



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

———— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ————

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

**Μελέτη ξύλων των ειδών *Quercus* και *Robinia* με
χρήση στη διαδικασία παλαίωσης του οίνου**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

Ειρήνη-Μαρία Κουή

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2019

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών

Απομόνωση – Ανάπτυξη - Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας

Μελέτη ξύλων των ειδών *Quercus* και *Robinia* με χρήση στη διαδικασία παλαίωσης του οίνου

Φοιτήτρια

Ειρήνη-Μαρία Κουή

A. M: 160804

Επιβλέπων Καθηγητής

Αναπληρωτής Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναπλ. Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης

Αναπλ. Καθηγητής Γιώργος Κοτσερίδης

Αναπλ. Καθηγήτρια Φωτεινή Λάμαρη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γιώργο Κοτσερίδη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φωτεινή Λάμαρη.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο, επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την αποδοχή και ένταξή μου στην ερευνητική του ομάδα, για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας, την υπομονή του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τη δυνατότητα περαιτέρω επιστημονικής κατάρτισης που μου προσέφερε, μέσω της άριστης συνεργασίας μας.
- Τη μεταδιδάκτορα Χείλαρη Αντιγόνη για την πολύτιμη βοήθειά της στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τις επιστημονικές συμβουλές της και την ηθική υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας αυτής, την υπομονή της και το αμείωτο και συνεχές ενδιαφέρον της, που συνετέλεσαν σε μία άψογη συνεργασία.
- Το μεταδιδάκτορα Διονύση Αμπάτη για τη βοήθεια, την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.
- Την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Ντίνα για την πολύτιμη βοήθεια της εντός του εργαστηρίου και την προθυμία της να παρέχει τις γνώσεις και συμβουλές της.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Κοτσερίδη Γιώργο για την υλοποίηση του Γευστικού και Οσφρητικού Ελέγχου των κλασμάτων FCPC.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου και όλα τα μέλη του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και επικοινωνίας.
- Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και τους στενούς φίλους μου για τη συμπαράστασή τους.

Περίληψη

Πεδίο έρευνας του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων αποτελεί η μελέτη φυσικών προϊόντων χερσαίας ή θαλάσσιας προέλευσης, τα οποία θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές εφαρμογές στους τομείς της φαρμακευτικής, της κοσμετολογίας, των τροφίμων και της γεωργίας.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σκοπός αποτέλεσε η συγκριτική μελέτη του φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων των μετρίως ψημένων ξύλων (υπό τη μορφή “chips”) τεσσάρων ειδών των γενών *Quercus* και *Robinia* και ιδιαίτερα, των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων (EtOH:H₂O 1:1) των λιγότερο μελετημένων ξύλων των ειδών *Quercus robur* και *Robinia pseudoacacia*. Τα ξύλα των συγκεκριμένων ειδών και ιδιαίτερα του γένους *Quercus* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στον τομέα της οινοποίησης και συγκεκριμένα στην κατασκευή των βαρελιών εντός των οποίων ο οίνος παλαιώνει. Σχετικά πρόσφατα, τα ξύλα διαφόρων ειδών συνήθως υπό τη μορφή “chips”, χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στον οίνο για την επίτευξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, τα οποία ο οίνος αποκτά μέσω της παραδοσιακής διαδικασίας της παλαίωσης, σε λιγότερο χρόνο και με μικρότερο κόστος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της παλαίωσης, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως η γεύση και η οσμή του, τροποποιούνται, εξαιτίας της εκχύλισης στον οίνο συστατικών περιεχόμενων στα χρησιμοποιούμενα ξύλα οινοποίησης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αρχικά πραγματοποιήθηκε σύγκριση του χημικού προφίλ των εκχυλισμάτων των ξύλων, υπό τη μορφή “chips” μετρίου βαθμού ψησίματος (MT: Medium Toasted), των ειδών *Quercus petraea*, *Quercus alba*, *Quercus robur* και *Robinia pseudoacacia*. Η παραλαβή των εκχυλισμάτων από τις προαναφερόμενες πρώτες ύλες πραγματοποιήθηκε με συμβατική εκχύλιση με Διαβροχή, ενώ ακολούθως έλβε χώρα κλασμάτωση με εφαρμογή Υγρής-Υγρής εκχύλισης. Παράλληλα, τα τέσσερα υλικά εκχυλίστηκαν και με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (ASE) και πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη του φυτοχημικού προφίλ όλων των παραληφθέντων εκχυλισμάτων με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC).

Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των “chips” του ξύλου του είδους *Q. robur* επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη και υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC). Τα προκύπτοντα κλάσματα αξιολογήθηκαν ως προς την οσμή και τη

γεύση τους, με τη χρήση της μεθοδολογίας του Περιγραφικού Οργανοληπτικού Ελέγχου και τα πιο άπολα κλάσματα αναλύθηκαν με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS), για το χαρακτηρισμό των περιεχόμενων μεταβολιτών τους. Από την προαναφερόμενη διαδικασία, συνολικά ταυτοποιήθηκαν 21 δευτερογενείς μεταβολίτες.

Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα των chips του ξύλου του είδους *Robinia pseudoacacia*, επίσης επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη και υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC). Τα προκύπτοντα κλάσματα αξιολογήθηκαν ως προς την οσμή και τη γεύση τους, με τη χρήση της μεθοδολογίας του Περιγραφικού Οργανοληπτικού Ελέγχου και τα κλάσματα με γλυκιά γεύση, αναλύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Sephadex-LH20) και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (prep-TLC).

Από την προαναφερόμενη διαδικασία, συνολικά ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) 12 δευτερογενείς μεταβολίτες και συγκεκριμένα:

Κονιφεραλδεΐδη (**Rp1**), σιναπαλδεΐδη (**Rp2**), βανιλίνη (**Rp3**), 4-υδροξυσαλικυλικό οξύ ή 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (**Rp4**), συριγγαλδεΐδη (**Rp5**), μπουτίνη (**Rp6**), ρομπινετίνη (**Rp7**), μπουτεΐνη (**Rp8**), ρομπτίνη (**Rp9**), συριγγυλογλυκερόλη (**Rp10**), συριγγικό οξύ (**Rp11**) και 6,3',4',5'-τετραυδροξυισσαουρόνη (**Rp12**).

Οι μεταβολίτες Rp1, Rp2, Rp3, Rp4, Rp5, Rp6, Rp8, και Rp11 έχουν ταυτοποιηθεί στο είδος *R. pseudoacacia* αλλά δεν έχουν απομονωθεί ξανά. Ο μεταβολίτης Rp12 αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Quercus petraea, *Quercus alba*, *Quercus robur*, *Robinia pseudoacacia*, τσιπς ξύλου, παλαίωση οίνου, ASE, FCPC, Περιγραφικός Οργανοληπτικός Έλεγχος, γλυκιά γεύση, φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, φυτοχημική ανάλυση

Abstract

The main research interests of the Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry is the study of natural products of terrestrial or marine origin, which have significant applications in the fields of pharmacy, cosmetology, food and agriculture.

In the context of this diploma thesis, the aim was to explore and compare the phytochemical profile of extracts of smoked wood chips of four plant species of the genus *Quercus* and *Robinia* and particularly, the study of the hydralcoholic extracts (EtOH: H₂O 1:1) of the less studied wood of *Quercus robur* and *Robinia pseudoacacia*. The wood of the specific plant species and especially of the genus *Quercus* are traditionally used in winemaking and specifically in the manufacture of barrels in which the wine ages. Recently, woods of different plant species, usually in the form of chips, are used as additives in wine to achieve the organoleptic characteristics that wine acquires through the traditional ageing process in less time and at a lower cost. During the wine ageing process, the organoleptic characteristics of wine, such as its flavor and smell, are modified due to the extraction of compounds from the woods that are utilized during vinification.

In this diploma thesis, a comparison of the phytochemical profile of the extracts of wood in the form of medium toasted (MT: Medium Toasted) chips of the species *Quercus petraea*, *Quercus alba*, *Quercus robur* and *Robinia pseudoacacia*, was initially carried out. The extraction of each species was performed by conventional extraction with maceration, followed by liquid-liquid extraction. Simoultaneously, the four studied plant species were extracted successively by Accelerated Solvent Extraction (ASE) and the phytochemical profile of all extracts obtained was a compared by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC).

The hydralcoholic extracts of *Quercus robur* and *Robinia pseudoacacia* wood chips were selected for further analysis and subjected to fractionation by Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC). The resulting fractions were characterized for their odor and taste by the technique of Descriptive Sensory Analysis. In the case of *Q. robur*, the most unpolar fractions were subjected into GC-MS analysis for the characterization of their profile, resulting to the identification of 21 secondary metabolites. In the case of *R. pseudoacacia*, FCPC fractions with sweet flavor were further analyzed using various chromatographic techniques, such as Size-Exclusion Chromatography (Sephadex-LH20) and preparative Thin

Layer Chromatography (prep-TLC). This procedure led to the identification and structure elucidation of 12 secondary metabolites by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1D & 2D NMR)

As far as secondary metabolites are concerned, there were identified:

coniferyl aldehyde (**Rp1**), sinapic aldehyde (**Rp2**), vanillin (**Rp3**), 4-hydroxysalicylic acid (**Rp4**), syringic aldehyde (**Rp5**), butin (**Rp6**), robinetin (**Rp7**), butein (**Rp8**), robtin (**Rp9**), syringyl glycerol (**Rp10**), syringic acid (**Rp11**) and 6,3',4',5'-tetrahydroxyisoaurone (**Rp12**).

Metabolites Rp1, Rp2, Rp3, Rp4, Rp5, Rp6, Rp8, and Rp11 have been identified previously but have not been isolated in *R. pseudoacacia*. Metabolite **Rp12** is a new natural compounds.

KEY WORDS:

Quercus petraea, *Quercus alba*, *Quercus robur*, *Robinia pseudoacacia*, wood chips, wine aging, ASE, FCPC, Descriptive Sensory Analysis, sweet taste, flavonoids, phenolic compounds, phytochemical analysis

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	v
Περίληψη	vii
Abstract	ix
Περιεχόμενα.....	xi
Συνομεύσεις	xvi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1 Η Επιστήμη της Οινοποιίας.....	2
1.1 Τα βήματα της οινοποίησης	3
1.1.1 Συγκομιδή-Τρύγος.....	4
1.1.2 Έκθλιψη.....	4
1.1.3 Ζύμωση	5
1.1.4 Παλαίωση του οίνου	6
1.1.5 Εμφιάλωση.....	6
1.2 Παλαίωση οίνου σε βαρέλι	7
1.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην παλαίωση του οίνου.....	8
1.2.1.1 Η μέθοδος παρασκευής του οίνου.....	8
1.2.1.2 Οι ποικιλίες του κρασιού.....	8
1.2.1.3 Παράγοντες σχετικοί με το βαρέλι.....	9
1.2.1.4 Το περιβάλλον παλαίωσης.....	11
1.3 Ξύλα οινοποίησης.....	12
1.4 Αρωματισμός του οίνου - Σύγχρονες πρακτικές παλαίωσης.....	15
1.4.1 Θραύσματα ξύλου (“Wood chips”).....	17
2 Οικογένεια <i>Fagaceae</i>	20
2.1 Κοινή Δρυς - <i>Quercus robur</i>	21
2.1.1 Ταξινομική και Βοτανική Περιγραφή του είδους <i>Q. robur</i>	21
2.1.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες του είδους <i>Q. robur</i>	22
2.1.2.1 Πολυφαινολικά συστατικά	23
2.1.2.1.1 Απλά πτητικά φαινολικά συστατικά.....	24
2.1.2.1.2 Φαινολικά οξέα.....	25
2.1.2.1.3 Φαινολικές αλδεΐδες	26
2.1.2.1.4 Ελλαγτανίνες.....	28

2.1.2.2	Φουρανικά παράγωγα	30
2.1.2.3	Λακτόνες	31
2.1.2.4	Αλειφατικές Αλδεΐδες	32
2.1.2.5	Τερπενοειδή	33
2.1.2.5.1	Μονοτερπένια	34
2.1.2.5.2	Νορισοπρενοειδή	35
2.1.2.5.3	Τριτερπενοειδή	35
2.1.2.5.4	Καροτενοειδή.....	41
2.1.3	Επίδραση του ψησίματος στο φυτοχημικό προφίλ του ξύλου του είδους <i>Q. robur</i>	43
2.1.4	Φαρμακολογικές Δράσεις του είδους <i>Q. robur</i>	43
2.1.5	Χρήσεις του ξύλου του είδους <i>Q. robur</i>	45
3	Οικογένεια <i>Fabaceae</i>	46
3.1	Ακακία - <i>Robinia pseudoacacia</i>	46
3.1.1	Ταξινόμηση και Βοτανική Περιγραφή του είδους <i>R. pseudoacacia</i>	46
3.1.2	Δευτερογενείς Μεταβολίτες του είδους <i>R. pseudoacacia</i>	48
3.1.2.1	Απλά Φαινολικά συστατικά.....	49
3.1.2.1.1	Απλά πτητικά φαινολικά συστατικά.....	49
3.1.2.1.2	Φαινολικά οξέα.....	50
3.1.2.1.3	Φαινολικές αλδεΐδες	51
3.1.2.1.4	Φαινολικές κετόνες.....	51
3.1.2.2	Φλαβονοειδή.....	52
3.1.2.2.1	Φλαβανόλες.....	55
3.1.2.2.2	Φλαβανόνες.....	55
3.1.2.2.3	Χαλκόνες	56
3.1.2.2.4	Αουρόνες	56
3.1.2.2.5	Φλαβονόλες.....	57
3.1.2.3	Συμπυκνωμένες ταννίνες	57
3.1.2.4	Στυλβένια.....	59
3.1.2.5	Φουρανικά Παράγωγα	60
3.1.2.6	Λακτόνες	61
3.1.3	Επίδραση του ψησίματος στο φυτοχημικό προφίλ του ξύλου του είδους <i>Robinia pseudoacacia</i> 61	
3.1.4	Φαρμακολογικές Δράσεις του είδους <i>R. pseudoacacia</i>	62
3.1.5	Χρήσεις ξύλου του είδους <i>R. pseudoacacia</i>	63
	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	64
4	Φυτικό Υλικό.....	65

4.1	“Chips” Ξύλου Δρυός και Ακακίας	65
5	Τεχνικές Εκχύλισης.....	65
5.1	Συμβατική Εκχύλιση με Διαβροχή - (Maceration).....	65
5.2	Υγρή-Υγρή Εκχύλιση - (Liquid-Liquid Extraction).....	66
5.3	Επιταχυνόμενη εκχύλιση – (Accelerated Solvent Extraction - ASE).....	67
6	Χρωματογραφικές Τεχνικές.....	69
6.1	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography -Analytical TLC)	69
6.2	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC).....	71
6.3	Χρωματογραφίες Στήλης.....	72
6.3.1	Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης (Low Pressure Liquid Column Chromatography - LPLC)	72
6.3.2	Υγρή Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού - (Size Exclusion Chromatography - Sephadex LH-20)	73
6.4	Χρωματογραφία κατ’ Αντιρροή (Countercurrent Chromatography - CCC) / Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (Centrifugal Partition Chromatography - CPC)	75
7	Φασματοσκοπικές Τεχνικές.....	78
7.1	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	78
7.2	Αέριος Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	79
8	Περιγραφικός Οργανοληπτικός Έλεγχος Οίνου - (Descriptive Sensory Analysis)	80
8.1	Σχεδιασμός του οργανοληπτικού ελέγχου (Sensory study design)	80
8.2	Αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μελετώμενων οίνων (Sensory evaluation of wines).....	81
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ.....	82
9	Εκχυλίσεις Ξύλων Οινοποίησης (<i>Quercus robur</i>, <i>Quercus alba</i>, <i>Quercus petraea</i>, <i>Robinia pseudoacacia</i>).....	83
9.1	Συμβατική Εκχύλιση με Διαβροχή (Maceration).....	83
9.2	Υγρή-Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction).....	84

9.3	Επιταχυνόμενη Εκχύλιση (ASE).....	86
9.4	Σύγκριση φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC).....	89
10	Μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου Σλαβονικής δρυός (<i>Quercus robur</i>).....	92
10.1	Κλασμάτωση εκχυλίσματος <i>Q. robur</i> με FCPC	93
10.1.1	Επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών έκλουσης.....	93
10.1.2	Εκτέλεση διαχωρισμού με FCPC.....	96
10.1.2.1	FCPC στο υδατοαλκοολικό (Maceration EtOH:H ₂ O 50:50) εκχύλιμα του ξύλου του φυτού <i>Quercus robur</i> -CPC4	97
10.1.2.2	Επαναληπτικό FCPC στο υδατοαλκοολικό (Maceration EtOH:H ₂ O 50:50) εκχύλιμα του ξύλου του φυτού <i>Quercus robur</i> -CPC5.....	100
10.2	Έλεγχος φυτοχημικού προφίλ κλασμάτων FCPC (CPC4 και CPC5) με HPTLC	103
10.3	Έλεγχος πτητικών συστατικών κλασμάτων FCPC με GC-MS	108
10.4	Γευστικός και Οσφρητικός Έλεγχος κλασμάτων FCPC.....	116
10.5	Απομόνωση Δευτερογενών Μεταβολιτών εκχυλίσματος <i>Q. robur</i>	117
10.5.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα δευτερογενών μεταβολιτών του είδους <i>Q. robur</i>	118
10.5.1.1	Μεταβολίτης Qr16.....	118
11	Μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου Ακακίας (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	119
11.1	Κλασμάτωση του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου <i>R. pseudoacacia</i> με τη μέθοδο FCPC	120
11.1.1	Επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών έκλουσης.....	120
11.1.2	Εκτέλεση διαχωρισμού με FCPC.....	122
11.1.2.1	FCPC στο υδατοαλκοολικό (ASE EtOH:H ₂ O 50:50) εκχύλιμα του ξύλου του είδους <i>R. Pseudoacacia</i> - CPC6	123
11.1.2.2	Επαναληπτικό FCPC στο υδατοαλκοολικό (EtOH:H ₂ O 50:50) εκχύλιμα του ξύλου του είδους <i>R. pseudoacacia</i> - CPC7	128
11.2	Έλεγχος φυτοχημικού προφίλ κλασμάτων FCPC (CPC6 και CPC7) με HPTLC	131
11.3	Γευστικός και Οσφρητικός έλεγχος κλασμάτων FCPC.....	134
11.4	Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών του είδους <i>R. pseudoacacia</i> από τα κλάσματα του CPC7	135

11.4.1	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_2.....	136
11.4.2	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_3.....	136
11.4.3	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_5.....	136
11.4.4	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_6.....	138
11.4.5	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_9.....	140
11.4.6	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_10.....	141
11.4.7	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_11.....	143
11.4.8	Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_12.....	144
11.5	Φασματοσκοπικά δεδομένα δευτερογενών μεταβολιτών του είδους <i>R. pseudoacacia</i>	
	146	
11.5.1	Μεταβολίτης Rp1	146
11.5.2	Μεταβολίτης Rp2	147
11.5.3	Μεταβολίτης Rp3	148
11.5.4	Μεταβολίτης Rp4	149
11.5.5	Μεταβολίτης Rp5	151
11.5.6	Μεταβολίτης Rp6	152
11.5.7	Μεταβολίτης Rp7	153
11.5.8	Μεταβολίτης Rp8	155
11.5.9	Μεταβολίτης Rp9	156
11.5.10	Μεταβολίτης Rp10	157
11.5.11	Μεταβολίτης Rp11	159
11.5.12	Μεταβολίτης Rp12	160
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	162
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	165
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	176

Συντομεύσεις

°C	βαθμοί Κελσίου
%	επί τοις εκατό
δ	χημική μετατόπιση
μg	μικρογραμμάρια
μmol	micromole
1D	μιας διάστασης
2D	δύο διαστάσεων
¹ H	πρωτόνιο
¹³ C	ισότοπο άνθρακα
AcN	ακετονιτρίλιο
ASE	Accelerated Solvent Extraction
brs	ευρεία μονή κορυφή
BuOH	βουτανόλη
C	άνθρακας
CCC	CounterCurrent Chromatography
CHCl ₃	χλωροφόρμιο
cm	centimetres (εκατοστόμετρα)
CoA	Συνένζυμο Α
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Centrifugal Partition Chromatography
<i>d</i>	διπλή κορυφή
<i>dd</i>	διπλώς διπλή κορυφή
<i>ddd</i>	διπλώς διπλή διπλής κορυφή
DCM	διχλωρομεθάνιο
DMAPP	πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
<i>et al</i>	<i>et alii</i> (και άλλοι)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	αιθανόλη
FA	φορμικό οξύ
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography
Fr	Fraction (κλάσμα)
g	grams (γραμμάρια)
GC-MS	Gas Chromatography—Mass Spectrometry
GGPP	διφωσφορικό γερανυλγερανύλιο
Glu	γλυκόζη
GPP	πυροφωσφορικό γερανύλιο
H	υδρογόνο
He	Ήλιο
Hept	Επτάνιο
HHDP	Hexa-Hydroxy-Di-Phenyl
H ₂ O	νερό
Hex	εξάνιο
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
	Συγκέντρωση μιας ουσίας ή μείγματος ουσιών στην οποία παρουσιάζεται το 50% της αναστολής μιας βιολογικής δράσης
IPP	πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο
J	Joule
<i>J</i>	βαθμός σύζευξης διπόλου-διπόλου
K_d	Συντελεστής Κατανομής
kg	kilogram (χιλιόγραμμα)
L	Litres (λίτρα)
LP	Lower Phase (κάτω φάση)
L.	Carl Linnaeus, βοτανικός
MeOH	μεθανόλη
MeOD	δευτεριωμένη μεθανόλη
MHz	MegaHertz
MP	Medium phase (μεσαία φάση)
MT	Medium Toasted (Ελαφρώς ψημένα)
m	metres
mg	milligram (χιλιοστόγραμμα)
min	λεπτά
mL	χιλιοστόλιτρα
mm	χιλιοστά
mol	mole (γραμμομόριο)
MTBE	μεθυλο-τεрт-βουτυλαιθέρας
N ₂	άζωτο
nm	nanometres (νανόμετρα)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Normal Phase (κανονική φάση)
NPP	πυροφωσφορικό νερύλιο
O	οξυγόνο
prep-TLC	preparative TLC
ppm	Parts per Million
psi	pound per square inch (μονάδα μέτρησης πίεσης)
<i>q</i>	Quartet (τετραπλή) κορυφή
QTT	Quercotriterpenoside
Rf	Retention Factor (συντελεστής συγκράτησης ή επιβράδυνσης)
RP	Reverse Phase (αντίστροφη φάση)
rpm	rounds per minute (στροφές ανά λεπτό)
RT	Retention Time (χρόνος συγκράτησης)
<i>s</i>	Singlet (απλή) κορυφή
<i>t</i>	Triplet (τριπλή) κορυφή
TLC	Thin Layer Chromatography
UP	Upper Phase (άνω φάση)
UV	Ultra Violet (υπεριώδες)
Πρβλ.	Παράβαλε
π.Χ.	προ Χριστού
π.χ.	παραδείγματος χάριν

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Η Επιστήμη της Οινοποιίας

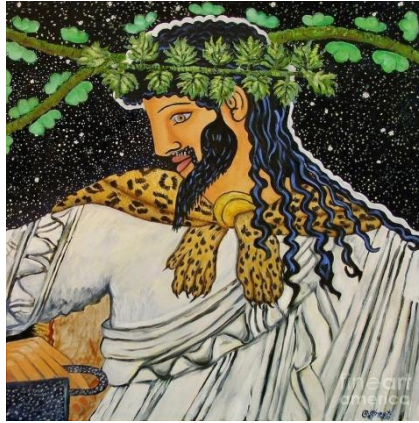
Η επιστήμη της οινοποιίας μελετά το σύνολο των διεργασιών και των τεχνικών που σχετίζονται με την παραγωγή του οίνου. Ο οίνος είναι ένα οινοπνευματώδες ποτό, προϊόν της πλήρους ή μερικής ζύμωσης των σταφυλιών (τα οποία έχουν υποστεί έκθλιψη ή όχι) ή του γλεύκους σταφυλιών (μούστος). Ο όρος 'κρασί' παραπέμπει σε προϊόν από σταφύλια, αν και ανάλογα ποτά έχουν παραχθεί από άλλα φρούτα ή καρπούς. Το κρασί είναι ιδιαίτερου πολιτισμικού και οικονομικού ενδιαφέροντος, από την παρουσία του σε θρησκευτικές τελετές για πολλούς πολιτισμούς μέχρι του καίριου ρόλου του στη πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής αλλά και της μεγάλης σημασίας του ως γεωργικό προϊόν για πολλές περιοχές. (Baiano et al., 2013)

Σύμφωνα με το λεξικό της νέας ελληνικής γλώσσας του Γ. Μπαμπινιώτη, η λέξη "οίνος", είναι αβέβαιης ετυμολογικής προέλευσης, αν και ευρύτατα διαδεδομένη στις περισσότερες ινδοευρωπαϊκές γλώσσες, χωρίς ωστόσο να έχει ινδοευρωπαϊκή προέλευση (Πρβλ. λατινικά *vinum*, γαλλικά *vin*, ισπανικά *vin*, γερμανικά *wein*, αγγλικά *wine*). Η λέξη οίνος πιθανότατα αποτελεί γλωσσικό γέννημα του αρχαϊκού "Φοίνος" (προφέρεται βοίνος). Η λέξη κρασί, προέρχεται από την κράση (ανάμειξη) που δήλωνε αρχικά την ανάμειξη οίνου και νερού, δηλαδή τον "κεκραμένον οίνον" που χρησιμοποιούσαν στα συμπόσια οι Αρχαίοι Έλληνες, για να επεκταθεί αργότερα σε κάθε είδους οίνο. (Τσακίρης, 2005)

Τα ίχνη της αμπέλου χάνονται στο βάθος των προϊστορικών χρόνων. Η καταγωγή της δεν έχει καθοριστεί ακόμη με ακρίβεια, καθώς, σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, η αμπελοργία ξεκίνησε από την Ανατολή, γύρω στα 5000 π.Χ., ενώ άλλοι ισχυρίζονται πως πρωτοεμφανίστηκε στη Δυτική Ασία. Το είδος Άμπελος η οινοφόρος (*Vitis vinifera*) πιθανότατα εμφανίστηκε, μετά την εποχή των παγετώνων, σε περιοχές με ευνοϊκότερο κλίμα, όπως οι περιοχές του Καυκάσου και της Μεσοποταμίας. (Soleas et al., 1997)

Δεν γνωρίζουμε με ακρίβεια ποιος λαός μετέδωσε στους αρχαίους Έλληνες τα μυστικά και τις τεχνικές οινοποίησης, όμως, σύμφωνα με την επικρατέστερη θεωρία, οι αρχαίοι Έλληνες διδάχτηκαν την οινοποιία από τους ανατολικούς λαούς (Φοίνικες ή/και Αιγύπτιους), με τους οποίους τόσο οι Μυκηναίοι όσο και οι Κυκλαδίτες και Μινωίτες, είχαν ανεπτυγμένες εμπορικές σχέσεις. Ήδη από τα αρχαία κείμενα του Ομήρου, γίνεται αναφορά σε πόλεις στις οποίες αποδίδονται χαρακτηρισμοί όπως "πολυστάφυλον Άρνην" της Βοιωτίας, "πολυστάφυλον Ιστιαίαν" της Εύβοιας, "αμπελόεντί Επίδαυρον" της Αργολίδος. Στην

Ελλάδα το αμπέλι καλλιεργείται από τον 15^ο αιώνα π.Χ., ενώ στη συνέχεια η καλλιέργειά του επεκτάθηκε και στη λοιπή Ευρώπη. Στη χώρα μας, κατά την αρχαιότητα, θεός του αμπελιού και του κρασιού ήταν ο Διόνυσος, η λατρεία του οποίου κατά τα 'Διονύσια' υποχρέωνε όλους σε οινοποσία, η άρνηση της οποίας θεωρείτο ασέβεια. (Unwin, 2003)



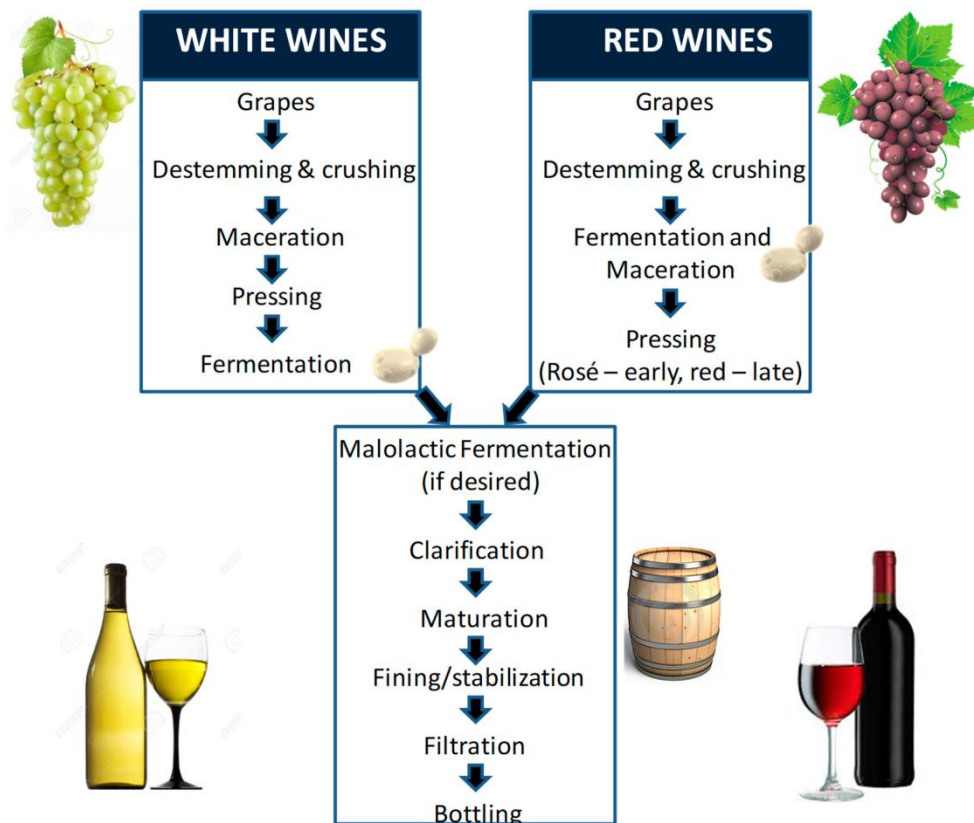
Εικόνα 1 Ο Διόνυσος, θεός του αμπελιού και του κρασιού κατά την αρχαιότητα (Unwin, 2003).

Το κρασί παραμένει και σήμερα ένα εκ των κυριότερων ελληνικών παραδοσιακών αγροτικών προϊόντων, με ιδιαίτερη οικονομική και κοινωνική σημασία.

