine
(-)-Epicatechin-(+)-gallocatechin	Wine
(-)-Epicatechin-(+)-epigallocatechin	Wine
(-)-Epicatechin 3-gallate-(4β-8)-(+)-catechin (B1 3-gallate)	Seeds
(-)-Epicatechin 3-gallate-(4β-8)-(-)-epicatechin (B2 3-gallate)	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin 3-gallate (B2 3'-gallate)	Seeds
(+)-Catechin-(4α-8)-(-)-epicatechin 3-gallate (B4 3-gallate)	Seeds
(-)-Epicatechin 3-gallate-(4β-8)-(-)-epicatechin 3-gallate (B2 3,3'-digallate)	Seeds
<i>Trimers</i>	
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin (C1)	Wine
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin-(4β-8)-(+)-catechin	Wine
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin-(4β-6)-(+)-catechin	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-6)-(-)-epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin-(4β-6)-(-)-epicatechin	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-6)-(-)-epicatechin-(4β-8)-(+)-catechin	Seeds
(-)-Epicatechin-(4β-8)-(-)-epicatechin 3-gallate-(4β-8)-(+)-catechin	Seeds

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν ότι τα πολυμερή προανθοκυανιδίνης (τανίνες) που προέρχονται από τα γίγαρτα, είναι κατά κύριο λόγο προκυανιδίνες εστερτοποιημένες με γαλλικό οξύ (galloylated procyanidins), ενώ οι τανίνες των φλοιών και των βοστρύχων αποτελούνται και από προκυανιδίνες και από προδελφινιδίνες. Οι περισσότερες συστατικές μονάδες προανθοκυανιδινών στους φλοιούς είναι η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη. Οι γαλλικοί εστέρες τους (3-gallates) αποτελούν επίσης δομικές μονάδες των τανινών των φλοιών, ενώ η κατεχίνη και η γαλλοκατεχίνη αποτελούν κατά κύριο λόγο και τις τελικές μονάδες των πολυμερών. Όσον αφορά στον βαθμό πολυμερισμού των

τανινών, οι φλοιοί εμφανίζουν τον υψηλότερο μέσο βαθμό πολυμερισμού (περίπου 30) σε σχέση με τα γίγαρτα και τους βοστρύχους (περίπου 10). Το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ των μονάδων (galloylated units) είναι επίσης αρκετά διαφορετικό στους φλοιούς (5%), τους βοστρύχους (15%), και τα γίγαρτα (30%) [Andersen M., et al., 2006].

1.1.6. Προανθοκυανιδίνες στον οίνο

Μετά την έκθλιψη των σταφυλιών, την εκχύλιση και τη ζύμωση, οι τανίνες των σταφυλιών, οι οποίες κατά κύριο λόγο αποτελούνται από προανθοκυανιδίνες, εξάγονται στο γλεύκος. Στους λευκούς οίνους, λίγες έως και καθόλου τανίνες είναι παρούσες, λόγω του διαχωρισμού των φλοιών από το γλεύκος και της χωρίς επαφή με τα στέμφυλα ζύμωσης. Αντίθετα, τανίνες στους ερυθρούς οίνους βρίσκονται σε ποσότητες μέχρι $1-2\text{gL}^{-1}$. Κατά την οινοποίηση των ερυθρών οίνων, η επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος, επιτρέπει την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στους φλοιούς, στα γίγαρτα και στους βοστρύχους, ειδικά καθώς αυξάνει η περιεκτικότητα της αλκοόλης. Ο προκύπτων ερυθρός οίνος περιέχει μια σημαντική ποσότητα τανινών. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών και ιδιαίτερα των τανινών ανάμεσα στους λευκούς και ερυθρούς οίνους, προκύπτουν και οι διαφοροποιήσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους όπως στο χρώμα και τη γεύση (στυπτικότητα). [2]

Η περιεκτικότητα σε τανίνες σε έναν κόκκινο οίνο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται η ποικιλία της αμπέλου (διαφορετικές ποικιλίες παράγουν διαφορετικές ποσότητες προανθοκυανιδινών), ο χρόνος επαφής του γλεύκους με τα στέμφυλα και το ποσοστό και η τεχνική της μηχανικής ανάδευσης και της ανακύκλωσης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τανίνες μη προανθοκυανιδινικής φύσης μπορούν επίσης να προστεθούν στους οίνους στο πλαίσιο της διαδικασίας της οινοποίησης ή μέσω εκχύλισης από το ξύλο δρυός κατά την παλαίωση σε βαρέλι [Grant E., et al., 2010].

1.2. Επίδραση της ποικιλίας και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην τανική σύνθεση της σταφυλής

Η συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών προσεγγίζει την υψηλότερη τιμή της, λίγες εβδομάδες μετά τον περκασμό τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα. Η συσσώρευση των μονομερών φλαβονολών πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη συσσώρευση των προανθοκυανιδινών στα γίγαρτα. Στους φλοιούς, η μέγιστη συγκέντρωση τους επιτυγχάνεται νωρίτερα και αρχίζει να μειώνεται καθώς οι προανθοκυανιδίνες συσσωρεύονται. Η μείωση της συγκέντρωσης των προανθοκυανιδινών που παρατηρήθηκε κατά τα τελευταία στάδια της ωρίμανσης των σταφυλιών, αποδίδεται σε μειωμένη εκχυλισιμότητα που προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα κυτταρικά συστατικά, όπως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα σχετικά με αλλαγές στην σύνθεση των προανθοκυανιδινών κατά την ωρίμανση εμφανίζονται αντιφατικά: το μέσο μήκος της αλυσίδας μπορεί να μειώνεται, να αυξάνει ή να παραμένει σταθερό από τον περκασμό μέχρι την συγκομιδή, ανάλογα με την ποικιλία [Andersen M., et al., 2006].

Το τανικό περιεχόμενο της σταφυλής διαφέρει ελάχιστα μεταξύ των ποικιλιών και κανένα ιδιαίτερο μοντέλο δεν παρατηρήθηκε για τις κόκκινες και τις λευκές ποικιλίες.

1.3. Επίδραση του ποτίσματος στο τανικό δυναμικό της σταφυλής

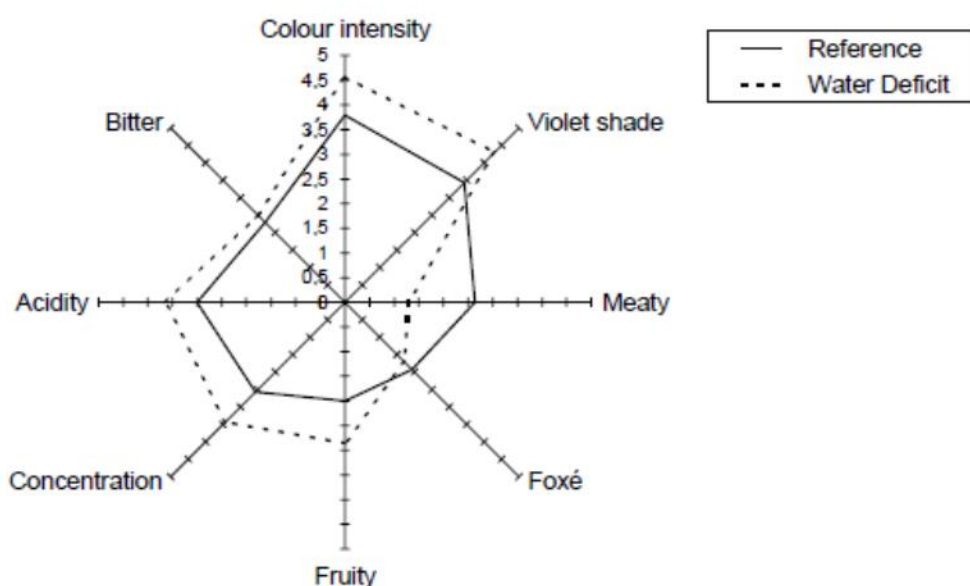
Το νερό είναι από τους πλέον βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των πρέμνων, αφού είναι το μέσον με το οποίο τα θρεπτικά στοιχεία εισέρχονται δια των ριζών στα φυτικά όργανα. Τα πρέμνα έχουν ανάγκη ορισμένης ποσότητας νερού σε καθορισμένες περιόδους κατά τον ετήσιο κύκλο βλάστησης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλλαγές στην υδατική κατάσταση του πρέμνου, σε κρίσιμα φαινολογικά στάδια, έχουν άμεση επίδραση στη σύσταση των σταφυλιών και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του, επηρεάζοντας τη βλαστική του ανάπτυξη, την απόδοση, το μικροκλίμα και το μεταβολισμό του [Acevedo-Orazo S., et al., 2010]. Κατά συνέπεια, η σύσταση σε φλαβονοειδείς ενώσεις, επηρεάζεται από την υδατική κατάσταση στο πρέμνο κατά την περίοδο ανάπτυξής του.

Η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στην συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών, εμφανίζει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα.

Σύμφωνα με τον [Bucchetti B. et al, 2011], η έλλειψη νερού από την έναρξη της ωρίμανσης μέχρι και την λήξη της (δηλαδή μέχρι την συγκομιδή), οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις ανθοκυανών και τανινών στις ράγες, ενώ δεν είναι ακόμη σαφές εάν και σε ποιο βαθμό αυτή η έλλειψη επηρεάζει άμεσα το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ανθοκυανών και των τανινών στις ράγες της σταφυλής. Η έναρξη της ωρίμανσης και ο ρυθμός της ωρίμανσης μπορεί να επιταχυνθεί ή να επιβραδυνθεί ανάλογα με το χρόνο και την ένταση της έλλειψης νερού. Επιπλέον, η υδατική έλλειψη αναστέλλει γενικά την ανάπτυξη των ραγών και την ανάπτυξη των φλοιών συγκεκριμένα, με τρόπο που εξαρτάται από τον χρόνο και την ένταση της υδατικής καταπόνησης. Το μέγεθος της ράγας, καθώς και η κατανομή των φλοιών και των γιγάρτων, αποτελούν παράγοντες ποιότητας της σταφυλής. Οι τανίνες ως γνωστόν, βρίσκονται στα γίγαρτα και στους φλοιούς. Οι τανίνες και οι ανθοκυάνες «μοιράζονται» τα διάφορα στάδια βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, αλλά η σύνθεση των τανινών ξεκινάει πιο νωρίς (πριν τον περκασμό), ενώ των ανθοκυανινών δεν έχει ξεκινήσει μέχρι τον περκασμό. Είναι κοινή παραδοχή ότι όταν η ανάπτυξη της ράγας αναστέλλεται, η προκύπτουσα συγκέντρωση των φλαβονοειδών στον καρπό ενισχύεται λόγω της αυξημένης επιφάνειας των φλοιών σε σχέση με τον όγκο της ράγας, καθώς και της αναλογίας γιγάρτων προς όγκο ράγας [Bucchetti B., et al., 2011].

Η χρήση προγράμματος άρδευσης μέσω αυτόματου ποτίσματος, αποτελεί ένα σύνολο τεχνικών διαδικασιών που επιτρέπει τη συχνότητα, και την ποσότητα της άρδευσης. Υπάρχουν τρεις τεχνικές για τον έλεγχο της άρδευσης. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται κυρίως στη μέτρηση (i) των περιβαλλοντικών μεταβλητών, όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η πίεση, η ηλιακή ακτινοβολία, η κατεύθυνση και η ταχύτητα του ανέμου (ii) οι μεταβλητές των φυτών, όπως η διαπνοή των πρέμνων, η ροή των χυμών και το μέγεθος των καρπών και (iii) μεταβλητές του εδάφους, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η αγωγιμότητα.

Η εφαρμογή ελεγχόμενης υδατικής καταπόνησης (ΕΥΚ) μετά τον περκασμό μέχρι και την συγκομιδή με διατήρηση της υγρασίας γύρω από τα πρέμνα στο 25%, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές βελτιώσεις στην ποιότητα της σταφυλής, μέσω της μείωσης της απόδοσης και του μεγέθους της ράγας. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η ΕΥΚ έχει θετική επίδραση στη σύνθεση και τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, υπάρχει θετική επίδραση της έλλειψης νερού στα μη – αρδευόμενα αμπέλια. Με χρήση συστήματος ελεγχόμενης υδατικής καταπόνησης, οι συγκεντρώσεις των φλαβανολών και των τανινών αυξάνονται συγκριτικά με την εφαρμογή πλήρους άρδευσης [Carparo F., et al., 2008]. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αντίστοιχων οίνων έχουν ως εξής:



Σχήμα 1.11. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε δείγματα οίνου αναφοράς και οίνου από μη αρδευόμενα αμπέλια

Παρ' όλα αυτά, άλλες μελέτες (Downey et al., 2006; Castellarin et al., 2007, Roby et al., 2004) δείχνουν ότι οι προανθοκυανιδίνες επηρεάζονται ελάχιστα από την έλλειψη νερού και η αύξηση των τανινών των φλοιών που συνοδεύουν την έλλειψη νερού, φαίνεται να προέρχονται περισσότερο από τη διαφορετική ανάπτυξη του εσωτερικού μεσοκαρπίου και του εξωκαρπίου, παρά από άμεσες επιπτώσεις της ελλιπούς άρδευσης στην βιοσύνθεση των φαινολικών. Σε παρόμοιες μελέτες [Zarrouk O., et al., 2012], διαπιστώθηκε ότι το σύνολο των προανθοκυανιδινών ήταν υψηλότερο στη φάση της πλήρους ωρίμανσης στα συνεχώς αρδευόμενα πρέμνα απ' ότι στα ελεγχόμενα αρδευόμενα και τα μη αρδευόμενα. Ωστόσο, δεν ήταν δυνατόν να επιβεβαιωθεί αν η αύξηση αυτή οφειλόταν σε αύξηση της βιοσύνθεσης των προανθοκυανιδινών. Πιο πρόσφατα, έρευνες έδειξαν (Lacampagne et al., 2010) ότι η εφαρμογή ABA επηρεάζει το προανθοκυανιδινικό περιεχόμενο, μειώνοντας τη δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση τους (LAR και ANR). Αυτό αποτελεί στοιχείο που θα μπορούσε να εξηγήσει την αναστολή της βιοσύνθεσης των προανθοκυανιδινών στα μη αρδευόμενα πρέμνα, αφού το ενδογενές ABA παρουσιάζει

αύξηση στους καρπούς των ελεγχόμενα αρδευόμενων και μη αρδευόμενων αμπελιών. Με βάση την ίδια έρευνα [Zargouk O., et al., 2012], η έντονη διακύμανση της συγκέντρωσης των προανθοκυανιδινών που παρατηρήθηκε κατά τις διαφορετικές χρονιές μελέτης τους, είναι ένα γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, ξηρότητα του αέρα κ.α.) μπορεί να επιδράσουν σημαντικά στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των προανθοκυανιδινών.

Σύμφωνα με αντίστοιχες δημοσιεύσεις, [Koundouras S., et al., 2009] η προανθοκυανιδινική βιοσύνθεση μειώθηκε με την έλλειψη νερού από την καρπόδεση μέχρι και τη συγκομιδή, τόσο στο τανικό προφίλ όσο και στην παρουσία μονομερών 3-φλαβανολών, ενώ παράλληλα σημειώθηκε και αύξηση του βαθμού πολυμερισμού των τανινών.

Σε έρευνες [Romero P., 2012] που πραγματοποιήθηκαν σε πρέμνα με ελεγχόμενη υδατική έλλειψη από την εκβλάστηση μέχρι τη συγκομιδή (10–30% ETc) και σε πρέμνα με συνεχή υδατική καταπόνηση, τα αποτελέσματα δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά στο τανικό δυναμικό. Ως συνέπεια του συνεχούς υδατικού στρες, η φυλλική επιφάνεια παρουσίασε σημαντική μείωση, με αποτέλεσμα να έχουμε μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου (τανίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις), σε σύγκριση με τα ελεγχόμενα αρδευόμενα πρέμνα.

1.4. Επίδραση των καλλιεργητικών τεχνικών στη συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών

Οι καλλιεργητικές τεχνικές αποσκοπούν στην επίτευξη της καλύτερης δυνατής ισορροπίας μεταξύ ζηρηρότητας των πρέμνων και της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Με τη σωστή επιλογή του συστήματος μόρφωσης, επιτυγχάνεται η καλύτερη αξιοποίηση του φυλλώματος, με στόχο την πρόσληψη των απαραίτητων ποσοτήτων ηλιακής ακτινοβολίας από το φυτό. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους [Cortell J.M., et al., 2005], οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών απαντούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε πρέμνα χαμηλής ζηρηρότητας, ενώ παρατηρείται αύξηση της αναλογίας των επιγαλοκατεχινών στις τανίνες, καθώς και αύξηση του μεγέθους των πολυμερών.

1.5. Επίδραση των φλαβονοειδών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου

Τα κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με τα φλαβονοειδή, είναι η στυπτικότητα, ενώ οι χαμηλότερου μοριακού βάρους φλαβανόλες συνεισφέρουν και στην πικράδα.

Ο όρος στυπτικότητα περιγράφεται ως ξήρανση, «λείανση» ή ζάρωμα του βλεννογόνου του στόματος. Ωστόσο, είναι γενικά αποδεκτό ότι δεν αποτελεί μια γεύση αντιληπτή μέσω της αναγνώρισης από τους υποδοχείς γεύσης, αλλά μια απτική αίσθηση [Andersen M., et al., 2006].

Η στυπτικότητα των τανινών είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων τους με τις σιελογόνους πρωτεΐνες και τις γλυκοπρωτεΐνες, ιδιαίτερα τις πλούσιες σε προλίνη

πρωτεΐνες, προκαλώντας μείωση της λιπαρότητας του σάλιου, ή με τις γλυκοπρωτεΐνες του επιθηλίου του στόματος. Η χημική συγγένεια των πολυφαινολών με τις πρωτεΐνες εξαρτάται κυρίως από την παρουσία αρκετών φαινολικών δακτυλίων σε ένα μόριο τανίνης, επιτρέποντας τη δημιουργία γεφυρών με τις πρωτεΐνες ή με άλλες πολυφαινόλες. Όλα τα φλαβονοειδή μπορούν να καταβυθίσουν τις πρωτεΐνες, εάν υπάρχουν σε επαρκείς ποσότητες, ενώ η καθίζηση αυξάνει με τον βαθμό πολυμερισμού και τον αριθμό των μονάδων γαλλικών εστέρων στην πολυφαινολική διαμόρφωση. Παρ' όλα αυτά, η καθίζηση δεν αντανακλά αναγκαστικά την ένταση της στυπτικότητας η οποία μπορεί επίσης να σχετίζεται με αλλαγές στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών που προκαλείται από τον σχηματισμό διαλυτών συμπλοκών με τις τανίνες [Andersen M., et al., 2006].

Η στυπτικότητα των προανθοκυανιδινών, αυξάνει με το μήκος της αλυσίδας, μέχρι το επίπεδο του οκταμερούς ή ακόμα και μέχρι το επίπεδο δεκαμερών κλασμάτων και πέρα από την τιμή αυτή μειώνεται, ενώ τα πολυμερή γίνονται αδιάλυτα. Παρ' όλα αυτά, υψηλότερου μοριακού βάρους προανθοκυανιδίνες ($MDP > 20$) που είναι παρούσες στον ερυθρό οίνο, καταβυθίστηκαν επιλεκτικά με πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν ως διαυγαστικά μέσα, κάτι που σημαίνει ότι παρέμεναν διαλυτές και πιθανώς συνέβαλαν και αυτές στη στυφάδα του οίνου. Σε οργανοληπτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό παρουσίας γαλλικών εστέρων και μονάδων επιγαλλοκατεχίνης σε πολυμερή κλάσματα (mDP 30, 70) αυξάνει και τη στυφάδα τους [Andersen M., et al., 2006].

Η μείωση της στυπτικότητας που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου, συνήθως αποδίδεται στην μετατροπή των προανθοκυανιδινών σε λιγότερο στυφά και αδιάλυτα παράγωγα μέσω αντιδράσεων πολυμερισμού. Από την άλλη πλευρά, οι αντιδράσεις των φλαβονοειδών στον οίνο δεν οδηγούν μόνο στον σχηματισμό μεγαλύτερων μορίων μέσω της γέφυρας της ακεταλδεΐδης που προκαλεί πολυμερισμούς και σχηματισμό συμπλόκων ανθοκυανινών-φλαβονολών, αλλά και σχηματισμό χαμηλότερου μοριακού βάρους ενώσεων μέσω οξειδωτικής υδρόλυσης, ειδικά εάν μεγάλες ποσότητες μονομερών φλαβονοειδών όπως οι ανθοκυανίνες, είναι παρούσες. Μια μείωση του μεγέθους των μορίων του οίνου, μπορεί να θεωρηθεί ως μια πιθανή εναλλακτική εξήγηση για την απώλεια στυπτικότητας που σχετίζεται με την παλαίωσή του [Andersen M., et al., 2006].

Οι ανθοκυανίνες, δεν συμβάλλουν ούτε στην πικράδα ούτε στη στυφή γεύση. Παρ' όλα αυτά, η συμπλοκοποίησή τους με τις τανίνες και κατά πόσο αυτή επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις τους με τις πρωτεΐνες και τις ιδιότητες της γεύσης, μένει να διερευνηθεί [Andersen M., et al., 2006].

