

ΜΟΥΣΕΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΓΟΥΛΑΝΔΡΗ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΓΑΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗΣ

Επιστημονικός υπεύθυνος : Δρ. Αντώνιος Τσαρμπόπουλος

Τίτλος διδακτορικής διατριβής:

Προσδιορισμός και μελέτη πτητικών συστατικών που εμπεριέχονται σε ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών και οίνων: Παρασκευή Βιολειτουργικών οίνων

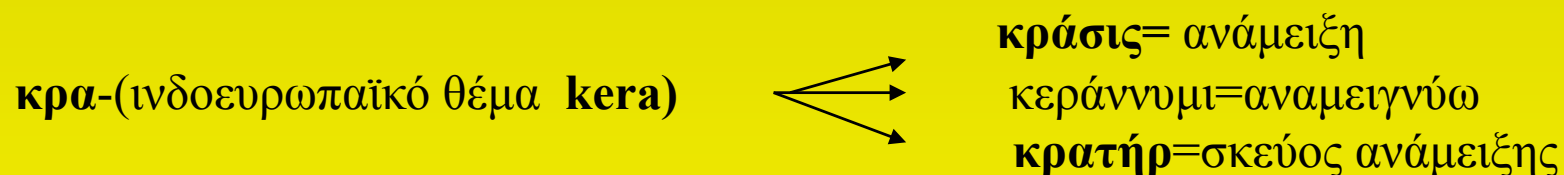
Υπ. Διδάκτορας: Άννα Παληογιάννη



Οι Έλληνες, γνώρισαν το κρασί πιθανότατα από την αρχή της εγκατάστασής τους στο σημερινό τους τόπο, δηλαδή τουλάχιστον πριν το 1700 π.Χ.

Λίγα λόγια για το κρασί

προέλευση της λέξης κρασί



ετυμολογία της λέξης κρασί

Αντανάκλαση συνήθειας Αρχαίων Ελλήνων: κρασί ανακατεμένο με νερό (1:3, οίνος/νερό)

συνήθειες των Αρχαίων Ελλήνων

- ανάμειξη του κρασιού με νερό
- προσθήκη διαφόρων μυρωδικών – μπαχαρικών στο κρασί (θυμάρι, μέντα, πιπέρι, γλυκάνισο, άψινθο (δηλ. παρασκευή βερμούτ= **Ιπποκράτειος Οίνος**)
- προσθήκη ρητίνης (δηλ. παρασκευή ρετσίνας)

Η σύσταση του κρασιού εξαρτάται από:

- την ποικιλία του σταφυλιού
- την ωρίμανση
- το κλίμα
- το έδαφος της αμπελονικής περιοχής
- την αμπελογραφία
- τις τεχνικές καλλιέργειας
- η περιεκτικότητά του σε πτητικά συστατικά.

Με τη χημική ανάλυση των πτητικών επιτυγχάνεται ταξινόμηση κρασιών σύμφωνα

- με τη γεωγραφική τους προέλευση ή
- τη χρονιά εξαίρετης παραγωγής

Που εστιάζει η χημική ανάλυση των πτητικών?

ανάλυση των πτητικών > κατάλληλη ανάλυση αρώματος

ταυτοποίηση συστατικών υπεύθυνων για εξειδικευμένες οσμές-γεύσεις> στη γενική οσμή γεύση του κρασιού

Άρωμα, «μπουκέτο» κρασιού

- 600-800 ουσίες

Ποιές είναι οι ενεργές οσμηρές ουσίες?

- αριθμός

- την τάξη και

- σχετική σημαντικότητα των οσμηρών ενώσεων

- Η πολυπλοκότητα χημικής σύνθεσης των πτητικών κλασμάτων
- το εύρος της συγκέντρωσης που συμμετέχουν στον οίνο (1 ng/l - 1 g/l)
- η ευαισθησία των ουσιών