1.1 Τα βήματα της οινοποίησης

Ο οίνος προέρχεται από τα χυμοτόπια της σάρκας των ραγών. Στα χυμοτόπια εντοπίζονται τα σάκχαρα στα ώριμα σταφύλια και τα υπεύθυνα για τη γεύση του οίνου οξέα. Οι ανθοκυάνες που διαμορφώνουν το χρώμα των ερυθρών οίνων, αποτελούν ένα μεγάλο μέρος των φαινολικών παραγώγων και αρωματικών συστατικών που είναι συγκεντρωμένα στο φλοιό των σταφυλιών. Ανάλογα με τον τρόπο που εργάζεται ο οινοποιός αλλά και με το επιθυμητό χρώμα του παραγόμενου οίνου (λευκό/ λευκή οινοποίηση, ερυθρό/ερυθρή οινοποίηση), το υδροαλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση εμπλουτίζεται λιγότερο ή περισσότερο με τα συστατικά του φλοιού.

Η οινοποίηση περιλαμβάνει το σύνολο των διαδικασιών (Εικόνα 2), οι οποίες ξεκινούν με τη συγκομιδή των σταφυλιών και ολοκληρώνονται με την εμφιάλωση του οίνου, στον οποίο έχει ολοκληρωθεί η μετατροπή των περιεχόμενων σακχάρων σε αιθανόλη. Η Οινολογία ορίζεται ως η επιστήμη της οινοποίησης, που στην πράξη απαιτεί τεχνολογική και μηχανική γνώση της διαδικασίας. (Boulton et al., 1996a)



Εικόνα 2 Τα βήματα της οινοποίησης (Gao et al., 2019)

Τα κυριότερα βήματα της οινοποίησης τα οποία εφαρμόζονται τόσο στην ερυθρή όσο και στη λευκή οινοποίηση, παρατίθενται συνοπτικά παρακάτω.

1.1.1 Συγκομιδή-Τρύγος

Κατά τη διάρκεια του τρύγου, του πρωταρχικού σταδίου της οινοποίησης, τα ώριμα σταφύλια συλλέγονται με τα χέρια ή με αυτοματοποιημένα πλέον μηχανήματα και οδηγούνται άμεσα στο οινοποιείο όπου και φυλάσσονται σε ανοξειδωτες δεξαμενές, προς αποφυγή αλλοίωσης της τελικής ποιότητας του κρασιού. Ο χρόνος συγκομιδής του σταφυλιού επηρεάζει την τελική ποιότητα του παραγόμενου οίνου καθώς, καθυστερημένη συγκομιδή αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης μυκήτων στα σταφύλια και συνεπώς τον κίνδυνο αλλοίωσης της πρώτης ύλης. (Gao et al., 2019)

1.1.2 Έκθλιψη

Η γλευκοποίηση έπεται του τρύγου και αποτελεί τη διαδικασία παραλαβής του γλεύκους (ή συνήθως μούστου) από το σταφύλι. Κατά τη γλευκοποίηση, απαραίτητη είναι η απομάκρυνση των κοτσανιών (αποβοστρύχωση) του σταφυλιού, καθώς οι βόστρυχοι του σταφυλιού επιδρούν αρνητικά τόσο στη γεύση του τελικού κρασιού, όσο και στην υγεία του

καταναλωτή. Η σύνθλιψη των σταφυλιών με τα πόδια ή τα παπούτσια στα πατητήρια που εφαρμοζόταν στο παρελθόν έχει πλέον εγκαταλειφθεί και αντικατασταθεί από πιο προηγμένες μεθόδους. Σήμερα, περιστρεφόμενοι κύλινδροι αυτόματων μηχανημάτων επιτυγχάνουν την έκθλιψη των σταφυλιών, συγχρόνως με την αποβοστρύχωση. (Gao et al., 2019)

1.1.3 Ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί τη βιοχημική διαδικασία μετατροπής των σακχάρων του μούστου σε αλκοόλη, παρουσία ζυμομυκήτων και με ελεγχόμενη απελευθέρωση θερμότητας. Σήμερα, υπάρχει η δυνατότητα προσθήκης συγκεκριμένων στελεχών ζυμομυκήτων στο μούστο, αντικαθιστώντας τους φυσιολογικά υπάρχοντες. Στην περίπτωση αυτή, κάνουμε λόγο για ελεγχόμενη διαδικασία ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ζύμωσης, οι αδρανοποιημένοι στο φλοιό των σταφυλιών ζυμομύκητες ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται κατά την επαφή τους με το μούστο και επιτελούν τη ζύμωση. Πέραν της αιθυλικής αλκοόλης, κατά τη ζύμωση παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και δευτερεύοντα προϊόντα και ενώσεις, οι οποίες είναι πολλές φορές καθοριστικής σημασίας για την ποιότητα του οίνου. Η διάρκεια της ζύμωσης είναι 10-30 ημέρες και έχει καίριο ρόλο στην ποιότητα του παραγόμενου τελικού οίνου. (Morrison-Whittle and Goddard R., 2018) Σε αυτό το στάδιο, βάσει του χρώματος του παραγόμενου κρασιού, γίνεται διάκριση *λευκής* και *ερυθρής* οινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, η ζύμωση του γλεύκους λευκών σταφυλιών αποτελεί τη λευκή οινοποίηση και πραγματοποιείται αποκλειστικά στο χυμό, χωρίς την παρουσία των στερεών συστατικών του σταφυλιού, τα οποία και διαχωρίζονται από το γλεύκος προ της ζύμωσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, παρατηρείται μειωμένη εκχύλιση συστατικών (και χρωστικών ενώσεων) από τα στερεά μέρη του σταφυλιού (στέμφυλα) στη λευκή οινοποίηση. Αντίθετα, στην ερυθρή οινοποίηση, στέμφυλα και γλεύκος δε διαχωρίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, γεγονός που οδηγεί σε εκχύλιση των χρωστικών που περιέχονται στα στέμφυλα και δικαιολογεί το τελικό ερυθρό χρώμα του οίνου. Υπάρχουν, ωστόσο, περιπτώσεις που ο λευκός οίνος παράγεται από ερυθρά σταφύλια, όπως συμβαίνει με τον 'καμπανίτη' οίνο (Champagne) και περιπτώσεις όπου η ζύμωση μπορεί να γίνει παρουσία στεμφύλων λευκών ποικιλιών. Αυτοί όμως σπανίζουν και αποτελούν εξαίρεση στην παραγωγή λευκών οίνων. (Christaki and Tzia, 2002)

1.1.4 Παλαίωση του οίνου

Η διαδικασία της παλαίωσης του οίνου έπεται χρονικά της αλκοολικής ζύμωσης και συνεχίζεται μέχρι την κατανάλωσή του. Στο στάδιο της παλαίωσης του οίνου στα δρύινα βαρέλια, το κρασί υφίσταται σημαντικές μεταβολές, όπως διαύγαση, αργή και συνεχή διάχυση του οξυγόνου μέσα από τους πόρους του ξύλου του βαρελιού και εκχύλιση πολλών ουσιών από το ξύλο δρυός (π.χ αρωματικές ενώσεις και ελλαγιταννίνες). Οι ουσίες αυτές διαμορφώνουν την οργανοληπτική ποιότητα και πολυπλοκότητα του οίνου, όπως το άρωμα, τη δομή, τη στυπτικότητα, την πικρία και το έντονο χρώμα. Οι ελλαγιταννίνες (υδρολύμενες ταννίνες) είναι οι κυριότερες μεταξύ των εκχυλιζόμενων από το βαρέλι ουσιών και αντιπροσωπεύουν το 10% του ξηρού βάρους του ξύλου δρυός. (Chira and Teissedre, 2013) Να διευκρινιστεί ότι η παλαίωση διακρίνεται σε οξειδωτική και σε αναγωγική. Κατά τη διάρκεια της “οξειδωτικής παλαίωσης” που πραγματοποιείται εντός του βαρελιού με την παρουσία οξυγόνου που εισέρχεται από τους πόρους του ξύλου, τα υπάρχοντα συστατικά του οίνου οξειδώνονται ενώ ταυτόχρονα προστίθενται εκχυλιζόμενες από το ξύλο ουσίες. Η “αναγωγική παλαίωση”, που πραγματοποιείται εντός της φιάλης, αποτελεί διαδικασία παλαίωσης απουσία οξυγόνου, συμβάλλοντας με τη σειρά της στην αρωματική και γευστική πολυπλοκότητα του οίνου. (Monagas et al., 2006)

Η παλαίωση του οίνου σε βαρέλι και οι εναλλακτικές προσεγγίσεις αυτής της διαδικασίας, θα αναλυθούν διεξοδικότερα στα επόμενα κεφάλαια.

1.1.5 Εμφιάλωση

Η εμφιάλωση του οίνου είναι κυρίαρχης σημασίας για την ασφαλή αποθήκευση και συντήρησή του. Ο φελλός, σημαντική ανακάλυψη του 17^{ου} αιώνα, επέτρεψε πρωτογενώς τη μεταφορά και αποθήκευση του οίνου. Με την πάροδο του χρόνου και με την τεχνολογική πρόοδο, η διαδικασία της εμφιάλωσης έχει πλέον αυτοματοποιηθεί. Σήμερα, πραγματοποιείται πλήρωση των φιαλών γεμίσματος, πλήρωσή τους με κρασί, προσθήκη πώματος και κόλληση ετικετών από ειδικά μηχανήματα. (Ronald, 2008a)



Εικόνα 3 Εμφιαλωμένα κρασιά (Goode, 2010).

1.2 Παλαίωση οίνου σε βαρέλι

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένα πολύ σημαντικό στάδιο της διαδικασίας οινοποίησης είναι και η παλαίωση του οίνου. Η παλαίωση του οίνου αποτελεί εδώ και χρόνια μια τεχνική που χρησιμοποιείται στα οινοποιεία, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας των οίνων και την επίτευξη περισσότερο πολύπλοκων αρωμάτων. Παραδοσιακά, χρησιμοποιούνται δρύινα βαρέλια τα οποία έχουν σημαντικό και πολυεπίπεδο ρόλο, καθώς συντελούν σε πολλαπλές αλλαγές στα χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε βαρέλι παρατηρείται μεταβολή της χημικής σύνθεσης του οίνου, λόγω της εκχύλισης συστατικών του ξύλου από το κρασί (π.χ. ταννινών, φαινολικών οξέων και πτητικών ενώσεων). Κατά αυτόν τον τρόπο, ο οίνος αποκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως άρωμα βανίλλιας ή ψησίματος, προσιδιάζοντα στο ξύλο του βαρελιού εντός του οποίου ωριμάζει. (Escalona et al., 2002) Επιπροσθέτως, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, τα χρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου τροποποιούνται (κεραμιδί χρώμα ώριμων ερυθρών οίνων και έντονο κίτρινο ώριμων λευκών οίνων), εξαιτίας της μοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των έγχρωμων ανθοκυανών του κρασιού και των άχρωμων αρωματικών μορίων, που προέρχονται τόσο από το κρασί όσο και από το ξύλο του βαρελιού. (Brouillard and Dangles, 1994) Τέλος, κατά την παλαίωση του οίνου παρατηρείται παραγωγή τρυγικού αιθυλεστέρα, μέσω εστεροποίησης των περιεχόμενων στον οίνο τρυγικών αλάτων, η οποία οδηγεί σε πτώση της γευστικής οξύτητάς του κρασιού. Μειονεκτήματα της μεθόδου παλαίωσης σε βαρέλι

αποτελούν το υψηλό της κόστος και το μακρύ χρονικό διάστημα, το οποίο απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. (Edwards et al., 1985)

Ένα πολύ μικρό ποσοστό των οίνων επωφελείται της διαδικασίας της παλαίωσης. Οι “ελαφροί” οίνοι συνήθως δε δέχονται παλαίωση και καταναλώνονται άμεσα κατόπιν της εμφιάλωσής τους. Σε αυτούς, περιλαμβάνονται τα περισσότερα λευκά, ροζέ και τα ελαφρά ερυθρά κρασιά, από τα οποία απουσιάζουν τα έντονα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, τα περισσότερα ερυθρά κρασιά και κάποιοι λευκοί οίνοι υψηλής ποιότητας, δύνανται να υποβληθούν στη διαδικασία της ωρίμανσης-παλαίωσης, προς βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Μεταξύ των ερυθρών οίνων, εκείνοι με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες και ιδιαίτερα σε ταννίνες, δύνανται να παλαιωθούν για περισσότερο χρόνο. Οίνοι που προέρχονται από αρωματικά σταφύλια δε βελτιώνονται σημαντικά και δεν ωφελούνται με την παλαίωση. (Ronald, 2008b)

1.2.1 Παράγοντες που επιδρούν στην παλαίωση του οίνου

1.2.1.1 Η μέθοδος παρασκευής του οίνου

Η συγκέντρωση του οίνου σε πολυφαινολικές και αρωματικές ενώσεις και συνεπώς η σύστασή του, επηρεάζεται από τη μέθοδο παρασκευής του. Η σύσταση του κρασιού στις προαναφερθείσες ενώσεις (π.χ. ταννίνες) είναι αυτή που αποτελεί το κριτήριο για τη δυνατότητα παλαίωσης του οίνου, τη διάρκεια αυτής και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. (Ortega-Heras et al., 2007)

1.2.1.2 Οι ποικιλίες του κρασιού

Ο οίνος που επιδέχεται παλαίωσης κατά βάση είναι ο ερυθρός, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία ταννινών. Οι ταννίνες προιούσης της παλαίωσης βελτιώνουν το άρωμα και τη γεύση του οίνου, εξαιτίας του πολυμερισμού που επιταχύνεται από την οξειδωση τους κατά την οξειδωτική παλαίωση. Λευκά κρασιά υψηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη (Sauvignon-Blanc) και υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων (όπως το κρασί της Σάμου), δύνανται να υποβληθούν στη διαδικασία της παλαίωσης. Γνωστές ελληνικές ποικίλες που επιδέχονται παλαίωσης με καλά αποτελέσματα είναι τα κρασιά από Μανδηλαριά, τα οποία επιδέχονται παλαίωσης μέχρι 5 χρόνια, ενώ τα κρασιά της ποικιλίας “Αγιωργίτικο” και “Ξινόμαυρο” δύνανται να παλαιώσουν μέχρι 10 χρόνια. Η ποικιλία ‘Cabernet sauvignon’ χρειάζεται παρατεταμένη ωρίμανση σε βαρέλια, ενώ επίσης προσφέρεται για πολύχρονη παλαίωση στη φιάλη. Βαθύχροα κρασιά προκύπτουν από σταφύλια με παχύ φλοιό, στον οποίο

εντοπίζονται οι υπεύθυνες για το χρώμα του οίνου ανθοκυάνες. Σχετικά με τα ελληνικά λευκά κρασιά, η παλαίωση διαρκεί 3 έως 5 χρόνια στις κατάλληλες συνθήκες, ενώ για ορισμένες ποικιλίες δύναται να παραταθεί ακόμα περισσότερο π.χ. το Chardonnay. (Τσετούρας, 2003) Όπως έχει προαναφερθεί, ο τύπος του οίνου καθορίζει και τη διάρκεια της παλαίωσης. (Boulton et al., 1996b) Στην περίπτωση των ερυθρών οίνων, η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και η οξύτητα ασκούν πρωταρχικό ρόλο στη διάρκεια παλαίωσης, η οποία ποικίλει από 1-3 χρόνια (Masneuf et al., 2006). Η κατάλληλη θερμοκρασία ωρίμανσης είναι 12-16°C και η κατάλληλη σχετική υγρασία 70-80%. Το κρασί, κατά τη διάρκεια της παραμονής του στο βαρέλι, πρέπει να ελέγχεται τακτικά, καθώς μέρος του υγρού εξατμίζεται και η στάθμη του πρέπει να συμπληρώνεται. (Castiñeira et al., 2002)

1.2.1.3 Παράγοντες σχετικοί με το βαρέλι

- Το είδος του ξύλου:

Η δρυς είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο είδος ξύλου στη βαρελοποιία, χάρη στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές του ιδιότητες. Η δρυς έχει αυξημένη μηχανική αντοχή κατά τη μορφοποίησή σε βαρέλι παλαίωσης. Συγχρόνως, το ξύλο δρυός στερείται καναλιών ρητίνης όπως τα πεύκα, η οποία προσδίδει ισχυρές γεύσεις στα προς ωρίμανση κρασιά. Να σημειωθεί ότι διάφορα υδατοαλκοολικά συστατικά δρυός διαχέονται στο κρασί, ενισχύοντας την ένταση και την πολυπλοκότητα των γεύσεών του, ενώ λόγω της ελάχιστη πορώδους φύσης του ξύλου δρυός επιτυγχάνεται ελεγχόμενη μεταφορά οξυγόνου στον οίνο. (Zhang et al., 2015a)

- Η επεξεργασία του ξύλου:

Η θέρμανση και η διαβροχή του ξύλου είναι διαδικασίες που καθιστούν το ξύλο μαλακότερο και συνεπώς, ευκολότερα διαμορφώσιμο σε βαρέλι παλαίωσης. Οι ανωτέρω διεργασίες σε συνδυασμό με το κάπνισμα του βαρελιού για την απόδοση περισσότερων πτητικών συστατικών στον οίνο, μεταβάλλουν τη χημική σύσταση του ξύλου οινοποίησης και συνεπώς του οίνου που βρίσκεται σε επαφή με αυτό. (Ortega-Heras et al., 2007)

- Το πορώδες του ξύλου:

Ξύλο μικρού βαθμού πορώδους επιτρέπει την ελεγχόμενη και περιορισμένη είσοδο του οξυγόνου στον προς παλαίωση οίνο και συνεπώς, καθίσταται ιδανικό για την παλαίωση οίνων, εν αντιθέσει με τα αποστάγματα που λόγω ανάγκης μεγαλύτερης οξυγόνωσης, απαιτούν ξύλο μεγαλύτερου πορώδους. Στις παραθαλάσσιες περιοχές εντοπίζεται ξύλο με

μεγαλύτερους πόρους, σε αντίθεση με το ξύλο των ορεινών περιοχών. (Del Alamo-Sanza et al., 2017) Στο σημείο αυτό θα πρέπει να καταγραφεί ότι κατά την ταχεία οξείδωση ενός κρασιού, παράγεται αιθανάλη (προϊόν οξείδωσης της αιθανόλης), στην οποία αποδίδεται η οσμή των κακώς παρασκευασθέντων οίνων. Συγχρόνως, κατά την υπεροξείδωση ενός κρασιού, παρατηρείται προσωρινή εμφάνιση ελεύθερων υπεροξειδίων, προκαλώντας μη αναστρέψιμη υποβάθμιση του φρουτώδους αρώματος του οίνου. Αντίθετα, η βραδέως και ελεγχόμενα εξελισσόμενη οξείδωση εντός του βαρελιού, οδηγεί μετέπειτα εντός της φιάλης στην παραγωγή ουσιών με αναγωγικό χαρακτήρα, οι οποίες συνιστούν και το χαρακτηριστικό άρωμα του κρασιού. (Chung et al., 2008)

- Η ηλικία και το μέγεθος των βαρελιών:

Η **ηλικία** των βαρελιών έχει άμεση σχέση με την επιτυχή παλαίωση του κρασιού. Η παλαίωση του οίνου συστήνεται να ξεκινά πάντα με τη χρήση καινούριων βαρελιών. Ο οινοποιός πρέπει να φροντίζει να αλλάζει τα βαρέλια του κάθε 2-3 έτη οινοποίησης, καθώς η ποσότητα ταννινών που απελευθερώνεται από τα ξύλα των βαρελιών μεταβάλλεται με το χρόνο χρήσης του βαρελιού. Το ξύλο ενός καινούριου βαρελιού 250 L εκλύει περίπου 200 mg ταννινών την πρώτη χρονιά χρήσης του και μόνο 50 mg τη δεύτερη χρονιά. (Ortega-Heras et al., 2007)

Το **μέγεθος** του βαρελιού, καθορίζοντας την έκταση της επιφάνειας επαφής του ξύλου του βαρελιού με το κρασί, επηρεάζει την έκβαση της παλαίωσης του οίνου. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια επαφής ξύλου βαρελιού - κρασιού, τόσο επιτυγχάνονται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα α) η εκχύλιση των διαλυτών συστατικών του ξύλου του βαρελιού στον οίνο, β) η μικροοξυγόνωση και γ) οι αντιδράσεις μεταξύ των συστατικών, που αποτελούν και τα κυρίαρχα αποτελέσματα της παλαίωσης. Η οικονομία της παραγωγής ευνοεί το μεγαλύτερο μέγεθος βαρελιού, ενώ η ευκολία μετακίνησης και η ταχύτερη ωρίμανση ευνοεί το μικρότερο μέγεθος. Ένας συμβιβασμός μεταξύ των αντικρουόμενων αυτών προσεγγίσεων οδήγησε στην ευρεία υιοθέτηση της χρήσης βαρελιών χωρητικότητας μεταξύ 200 και 1000 L. Το επονομαζόμενο 'barrique' με μέγεθος 225 L χρησιμοποιείται ευρύτατα στην οινοποιία. Μεγάλα δρύινα βαρέλια μπορούν να χρησιμοποιούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ενώ τα μικρά βαρέλια αντικαθίστανται συνήθως μετά από λίγα χρόνια. (Pérez-Prieto et al., 2002)

- Η διάρκεια παλαίωσης:

Η διάρκεια της παλαίωσης είναι μία μεταβλητή άμεσα εξαρτώμενη από το είδος του προς παλαίωση κρασιού, της ποικιλίας του αρχικού σταφυλιού και της παλαιότητας του βαρελιού. Φυσικά, σπουδαίο ρόλο παίζει και το είδος του τελικού παλαιωμένου κρασιού που επιδιώκουμε να πετύχουμε. Ο συνήθης χρόνος που απαιτείται να μείνει το κρασί στο βαρέλι για να επιτευχθεί μια αποδεκτή παλαίωση είναι κατ' ελάχιστον 1 έτος. Απαιτείται χρόνος 2 μηνών για τη μέγιστη εξαγωγή των ελλαγιταννινών και της φουρφουράλης, ενώ αναφορικά με άλλες πτητικές ενώσεις, η συγκέντρωσή τους αυξάνεται προοδευτικά στο πέρασμα του χρόνου. Βασικός παράγοντας επιτυχίας είναι η περιεκτικότητα σε ταννίνες του κρασιού να είναι μεγαλύτερη της αντίστοιχης του ξύλου του βαρελιού. (Hernanz et al., 2009)

1.2.1.4 Το περιβάλλον παλαίωσης

Ο χώρος στον οποίο θα πραγματοποιηθεί η παλαίωση του οίνου (παραδοσιακά υπόγεια κελλάρια) πρέπει να εξασφαλίζει τις σωστές συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός και υγρασίας. Η επίτευξη της ιδανικής θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας εγγυάται την καλή παλαίωση του οίνου και την αποφυγή εκτεταμένης απώλειας κρασιού εξαιτίας της εξάτμισής του με την πάροδο του χρόνου.

Η ιδανική θερμοκρασία για την παλαίωση του οίνου είναι γύρω στους 10-13 °C και πρέπει να επιδιώκεται να παραμένει σταθερή, χωρίς διακυμάνσεις σε όλη τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου και του έτους. Η σταθερή ιδανική θερμοκρασία επιτυγχάνεται σε χώρους που δεν επηρεάζονται εύκολα από τις εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες ή με τη χρήση μηχανημάτων ψύξης-θέρμανσης. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας προκαλούν φαινόμενα διαστολής και συστολής του κρασιού εντός των βαρελιών. Συνεπώς, η επίτευξη της διατήρησης της σταθερότητας της θερμοκρασίας είναι σημαντικότερη και από την ανοχή σε μικρές αποκλίσεις από την ιδανική θερμοκρασία των περίπου 12 °C.

Σημαντικό είναι να τονισθεί ότι κάτω από τη θερμοκρασία των 8-9 °C επιβραδύνονται οι απαραίτητες χημικές αντιδράσεις της παλαίωσης, αν και ευνοείται η καθίζηση τρυγικών και ασταθών έγχρωμων συστατικών. Υψηλές θερμοκρασίες άνω των 25 °C έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της εξάτμισης του οίνου και την ταχεία εξέλιξη των αντιδράσεων της παλαίωσης, που δύνανται να καταστρέψουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. (Tao et al., 2013)

Η ιδανική **υγρασία** που πρέπει να έχει ο χώρος παλαίωσης είναι 75-85%. Η σχετική υγρασία πρέπει να είναι υψηλή και σταθερή για τη μείωση των απωλειών του οίνου με εξάτμιση, αλλά δεν πρέπει να λαμβάνει χώρα συμπύκνωση του νερού.

Η παρουσία **φωτός** στα κελλάρια παλαίωσης ευθύνεται για φωτοχημικές αντιδράσεις που αλλοιώνουν την ποιότητα του προς παλαίωση οίνου. Συνεπώς, σκοτεινοί υπόγειοι χώροι, χωρίς ήλιο ή χώροι με λαμπτήρες φθορισμού προτιμώνται για την παλαίωση του οίνου.

Ο θόρυβος και οι έντονες μυρωδιές είναι οι τελευταίοι παράγοντες που θα επηρεάσουν την παλαίωση. Το κρασί πρέπει να παλαιώνεται σε ένα χώρο απαλλαγμένο από έντονους θορύβους και λειτουργία ηχηρών μηχανημάτων, που μέσω κραδασμών που προκαλούν, αποτρέπουν την καθίζηση ουσιών στον ώριμο οίνο. Ο χώρος παλαίωσης πρέπει να στερείται και έντονων οσμών καθώς αυτές δύνανται να μεταφερθούν στον οίνο, μέσω του πορώδους των δρύινων βαρελιών. (Martin and Canas, 2006)



Εικόνα 4 Κελλάρι παλαίωσης οίνου (<https://www.justwinecountry.com/napa-wine-tours.html>)

1.3 Ξύλα οينوποίησης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην παλαίωση του οίνου είναι η επιλογή του είδους του ξύλου στη βαρελοποιία. Τα ξύλινα βαρέλια ανακαλύφθηκαν πιθανότατα από τους Κέλτες και η μορφή τους ήταν προσιδιάζουσα στη μορφή των βαρελιών που χρησιμοποιούνται σήμερα. Τον 3^ο αιώνα π.Χ., τα βαρέλια αυτά σταδιακά αντικατέστησαν τους αμφορείς, που αποτελούσαν τους κύριους

περιέκτες για τη μεταφορά του οίνου. Οι Αρχαίοι Μεσοποτάμιοι χρησιμοποίησαν αρχικά βαρέλια κατασκευασμένα από ξύλο φοίνικα, αν και δεν προοριζόνταν για χρήση στη διαδικασία της οινοποίησης. Ωστόσο, η δυσκαμψία του ξύλου φοίνικα περιόρισε τη χρήση του στη βαρελοποιία και οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών ξύλων, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν.

Η χρήση της δρυός στη βαρελοποιία είναι κυρίαρχη εδώ και δύο χιλιετηρίδες, με τις πρώτες αναφορές στην αποτελεσματικότητα της να χρονολογούνται στη Ρωμαϊκή Περίοδο. Με την πάροδο του χρόνου, οι οινοποιοί διαπίστωσαν ότι η παλαίωση του οίνου σε δρύινα βαρέλια ήταν όχι μόνο εύκολη αλλά, επιδρούσε θετικά στην ποιότητα του παραγόμενου οίνου, μέσω βελτιωτικών αλλαγών που επέφερε στην εμφάνιση, το άρωμα και τη γεύση του. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ωρίμανση του οίνου σε βαρέλια δρυός κατέστη σχεδόν αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας οινοποίησης. (Zhang et al., 2015a)

Η δρυς (βαλανιδιά) είναι υπεραιώνιο δένδρο που ζει για περίπου 300 χρόνια και παρέχει απλόχερα το ξύλο του, εφόσον ο κορμός του φθάνει σε ύψος τα 30 μέτρα. Υπάρχουν περίπου 600 είδη βελανιδιάς, με διαφορετική ποιότητα ξύλου το καθένα αλλά με την ίδια βασική χημική σύνθεση. Κυρίαρχα συστατικά στο δρυίνο ξύλο είναι η κυτταρίνη (40%) και η ημικυτταρίνη (25%), ενώ στο κυτταρικό τοίχωμα του ξηρού δρύινου ξύλου υπάρχει συγκέντρωση λιγνίνης σε ποσοστό 20%. (Nonier et al., 2006)

Η επιλογή της δρυός για την κατασκευή δρύινων βαρελιών στην οινοποιία οφείλεται στα κατωτέρα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της:

- Έχει σταθερότητα στην πάροδο του χρόνου
- Παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά διαρροής (εξασφαλίζει τη σωστή στεγανότητα και αποθήκευση του κρασιού και τη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του)
- Δίνει χρώμα και γεύση σε αλκοολούχα ποτά. (Maga, 1996)

Η βαρελοποιία χρησιμοποιεί περισσότερο δρύες από τη Γαλλία και τις ΗΠΑ. Η Πορτογαλία, η Τσεχία, η Σλοβακία, η Πολωνία, η Ουγγαρία, η Αυστρία, η Γιουγκοσλαβία και η Ρωσία είναι χώρες επίσης από τις οποίες προμηθεύεται η βαρελοποιία τα ξύλα της. Πρώτες και σταθερές επιλογές πάντως, στη βαρελοποιία και οινοποιία, αποτελούν η αμερικανική και η γαλλική δρυς. (Glabasnia and Hofmann, 2006)

Το είδος *Quercus alba*, δηλαδή η λευκή δρυς που χαρακτηρίζεται από σχετικά γρήγορη ανάπτυξη, πλατείς ιστούς και χαμηλή συγκέντρωση ταννινών στο ξύλο του, αποτελεί τη γνωστή “αμερικάνικη δρυ”. Το συγκεκριμένο είδος απαντάται κυρίως στις περισσότερες

ανατολικές περιοχές των ΗΠΑ, από όπου προέρχονται πολλά βαρέλια, ενώ στην πολιτεία του Oregon παρατηρείται χρήση της λευκής δρυός *Quercus garryana*, εξαιτίας των κοντινότερων ομοιοτήτων της με την ευρωπαϊκή δρυ. Η χρήση της αμερικανικής δρυός στην οινοποιία αναγνωρίζεται εύκολα από τη χαμηλή ποσότητα εκχυλίσμων πολυφαινόλων, την υψηλή περιεκτικότητα μεθυλο-οκταλακτόνης και την παρουσία δύο ισομερών της 3-οξο-*retro-α-ιονόλης*. (Chatonnet and Dubourdieu, 1998)

Στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στη Γαλλία, παραγωγό χώρα οίνου με παράδοση, τόσο το είδος *Quercus robur* (κοινή δρυς) όσο και το είδος *Quercus petraea* (άμισχος δρυς) χρησιμοποιούνται στη βαρελοποιία. Το είδος *Q. petraea* (γαλλική δρυς) θεωρείται ποιοτικά ανώτερο λόγω της μεγαλύτερης συμβολής του σε αρωματικά συστατικά (π.χ. η βανιλίνη και τα παράγωγά της, η μεθυλοκταλακτόνη), αλλά και σε ταννίνες, φαινόλες και πτητικές αλδεΐδες. Η γαλλική δρυς δύναται να προέρχεται από ένα ή περισσότερα δάση περιοχών της Γαλλίας, με μικρές αλλά εμφανείς διαφοροποιήσεις μεταξύ των ξύλων διαφορετικών περιοχών. Πολλοί οινοποιοί χρησιμοποιούν βαρέλια κατασκευασμένα από διαφορετικά βαρελοποιεία, περιοχές και βαθμό καψίματος στην ωρίμαση των οίνων τους για να ενισχύσουν την πολυπλοκότητα του παραγόμενου οίνου. (Mosedale and Savill, 1996)

Στην Ιταλία χρησιμοποιείται η σλαβονική δρυς, δηλαδή το είδος *Quercus robur*, το οποίο είναι γνωστό για την σφιχτή του υφή, τη χαμηλή συγκέντρωση αρωματικών και τις περιεχόμενες ελλαγιταννίνες του. Η σλαβονική δρυς τείνει να χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερου μεγέθους βαρέλια (με μικρότερη επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο), με τα ίδια βαρέλια να επαναχρησιμοποιούνται για πολλά χρόνια πριν την αντικατάστασή τους.