Η γευστική αίσθηση που προσδίδουν οι φλαβανόλες σε μεγάλο βαθμό επηρεάζεται από άλλα συστατικά του μέσου. Ειδικότερα, η μείωση του pH, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της στυπτικότητας, ενώ η αύξηση του επιπέδου της αιθανόλης ενισχύει την πικράδα. Η γευστική αντίληψη των τανινών μπορεί επίσης να μεταβληθεί από την παρουσία πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση των τανινών με διαλυτές πηκτίνες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού της σταφυλής, εμποδίζει τη σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες του σιέλου. Αναλύσεις των οίνων πριν και μετά την

προσθήκη διαυγαστικής πρωτεΐνης, έδειξαν σημαντική μείωση της συτυπικότητας, λόγω του σχηματισμού διαλυτών συμπλόκων τανίνης-πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία καταβυθίζονται μαζί με την απομάκρυνση ιδιαίτερα των τανινών με έντονη παρουσία γαλλικών εστέρων [Andersen M., et al., 2006].

Οργανοληπτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν ότι η πικράδα των φλαβονολών εξαρτάται από τη δομή των τανινών. Πιο συγκεκριμένα, μειώνεται από τα μονομερή στα τριμερή. Η επικατεχίνη θεωρήθηκε πιο πικρή από την κατεχίνη και το διμερές της κατεχίνης με σύνδεση C4-C6 πιο πικρή από άλλα διμερή προκυανιδίνης με σύνδεση C4-C6. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον υψηλότερο λιπόφιλο χαρακτήρα αυτών των μορίων που διευκολύνει τη διάχυσή τους στους γευστικούς υποδοχείς. Η πικράδα των κλασμάτων προκυανιδίνης μειώθηκε με την αύξηση του ποσοστού της αιθανόλης στο οινικό διάλυμα [Andersen M., et al., 2006; Grant E., et al., 2010].

Τέλος, οι συμπυκνωμένες τανίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του χρώματος των ερυθρών οίνων. Οι ανθοκυανίνες, όπως οι γλυκοζίτες της μαλβιδίνης, και τα πολυμερή που σχηματίζονται μεταξύ των ανθοκυανινών και των τανινών, είναι κυρίως υπεύθυνα για το κόκκινο χρώμα του οίνου. Τα χρωστικά πολυμερή ορίζονται ως τα πολυμερή όπως οι προανθοκυανιδίνες τα οποία συνδέονται με μια χρωστική ουσία (ένα έγχρωμο μόριο) όπως οι ανθοκυανιδίνες. Οι ανθοκυανιδίνες είναι εξαιρετικά ασταθείς ενώσεις οι οποίες μπορούν να αποχρωματιστούν όταν αντιδρούν με το SO₂ και με αλλαγή του pH, με αποτέλεσμα το χρώμα των οίνων να μεταβάλλεται σύμφωνα με τις αντίστοιχες συνθήκες. Σε αντίθεση με τις μονομερείς ανθοκυανιδίνες, τα χρωστικά πολυμερή είναι ανθεκτικά στις επιδράσεις του pH και του SO₂, και αυτό βοηθά στην σταθεροποίηση του χρώματος στους ερυθρούς οίνους [Grant E., et al., 2010].

1.6. Βιολογικές ιδιότητες

Οι βιολογικές ιδιότητες των προανθοκυανιδινών καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων. Τέτοιες είναι η αντιοξειδωτική τους δράση, η αντιβακτηριακή, αντι-ική, αντικαρκινική, αντι-φλεγμονώδης, αντι-αλλεργική και η αγγειοδιασταλτική τους δράση. Οι προανθοκυανιδίνες έχουν επίσης αναφερθεί ότι αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την τριχοειδή διαπερατότητα και ευθραυστότητα, ενώ επηρεάζουν ενζυμικά συστήματα όπως της φωσφολιπάσης A2, της κυκλοοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης [Fine A., et al., 2000]. Ο προστατευτικός ρόλος των προανθοκυανιδινών λοιπόν, αποδίδεται ακριβώς σ' αυτήν την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, να απενεργοποιούν μέταλλα υπεύθυνα για την πρόκληση οξειδωσης και να εμποδίζουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων. [Αποστολάκης Κ.]

Η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών από την αντιοξειδωτική δράση των προανθοκυανιδινών έχει τεκμηριωθεί εκτενώς σε ερευνητικές μελέτες. In vino και in vitro μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα προανθοκυανιδινών από γίγαρτα σταφυλής εμφάνισαν τη βέλτιστη δράση κατά των ελευθέρων ριζών και λειτουργούν καλύτερα ως αναστολείς της οξειδωτικής βλάβης των ιστών ακόμα και από τους αντιοξειδωτικούς συνδυασμούς βιταμίνης C, βιταμίνης E, ηλεκτρικού οξέος και β-καροτένιου [Fine A., et al., 2000].

Η χημική δομή των φλαβονοειδών επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Ενώσεις με δύο γειτονικά υδροξύλια στον αρωματικό δακτύλιο, λειτουργούν καλύτερα για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, από τις ενώσεις με ένα μόνο αρωματικό υδροξύλιο [Αποστολάκης Κ.].

Τα OPCs (ολιγομερή σύμπλοκα προανθοκυανιδινών) εμφάνισαν μεγάλη παρουσία σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκοζαμινογλυκάνες (επιδερμίδα, τριχοειδή τοιχώματα, γαστρεντερικός βλεννογόνο, κλπ.). Αυτό το χαρακτηριστικό τις καθιστά χρήσιμες για τη μείωση της αγγειακής διαπερατότητας και την ενίσχυση της αντοχής των τριχοειδών, την αγγειακή λειτουργία, και την περιφερειακή κυκλοφορία [Fine A., et al., 2000].

1.6.1. Θεραπευτικές εφαρμογές

Η βλάβες που προκαλούνται από τη δράση των ελεύθερων ριζών, συσχετίζεται με τις περισσότερες χρόνιες και εκφυλιστικές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων, της αρθρίτιδας, και τον καρκίνο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικές και προκαλούν βλάβη στους ιστούς μέσω αντίδρασής τους με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες, με τα νουκλεοτίδια στο DNA, και με πρωτεΐνες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέρχονται ενδογενώς μέσω του φυσιολογικού μεταβολισμού και εξωγενώς από το μολυσμένο αέρα, το νερό, τα μολυσμένα από φυτοφάρμακα τρόφιμα ή από την έκθεση σε ακτινοβολία [Fine A., et al., 2000].

Λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, το θεραπευτικό δυναμικό των προανθοκυανιδινών είναι αρκετά ευρύ. Στην Ευρώπη, οι προανθοκυανιδίνες χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία αγγειακών διαταραχών όπως η φλεβική ανεπάρκεια, οι κιρσοί και για μικροαγγειακά προβλήματα όπως η ευθραυστότητα των τριχοειδών και των αμφιβληστροειδοπαθειών [Fine A., et al., 2000].

Οι προανθοκυανιδίνες είναι οι ουσίες που δίνουν την εξήγηση για το "γαλλικό παράδοξο". Με βάση το φαινόμενο αυτό, παρατηρήθηκε ότι στη Γαλλία, όπου πρόσληψη κορεσμένων λιπών είναι αυξημένη, τα ποσοστά της αθηροσκλήρωσης και της στεφανιαίας νόσου που θα περίμενε κανείς ότι θα παρουσιάζονται στον πληθυσμό, είναι παραδόξως αναλογικά μειωμένα. Όταν αυτό το παράδοξο παρατηρήθηκε για πρώτη φορά, οι έρευνες επικεντρώθηκαν στην κατανάλωση αλκοόλ με τη μορφή του ερυθρού οίνου ως αποτρεπτικό παράγοντα, αλλά τα αποτελέσματα ήταν διφορούμενα. Περαιτέρω έρευνες, αποκάλυψαν ότι οι φαινολικές ουσίες του ερυθρού οίνου, όπως οι προανθοκυανιδίνες, έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μειώνοντας την οξείδωση της ανθρώπινης LDL, ενώ αναστέλλει την κυκλοοξυγονάση και την λιποξυγονάση των αιμοπεταλίων, μειώνοντας έτσι τη θρομβωτική και καρδιαγγειακή προδιάθεση [Fine A., et al., 2000].

Διάφορα πειραματικά μοντέλα αποδεικνύουν ότι ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών έχει αντικαρκινική δράση. Τα μόρια αυτά, φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου. Τα φλαβονοειδή έχουν σημαντική επίδραση στη βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών [Αποστολάκης Κ.].

Μελέτες δείχνουν ότι η χρόνια φλεγμονή σχετίζεται με την αιτιολογία πολλών ειδών καρκίνου. Αναστολείς του ενζύμου της κυκλοοξυγονάσης όπως ορισμένα φλαβονοειδή (κερκετίνη, κατεχίνη, προανθοκυανιδίνες, κυανιδίνη) θεωρούνται κύριοι προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου [Αποστολάκης Κ.].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ – INFRARED SPECTROSCOPY, IR

2.1. Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου (IR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές, με πολλές εφαρμογές, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών, καθώς και η πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Για τον λόγο αυτό η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στην οργανική χημεία, τη φαρμακογνωσία και την ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.α.

Το υπέρυθρο (Infrared – IR) είναι εκείνο το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, το οποίο εκτείνεται πέρα από το ορατό και φθάνει μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm). Διακρίνεται σε 3 περιοχές: το εγγύς υπέρυθρο (Near IR, NIR): 0,75-2,5 μm , το κυρίως ή μέσο υπέρυθρο (Mid IR, MIR): 2,5-50 μm και το άπω υπέρυθρο (Far IR, FIR): 50-1000 μm .

Τα φάσματα υπέρυθρου είναι φάσματα απορρόφησης. Στα φάσματα IR δεν χρησιμοποιείται η συχνότητα ή το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας, αλλά εισάγεται μια νέα έννοια, η έννοια του κυματαριθμού (ν), ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός. Τελικά, ο κυματαριθμός ν δίνεται από την σχέση:

$$\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})}$$

όπου λ : το μήκος κύματος της ακτινοβολίας [Παππάς Χ., 2000, Βαλαβανίδης 2006].

2.1.1. Αρχή Φασματοσκοπίας Υπέρυθρου

Τα άτομα των μορίων ακόμη και στην βασική ενεργειακή τους κατάσταση δεν παραμένουν ποτέ ακίνητα, αλλά αντιθέτως εκτελούν κινήσεις δόνησης και περιστροφής. Όταν μια ποσότητα ύλης δεχθεί υπέρυθη ακτινοβολία, ένα ποσοστό από τα μόρια που δέχονται την ακτινοβολία διεγείρονται, αυξάνοντας την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους.

Για να λάβει χώρα απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπέσει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού.

Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόρια εξαρτώνται από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου. Αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR μόνο εφόσον μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης.

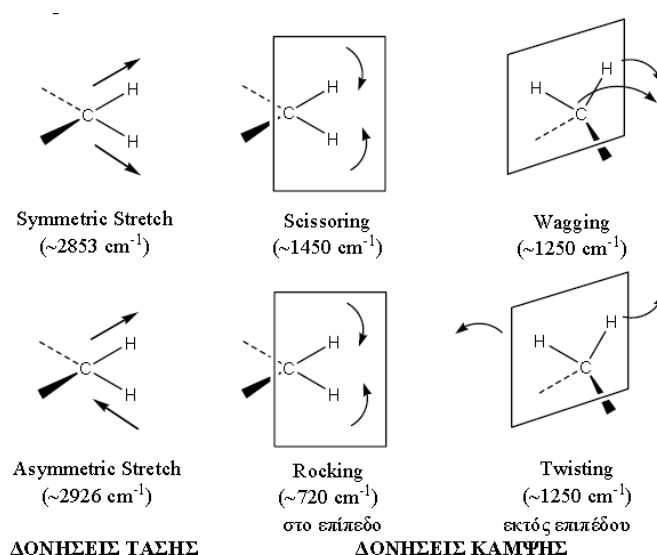
Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση.

Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

Δονήσεις τάσης: Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

Δονήσεις κάμψης: Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών.

Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις. Υπάρχουν δηλαδή και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό «σειείται» (wagging), «κλυδωνίζεται» (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.



Οι μοριακές ταλαντώσεις ορισμένων ομάδων είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικές. Για αυτό και η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι κατάλληλη για τον χαρακτηρισμό ορισμένων ομάδων σε ένα μόριο (π.χ. υδροξύλια, καρβοξύλια, αμινομάδες, διπλοί και τριπλοί δεσμοί κ.α).

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (π.χ. O-H, NH₂, C=O κλπ) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στην περιοχή 4000-1400cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη στην περιοχή 1400-600cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» κάθε ένωσης.

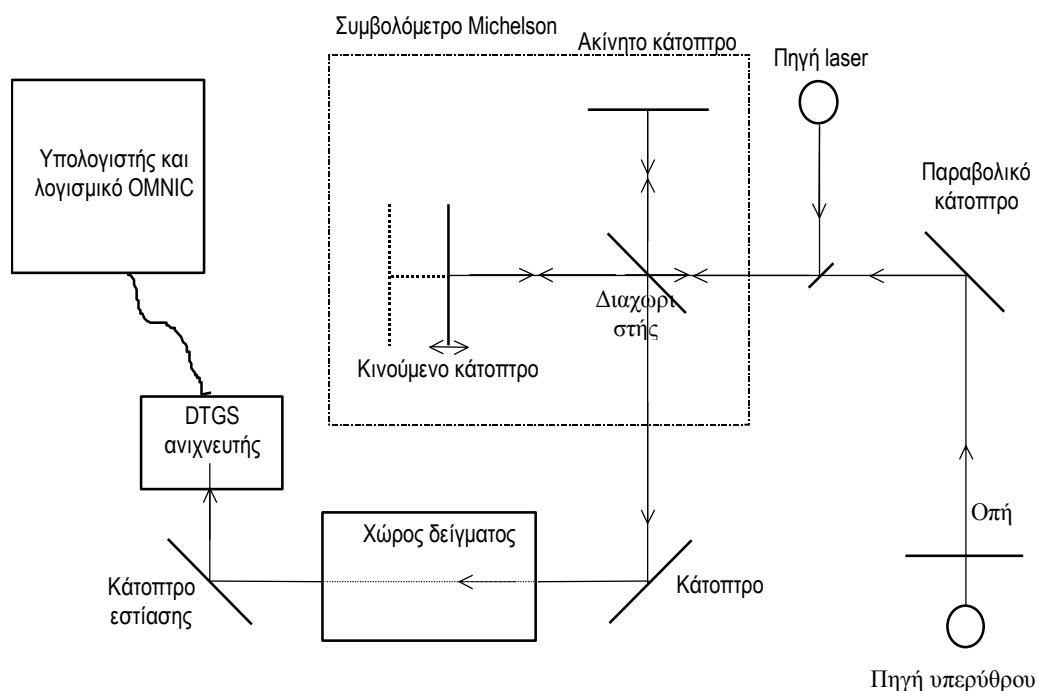
Στην παραπάνω περιοχή (από 4000-600 cm⁻¹), που συνήθως χρησιμοποιείται στο IR, η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των

απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο "θόρυβος" να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκε με την φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR). Πρόκειται για μια τεχνική μέτρησης για την συλλογή των υπέρυθρων φασμάτων στην οποία αντί να καταγράφεται το ποσό της ενέργειας που απορροφάται για διαφορετικές συχνότητες της ακτινοβολίας, η ακτινοβολία IR οδηγείται στο δείγμα αφού πρώτα διαμορφωθεί μέσω ενός συμβολόμετρου. Αφού περάσει μέσα από το δείγμα, το μετρούμενο σήμα είναι το συμβολογράφημα. Η εκτέλεση μετασχηματισμού Fourier στο συμβολογράφημα, έχει ως αποτέλεσμα ένα φάσμα όμοιο με εκείνο που παίρνουμε από τη συμβατική φασματοσκοπία διασποράς [Παππάς Χ., 2000, Βαλανίδης, 2006, Μέθοδοι χαρακτηρισμού και υλικών 2010].

2.1.2. Το όργανο και η βαθμονόμηση του

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR), είναι μια από τις πιο σημαντικές σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιείται σχετικά εύκολα, ενώ στη συνέχεια γίνεται σύγκρισή τους με άλλα γνωστά. Με τον τρόπο αυτό και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, είναι δυνατή η ταυτοποίηση άγνωστων οργανικών ουσιών, η πιστοποίηση καθαρότητάς τους κ.α.

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα: την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, την πηγή λέιζερ, το συμβολόμετρο Michelson και τον ανιχνευτή. Στο σχήμα 2.1. φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FT-IR 6700 της εταιρείας Thermo-Nicolet.



Σχήμα 2.1. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR 6700 της εταιρείας Thermo-Nicolet.

Πηγή ακτινοβολίας: Σαν πηγή ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ράβδος από κεραμικό υλικό, το οποίο μετά από ηλεκτρική θέρμανση, δίνει ένα μεγάλο μέρος σε υπέρυθρη ακτινοβολία. Συνήθως χρησιμοποιείται λυχνία νικελίου-χρωμίου (Nicrome). Η συγκεκριμένη λυχνία είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200-1250°C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσο - υπέρυθρου. Το μειονεκτήματα της πηγής αυτής είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και σχετικά μικρή περίοδο ζωής.

Πηγή λέιζερ: Υπάρχει μια πηγή Laser με διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe).

Συμβολόμετρο Michelson: Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR είναι χωρίς επιλογέα μήκους κύματος αλλά η λειτουργία τους στηρίζεται στο φαινόμενο της συμβολής με τη βοήθεια ενός συμβολομέτρου Michelson. Αποτελείται από μια ημιδιαφανή πλάκα, τον διαχωριστή δέσμης από KBr που δεν απορροφά στο υπέρυθρο και από ένα κινητό και ένα ακίνητο κάτοπτρο.

Ανιχνευτής: Ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να ανιχνεύσει την υπέρυθρη ακτινοβολία που έχει διέλθει από το δείγμα. Ένας συνήθης ανιχνευτής, κατασκευάζεται από δευτεριωμένηθειική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Η λειτουργία του συγκεκριμένου ανιχνευτή στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του όταν δέχεται υπέρυθρη ακτινοβολία. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Οποιαδήποτε διακύμανση της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας λόγω απορρόφησης από το δείγμα, εκφράζεται από τον ανιχνευτή σαν μεταβολή τάσης η οποία στη συνέχεια στέλνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ανιχνευτές αυτού του είδους έχουν το πλεονέκτημα ότι ανταποκρίνονται σε μεγάλη περιοχή του υπέρυθρου, παράγουν μικρό θόρυβο και δεν χρειάζονται ψύξη, ενώ τα μειονεκτήματα είναι η σχετικά μικρή ευαισθησία τους και ο σχετικά μεγάλος χρόνος απόκρισής τους.

Πριν αρχίσει η καταγραφή οποιουδήποτε φάσματος πρέπει να γίνει βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου με μία γνωστή ουσία (calibration). Στην περίπτωση της παρούσας μελέτης έγινε χρήση σκόνης βρωμιούχου καλίου (KBr).

2.2. Λειτουργία φασματοφωτόμετρου FT-IR

Η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται, μέσω ενός παραβολικού κατόπτρου προσπίπτει στον διαχωριστή δέσμης. Στο σημείο αυτό διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, η μία εκ των οποίων τον διαπερνά και προσπίπτει στο κινούμενο κάτοπτρο, ενώ η άλλη κατευθύνεται προς το ακίνητο κάτοπτρο. Οι δύο δέσμες επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της συμβολής και προκύπτει μια συνελιγμένη δέσμη.

Το διπλάσιο της διαφοράς των αποστάσεων των δύο κατόπτρων, άρα των διαδρομών των δύο δεσμών, ονομάζεται καθυστέρηση και συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα δ . Όταν $\delta = k\lambda$ (όπου $k=0,1,2,\dots$ και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) τότε το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή, ενώ όταν $\delta = (2k+1)\lambda/2$ τότε το σήμα μηδενίζεται. Σε κάθε άλλη περίπτωση το σήμα λαμβάνει ενδιάμεση τιμή.

Η πηγή εκπέμπει μια σειρά από συχνότητες μονοχρωματικής ακτινοβολίας (ν_1, ν_2, \dots), οι οποίες ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία δημιουργούν ένα περίπλοκο σήμα, τη συνολική συνελιγμένη δέσμη, που στην πραγματικότητα αποτελείται από ένα μίγμα ακτινοβολιών.

Η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του δείγματος. Από το δείγμα απορροφώνται ολικά ή μερικά ορισμένες συχνότητες και στη συνέχεια η δέσμη εξέρχεται και εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο. Ακολούθως κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή, η θερμοκρασία του οποίου μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαφοράς δυναμικού. Η μεταβολή της τάσης μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα και με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού (OMNIC ver. 7.4.127) λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Το συμβολόγραμμα υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό FT-IR φάσμα.