ποιοτική+ποσοτική ανάλυση πτητικών συστατικών

= εξαιρετικά πολύπλοκη+απαιτητική εργασία

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Ελάχιστες εργασίες υπάρχουν για τα ελληνικά κρασιά (μικρό ποσοστό αφορά στα αρωματικά-πτητικά τους χαρακτηριστικά)
- ιδιαίτερα συμβατές με τα ελληνικά κρασιά υπήρξαν
 - η μέθοδος Moio
 - η χρήση της ρητίνης XAD-4
 - η χρήση «φίλτρων» για απ'ευθείας ένεση κρασιού στο GC-MS (όταν χρησιμοποιείται η πολική στήλη)

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- GC-αέρια χρωματογραφία
- GC-MS αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας**
- GC-O αέρια χρωματογραφία με ηλεκτρονική μύτη
- HPLC-υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία
- GC-FID, αέρια χρωματογραφία με ιονιστή φλόγας
- απ' ευθείας ανάλυση του κρασιού με SPME

Στόχος της παρούσας εργασίας

- η ανάλυση των πτητικών συστατικών των ελληνικών ποικιλιών (λευκών- ροζέ- κόκκινων) των συνεταιρισμών που ανήκουν στον ΚΕΟΣΟΕ.

Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση του GC-MS (αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας) με 2 διαφορετικές σε πολικότητα στήλες, σε συνδυασμό με διάφορες μεθόδους διαχωρισμού ή εκχύλισης.

•η παρασκευή Βιολειτουργικού οίνου

καταλληλότερο συμπλήρωμα για το εκχυλιστικό «σώμα», το κρασί, στη δημιουργία πρόδρομου βιολειτουργικού οίνου, θεωρήθηκε ότι είναι το ελληνικό ενδημικό φυτό, *Sideritis clandestina subsp. clandestina* της οικογένειας **Labiatae**.

Δείγματα κρασιών (2002-2004)

•Περιοχές

- Θήβα (Σαββατιανό, ερυθράς περιοχής)
- Πεζά (Κοτσιφάλι)
- Ρόδος (Αθήρι, Μοσχάτο, grenache rose, αφρώδης οίνος)
- Σάμος (Μοσχάτο)
- Σαντορίνη (Ασύρτικο, Αηδάνι, Βινσάντο-λευκό, Βοϋδόματο, Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Βινσάντο-ερυθρό)
- Τύρναβος (ερυθρό, Ροδίτης λευκό)

•Στάδια οινοποίησης

- μετά τη ζύμωση και τη θείωση και πριν το κολλάρισμα
- μετά το κολλάρισμα
- έτοιμο για εμπορία

Προετοιμασία δείγματος

- Οι φιάλες κρασιού ανοίγονται
- λαμβάνεται το δείγμα
- οι φιάλες κρασιού κλείνονται (προσαρμογή μπαλονιού με Αργό ή Νέο) και αποθηκεύονται σε ψυγείο ή καταψύκτη
- ανάλογα με το στάδιο οινοποίησης το δείγμα φιλτράρεται ή όχι
- Προετοιμασία για την εκχύλιση ή το διαχωρισμό με ρητίνη

• Εκχύλιση ΜΟΙΟ

- **200 ml κρασιού** (vol 11%) + **30 g NaCl** σε κλειστό σύστημα που περιβάλλεται από πάγο (συνθήκες αδρανούς αερίου)
- μαγνητική ανάδευση μέχρι τη διάλυση NaCl
- + **5 ml CH₂Cl₂**
- 3 h μαγνητική ανάδευση
- συλλογή μίγματος σε διαχωριστική χοάνη και παραμονή σε ηρεμία
- διαχωρισμός των 2 φάσεων
- αν η «οργανική φάση»
 - είναι γαλάκτωμα → (φίλτρο ή φυγοκέντρωση)
 - είναι διαυγής
- συγκεντρώνεται σε φιαλίδιο με αφυγραντικό
- φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι να γίνει ένεση στον αέριο χρωματογράφο