Εναλλακτικά **είδη ξύλου** δοκιμάσθηκαν διαχρονικά στην κατασκευή βαρελιών, όπως το ξύλο της καστανιάς (*Castanea sativa*), το ξύλο του πεύκου (*Pinus banksiana*), το ξύλο της σεκόγιας (*Sequoia sempervirens*) και το ξύλο της ακακίας (*Robinia pseudoacacia*).

Η καστανιά (*Castanea sativa*), αν και της ίδιας βοτανικής οικογενείας με την δρυ (Fagaceae), περιέχει πολύ περισσότερες ταννίνες και χαρακτηρίζεται από την ιδιαίτερα πορώδη υφή του ξύλου της, γεγονός το οποίο την καθιστά ακατάλληλη για αποθήκευση οίνου. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης βαρελιού από καστανιά στην οινοποιία, επικαλύπτεται το εσωτερικό του βαρελιού με παραφίνη, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του οίνου διαμέσου των πόρων. Παρόλα αυτά, η καστανιά έχει χρησιμοποιηθεί στη Γαλλική και Πορτογαλική οινοποιία. Η σεκόγια προσδίδει στο κρασί δυσάρεστο άρωμα και γεύση και το δύσκαμπτο ξύλο της δεν ευνοεί την κατασκευή μικρού μεγέθους βαρελιών. (Robinson, 2006)

Η ακακία (*Robinia pseudoacacia*) περιέχει φλαβονοειδή που δίνουν χαρακτηριστικό κίτρινο χρωματισμό στο κρασί, ενώ άλλα σκληρά ξύλα όπως η μηλιά (*Malus domestica*) και η κερασιά (*Prunus avium*) εμφανίζουν μία απωθητική οσμή.

Πιο σπάνια στη βαρελοποιία, έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά της δρυός, ξύλα από τα είδη: κοινός φράξινος (*Fraxinus excelsior*, *F. vulgaris*), μουριά (*Morus alba* και *M. nigra*), οξιά (*Fagus sylvatica*) και σκλήθρα (*Alnus glutinosa*). (Fernández De Simón et al., 2014) Ωστόσο, είναι αναγκαίο να τονισθεί ότι ακόμη η προέλευση του ξύλου δρυός διαφορετικές περιοχές (π.χ. ορεινές ή παραθαλάσσιες), ακόμα και όταν αυτές ανήκουν στην ίδια χώρα, διαφοροποιεί την αποτελεσματικότητά του στην οινοποιία. Βαρέλια δρυός από ορεινές περιοχές έχουν μικρούς πόρους, που μεταφέρουν την ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την παλαίωση του οίνου, ενώ αντίθετα, βαρέλια δρυός από γειτνιάζουσες στη θάλασσα περιοχές έχουν πόρους μεγαλύτερους που τα καθιστούν ακατάλληλα για παλαίωση κρασιών και καταλληλότερα για αποστάγματα. Από τα ανωτέρω, καθίσταται αντιληπτό ότι τελείως όμοια βαρέλια είναι αδύνατον να κατασκευαστούν και να χρησιμοποιηθούν. Ακόμα και μικρές διαφορές που προέρχονται από τη διαφορετική γεωγραφική θέση του δέντρου προέλευσης, δίνουν διαφορετική ποιότητα και γεύση στο παραγόμενο κρασί. Το ίδιο ακριβώς κρασί διαφοροποιείται κατά την ωρίμανσή του σε διαφορετικά βαρέλια και για τον λόγο αυτό είναι επιθυμητό να καταγράφεται σε κάθε βαρέλι η χώρα και η γεωγραφική περιοχή προέλευσης της ξυλείας του. (Τσακίρης, 2005)

1.4 Αρωματισμός του οίνου - Σύγχρονες πρακτικές παλαίωσης

Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση της δρυός στη βαρελοποιία προτιμάται καθώς πλεονεκτεί έναντι της χρήσης άλλων ξύλων. Παρ'όλα αυτά, η παλαίωση στα δρύινα βαρέλια είναι κοστοβόρος διαδικασία, λόγω του υψηλού κόστους απόκτησης και συντήρησης των βαρελιών και της μεγάλης απαιτούμενης χρονικής διάρκειας παραμονής του οίνου σε αυτά. Έτσι, τα τελευταία χρόνια δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών τεχνικών παλαίωσης του οίνου. Οι εναλλακτικές τεχνικές που επινοήθηκαν στοχεύουν ακριβώς στη μείωση του κόστους απόκτησης και συντήρησης των δρύινων βαρελιών και στη μείωση του χρόνου παραμονής του οίνου σε αυτά.

Σε αυτές περιλαμβάνεται η προσθήκη θραυσμάτων ξύλου (wood chips) σε κρασί που ωριμάζει εντός παλιών βαρελιών ηλικίας άνω των 2 ετών, οι οποίες δεν εκλύουν πλέον αρώματα στο κρασί, ή σε οίνο που ωριμάζει σε ανοξειδωτες δεξαμενές. Κατά αυτόν τον τρόπο, λαμβάνουν χώρα οι χημικές αντιδράσεις που συντελούνται κατά την παλαίωση του

κρασιού, ενώ η βελτίωση της εμφάνισης, του αρωματισμού και της γεύσης του οίνου είναι αντίστοιχη με εκείνη που επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση του κρασιού σε νεοκατασκευασθέντα δρύινα βαρέλια. Να σημειωθεί πως σύμφωνα με Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μέγεθος των προστιθέμενων θραυσμάτων ξύλου πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε τουλάχιστον το 95% αυτών να συγκρατείται από φίλτρο 2 mm. (Del Alamo Sanza and Nevares Domínguez, 2006)



Εικόνα 5 Ξύλο υπό τη μορφή “chips” για τον αρωματισμό του οίνου (<http://kristicorpusa.com/index.php/agro-commodities>)

Πρωτοπόροι στη χρησιμοποίηση θραυσμάτων ξύλου, με σκοπό τη μίμηση της επίδρασης του ξύλου του βαρελιού στο άρωμα και τη γεύση του οίνου, αποτέλεσαν οι Αυστραλοί και οι Καλιφορνέζοι παραγωγοί. Με την τεχνική αυτή, οι χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την παλαίωση του οίνου, επιταχύνονται σε σχέση με την παραδοσιακή παλαίωση του οίνου σε βαρέλι.

Οι πολέμιοι της μεθόδου αρωματισμού του οίνου με θραύσματα δρυός, ισχυρίζονται ότι αυτά προσδίδουν μονοδιάστατο άρωμα στον οίνο και γεύση που προσιδιάζει σε αυτή του εκχυλίσματος βανίλλιας. Πράγματι, τα θραύσματα ξύλου προσφέρουν λιγότερα πτητικά συστατικά στον οίνο από τα βαρέλια, αλλά σε γενικές γραμμές οίνοι αρωματισμένοι με θραύσματα ξύλου και οίνοι παλαιωμένοι σε βαρέλι παρουσιάζουν παρόμοια χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. (Tao et al., 2013) Παρά τους πολλούς επικριτές της σύγχρονης αυτής πρακτικής, την οποία θεωρούν μέθοδο τεχνητού αρωματισμού, οι οίνοι αυτού του τύπου βρήκαν θετική ανταπόκριση στους καταναλωτές, με αποτέλεσμα η Ευρωπαϊκή Ένωση να επιτρέψει τη χρήση τους. Πριν το 2006, η πρακτική χρησιμοποίησης θραυσμάτων ξύλου δρυός ήταν εκτός νόμου στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Το 1999, το Εφετείο του Μπορντό επέβαλε πρόστιμα σε τέσσερα οινοποιεία ύψους πάνω από 13 χιλιάδες

δολλάρια Αμερικής, για τη χρήση “chips” ξύλου δρυός σε οίνο τους. (Bautista-Ortín et al., 2008)

Να σημειωθεί ότι η προσθήκη των θραυσμάτων ξύλου, συνήθως δρυός, δύναται να πραγματοποιηθεί όχι μόνο κατά τη διάρκεια της παλαίωσης αλλά και κατά τη ζύμωση ή κατόπιν αυτής. Ωστόσο, η προσθήκη θραυσμάτων ξύλου κατά τη ζύμωση του γλεύκους αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση και σταθεροποίηση των χρωματικών χαρακτηριστικών του οίνου, ενώ η προσθήκη θραυσμάτων ξύλου κατά την παλαίωση συντελεί στον αρωματισμό του οίνου, προσομοιάζοντας επαρκώς στη διαδικασία της παλαίωσης του οίνου σε βαρέλι. (Ortega-Heras et al., 2010)

1.4.1 Θραύσματα ξύλου (“Wood chips”)

Στο εμπόριο, υπάρχει μεγάλη ποικιλία θραυσμάτων ξύλου (“wood chips”) που μπορούν να επιλεγούν από τους οινοποιούς. Η συνήθης αναλογία στην οποία χρησιμοποιούνται είναι 1-4 g θραυσμάτων / L οίνου. Η αναλογία αυτή βέβαια μεταβάλλεται ανάλογα με την ποιότητα του ξύλου και την επιθυμητή επίδραση στο άρωμα του οίνου. (Arapitsas et al., 2004) Για παράδειγμα, η προσθήκη θραυσμάτων ξύλου σε μεγάλες ποσότητες οίνου δύναται να πραγματοποιηθεί με την κατωτέρω τεχνική: προστίθεται μια αυξημένη δόση θραυσμάτων ξύλου σε μια μικρή ποσότητα οίνου, της τάξης των 10 γραμμαρίων θραυσμάτων ξύλου σε ένα λίτρο οίνου και το παραχθέν μείγμα ακολούθως προστίθεται στην επιθυμητή μεγάλη ποσότητα οίνου για τον αρωματισμό της.

Στην τεχνική αρωματισμού του οίνου με θραύσματα ξύλου, το μέγεθος των θραυσμάτων ξύλου πρέπει να είναι κατάλληλο, ώστε με την πρώτη χρήση να εκχυλίζεται το σημαντικότερο μέρος των συστατικών τους. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στην τεχνική αυτή είναι η διασφάλιση των κανόνων υγιεινής. Τα “chips” ξύλου δεν πρέπει να επαναχρησιμοποιούνται γιατί όταν εμβαπτίζονται στο κρασί και μετά εκτίθενται στον αέρα, αυξάνονται γεωμετρικά οι πιθανότητες ανάπτυξης βακτηρίων. Επίσης, τα “chips” πρέπει να τοποθετούνται στο κρασί με τη χρήση κάποιου κατάλληλου διαχωριστικού (σίτα, σχάρα, τούλι κτλ) ή να τοποθετούνται σε ευρύχωρους υφασμάτινους σάκους και αυτοί με τη σειρά τους στον οίνο που παλαιώνει. Έτσι αποφεύγεται η μετέπειτα διήθηση του οίνου προς απομάκρυνση των θραυσμάτων. Τα “chips” αποθηκεύονται μακριά από άλλες εστίες οσμών, σε ψυχρό και σκοτεινό μέρος, ενώ ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσής τους είναι ο ένας χρόνος.

Δεδομένου ότι το ξύλο εισάγεται στο κρασί και όχι το κρασί στο ξύλο, ολόκληρη η επιφάνεια του ξύλου είναι χρησιμοποιήσιμη και όχι μόνο το 40% αυτής. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο αρωματισμός του κρασιού από “chips” γίνεται μέσα σε 1-5 εβδομάδες, ενώ το αντίστοιχο αποτέλεσμα σε κρασί μέσα σε δρυινο βαρέλι επιτυγχάνεται τουλάχιστον σε διάστημα ενός έτους. (Tao et al., 2013)

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές ξύλου για την προσθήκη τους στον οίνο. Η χρήση ξύλου δρυός σε μορφή σκόνης (πούδρας) για τον αρωματισμό του οίνου είναι λιγότερο συχνή από τη χρήση “chips”. Συχνότερα, χρησιμοποιούνται θραύσματα δρυός κατά τη διάρκεια του αρωματισμού του οίνου, ενώ κάποιες φορές χρησιμοποιούνται σανίδες, δούγιες ή ράβδοι δρυός, μορφές εναλλακτικών πρόσθετων ξύλου που παρατίθενται στην Εικόνα 6. (Del Álamo et al., 2008)



Εικόνα 6 Εναλλακτικές μορφές πρόσθετων ξύλου. Πάνω αριστερά: πρόσθετα ξύλου σε μορφή πούδρας. Πάνω δεξιά: πρόσθετα ξύλου σε μορφή κύβων. Κάτω αριστερά: πρόσθετα ξύλου σε μορφή “chips”. Κάτω δεξιά: πρόσθετα ξύλου σε μορφή δούγιας. (<http://www.oakaddins.com/en/produits/quel-produit-pour-quel-usage/>)

Τα πλέον συνήθη είδη ξύλου που χρησιμοποιούνται στη βαρελοποιία αλλά και ως πρόσθετα σε οίνους και αποστάγματα και τα οποία θα μελετηθούν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα ξύλα από τα 4 παρακάτω είδη:

- Ακακία: *Robinia pseudoacacia* (False acacia, black locust)

- Γαλλική Δρυς: *Quercus petraea* (French or sessile oak)
- Αμερικάνικη Δρυς: *Quercus alba* (American oak)
- Σλαβονική Δρυς: *Quercus robur* (Slavonian or penduculate or English or common oak)

2 Οικογένεια Fagaceae

Η οικογένεια Fagaceae, η οποία είναι αρκετά σύνθετη και εξακολουθεί να υπόκειται σε αναθεωρήσεις, αποτελείται από 600-800 είδη, τα οποία κατανέμονται στα παρακάτω εννέα γένη: *Quercus* (περιλαμβάνει τις βελανιδιές), *Castanea* (περιλαμβάνει τις καστανιές), *Castanopsis*, *Chrysolepis*, *Colombobalanus*, *Fagus* (περιλαμβάνει τις οξιές), *Formanodendron*, *Lithocarpus* και *Trigonobalanus*. Αποτελείται από δέντρα φυλλοβόλα ή αειθαλή, σπανιότερα είναι θάμνοι με φύλλα απλά, εναλλασόμενα και συνήθως με εύπτωτα παράφυλλα. Τα άνθη τους είναι μονογενή, τα φυτά μόνοικα και η επικονίαση συντελείται με τον άνεμο. Οι καρποί των δέντρων της οικογένειας Fagaceae είναι ξηροί και περιβάλλονται από ξυλώδες κύπελλο (κάλυκας) με βράκτεια ή αγκάθια. (Manos et al., 2001)

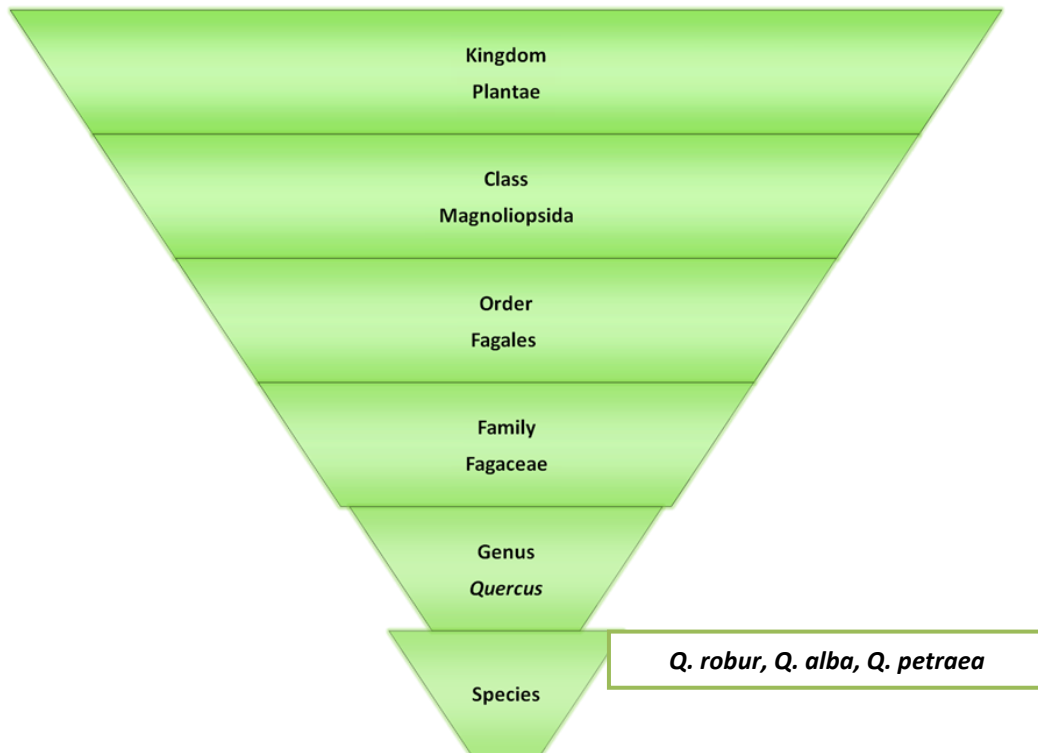
Το γένος *Quercus* περιλαμβάνει περίπου 500 είδη δένδρων και θάμνων, τα οποία απαντώνται σε όλο το Βόρειο Ημισφαίριο, από τροπικά και εύκρατα δάση μέχρι ημι-άνυδρες περιοχές. Οι βελανιδιές είναι αειθαλή ή χειμερινά-φυλλοβόλα δέντρα ή θάμνοι με απλά φύλλα. Τα πτερύγια των φύλλων μπορεί να είναι λοβωτά ή μη, πεπλατυσμένα, με περιθώρια οδοντωτά (κόκκινες βελανιδιές) ή μη (λευκές βελανιδιές). Τα άνθη είναι μονογενή και ο καρπός τους, το βελανίδι, έχει υπερκείμενο περίβλημα, που ωριμάζει στο πρώτο έτος (όλες οι λευκές βελανιδιές της Βόρειας Αμερικής) ή στο δεύτερο έτος (οι περισσότερες κόκκινες βελανιδιές της Βόρειας Αμερικής). (Aldrich, 2011)

Μερικά είδη του γένους *Quercus* είναι δέντρα μεγάλης οικονομικής σημασίας, καθώς χρησιμοποιούνται για την ξυλεία ή το φλοιό τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Quercus suber* (Δρυς η φελλοφόρος), από το φλοιό του οποίου προέρχεται ο φελλός. Από τις παλαιότερες εποχές, οι βελανιδιές διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην Ευρώπη, παρέχοντας ξύλο ως καύσιμη ύλη, βελανίδια ως χοιροτροφή, φλοιό για χρήση στη βυρσοδεψία και ξυλεία για κατασκευαστικούς σκοπούς. (Eaton et al., 2016)

2.1 Κοινή Δρυς - *Quercus robur*

2.1.1 Ταξινόμική και Βοτανική Περιγραφή του είδους *Q. robur*

Το είδος *Quercus robur* L., γνωστό και ως κοινή δρυς (common oak), αγγλική δρυς (English oak) ή Σλαβονική δρυς (Slavonian oak), ανήκει στην οικογένεια Fagaceae και στο γένος *Quercus*, όπως παρουσιάζεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμικής κατάταξης του *Q. robur*

Το είδος *Q. robur* αποτελεί μεγάλο, ανθεκτικό και φυλλοβόλο πλατύφυλλο δέντρο, το οποίο απαντάται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *Q. robur* ευδοκμεί βόρεια, στη νότια Νορβηγία και τη Σουηδία, αλλά και νότια, στο βόρειο τμήμα της Ιβηρικής χερσονήσου, της νότιας Ιταλίας, της Βαλκανικής Χερσονήσου και της Τουρκίας. Επίσης, απαντάται στην Πορτογαλία, την Ελλάδα και τη νότια Τουρκία και ανατολικά, στην ηπειρωτική κεντρική Ρωσία, μέχρι και τα Ουράλια Όρη. (Pérez et al., 2017)

Οι δρύες αυτού του είδους είναι μακρόβιες (σε ορισμένες περιπτώσεις, ο χρόνος ζωής τους είναι άνω των 1000 ετών) με ύψος μέχρι 30 m και διάμετρο κορμού έως 3-4 m. Τα φύλλα είναι επιμήκη και έχουν ακανόνιστο λοβό και κοντό μίσχο (2-7 mm). Τα άνθη διακρίνονται στα αρσενικά άγονα που εμφανίζονται μαζί με τα φύλλα και στα θηλυκά γόνιμα σε απόσταση από τα φύλλα. Ο κορμός στα νεαρά φυτά είναι λείος, φαιοπράσινος και με την πάροδο του χρόνου, καθίσταται αδρός και γκριζόχαιος μέχρι μαύρος. Οι καρποί, δηλαδή τα

βελανίδια του είδους *Q. robur*, έχουν ωσειδές σχήμα μήκους 2-3 cm, με πράσινες επιμήκειες λωρίδες, ορατές στους φρέσκους καρπούς, ενώ εντοπίζονται συχνά σε ζεύγη και επί κυματιστών κυπελλοειδών σχηματισμών στα άκρα μακρών μίσχων. (Eaton et al., 2016)



Εικόνα 8 Αριστερα: δέντρο του είδους *Q. robur*; Δεξιά: καρποί (βελανίδια) (Barstow, M. & Khela, 2017)

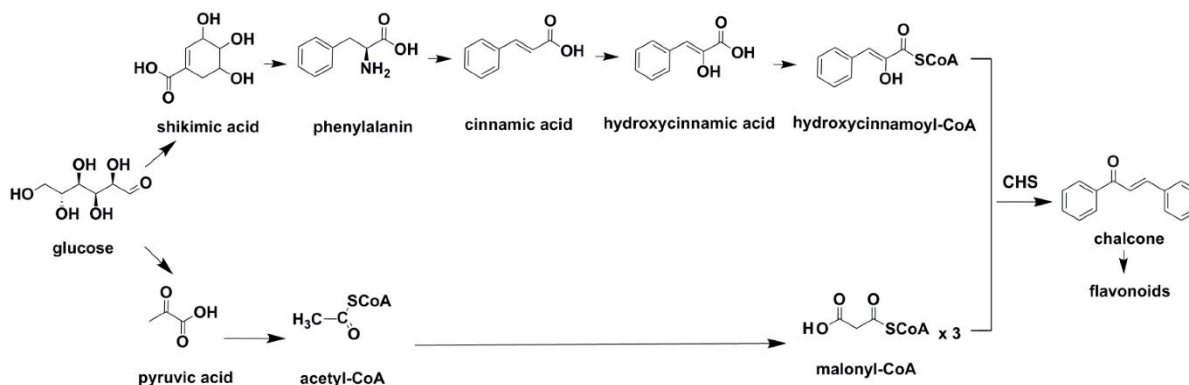
2.1.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες του είδους *Q. robur*

Η εκχύλιση διαφορετικών ενώσεων από τα δρύινα βαρέλια ή “chips” δρυός στο κρασί κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, εξαρτάται κυρίως από το σύνολο των εκχυλίσμων ενώσεων, που υπάρχουν αρχικά στο ξύλο δρυός. Η χημική σύνθεση του ξύλου δρυός επηρεάζεται από δύο κυρίως παράγοντες, αφενός το είδος και τη γεωγραφική προέλευση του δέντρου από το οποίο λαμβάνεται το ξύλο οινοποίησης, και αφετέρου, την επεξεργασία που έχει υποστεί το παραληφθέν ξύλο (κάπνισμα ή μη, βαθμός και διάρκεια ψησίματος). (Cadahía et al., 2001)

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες ανά χημική κατηγορία, οι οποίοι περιέχονται στο ξύλο Σλαβονικής δρυός (*Q. robur*), παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω, ενώ επισημαίνεται και η συνεισφορά τους στη γεύση και στο άρωμα του οίνου, κατά την παλαίωσή του σε δρύινα βαρέλια κατασκευασμένα από ξύλο *Q. robur* ή κατά τον αρωματισμό του με “chips” ξύλου Σλαβονικής δρυός.

2.1.2.1 Πολυφαινολικά συστατικά

Τα πολυφαινολικά συστατικά αποτελούν μία από τις πολυάριθμες και ευρέως διαδεδομένες ομάδες ουσιών στο φυτικό βασίλειο, που σήμερα απαριθμεί πάνω από 8000 γνωστές φαινολικές δομές. Τα πολυφαινολικά συστατικά δύνανται να υποδιαιρεθούν σε διαφορετικές κατηγορίες σύμφωνα με τον αριθμό των δακτυλίων φαινόλης και των βασικών δομικών χαρακτηριστικών τους. Συμμετέχουν σε αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού, δρώντας προστατευτικά έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας ή της προσβολής από παθογόνους οργανισμούς. Γενικά, οι σκελετοί πολυφαινόλης προέρχονται από δύο διαφορετικές δραστικές πρόδρομες ουσίες (δηλαδή, τις 4-κουμαροϋλο-συνένζυμο Α και μαλονυλο-συνένζυμο Α) και προκύπτουν βιοσυνθετικά από τις οδούς του σικιμικού και του μηλονικού οξέος, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9. (Zhang et al., 2015a)

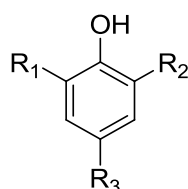


Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση της οδού βιοσύνθεσης των πολυφαινολικών ενώσεων (Zhang et al., 2015a)

Τα πολυφαινολικά συστατικά του ξύλου δρυός είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διαδικασία της παλαίωσης, καθώς έχουν καίριο ρόλο στην ωρίμανση του οίνου και στη διαμόρφωση της γεύσης και της οσμής του, ενώ συγχρόνως παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Τα συστατικά αυτά που περιέχονται στο ξύλο της κοινής δρυός (*Q. robur*) διακρίνονται σε 4 κύριες κατηγορίες: τις πτητικές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τις φαινολικές αλδεΐδες και τις ελλαγιταννίνες. Δομικά, τόσο τα πτητικά φαινολικά συστατικά όσο και τα φαινολικά οξέα και οι αλδεΐδες προέρχονται από την απλή φαινολική δομή του υδροξυβενζολίου. Αντιθέτως, οι ελλαγιταννίνες αποτελούν μία κατηγορία πολυφαινολών οι οποίες δημιουργούνται από τη σύνδεση γαλλοϋλομάδων (galloyl units) στην β-1,2,3,4,6-πενταγαλλοϋλογλυκόζη. (Alañón et al., 2011)

2.1.2.1.1 Απλά πτητικά φαινολικά συστατικά

Είναι απλές φαινόλες παρούσες στο ξύλο δρυός, που μπορούν να εκχυλιστούν στο κρασί, μεταβάλλοντας το αρωματικό του προφίλ. Ίχνη 4-βινυλοφαινόλης βρέθηκαν στο ξύλο δρυός αλλά, σε οίνους που είχαν υποστεί παλαίωση για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, η συγκέντρωση της 4-βινυλοφαινόλης προσέγγιζε το όριο οσφρητικής ανίχνευσης (605 µg/L). Σε κρασιά που είχαν υποστεί παλαίωση σε δρύινα βαρέλια ανιχνευτήκαν επίσης οι απλές φαινόλες: 4-αιθυλοφαινόλη, γουαϊακόλη, 4-μεθυλογουαϊακόλη, 4-αιθυλογουαϊακόλη και βινυλογουαϊακόλη. Οι προαναφερόμενες φαινόλες προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή στον παλαιωμένο οίνο. (Zhang et al., 2015a),(Marín et al., 2005)



Εικόνα 10 Βασικός σκελετός πτητικού φαινολικού συστατικού

Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι οι απλές φαινόλες, όπως η αιθυλοφαινόλη, η βινυλοφαινόλη και η βινυλογουαϊακόλη, υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις στο ξύλο δρυός, ενώ η αυξημένη παρουσία τους σε οίνους οφείλεται στη δράση μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, κυρίως λακτοβακτηρίων και ζυμομυκήτων. (Jaraúta et al., 2005) Οι απλές φαινόλες που έχουν ανιχνευτεί στο ξύλο δρυός του είδους *Q. robur* παρατίθενται κατωτέρω:

Πίνακας 1 Πτητικά φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Πτητικό Φαινολικό Συστατικό	R ₁	R ₂	R ₃	Βιβλιογραφία
φαινόλη	H	H	H	(Cadañía et al., 2003)
γουαϊακόλη	OCH ₃	H	H	(Cadañía et al., 2003)
4-μεθυλογουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH ₃	(Cadañía et al., 2003)
4-αιθυλογουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	(Cadañía et al., 2003)
4-βινυλογουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH=CH ₂	(Cadañía et al., 2003)
ευγενόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH=CH ₂	(Cadañía et al., 2003)
ισοευγενόλη	OCH ₃	H	CH=CHCH ₃	(Cadañía et al., 2003)
συριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	H	(Cadañía et al., 2003)
4-μεθυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	(Cadañía et al., 2003)
4-αλλυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	(Cadañía et al., 2003)

Σύμφωνα με μελέτες, η απλή φαινόλη έχει άρωμα μελανιού. Η γουαϊακόλη και τα παράγωγά της έχουν χαμηλά όρια οσφρητικής ανίχνευσης. Πιο συγκεκριμένα, οι ουσίες γουαϊακόλη και 4-μεθυλογουαϊακόλη, που έχουν χαρακτηριστικά αρώματα καπνιστού και πικάντικου, έχουν οσφρητικό κατώφλι της τάξεως των 25 και 65 μg/L, αντίστοιχα. Η 4-αιθυλογουαϊακόλη με οσφρητικό όριο 33 μg/L συνεισφέρει επίσης σε αρώματα πικάντικου και καπνιστού. Η 4-βινυλογουαϊακόλη, με οσφρητικό όριο ανίχνευσης 40 μg/L, προσδίδει πικάντικα και ξυλώδη αρώματα, καθώς και αρώματα γαρύφαλλου. (Zhang et al., 2015a) Η ευγενόλη έχει άρωμα παρόμοιο με τα μπαχαρικά γαρύφαλλο και κανέλλα, ενώ η ισοευγενόλη παρουσιάζει πικάντικο και ξυλώδες άρωμα. Η συριγγόλη και τα παράγωγά της έχουν χαρακτηριστικό άρωμα καπνού. (B. Cabrera et al., 2012)

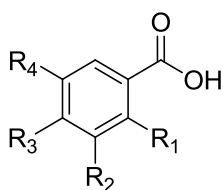
2.1.2.1.2 Φαινολικά οξέα

Τα κύρια φαινολικά οξέα που έχουν ταυτοποιηθεί στο ξύλο δρυός είναι τα υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμωμικά οξέα. Στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων, τα οποία προέρχονται απευθείας από το βενζοϊκό οξύ, περιλαμβάνονται το γαλλικό, το γεντισικό, το π-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό, το συριγγικό, το σαλικυλικό και το βανιλλικό οξύ. Συναφή συστατικά είναι οι υδροξυβενζοϊκές αλδεΐδες, όπως η συριγγαλδεΐδη και η βανιλίνη, στις οποίες η καρβοξυλική (-COOH) ομάδα υποκαθίσταται από μια αλδεΐδομάδα (-CHO). Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους έχουν δομή C6-C3, με περισσότερο διαδεδομένα στο ξύλο δρυός το π-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ. (Zhang et al., 2015a)

Σύμφωνα με μελέτες, το χρώμα των κόκκινων κρασιών επηρεάζεται από την παρουσία φαινολικών οξέων και ιδιαίτερα των υδροξυκινναμωμικών οξέων, τα οποία φαίνεται ότι σταθεροποιούν και ενισχύουν το κόκκινο χρώμα του ερυθρού οίνου κατά 60-70% στα 520 nm. (Zhang et al., 2015b) (Eiro and Heinonen, 2002) Μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν αναφορές για τη συνεισφορά των φαινολικών οξέων στη γεύση και στο άρωμα του οίνου.