Το σήμα που στέλνει η πηγή υπέρυθρου είναι συνάρτηση συχνοτήτων και συνεπώς κυματαριθμών. Όταν το σήμα εισέλθει στο συμβολόμετρο υπόκειται σε συμβολή με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Ο τύπος όμως της συμβολής ουσιαστικά εξαρτάται από την καθυστέρηση του κινουμένου κατόπτρου και επομένως το συμβολόγραμμα, είναι συνάρτηση της καθυστέρησης και ως τέτοια φθάνει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό «εργαλείο» με τη βοήθεια του οποίου το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται ξανά σε συνάρτηση κυματαριθμών με βάση τον τύπο

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta$$

όπου $B(\bar{\nu})$ η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή, και $I(\delta)$ η συνάρτηση καθυστέρησης. Ο παραπάνω τύπος αποτελεί το γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) με τη βοήθεια του οποίου ο αριθμός των σημείων που εξετάζονται και υπόκεινται στο μετασχηματισμό είναι μειωμένος και επομένως η όλη διαδικασία γίνεται ταχύτερη.

Ουσιαστικά με το μετασχηματισμό Fourier προκύπτουν όλες οι συχνότητες της περιοχής του υπέρυθρου φάσματος που μελετάται. Δηλαδή τα κενά των συχνοτήτων που απορροφήθηκαν από το δείγμα (μερικά ή ολικά) μετασχηματίζονται μαζί με τις συχνότητες που δεν απορροφήθηκαν, σε τυπικό IR φάσμα.

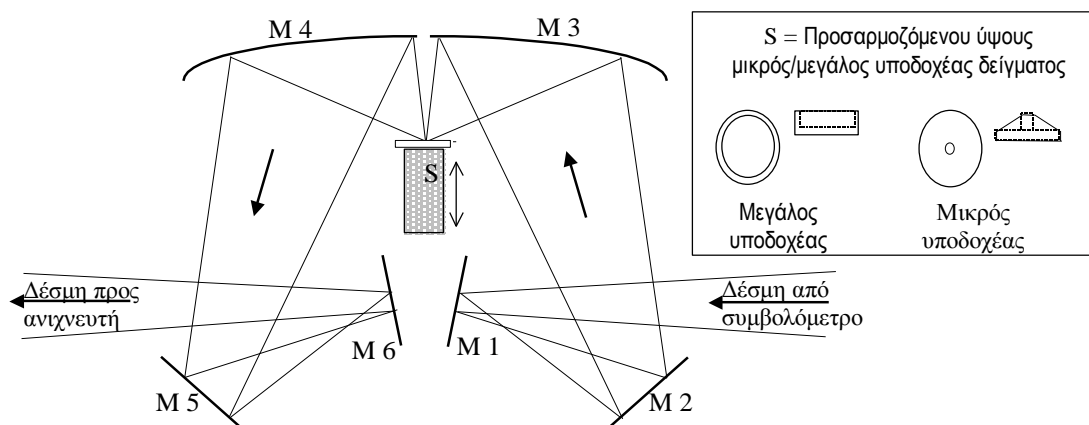
Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR μπορούν, χάρις στο συμβολόμετρο, να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 10-20 δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνεται συνήθως 20-100 φορές. Το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων “σαρώσεων” που έχουν εκτελεστεί. Με αυτόν τον τρόπο όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο «θόρυβος» μειώνεται και οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σημαντικά. Έτσι, η καταγραφή φασμάτων με το μετασχηματισμό Fourier παρουσιάζει, εκτός της υψηλής ταχύτητας καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Επιπλέον μπορούν να αφαιρεθούν ή να προστεθούν δύο φάσματα, να μεγεθυνθεί τμήμα του φάσματος, να διορθωθεί η βασική γραμμή κλπ. Αρνητικοί παράγοντες στην ποιότητα των FT-IR φασμάτων είναι: α) η

υγρασία του δείγματος και β) η υγρασία του χώρου τοποθέτησης του δείγματος. Η υγρασία του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλή. Αυτό σε μεγάλο βαθμό μπορεί να λυθεί με την τεχνική της λυοφιλίωσης των δειγμάτων. Η υγρασία του χώρου του δείγματος μειώνεται με την τοποθέτηση μέσα σ' αυτόν αφυδραντικών (π.χ. silica gel) ή τη διαβίβαση ξηρού αέρα ή αζώτου. Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, στο φάσμα καταγράφονται και εκείνα τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος καταγράφεται φάσμα αναφοράς, όπου στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σκόνη βρωμιούχου καλίου (KBr). Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα, με τη βοήθεια του λογισμικού, από το συνολικό φάσμα.

Πριν από την καταγραφή φασμάτων πρέπει να γίνεται ευθυγράμμιση των οπτικών μερών του φασματοφωτομέτρου. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου. Κύρια η ευθυγράμμιση αποσκοπεί στο να είναι οι γωνίες που σχηματίζει ο διαχωριστής δέσμης με το κινούμενο και το ακίνητο κάτοπτρο ίσες [Παππάς Χ., 2000].

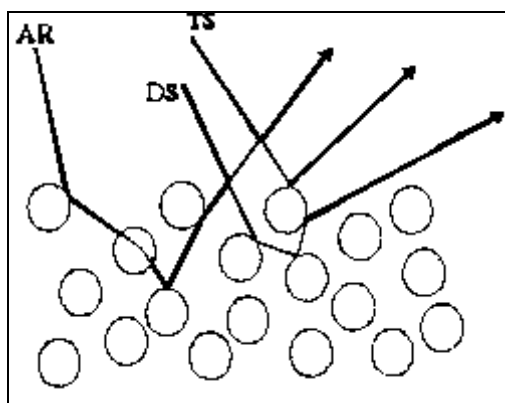
2.3. Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance IR, DRIFT)

Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης είναι μία από τις τεχνικές λήψης FT-IR φασμάτων από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως σε μορφή σκόνης χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού (π.χ. KBr). Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (Σχ.2.2). Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα. Τα κάτοπτρα M1, M2 και M3 εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα M4, M5 και M6 εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) μπορεί να είναι δύο μεγεθών. Ο μεγαλύτερος έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm ενώ ο μικρός 3 και 2 mm αντίστοιχα.



Σχήμα 2.2. Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης (DRIFT).

Με την τεχνική DRIFT, η υπέρυθη ακτινοβολία ανακλάται από το δείγμα αντί να περνά μέσα από αυτό.



Σχήμα 2.3. Τα τρία είδη ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα με μορφή σκόνης (AR: απορροφητικά ανακλώμενη, DS: διαχυτικά ανακλώμενη, TS: αληθινά ανακλώμενη).

Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά η ανάκλαση είναι το φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η τεχνική DRIFTS. Όμως η υπέρυθη ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις. Την απορροφητική, τη διαχυτική και την αληθινή ανάκλαση (Σχ.2.3). Από τα τρία αυτά είδη ανάκλασης μόνον η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα. Το μέρος της ακτινοβολίας που θα απορροφηθεί και στη συνέχεια θα ανακλαστεί, δηλαδή η απορροφητική ανάκλαση, εξαρτάται από: α) το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, β) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα γ) το δείκτη διάθλασης του δείγματος καθώς και από δ) τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας επάνω στο δείγμα.

Η μέθοδος DRIFTS χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια γιατί είναι απλή, πάρα πολύ γρήγορη και δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του δείγματος. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με το δείγμα ως έχει, είτε με ανάμιξη σε αναλογία συνήθως 1:100 με KBr ή χλωριούχο κάλιο (KCl). Όταν εξετάζονται μίγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ομογενοποίησή τους.

2.4. Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

Οι συνήθεις επεξεργασίες που γίνονται στα FT-IR φάσματα είναι η εξομάλυνση του σήματος και η διόρθωση της βασικής γραμμής. Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς.

2.4.1. Αυτόματη εξομάλυνση (Automatic smooth)

Με την εξομάλυνση δεν εξαλείφεται ο θόρυβος αλλά μειώνεται αισθητά χωρίς να παραποιείται η εικόνα του φάσματος, με βάση μία μαθηματική επεξεργασία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος σήματος προς θόρυβο (**Signal-to-Noise Ratio, RSN**). Για την βελτίωση του RSN χρησιμοποιείται η διαδικασία υπολογισμού της τετραγωνικής ρίζας του μέσου όρου του αθροίσματος των τετραγώνων (**Root Mean Square, RMS**) των RSN επιλεγμένων σημείων, εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο των Savitsky-Golay. Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί ένα πολυωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προσαρμόζει την καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία “αυτόματη εξομάλυνση” του λογισμικού OMNIC ver. 7.4.127 των φασματομέτρων της εταιρείας Thermo-Nicolet, χρησιμοποιεί τον παραπάνω αλγόριθμο με πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού και πέντε επιλεγμένα σημεία.

2.4.2. Διόρθωση βασικής γραμμής (Automatic baseline correct)

Η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR συνήθως αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν, γι' αυτό συνήθως γίνεται διόρθωσή της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δεν γίνεται μόνον για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση.

Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται είτε με αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό είτε με καθοδηγούμενη. Στη δεύτερη περίπτωση οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η γραμμική, της κυβικής σφήνας και η πολυωνυμική.

Στην γραμμική τεχνική επιλέγονται τα σημεία τα οποία θεωρούνται ότι έχουν απορρόφηση μηδέν και όλο το φάσμα προσαρμόζεται κατάλληλα, ενώ στην τεχνική της κυβικής σφήνας, διαδοχικές ομάδες τεσσάρων σημείων υπόκεινται σε προσαρμογή τριτοβάθμιου πολυωνύμου. Τέλος με την πολυωνυμική τεχνική, γίνεται προσαρμογή της γραμμής βάσης σε πολυώνυμο ο βαθμός του οποίου αυξάνει (με μέγιστο βαθμό 6) ανάλογα με τα σημεία που επιλέγονται.

2.4.3. Μέσος όρος φασμάτων

Το λογισμικό του οργάνου έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει τον μέσο όρο φασμάτων. Η λειτουργία αυτή μας επιτρέπει να καταγράφουμε περισσότερα του ενός φάσματα και στη συνέχεια να υπολογίζεται ο μέσος όρος των φασμάτων και να παρουσιάζεται ως φάσμα. Το μέσο φάσμα είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Στατιστικές Μέθοδοι Πολλών Μεταβλητών – Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, (Partial Least Squares, PLS)

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στον τομέα της αναλυτικής χημείας έχει αλλάξει σημαντικά με την εισαγωγή χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης, μέσω των οποίων υπάρχει η δυνατότητα ψηφιακής καταγραφής και επεξεργασίας ευρύτατων συνόλων δεδομένων. Η χημειομετρία είναι η μαθηματική μεθοδολογία (εφαρμογή στατιστικής και γραμμικής άλγεβρας) που επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνου του υποσυνόλου των δεδομένων που σχετίζεται με την ιδιότητα του αντικειμένου που μας ενδιαφέρει, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του αντικειμένου ή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιδιότητας που μας ενδιαφέρει. Σχετίζεται με το κλάδο της αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιεί στατιστικές μεθόδους ανάλυσης με τη βοήθεια πολλών μεταβλητών (multivariate calibration methods). Σε αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιείται πλήθος στοιχείων για την ανάλυση, έναντι ενός που χρησιμοποιείται στις στατιστικές μεθόδους μιας μεταβλητής. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου στατιστικής ανάλυσης είναι ότι το πλήθος των μεταβλητών συνεπάγεται και πλήθος πληροφοριών που σχετίζονται με τα δεδομένα. Οι μαθηματικές αυτές μέθοδοι πολλών μεταβλητών έχουν βρει ευρύ φάσμα εφαρμογών διεπιστημονικού χαρακτήρα.

Η κατάστροψη ποσοτικών μεθοδολογιών που θα επιτρέπει τον υπολογισμό της σύστασης μιας ουσίας με βάση τα φάσματα διευκολύνεται πλέον από την ύπαρξη πακέτων λογισμικού, ορισμένα εκ των οποίων ενσωματώνονται στο λογισμικό των φωτομέτρων και των φασματομέτρων. Ο βασικός στόχος κάθε ποσοτικής αναλυτικής τεχνικής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των ιδιοτήτων (Y) ενός συνόλου δειγμάτων από τα αποτελέσματα μετρήσεων που πραγματοποιούνται στα ίδια τα δείγματα (X). Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάλυσης πολλαπλών μεταβλητών. Κατά βάση απαιτείται η εύρεση της συσχέτισης μεταξύ των δύο ειδών δεδομένων, των X (μεταβλητές) και των Y (αποκρίσεις). Με την PLS καταstrώνεται η γραμμική σχέση η οποία συνδέει τα X με τα Y σε πολυδιάστατο επίπεδο. Η αξιοπιστία των εξαγόμενων αποτελεσμάτων βελτιώνεται σημαντικά με την χρήση όσο το δυνατό περισσότερων μεταβλητών. Στον τομέα των χημικών επιστημών και πιο συγκεκριμένα της φασματοσκοπίας, αυτό σημαίνει ότι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν φάσματα για μεγάλο εύρος κυματαρίθμων αντί της κλασικής ανάλυσης που με βάση το νόμο του Beer η ανάλυση εστιάζεται σε ένα ή δύο μήκη κύματος. Οι αναλύσεις μιας μεταβλητής κρίνονται έτσι ανεπαρκείς για την πρόβλεψη πολύπλοκων συστημάτων. Το βασικό μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι η ιδιότητα που μελετάται (π.χ. συγκέντρωση) στα άγνωστα, μη βαθμονομημένα δείγματα, συσχετίζεται μόνο με ένα σημείο του φάσματος (μια πληροφορία). Έτσι μια τυχαία μεταβολή του συγκεκριμένου αυτού σημείου (π.χ. θόρυβος ανιχνευτή) μεταφέρεται άμεσα στα αποτελέσματα της ιδιότητας. Η αναπόφευκτη αύξηση της αβεβαιότητας μπορεί να βελτιωθεί μόνο με πολλαπλές μετρήσεις και την εύρεση του μέσου όρου. Απαιτείται δηλαδή, μεγάλος αριθμός μετρήσεων για την αποφυγή σφαλμάτων κάτι που όμως ελαττώνει σημαντικά την χρησιμότητα των αποτελεσμάτων και της μεθόδου.

$$\begin{array}{c}
 \mathbf{Y} = \\
 \begin{array}{l}
 \text{(Πρότυπο 1)} \\
 \text{(Πρότυπο 2)} \\
 \text{(Πρότυπο 3)} \\
 \vdots \\
 \text{(Πρότυπο N)}
 \end{array}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{c}
 \underline{\text{2 - συστατικά}} \\
 \begin{array}{cc}
 X_B & X_C
 \end{array}
 \end{array} \\
 \left[\begin{array}{cc}
 X_{B1} & X_{C1} \\
 X_{B2} & X_{C2} \\
 X_{B3} & X_{C3} \\
 \vdots & \vdots \\
 X_{BN} & X_{CN}
 \end{array} \right]
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \left. \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\
 \end{array} \right\} N - \text{δείγματα}
 \end{array}$$

ενώ ο **B** είναι ο πίνακας των συντελεστών παλινδρόμησης και ο πίνακας **E** εκφράζει τις τιμές των σφαλμάτων.

Σχηματικά η παραπάνω εξίσωση θα έχει ως εξής:

$$\begin{array}{c} 1 \\ \boxed{y} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{b} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} 1 \\ \boxed{e} \\ n \end{array}$$

Αναζητείται λοιπόν ο αλγόριθμος **b**, ο οποίος εφαρμοζόμενος στον πίνακα **X** των φασματικών δεδομένων (**n** φάσματα x **m** σημεία ανά φάσμα), αποδίδει τον πίνακα των γνωστών ιδιοτήτων **y**, ελαχιστοποιώντας το σφάλμα **e**.

Αντί όμως να βρεθεί άμεσα η γραμμική συσχέτιση μεταξύ **X** και **Y**, η PLS προτείνει μεθοδολογία έμμεσης εύρεσης αυτής της συσχέτισης χρησιμοποιώντας τις εικονικές μεταβλητές **T**, **P**, **U** και **Q**, οι οποίες συνδέονται με τους πίνακες **X** και **Y** με τις παρακάτω σχέσεις:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E}_X \quad [2]$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_Y \quad [3]$$

Οι πίνακες **T**, **P**, **U** και **Q** έχουν όλοι τον ίδιο αριθμόν στηλών ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των κύριων συνιστωσών (principal components, PC) που απαιτούνται για την επίλυση των παραπάνω εξισώσεων. Κύριες συνιστώσες καλούνται τα διανύσματα τα οποία αποτελούνται από τις τιμές των στηλών των πινάκων **P** και **Q**. Τα διανύσματα του πίνακα **T** είναι γραμμικοί συνδυασμοί με τα αντίστοιχα του **X** ενώ ομοίως, τα διανύσματα του **U** είναι γραμμικοί συνδυασμοί με τα αντίστοιχα του **Y**. Οι πίνακες **T** και **U** συσχετίζονται μεταξύ τους γραμμικά, ισχύει δηλαδή η σχέση:

$$\mathbf{U} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{D} + \mathbf{H} \quad [4]$$

όπου **D** είναι ένας διαγώνιος πίνακας τα στοιχεία του οποίου αποτελούν τους συντελεστές συσχέτισης της γραμμικής σχέσης μεταξύ των στοιχείων του **U** και του **T**, ενώ ο πίνακας **H**

είναι ο πίνακας των υπολοίπων [Practical guide to chemometrics, 2006, Καράμπας Ι., 2011, Σιδερούδη Θ., 2006].

Για την ανάπτυξη και αξιολόγηση των χημειομετρικών μοντέλων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο TQ Analyst Professional Edition (7.2.0.161 Release, Therm o Electron Corp.).

3.2. PLS ανάλυση - Βαθμονόμηση (Calibration)

Το στάδιο της βαθμονόμησης αφορά στον υπολογισμό της συνάρτησης βαθμονόμησης από γνωστά φασματικά και αναλυτικά δεδομένα ενός πλήθους δειγμάτων αναφοράς.

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, παρασκευάζονται Ν δείγματα αναφοράς και λαμβάνονται ισάριθμα φάσματα Μ σημείων το καθένα. Οι τιμές των εντάσεων του σήματος στους Μ κυματαριθμούς τοποθετούνται σε πίνακα Χ διαστάσεων ΝxΜ ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε πίνακα στήλη $Y_{N \times 1}$ που στοιχεία του είναι οι ιδιοτητες ενός συστατικού στα Ν φάσματα.

Στο στάδιο της βαθμονόμησης, αναζητείται μια σχέση συσχέτισης του πίνακα **X** με τα δεδομένα του πίνακα **Y**. Ο συσχετισμός αυτός προϋποθέτει ότι μεταβολή στην ιδιότητα κάποιου συστατικού συνεπάγεται κάποια μεταβολή του σήματος και αντίστροφα. Συνεπώς οι μεταβολές στα φασματικά δεδομένα (πίνακα **X**) κωδικοποιούν τις πληροφορίες που σχετίζονται με κάποιες ιδιότητες του συστήματος.

Στην ανάλυση PLS ο πίνακας των φασματικών δεδομένων **X** αναλύεται σε άθροισμα παραγόντων (σχέση 5), που ονομάζονται ranks. Ο κάθε παράγοντας περικλείει μέσα του πληροφορίες που σχετίζονται με μεταβολές των στοιχείων του πίνακα, δηλαδή μεταβολές στα φασματικά δεδομένα. Στην ανάλυση PLS αυτοί οι παράγοντες επιλέγονται έτσι ώστε να προσεγγίζουν με όσο το δυνατόν καλύτερο τρόπο τα δεδομένα. Οι πρώτοι παράγοντες εκφράζουν την κύρια μεταβολή (μαθηματικά: τη μεγαλύτερη μεταβολή) σε στοιχεία του πίνακα. Αυτοί οι παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί στη διαδικασία της ανάλυσης. Οι τελευταίοι παράγοντες εκφράζουν μικρές αλλαγές στα φασματικά χαρακτηριστικά. Συνεπώς οι παράγοντες μικρής τάξης κωδικοποιούν τις μεγαλύτερες μεταβολές σε στοιχεία του πίνακα **X**, ενώ οι παράγοντες υψηλότερης τάξης τείνουν να εκπροσωπούν μικρότερες μεταβολές όπως μεταβολές που συμβαίνουν στην περιοχή θορύβου του φάσματος.

Οι παράγοντες είναι γινόμενα, των υποτιθέμενων συντελεστών διανυσμάτων t_i (score vectors) με τα διανύσματα βάσης p_i (loading vectors).