- Δέσμευση πτητικών συστατικών κρασιού από τη ρητίνη XAD-4
- Στήλη διαμέτρου **1 εκ.** «πακετάρεται» σε ύψος **10 εκ.** με ρητίνη **XAD-4**
- Η ρητίνη ξεπλένεται με απιονισμένο νερό
- **150 ml κρασιού** αραιώνονται με νερό ώστε **vol= 6 %** (περίπου 1/1)
- Το οινικό διάλυμα διέρχεται χωρίς πίεση από τη στήλη
- Μετά το πέρας του οιν. διαλύματος διέρχεται αέρας από τη στήλη
- Η στήλη ξεπλένεται με **40 ml διαιθυλαιθέρα/πεντάνιο (1/1)**
- Το μίγμα συγκεντρώνεται σε σφαιρική φιάλη με αφυγραντικό
- Για κάθε δείγμα κρασιού επαναλαμβάνουμε 2 φορές
- Μετά από 24 h διηθούμε και συμπηκνώνουμε το μίγμα
- Η συμπήκνωση (μέχρι τα 0,5-1,0 ml) γίνεται
 - με στήλη vigreux
 - με rotary evaporator χωρίς χρήση κενού
- Τα δείγματα συγκεντρώνονται σε φιαλίδια και φυλάσσονται στην κατάψυξη μέχρι να γίνει ένεση στον αέριο χρωματογράφο

Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο με φασματογράφο μάζας

Για τις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιείται το όργανο

FINNIGAN TRACE DSQ με **Autoinjector AI3000** και **Trace GC Ultra**,

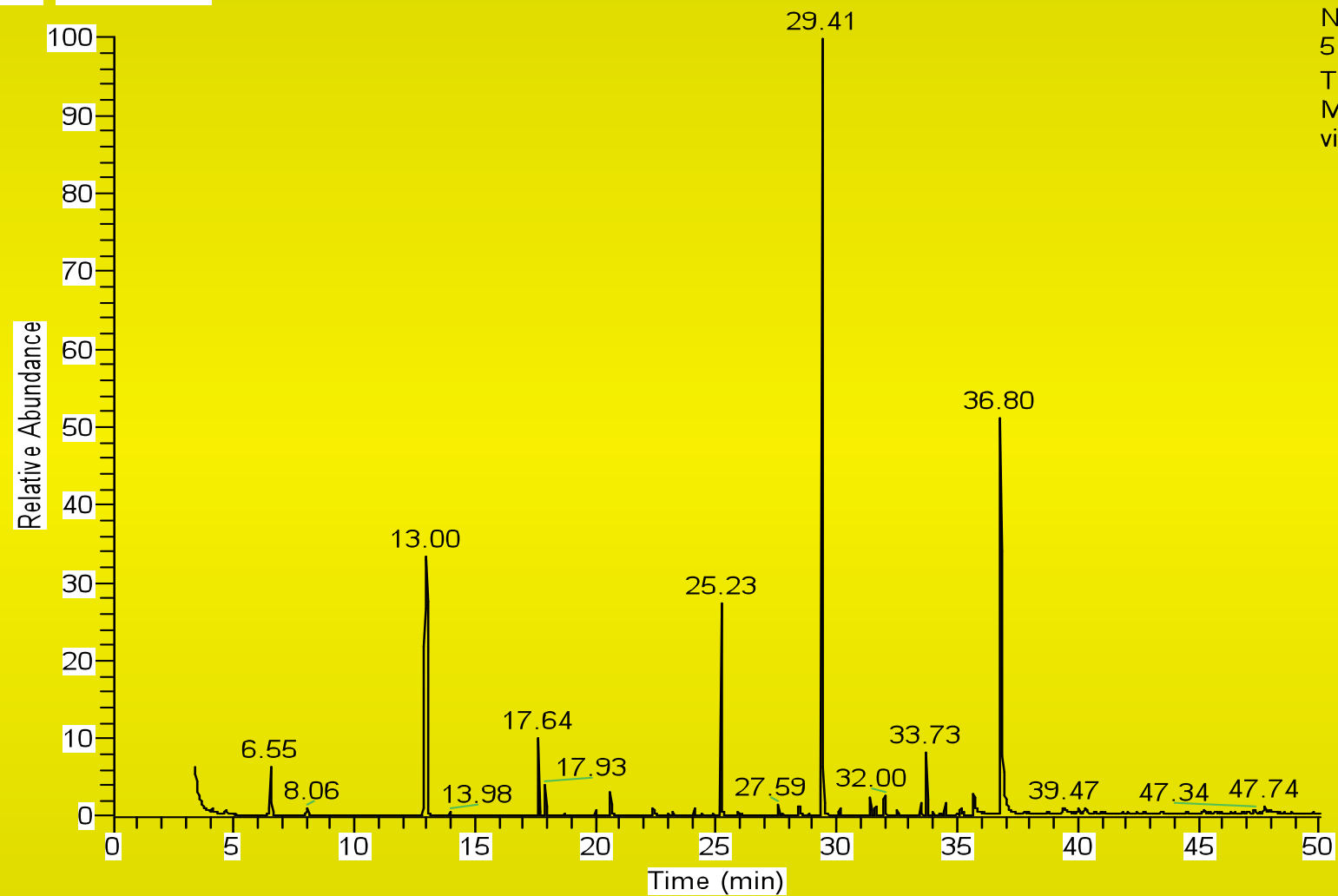
με τις στήλες **ATtm-Aquawax** (30.0 m X 0.32 mm X 0.25 μm)