Τα φαινολικά οξέα που περιέχονται στο ξύλο δρυός του είδους *Q. robur* παρατίθενται κατωτέρω.

- Υδροξυβενζοϊκά οξέα

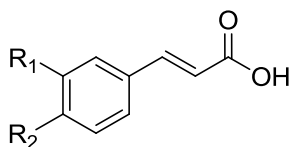


Εικόνα 11 Βασικός σκελετός υδροξυβενζοϊκού οξέος

Πίνακας 2 Υδροξυβενζοϊκά οξέα που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Φαινολικό οξύ	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Βιβλιογραφία
Ευδεσμικό οξύ	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	(Zhang et al., 2015a)
Γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH	(Zhang et al., 2015a)
π-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	H	H	OH	H	(Zhang et al., 2015a)
Βαννιλικό οξύ	H	H	OH	OCH ₃	(Zhang et al., 2015a)
Γεντισικό οξύ	OH	H	H	OH	(Zhang et al., 2015a)
Συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	(Zhang et al., 2015a)

- Υδροξυκινναμικά οξέα



Εικόνα 12 Βασικός σκελετός υδροξυκινναμικού οξέος

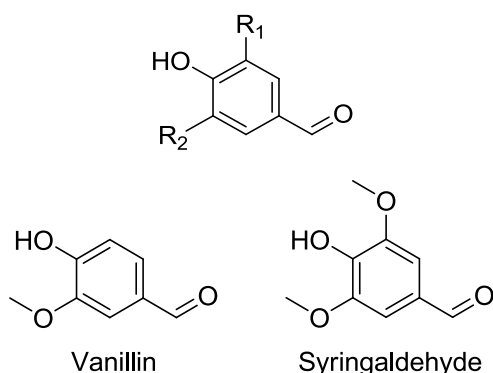
Πίνακας 3 Υδροξυκινναμικά οξέα που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Φαινολικό οξύ	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
Καφεϊκό οξύ	OH	OH	(Zhang et al., 2015a)
Φερουλικό οξύ	OCH ₃	OH	(Zhang et al., 2015a)
Π-Κουμαρικό οξύ	H	OH	(Zhang et al., 2015a)

2.1.2.1.3 Φαινολικές αλδεΐδες

Οι φαινολικές αλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο δρυός του είδους *Q. robur* παρατίθενται κατωτέρω. Ο αρωματικός δακτύλιος των φαινολικών αλδεϋδών συντίθεται μέσω της οδού του σικιμικού οξέος από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, τον κοινό πρόδρομο των φαινολών. Το περιεχόμενο και ο ρυθμός μεταβολισμού των φαινολικών αλδεϋδών ενισχύεται σε φυτά υπό συνθήκες στρες. Οι φαινολικές αλδεΐδες στα φυτά παρουσιάζουν αμυντική δράση κατά του οξειδωτικού στρες. (Kulbat, 2016)

- Υδροξυβενζαλδεΐδες



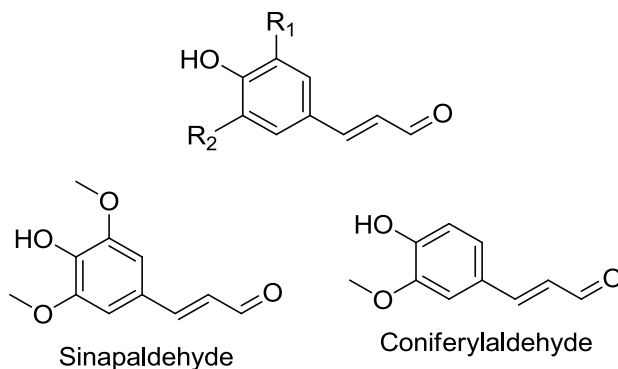
Εικόνα 13 Πάνω: βασικός σκελετός υδροξυβενζαλδεΐδης; Κάτω: vanillin και syringaldehyde

Πίνακας 4 Υδροξυβενζαλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Φαινολική αλδεΐδη	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
Βανιλίνη	H	OCH ₃	(Chira and Teissedre, 2013)
Συριγγαλδεΐδη	OCH ₃	OCH ₃	(Chira and Teissedre, 2013)

Η βανιλίνη και η συριγγαλδεΐδη προσδίδουν στον οίνο άρωμα βανίλλιας, κατά την εκχύλισή τους από το ξύλο Σλαβονικής δρυός στη διάρκεια της παλαίωσής του. (B. Cabrita et al., 2012)

- Υδροξυκινναμάλδεΐδες



Εικόνα 14 Πάνω: βασικός σκελετός υδροξυκινναμάλδεΐδης; Κάτω: sinapaldehyde και coniferylaldehyde

Πίνακας 5 Υδροξυκινναμάλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

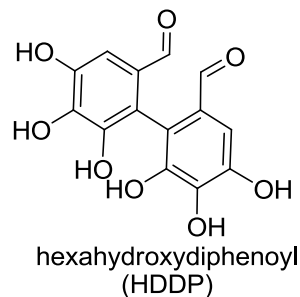
Φαινολική αλδεΐδη	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
Σιναπαλδεΐδη	OCH ₃	OCH ₃	(Fernández De Simón et al., 1996)
Κονιφεραλδεΐδη	H	OCH ₃	(Fernández De Simón et al., 1996)

Η σιναπαλδεΐδη προσδίδει στον οίνο άρωμα βανίλλιας, ενώ η κονιφεραλδεΐδη προσδίδει στον οίνο άρωμα βανίλλιας και ξύλου, κατά την εκχύλισή τους από το ξύλο Σλαβονικής δρυός στη διάρκεια της παλαίωσής του. (B. Cabrita et al., 2012)

2.1.2.1.4 Ελλαγιταννίνες

Πρόκειται για μία μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών συστατικών, ευρέως διαδεδομένων στο φυτικό βασίλειο, κυρίως λόγω των φυτοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων. Οι απωθητικές ιδιότητές τους οφείλονται στη δυσάρεστη, πικρή γεύση τους, ενώ η τοξικότητά τους σχετίζεται με την ικανότητά τους να δεσμεύουν και να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά τους τις καθιστούν εξαιρετικές ενώσεις για την παροχή φυτοπροστασίας ενάντια στα έντομα. (Kulbat, 2016)

Η δομή τους χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας ή περισσότερων εξαυδροξυδιφαινολυμάδων (hexahydroxydiphenyl-HHDP), που εστεροποιούνται με ένα σάκχαρο, κυρίως τη D-γλυκοκυρανόση. (Landete, 2011)



Εικόνα 15 Δομή HHDP (HexaHydroxyDiPhenoyl)

Τα ανάλογα HHDP συνδέονται με γειτνιάζουσες γαλλόϋλομάδες μέσω C-C δεσμού. Οι ελλαγιταννίνες έχουν μεγάλη δομική ποικιλία, εξαιτίας της διαφορετικής σύνδεσης των ομάδων HHDP με τη μονάδα του σακχάρου και της τάσης τους να σχηματίζουν μονομερή και διμερή. (Zhang et al., 2015a)

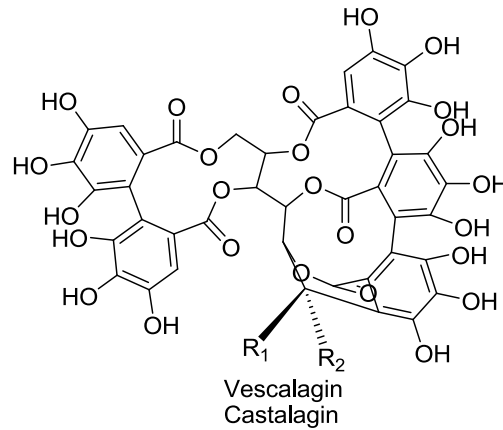
Οι μονομερείς βεσκαλαγίνη και κασταλαγίνη (vescalagin και castalagin) εντοπίζονται σε είδη δρυός χρησιμοποιούμενα στη βαρελοποιία και αποτελούν το 40%-60% των ελλαγιταννινών. Τα διμερή (roburins A-D) και τα παράγωγα λυξόζης/ξυλόζης (grandinin, roburin B, roburin C, roburin E) επίσης έχουν εντοπισθεί στο ξύλο δρυός. (Michel et al., 2011)

Το ξύλο της Σλαβονικής δρυός περιέχει κυρίως C-γλυκοσιδικά μονομερή ελλαγιταννίνης (vescalagin, castalagin, grandinin, roburin E) και τα διμερή τους (roburins A-D).

Η γευστική αίσθηση των ελλαγιταννινών περιγράφηκε ως στυφή σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις 0.2-6.3 $\mu\text{mol/L}$, ενώ η πικρή γεύση είναι έντονη εξαρτώμενη από τη δομή της ελλαγιταννίνης και καθίσταται αντιληπτή σε συγκεντρώσεις κατωφλίου 410-1650 $\mu\text{mol/L}$. (Chira and Teissedre, 2014)

Οι ελλαγιταννίνες που περιέχονται στο ξύλο δρυός του είδους *Q. robur* παρατίθενται κατωτέρω.

- **C-γλυκοσιδικά μονομερή ελλαγιταννίνης**



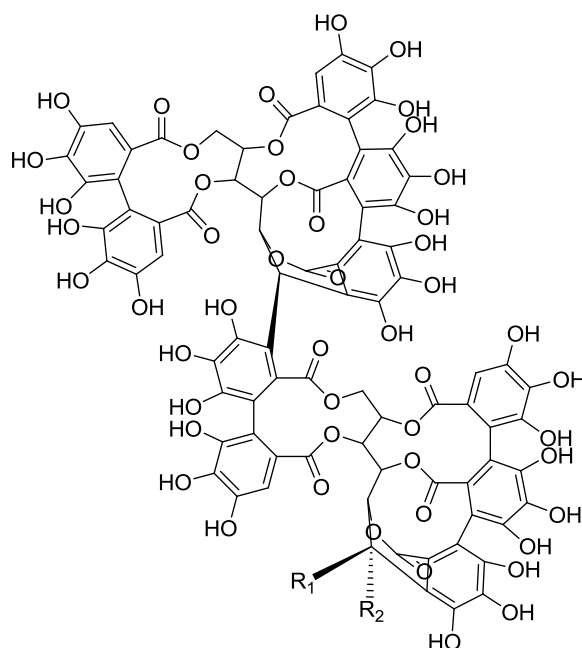
Εικόνα 16 Βασικός σκελετός C-γλυκοσιδικών μονομερών ελλαγιταννίνης

Πίνακας 6 C-γλυκοσιδικά μονομερή ελλαγιταννίνης που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Ελλαγιταννίνη	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
vescalagin	OH	H	(Klumpers et al., 1994)
castalagin	H	OH	(Klumpers et al., 1994)
grandinin	H	lyxose	(Klumpers et al., 1994)
roburin E	H	xylose	(Klumpers et al., 1994)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία

- Διμερή C-γλυκοσιδικών μονομερών ελλαγιταννίνης



Εικόνα 17 Βασικός σκελετός διμερών C-γλυκοσιδικών μονομερών ελλαγιταννίνης

Πίνακας 7 Διμερή C-γλυκοσιδικών μονομερών ελλαγιταννίνης που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Ελλαγιταννίνη	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
roburin A	OH	H	(Klumpers et al., 1994)
roburin B	H	lyxose	(Klumpers et al., 1994)
roburin C	H	xylose	(Klumpers et al., 1994)
roburin D	H	OH	(Klumpers et al., 1994)

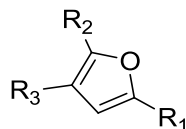
*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία

2.1.2.2 Φουρανικά παράγωγα

Το φουράνιο είναι ένας πενταμελής ετεροκυκλικός και ακόρεστος δακτύλιος, ο οποίος περιέχει οξυγόνο. Ο πυρήνας του φουρανίου βρίσκεται σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικά δραστικών ενώσεων. Οι ενώσεις που περιέχουν τον δακτύλιο φουρανίου (όπως επίσης και το δακτύλιο τετραϋδροφουρανίου) αναφέρονται συνήθως ως φουρανικά παράγωγα. Η φουρφουράλη αποτελεί την πρώτη ύλη, από την οποία προέρχονται όλα τα εμπορικά διαθέσιμα φουρανικά παράγωγα. Η φουρφουράλη προέρχεται από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης σε μονοσακχαρίτες, οι οποίοι μέσω αφυδάτωσης οδηγούν στο σχηματισμό της φουρφουράλης. (Kada et al., 1976)

Στο ξύλο του είδους *Q. robur*, τα κύρια ανιχνεύσιμα φουρανικά παράγωγα είναι η φουρφουράλη, η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και η 5-μεθυλοφουρφουράλη. Οι δύο

τελευταίες ενώσεις προέρχονται από εξόζες, οι οποίες είναι τα κύρια συστατικά της κυτταρίνης, ενώ η φουρφουράλη προέρχεται από πεντόζες, οι οποίες αποτελούν τα κύρια συστατικά των ημικυτταρινών. (Alañón et al., 2012)



Εικόνα 18 Βασικός σκελετός φουρανίου

Πίνακας 8 Φουρανικά παράγωγα που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

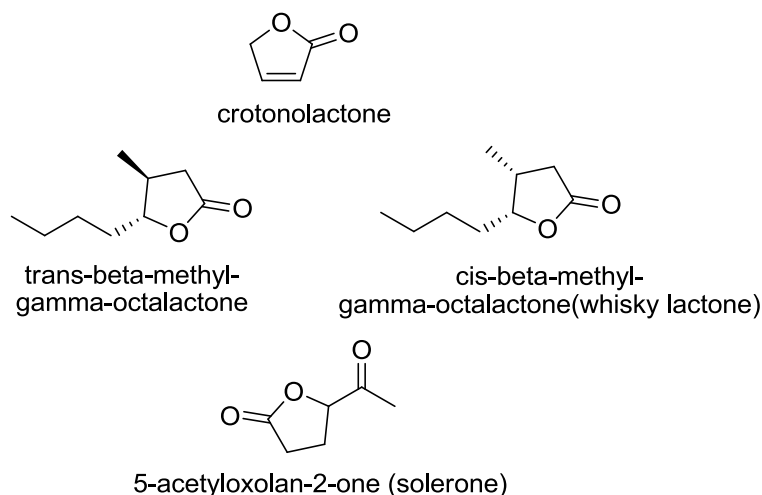
Φουρανικό Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	Βιβλιογραφία
Φουρφουράλη	CHO	H	H	(Alañón et al., 2012)
1-(2-Φουρανυλο)αιθανόνη	C=OCH ₃	H	H	(Alañón et al., 2012)
5-Μεθυλοφουρφουράλη	CHO	CH ₃	H	(Alañón et al., 2012)
Φουρανο-2,3-δικαρβοξαλδεύδη	H	CHO	CHO	(Alañón et al., 2012)
2-Φουρανομεθανόλη	CH ₂ OH	H	H	(Alañón et al., 2012)
5-Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη	CHO	CH ₂ OH	H	(Alañón et al., 2012)

Η φουρφουράλη και η 5-μεθυλοφουρφουράλη παρουσιάζει αρωματικά χαρακτηριστικά γλυκού αμυγδάλου, ελαφρού καπνίσματος και καραμέλας. Η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη είναι άοσμη. (B. Cabrita et al., 2012)

2.1.2.3 Λακτόνες

Η θερμική αποικοδόμηση των λιπιδίων του ξύλου δρυός οδηγεί στο σχηματισμό λακτονών, οι οποίες θεωρούνται ως τα πιο σημαντικά πτητικά συστατικά, καθώς αποτελούν ενώσεις που συμβάλλουν στη γεύση του παλαιωμένου οινοπνευματώδους ποτού, λόγω του χαμηλού ορίου γευστικής και οσφρητικής ανίχνευσής τους.

Το ξύλο δρυός *Q. robur* φέρει δύο ισομερείς ενώσεις, τη *cis*- και τη *trans*- β -μεθυλο- γ -οκταλακτόνη, οι οποίες είναι παρούσες στο ακάπνιστο ξύλο σε σημαντικές ποσότητες και στο ψημένο ξύλο σε ποσότητες μεταβαλλόμενες ανάλογα με τις συνθήκες ψησίματος. Στην αρχή του ψησίματος, η ποσότητα της γ -οκταλακτόνης αυξάνεται, αλλά η μεγάλη διάρκεια ψησίματος δύναται να συντελέσει στην καταστροφή αυτής της ένωσης. (Cadahía et al., 2003)

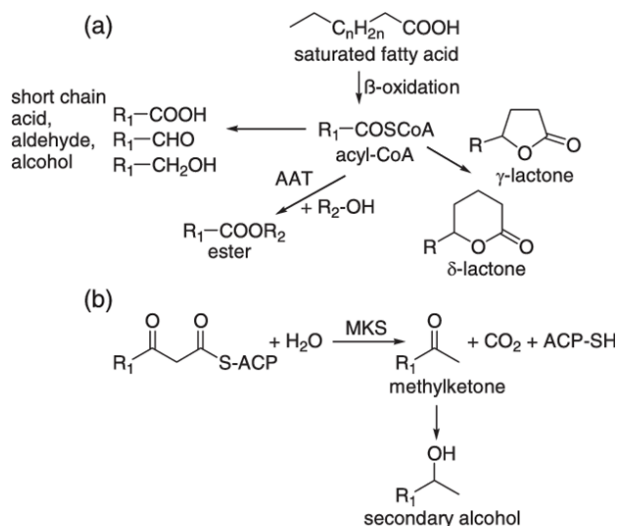


Εικόνα 19 Λακτόνες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* (Alañón et al., 2012)

Τα δύο ισομερή της β-μεθυλο-γ-οκταλακτόνης αποτελούν σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, λόγω του έντονου αρώματος καρύδας και ξύλου που έχουν, του χαμηλού κατωφλίου αντίληψής τους και της αποκλειστικής παρουσίας τους στο γένος *Quercus*. (Alañón et al., 2012)

2.1.2.4 Αλειφατικές Αλδεΐδες

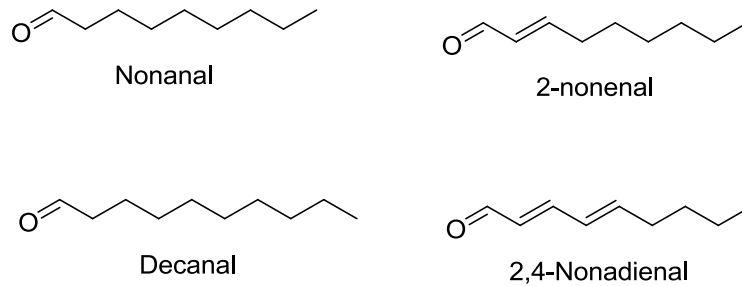
Μία άλλη ομάδα ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο ξύλο του είδους *Q. robur* ήταν οι αλειφατικές αλδεΐδες, δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι έχουν μελετηθεί λιγότερο από τις προαναφερόμενες ενώσεις. Βιοσυνθετικά, αυτές οι ουσίες προκύπτουν από την οξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 20 Σχηματική απεικόνιση της οδού βιοσύνθεσης των αλειφατικών αλδεϊδών (Schwab et al., 2008)

Η παρουσία αυτών των μεταβολιτών είναι σημαντική, επειδή θεωρούνται ανεπιθύμητες, λόγω των δυσάρεστων οσμών τους (π.χ. οσμή προσιδιάζουσα σε πριονίδι, φρέσκο γρασίδι και χαρτόνι). (Alañón et al., 2012)

Οι αλειφατικές αλδεΐδες, οι οποίες περιέχονται στο ξύλο του είδους *Q. robur* παρατίθενται στην κατωτέρω εικόνα.



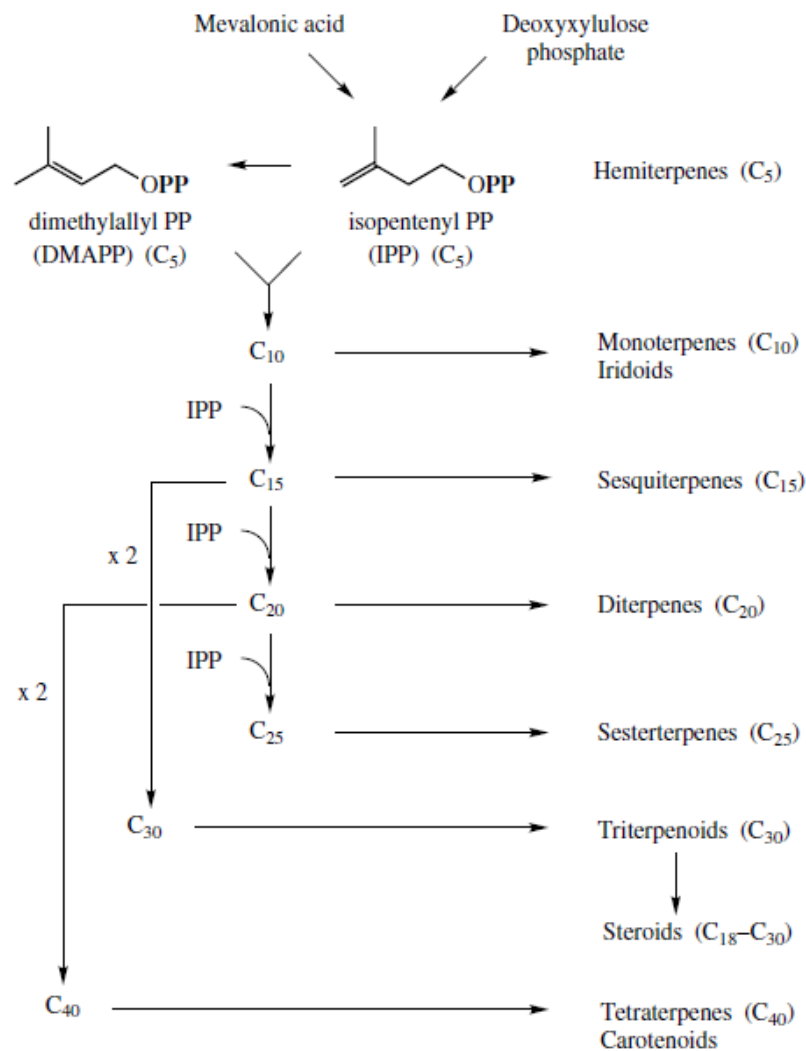
Εικόνα 21 Αλειφατικές αλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* (Alañón et al., 2012)

2.1.2.5 Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή αποτελούν μια μεγάλη και δομικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων. Οι τυπικές δομές περιέχουν ανθρακικούς σκελετούς που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ισοπρενίου και ταξινομούνται ως ημιτερπένια (C₅), μονοτερπένια (C₁₀), σεσκιτερπένια (C₁₅), διτερπένια (C₂₀), σεστερτερπένια (C₂₅), τριτερπένια (C₃₀) και τετρατερπένια (C₄₀).

Οι μονάδες ισοπρενίου προέρχονται από δύο οδούς, είτε μέσω της οδού των ενδιάμεσων του μεβαλονικού οξέος (MVA: Mevalonic Acid) ή μέσω της οδού της 5-φωσφορικής-1-δεοξυ-D-ξυλουλόσης / 4-φωσφορικής 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (φωσφορική δεοξυξυλουλόση, DXP: Deoxy-xylulose Phosphate/ 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate: MEP). Το ισοπρένιο παράγεται φυσικά αλλά δεν εμπλέκεται στο σχηματισμό των τερπενοειδών και οι δραστικές μονάδες ισοπρενίου που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τερπενοειδών είναι το πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP).

Η βιοσυνθετική οδός των τερπενοειδών συνοψίζεται στην κατωτέρω εικόνα, ενώ τα περιεχόμενα στο ξύλο του *Q. robur* τερπενοειδή παρατίθενται στα υποκεφάλαια που ακολουθούν. (Dewick, 2002a)

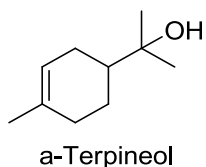


Εικόνα 22 Σχηματική απεικόνιση της οδού βιοσύνθεσης των τερπενίων (Dewick, 2002a)

2.1.2.5.1 Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια περιέχουν 10 άτομα άνθρακα και προκύπτουν από συμπύκνωση δύο μονάδων ισοπρενίου. Πρόκειται κυρίως για προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, αν και εξειδικευμένες κατηγορίες εμφανίζονται σε μερικά ζώα και μικροοργανισμούς. Το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) και το πυροφωσφορικό νερούλιο (NPP) αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες των μονοτερπενίων. Να σημειωθεί ότι τα μονοτερπένια βιοσυντίθενται μέσω της οδού της MEP. (Banthorpe et al., 1972)

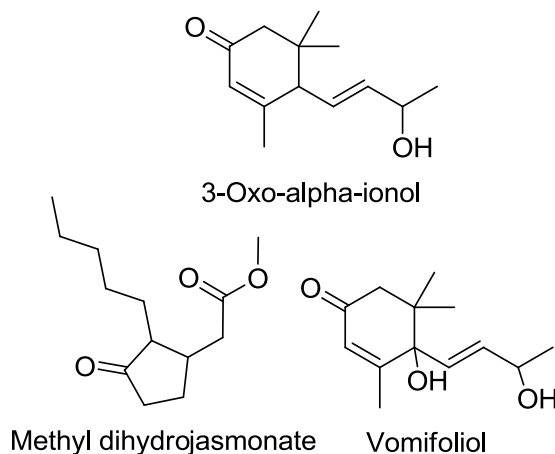
Η α -τερπινεόλη, ένα από τα κύρια μονοτερπένια που περιέχονται στο ξύλο του είδους *Q. Robur*, παρατίθεται στην κατωτέρω εικόνα.



Εικόνα 23 Μονοτερπένιο που περιέχεται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* (Alañón et al., 2012)

2.1.2.5.2 Νορισοπρενοειδή

Τα νορισοπρενοειδή είναι αρωματικές ενώσεις αποτελούμενες από 13 άτομα άνθρακα, μερικές από τις οποίες συμβάλλουν στο φρουτώδη αρωματικό χαρακτήρα που προσφέρει το ξύλο δρυός στον παλαιωμένο οίνο. Τα νορισοπρενοειδή αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης των καροτενοειδών, κατά την έκθεση των καροτενοειδών στο οξυγόνο, στο φως και στη θερμοκρασία, παράγοντες στους οποίους τα τελευταία είναι ασταθή. (Nonier et al., 2004)



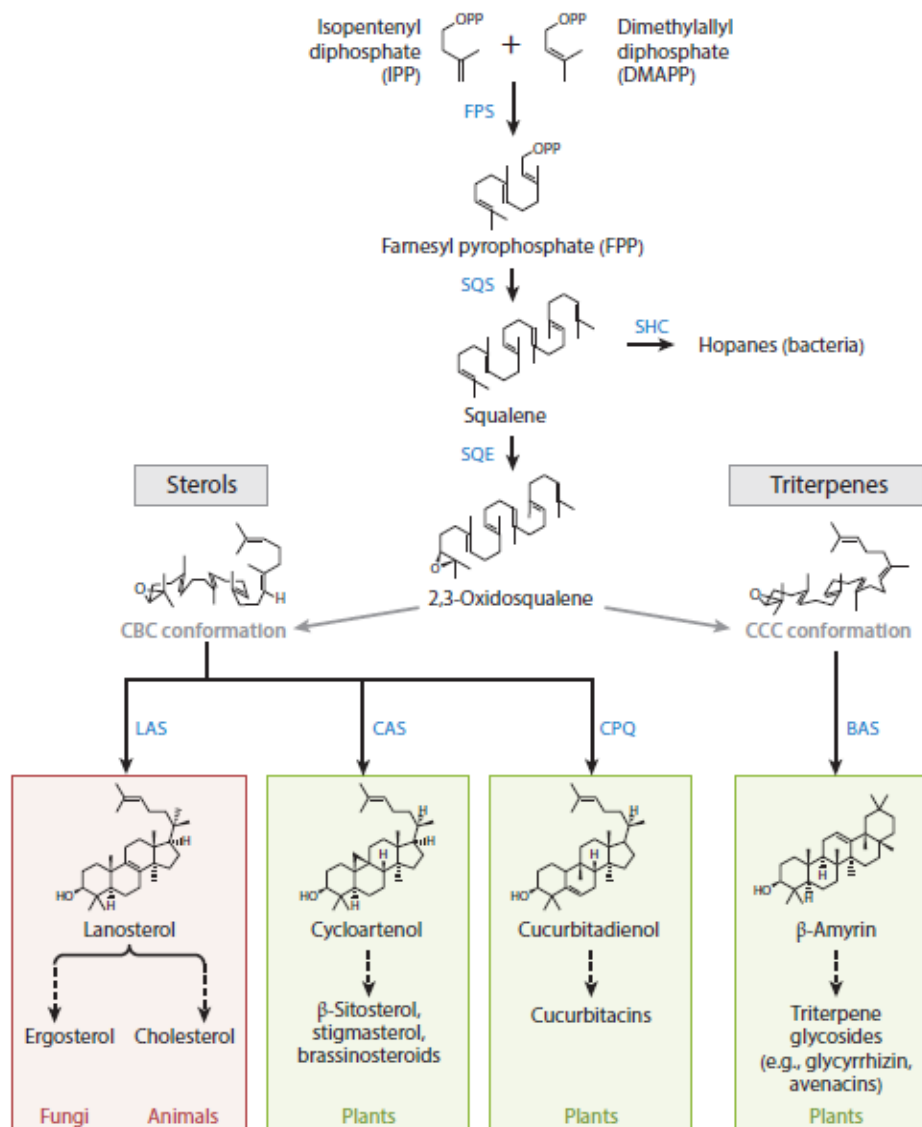
Εικόνα 24 Νορισοπρενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* (Alañón et al., 2012)

Η παρουσία νορισοπρενοειδών είναι σημαντική. Τα αρωματικά χαρακτηριστικά τους προσιδιάζουν στην οσμή ανθέων, φρούτων, τσαγιού και καπνού. (Alañón et al., 2012)

2.1.2.5.3 Τριτερπενοειδή

Τα τριτερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένων των στερολών, είναι μια ομάδα φυσικών προϊόντων που περιέχουν 30 άτομα άνθρακα και είναι ευρέως διαδεδομένων στα φυτά. Τα φυτά συχνά συσσωρεύουν τους δευτερογενείς αυτούς μεταβολίτες στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, η οποία καλείται σαπωνίνη. Οι σαπωνίνες περιλαμβάνουν το υδρόφοβο άγλυκο τμήμα του τριτερπενοειδούς, που ονομάζεται σαπωνγενίνη και μία ή περισσότερες υδρόφιλες μονάδες σακχάρου. (Sawai and Saito, 2011)