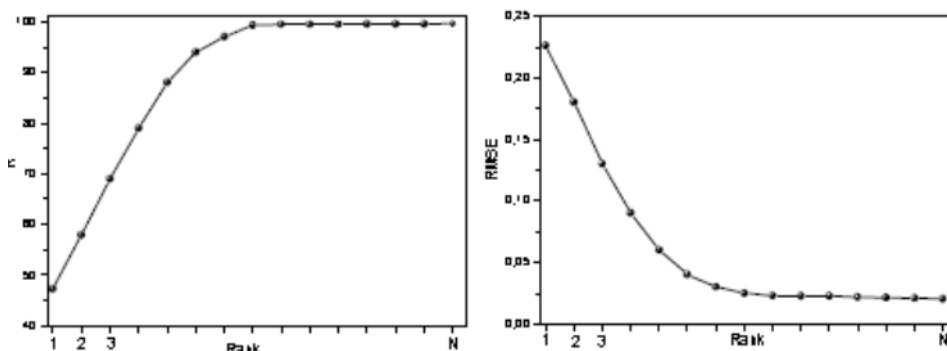
$$X = \underbrace{t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_N p_N^T}_{\text{Ranks}} \quad [5]$$

Ενώ η σχηματική αναπαράσταση της προηγούμενης εξίσωσης είναι η εξής:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_N \mathbf{p}_N^T$$

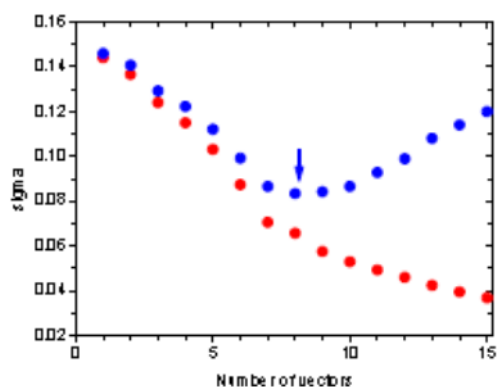
Στη διαδικασία αυτή, οι τιμές των ιδιοτήτων συσχετίζονται με εύρος φασματικής περιοχής αντί με ένα σημείο του φάσματος. Δηλαδή, χρησιμοποιώντας εύρος φασματικής περιοχής αντί για συγκεκριμένο σημείο φάσματος ως δεδομένο, η ανάλυση μπορεί να χειριστεί περισσότερες πληροφορίες για την εύρεση της πιο ρεαλιστικής και αξιόπιστης συνάρτησης βαθμονόμησης (b). Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να αφορούν όχι μόνο το μέγιστο κορυφής αλλά και το εμβαδόν της, καθώς και άλλα φασματικά χαρακτηριστικά. Έτσι, αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές μπορούν να διαχωριστούν εφόσον διαφέρουν έστω και λίγο στο σχήμα τους.

Ο μέγιστος αριθμός γραμμικών όρων, στον οποίο αναλύεται ο πίνακας \mathbf{X} είναι N (δηλαδή ίσος με τον αριθμό των φασμάτων αναφοράς). Η τιμή του R^2 (determination coefficient) και του σφάλματος (RMSE- Root Mean Square Error) ενός μοντέλου σε σχέση με τον αριθμό των γραμμικών όρων που αναλύεται ο πίνακας \mathbf{X} , φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχ.3.1). Να σημειωθεί ότι η βελτιστοποίηση δεν επιτυγχάνεται πάντα στο νιοστό Rank.



Σχήμα 3.1. Θεωρητική συσχέτιση του R^2 και του RMS error ενός μοντέλου σε συνάρτηση με τον αριθμό των Ranks

Μαθηματικά, το σφάλμα e μειώνεται αυξανόμενου του αριθμού των ανυσμάτων βάσης (Σχ. 3.2, κόκκινα σημεία) και μηδενίζεται ασυμπτωτικά όταν αυτός φτάσει τον αριθμό των δειγμάτων αναφοράς (n). Ωστόσο, μια τέτοια βαθμονόμηση είναι ασταθής και αναξιόπιστη διότι στηρίζεται στο σύνολο των φασματικών χαρακτηριστικών ανεξάρτητα από το αν αυτά σχετίζονται με την μελετώμενη ιδιότητα ή αποτελούν τυχαίο θόρυβο.



Σχήμα 3.2. Το σφάλμα της πρόβλεψης της συγκέντρωσης του συστατικού δ συναρτήσει του αριθμού των ανυσμάτων βάσης. Ο βέλτιστος αριθμός ανυσμάτων στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι 8 (βέλος). Η καμπύλη με το κόκκινο χρώμα αποτελεί τετριμμένη λύση.

Για να υπολογιστεί ο βέλτιστος αριθμός Ranks (Factors) ο οποίος μεγιστοποιεί την ποιότητα του μοντέλου χωρίς να στηρίζεται σε άσχετη πληροφορία ή θόρυβο (overfitting) απαιτείται η εφαρμογή ενός σταδίου επικύρωσης του μοντέλου. Αναζητείται συνεπώς ο βέλτιστος αριθμός ανυσμάτων βάσης, αυτός δηλαδή που αξιοποιεί σε μέγιστο βαθμό την φασματική πληροφορία που είναι ουσιαστική για την πρόβλεψη (no underfitting), χωρίς να επηρεάζεται από εκείνη που δεν σχετίζεται με το ζητούμενο (no overfitting). Η εύρεση του βέλτιστου αριθμού ανυσμάτων προϋποθέτει δηλαδή τον διαχωρισμό των δειγμάτων / φασμάτων αναφοράς σε δύο διακριτά υποσύνολα βαθμονόμησης και ελέγχου. Αυτό εξασφαλίζει ότι τα τυχαία χαρακτηριστικά των φασμάτων ελέγχου δεν θα συμπεριληφθούν στα κριτήρια (ανύσματα) της πρόβλεψης και έχει σαν συνέπεια την μη γραμμική εξάρτηση του σφάλματος της πρόβλεψης από τον αριθμό των ανυσμάτων βάσης (Σχ. 3.2, μπλέ σημεία). Ο βέλτιστος αριθμός ανυσμάτων προσδιορίζεται με σαφήνεια από τη θέση του ελαχίστου σφάλματος [Practical guide to chemometrics, 2006, Καράμπας Ι., 2011, Σιδερούδη Θ., 2006, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Κατάστρωση χημειομετρικών μεθοδολογιών ποσοτικής ανάλυσης].

3.3. PLS ανάλυση – Επικύρωση (Validation)

Η αποφυγή τετριμμένης λύσης γίνεται με την αξιολόγηση φασμάτων για τα οποία είναι γνωστή η τιμή του Y αλλά δεν συμμετέχουν στην κατάστρωση του πίνακα X . Δύο διαφορετικοί τρόποι επικύρωσης υπάρχουν, η εσωτερική και η εξωτερική.

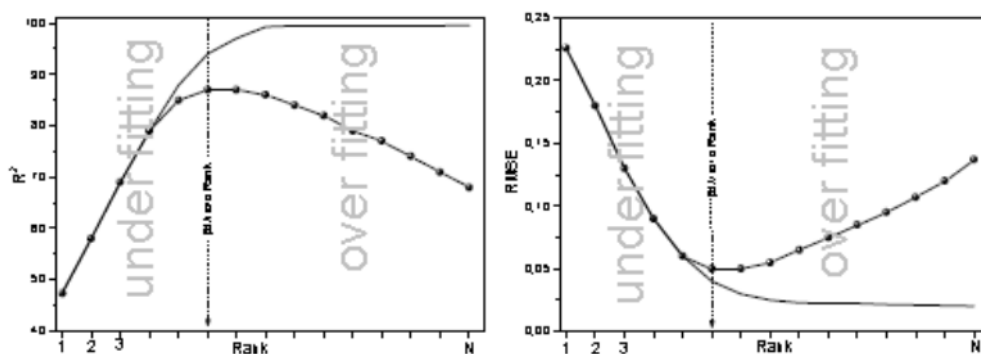
Στην εξωτερική επικύρωση τα δείγματα (φάσματα αναφοράς) χωρίζονται σε δείγματα βαθμονόμησης και δείγματα αξιολόγησης (συνήθως αναλογία 2:1). Η βαθμονόμηση (πίνακας X και ανάλυσή του σε γραμμικούς όρους) στηρίζεται αποκλειστικά στο υποσύνολο βαθμονόμησης. Η μέθοδος της επικύρωσης εφαρμόζεται στα φάσματα αξιολόγησης και οδηγεί στην πρόβλεψη των ιδιοτήτων.

Στην εσωτερική επικύρωση (internal validation) ένα μικρό υποσύνολο (συνήθως <5%) των δειγμάτων φασμάτων αναφοράς χαρακτηρίζεται προσωρινά ως υποσύνολο αξιολόγησης. Η βαθμονόμηση στηρίζεται στα υπόλοιπα δείγματα (>95%) και χρησιμοποιείται για να

προβλέπει την ιδιότητα του υποσύνολου αξιολόγησης. Κατόπιν τα φάσματα που απετέλεσαν το υποσύνολο αξιολόγησης επανεπεντάσσονται στη βαθμονόμηση ενώ το επόμενο 5% των φασμάτων εξαιρείται από αυτήν και αποτελεί το νέο υποσύνολο αξιολόγησης. Η διαδικασία αυτή τελειώνει όταν όλα τα φάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση του μοντέλου. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως leave-some-out. Στην περίπτωση όπου ένα-ένα φάσματα αφήνεται εκτός της διαδικασίας βαθμονόμησης η μέθοδος είναι γνωστή ως leave-one-out.

Και στις δύο περιπτώσεις, η μέθοδος αξιολογείται με βάση το R^2 και το RMS error της ευθείας και ο υπολογισμός γίνεται συναρτήσει του αριθμού των Ranks (ο οποίος είναι μικρότερος ή ίσος του αριθμού των δειγμάτων βαθμονόμησης).

Επιλέγεται συνεπώς η μέθοδος που οδηγεί στο βέλτιστο R^2 και RMSE. Στην πράξη παρατηρείται ότι υπάρχει συγκεκριμένος αριθμός γραμμικών όρων στον οποίο το μοντέλο έχει το βέλτιστο R^2 και RMSE (Σχ.3.3).



Σχήμα 3.3. Συσχέτιση του R^2 και του RMS error ενός μοντέλου σε συνάρτηση με τον αριθμό των Ranks

3.4. PLS ανάλυση - Πρόβλεψη (Prediction)

Το στάδιο της πρόβλεψης αφορά στη χρήση της συνάρτησης βαθμονόμησης (b) για την πρόβλεψη της ιδιότητας Y με βάση τα φάσματα X . Για την πρόβλεψη των δεδομένων, γίνεται χρήση της συνάρτησης βαθμονόμησης b που προσδιορίστηκε στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης PLS. Καταρχήν λαμβάνονται τα φάσματα που πρόκειται να μελετηθούν και στη συνέχεια εφαρμόζεται η συνάρτηση βαθμονόμησης b στον πίνακα των νέων φασματικών δεδομένων, κάτι που οδηγεί τελικά στον υπολογισμό των αντίστοιχων ιδιοτήτων (σχέση 6).

$$Y_{\text{prediction}} = (X_{\text{analysis}} \cdot b)$$

[6]

Όπου X_{analysis} : πίνακας φασματικών δεδομένων των προς ανάλυση δειγμάτων

$Y_{\text{predictor}}$: προβλεπόμενη ιδιότητα των φασμάτων αγνώστων δειγμάτων

3.5. Επαναληπτικές διαδικασίες Cross Validation και PRESS

Ένα σημαίνον σημείο της διαδικασίας έχει να κάνει με τον τρόπο με τον οποίο επιλέγεται ο βέλτιστος αριθμός των κύριων συνιστωσών. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της μεθόδου της διασταυρωμένης επικύρωσης (Cross Validation, CV) σε συνδυασμό με την επαναληπτική διαδικασία PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares). Η διαδικασία που εφαρμόζεται είναι η εξής: αρχικά επιλέγεται η πρώτη κύρια συνιστώσα. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τη μέθοδο του CV, τα δεδομένα των πινάκων \mathbf{X} και \mathbf{Y} χωρίζονται σε ένα συγκεκριμένο αριθμό m ομάδων (συνήθως 5-10). Κατόπιν, αφαιρείται η πρώτη ομάδα από τα δεδομένα και κατασκευάζεται μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τις υπόλοιπες, $m-1$ ομάδες. Οι τιμές που προβλέπει το μοντέλο που προέκυψε, για τα στοιχεία του πίνακα \mathbf{Y} που έμειναν εκτός της διαδικασίας κατασκευής του μοντέλου βαθμονόμησης, \hat{y}_{im} (οι τιμές του \mathbf{Y} δηλαδή που ανήκουν στην ομάδα που αφαιρέθηκε), συγκρίνονται με τις πραγματικές τους τιμές y_{im} προκύπτοντας με αυτό τον τρόπο η τιμή της παραμέτρου PRESS σύμφωνα με τη σχέση:

$$PRESS = \sum_i \sum_m (y_{im} - \hat{y}_{im})^2$$

Η διαδικασία είναι επαναληπτική και συνεχίζεται m φορές, μέχρι δηλαδή να απορριφθεί κάθε τιμή του \mathbf{Y} μία φορά.

Ακολούθως χρησιμοποιείται και η δεύτερη κύρια συνιστώσα και προσδιορίζεται και πάλι η τιμή του PRESS. Αν με την προσθήκη της δεύτερης κύριας συνιστώσας προέκυψε μικρότερη τιμή για το PRESS, η διαδικασία συνεχίζεται με την εισαγωγή και τρίτης κύριας συνιστώσας κ.ο.κ. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν προκύψει κύρια συνιστώσα η οποία προκάλεσε αύξηση της τιμής του PRESS οπότε και διατηρούνται όλες οι πριν από αυτή κύριες συνιστώσες.

Προφανώς, ένα αρκετά ικανοποιητικό μοντέλο θα απαιτούσε τιμές PRESS οι οποίες να προσεγγίζουν το μηδέν, κάτι που θα σήμαινε ότι $\hat{y}_{im} \rightarrow y_{im}$ και άρα το μοντέλο προβλέπει πολύ καλά νέες τιμές (τιμές για άγνωστα δείγματα) [Practical guide to chemometrics, 2006, Καράμπας Ι., 2011, Σιδερούδη Θ., 2006].

3.6. Spectrum outlier

Κατά την ανάλυση γίνεται έλεγχος για τυχόν απομακρυσμένες τιμές (outliers), δηλαδή δείγματα που δεν εμφανίζουν καλή συσχέτιση μεταξύ \mathbf{X} και \mathbf{Y} και άρα αποκλίνουν από τη γραμμικότητα.

3.7. Εφαρμογή φασματικών φίλτρων (spectral filters)

Όταν αναλύονται φασματοσκοπικά δεδομένα, είναι πολύ πιθανό το προκύπτον μοντέλο να χαρακτηριστεί από μειωμένη γραμμικότητα και συσχέτιση. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι η

πληροφορία του πίνακα δεδομένων \mathbf{X} , δεν συσχετίζεται με τα δεδομένα του \mathbf{Y} . Για τη βελτίωση του εξαγόμενου μοντέλου χρησιμοποιούνται μαθηματικοί αλγόριθμοι διόρθωσης του σήματος προκειμένου να απομονωθεί η πληροφορία που έχει φυσική σημασία. Τέτοια είναι η εφαρμογή πρώτης και δεύτερης παραγώγου.

Τα φασματικά φίλτρα δοκιμάζονται και συγκρίνονται με το αρχικό μοντέλο στο οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε κανένα φίλτρο, σε σχέση με τον συντελεστή συσχέτισης R^2 που προκύπτει.

3.7.1. Ανάπτυξη μοντέλου με χρήση πρώτης παραγώγου

Με εφαρμογή της πρώτης παραγώγου στην επιλεγμένη φασματική περιοχή, επιτυγχάνεται καλύτερη διακριτότητα των κορυφών.

3.7.2. Ανάπτυξη μοντέλου με χρήση δεύτερης παραγώγου

Με τη μέθοδο μετασχηματισμού με διπλή παραγώγιση των φασμάτων, εξαλείφεται η επίδραση του φαινομένου της τυχαίας σκέδασης και έτσι τα φάσματα αποκτούν ίδια γραμμή βάσης. Η παραγώγιση όμως παρουσιάζει το μειονέκτημα της μείωσης του λόγου σήματος προς θόρυβο.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι τανίνες είναι ενώσεις με πολύ μεγάλη σημασία καθώς σχετίζονται άμεσα με ποιοτικές παραμέτρους των οίνων όπως η γεύση, η στυφάδα, το χρώμα, ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα παλαίωσης των ερυθρών οίνων παρέχοντας ταυτόχρονα αντιοξειδωτική δράση. Παράλληλα, η γνώση του τανικού περιεχομένου των σταφυλιών και των οίνων παρουσιάζει τεχνολογικό ενδιαφέρον, καθότι ο οινολόγος θα μπορέσει με αυτήν την γνώση να προσαρμόσει τις μεθόδους οινοποίησης ανάλογα, ώστε να προκύψουν οίνοι βελτιωμένοι οργανοληπτικά που θα αντέχουν σε παλαίωση. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι υπάρχει ανάγκη για μια γρήγορη, εύκολη και αξιόπιστη μέθοδο μέτρησης τανινών. Η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι μια γρήγορη, απλή και αξιόπιστη τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων σε φυσικά προϊόντα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη φασματοσκοπικής μεθόδου εκτίμησης του τανικού περιεχομένου των γιγάρτων και πιο συγκεκριμένα της συγκέντρωσης ολικών φαιολών, συμπυκνωμένων τανινών, στυφών τανινών, βαθμού πολυμερισμού και ποσοστού εστεροποίησης με γαλλικό οξύ.

Για το σκοπό αυτό θα συνδυαστεί η φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR (DRIFT) με τη στατιστική ανάλυση πολλών μεταβλητών PLS και θα γίνει προσπάθεια συσχέτισης των αποτελεσμάτων από φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα γιγάρτων σταφυλής όπως αυτά περιγράφονται στο Κεφάλαιο 4 (Πρώτες ύλες: επεξεργασία και αναλύσεις).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

4.1. Τα δείγματα γιγάρτων

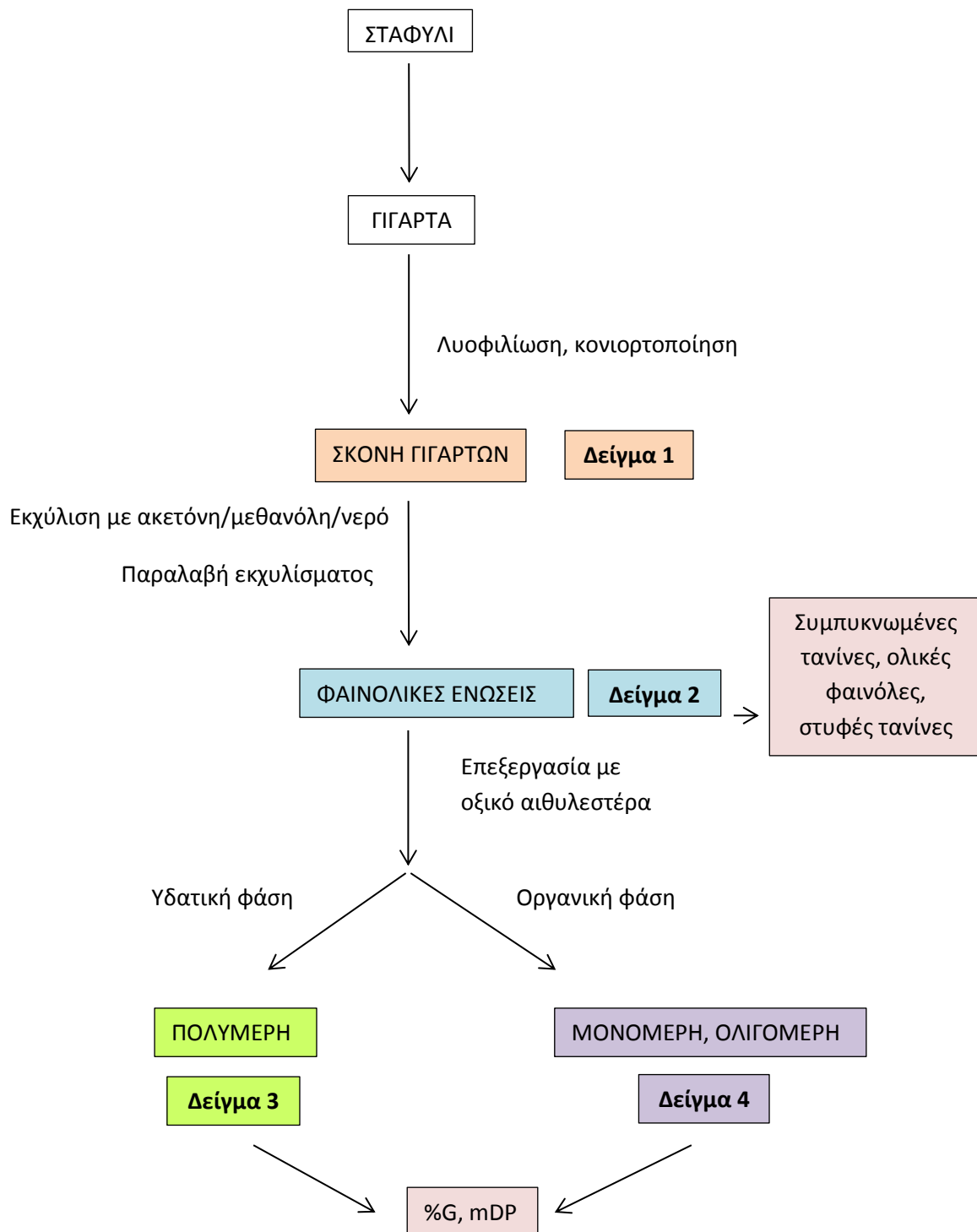
Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν γίγαρτα σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο. Τα γίγαρτα Ξινόμαυρου ελήφθησαν από πρέμνα με γραμμικό σύστημα μόρφωσης, Royal, Guyot και Lyre, καθώς και από δύο διαφορετικούς κλώνους V6 και V3, τη χρονιά 2010. Τα γίγαρτα Μαυροτράγανου, ελήφθησαν τη χρονιά 2010 από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί πότισμα και από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί υδατική καταπόνηση (απότιστα). Τις χρονιές 2011 και 2012, ελήφθησαν δείγματα από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί πλήρες πρόγραμμα ποτίσματος, μέτριο πότισμα και υδατική έλλειψη.