και **HP 5MS** (30.0 m X 0.25 mm X 0.25 μm).

Η θερμοκρασία της στήλης κυμαίνεται από 40 μέχρι 220 ή 280 °C

με συγκεκριμένο ρυθμό ανόδου ή παραμονής σε κρίσιμες τιμές.

RT: 0.00 - 50.01



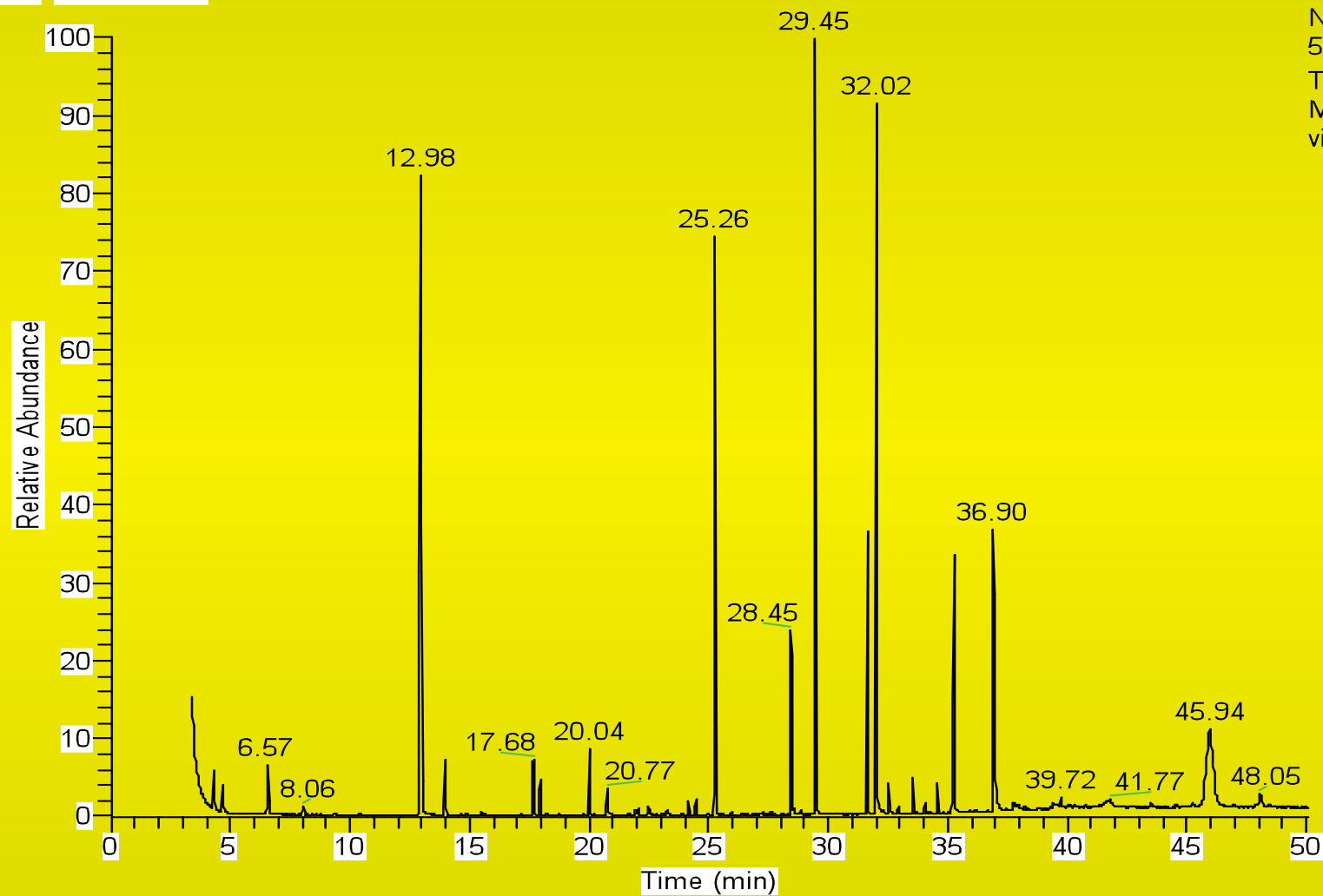
NL:
5.50E7
TIC F:
MS
vin028_m

ΜΑΥΡΟΤΡΑΓΑΝΟ (ΣΑΝΤΟΡΙΝΗ 2004), ΕΚΧ. ΜΟΙΟ (πολική στήλη)

29.41	phenylethyl alcohol or benzeneethanol				26.58
	butanedioic acid, hydroxy-, diethyl ester				
	4-isopropenyl-5-methyl-4-hexen-1-al				0.87
	desulphosinigrin				
32.00	octanoic acid				0.93
	2-(methoxyethoxy) methyl 2, 12-dibromo-7-phenyl-5,6,8,9				
	3-furanacetic acid, 4-hexyl-2,5-dihydro-2,5-dioxo				
	parabanic acid				
	2,4-hexadienoic acid				
33.73	phenol-3-ethyl or phenol-4ethyl				2,45
	4-ethyl-2,6-xlenol (isothymol)				
	butanedioic acid, diethyl ester				
	diethyle 2-hydroxypentanedioate				
34.50	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid, ethyl ester				0.44
	1-cyano-1-piperidinocyclopropane				
35.17	benzene propanoic acid,1-hydroxy ethyl				0.46
	a-D-galactopyranoside, methyl 2,6- bis-O-(trimethylsilyl)-cyclic butylboronate				
	decanoic acid				