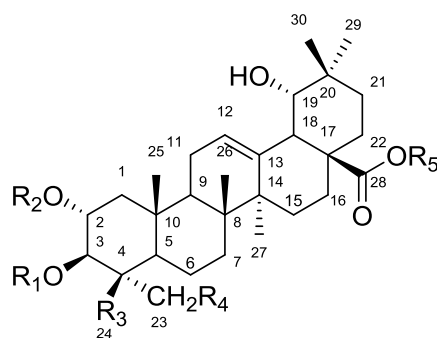
Οι στερόλες και τα τριτερπένια προέρχονται από ισοπρενοειδή που συντίθενται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (MVA). Το τελευταίο κοινό ενδιάμεσο για τις δύο οδούς βιοσύνθεσής τους είναι το 2,3-οξειδοσκουαλένιο. Οι στερόλες είναι σημαντικά δομικά στοιχεία των μεμβρανών και έχουν επίσης ρόλο σηματοδότησης (ως στεροειδείς ορμόνες). Αντίθετα, τα τριτερπένια δεν θεωρούνται απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία, ενώ παρόλο που υπάρχουν σε φυτά σε απλή μη τροποποιημένη μορφή, συχνά συσσωρεύονται ως τριτερπενικές σαπωνίνες. Η οδός βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και των στερολών απεικονίζεται στο κατωτέρω σχήμα.(Thimmapra et al., 2014)



Εικόνα 25 Σχηματική απεικόνιση της οδού βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών και των στερολών. Τα ένζυμα που καταλύουν τα διάφορα στάδια υποδεικνύονται σε κουτιά. Συντομογραφίες ενζύμων: FPS-συνθετάση πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου, SQS- συνθάση σκουαλενίου, SQE- μονοοξυγενάση ή εποξειδάση σκουαλενίου, SHC-κυκλάση σκουαλενίου/χοπενίου, LAS- συνθάση λανοστερόλης, CAS- συνθάση κυκλοαρτενόλης, CPQ-συνθάση κουκουρβιταδιενόλης, BAS- συνθάση β-αμυρίνης. (Thimmappa et al., 2014)

Οι πικρές και στυφές γεύσεις συσχετίζονται με την ύπαρξη τριτερπενοειδών σε αλκοολούχα ποτά. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες για τους μοριακούς δείκτες της γλυκύτητας του ξύλου δρυός και των οίνων που έχουν υποστεί παλαίωση σε βαρέλι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ορισμένα από τα εξεταζόμενα τριτερπενοειδή είναι στην πραγματικότητα φυσικά γλυκαντικά. (Pérez et al., 2017) Τα τριτερπενοειδή τα οποία περιέχονται στο ξύλο του είδους *Q. robur*, περιγράφονται παρακάτω:

- Τριτερπενοειδή με “β” προσανατολισμό του υποκαταστάτη στη θέση του C-3 του σκελετού ολεανανίου

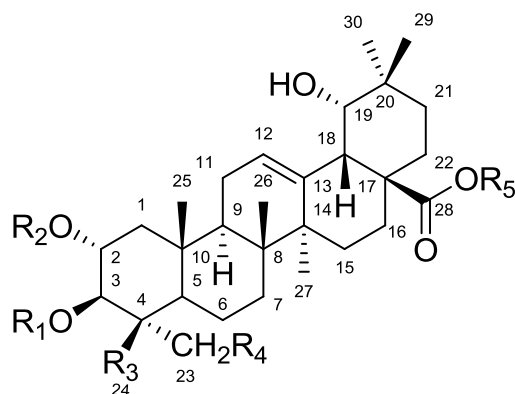


Εικόνα 26 Βασικός σκελετός τριτερπενοειδούς με “β” προσανατολισμό του υποκαταστάτη στη θέση του C-3 του σκελετού ολεανανίου

Πίνακας 9 Τριτερπενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Τριτερπενοειδές	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Βιβλιογραφία
2α,3β,19α-trihydroxyolean-12-ene-24,28-dioic acid (bartogenic acid)	H	H	COOH	H	H	(Pérez et al., 2017)(Arramon et al., 2002)
28-β-D-glucopyranosyl-2α,3β,19α-trihydroxyolean-12-ene-24,28-dioic acid (bartogenic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester)	H	H	COOH	H	Glucose	(Pérez et al., 2017) (Arramon et al., 2002),(Marchal et al., 2016)
2α,3β,19α,23-tetrahydroxyolean-12-ene-24,28-dioic acid (23-hydroxybartogenic acid)	H	H	COOH	OH	H	(Pérez et al., 2017) (Arramon et al., 2002)
2-O-galloyl bartogenic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester	H	galloyl	COOH	H	Glucose	(Pérez et al., 2017)
2-O-galloyl bartogenic acid	H	galloyl	COOH	H	H	(Pérez et al., 2017)
3-O-galloyl bartogenic acid	galloyl	H	COOH	H	H	(Pérez et al., 2017)
23-O-galloyl 2α,3β,19α,23-tetrahydroxyolean-12-ene-24,28-dioic acid	H	H	COOH	O-galloyl	H	(Pérez et al., 2017)
2α,3β,19α,23-tetrahydroxy-24-oxo-olean-12-en-28-oic acid (robural A)	H	H	CHO	OH	H	(Pérez et al., 2017)
23-O-galloyl robural A	H	H	CHO	O-galloyl	H	(Pérez et al., 2017)
3-O-galloyl 2α,3β,19α-trihydroxy-24-oxo-olean-12-en-28-oic acid (robural B)	galloyl	H	CHO	H	H	(Pérez et al., 2017)
3-O-galloyl bartogenic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester	galloyl	H	COOH	H	Glucose	(Pérez et al., 2017)
bellericagenin B	H	H	CH ₂ OH	OH	H	(Pérez et al., 2017)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία



Εικόνα 27 Βασικός σκελετός QTT

Πίνακας 10 Τριτερπενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

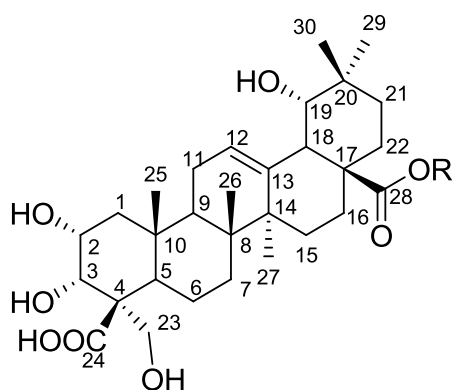
Τριτερπενοειδές	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Βιβλιογραφία
quercotriterpenoside(QTT) I	H	H	CH ₃	O-galloyl	Glucose	(Marchal et al., 2016)
quercotriterpenoside (QTT) II	H	galloyl	CH ₂ OH	H	Glucose	(Marchal et al., 2016)
quercotriterpenoside (QTT) III	H	galloyl	CH ₃	OH	Glucose	(Marchal et al., 2016)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία

Οι προαναφερόμενες ουσίες QTTs συνεισφέρουν στην αύξηση της γλυκιάς γεύσης του οίνου, η οποία παρατηρείται κατά την παλαίωσή του, ενώ ο γλυκοσίδης του μπαρτογενικού οξέος (bartogenic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester) προσδίδει στον οίνο πικρή γεύση, κατά την παλαίωσή του. (Marchal et al., 2016)

- **Τριτερπενοειδή με "α" προσανατολισμό του υποκαταστάτη του OH στη θέση του C-3 του σκελετού ολεανανίου**

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο προσανατολισμός "α" του υδροξυλίου στη θέση του C-3 του σκελετού ολεανανίου είναι αρκετά σπάνιος και αναφέρεται για πρώτη φορά στο γένος *Quercus*, από τους Pérez et al., το 2017.



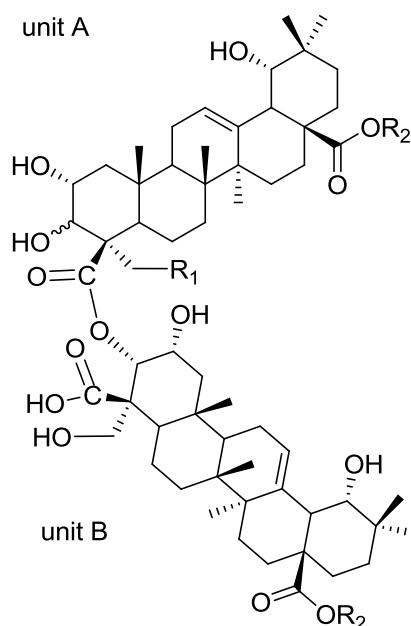
Εικόνα 28 Βασικός σκελετός τριτερπενοειδούς με “α” προσανατολισμό του υποκαταστάτη του OH στη θέση του C-3 του σκελετού ολεανανίου

Πίνακας 11 Τριτερπενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Τριτερπενοειδές	R	Βιβλιογραφία
2α,3α,19α,23 tetrahydroxylean-12-en-24,28-dioic acid (roburgenic acid)	H	(Pérez et al., 2017)
roburgenic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester	Glucose	(Pérez et al., 2017)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

- **Διμερή Τριτερπενοειδή**



Εικόνα 29 Βασικός σκελετός διμερών τριτερπενοειδών

Πίνακας 12 Διμερή τριτερπενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur*

Τριτερπενοειδές	R ₁	R ₂	Βιβλιογραφία
bartogenic acid [24-O-(28-O-β-D-glucopyranosyl roburgenic acid)] 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (roburoside A)	H	Glucose	(Pérez et al., 2017)

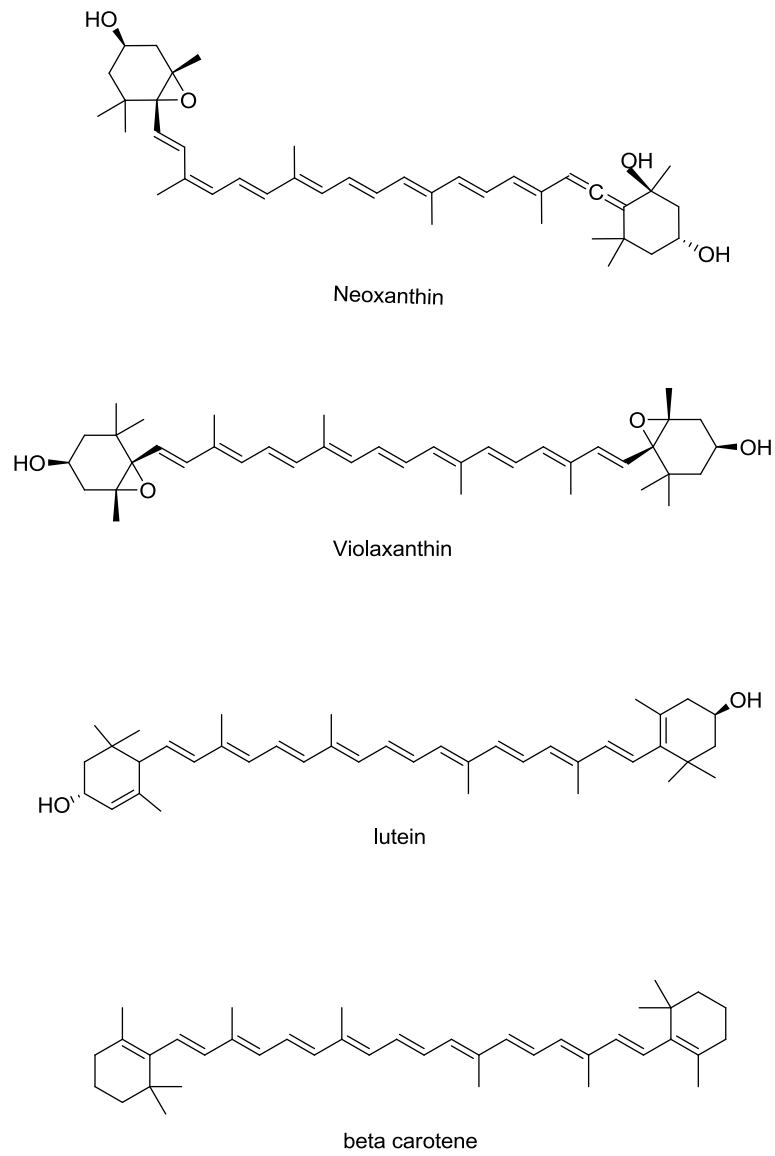
23-hydroxybartogenic acid [24-O-(28-O-β-D-glucopyranosyl roburgenic acid)] 28-O-β-D glucopyranosyl ester (roburoside B)	OH	Glucose	(Pérez et al., 2017)
roburgenic acid [24-O-(28-O-β-D-glucopyranosyl roburgenic acid)] 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (roburoside C)	OH	Glucose	(Pérez et al., 2017)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

2.1.2.5.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι υδρογονάνθρακες πολυενίου, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των τετρατερπενίων, συντίθενται από οκτώ μονάδες ισοπρενίου και συνεπώς, έχουν σκελετό 40 ατόμων άνθρακα. Παρέχουν το έντονο κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα ενός μεγάλου αριθμού φυτών, στα οποία είναι γενικά παρόντα ως σύνθετο μίγμα. (Nonier et al., 2004) Η συγκεκριμένη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, αλλά απαντάται και σε μη φωτοσυνθετικούς φυτικούς ιστούς, σε μύκητες και βακτήρια. Η δημιουργία του σκελετού του τετρατερπενίου, δηλαδή του φυτοενίου, προκύπτει από τη σύζευξη δύο μορίων διφωσφορικού γεραφυλλεραφυλλίου (GGPP) ουρά με ουρά, σε μία αλληλουχία ουσιαστικά ανάλογη με αυτή που παρατηρείται για τη βιοσύνθεση του σκουαλενίου και των τριτερπενίων. Να σημειωθεί ότι τα καροτενοειδή βιοσυντίθενται μέσω της οδού της 4-φωσφορικής 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (MEP). (Dewick, 2002b)

Τα καροτενοειδή δεν προσδίδουν γεύση και άρωμα στον οίνο με την εκχύλισή τους, κατά την παλαίωση του οίνου αλλά αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση των νορισοπρενοειδών, μορίων που συμβάλλουν στη γευστική και αρωματική βελτίωση του παλαιωμένου οίνου, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. (Masson et al., 1997)



Εικόνα 30 Καροτενοειδή που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* (Masson et al., 1997).

2.1.3 Επίδραση του ψησίματος στο φυτοχημικό προφίλ του ξύλου του είδους *Q. robur*

Η επεξεργασία του ξύλου δρυός με κάπνισμα έχει σημαντική επίδραση στους περιεχόμενους σε αυτό δευτερογενείς μεταβολίτες, τροποποιώντας τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητά τους. Η διαδικασία του ψησίματος ενισχύει δραστικά την περιεκτικότητα σε πτητικές ενώσεις, που προκύπτουν από τη θερμική αποικοδόμηση του ξύλου δρυός. Κατά τη διαδικασία του ψησίματος, η εφαρμογή θερμότητας επί του ξύλου δρυός οδηγεί σε διάσπαση των χημικών δεσμών εντός των βιοπολυμερών του, όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η λιγνίνη, οι πολυσακχαρίτες, οι πολυφαινόλες και τα λιπίδια, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση ή τις αλλαγές της φυτοχημικής σύνθεσης του ξύλου. Πτητικές φαινόλες, φαινολικές αλδεΐδες, φαινυλοκετόνες και ορισμένες φαινολικές αλκοόλες, σχηματίζονται κυρίως από τη θερμική αποικοδόμηση της λιγνίνης. Συγκεκριμένα, υψηλά επίπεδα μονο- και διμεθοξυλιωμένων φαινολών, βενζοϊκών και κινναμωμικών αλδεϋδών ταυτοποιήθηκαν στο ψημένο ξύλο δρυός.

Η θερμική αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών οδηγεί στην παραγωγή φουρανικών αλδεϋδών, καθώς επίσης πεντακυκλικών και εξακυκλικών κετονών. Οι λακτόνες, που σχηματίζονται από τα λιπίδια του ξύλου, αυξάνονται κατά την έναρξη του ψησίματος, ενώ είναι πιθανή η καταστροφή τους από μια μακράς διάρκειας διαδικασία εφαρμογής θερμότητας.

Η διαδικασία του ψησίματος και η θερμική αποικοδόμηση που επιφέρει στο ξύλο οδηγεί στο σχηματισμό αρκετών ενώσεων εντός του ξύλου δρυός, οι οποίες μπορούν να μεταφερθούν στο κρασί και στα οινοπνευματώδη κατά τη διάρκεια της παλαίωσης. Συνεπώς, οι εκτεταμένες πληροφορίες σχετικά με την πτητική σύνθεση του ξύλου δρυός που χρησιμοποιείται στη βαρελοποιία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στη βιομηχανία οινοποίησης. (B. Cabrita et al., 2012)

2.1.4 Φαρμακολογικές Δράσεις του είδους *Q. robur*

Πολλά είδη του γένους *Quercus* παρουσιάζουν φαρμακολογικές δράσεις. Από το μεσαίωνα, ο φλοιός των δένδρων του γένους *Quercus* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική, τοπικά σε εγκαύματα και πληγές ή σε γαστρεντερικές διαταραχές. Οι πιο κοινές ιατρικές ενδείξεις για το εκχύλισμα φλοιού *Quercus* (φλοιός βελανιδιάς) περιλαμβάνουν τη συμπτωματική θεραπεία της ήπιας διάρροιας και της ήπιας φλεγμονής του στοματικού

βλεννογόνου ή του δέρματος. (Deryabin and Tolmacheva, 2015) Πιο συγκεκριμένα, το είδος Q. robur, το οποίο και μελετάται στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρουσιάζει έντονη φαρμακολογική δράση, με τα διαφορετικά μέρη του να επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες.

Τα εναέρια τμήματα του είδους *Q. robur* παρουσιάζουν αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Εκχυλίσματα εξανίου, χλωροφορμίου, οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης των εναέριων τμημάτων του είδους *Q. robur* επέδειξαν μέτρια αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* και *Bacillus subtilis*, ενώ συγχρόνως παρουσίασαν ήπια αντιοξειδωτική δράση. (Uddin and Rauf, 2012) Σε άλλη ερευνητική μελέτη, το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα φύλλων του είδους *Q. robur* επέδειξε ηπατοπροστατευτική και γαστροπροστατευτική/αντιελκωτική δράση. (Moharram et al., 2015) Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα των φύλλων του *Q. robur* παρουσίασε κυτταροτοξικές ιδιότητες, κατά την *in vitro* αξιολόγησή του ως προς την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του ανθρώπινου καρκίνου του κόλον LoVo, του καρκίνου του προστάτη PC3 και των κυτταρικών σειρών του γλοιοβλαστώματος U373. (Frédérich et al., 2009a)

Η Επιτροπή Φυτικών Φαρμακευτικών Προϊόντων (HMPC) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) έχει συντάξει ήδη τη μονογραφία για το φλοιό των ειδών *Quercus robur*, *Quercus petraea* και *Quercus rubescens*. Ως χρησιμοποιούμενη δρόγη, περιγράφεται ο κομμένος και αποξηραμένος φλοιός από τα νεαρά κλαδιά και τους πλευρικούς βλαστούς των ειδών *Quercus robur*, *Quercus petraea* και *Quercus rubescens*, που συλλέγεται την άνοιξη (από το Μάρτιο έως τον Απρίλιο). Η δρόγη παρουσιάζει παραδοσιακή χρήση και ενδείκνυται στη συμπτωματική θεραπεία της ήπιας διάρροιας, όπως επίσης και στη συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δερματικών φλεγμονών και ήπιων φλεγμονών του στοματικού βλεννογόνου. Επιπρόσθετα, ενδείκνυται στη συμπτωματική ανακούφιση από το αίσθημα κνησμού και καύσου, που προκαλείται από τις αιμορροΐδες, κατόπιν αποκλεισμού άλλων σοβαρών καταστάσεων. Η σκόνη φλοιού βελανιδιάς από το είδος *Q. robur* χρησιμοποιείται επίσης για την προφύλαξη από τη διάρροια στα βοοειδή, στα άλογα, στους χοίρους, στα πρόβατα και στα κοτόπουλα. (Deryabin and Tolmacheva, 2015), (HMPC, 2011)

Εικόνα 31 Μονογραφία φλοιού *Q. robur*, *Q. petraea* και *Q. pubescens* (HMPC, 2011)

Το μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού του *Q. robur* παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και ικανοποιητική αναστολή των ενζύμων ελαστάση, κολλαγενάση και τυροσινάση, γεγονός που καθιστά το είδος *Q. robur* ιδιαίτερα σημαντικό στη βιομηχανία καλλυντικών. (Hubert et al., 2016)

Το ξύλο (heartwood) του *Q. robur* εμφανίζει επίσης φαρμακολογική δράση. Πιο συγκεκριμένα, τα περιεχόμενα στο ξύλο δρυός τριτερπενοειδή εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων PC3 (καρκίνος του προστάτη) και MCF-7 (αδenoκαρκίνωμα του μαστού εξαρτώμενο από τα οιστρογόνα), αλλά και έναντι των λεμφοκυττάρων. Τα τριτερπενοειδή αποδείχτηκαν περισσότερο δραστικά έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7), με το ρομπουργενικό οξύ, να είναι το δραστικότερο τριτερπενοειδές ($IC_{50} = 19.7 \mu M$). (Pérez et al., 2017) Τέλος, η ελλαγιταννίνη βεσκαλαγίνη που περιέχεται στο ξύλο του *Q. robur*, λειτουργεί ως εκλεκτικός καταλυτικός αναστολέας της α -ισομορφής της DNA τοποϊσομεράσης τύπου II. Η τοποϊσομεράση τύπου II είναι σημαντική για την εξασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, ενώ οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι ισχυρά αντικαρκινικά φάρμακα. (Auzanneau et al., 2012)

2.1.5 Χρήσεις του ξύλου του είδους *Q. robur*

Το είδος *Q. robur* χρησιμοποιείται κυρίως για την ξυλεία του. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται για την κατασκευή επίπλων, βαρελιών οиноποίησης, πλοίων στο παρελθόν, πλακών δαπέδου και ξύλινων επενδύσεων. Το ξύλο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμη ύλη και τα βελανίδια ως ζωτροφές. Διάφορα τμήματα του δέντρου εμφανίζουν ποικίλες φαρμακευτικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης της αντιδιαρροϊκής και της αντιφλεγμονώδους, όπως αναφέρθηκαν στο προηγούμενο υποκεφάλαιο. Καταληκτικά, το συγκεκριμένο είδος φύτεται επίσης ευρέως ως καλλωπιστικό. (Barstow, M. & Khela, 2017)

3 Οικογένεια Fabaceae

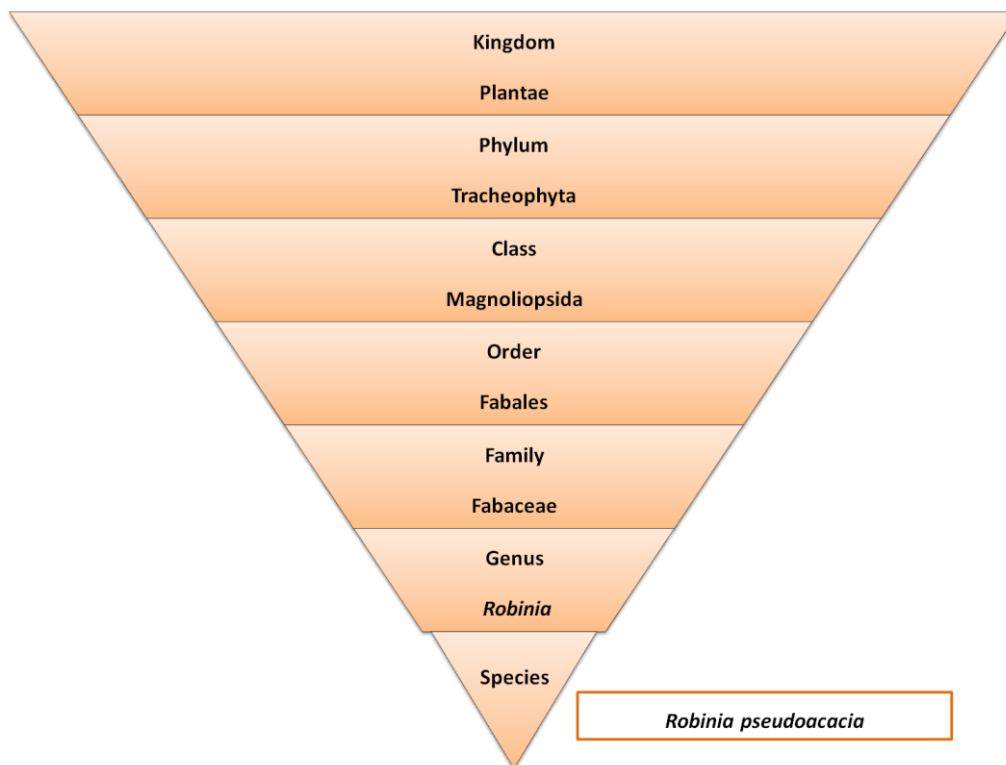
Η οικογένεια Fabaceae συνιστά την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων, περιλαμβάνει περισσότερα από 800 γένη και 20.000 είδη και κατέχει το μεγαλύτερο αριθμό οικόσιτων καλλιεργειών σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη οικογένεια φυτών (41 είδη). Από οικονομικής άποψης, η οικογένεια των οσπρίων αποτελούν τη δεύτερη σημαντικότερη οικογένεια καλλιεργούμενων φυτών μετά την οικογένεια των χόρτων. Τα όσπρια συνιστούν το 27% της παγκόσμιας φυτικής παραγωγής και παρέχουν το 33% της διατροφικής πρωτεΐνης, που καταναλώνουν οι άνθρωποι και τα ζώα. Τα φυτά της οικογένειας Fabaceae δύνανται να είναι πόες ή και δένδρα με παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση, καθώς εντοπίζονται σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές.

Τα φύλλα είναι εναλλασσόμενα, σύνθετα και περιβάλλονται από παράφυλλα. Τα άνθη είναι σε διάταξη αμφίπλευρη συμμετρική, ενώ τα πέντε σέπαλα ενώνονται για να σχηματίσουν τον κάλυκα, δημιουργώντας σε κάποια σημεία μέσω της ένωσής τους, δύο ή τέσσερις λοβούς. Ο καρπός είναι ξηρός, και ο καρπός που περιέχει μεγάλα σπέρματα μερικές φορές διαρρηγνύεται. (Li and Olsen, 2016)

3.1 Ακακία - *Robinia pseudoacacia*

3.1.1 Ταξινομική και Βοτανική Περιγραφή του είδους *R. pseudoacacia*

Το είδος *Robinia pseudoacacia*, γνωστό και ως “ακακία” (acacia) ή με τα κοινά ονόματα “μαύρη ακρίδα” (black locust) ή “ψευδής ακακία” (false acacia), ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και στο γένος *Robinia*, όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Το γένος *Robinia* περιλαμβάνει ανθισμένα φυτά, που προέρχονται από τη Βόρεια Αμερική και το βόρειο Μεξικό. Αποτελούν φυλλοβόλα δέντρα και θάμνους, τα οποία φτάνουν τα 4-25 μέτρα ύψος. Τα φύλλα σχηματίζονται από 7-21 οβάλ φυλλάρια. Τα λουλούδια είναι λευκά ή ροζ ενώ, πολλά είδη έχουν ακανθώδεις βλαστούς, και μερικά κολλώδη τριχίδια επί των βλαστών. Το γένος πήρε το όνομά του από το βασιλικό γάλλο κηπουρό “Jean Robin” και τον γιο του “Vespasien Robin”, οι οποίοι εισήγαγαν το γένος στην Ευρώπη το 1601.



Εικόνα 32 Σχηματική απεικόνιση της ταξινομικής κατάταξης του είδους *Robinia pseudoacacia*

Ο αριθμός των ειδών του γένους *Robinia* αμφισβητείται μεταξύ των συστηματικών βοτανικών, με τέσσερα μόνο αναγνωρισμένα είδη από ορισμένους συγγραφείς, ενώ άλλοι αναγνωρίζουν μέχρι και δέκα είδη. Αρκετά φυσικά υβρίδια είναι επίσης γνωστά. (Isely and Peabody, 1984) Το είδος *Robinia pseudoacacia* είναι ένα δέντρο πολλαπλών χρήσεων, ενδημικό στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ, το οποίο έχει εισαχθεί σε πολλές χώρες παγκοσμίως. Το είδος *R. pseudoacacia* είναι μεταξύ των λίγων δέντρων της οικογένειας Fabaceae που ρυθμίζουν τη δέσμευση αζώτου, προσαρμοσμένα σε περιοχές επιρρεπείς στον παγετό. Παρουσιάζει επίσης προσαρμοστικότητα σε ακραία περιβάλλοντα, όπως η ξηρασία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και οι υψηλές εντάσεις φωτός. Είναι ευρέως γνωστό για την ταχεία ανάπτυξή του, την προσαρμοστικότητά του και την καλή ποιότητα ξυλείας του. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη διακοσμητική του αξία, δεδομένου ότι φέρει λευκά, αρωματικά άνθη. Το βαθύ, εκτεταμένο ριζικό του σύστημα, επιτρέπει την ανάπτυξή του σε μεγάλη ποικιλία εδαφών αλλά όχι σε πολύ αμμώδη, πολύ όξινα ή υγρά εδάφη. (Kanwar et al., 2007)

Το είδος *Robinia pseudoacacia* είναι ένα μεσαίου μεγέθους, φυλλοβόλο δέντρο. Το ώριμο δέντρο *Robinia pseudoacacia* κυμαίνεται σε ύψος 12-18 μέτρα, ενώ μεγαλώνει γρήγορα, φτάνοντας στα προαναφερθέντα ύψη σε 20 έως 40 χρόνια. Η ακακία είναι βραχύβια, με τη

μείωση του δέντρου να αρχίζει σε ηλικία 40 ετών και σπάνια παρατηρείται υπέρβαση των 100 χρόνων ζωής. Ο φλοιός είναι πάχους 2.5-4.0 cm, τραχείας και βαθιάς αυλάκωσης, κοκκινωπού-καστανού έως σκούρου γκριζού χρώματος. Οι νεαροί βλαστοί είναι λείοι, πορφυρού-καφέ χρώματος. Οι ρίζες της *Robinia pseudoacacia* είναι συνήθως ρηχές, ινώδεις και ευρέως διαδεδομένες, αλλά μπορούν να σχηματίζονται και βαθιές ρίζες έως και 8 μέτρων σε ξηρά εδάφη. Η εξάπλωση της ακτινικής ρίζας είναι συνήθως 1 έως 1,5 φορές το ύψος του δέντρου. Τα φύλλα είναι μήκους 10-15 cm, ο μίσχος διογκώνεται στη βάση ενώ τα φυλλάρια είναι 9-19 ωοειδή ή ελλειπτικά και μήκους 2.5-5.0 cm. Η ταξιανθία είναι ένας μεγάλος, λευκός, πολύ αρωματικός, κρεμαστός βότρυς μήκους έως 20 cm επί των βλαστών του τρέχοντος έτους. Ο καρπός είναι πεπλατυσμένος μήκους 5-10 cm και ανοίγει ενώ βρίσκεται ακόμα στο δέντρο. (Kanwar et al., 2007)



Εικόνα 33 *Robinia pseudoacacia* δέντρο και ταξιανθία (Sitzia et al., 2016)

3.1.2 Δευτερογενείς Μεταβολίτες του είδους *R. pseudoacacia*

Αν και το ξύλο δρυός αποτελεί το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο υλικό στη βαρελοποιία, άλλα είδη όπως η καστανιά (*Castanea sativa*), η κερασιά (*Prunus avium*), η ακακία (*Robinia pseudoacacia*) και, πιο σπάνια, η τέφρα (*Fraxinus excelsior* και *Fraxinus vulgaris*) και η μουριά (*Morus alba* και *Morus nigra*) θεωρούνται ως πιθανές πηγές ξύλου, για την παλαίωση τόσο των οίνων όσο και των παράγωγων προϊόντων τους, όπως το ξύδι, ο μηλίτης και τα οινοπνευματώδη ποτά.