4.2. Επεξεργασίες και αναλύσεις των γιγάρτων

Οι επεξεργασίες και οι αναλύσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν από την Κυραλέου Μαρία στα πλαίσια της Διδακτορικής της διατριβής που βρίσκεται στη διαδικασία δημοσίευσης υπό τον τίτλο «Μελέτη των συστατικών που συμμετέχουν στο άρωμα και τη γεύση των σταφυλιών και οίνων των ποικιλιών Ξινόμαυρο Ναούσης και Μαυροτράγανο Σαντορίνης» [Αθήνα, 2014] και περιγράφονται στο παράρτημα της παρούσας μελέτης. Αφορούν σε φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές αναλύσεις με HPLC.

Οι επεξεργασίες και οι αναλύσεις αφορούν στη συγκέντρωση ολικών φαινολών, συμπυκνωμένων τανινών, στυφών τανινών, βαθμού πολυμερισμού και ποσοστού εστεροποίησης με γαλλικό οξύ.

Στο παρακάτω διάγραμμα ροής (4.1), φαίνονται σχηματικά τα στάδια επεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.



Σχήμα 4.1. Στάδια επεξεργασίας και ανάλυσης των γιγάρτων

4.3. Σύσταση δειγμάτων σε σχέση με τα στάδια επεξεργασίας

Δείγμα 1 – Πρώτο στάδιο επεξεργασίας

Τα συστατικά που περιέχουν τα γίγαρτα είναι νερό, πρωτεΐνες, έλαια, τανίνες, αζωτούχα και ανόργανα συστατικά και λιπαρά οξέα. Η σύσταση τους σε ταννίνες είναι 4 – 6 g/100g, δηλαδή περιέχονται σε ποσοστό έως 65% [Τσακίρης Α., 1988].

Δείγμα 2 – Δεύτερο στάδιο επεξεργασίας

Περιέχονται όλα τα φαινολικά συστατικά που έχουν απομονωθεί από το Δείγμα 1 όπως τανίνες, μονομερή κατεχίνης και επικατεχίνης, προκυανιδίνες (διμερή κατεχίνης-επικατεχίνης)

Δείγμα 3 – Τρίτο στάδιο επεξεργασίας

Πολυμερή: τανίνες

Δείγμα 4 – Τέταρτο στάδιο επεξεργασίας

Μονομερή: κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλικό οξύ, επιγαλλοκατεχίνες (και το ισομερές γαλλοκατεχίνη), ανθοκυανιδίνες

Ολιγομερή: προανθοκυανιδίνες (διμερή κατεχινών-επικατεχινών), γαλλικοί εστέρες κατεχίνης και επιγαλλοκατεχίνης, τριμερή με δομικές μονάδες όπως τα παραπάνω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΜΕ FT-IR

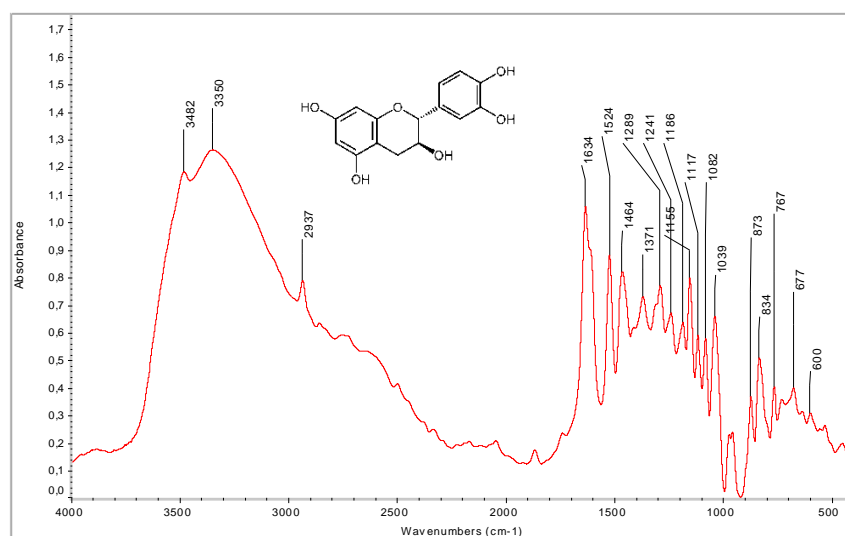
Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν με φασματόμετρο υπερύθρου Therm o Nicolet 7600. Το όργανο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία των φασμάτων. Έγινε χρήση της τεχνικής DRIFTS. Με βάση την μέθοδο αυτή, το δείγμα τοποθετούνταν υπό μορφή σκόνης σε ειδικό καψύλλιο και στη συνέχεια σε ειδικό υποδοχέα, έτσι όπως αυτός περιγράφηκε παραπάνω.

Για κάθε δείγμα ελήφθησαν συνολικά 3 φάσματα και σε κάθε δείγμα, πραγματοποιούνταν 100 σαρώσεις. Ως φάσμα αναφοράς (background) χρησιμοποιήθηκε σκόνη KBr.

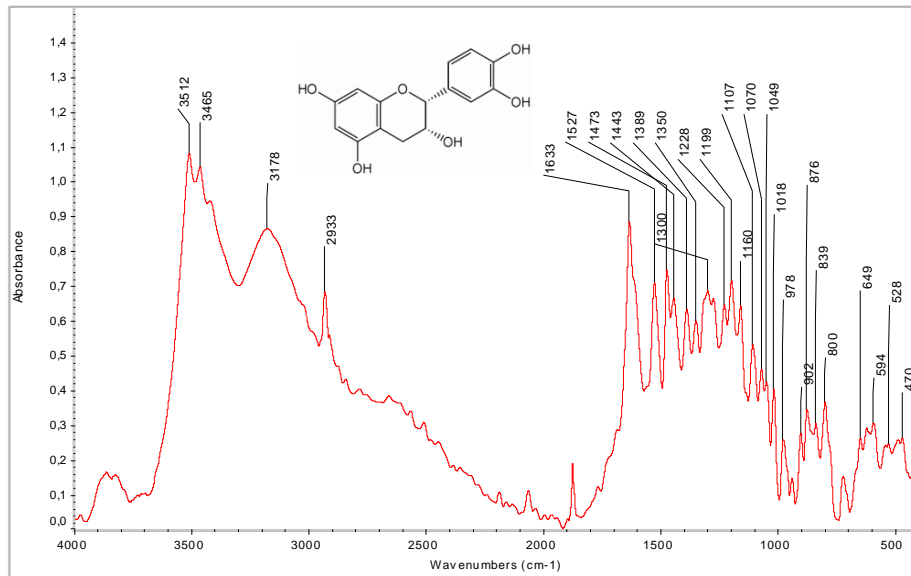
5.1. Αποτελέσματα της ανάλυσης των γιγάρτων με FT-IR/DRIFT

5.1.1. Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων

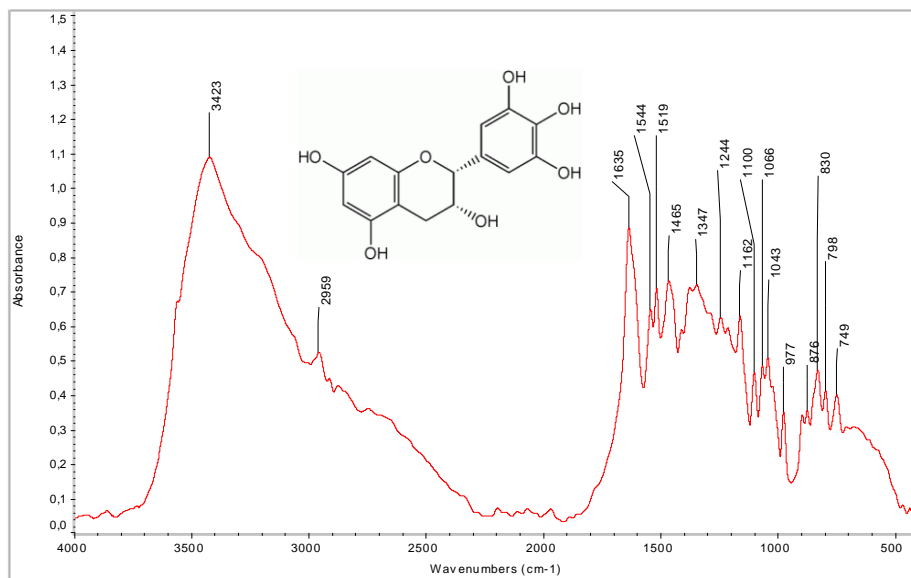
Τα φάσματα FT-IR του φυτικού υλικού καθώς και των καθαρών πρότυπων ουσιών, ελήφθησαν με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης, εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Παρακάτω παρατίθενται τα φασματοσκοπικά δεδομένα από τα δείγματα γιγάρτων (μία σειρά δειγμάτων) στα διάφορα στάδια επεξεργασίας, καθώς και των καθαρών πρότυπων ουσιών.



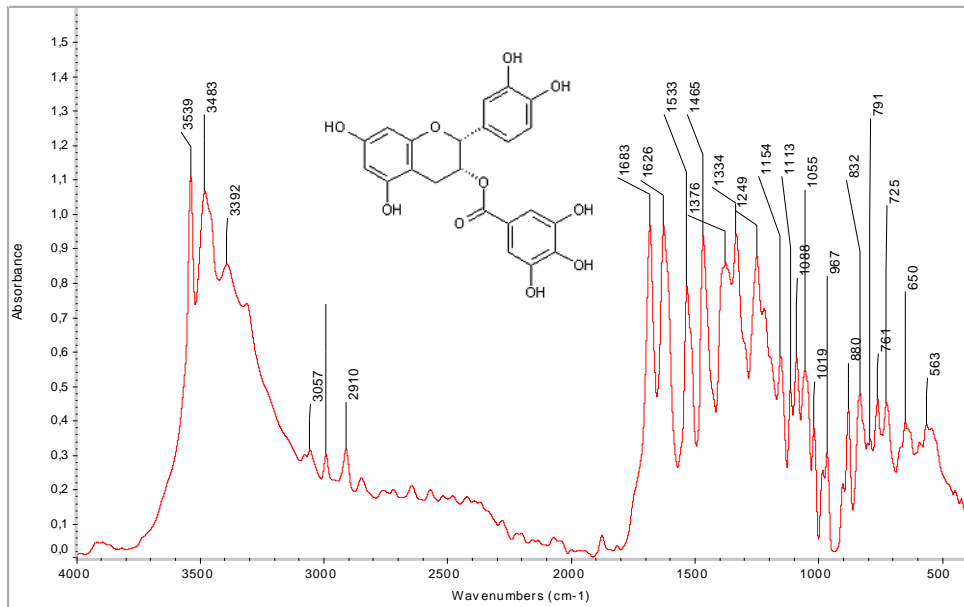
Σχήμα 5.1. Φάσμα FT-IR καθαρής κατεχίνης



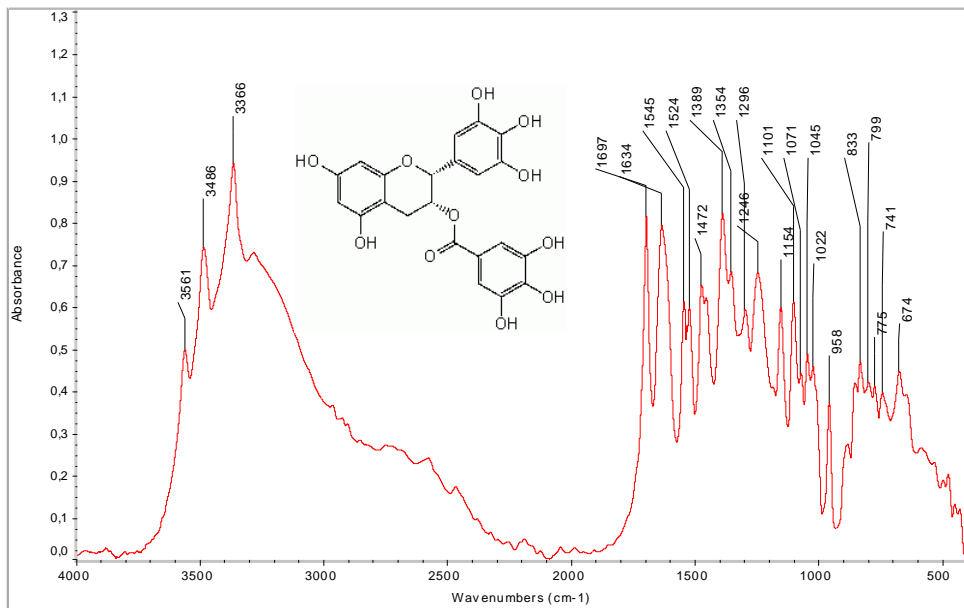
Σχήμα 5.2. Φάσμα FT-IR καθαρής επικατεχίνης



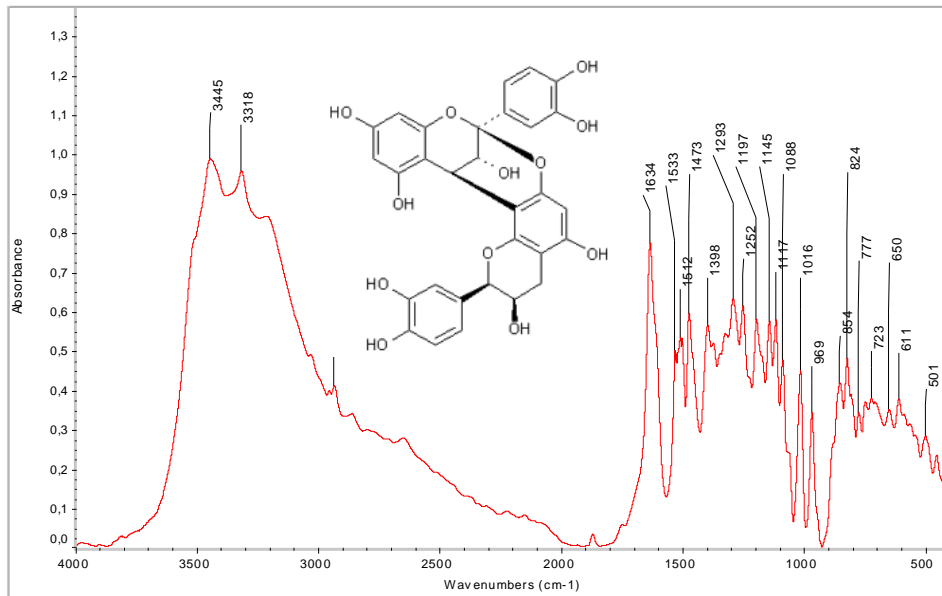
Σχήμα 5.3. Φάσμα FT-IR καθαρής επιγαλλοκατεχίνης



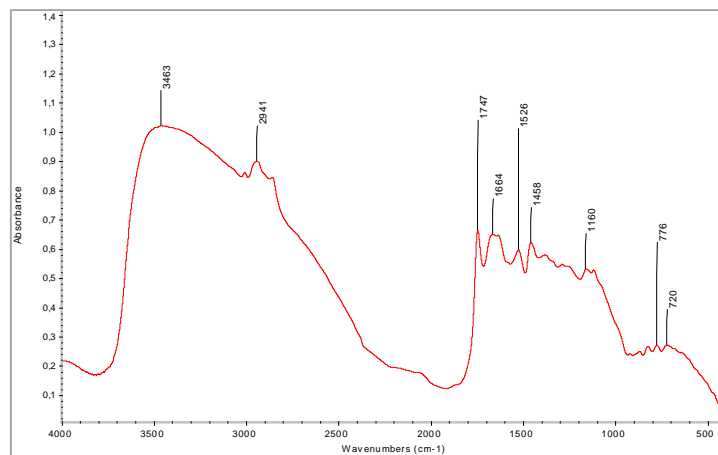
Σχήμα 5.4. Φάσμα FT-IR καθαρού γαλλικού οξέος επικατεχίνης



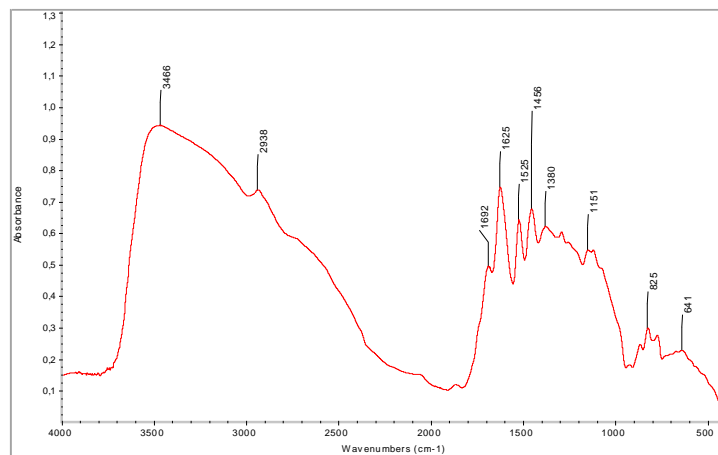
Σχήμα 5.5. Φάσμα FT-IR καθαρού γαλλικού οξέος επιγαλοκατεχίνης



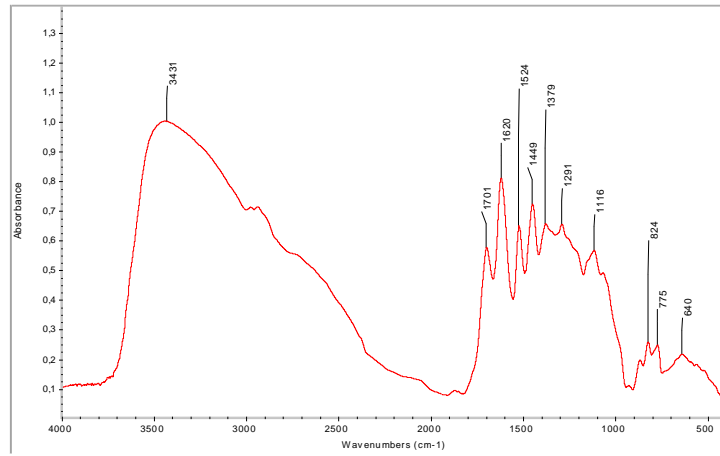
Σχήμα 5.6. Φάσμα FT-IR καθαρής προκυανιδίνης A2



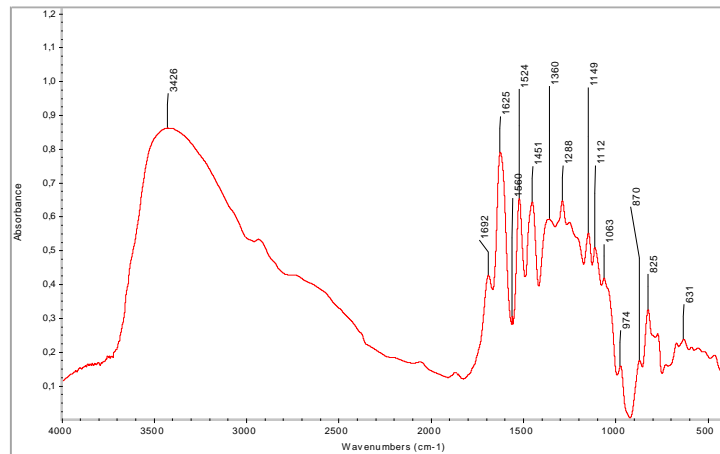
Σχήμα 5.7. Σκόνη γιγάρτων Ξινόμαρου, χωρίς επεξεργασία (guyotA1)



Σχήμα 5.8. Σκόνη γιγάρτων Ξινόμαυρου, επεξεργασία με Ac/MeOH/H₂O (guyotA2)



Σχήμα 5.9. Σκόνη γιγάρτων Ξινόμαυρου, επεξεργασία με H₂O (guyotA3)



Σχήμα 5.10. Σκόνη γιγάρτων Ξινόμαυρου, επεξεργασία με οξικό αιθυλεστέρα (guyotA4)

Σύμφωνα με τα παραπάνω φάσματα, παρατηρούνται κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται σε απορροφήσεις συγκεκριμένων ομάδων των ενώσεων που μελετώνται. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας 5.1 με τις πιο χαρακτηριστικές απορροφήσεις και τις ομάδες στις οποίες αντιστοιχούν, για τα δείγματα γιγάρτων και των πρότυπων ουσιών, σύμφωνα και με στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία [Ping L. et al., 2012, Passos C., et al., 2010, Jensen J., et al., 2008, Fernandez K., et al., 2007, Silvestein et al., 1996, Department of Scientific and Industrial Research, Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra, 1981, Laghi L et al., 2010].

Πίνακας 5.1. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις – χαρακτηριστικές ομάδες

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα και είδος απορρόφησης
3561-3423	-OH, δόνηση τάσης
2959-2910	C-H, δόνηση τάσης
1701-1683	C=O, δόνηση τάσης εστέρων
1635-1600, 1533-1519, 1473-1449	C=C Αρωματικός δακτύλιος, δόνηση τάσης
1296-1287	C-O του βενζοπυρανικού δακτυλίου, δόνηση τάσης
909-674	C-H του αρωματικού δακτυλίου, δεσμός εκτός επιπέδου

Από τα παραπάνω φάσματα και τον πίνακα που προέκυψε από τη μελέτη των κύριων φασματικών περιοχών που εμφανίζονται, παρατηρούμε ότι τα φάσματα παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους, εμφανίζοντας κορυφές σε όλες τις κύριες φασματικές περιοχές.