35.73	1,2,3-propanetriol (glycerin)				2.01
36.82	ethyl hydrogen succinate				20.16
	benzoic acid				
	tetramethyl 1 benzoyloxy-4,5-dihydropyrido(1,2-A)azerine-2,3,4,5-tetracarboxylate				
	2-furancarboxaldehyde,5-hydroxymethyl)				
	4-piperidinol,1,3-dimethyl-4-phenyl-, propanoate				
	heptadecene-(8)-carbonic acid-(1)				
39.45	oleic acid				1.08
	9-octadecenoic acid, (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl ester				
40.31	1,3-dioxane, 4-methyl-2-pentadecyl-				0.39
	2-pyrrolidinecarboxylic acid-5-oxo-, ethyl ester				
	1H-indole-3-ethanol-				
	5-aminomethyl-6,7,8,9-tetrahydro-5-benzocycloheptenol				
	3,3'-methylenebis (1,5,8,11 tetraoxacyclotridecane)				
	octaethylene glycol monododecyl ether				
	n-hexadecanoic acid				
	hexadecanoic acid, 2,3- dihydroxypropyl ester				
	p-hydroxycinnamic acid, ethyl ester				
	benzoic acid, 4-ethoxy-				
47.76	benzeneethanol, 4-hydroxy				1.04
	16-nitrobicyclo[10,4,0,] hexadecan-1-ol-13-one				
	2-propen-1-ol, 2-methyl-3-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)				
	5-thio-D-glucose				
	octaethylene glycol monododecyl ether59				