Η αξιολόγηση της επίδρασης των προαναφερόμενων ξύλων (εκτός της δρυός) επί της χημικής σύνθεσης και των αισθητικών ιδιοτήτων των παλαιωμένων ποτών, δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί. Απαραίτητη συνεπώς καθίσταται η συγκέντρωση περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τη χημική τους σύνθεση, τις μηχανικές ιδιότητές τους και τις

μεταβολές που υφίστανται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους. Σχετικά πρόσφατα, έχουν δημοσιευθεί ορισμένα άρθρα σχετικά με τη σύνθεση ξύλων εκτός της δρυός, που χρησιμοποιούνται στη βαρελοποιία. (Sanz et al., 2012)

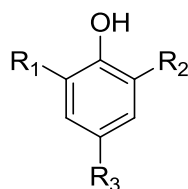
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε το φυτοχημικό προφίλ του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου (υπό μορφή chips) του φυτού *Robinia pseudoacacia*, σε μία προσπάθεια διερεύνησης της συνεισφοράς του στον οίνο, κατά τη χρήση του στη βαρελοποιία. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες ανά χημική κατηγορία, οι οποίοι περιέχονται στο ξύλο της ακακίας (*Robinia pseudoacacia*), παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω, ενώ επισημαίνεται και η συνεισφορά τους στη γεύση και στο άρωμα του οίνου, κατά την παλαίωσή του σε βαρέλια κατασκευασμένα από ξύλο *Robinia pseudoacacia* ή κατά τον αρωματισμό του με “chips” ξύλου ακακίας.

3.1.2.1 Απλά Φαινολικά συστατικά

Η οδός βιοσύνθεσης των πολυφαινολικών συστατικών και η συνεισφορά τους στη γεύση και στο άρωμα του οίνου (που ωριμάζει σε επαφή με “chips” ξύλου ακακίας) έχουν περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 2.1.2.1. Στο παρόν υποκεφάλαιο, ιδιαίτερη αναφορά θα γίνει στην οδό βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών και των στιλβενίων, καθώς οι συγκεκριμένες βιοσυνθετικοί οδοί δεν έχουν αναλυθεί παραπάνω. Στις εικόνες που ακολουθούν, τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

3.1.2.1.1 Απλά πτητικά φαινολικά συστατικά

Τα απλά πτητικά φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* παρατίθενται κατωτέρω:



Εικόνα 34 Βασικός σκελετός απλών πτητικών φαινολικών συστατικών

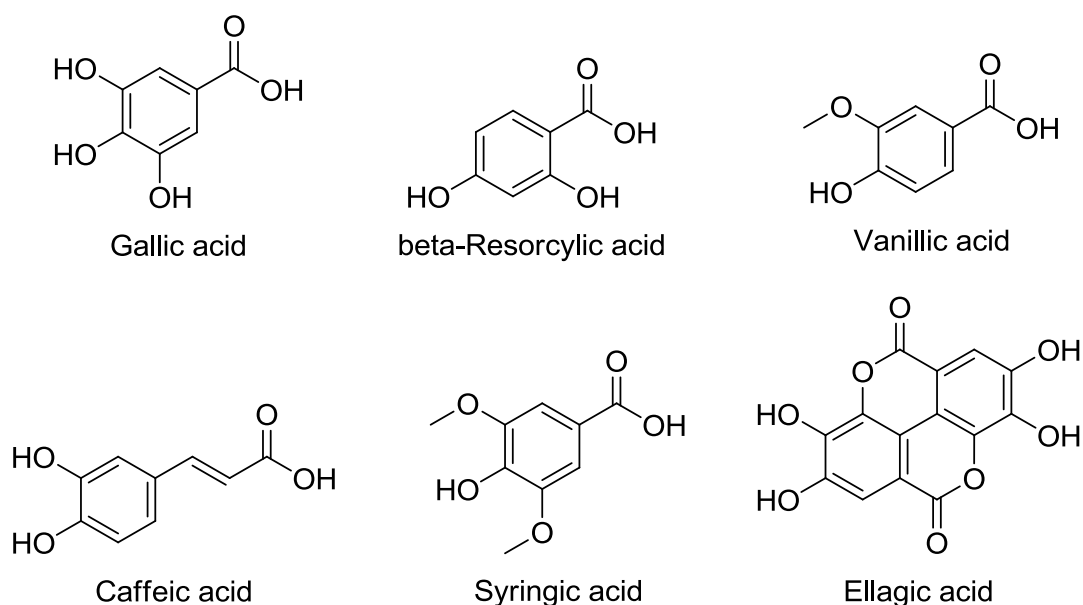
Πίνακας 13 Απλά πτητικά φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

Απλό πτητικό φαινολικό συστατικό	R ₁	R ₂	R ₃	Βιβλιογραφία
Φαινόλη	H	H	H	(De Símon et al., 2009)
Γουαϊακόλη	OCH ₃	H	H	(De Símon et al., 2009)

4-Μεθυλογοουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Αιθυλογοουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Προπυλογοουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Βινυλογοουαϊακόλη	OCH ₃	H	CH=CH ₂	(De Símon et al., 2009)
Ευγενόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH=CH ₂	(De Símon et al., 2009)
Ισοευγενόλη	OCH ₃	H	CH=CHCH ₃	(De Símon et al., 2009)
Συριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	H	(De Símon et al., 2009)
4-Μεθυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Αιθυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Προπυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(De Símon et al., 2009)
4-Αλλυλοσυριγγόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH ₂ CH=CH ₂	(De Símon et al., 2009)
Κατεχόλη	OH	H	H	(De Símon et al., 2009)
3-Μεθυλοκατεχόλη	OH	CH ₃	H	(De Símon et al., 2009)
4-Μεθυλοκατεχόλη	H	OH	CH ₃	(De Símon et al., 2009)
<i>cis-or trans</i> -2,6-Διμεθοξυ-4-(1-προπενυλο)φαινόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH=CHCH ₃	(De Símon et al., 2009)
Βανιλική αλκοόλη	OCH ₃	H	CH ₂ OH	(De Símon et al., 2009)
Ομοβανιλική αλκοόλη	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₂ OH	(De Símon et al., 2009)
Διϋδροσιναπυλική αλκοόλη	OCH ₃	OCH ₃	CH=CHCH ₂ OH	(De Símon et al., 2009)
Βανιλικός αιθυλαιθέρας	H	OCH ₃	CH ₂ O CH ₂ CH ₃	(De Símon et al., 2009)

3.1.2.1.2 Φαινολικά οξέα

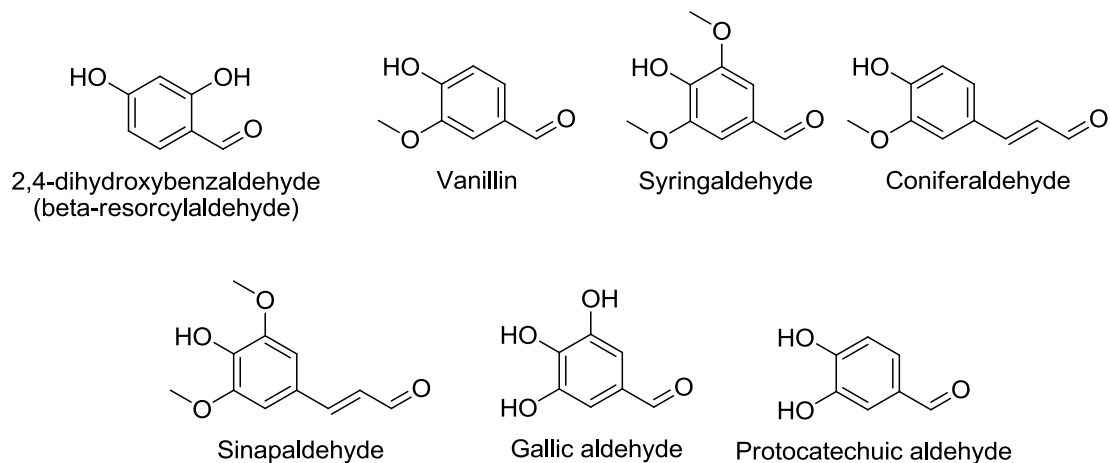
Τα φαινολικά οξέα που περιέχονται στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* παρατίθενται κατωτέρω:



Εικόνα 35 Φαινολικά οξέα που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia* (Sanz et al., 2012)

3.1.2.1.3 Φαινολικές αλδεΐδες

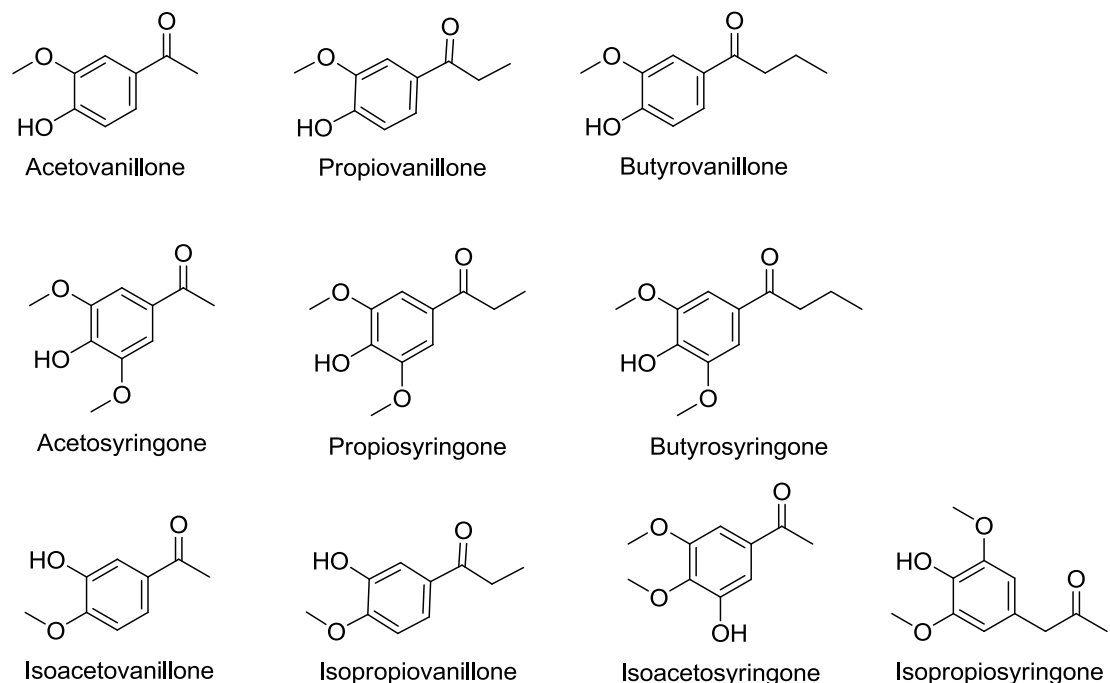
Οι φαινολικές αλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* παρατίθενται κατωτέρω:



Εικόνα 36 Φαινολικές αλδεΐδες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia* (De Sión et al., 2009)

3.1.2.1.4 Φαινολικές κετόνες

Οι φαινολικές κετόνες που περιέχονται στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* παρατίθενται κατωτέρω:

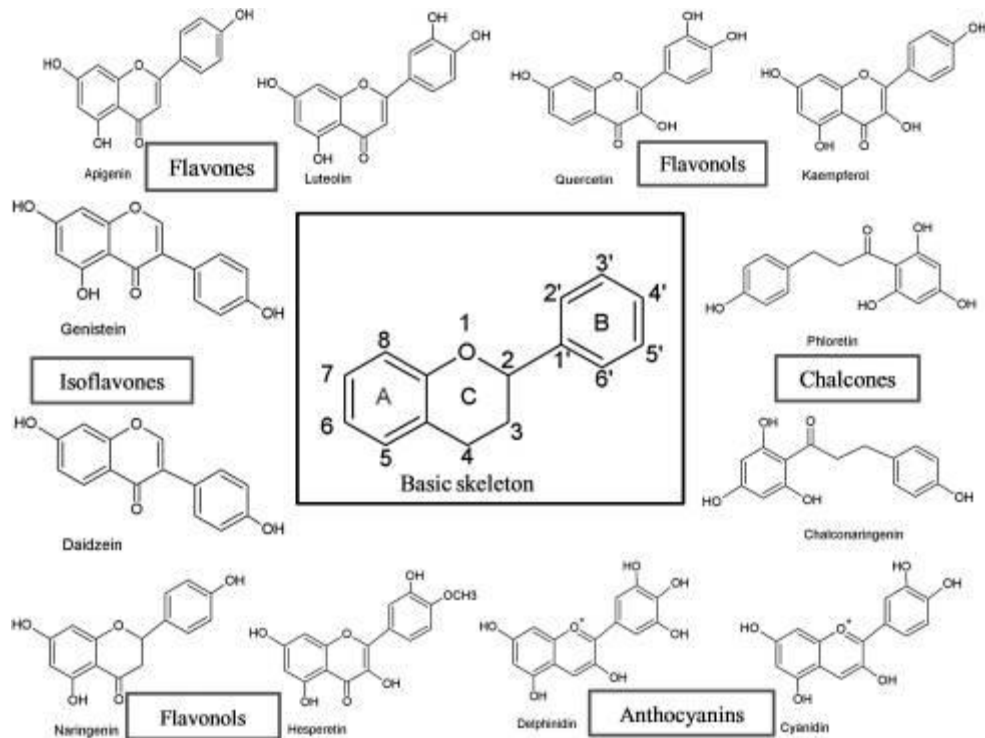


Εικόνα 37 Φαινολικές κετόνες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia* (De Sión et al., 2009)

3.1.2.2 Φλαβονοειδή

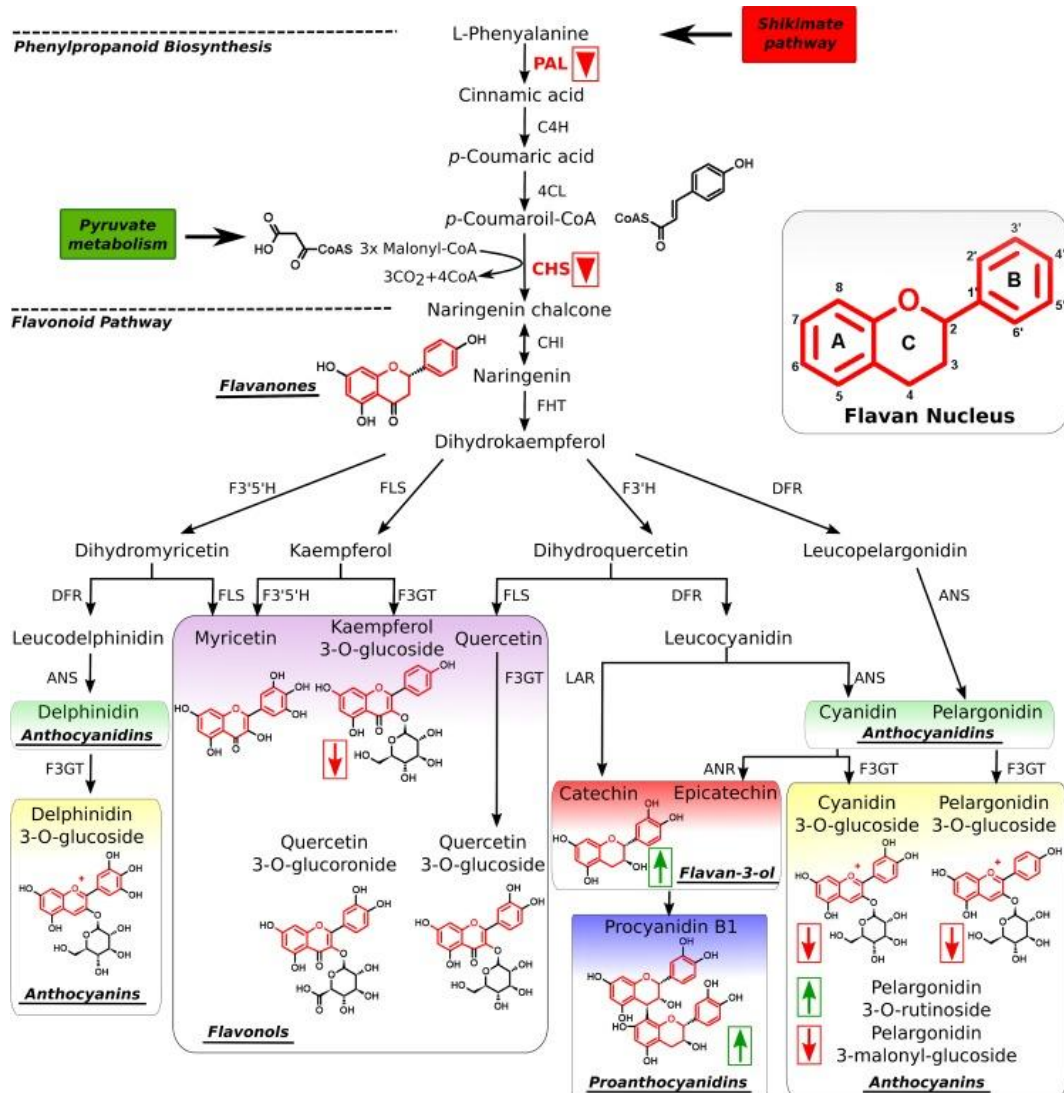
Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια σημαντική κατηγορία φυσικών προϊόντων, τα οποία ανήκουν στις πολυφαινόλες. Στη φύση, τα φλαβονοειδή απαντώνται σε διάφορα μέρη του φυτού και χρησιμεύουν σε αυτά για την ανάπτυξη και την άμυνά τους. Αποτελούν μία από τις χαρακτηριστικότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στα ανώτερα φυτά. Πολλά φλαβονοειδή αναγνωρίζονται εύκολα ως χρωστικές λουλουδιών στις περισσότερες οικογένειες Αγγειόσπερμων. Ωστόσο, η εμφάνισή τους δεν περιορίζεται στα λουλούδια, αλλά παρατηρείται σε όλα τα μέρη των φυτών. Τα φλαβονοειδή βρίσκονται επίσης άφθονα σε τρόφιμα και εκχυλίσματα ή ποτά φυτικής προέλευσης, όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι, κακάο και κρασί.

Τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές υποκατηγορίες, βάσει του άνθρακα του C δακτυλίου στον οποίο προσκολλάται ο B δακτύλιος και βάσει του βαθμού ακορεστότητας και οξειδωσης του C δακτυλίου. Τα φλαβονοειδή στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται στη θέση 3 του C δακτυλίου καλούνται ισοφλαβόνες. Τα φλαβονοειδή στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται στη θέση 4 καλούνται νεοφλαβονοειδή, ενώ αυτά στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται στη θέση 2 μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε υποκατηγορίες, βάσει των δομικών χαρακτηριστικών του δακτυλίου C. Αυτές οι υποκατηγορίες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι φλαβανόλες ή κατεχίνες, οι ανθοκυανιδίνες και οι χαλκόνες, κατηγορίες οι οποίες φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. (Panche et al., 2016)



Εικόνα 38 Βασικές κατηγορίες φλαβονοειδών (Panche et al., 2016)

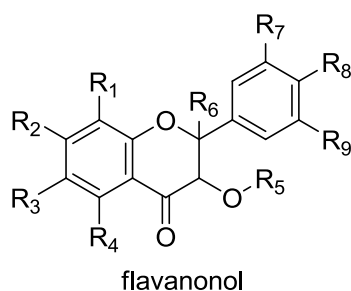
Τα φλαβονοειδή συντίθενται μέσω της οδού των φαινυλοπροπανοειδών, με τη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε 4-κουμαροϋλοσυνένζυμο Α, το οποίο και τελικά εισέρχεται στην οδό βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών. Το πρώτο ένζυμο στη βιοσυνθετική οδό των φλαβονοειδών, η συνθάση της χαλκόνης, συντελεί στο σχηματισμό του σκελετού της χαλκόνης από τον οποίο προκύπτουν όλα τα άλλα φλαβονοειδή. Αν και η κεντρική οδός για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών έχει διατηρηθεί στα φυτά, ανάλογα με το φυτικό είδος, ομάδες ενζύμων, όπως οι ισομεράσες, οι αναγωγάσες, οι υδροξυλάσες και αρκετές εξαρτώμενες από το Fe^{2+} 2-οξογλουταρικό διοξυγενάσες, τροποποιούν το βασικό σκελετό των φλαβονοειδών, δημιουργώντας τις διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών. Καταληκτικά, οι τρανσφεράσες συμβάλουν στην προσθήκη σακχάρων, μεθυλίων και ακυλομάδων στο βασικό σκελετό του φλαβονοειδούς, τροποποιώντας τη φυσιολογική δραστηριότητα του προκύπτοντος φλαβονοειδούς και μεταβάλλοντας τη διαλυτότητα και την ικανότητα αλληλεπίδρασής του με κυτταρικούς στόχους. (Falcone Ferreyra et al., 2012)



Εικόνα 39 Σχηματική απεικόνιση της οδού βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών (Casañal et al., 2013)

Τα περιεχόμενα στο ξύλο του *Robinia pseudoacacia*, φλαβονοειδή παρατίθενται στα υποκεφάλαια που ακολουθούν.

3.1.2.2.1 Φλαβανονόλες



Εικόνα 40 Βασικός σκελετός φλαβανονόλης

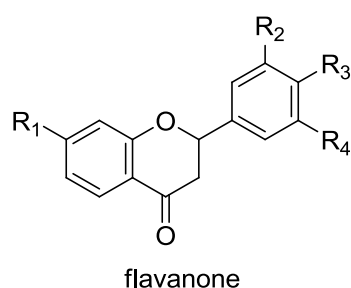
Πίνακας 14 Φλαβανονόλες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

Φλαβανονόλη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	Βιβλιογραφία
dihydrorobinetin	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
fustin	H	OH	H	H	H	H	OH	OH	H	(Sanz et al., 2012)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

Εκτός από τις παραπάνω ουσίες, σύμφωνα με τους Sanz *et al.*, 2012, εντοπίστηκαν στο ξύλο του *R. pseudoacacia* με LC-MS/MS (dereplication) και οι μεταβολίτες pentahydroxydihydroflavonol, tetrahydroxydihydroflavonol, trihydroxydihydroflavonol, και trihydroxymethoxydihydroflavonol.

3.1.2.2.2 Φλαβανόνες



Εικόνα 41 Βασικός σκελετός φλαβανόνης

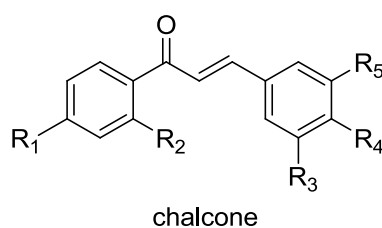
Πίνακας 15 Φλαβανόνες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

Φλαβανόνη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Βιβλιογραφία
robtin	OH	OH	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
butin	OH	H	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
liquiritigenin	OH	H	OH	H	(Sanz et al., 2012)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

3.1.2.2.3 Χαλκόνες

Οι χαλκόνες ή 1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνες είναι μία από τις σημαντικότερες υποκατηγορίες φλαβονοειδών σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο. Οι χαλκόνες βρίσκονται σε μορφή ανοικτής αλυσίδας, αποτελούν πρόδρομες ουσίες για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών και το χρώμα τους ποικίλλει από κίτρινο ως πορτοκαλί. (Gomes et al., 2017) Τα φυτά στα οποία εντοπίζονται χαλκόνες έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική, με τις χαλκόνες να έχουν μελετηθεί και περιγραφεί για πολλές ευεργετικές βιολογικές δράσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι χαλκόνες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιασική, αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση. (Rozmer and Perjési, 2016)



Εικόνα 42 Βασικός σκελετός χαλκόνης

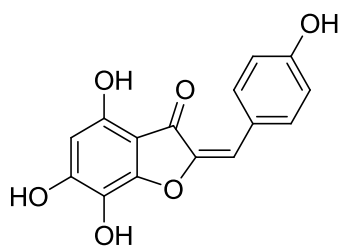
Πίνακας 16 Χαλκόνες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

Χαλκόνη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Βιβλιογραφία
robtein	OH	OH	OH	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
butein	OH	OH	H	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
isoliquiritigenin	OH	OH	H	OH	H	(Sanz et al., 2012)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

3.1.2.2.4 Αουρόνες

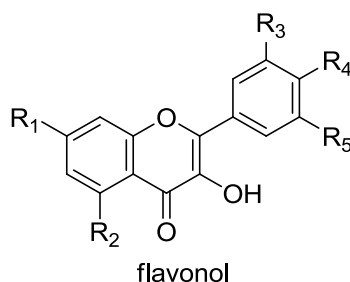
Οι αουρόνες είναι είτε φυσικές είτε συνθετικές ενώσεις, που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Αποτελούν ισομερή των φλαβονων και προσδίδουν λαμπερό κίτρινο χρώμα στα φυτά στα οποία εμφανίζονται. Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν ευρεία ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως αντιμυκητιασικές, εντομοκτόνες, ανασταλτικές επί της τυροσινάσης και αντιοξειδωτικές. (Zwergel et al., 2012)



4,7,4',6-Tetrahydroxyaurone

Εικόνα 43 Δομή της 4,7,4',6-tetrahydroxyaurone, που περιέχεται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia* (Sanz et al., 2012)

3.1.2.2.5 Φλαβονόλες



Εικόνα 44 Βασικός σκελετός φλαβονόλης

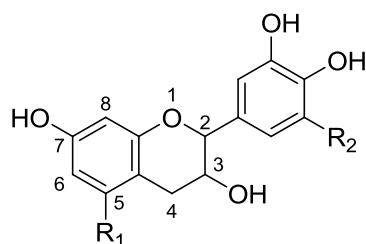
Πίνακας 17 Φλαβονόλες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

Φλαβονόλη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Βιβλιογραφία
robinetin	OH	H	OH	OH	OH	(Sanz et al., 2012)
fisetin	OH	H	H	OH	OH	(Sanz et al., 2012)

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

3.1.2.3 Συμπυκνωμένες ταννίνες

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες όπως εναλλακτικά καλούνται, αποτελούν μία κατηγορία πολυ-υδροξυλιωμένων ολιγομερών φλαβαν-3-όλης και πολυμερών που προκύπτουν από τη σύνδεση μεταξύ των υποομάδων φλαβανόλης, με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Οι πολλαπλές ομάδες φαινολικών υδροξυλίων των συμπυκνωμένων ταννινών οδηγούν στη συμπλοκοποίησή τους με πρωτεΐνες, με μεταλλικά ιόντα και με άλλα μακρομόρια όπως οι πολυσακχαρίτες. Κατά αυτόν τον τρόπο, αλληλεπιδρώντας με μόρια βιολογικής σημασίας, οι συμπυκνωμένες ταννίνες παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες προκύπτουν από την επαναλαμβανόμενη βασική δομή της προανθοκυανιδίνης, της προδελφινιδίνης, της προφισετινιδίνης και της προρομπινετινιδίνης βάσει της διαφορετικής υποκατάστασης, όπως φαίνεται στο κατωτέρω σχήμα.



Εικόνα 45 Βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα του σκελετού των συμπυκνωμένων ταννινών

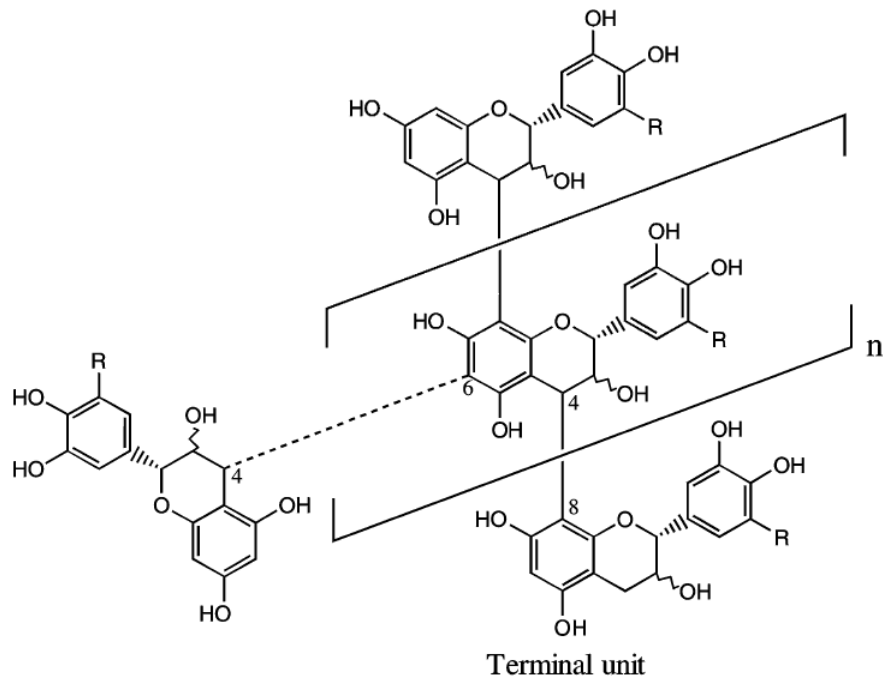
Πίνακας 18 Κατηγορίες συμπυκνωμένων ταννινών βάσει της διαφορετικής υποκατάστασης στις θέσεις R_1 και R_2

Κατηγορία συμπυκνωμένης ταννίνης	R_1	R_2
proanthocyanidin	OH	H
prodelphinidin	OH	OH
profisetinidin	H	H
prorobinetinidin	H	OH

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

Να σημειωθεί ότι σε περίπτωση που $R_1=OH$ και $R_2=H$, τότε η ανωτέρω δομή καθίσταται η δομή της επικατεχίνης. Οι υποκαταστάτες R_1 και R_2 για τις άλλες κατηγορίες πρόδρομων ενώσεων των συμπυκνωμένων ταννινών εμφανίζονται στον πίνακα κάτω από τη δομή.