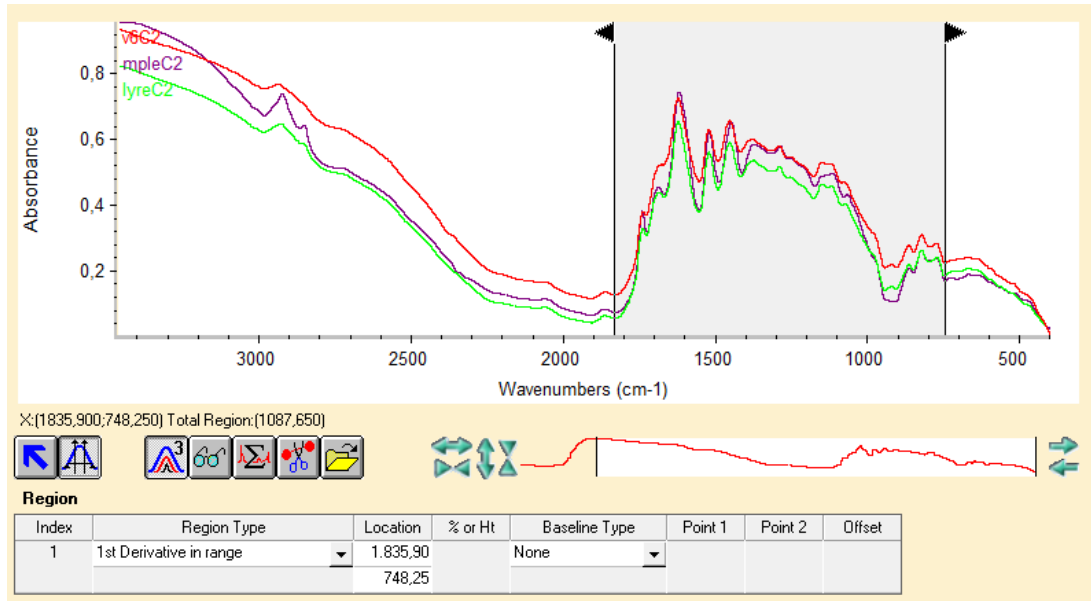
Στη συνέχεια ακολουθεί στατιστική ανάλυση των φασμάτων που προέκυψαν από τα δείγματα γινάρτων και σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα από χρωματογραφικές και φασματοφωτομετρικές αναλύσεις. Η κατάστρωση των χημειομετρικών αλγορίθμων PLS πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό TQ Analyst (ver. 8.0.0.245) της εταιρείας Thermo.

5.1.2. Κατασκευή αρχικών μοντέλων

Για την ανάπτυξη του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα που ελήφθησαν από τα δείγματα γινάρτων, κάποια ως φάσματα βαθμονόμησης και κάποια ως φάσματα επικύρωσης. Το κάθε φάσμα ή μέρος αυτού μπορεί να εισαχθεί. Μετά από δοκιμές για εύρεση του μικρότερου σφάλματος και της μεγαλύτερης συσχέτισης, τα βέλτιστα μοντέλα προκύπτουν μετά από την εφαρμογή ή και μη, των φασματικών φίλτρων στις επιλεγμένες περιοχές του φάσματος, όπως αναλύθηκε παραπάνω.

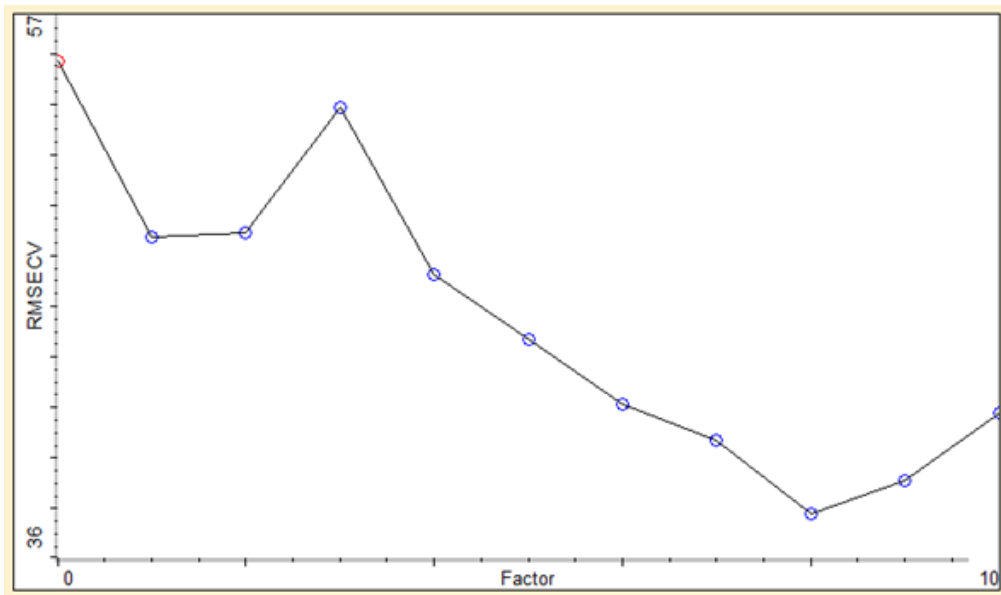
5.1.2.1. Συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, κατασκευάστηκε το μοντέλο βαθμονόμησης από 36 φάσματα δειγμάτων από το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας, εκ των οποίων τα 30 αποτελούν τα δείγματα βαθμονόμησης (calibration spectra) και τα 6 τα φάσματα επικύρωσης (validation spectra). Στη συνέχεια αναζητήθηκε εκείνη η φασματική περιοχή η οποία έδωσε τον μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης R². Μετά από δοκιμές επιλέχθηκε η περιοχή 1836-748cm⁻¹ και με χρήση της 1^{ης} παραγώγου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.11:

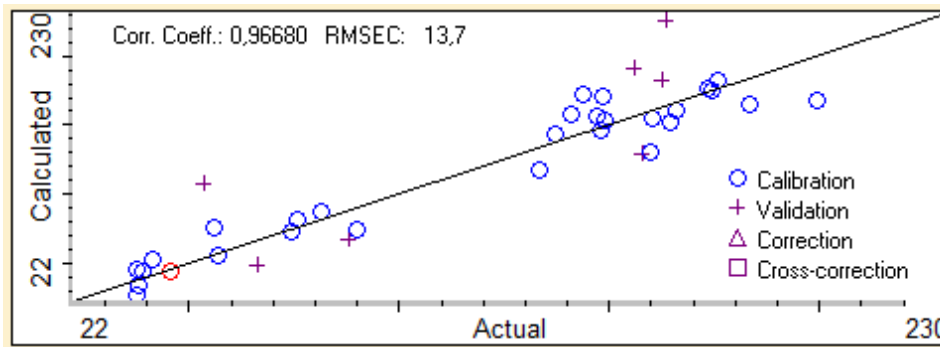


Σχήμα 5.11. Επιλεγόμενη περιοχή και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τη συγκέντρωση συμπτυκνωμένων τανινών.

Με την εφαρμογή της διαδικασίας PRESS και CV, προέκυψε ότι το μοντέλο χρειάζεται 8 κύριες συνιστώσες για να περιγραφεί και οι οποίες του προσδίδουν ικανοποιητικές τιμές για τον συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,97$.



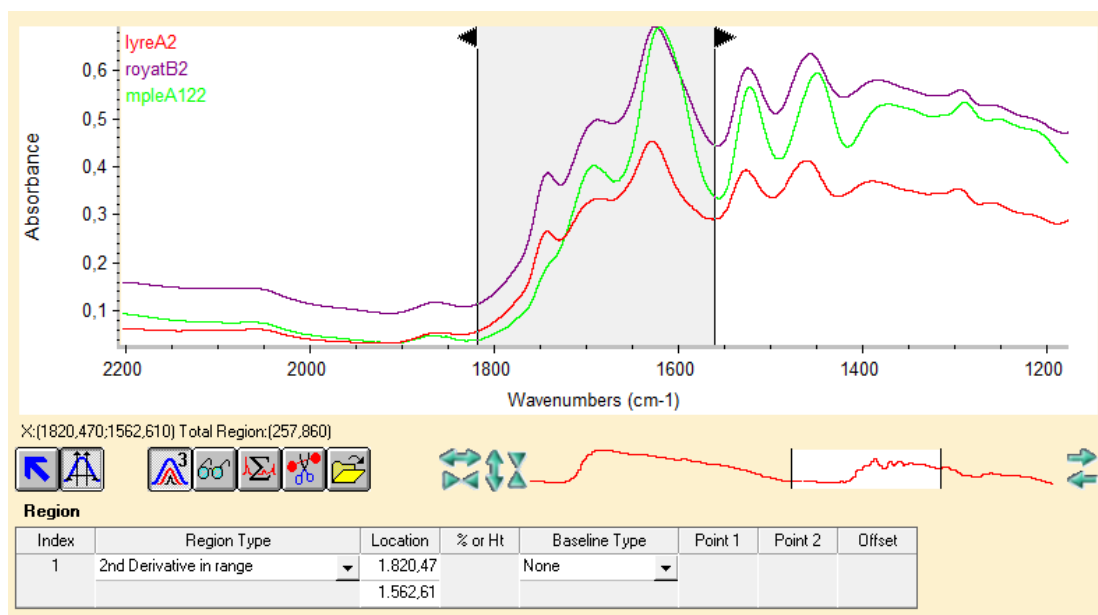
Σχήμα 5.12. RMSSECV (μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης) συναρτήσει των κύριων συνιστωσών για το μοντέλο της συγκέντρωσης συμπτυκνωμένων τανινών



Σχήμα 5.13. Καμπύλη συσχέτισης της προβλεπόμενης συγκέντρωσης συμπυκνωμένων τανινών σε συνάρτηση με τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης με PLS.

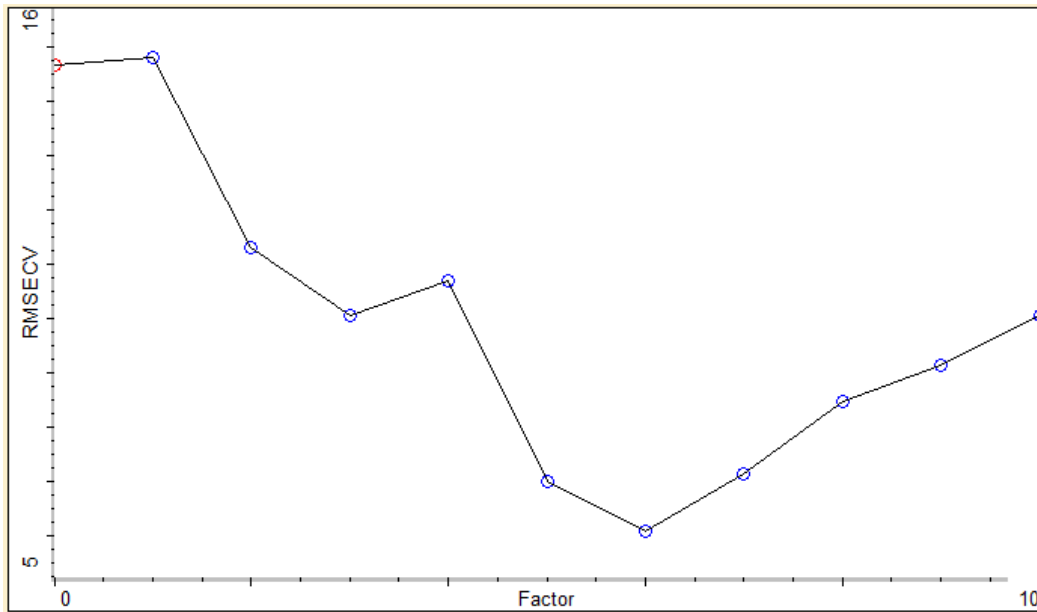
5.1.2.2. Συγκέντρωση στυφών τανινών

Για τη συσχέτιση των φασμάτων FT-IR με τη μέθοδο υπολογισμού της συγκέντρωσης των στυφών τανινών με BSA όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω (5.1.2.2), καταστρώθηκε μοντέλο βαθμονόμησης από 36 φάσματα δειγμάτων από το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας, εκ των οποίων τα 29 αποτελούν τα δείγματα βαθμονόμησης (calibration spectra) και τα 7 τα φάσματα επικύρωσης (validation spectra). Στη συνέχεια, όπως περιγράφηκε και παραπάνω, αναζητήθηκε εκείνη ση φασματική περιοχή η οποία έδωσε τον μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης R^2 . Μετά από δοκιμές επιλέχθηκε η περιοχή $1820-1563\text{cm}^{-1}$ και με χρήση της 2^{ης} παραγώγου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.14:

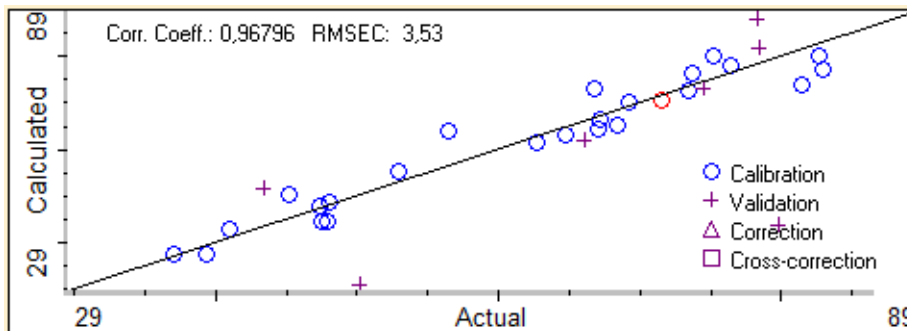


Σχήμα 5.14. Επιλεγόμενη περιοχή και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τη συγκέντρωση στυφών τανινών.

Με εφαρμογή του PRESS και CV, προέκυψε ότι το μοντέλο χρειάζεται 6 κύριες συνιστώσες για να περιγραφεί και οι οποίες του προσδίδουν ικανοποιητικές τιμές για τον συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,97$.



Σχήμα 5.15. RMSSECV (μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης) συναρτήσει των κύριων συστασιών για το μοντέλο της συγκέντρωσης συφών τανινών



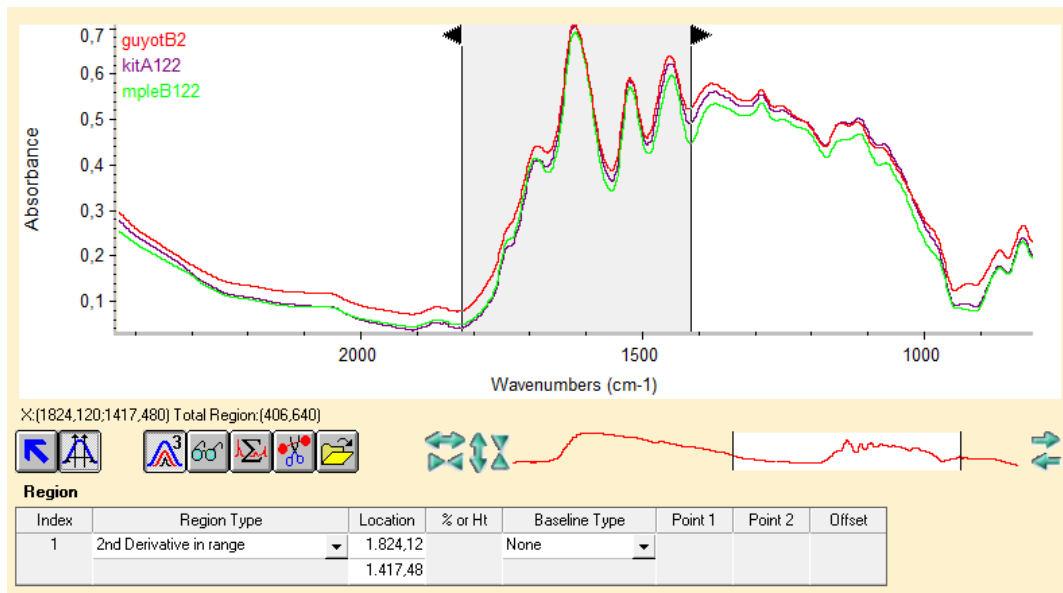
Σχήμα 5.16. Καμπύλη συσχέτισης της προβλεπόμενης συγκέντρωσης συφών τανινών σε συνάρτηση με τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης με PLS.

5.1.2.3. Συγκέντρωση ολικών φαινολών

Για τη συσχέτιση των φασμάτων FT-IR με τη συγκέντρωση ολικών φαινολών όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.1.2.3, καταστρώθηκε μοντέλο βαθμονόμησης από 35 φάσματα δειγμάτων από το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας, εκ των οποίων τα 27 αποτελούν τα δείγματα βαθμονόμησης (calibration spectra) και τα 8 τα φάσματα επικύρωσης (validation spectra). Μετά από δοκιμές, επιλέχθηκαν δύο περιοχές: $1824-1417\text{cm}^{-1}$ και $907-743\text{cm}^{-1}$ με χρήση και στις δύο της 2^{ης} παραγώγου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.17:

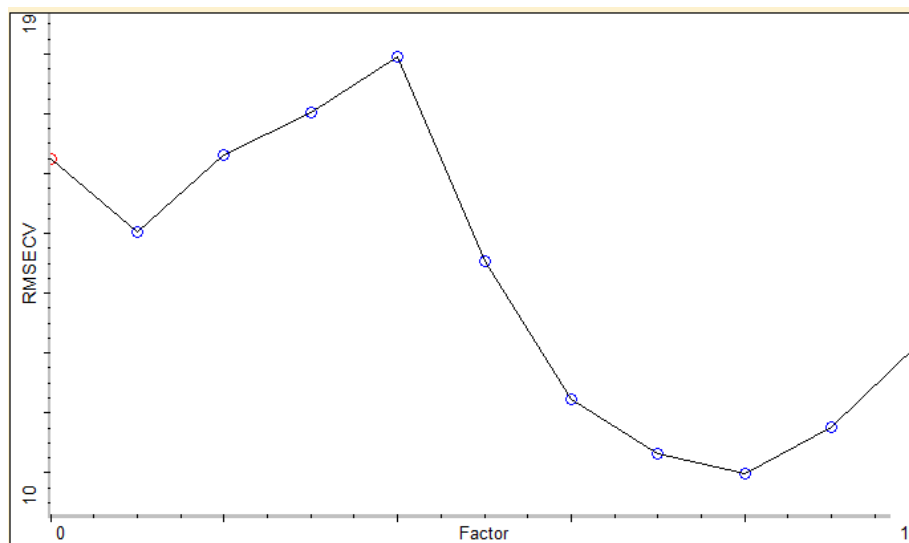
Regions Table							
Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset
1	2nd Derivative in range	1.824,12		None			
		1.417,48					
2	2nd Derivative in range	907,49		None			
		743,35					
3							

Σχήμα 5.17.α. Επιλεγμένες περιοχές και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τη συγκέντρωση ολικών φαινολών.

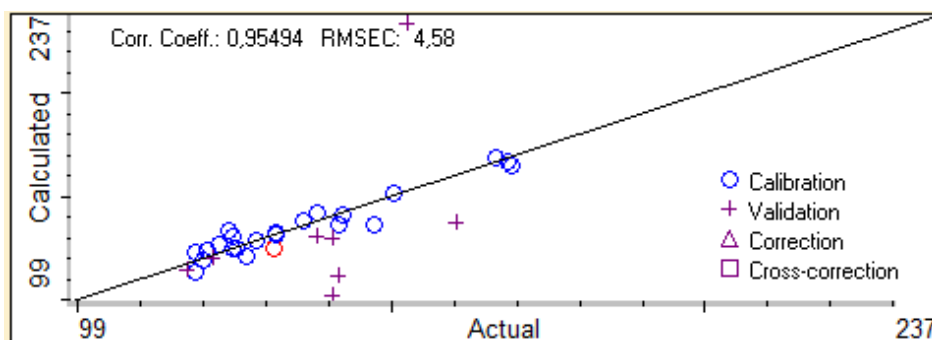


Σχήμα 5.17.β. Επιλεγόμενη περιοχή και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τη συγκέντρωση ολικών φαινολών.

Με εφαρμογή του PRESS και CV, προέκυψε ότι το μοντέλο χρειάζεται 8 κύριες συνιστώσες για να περιγραφεί και οι οποίες του προσδίδουν ικανοποιητικές τιμές για τον συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,96$.