33.73	phenol-3-ethyl or phenol-4ethyl				2,45
	4-ethyl-2,6-xilenol (isothymol)				
	butanedioic acid, diethyl ester				
	diethyle 2-hydroxypentanedioate				
34.50	5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid, ethyl ester				0.44
	1-cyano-1-piperidinocyclopropane				
35.17	benzene propanoic acid,1-hydroxy ethyl				0.46
	a-D-galactopyranoside, methyl 2,6- bis-O-(trimethylsilyl)-cyclic butylboronate				
	decanoic acid				
35.73	1,2,3-propanetriol (glycerin)				2.01
36.82	ethyl hydrogen succinate				20.16
	benzoic acid				
	tetramethyl 1 benzoyloxy-4,5-dihydropyrido(1,2-A)azepine-2,3,4,5-tetracarboxylate				
	2-furancarboxaldehyde,5-hydroxymethyl)				
	4-piperidinol,1,3-dimethyl-4-phenyl-, propanoate				
	heptadecene-(8)-carbonic acid-(1)				
39.45	oleic acid				1.08
	9-octadecenoic acid, (2-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl) methyl ester				
40.31	1,3-dioxane, 4-methyl-2-pentadecyl-				0.39
	2-pyrrolidinecarboxylic acid-5-oxo-, ethyl ester				
	1H-indole-3-ethanol-				
	5-aminomethyl-6,7,8,9-tetrahydro-5-benzocycloheptenol				
	3,3'-methylenebis (1,5,8,11 tetraoxacyclotridecane)				
	octaethylene glycol monododecyl ether				
	n-hexadecanoic acid				
	hexadecanoic acid, 2,3- dihydroxypropyl ester				
	p-hydroxycinnamic acid, ethyl ester				
	benzoic acid, 4-ethoxy-				
47.76	benzeneethanol, 4-hydroxy				1.04
	16-nitrobicyclo[10,4,0,] hexadecan-1-ol-13-one				
	2-propen-1-ol, 2-methyl-3-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)				
	5-thio-D-glucose				
	octaethylene glycol monododecyl ether59				