Η οξειδωτική σύζευξη μεταξύ των μονομερών φλαβανόλης προς σχηματισμό των πολυμερών των ταννινών γίνεται συνηθέστερα μεταξύ των θέσεων 4 και 8, αλλά και μεταξύ των θέσεων 4 και 6 των μονομερών. Αν και ο συνολικός αριθμός των μονομερών φλαβανολών στις εκχυλιζόμενες ταννίνες είναι συνήθως 2-17, υψηλότερος βαθμός πολυμερισμού υπάρχει, οδηγώντας ωστόσο σε αδιάλυτα και δύσκολα μελετώμενα πολυμερή. (Schofield et al., 2001)



Εικόνα 46 Μοντέλο της δομής συμπυκνωμένης ταννίνης. Η σύνδεση μεταξύ των θέσεων 4 και 6 με τη στικτή γραμμή αποτελεί εναλλακτικό δεσμό μεταξύ φλαβανών. Η τελική μονάδα είναι στο τέλος του πολυμερούς. (Schofield et al., 2001)

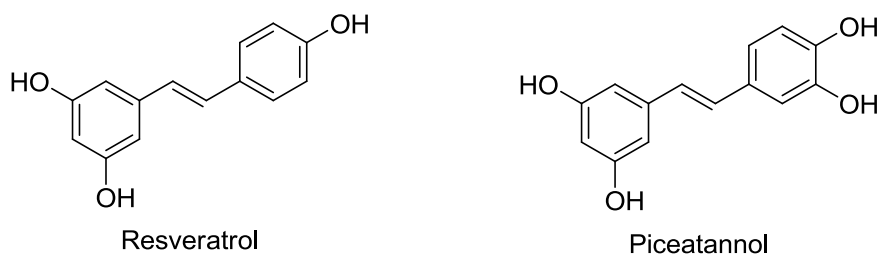
Στο ξύλο του είδους *Robinia pseudoacacia*, περιέχονται συμπυκνωμένες ταννίνες τύπου προρομπινετινιδίνης (προρομπινετίνες). Οι προρομπινετίνες που εντοπίστηκαν στην ακάπνιστη ακακία ήταν ευαίσθητες στη θερμική επεξεργασία, όπως διαπιστώθηκε από τη μείωση της συγκέντρωσή τους κατά το σημαντικό ποσοστό της τάξης του 70% στα ελαφρώς ψημένα ξύλα. (Sanz et al., 2012)

3.1.2.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι βιολογικώς δραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε διάφορες οικογένειες αγγειοσπέρμων, όπως στις οικογένειες Vitaceae, Fabaceae και Rosaceae. Επίσης, είναι παρόντα και στο ξύλο, στο φλοιό και στα φύλλα ενός περιορισμένου αριθμού δέντρων, κυρίως στα Γυμνόσπερμα, όπως τα πεύκα και τα έλατα (Pinaceae). Παράγονται είτε κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του κορμού, είτε σε απόκριση σε μόλυνση ή τραυματισμό και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται ως φυτοαλεξίνες. Τα στιλβένια παρουσιάζουν υψηλές μυκητοστατικές και μυκητοτοξικές ιδιότητες και είναι γνωστά ως ουσίες με αντιβιοτική δράση. Μάλιστα, η συσσώρευση στιλβενίων στο κορμό του δέντρου έχει συχνά προταθεί ως μηχανισμός ανθεκτικότητας του κορμού στην αποσύνθεση και σχετίζεται με την αντοχή του ξύλου. (Sergent et al., 2014)

Τα στυλβένια χαρακτηρίζονται δομικά από την παρουσία ενός πυρήνα 1,2-διφαινυλοαιθυλενίου και προέρχονται από το γενική βιοσυνθετική οδό των φαινυλοπροπανοειδών. Η βιοσύνθεση των στυλβενίων και άλλων φαινυλοπροπανοειδών ξεκινά από τη σύνθεση του *trans*-κινναμωμικού οξέος ή του παραγώγου του, του π-κουμαρικού οξέος από τα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, αντίστοιχα. Η συνθάση των στυλβενίων καταλύει τον άμεσο σχηματισμό του σκελετού του στυλβενίου από τρεις μονάδες μαλονυλοσυνενζύμου A, αλλά και μία μονάδα εστεροποιημένου συνενζύμου A ενός παραγώγου κινναμωμικού οξέος. Τα περισσότερα στυλβένια στα φυτά είναι παράγωγα των μονομερών στυλβενίων ρεσβερατρόλης, πινοσυλβίνης και πικεαταννόλης. (Dubrovina and Kiselev, 2017)

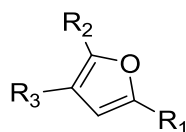
Στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* περιέχονται τα στυλβένια ρεσβερατρόλη και πικεαταννόλη και μάλιστα σε υψηλότερη περιεκτικότητα στο ώριμο ξύλο. (Sergent et al., 2014)



Εικόνα 47 Δομή των στυλβενίων ρεσβερατρόλη και πικεαταννόλη

3.1.2.5 Φουρανικά Παράγωγα

Στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* τα κύρια ανιχνεύσιμα φουρανικά παράγωγα παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:



Εικόνα 48 Βασικός σκελετός φουρανίου

Πίνακας 19 Φουρανικά παράγωγα που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia*

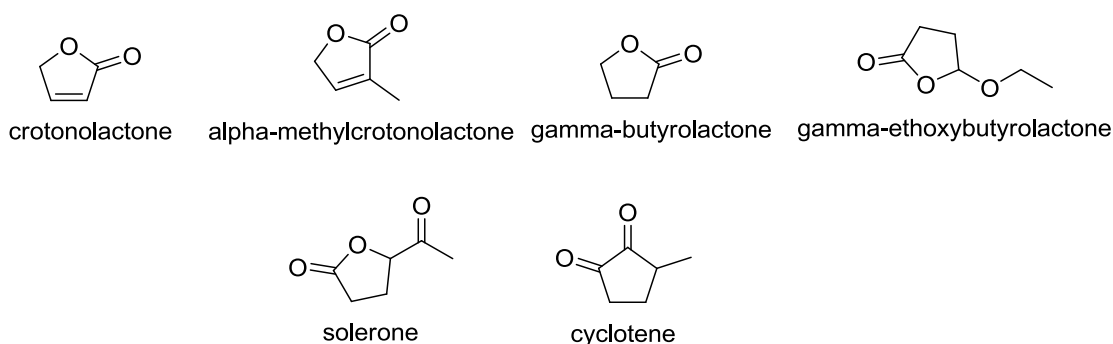
Φουρανικό Παράγωγο	R ₁	R ₂	R ₃	Βιβλιογραφία
furfural	CHO	H	H	(De Simón et al., 2009)
1-(2-furanyl)ethanone	C=OCH ₃	H	H	(De Simón et al., 2009)
5-methylfurfural	CHO	CH ₃	H	(De Simón et al., 2009)
furandicarboxyaldehyde	H	CHO	CHO	(De Simón et al., 2009)
2-furanmethanol	CH ₂ OH	H	H	(De Simón et al., 2009)
5-hydroxymethylfurfural	CHO	CH ₂ OH	H	(De Simón et al., 2009)
methyl-2-furoate	H	COOH	CH ₃	(De Simón et al., 2009)

5-acetoxymethyl-2-furfural	CHO	CH ₂ OCOCH ₃	H	(De Simón et al., 2009)
----------------------------	-----	------------------------------------	---	-------------------------

*Τα ονόματα των δευτερογενών μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρατίθενται στη βιβλιογραφία.

3.1.2.6 Λακτόνες

Στο ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* οι κύριες ανιχνεύσιμες λακτόνες παρατίθενται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 49 Λακτόνες που περιέχονται στο ξύλο του φυτικού είδους *R. pseudoacacia* (De Simón et al., 2009)

3.1.3 Επίδραση του ψησίματος στο φυτοχημικό προφίλ του ξύλου του είδους *Robinia pseudoacacia*

Το μη ψημένο ξύλο ακακίας περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών και χαμηλά επίπεδα μη φλαβονοειδών ενώσεων, με τις κύριες ενώσεις φλαβονοειδών να είναι οι διυδροφλαβονόλες διυδρορομπινετίνη, φουστίνη, τετραϋδροξυ και τριυδροξυμεθοξυ διυδροφλαβονόλη, η φλαβονόλη ρομπινετίνη και οι φλαβανόνες ρομπτίνη και μπουτίνη, από τις οποίες καμία δεν εντοπίζεται σε ξύλο δρυός. Οι χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) φαινολικές ενώσεις που είναι παρούσες στο ξύλο ακακίας, επίσης διέφεραν από αυτές που εντοπίζονται στο ξύλο δρυός, δεδομένου ότι οι ενώσεις με μια β-ρεσορκυλική δομή, τα παράγωγα του γαλλικού, η πρωτοκατεχική αλδεΐδη και μερικές υδροξυκιναμωμικές ενώσεις περιλαμβάνονται στο ξύλο ακακίας, αλλά απαντώνται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ. Ο βαθμός ψησίματος αλλάζει σημαντικά το φυτοχημικό προφίλ του ξύλου ακακίας. Πιο συγκεκριμένα, το ψημένο ξύλο ακακίας περιλαμβάνει φλαβονοειδή και συμπυκνωμένες ταννίνες (τύπου προρομπινετίνης) σε ποσοστό αντιστρόφως ανάλογο προς το βαθμό ψησίματος, ενώ οι χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικές ενώσεις εμφανίζονται σε ποσοστό ευθέως ανάλογο προς το βαθμό ψησίματος, εκτός από το γαλλικό οξύ, το ελλαγικό οξύ και τις συναφείς τους ενώσεις. Αν και επιδιώκεται η μείωση των διαφορών μεταξύ δρυός και ακακίας μέσω της επεξεργασίας του ξύλου με τη

διεργασία του ψησίματος, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ιδιαίτερα τα χαρακτηριστικά του ξύλου ακακίας όταν χρησιμοποιείται στη βαρελοποιία και στον αρωματισμό του οίνου, με κυρίαρχα την παρουσία флаβονοειδών, ενώσεων με β-ρεσορκυλική δομή και συμπυκνωμένων ταννινών. (Sanz et al., 2011)

3.1.4 Φαρμακολογικές Δράσεις του είδους *R. pseudoacacia*

Το είδος *Robinia pseudoacacia* έχει χρησιμοποιηθεί για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες από την αρχαιότητα. Τα εκχυλίσματα του είδους *R. pseudoacacia* είναι γνωστά για τις φαρμακευτικές χρήσεις τους αλλά και τις τοξικές τους επιδράσεις. Τα φύλλα του *R. pseudoacacia* περιέχουν ταννίνες ενώ, οι φαινολικές ενώσεις και ειδικά τα περιεχόμενα флаβονοειδή, στο ξύλο, στο φλοιό και στα φύλλα του φυτού θεωρείται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική δραστηριότητά του. (Hosseinihashemi et al., 2016)

Το φυτό *R. pseudoacacia* περιέχει τα флаβονοειδή robinin (kaempferol-3-O-rhamnosyl-galactosyl-7-O-rhamnoside), acacetin-7-O-rutoside, apigenin, diosmetin, luteolin, secundiflorol, mucronulatol, isomucronulatol και isovestitol, Οι προαναφερόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν διάφορες ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξεινών, αντιβακτηριδιακών, αντιμυκητησιακών, καθαρικών και εμμηναγωγών. (Jayanta et al., 2015)

Ο φλοιός της *Robinia pseudoacacia* παρουσιάζει εξαιρετική αντίσταση στη βιοαποικοδόμηση, ιδιότητα η οποία οφείλεται στην περιεκτικότητά του φλοιού σε διϋδρορομπινετίνη και σε ρομπινετίνη. Τα εκχυλίσματα του φλοιού και των φύλλων είναι δραστικά έναντι των μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella choleraesuis* και *Candida albicans*. (Hosseinihashemi et al., 2016)

Εκχυλίσματα του ξύλου ακακίας έχουν παρουσιάσει μυκητοκτόνο δράση, ενώ συγχρόνως συνιστούν και εξαιρετικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες, εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους και πάλι στα флаβονοειδή διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη, αλλά και στα στυλβένια, ρεσβερατρόλη και πικεατανόλη, τα οποία έχουν αντιμυκητησιακή δράση. Να σημειωθεί ότι τα περιεχόμενα στο ξύλο ακακίας λιγνάνια και ολιγολιγνάνια αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες και παράγοντες εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, αλλά παρουσιάζουν μικρή αντιμικροβιακή δράση. (Sergent et al., 2014)

Τα εκχυλίσματα των ανθέων και των σπόρων, είναι αποτελεσματικοί αντιβακτηριδιακοί παράγοντες για τους Gram θετικούς κόκκους ενώ, η περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες

τα καθιστά ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Τα άνθη του είδους *Robinia pseudoacacia* σε μορφή αφεψήματος ή εγχύματος, χρησιμοποιούνται στη λαϊκή θεραπευτική για τις αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντισηπτικές ιδιότητές τους, ενώ συγχρόνως χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση του γαστρικού έλκους και της γαστρίτιδας. (Tita et al., 2009)

Σε μια άλλη μελέτη, τα μεθανολικά και ειδικότερα τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα των ριζών του είδους *Robinia pseudoacacia* αποδείχτηκαν δραστικά έναντι του ανθρώπινου καρκίνου στο κόλον (LoVo), έναντι του καρκίνου του προστάτη (PC3) και της κυτταρικής σειράς γλοιοβλαστώματος (U373). Η αντικαρκινική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος οφείλεται στην παρουσία κυτταροτοξικών λεκτινών. Η δραστηριότητα του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα δε μπορεί να αποδοθεί στις λεκτίνες αλλά πιθανότατα σε φλαβονοειδή, απομονωμένα από αιθανολικά εκχυλίσματα, στο παρελθόν. (Frédérich et al., 2009b)

3.1.5 Χρήσεις ξύλου του είδους *R. pseudoacacia*

Το ξύλο ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia* είναι ισχυρό και σκληρό και αποτελεί καλή καύσιμη ύλη. Η ενεργειακή απόδοση από την καύση του συγκεκριμένου ξύλου είναι χαρακτηριστική των πλατύφυλλων δέντρων της εύκρατης ζώνης, περίπου $19.44 * 10^6$ J / kg. Το ξύλο ακακίας φωτεινού έως σκούρου καφέ χρώματος χρησιμοποιείται στην κατασκευή ξύλινων επενδύσεων και πλαισίων, στην κατασκευή δαπέδων και επίπλων, στην κατασκευή πλοίων και καταστρωμάτων και πρόσφατα στη βαρελοποιία. (Kanwar et al., 2007) Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να επισημανθεί ότι το είδος *Robinia pseudoacacia* έχει έντονα ενθαρρυνθεί ως δασικό δέντρο στην Ευρώπη. Το ξύλο της ακακίας είναι ανθεκτικό στη βλαστική σήψη (stem rot), ασθένεια που προκαλείται από προσβολή του βλαστού από συγκεκριμένους μύκητες (*Rhizoctonia*, *Fusarium* και *Pythium*) και συγχρόνως, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην προσβολή από έντομα. (Sitzia et al., 2016)

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφονται συνοπτικά τα υλικά, οι μέθοδοι και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

4 Φυτικό Υλικό

4.1 “Chips” Ξύλου Δρυός και Ακακίας

Οι πρώτες ύλες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελούν θραύσματα ξύλου των ειδών *Quercus robur* (Slavonian oak), *Quercus alba* (American oak), *Quercus petraea* (French oak) και *Robinia pseudoacacia*, τα οποία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα ως πρόσθετα για τον αρωματισμό του οίνου κατά την ωρίμανσή του. Τα θραύσματα ξύλου των τεσσάρων υπό μελέτη φυτικών ειδών διατέθηκαν υπό τη μορφή τσιπς (chips) μέτριου βαθμού ψησίματος (MT:Medium Toasted) από την εταιρεία Nadalié USA.



Εικόνα 50 Χαρακτηριστική εικόνα των “chips” Σλαβονικής Δρυός (*Q.robur*) (<http://www.oakaddins.com/en/produits/quel-produit-pour-quel-usage/>)

5 Τεχνικές Εκχύλισης

5.1 Συμβατική Εκχύλιση με Διαβροχή - (Maceration)

Η συμβατική εκχύλιση με διαβροχή της φυτικής δρόγης περιλαμβάνει πρωτογενώς την κονιοποίηση της δρόγης με στόχο την αύξηση της επιφάνειας επαφής της με το διαλύτη εκχύλισης και την παραμονή της με επαρκή ποσότητα του κατάλληλου διαλύτη, εντός σφραγισμένου περιέκτη. Αφού παρέλθει ο απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης, το υπερκείμενο εκχύλισμα συλλέγεται με διήθηση και το στερεό υπόλειμμα συμπιέζεται, για να ανακτηθεί η ποσότητα διαλύτη που είναι εγκλωβισμένη εντός της δρόγης, η οποία και προστίθεται στο υπερκείμενο εκχύλισμα. Το λαμβανόμενο συνολικό εκχύλισμα διηθείται εκ νέου προς απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων. Η περιστασιακή ανάδευση κατά τη διάρκεια της

εκχύλισης διευκολύνει τη διαδικασία παραλαβής των συστατικών του προς εκχύλιση υλικού. Πιο συγκεκριμένα, επιτυγχάνεται αύξηση της διάχυσης και συγχρόνως, απομάκρυνση του κορεσμένου διαλύματος από την επιφάνεια του εκχυλιζόμενου υλικού και ανανέωσή με νέο διαλύτη, προς εκχύλιση περισσότερων συστατικών από τη δρόγη. (Azmir et al., 2013)

Η συμβατική εκχύλιση με διαβροχή παρουσιάζει τα μειονεκτήματα της κατανάλωσης μεγαλύτερου όγκου διαλύτη εκχύλισης, της μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας για την εκχύλιση των περιεχόμενων στη δρόγη ενώσεων και της χαμηλότερης απόδοσης, σε σύγκριση με τις σύγχρονες και φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές. Τα μειονεκτήματα αυτά, σε συνδυασμό με τις αυξημένες απαιτήσεις στο ερευνητικό πεδίο της Χημείας Φυσικών Προϊόντων, δικαιολογούν την αναζήτηση εναλλακτικών μορφών εκχύλισης, όπως η Επιταχυνόμενη Εκχύλιση που θα αναλυθεί κατωτέρω. (Belwal et al., 2018)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για την εκτέλεση της συμβατικής εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκαν αιθανόλη (EtOH) (J. T. Baker) και απιονισμένο νερό (H₂O) (συσκευή Milli-Q®).

5.2 Υγρή-Υγρή Εκχύλιση - (Liquid-Liquid Extraction)

Η υγρή-υγρή εκχύλιση αποτελεί διαδικασία διαχωρισμού που συνίσταται στη μεταφορά των μορίων μιας διαλυμένης ουσίας από το ένα διαλυτικό μέσο στο άλλο, ενώ οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες να είναι μη αναμίξιμοι ή μερικώς αναμίξιμοι μεταξύ τους. Συχνά, ένας από τους διαλύτες είναι νερό ή ένα υδατικό μίγμα και ο άλλος είναι ένα μη πολικό μίγμα οργανικών διαλυτών. Όπως σε όλες τις διεργασίες εκχύλισης, η υγρή-υγρή εκχύλιση περιλαμβάνει ένα στάδιο ανάμιξης των διαλυτών ακολουθούμενο από ένα στάδιο διαχωρισμού των φάσεων. Είναι σημαντικό να συνεκτιμώνται και τα δύο βήματα για την ορθή επιλογή των διαλυτών. Η έντονη ανάμιξη είναι ευνοϊκή για τη μεταφορά του εκχυλίσμου συστατικού από τον έναν διαλύτη στον άλλο αλλά δύνανται να επηρεάσει την ευκολία διαχωρισμού των φάσεων με τη δημιουργία γαλακτωμάτων. Ισορροπία επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση της εκχυλίσιμης ουσίας στις δύο φάσεις παραμένει σταθερή και δε μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου. Η κατανομή μίας ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων σε ισορροπία εκφράζεται μέσω του συντελεστή κατανομής, που δίνεται από τη σχέση: $K_d = C_1/C_2$, όπου τα C₁ και C₂ είναι οι συγκεντρώσεις της διαλυμένης ουσίας στις δύο φάσεις, αντίστοιχα.

Η υγρή-υγρή εκχύλιση είναι μια σημαντική μέθοδος διαχωρισμού στο πεδίο της έρευνας και της χημικής ανάλυσης. Ως εμπορική διαδικασία, χρησιμοποιείται συχνά στη χημική και μεταλλευτική βιομηχανία και στην ανάκτηση προϊόντων ζύμωσης (αντιβιοτικά, αμινοξέα, στεροειδή). Οι εφαρμογές της τεχνικής αυτής σε τρόφιμα περιορίζονται σε μεμονωμένες περιπτώσεις, όπως η μεταφορά των καροτενοειδών χρωστικών από οργανικούς διαλύτες σε βρώσιμα έλαια. (Berk, 2013)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για την εκτέλεση της υγρής-υγρής εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες : επτάνιο (Heptane), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc), μεθυλο-tert-βουτυλαιθέρας (MtBE) και βουτανόλη (BuOH), της εταιρείας J. T. Baker.

5.3 Επιταχυνόμενη εκχύλιση – (Accelerated Solvent Extraction - ASE)

Η τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction-ASE) ή Εκχύλισης υπό Πίεση (Pressurized Liquid Extraction-PLE ή Pressurized Solvent Extraction-PSE) αποτελεί διαδικασία υγρής-στερεής εκχύλισης, κατά την οποία το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε δοχείο (κελί) εκχύλισης και η διαδικασία πραγματοποιείται σε αυξημένη θερμοκρασία (50–200 °C) και πίεση (10–15 MPa).

Η Επιταχυνόμενη Εκχύλιση εφαρμόζεται σε στερεά ή ημιστερεά δείγματα, που μπορούν να διατηρηθούν στο δοχείο (κελί) κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Με την παρούσα τεχνική, ο χρόνος εκχύλισης για δείγματα βάρους 1-30 g είναι μικρότερος από 15 min, και ο όγκος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη είναι 1.2 - 1.5 φορές ο όγκος του κελιού που περιέχει το δείγμα. (Richter et al., 1996)

Η διαδικασία της εκχύλισης συνοψίζεται στα κατωτέρω βήματα:

1. Πλήρωση του κελιού εκχύλισης με προζυγισμένο (ανάλογα με τη χωρητικότητα του κελιού) προς εκχύλιση υλικό
2. Τοποθέτηση των δοχείων εκχύλισης και συλλογής στους περιστρεφόμενους δίσκους της συσκευής ASE
3. Βάσει της δημιουργηθείσας μεθόδου, αυτοματοποιημένη μεταφορά του δοχείου εκχύλισης στον ειδικό κλίβανο και πλήρωση του δοχείου με διαλύτη (υπό πίεση 1500 psi)
4. Στατική εκχύλιση
5. Έκπλυση με φρέσκο διαλύτη για την παραλαβή του εναπομείναντος εκχυλίσματος στο εσωτερικό του κελιού
6. Απομάκρυνση του εκχυλίσματος του δείγματος από το κελί σε ένα δοχείο συλλογής με τη χρήση αδρανούς αερίου N₂



Εικόνα 51 Συσκευή ASE 300 Accelerated Solvent Extraction System (Dionex Corporation)

Η υψηλή θερμοκρασία και πίεση αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες για την επιτυχή πορεία της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης. Η αυξημένη θερμοκρασία συντελεί σε αύξηση της διαλυτικής ικανότητας των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και στην εξάλειψη των αλληλεπιδράσεων (π.χ. δυνάμεων Van der Waals και δεσμών υδρογόνου) μεταξύ των μορίων του υλικού, που τα συγκρατούν ενωμένα μεταξύ τους. Πέραν των ανωτέρω, η μείωση του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης του διαλύτη μέσω της αυξημένης θερμοκρασίας, επιτρέπει καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στους πόρους του προς εκχύλιση υλικού. Με όλους τους παραπάνω τρόπους, η αυξημένη θερμοκρασία επιταχύνει την κινητική της εκχύλισης.

Ο κύριος λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται υψηλή πίεση κατά τη διάρκεια του επιταχυνόμενης εκχύλισης 'ASE' είναι η διατήρηση του διαλύτη σε υγρή κατάσταση, ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες άνω του σημείου βρασμού του. Συγχρόνως, οι υψηλές πιέσεις επιτρέπουν τη γρήγορη πλήρωση του κελιού εκχύλισης και την αυξημένη διεισδυτική ικανότητα του διαλύτη στο φυτικό υλικό. (Giergielewicz-Mozajska et al., 2001)

Η τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης χρησιμοποιείται στην παραλαβή φυσικών προϊόντων από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και στην επαλήθευση των εντός των προδιαγραφών συγκεντρώσεων δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της αποτελούν ο μικρός χρόνος εκχύλισης (στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν περίπου 15 min) σε σύγκριση με τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης (π.χ. η εκχύλιση με διάταξη Soxhlet), η χαμηλότερη κατανάλωση διαλυτών και η πλήρης

αυτοματοποίηση της διαδικασίας που οδηγεί σε αυξημένη επαναληψιμότητα της διαδικασίας και σε παραλαβή πολλών εκχυλισμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Στα μειονεκτήματα της τεχνικής ASE συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος της συσκευής εκχύλισης, η παραλαβή εκχυλισμάτων μικρής ποσότητας (0,5-2 g) και η πιθανή θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ουσιών. (Giergielewicz-Mozajska et al., 2001) (Huie, 2002)

Η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης του εργαστηρίου μας, που χρησιμοποιήθηκε στην πραγματοποίηση των παρακάτω πειραμάτων, είναι η συσκευή ASE 300 Accelerated Solvent Extraction System (Dionex Corporation).

6 Χρωματογραφικές Τεχνικές

6.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography - Analytical TLC)

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) είναι μία εκ των παλαιότερων μορφών χρωματογραφίας. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή επίπεδης χρωματογραφίας και συγχρόνως, την ευκολότερη και φθηνότερη τεχνική για τον ταχύ έλεγχο της σύστασης εκχυλισμάτων φυσικής προέλευσης.

Ο διαχωρισμός με TLC πραγματοποιείται με την εφαρμογή μίγματος ή εκχυλίσματος ως σημείο ή λεπτή γραμμή, σε ένα προσροφητικό υλικό (συνήθως γέλη οξειδίου του πυριτίου- SiO_2) που έχει σταθεροποιηθεί σε πλάκα από γυαλί, πλαστικό ή αλουμίνιο. Η πλάκα ακολούθως τοποθετείται σε θάλαμο ανάπτυξης με κατάλληλο διαλύτη, σε ποσότητα ικανή να διαβρέξει τη χαμηλότερη άκρη της πλάκας, αφήνοντας ανέπαφο το τμήμα της πλάκας όπου οι κηλίδες εφαρμόστηκαν. Το μέτωπο του διαλύτη ακολουθεί ανοδική πορεία στην πλάκα, μέσω τριχοειδικών φαινομένων. Η ανωτέρω περιγραφείσα διαδικασία αποτελεί τη διαδικασία της ανάπτυξης.

Ο διαχωρισμός των συστατικών σε αυτό τον τύπο χρωματογραφίας προσρόφησης επιτυγχάνεται βάσει του διαφορετικού συντελεστή συγκράτησης ή επιβράδυνσης R_f (Retention Factor) των συστατικών. Ο συντελεστής συγκράτησης R_f ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διάνυσε η ουσία προς την απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη από το σημείο εκκίνησης. Στην περίπτωση TLC κανονικής φάσης με στατική φάση SiO_2 , οι πολικές ενώσεις έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την πολική στατική φάση, κινούνται αργά κατά την ανάπτυξη της TLC και έχουν μικρό R_f . Κατά ανάλογο τρόπο, άπολες ουσίες παρουσιάζουν υψηλότερα R_f .

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) χρησιμοποιείται για αναλυτικούς και παρασκευαστικούς σκοπούς στο επιστημονικό πεδίο της Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να καταγραφεί ότι η Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (preparative TLC), χρησιμοποιείται στη διαδικασία της απομόνωσης φυσικών προϊόντων, λόγω του μεγαλύτερου πάχους στιβάδας του προσροφητικού υλικού, σε σύγκριση με τις TLC που χρησιμοποιούνται σε αναλυτικούς σκοπούς. Για αναλυτικούς σκοπούς, το πάχος της προσροφητικής στιβάδας είναι 0.1 – 0.2 mm ενώ, για παρασκευαστικούς σκοπούς 0.5 – 4.0 mm.

Το προς διαχωρισμό δείγμα πρέπει να διαλύεται στον ελάχιστο δυνατό όγκο διαλύτη, συνήθως σε εύρος συγκεντρώσεων 10-20 mg / mL. Ακολούθως, το δείγμα εφαρμόζεται ως λεπτή γραμμή 1.5 cm στη χαμηλότερη άκρη της πλάκας, χρησιμοποιώντας είτε μια τριχοειδή πιπέτα είτε μια πιπέτα Pasteur. Πραγματοποιείται επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών για την ανάπτυξη της πλάκας και ακολούθως, η πλάκα παρατηρείται στο υπεριώδες (UV) και αν κριθεί απαραίτητο, η άκρη της ψεκάζεται με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος. Οι ζώνες των επιθυμητών φυσικών προϊόντων επισημαίνονται με μολύβι, απομακρύνονται από την πλάκα με νυστέρι και μεταφέρονται εντός κωνικών φιαλών. Με την προσθήκη κατάλληλου συστήματος διαλυτών εντός των κωνικών, οι δεσμευμένες στο προσροφητικό υλικό ουσίες εκχυλίζονται. Καταληκτικά, το προσροφητικό υλικό απομακρύνεται από τις καθαρές ουσίες με διήθηση. (Gray, 2012)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση :

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού (silica gel 60 F-254 Merck) σε φύλλα αλουμινίου 20 x 10 cm., πάχους στιβάδας 0.1 mm (αναλυτική TLC κανονικής φάσεως).
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως με δείκτη φθορισμού (RP-18 F254S Merck) σε φύλλα αλουμινίου 20 x 10 cm., πάχους στιβάδας 0.25 mm (αναλυτική TLC αντιστρόφου φάσεως).
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού (silica gel 60 F-254) σε γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm. και 10 x 10 , πάχους στιβάδας 1 mm (παρασκευαστική TLC κανονικής φάσης)
- Αντιδραστήριου θειικής βανιλίνης: παρασκευή με την ανάμιξη ίσων όγκων διαλύματος 5% βανιλίνης σε μεθανόλη και διαλύματος 5% πυκνού θειικού οξέος (π.Η₂SO₄) σε μεθανόλη, λίγο πριν τον ψεκασμό.

- CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, στα 366 nm και στο ορατό.

6.2 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC)

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) είναι μια αναλυτική τεχνική που βασίζεται στην τεχνική της Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), αλλά με βελτιώσεις που αποσκοπούν στην καλύτερη ανάλυση των προς διαχωρισμό ενώσεων και την ποσοτικοποίησή τους. Στην HPTLC, με τη χρήση υπερσύγχρονων συσκευών σε όλα τα στάδια της διαδικασίας, πραγματοποιείται ακριβής εφαρμογή δείγματος, τυποποιημένη και επαναλήψιμη ανάπτυξη χρωματογραφήματος και ελεγχόμενη από το κατάλληλο λογισμικό αξιολόγηση των συλλεχθέντων αναλυτικών και ποσοτικών δεδομένων. Συνεπώς, η HPTLC περιλαμβάνει μια ευρέως τυποποιημένη μεθοδολογία βασισμένη σε επιστημονικά δεδομένα, καθώς και τη χρήση επικυρωμένων μεθόδων για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. (Rashmin et al., 2012)

Στα κυριότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής HPTLC περιλαμβάνονται η δυνατότητα οπτικοποίησης του χρωματογραφήματος (με τη μορφή σειράς ζωνών επί της πλάκας), το χαμηλό κόστος και η απλότητα της τεχνικής ως προς την προετοιμασία των δειγμάτων, το χειρισμό του μηχανήματος και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επιπροσθέτως, ο υψηλός βαθμός τυποποίησης της διαδικασίας προσφέρει αυξημένη επαναληψιμότητα, ενώ συγχρόνως παρέχεται η δυνατότητα σύγχρονης ανάλυσης πολλών δειγμάτων.