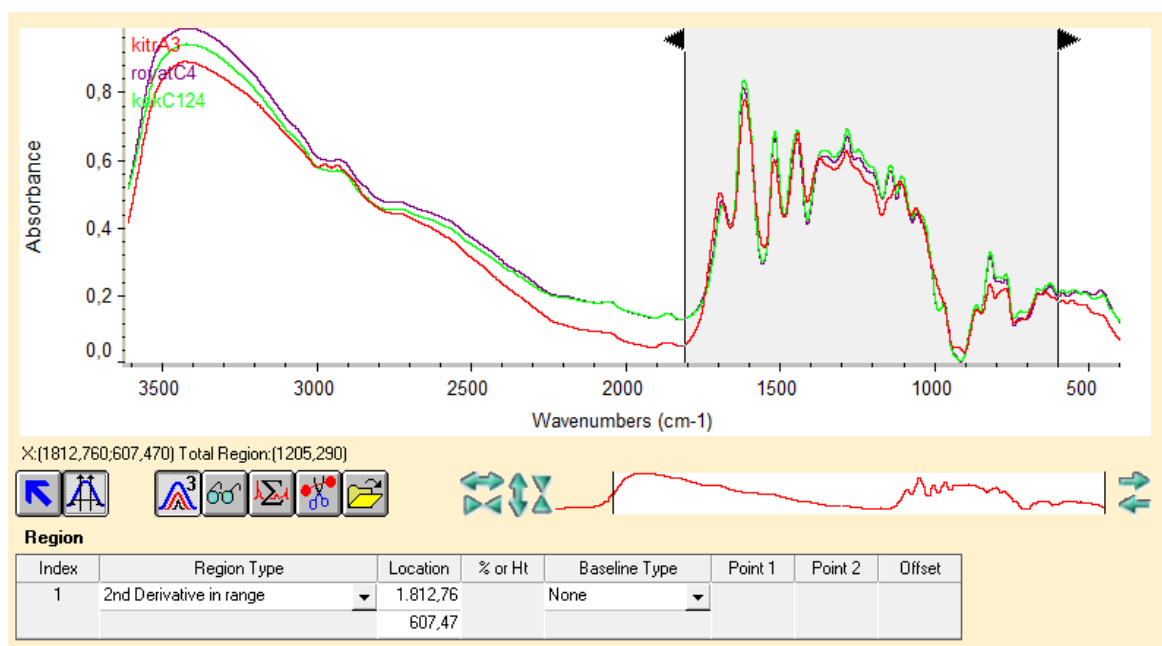
Σχήμα 5.18. RMSSECV (μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης) συναρτήσει των κύριων συνιστωσών για το μοντέλο της συγκέντρωσης ολικών φαινολών



Σχήμα 5.19. Καμπύλη συσχέτισης της προβλεπόμενης συγκέντρωσης ολικών τανινών σε συνάρτηση με τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης με PLS.

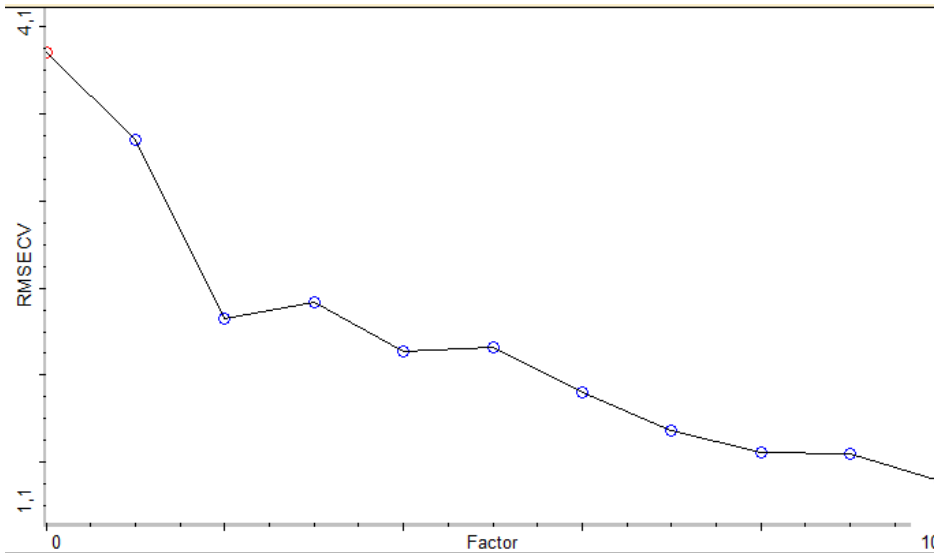
5.1.2.4. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G)

Η συσχέτιση των φασμάτων με το ποσοστό εστέρων γαλλικού οξέος πραγματοποιήθηκε με την κατάστρωση μοντέλου βαθμονόμησης από 66 φάσματα δειγμάτων από το τρίτο και τέταρτο στάδιο επεξεργασίας, εκ των οποίων τα 58 αποτελούν τα δείγματα βαθμονόμησης (calibration spectra) και τα 8 τα φάσματα επικύρωσης (validation spectra). Μετά από δοκιμές, επιλέχθηκε η περιοχή $1813-607\text{cm}^{-1}$ με χρήση 2^{ης} παραγώγου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.20:

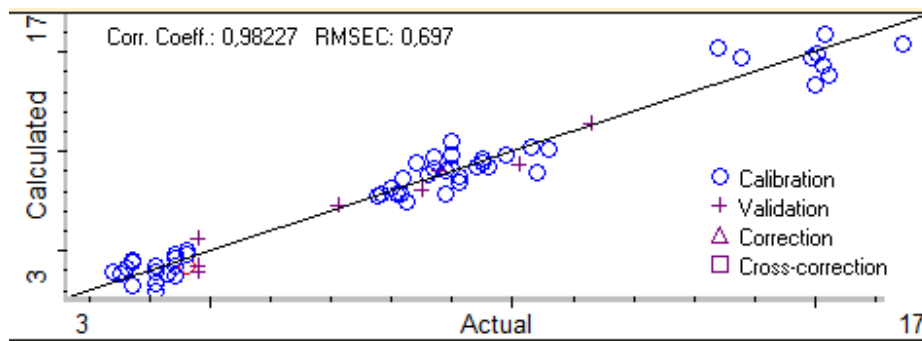


Σχήμα 5.20. Επιλεγόμενη περιοχή και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για το %G.

Με εφαρμογή του PRESS και CV, προέκυψε ότι το μοντέλο χρειάζεται 10 κύριες συνιστώσες για να περιγραφεί και οι οποίες του προσδίδουν τιμές για τον συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,98$.



Σχήμα 5.21. RMSSECV (μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης) συναρτήσει των κύριων συνιστωσών για το μοντέλο του ποσοστού εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G).



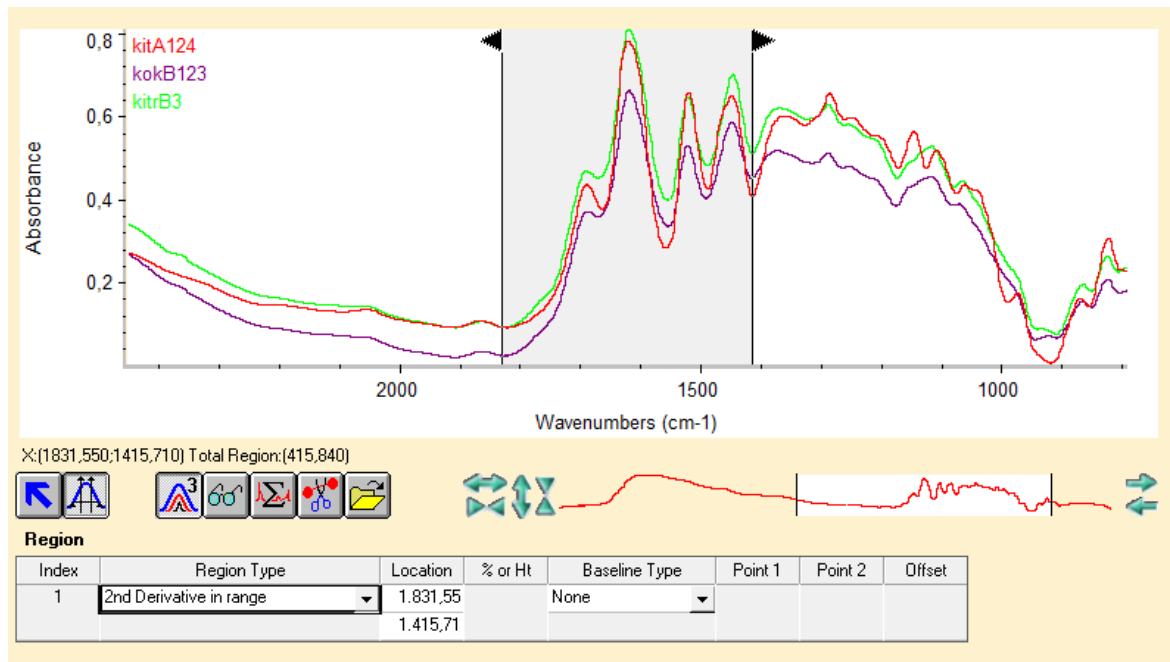
Σχήμα 5.22. Καμπύλη συσχέτισης των προβλεπόμενων τιμών για το %G σε συνάρτηση με τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης με PLS.

5.1.2.5. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP)

Η συσχέτιση των φασμάτων με τον μέσο βαθμό πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε με την κατάστροψη μοντέλου βαθμονόμησης από 66 φάσματα δειγμάτων από το τρίτο και τέταρτο στάδιο επεξεργασίας, εκ των οποίων τα 55 αποτελούν τα δείγματα βαθμονόμησης (calibration spectra) και τα 11 τα φάσματα επικύρωσης (validation spectra). Μετά από δοκιμές, επιλέχθηκαν δύο περιοχές: $1832-1416\text{cm}^{-1}$ και $918-739\text{cm}^{-1}$ με εφαρμογή 2^{ης} παραγώγου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.23:

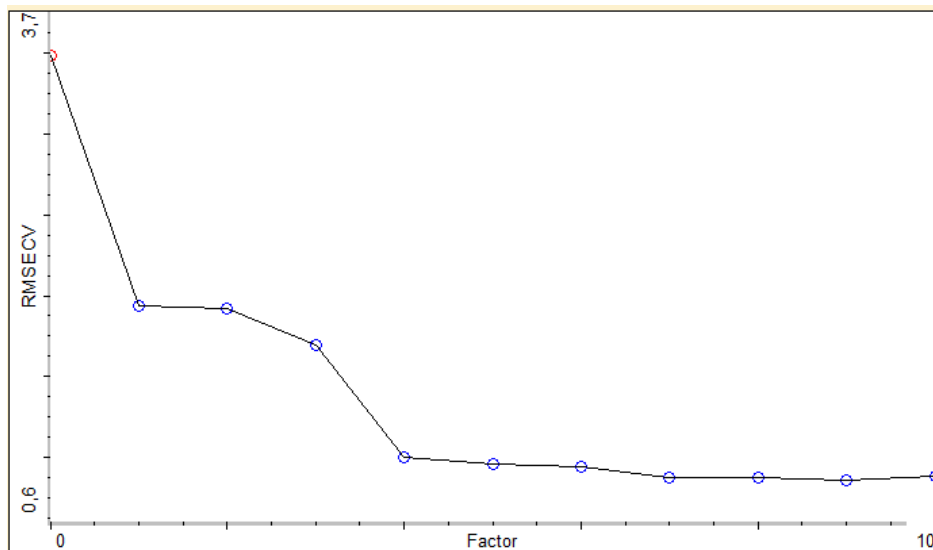
Regions Table							
Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset
1	2nd Derivative in range	1.831,55		None			
		1.415,71					
2	2nd Derivative in range	917,95		None			
		738,60					
3							

Σχήμα 5.23.α. Επιλεγόμενες περιοχές και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τον μέσο βαθμό πολυμερισμού (mDP).

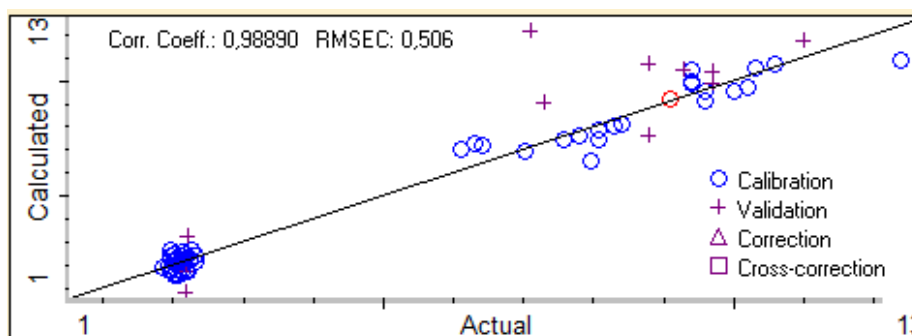


Σχήμα 5.23.β. Επιλεγόμενες περιοχές και επεξεργασία για εφαρμογή του μοντέλου PLS για τον μέσο βαθμό πολυμερισμού (mDP).

Τέλος, με εφαρμογή του PRESS και CV, προέκυψε ότι το μοντέλο χρειάζεται 9 κύριες συνιστώσες για να περιγραφεί και οι οποίες του προσδίδουν τιμές για τον συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,99$.



Σχήμα 5.24. RMSSECV (μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης) συναρτήσει των κύριων συνιστωσών για το μοντέλο του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP).



Σχήμα 5.25. Καμπύλη συσχέτισης των προβλεπόμενων τιμών για τον mDP σε συνάρτηση με τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης και επικύρωσης με PLS.

5.2. Συσχετισμός και σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία

Στη διεθνή βιβλιογραφία, η έρευνα πάνω στη χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους, αντιμετωπίζεται με μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της ευκολίας και της αξιοπιστίας που εμφανίζουν τα αποτελέσματά τους. Στο πεδίο της έρευνας που αφορά στη μελέτη των οίνων και των καρπών σταφυλής, αυτές οι μέθοδοι σε συνδυασμό, έχουν αρχίσει να μελετώνται τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα να υπάρχει πολύ μικρός αριθμός δημοσιεύσεων που να αφορά αποκλειστικά στον συνδυασμό της μεθόδου FT-IR με την PLS, εμφανίζοντας ωστόσο πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη συγκριτικά με τα αντίστοιχα που συναντάμε στη διεθνή βιβλιογραφία, εμφανίζονται βελτιωμένα. Τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν, παρουσιάζουν μεγαλύτερο συντελεστή συσχετισμού, ενώ ταυτόχρονα, η έρευνα πραγματοποιήθηκε με στόχο να μελετηθεί συνολικά το τανικό περιεχόμενο των δειγμάτων συσχετίζοντας και παραμέτρους που δεν εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία όπως το ποσοστό εστέρων γαλλικού οξέος και τη συγκέντρωση στυφών τανινών.

Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη [Passos C., et al., 2010] που πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα γιγάρτων λευκών και ερυθρών ποικιλιών σταφυλής και στην οποία αρχικά τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας HPLC -UV και MS ανιχνευτή, ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με FT-IR μαζί με PLS για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων που αφορούν στον βαθμό πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών των γιγάρτων. Τα φάσματα της FTIR μελετήθηκαν στην περιοχή $1800 - 700\text{cm}^{-1}$. Η στατιστική ανάλυση με PLS έδωσε τιμές για το $R^2=0,91$. Συγκριτικά λοιπόν με τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη, επιτεύχθηκε σημαντική βελτίωση του μοντέλου για τον μέσο βαθμό πολυμερισμού, με συντελεστή συσχετισμού $R^2=0.99$.

Στη μελέτη που δημοσιεύτηκε από τους [Jensen J., et al., 2008], έγινε χρήση της μεθόδου FT-MIR σε δείγματα ραγών και ερυθρών οίνων. Στόχος ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των τανινών με τη βοήθεια της ταυτοποίησης των πλέον σημαντικών φασματικών περιοχών, χρησιμοποιώντας την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Με την μέθοδο που ακολουθήθηκε, επιτεύχθηκε μια πρόβλεψη της συγκέντρωσης των συμπυκνωμένων τανινών με συντελεστή συσχετισμού $R^2=0,93-0,94$. Όσον αφορά στη σύγκριση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα, προκύπτει ότι πετύχαμε

βελτιωμένα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών, καταστρώνοντας μοντέλο το οποίο εμφάνισε συντελεστή συσχετισμού 0,97.

Σε αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους [Fernandez K., et al., 2007], έγινε χρήση της μεθόδου FT-MIR σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές για την ποσοτική ανάλυση των τανινών ερυθρών οίνων. Για την εκτίμηση των συμπυκνωμένων τανινών, η PLS εφαρμόστηκε σε όλη τη φασματική περιοχή ($650-4000\text{ cm}^{-1}$), ενώ με χρήση της δεύτερης παραγώγου προέκυψαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα ($R^2=0,995$). Η πρόβλεψη του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) των τανινών έδωσε επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα με $R^2=0,958$.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάγκη για χρήση γρήγορων, εύκολων και ταυτόχρονα αξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης για τον υπολογισμό σημαντικών παραμέτρων σε οίνους και καρπούς σταφυλής, ήταν το κίνητρο για την πραγμάτωση της παρούσας μελέτης. Σύμφωνα λοιπόν με το σκεπτικό αυτό, πραγματοποιήθηκε επιτυχής συσχέτιση φασματοφωτομετρικών και χρωματογραφικών αναλύσεων σε γιγάρτα σταφυλής, με τα αντίστοιχα φάσματά τους με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερύθρου FT-IR.

Πιο συγκεκριμένα, οι αναλύσεις αφορούν στο τανικό περιεχόμενο των γιγάρτων όπως η συγκέντρωση των συμπυκνωμένων τανινών, η περιεκτικότητα σε στυφές τανίνες, η συγκέντρωση των ολικών φαινολών, το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού. Με χρήση στατιστικής ανάλυσης πολλών μεταβλητών PLS, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων των αναλύσεων με τα αντίστοιχα φάσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη. Έτσι για κάθε παράμετρο που μελετήθηκε, λάβαμε τους συντελεστές συσχέτισης που περιγράφουν το μοντέλο που καταστρώθηκε. Για όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν, προέκυψε γραμμική συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων με τα φάσματα που ελήφθησαν από τη φασματοσκοπία. Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης υποδηλώνουν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, με τον χαμηλότερο να εμφανίζεται στο μοντέλο για τη συγκέντρωση ολικών φαινολών ($R^2=0,95$). Τα μοντέλα που καταστρώθηκαν για τις συμπυκνωμένες και στυφές τανίνες, εμφάνισαν παρόμοιο συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0,97$), ενώ το μοντέλο που καταστρώθηκε για τον μέσο βαθμό πολυμερισμού, έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα με $R^2=0,99$.

Συγκριτικά με τη αντίστοιχες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία, τα μοντέλα που καταστρώθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι σαφώς βελτιωμένα, εμφανίζοντας υψηλότερους συντελεστές συσχέτισης για τον μέσο βαθμό πολυμερισμού και για την συγκέντρωση συμπυκνωμένων τανινών. Παράλληλα μελετήθηκαν παράμετροι (περιεκτικότητα στυφών τανινών, ολικές φαινόλες, ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ) που δεν αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως αντικείμενα μελέτης με τις συγκεκριμένες μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιήσαμε.

Έτσι επιτεύχθηκε επιτυχώς η κατασκευή μοντέλων συσχετισμού παραμέτρων που περιγράφουν την τανική περιεκτικότητα γιγάρτων σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο, με τα αντίστοιχα φάσματά τους που ελήφθησαν με την μέθοδο FT-IR/DRIFT, δίνοντας πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα και θέτοντας βάσεις για τη συνέχιση και βελτίωση των μεθόδων αυτών. Με τη χρήση των μοντέλων αυτών, δημιουργείται η δυνατότητα μελέτης των συγκεκριμένων παραμέτρων, σε άγνωστα δείγματα, ανοίγοντας τον δρόμο για μια εύκολη, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο ανάλυσης του τανικού περιεχομένου γιγάρτων σταφυλής.

Ανακεφαλαιώνοντας, διαπιστώνουμε ότι η φασματοσκοπία υπερύθρου με την τεχνική DRIFTS είναι μια πολύ ελπιδοφόρα τεχνική για ποσοτικούς προσδιορισμούς φυτικών δειγμάτων. Μεγάλη σημασία θα αποτελέσει η παραπάνω έρευνα για τη βελτίωση των

μοντέλων και κατάστροψη νέων που θα αφορούν σε πιο ευρύ φάσμα παραμέτρων αλλά και δειγμάτων όπως σε φλοιούς και οίνους. Έτσι θα καταστεί δυνατή η χρήση γρήγορων, εύκολων και αξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης στον αμπελοοικονομικό επιστημονικό τομέα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acevedo-Opazo C., S. Ortega-Farias, S. Fuentes, Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation, *Agricultural Water Management* 97 (2010) 956–964

Andersen Øyvind M. Kenneth R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006

Aron Patricia M. and James A. Kennedy, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity, *Molecular Nutrition & Food Research*, Volume 52, Issue 1, pages 79–104, January 2008

Bucchetti Barbara, Mark A. Matthews, Luigi Falginella, Enrico Peterlunger, Simone D. Castellarin, Effect of water deficit on Merlot grape tannins and anthocyanins across four seasons, *Scientia Horticulturae* 128 (2011) 297–305.

Capraro Flavio, Carlos Schugurensky, Facundo Vita, Santiago Tosetti, Andres Lage, Daniel Patiño, Intelligent irrigation in grapevines: a way to obtain different wine characteristics, *International Federation of Automatic Control Seoul, Korea*, July 6-11, 2008

Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., DiGaspero, G., 2007b. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruit of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell & Environment* 30, 1381–1399.