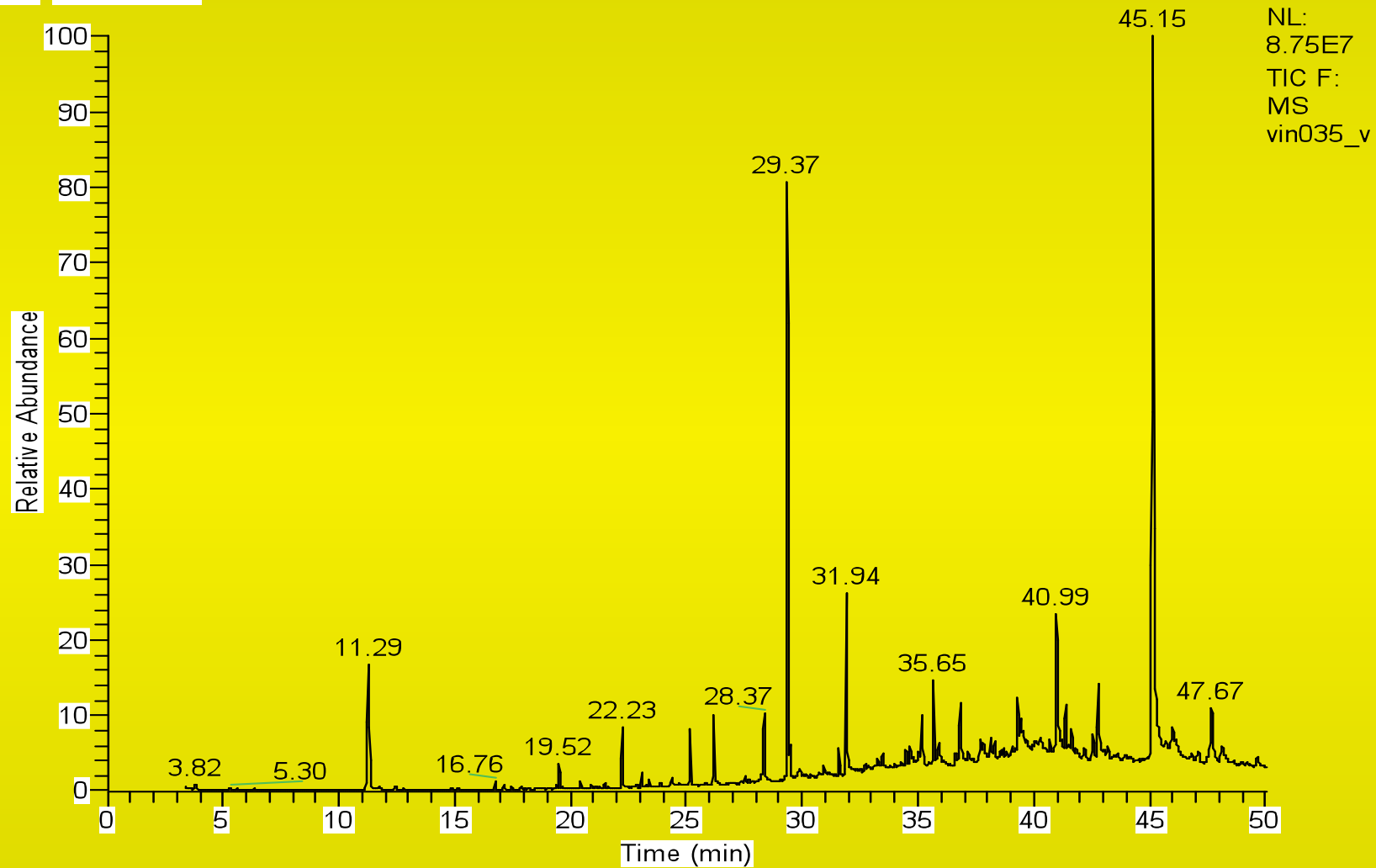
RT: 0.00 - 50.03



NL:
5.84E7
TIC F:
MS
vin007m_

ΣΑΒΒΑΤΙΑΝΟ (ΠΡΙΝ ΤΟ ΚΟΛΛΑΡΙΣΜΑ- ΘΗΒΑ 2002) ΕΚΧ. ΜΟΙΟ (πολική στήλη)

RT: 0.00 - 50.01



ΑΘΗΡΗ (ΡΟΔΟΣ 2004) –ΡΗΤΙΝΗ Χad-4-ΣΥΜΠΗΚΝΩΣΗ vigreux (πολική στήλη)

Τα μέχρι τώρα πειράματα της ανάλυσης πτητικών αποβλέπουν

--στη σύγκριση των περιεκτικοτήτων σε πτητικά:

- των ιδίων ποικιλιών (διαφορετικές αμπελονικές ζώνες)
 - των διαφορετικών ποικιλιών (της ίδια αμπελονικής ζώνης)
 - των ίδιων ποικιλιών, της ίδια αμπελονικής ζώνης, σε διαφορετικές χρονιές
- στην καταγραφή των ιδιαιτεροτήτων εκάστου οίνου (γεύση)
- στην αναγνώριση των «κρίσιμων-ουσιών» (βασικός παράγοντας γεωγραφικής θέσης)

Βιολειτουργικός οίνος και προοπτικές

Στα πρώτα πειράματα συμπεριλαμβάνονται

- η φυτοχημική ανάλυσή του «τσαγιού του βουνού», *Sideritis clandestina subsp. clandestina* της οικογένειας **Labiatae**, γνωστό για τα αφεψήματά του και τις θεραπευτικές του ιδιότητες, όχι όμως και ερευνητικά (στα πρώτα ευρήματα ανήκουν ουσίες όπως η α- μπισαμπολόλη και η σιδερόλη)

- η χρησιμοποίηση δυο «δυνατών», από άποψη γλυκιάς γεύσης και φήμης, ελληνικών κρασιών, σαν εκχυλιστικό μέσο για τη δημιουργία βιολειτουργικού οίνου, του **Μοσχάτου Σάμου** και της **Μαυροδάφνης Πατρών**.

Ταξιανθίες καθώς και υδατικό εκχύλισμα του τσαγιού εμβαπτίσθηκαν ή διαλύθηκαν στα 2 κρασια, παρέμειναν σε δροσερό και σκιερό μέρος και δοκιμάζονταν «γευστικά» κατά το πέρασμα των ημερών.