Cortell Jessica M., Michael Halbleib, Andrew V. Gallagher, Timothy L. Righetti, James A. Kennedy, Influence of Vine Vigor on Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and Wine Proanthocyanidins, *Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 5798–5808

Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Krstic, M.P., 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 257–268.

Edelmann Andrea, Josef Diewok, Kurt Christian Schuster, and Bernhard Lendl, Rapid Method for the Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-Infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1139-1145

Fernandez Katherina, Eduardo Agosin, Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7294-7300

Fine Anne Marie, Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications, CPA, ND Candidate 2000, *Altern Med Rev* 2000;5(2):144-151

Grant Eric Dennis, Synthesis of Procyanidin Oligomers. Development and Application of Cross-Coupling Reactions using Novel C8-organometallic Derivatives, January 2010

Jensen Jacob S., Max Egebo, Anne S. Meyer, Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3493–3499

Koundouras Stefanos, Effimia Hatzidimitriou, Margarita Karamolegkou, Eirini Dimopoulou, Stamatina Kallithraka, John T. Tsialtas, Eleftheria Zioziou, Nikolaos Nikolaou, Yorgos Kotseridis, Irrigation and Rootstock Effects on the Phenolic Concentration and Aroma Potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon Grapes, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7805–7813

Lacampagne, S., Gagné, S., Gény, L., 2010. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 29, 81–90.

Laghi Luca, Giuseppina P. Parpinello, Daniele Del Rio, Luca Calani, Alessia U. Mattioli, Andrea Versari, Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach, *Food Chemistry* 121 (2010) 783–788

Mendoza-Wilson Ana Maria, Daniel Glossman-Mitnik, Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 761 (2006) 97–106

Passos Cláudia P., Susana M. Cardoso, António S. Barros, Carlos M. Silva, Manuel A. Coimbra, Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerization, *Analytica Chimica Acta* 661 (2010) 143–149

Ping Lan, Antonio Pizzi, Zhou Ding Guo, Nicolas Brosse, Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive, *Industrial Crops and Products* 40 (2012) 13– 20

Practical Guide to Chemometrics, Edited by Paul Gemperline, Second Edition, CRC Press, 2006

Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra, Chemistry Division, Department of Scientific and Industrial Research, Private Bag, Petone, New Zealand, *Phytochemistry* Vo I. 20, No. 6, pp. 1397-1402, 1981.

Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.A., Matthews, M.A., 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10, 100–107.

Romero Pascual, Rocío Gil-Munoz, Francisco M. del Amor, Esperanza Valdés, Jose Ignacio Fernández, Adrián Martínez-Cutillas, Regulated Deficit Irrigation based upon optimum water status improves phenolic composition in Monastrell grapes and wines, *Agricultural Water Management* 121 (2013) 85– 101

- Silverstein Robert M., Francis X. Webster, David KiemLe, Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley and sons 6th Edition, Torondo 1996
- Tao Zou, Susan S. Percival, Qiong Cheng, Zheng Li, Cheryl A. Rowe, Liwei Gu, Preparation, characterization, and induction of cell apoptosis of cocoa procyanidins–gelatin–chitosan nanoparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 82 (2012) 36–42
- Xijin Dua, Xueqing Huang, Cui Huang, Yake Wang, Yufeng Zhang, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive, journal of dentistry 40 (2012) 485–492
- Yi Liu , Yong Wang, Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses, journal of dentistry, 2013
- Yue Ming Chen, Ming Kuang Wang, Pan Ming Huang, Catechin Transformation As Influenced by Aluminum, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 212-218
- Zarrouk Olfa, Rita Francisco, Marta Pinto-Marijuan, Ricard Brossa, Raquen Raissa Santos, Carla Pinheiro, Joaquim Miguel Costa, Carlos Lopes, Maria Manuela Chaves, Impact of irrigation regime on berry development and flavonoids composition in Aragonez (Syn. Tempranillo) grapevine, Agricultural Water Management 114 (2012) 18– 29
- Αποστολάκης Κωνσταντίνος, Σύνθεση, διαχωρισμός και μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας ακετυλιωμένων φαινολικών παραγώγων, Πτυχιακή μελέτη, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο,
- Βαλαβανίδης Α. Π., Φασματοσκοπία Οργανικών ενώσεων, Αθήνα 2006
- Καράμπας Ιωάννης, Διδακτορική Διατριβή: Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας Για Την Εκτίμηση Της Ποιότητας Των Οστών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, 2011
- Κατάστρωση χημειομετρικών μεθοδολογιών ποσοτικής ανάλυσης, Βασικές αρχές, ορθή πρακτική και συνήθη σφάλματα, Εργαστήριο Φασματοσκοπικών Εφαρμογών, Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- Μέθοδοι χαρακτηρισμού και υλικών, ΣΕΜΦΕ, εργαστηριακός οδηγός, φασματοσκοπία υπερύθρου, 2010
- Παππάς Χρήστος, Διδακτορική διατριβή: Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού Κενάφ (Hibiscus Cannabinus L.), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2000
- Σιδερούδη Θεοχαρία, Διδακτορική Διατριβή: Φασματοσκοπική Μελέτη Οφθαλμικών Παθήσεων Και Ανίχνευση Μορίων Φαρμάκων, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, 2006
- Τσακίρης Αργύρης, οινολογία – από το σταφύλι στο κρασί, έκδοσεις τρόφιμα και ποτά, Αθήνα 1988

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

1. Τα δείγματα γιγάρτων

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν γίγαρτα σταφυλής των ποικιλιών Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο. Τα γίγαρτα Ξινόμαυρου ελήφθησαν από πρέμνα με γραμμικό σύστημα μόρφωσης, Royal, Guyot και Lyre, καθώς και από δύο διαφορετικούς κλώνους V6 και V3, τη χρονιά 2010. Τα γίγαρτα Μαυροτράγανου, ελήφθησαν τη χρονιά 2010 από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί πότισμα και από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί υδατική καταπόνηση (απότιστα). Τις χρονιές 2011 και 2012, ελήφθησαν δείγματα από πρέμνα στα οποία είχε εφαρμοστεί πλήρες πρόγραμμα ποτίσματος, μέτριο πότισμα και υδατική έλλειψη.

2. Επεξεργασίες και αναλύσεις των δειγμάτων

Οι επεξεργασίες και οι αναλύσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν από την Κυραλέου Μαρία στα πλαίσια της Διδακτορικής της διατριβής που βρίσκεται στη διαδικασία δημοσίευσης υπό τον τίτλο «Μελέτη των συστατικών που συμμετέχουν στο άρωμα και τη γεύση των σταφυλιών και οίνων των ποικιλιών Ξινόμαυρο Ναούσης και Μαυροτράγανο Σαντορίνης» [Αθήνα, 2014].

Αρχικά, για κάθε ένα από τα δείγματα των επεμβάσεων λαμβάνονται 100 αντιπροσωπευτικές ράγες, των οποίων καταγράφεται το βάρος τους. Στη συνέχεια γίνεται αποχωρισμός της σάρκας της ράγας από του φλοιούς και τα γίγαρτα, και τόσο οι φλοιοί όσο και τα γίγαρτα καθαρίζονται σε απεσταγμένο νερό. Αφήνονται να στεγνώσουν και κατόπιν ζυγίζονται. Στα γίγαρτα μετράται ο ακριβής τους αριθμός και εφόσον τοποθετηθούν σε διηθητικό μέσο, ακολουθείται ελαφρύς θρυμματισμός τους, ενώ στη συνέχεια αποθηκεύονται στην κατάψυξη. Το επόμενο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει λυοφιλίωση των γιγάρτων επί 24h στη συσκευή λυοφιλίωσης (freeze-dryer). Τα λυοφιλωμένα δείγματα γιγάρτων αλέθονται και η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε σκοτεινό και ξηρό μέρος. Έτσι προκύπτουν τα δείγματα από το πρώτο στάδιο επεξεργασίας.

Προκειμένου να εκχυλιστούν τα φαινολικά των γιγάρτων, σε 3 g της σκόνης προστίθενται 25mL διαλύματος ακετόνης και νερού (αναλογία 80:20 v/v) και γίνεται εκχύλιση υπό συνεχή ανάδευση στους 25°C επί 4h. Έπειτα το εκχύλισμα τοποθετείται σε σωλήνες για φυγοκέντρηση στις 9000rpm, για 15min. Λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και στο στερεό υπόλειμμα προστίθενται 25mL διαλύματος μεθανόλης και νερού (αναλογία 60:40 v/v) για 2,5h. Το εκχύλισμα που προκύπτει φυγοκεντρείται και πάλι στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο διάλυμα τοποθετείται στον ίδιο περιέκτη με το πρώτο εκχύλισμα και φυλάσσεται στην κατάψυξη. Μετέπειτα, στον περιστροφικό συμπυκνωτήρα κενού (Rotary Evaporator) υπό κενό στους 35°C γίνεται διαχωρισμός του δείγματος από την ακετόνη και τη μεθανόλη με αποτέλεσμα να μείνει το δείγμα συμπυκνωμένο, το οποίο απουσία

διαλυτών οδηγείται εκ νέου για λυοφιλίωση. Έτσι προκύπτουν τα δείγματα από το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας.

Από την πούδρα που προκύπτει μετά τη δεύτερη λυοφιλίωση, λαμβάνονται 400mg και προστίθενται 10 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 5% και το δείγμα αναδεύεται σε αναδευτήρα για 30sec. Ακολουθεί προσθήκη 10mL χλωροφορμίου. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 4000rpm για 5min, αναδεύεται και λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα (η πρώτη από δύο διακριτές φάσεις του διαλύματος) σε νέο περιέκτη και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία στο υπόλοιπο διάλυμα άλλες 2 φορές. Η προσθήκη του χλωροφόρμιου πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπόφιλων ενώσεων του δείγματος (λιπαρά οξέα γιγάρτων). Στο νέο διάλυμα που προκύπτει μετά τις 3 εκχυλίσεις με χλωροφόρμιο, προστίθενται 10mL οξικού αιθυλεστέρα, ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα για 30sec και στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία, έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις (οργανική φάση και υδατική φάση), από όπου λαμβάνεται η υπερκείμενη οργανική φάση σε νέο περιέκτη. Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία δύο φορές. Ο οξικός αιθυλεστέρας εκχυλίζει μικρού μοριακού βάρους προανθοκυανιδίνες (ολιγομερών ταννινών) στην οργανική φάση. Έτσι η οργανική φάση περιέχει κυρίως ολιγομερή (σχ.4.1. Δείγμα 4), ενώ η υδατική φάση περιέχει πολυμερή (σχ.4.1. Δείγμα 3). Στην συνέχεια το εκχύλισμα ολιγομερών ταννινών συμπυκνώνεται σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα κενού με την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και λυοφιλιώνεται επί 2 ημέρες. Στη σκόνη που προκύπτει από τη λυοφιλίωση, αφού προστεθεί μεθανόλη δημιουργείται για το κάθε δείγμα γιγάρτων διάλυμα με συγκέντρωση 5 g/L. Τα δείγματα γιγάρτων αραιώνονται 1:10 w/v με μεθανόλη και στη συνέχεια 20μL δείγματος διηθούνται με φίλτρο 0,2μm. Ακολουθεί ανάλυση με HPLC.

2.1. Συγκέντρωση συμπυκνωμένων ταννινών

Η μέτρηση των ολικών συμπυκνωμένων ταννινών γίνεται με τη μέθοδο της μεθυλιωμένης κυτταρίνης (methyl cellulose), όπως αυτή περιγράφεται από τους [Sarneckis et. al., 2005, Smith 2005, Mercurio and Smith 2006]. Η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογίζει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η μεθυλιωμένη κυτταρίνη και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Η ανάλυση γίνεται με φωτομετρικές μεθόδους. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg κατεχίνης / g νωπού βάρους γιγάρτων.

2.2. Συγκέντρωση στυφών ταννινών

Η συγκεκριμένη μέθοδος υπολογίζει το σύνολο των ταννινών του δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ταννινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Ο χλωριούχος σίδηρος αντιδρά με τα μόρια των πολυφαινολών και σχηματίζει σύμπλοκα $Fe-(OR)_6$ (το OR αντιστοιχεί σε ιονισμένα φαινολικά μόρια) τα οποία έχουν ιώδες χρώμα σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκα ταννίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της

πρωτεΐνης του δείγματος. Για την ποσοτική παραλαβή του συνόλου των ταννινών του δείγματος είναι απαραίτητο το πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των ταννινών. Περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα.

2.3. Ολικές φαινόλες με τη μέθοδο FOLIN-CIOCALTEAU

Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στους οίνους ή τα εκχυλίσματα φλοιών και γιγάρτων. Βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος (χωρίς να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/L Gallic Acid Equivalents).

Προετοιμάζονται δύο δείγματα, το ένα περιέχει το προς μελέτη δείγμα ενώ το άλλο αποτελεί το τυφλό. Σε ογκομετρική φιάλη των 10mL με περίπου 10mL νερό τοποθετούνται 100μL εκχυλίσματος, 0.5mL FC και 1,5mL Na₂CO₃ 20%. Στο τυφλό δεν προστίθεται εκχύλισμα. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 10mL. Μετά από παραμονή 30min μετράται η απορρόφηση στα 765nm με πλαστική κυψελίδα πάχους 10mm και με χρήση λάμπας αλογόνου, μηδενίζουμε με το τυφλό (blank). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών γίνεται μέσω της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος.

2.4. Μέσος Βαθμός Πολυμερισμού (mDP)

Σε όξινο περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία, τα πολυμερή διασπώνται στα μονομερή τους. Η φλωρογλυκινόλη, έχει την ιδιότητα να συνδέεται μόνο με τις ακραίες μονάδες του πολυμερούς μορίου. Με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), μετά από αντίδραση με φλωρογλυκινόλη προσδιορίζουμε τον αριθμό των συνολικών μονομερών και τον αριθμό των ακραίων μονάδων. Έτσι μπορεί να υπολογιστεί ο μέσος βαθμός πολυμερισμού. Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού υπολογίζεται από το πηλίκο του συνολικού αριθμού μονομερών προς τον αριθμό πολυμερών. Ο αριθμός πολυμερών με τη σειρά του προκύπτει από τον αριθμό των ακραίων μονάδων/2.

2.5. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G)

Το %G προσδιορίζεται από το ίδιο χρωματογράφημα που προέκυψε με βάση την μέθοδο προσδιορισμού του mDP. Προσδιορίζεται δηλαδή με HPLC, μετά από αντίδραση με φλωρογλυκινόλη.

3. Αποτελέσματα αναλύσεων

Κωδικός	Επεξεργασία	Αμπελοτεμάχιο	Χρονιά	mDP	%G
Μπλε	H2O	A	2011	9,71	4,14
Μπλε	H2O	B	2011	9,96	4,42
Μπλε	H2O	Γ	2011	9,75	4,35
Κόκκινο	H2O	A	2011	10,65	4,12
Κόκκινο	H2O	B	2011	13,36	3,67
Κόκκινο	H2O	Γ	2011	10,32	4,75
Κίτρινο	H2O	A	2011	8,76	3,39
Κίτρινο	H2O	B	2011	12,36	3,63
Κίτρινο	H2O	Γ	2011	11,01	4,40
Π	H2O	A	2010	9,40	4,15
Π	H2O	B	2010	9,36	4,75
Π	H2O	Γ	2010	10,21	4,56
A	H2O	A	2010	9,08	4,59
A	H2O	B	2010	9,56	3,68
A	H2O	Γ	2010	9,37	4,56
Μπλε	Eth.Ac	A	2011	2,24	8,95
Μπλε	Eth.Ac	B	2011	2,27	10,64
Μπλε	Eth.Ac	Γ	2011	2,19	11,33
Κόκκινο	Eth.Ac	A	2011	2,33	9,02
Κόκκινο	Eth.Ac	B	2011	2,32	9,52
Κόκκινο	Eth.Ac	Γ	2011	2,33	9,46
Κίτρινο	Eth.Ac	A	2011	2,31	8,71
Κίτρινο	Eth.Ac	B	2011	2,22	9,05
Κίτρινο	Eth.Ac	Γ	2011	2,13	10,40
Π	Eth.Ac	A	2010	2,10	8,63
Π	Eth.Ac	B	2010	2,11	9,02
Π	Eth.Ac	Γ	2010	2,14	8,47
A	Eth.Ac	A	2010	2,20	9,53
A	Eth.Ac	B	2010	2,25	8,66
A	Eth.Ac	Γ	2010	2,17	9,08
Lyre	H2O	A	2010	6,11	4,37
Lyre	H2O	B	2010	8,27	4,61
Lyre	H2O	Γ	2010	8,27	4,61
Guyot	H2O	A	2010	7,07	5,11
Guyot	H2O	B	2010	7,81	4,36
Guyot	H2O	Γ	2010	8,82	4,80
Royat	H2O	A	2010	8,37	4,14
Royat	H2O	B	2010	9,34	3,68
Royat	H2O	Γ	2010	9,60	3,45
Lyre	EthAc	A	2010	2,17	8,01
Lyre	EthAc	B	2010	2,19	8,83
Lyre	EthAc	Γ	2010	2,13	8,90

Guyot	EthAc	A	2010	1,98	8,41
Guyot	EthAc	B	2010	1,96	10,08
Guyot	EthAc	Γ	2010	2,01	10,30
Royat	EthAc	A	2010	2,07	9,40
Royat	EthAc	B	2010	1,95	9,60
Royat	EthAc	Γ	2010	2,17	9,86
μπλε	H2O	A	2012	6,40	8,09
μπλε	EthAc	A	2012	1,94	15,17
μπλε	H2O	B	2012	7,30	7,83
μπλε	EthAc	B	2012	2,02	14,99
μπλε	H2O	Γ	2012	8,06	7,11
μπλε	EthAc	Γ	2012	1,95	15,24
κόκκινο	H2O	A	2012	7,97	8,42
κόκκινο	EthAc	A	2012	2,07	14,93
κόκκινο	H2O	B	2012	7,03	8,18
κόκκινο	EthAc	B	2012	2,01	15,04
κόκκινο	H2O	Γ	2012	8,07	7,76
κόκκινο	EthAc	Γ	2012	2,03	16,47
κίτρινο	H2O	A	2012	6,40	8,15
κίτρινο	EthAc	A	2012	1,84	13,77
κίτρινο	H2O	B	2012	6,29	8,88
κίτρινο	EthAc	B	2012	1,95	15,12
κίτρινο	H2O	Γ	2012	7,58	8,25
κίτρινο	EthAc	Γ	2012	2,01	13,40

			DPPH	FOLLIN	BSA	METHYL CELLULOSE
Κωδικός	Αμπελοτεμάχιο	Χρονιά	mmol trolox/g dw seed	mg gallic acid/ g dw seed	mg catechin /g dw seeds	mg catechin/g dw seeds
μπλε	A	2011	0,156	155,7	39,4	174,3
μπλε	B	2011	0,164	120,1	40,5	140,9
μπλε	Γ	2011	0,168	141,7	39,5	133,5
κόκκινο	A	2011	0,149	140,6	47,3	159,8
κόκκινο	B	2011	0,172	136,1	45,5	160,2
κόκκινο	Γ	2011	0,142	124,2	45,2	148,4
κίτρινο	A	2011	0,158	138,3	47,9	146,8
κίτρινο	B	2011	0,161	124,7	41,0	137,2
κίτρινο	Γ	2011	0,158	141,5	43,4	148,0
Π	A	2010	0,169	147,2	82,6	41,5
Π	B	2010	0,171	124,7	78,3	38,9

Π	Γ	2010	0,182	128,5	78,5	38,1
A	A	2010	0,185	131,1	71,5	74,4
A	B	2010	0,157	122,4	66,8	56,8
A	Γ	2010	0,161	150,3	73,7	75,7
Lyre	A	2010	0,199	131,5	83,0	53,7
Lyre	B	2010	0,220	131,7	75,2	37,7
Lyre	Γ	2010	0,203	127,0	76,4	37,5
Guyot	A	2010	0,193	109,4	64,7	45,6
Guyot	B	2010	0,201	118,6	68,2	56,0
Guyot	Γ	2010	0,246	140,6	74,5	66,2
Royat	A	2010	0,183	118,6	67,0	81,2
Royat	B	2010	0,194	125,2	62,7	87,8
Royat	Γ	2010	0,180	120,6	66,1	89,9
V3	A	2010	0,200	116,5	70,6	157,3
V3	B	2010	0,203	122,4	68,3	148,7
V3	Γ	2010	0,212	134,3	71,8	156,3
V6	A	2010	0,207	121,5	69,2	149,1
V6	B	2010	0,224	117,6	56,4	143,6
V6	Γ	2010	0,267	158,2	81,4	199,3
μπλε	A	2012	0,153	168,659	37,013	155,781
μπλε	B	2012	0,161	169,247	47,973	162,407
μπλε	Γ	2012	0,150	138,109	47,471	164,341
κόκκινο	A	2012	0,147	143,450	50,161	175,846
κόκκινο	B	2012	0,155	166,498	52,947	183,342
κόκκινο	Γ	2012	0,156	160,351	73,375	157,861
κίτρινο	A	2012	0,148	142,334	68,388	165,704
κίτρινο	B	2012	0,148	143,099	79,787	163,560
κίτρινο	Γ	2012	0,141	152,561	67,213	173,551