Στον τομέα της Χημείας Φυσικών Προϊόντων, η τεχνική της HPTLC αποτελεί ιδανικό εργαλείο εύρεσης του χημικού προφίλ (fingerprint) πρώτων υλών φυσικής προέλευσης, γεγονός που επιτρέπει και τη χρήση της τεχνικής για την ανίχνευση νοθειών σε φυσικά προϊόντα. Συγχρόνως, είναι κατάλληλη για την αξιολόγηση και παρακολούθηση των διαδικασιών της καλλιέργειας αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, όπως επίσης και της συγκομιδής και της εκχύλισης φυτικών δρογών. Καταληκτικά, η τεχνική της HPTLC χρησιμοποιείται και για την αξιολόγηση οργανικών ενώσεων, ως προς τις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (HPTLC-bioautography). (Attimarad et al., 2011)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η κατωτέρω οργανολογία:

- Συσκευή “CAMAG Linomat 5” για την εφαρμογή του δείγματος.
- Συσκευή “CAMAG chamber” για την ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας.

- Συσκευή “CAMAG TLC Scanner 3” για τη λήψη φασμάτων απορρόφησης.
- Λογισμικά “CAMAG VisionCats” και “WinCats” για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.
- Αναλυτική TLC κανονικής και αντιστρόφου φάσεως, αντιδραστήριο εμφάνισης θειικής βανιλίνης και “CAMAG TLC Visualizer”, όπως τα ανωτέρω αναλύθηκαν στο Υποκεφάλαιο 6.1.

6.3 Χρωματογραφίες Στήλης

6.3.1 Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης (Low Pressure Liquid Column Chromatography - LPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης (LPLC) αποτελεί χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού, κατά την οποία η υγρή κινητή φάση (l) αφήνεται να ρέει μέσα από ένα πυκνά συσκευασμένο πληρωτικό υλικό, που λειτουργεί ως στατική φάση (s). Διαφορετικοί μηχανισμοί διαχωρισμού μπορούν να λάβουν χώρα, ανάλογα με την επιλογή του υλικού πλήρωσης της στήλης και της κινητής φάσης. Η προσρόφηση είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς διαχωρισμού στην Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης. Τα μόρια του υπό ανάλυση δείγματος συγκρατούνται από τη στατική φάση, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την επιφάνεια της. Επομένως, ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως στο διαφορετικό βαθμό συγγένειας - προσρόφησης των συστατικών του δείγματος προς την επιφάνεια της στατικής φάσης, ο οποίος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στατικής φάσης και των μορίων του δείγματος μέσω δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων Van der Waal, δυνάμεων διπόλου-διπόλου, αλλά και οι οξεοβασικές ιδιότητες τόσο της στατικής φάσης όσο και του δείγματος.

Η γέλη διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) αποτελεί το προσροφητικό υλικό επιλογής στην Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης για το διαχωρισμό διαφόρων τύπων φυσικών προϊόντων, ιδιαίτερα μη πολικών και ενδιάμεσης πολικότητας. (Reid and Sarker, 2012) Η γέλη διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) είναι διαθέσιμη εμπορικά σε ένα ευρύ φάσμα μορφών. Η πλήρης αδράνεια της γέλης SiO₂ έναντι ασταθών ενώσεων συνιστά το κυριότερο πλεονέκτημά της, το οποίο την καθιστά υλικό επιλογής για την εκτέλεση διαχωρισμών με την τεχνική LPLC. Η γέλη SiO₂ αποτελεί πολικό προσροφητικό μέσο και η επιφάνεια της

είναι ελαφρώς όξινη. Αποτελεί πολυμερές τετραεδρικών μονάδων οξειδίου του πυριτίου και είναι πορώδες υλικό. Για τη Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης, το μέγεθος σωματιδίων της γέλης SiO₂ κυμαίνεται κανονικά μεταξύ 40-200 μm με μέγεθος πόρων μεταξύ 40 και 300 Å. Μικρότερα μεγέθη σωματιδίων συνήθως χρησιμοποιούνται στην τεχνική HPLC.

Η εκτέλεση του διαχωρισμού μέσω της συγκεκριμένης χρωματογραφίας στήλης επιτυγχάνεται βάσει του διαφορετικού βαθμού προσρόφησης των συστατικών στις ομάδες σιλανόλης της επιφάνειας της πυριτικής γέλης. Πολικές ενώσεις που περιέχουν ομάδες καρβοξυλικού οξέος, αμίνης ή αμιδίου συγκρατούνται από την πυριτική γέλη, μέσω ισχυρών δεσμών υδρογόνου, εν αντιθέσει προς τις άπολες ενώσεις, οι οποίες δε συγκρατούνται στον ίδιο βαθμό και εκλούονται ταχύτερα. Επιπροσθέτως, η συγκράτηση μιας συγκεκριμένης ένωσης από τη στατική φάση εξαρτάται από την πολικότητα της κινητής φάσης. Αυξανόμενη της πολικότητας της κινητής φάσης, εκλούονται οι πολικές ενώσεις, ενώ μη πολικοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έκλυση των άπολων ενώσεων.

Η τεχνική της LCPC είναι, από τεχνικής άποψης, απλή και έχει χαμηλό κόστος. Στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγονται, ο μεγάλος χρόνος των αναλύσεων, η απώλεια αρχικού δείγματος λόγω της προσρόφησης του από το πληρωτικό υλικό και η μικρή αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την τεχνική HPLC. Η τεχνική της LPLC εφαρμόζεται στην απομόνωση φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς, μικροοργανισμούς και θαλάσσιες πηγές.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, για την εκτέλεση του διαχωρισμού με την τεχνική LPLC χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη διαμέτρου 1.8 cm, πορώδους 2 και ως προσροφητικό υλικό "silica gel 40-60 μm, 60A" της εταιρείας "ACROS Organics".

6.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού - (Size Exclusion Chromatography - Sephadex LH-20)

Η χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού αποτελεί χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση και υγρή κινητή φάση (υδατικό ή άλλο διάλυμα οργανικής ουσίας) και εφαρμόζεται ως τεχνική διαχωρισμού των ενώσεων, με βάση τις διαφορές τους στο μοριακό μέγεθος. Οι όροι "χρωματογραφία διήθησης πηκτής" (gel filtration chromatography) και "χρωματογραφία διείσδυσης γέλης" (gel-permeation

chromatography) χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για να περιγράψουν αυτή τη χρωματογραφική διαδικασία, όταν η στατική φάση αποτελούσε διογκωμένη πηκτή. Το πληρωτικό υλικό είναι πορώδες και χαρακτηρίζεται από το εύρος ή την ομοιομορφία (εύρος αποκλεισμού) του μεγέθους των πόρων του. Στους μηχανισμούς διαχωρισμού στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους περιλαμβάνονται, πέραν του διαφορετικού μεγέθους των μορίων, η προσρόφηση και η κατανομή.

Κατά την εκτέλεση χρωματογραφίας στήλης αποκλεισμού μεγέθους, τα μεγαλύτερα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους του πληρωτικού υλικού της στήλης, δε συγκρατούνται και συνεπώς εκλούνται από τη στήλη πρώτα, ενώ, ελαφρώς μικρότερα μόρια μπορούν να εισχωρήσουν σε ορισμένους πόρους και έτσι χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εξέλθουν της στήλης.

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική τεχνική συνιστάται για την απομάκρυνση από το δείγμα λιπιδίων, πρωτεϊνών, πολυμερών, στεροειδών, κυτταρικών συστατικών και διασκορπισμένων ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους. (Fletouris, 2007)

Το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι το “Sephadex LH-20” (Pharmacia Fine Chemicals). Αποτελεί γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης, που παρασκευάζεται με υδροξυπροπυλίωση από το υλικό “Sephadex G-25”. Διατίθεται σε μορφή σφαιριδίων (μέγεθος κόκκων 25 – 100 μ) ως ξηρή, ελεύθερη-τρέχουσα σκόνη, η οποία διογκώνεται σε νερό και πολικούς οργανικούς διαλύτες. Πριν από τη χρήση αφήνεται να διογκωθεί με το διαλύτη έκλουσης επί 24 ώρες. Ακολουθώς, φέρεται στη στήλη και εκπλένεται με τον ίδιο διαλύτη πέντε φορές (αντενδείκνυται η μηχανική και κυρίως η μαγνητική ανάδευση, διότι καταστρέφονται οι κόκκοι). Ο βαθμός διογκωσης του πληρωτικού υλικού “Sephadex LH-20” μειώνεται με τη μείωση της πολικότητας του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Πλεονεκτήματα του υλικού “Sephadex LH-20” αποτελούν η εκλεκτικότητα που προσδίδει στη χρωματογραφία λόγω της διττής υδρόφιλης και υδρόφοβης φύσης του, η εύκολη πρόβλεψη συμπεριφοράς έκλουσης των περιεχόμενων στο υπό ανάλυση δείγμα συστατικών και η επαναληψιμότητα των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων. Το “Sephadex LH-20” χρησιμοποιείται ευρέως στην κλασμάτωση πολυμερών και στο διαχωρισμό λιπιδίων και στεροειδών, αλειφατικών και αρωματικών υδρογονανθράκων. (Angele, 1971)

6.4 Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή (Countercurrent Chromatography - CCC) / Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal Partition Chromatography - CPC)

Η Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή συνιστά τεχνική υγρής-υγρής χρωματογραφίας, στην οποία χρησιμοποιούνται δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσεις, ενά απουσιάζει η στερεή στατική φάση. Το όνομα της τεχνικής θα μπορούσε να χαρακτηριστεί εσφαλμένο, καθώς οι δύο υγρές φάσεις δεν κινούνται αντίθετα η μία προς την άλλη, αλλά πλέον ο όρος "CCC" έχει καθιερωθεί λόγω της χρήσης του σε πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων. Ο εφευρέτης της τεχνικής, Yoshiro Ito, απέδωσε στην τεχνική την ονομασία "Χρωματογραφία κατ' Αντιρροή", λόγω της εφαρμογής της συσκευής "Craig", την οποία ο Craig πρώτος ανέπτυξε το 1940-1950, για την κατανομή των ουσιών ενός μίγματος μεταξύ δύο κατ' αντιρροή υγρών φάσεων. (Berthod et al., 2009)

Στην παρούσα χρωματογραφική μέθοδο, γίνεται κατανομή των ουσιών του προς κλασμάτωση δείγματος στις δύο φάσεις ενός διφασικού συστήματος διαλυτών. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος επιτυγχάνεται βάσει των συντελεστών κατανομής (K_D) των ουσιών στις δύο φάσεις. Ο συντελεστής κατανομής K_D μίας ουσίας ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στη στατική φάση ($[A]_{stat}$) προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση ($[A]_{mob}$), δηλαδή για ουσία A ο **συντελεστής κατανομής** της, K_D ορίζεται $K_D = [A]_{stat} / [A]_{mob}$. (Berthod et al., 2009)

Η επιλογή του συστήματος διαλυτών έκλουσης γίνεται πρωτίστως βάσει της ικανότητάς του να διαλύει το υπό μελέτη δείγμα, καθώς το CCC χρησιμοποιείται κυρίως για παρασκευαστικούς παρά για αναλυτικούς σκοπούς. Συγχρόνως, κριτήρια επιλογής αποτελούν ο διαχωρισμός των μη αναμίξιμων φάσεων σε εύλογο χρόνο (<1 min), ο λόγος των όγκων των σχηματιζόμενων φάσεων και η συγκράτηση στη στήλη της φάσης που έχει επιλεγεί ως στατική. Καταληκτικά, ιδανικό σύστημα έκλουσης για την κλασμάτωση ενός δείγματος κρίνεται εκείνο, στο οποίο οι ουσίες του δείγματος κατανέμονται εξίσου στις σχηματιζόμενες μη αναμιγνυόμενες φάσεις (ιδανικά η τιμή του συντελεστή κατανομής K_D των περιεχόμενων ουσιών στο υπό μελέτη δείγμα να είναι κοντά στο ένα). (Berthod et al., 2009) (Foucault and Chevolot, 1998)

Τα διφασικά συστήματα για εφαρμογές CCC έχουν οργανωθεί σε οικογένειες, αποτελούμενες από τους ίδιους διαλύτες που αναμιγνύονται σε ποικίλες αναλογίες. Κοινές

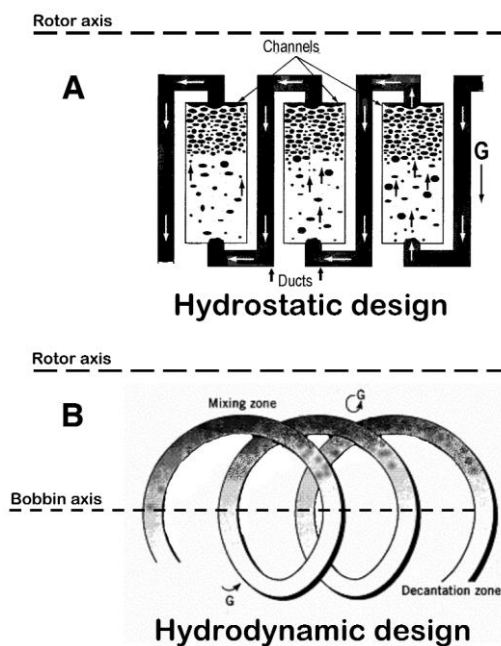
οικογένειες διφασικών συστημάτων είναι οι: Hex/EtOAc/MeOH/H₂O (HEMWat), CHCl₃/MeOH/H₂O (ChMWat) και Hept/EtOAc/MeOH/H₂O (Arizona). Η πολικότητα των συστατικών που περιέχονται στο υπό μελέτη δείγμα καθορίζει την επιλογή και διερεύνηση διαφορετικής οικογένειας διφασικών συστημάτων. Για παράδειγμα η οικογένεια HE MWat είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό άπολων ως ενδιάμεσης πολικότητας ενώσεων. (Friesen and Pauli, 2007)

Πέραν των κλασικών διφασικών συστημάτων, τριφασικά συστήματα διαλυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για την κλασμάτωση πολύπλοκων μιγμάτων φυσικών προϊόντων ευρείας πολικότητας, όπως για το διαχωρισμό πολλαπλών ενώσεων με ευρύ φάσμα υδροφοβικότητας (Shibusawa et al., 2006) ή για την απομάκρυνση των ταννινών από ακατέργαστο εκχύλισμα κορμού του φυτικού είδους *Anogeissus leiocarpus*. (Hamzaoui et al., 2013)

Υπάρχουν δύο κύριοι διαφορετικοί τύποι στήλων χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (CCC), ανάλογα με της τεχνικής συγκράτησης εντός της στήλης της υγρής στατικής φάσης με φυγόκεντρο δύναμη. Οι στήλες CCC διακρίνονται σε υδροδυναμικού και υδροστατικού τύπου.

Στις **υδροδυναμικού τύπου στήλες**, υπάρχει ένα μεταβλητό και κυκλικό φυγόκεντρο πεδίο (G) που παράγεται από την πλανητική περιστροφή της έλικας γύρω από τον άξονά της (bobbin axis) και γύρω από τον κεντρικό άξονα περιστροφής της στήλης. Υπάρχει επαφή μεταξύ των δύο υγρών φάσεων στη μισή έκταση του ελικοειδούς σωλήνα.

Οι **υδροστατικού τύπου στήλες** αποτελούν τις στήλες της τεχνικής "Centrifugal Partition Chromatography – CPC", η οποία και εφαρμόστηκε στην εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, όπως θα αναλυθεί κατωτέρω στο πειραματικό μέρος. Στις υδροστατικού τύπου στήλες υπάρχει ένα μόνος άξονας περιστροφής που παράγει σταθερό φυγόκεντρο πεδίο (G). (Berthod et al., 2009)



Εικόνα 52 Υδροστατικές-Υδροδυναμικές στήλες CCC (Berthod et al., 2009)

Η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (Centrifugal Partition Chromatography - CPC) αναπτύχθηκε το 1982 από τους Wataru Murayama και Kanichi Nunogaki. Το CPC, ως εξέλιξη των τεχνικών CCC, αποτελεί μία αναλυτική και παρασκευαστική μέθοδο διαχωρισμού ουσιών από πολύπλοκα μίγματα.

Παρουσιάζει πολλαπλά πλεονεκτήματα τα οποία αναφέρονται στη συνέχεια:

- Απουσία στερεής στατικής φάσης και μικρότερη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, παράγοντες που καθιστούν την τεχνική οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον.
- Μικρότερος χρόνος διαχωρισμού, σε σχέση με τις κλασικές χρωματογραφίες στήλης.
- Αυξημένη δυνατότητα επιλογής του βέλτιστου συστήματος διαλυτών μεταξύ μίας ποικιλίας διφασικών (ή και τριφασικών) συστημάτων διαλυτών.
- Απουσία μη αναστρέψιμης προσρόφησης των μορίων στη στήλη και συνεπώς, εξασφάλιση της ολικής ανάκτησης του ενέσιμου στη στήλη δείγματος.
- Χαμηλός κίνδυνος αλλοίωσης των συστατικών του δείγματος.
- Εύκολη προσαρμογή για εφαρμογή της τεχνικής σε μεγάλη κλίμακα (scale-up)

Τα κυριότερα μειονεκτήματα του CPC συνοψίζονται στα κατωτέρω:

- Χρονοβόρα η διαδικασία επιλογής του βέλτιστου διφασικού συστήματος διαλυτών.
- Υψηλό κόστος της συσκευής. (Bojczuk et al., 2017)

Η τεχνική CPC παρουσιάζει πολλές εφαρμογές στον τομέα των φυσικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική κλασμάτωση σύνθετων μιγμάτων

ουσιών, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα. Συγχρόνως, καθιστά δυνατή την απομόνωση βιολογικά δραστικών φυσικών προϊόντων, που είναι δύσκολο να επιτευχθεί με άλλες τεχνικές, μετατρέποντας την τεχνική CPC σε ένα ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στον τομέα της Χημείας Φυσικών Προϊόντων. (Bojczuk et al., 2017)

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια νέα μεθοδολογία σύζευξης CPC και οργανοληπτικού ελέγχου. Αυτή η καινοτόμος τεχνική, η οποία ονομάστηκε CPC-gustatometry επέτρεψε την κλασμάτωση του ακατέργαστου εκχυλίσματος και όλα τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το CPC, αξιολογήθηκαν ακολούθως, ως προς τη γλυκύτητά τους. (Marchal et al., 2011) Η μέθοδος CPC-gustatometry θα αναλυθεί κατωτέρω.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε συσκευή της εταιρίας Kromaton με στήλη 200 mL.

7 Φασματοσκοπικές Τεχνικές

7.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού είναι ένα από τα πλέον ισχυρά εργαλεία καθορισμού της δομής οργανικών ενώσεων και όχι μόνο. Σε οργανικές ενώσεις, αυτή η μη καταστρεπτική φασματοσκοπική ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και πρωτονίων, τη σύνδεσή τους, τη διαμόρφωση των μορίων, καθώς και τη σχετική και απόλυτη στερεοχημεία τους. Η εμφάνιση της τεχνολογίας του παλμικού πεδίου κλίσης (PFG: Pulsed Field Gradient) για τα φασματόμετρα NMR επέτρεψε τη λήψη φασμάτων NMR μίας διάστασης (1D) και δύο διαστάσεων (2D), σε σχετικά βραχείες χρονικές περιόδους σε σύνθετα οργανικά μόρια. (McClure, 2017) Η φασματοσκοπία NMR είναι φασματοσκοπική τεχνική η οποία μετρά την απορρόφηση της ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF), η οποία λαμβάνει χώρα όταν ορισμένα είδη ατομικών πυρήνων (^1H , ^{13}C , ^{15}N) τοποθετούνται κάτω από ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Οι θέσεις των συχνοτήτων απορρόφησης ή “συντονισμών” που μπορούν να ανιχνευθούν ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις. Οι χημικές μετατοπίσεις είναι πολύ ευαίσθητες στο ηλεκτροχημικό περιβάλλον κάθε πυρήνα και επιτρέπουν την εξαγωγή πολλών πληροφοριών σχετικά με τη δομή ενός μορίου. (Wishart, 2005)

Τα φάσματα πρωτονίου (^1H -NMR) δίνουν σε λίγα μόνο λεπτά αρκετές πληροφορίες για τη δομή του προς ανάλυση μορίου και απαιτούνται μόνο μικρές ποσότητες δείγματος (1-10 mg σε 0.5 mL διαλύτη). Από την άλλη, λόγω της χαμηλής φυσικής αφθονίας του ισοτόπου

^{13}C (1.1%), σε σύγκριση με την αφθονία του ισότοπου ^1H (κοντά στο 100%), και της τετραπλάσιας ενέργειας διάσπασης του πρωτονίου σε σχέση με αυτή του άνθρακα, τα φάσματα ^{13}C -NMR έχουν πολύ χαμηλότερη ευαισθησία και απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες και περισσότερο πειραματικό χρόνο από τα φάσματα ^1H -NMR. (McClure, 2017) Στην παρούσα διπλωματική εργασία λήφθηκαν φάσματα NMR μιας (1D): ^1H -NMR και δυο διαστάσεων (2D): COSY-Correlation Spectroscopy, HSQC-Heteronuclear Single Quantum Coherence και HMBC-Heteronuclear Multiple Bond Correlation) από φασματογράφους Varian 600 MHz, Bruker Avance III 600 MHz, DRX 400 και 200 MHz. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με τα λογισμικά TopSpin 3.5pl7 (Bruker) και MestreNova.

7.2 Αέριος Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS) αποτελεί συζευγμένη αναλυτική τεχνική, που συνδυάζει τις διαχωριστικές ιδιότητες της αέριας χρωματογραφίας με το χαρακτηριστικό της ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας, για την ταυτοποίηση διαφορετικών ουσιών εντός ενός εξεταζόμενου δείγματος. Το GC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πτητικών και θερμικά σταθερών ουσιών που περιέχονται σε ένα δείγμα, ενώ το MS προσφέρει τη δυνατότητα ταυτοποίησης της αναλυόμενης ουσίας βάσει ενός φορτισμένου μοριακού ιόντος της. Το αποτελεσματικό και αυτοματοποιημένο σύστημα του GC-MS δίνει γρήγορα και επαναλήψιμα αποτελέσματα. (Chauhan, 2014)

Στον τομέα της Φαρμακογνωσίας, η τεχνική GC-MS αποδείχθηκε πολύτιμο αναλυτικό εργαλείο για την ανάλυση κυρίως μη πολικών συστατικών και πτητικών φυσικών προϊόντων, όπως τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια. Επιπροσθέτως, η τεχνική του GC-MS χρησιμοποιείται στην εύρεση του χημικού προφίλ (chemical fingerprinting), στον ποιοτικό έλεγχο φυτικών εκχυλισμάτων και σε χημειοταξινομικές μελέτες. (Patel et al., 2010)

Η τεχνική του GC-MS εφαρμόζεται πλέον ευρύτατα και στη μελέτη των πτητικών συστατικών του οίνου, τα οποία μπορεί να προέρχονται από την πρώτη ύλη, δηλαδή τον ίδιο τον οίνο, τη ζύμωση, αλλά και τη διαδικασία παλαίωσης. Το άρωμα του οίνου είναι αποτέλεσμα μεγάλου αριθμού πτητικών ενώσεων, όπως μονοτερπένια, νορισοπρενοειδή, αιθυλεστέρες, οξικούς εστέρες, αλειφατικά οξέα και αλκοόλες, παράγωγα φουρφουράλης, φαινολικές αλδεΐδες, φαινόλες και λακτόνες. Όλες οι ανωτέρω κατηγορίες ενώσεων ταυτοποιούνται εντός του οίνου, με την τεχνική GC-MS. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν

πολυδιάστατες τεχνικές GC για τη βελτίωση του διαχωρισμού των συστατικών του οίνου και την επίτευξη μεγαλύτερης ακρίβειας στην αναγνώριση της ένωσης, όπως η τεχνική GC-Olfactometry. Η τελευταία τεχνική, συνδυάζοντας τις αποκρίσεις του οργάνου με τις ανθρώπινες, αναπτύχθηκε με απώτερο στόχο τη συσχέτιση της χημικής σύνθεσης με την αισθητηριακή αντίληψη. (Angioni et al., 2012)

Η ανάλυση του προφίλ των δειγμάτων στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε σε συσκευή “Agilent Hewlett Packard 5973-6890 GC-MS” (EI mode), με στήλη “HP-5MS” (30 m x 0.25 mm με 0.25 μm) και φέρον αέριο He (ροή 1 mL/min). Τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα “Agilent Chemstation” και η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, της βιβλιοθήκης NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Version 2.0d) και του βιβλίου Adams (2010).

8 Περιγραφικός Οργανοληπτικός Έλεγχος Οίνου - (Descriptive Sensory Analysis)

Η διαδικασία του οργανοληπτικού ελέγχου του οίνου για την απόδοση των χαρακτηριστικών της οσμής και της γεύσης του, περιλαμβάνει πρωτογενώς την εντατική εκπαίδευση μιας επιτροπής (πάνελ) δοκιμαστών που αποτελείται από περίπου 8-12 κριτές, και δευτερογενώς, την ανάλυση του συνόλου των υπό μελέτη δειγμάτων οίνων. Τα δύο αυτά στάδια αναλύονται κατωτέρω.

8.1 Σχεδιασμός του οργανοληπτικού ελέγχου (Sensory study design)

Ο σχεδιασμός του οργανοληπτικού ελέγχου περιλαμβάνει αρχικά τη δημιουργία όρων που περιγράφουν πλήρως το πλήθος των οσφρητικών και γευστικών χαρακτηριστικών των εξεταζόμενων δειγμάτων, καθώς και την εκπαίδευση των δοκιμαστών στην αναγνώριση των επιλεγμένων χαρακτηριστικών και της έντασης με την οποία αυτά παρατηρούνται. Συνήθως επιλέγεται ένα εύρος οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, ώστε να εξασφαλιστεί ότι θα συμπεριληφθούν τα χαρακτηριστικά που υπάρχουν σε όλα τα μελετώμενα δείγματα. Κατά τη διάρκεια της φάσης της κατάρτισης των δοκιμαστών - κριτών, χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα ουσιών, τα οποία οι δοκιμαστές εκπαιδεύονται να συσχετίζουν με συγκεκριμένο από τους δημιουργηθέντες για την οσμή και γεύση όρους. Κατά αυτόν τον τρόπο, ελαχιστοποιείται η υποκειμενική κρίση του πάνελ των δοκιμαστών και ο επακόλουθος οργανοληπτικός έλεγχος καθίσταται περισσότερο τυποποιημένος και αντικειμενικός. (Murray et al., 2001)

8.2 Αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των μελετώμενων οίνων (Sensory evaluation of wines)

Κατά τη διάρκεια της φάσης της οργανοληπτικής αξιολόγησης, ακολουθούνται συνήθεις πρακτικές, οι οποίες περιλαμβάνουν την κωδικοποίηση των δειγμάτων με τριψήφια νούμερα, την τυχαιοποίηση της σειράς των δειγμάτων, τη συμμετοχή των κριτών σε ξεχωριστούς θαλάμους γευσιγνωσίας και τον έλεγχο της θερμοκρασίας και του φωτισμού του χώρου. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, οι αξιολογητές σημειώνουν τα διαφορετικά οσφρητικά και γευστικά χαρακτηριστικά που γίνονται αντιληπτά σε κάθε δείγμα και την έντασή τους σε γραμμική κλίμακα, χρησιμοποιώντας τους όρους που επιλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης εκπαίδευσης. Η διαδικασία ανάλυσης συνήθως επαναλαμβάνεται για να εξασφαλιστεί η συνοχή των αποτελεσμάτων των ομάδων.

Μονομεταβλητές στατιστικές μεθοδολογίες (π.χ. ανάλυση διακύμανσης, ANOVA) και στατιστικές ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων (π.χ. ανάλυση κύριων συνιστοσών, PCA) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των συλλεχθέντων δεδομένων του οργανοληπτικού ελέγχου. Κατά αυτόν τον τρόπο, δύναται να εξακριβωθεί εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων, όσον αφορά συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, ενώ διαπιστώνεται η πιθανή σύνδεση συγκεκριμένων δειγμάτων και χαρακτηριστικών με μια πολυπαραγοντική συνάρτηση. (Fragasso et al., 2012)

Το κύριο πλεονέκτημα του περιγραφικού οργανοληπτικού ελέγχου είναι ο ολοκληρωμένος οργανοληπτικός χαρακτηρισμός του οίνου, ο οποίος επιτρέπει τη σύγκριση πολλαπλών οσφρητικών και γευστικών χαρακτηριστικών ενός οίνου και διαφορετικών οίνων μεταξύ τους.

Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν ο μεγάλος χρόνος ανάλυσης και το υψηλό κόστος. Η χρήση ομάδας εκπαιδευμένων αξιολογητών έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το ανθρώπινο αισθητηριακό σύστημα είναι πιο ευαίσθητο από οποιοδήποτε όργανο αλλά οι μεμονωμένες διαφοροποιήσεις και η υποκειμενικότητα καθιστούν το ανθρώπινο δυναμικό λιγότερο συνεπές από τα εργαστηριακά όργανα. (Kemp et al., 2018)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο οσφρητικός και γευστικός έλεγχος των κλασμάτων FCPC των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Q. robur* και *R. pseudoacacia* πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Γεώργιου Κοτσερίδη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

9 Εκχυλίσεις Ξύλων Οινοποίησης (*Quercus robur*, *Quercus alba*, *Quercus petraea*, *Robinia pseudoacacia*)

9.1 Συμβατική Εκχύλιση με Διαβροχή (Maceration)

Τα “chips” ξύλου των τεσσάρων υπό μελέτη ειδών κονιοποιήθηκαν, με σκοπό την αύξηση της επιφάνειας της εκχυλιζόμενης δρόγης και συνεπώς τη διευκόλυνση της εκχύλισης. Συγκεκριμένη ποσότητα πούδρας ξύλου, η οποία αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα, τοποθετήθηκε σε γυάλινο αεροστεγές δοχείο και ακολούθησε εκχύλιση με κοινό πρωτόκολλο και για τα τέσσερα είδη.

Η πούδρα από τα κάθε είδος ξύλου εκχυλίστηκε με μείγμα διαλυτών αιθανόλης/νερού 50:50 (4 L x 2). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία 30-32 °C. Κατά τη διάρκεια των εκχυλίσεων, διοχετευόταν σταθερή ροή αζώτου. Η διαδικασία εκχύλισης διήρκησε 6 ημέρες. Το μίγμα EtOH:H₂O 50:50 παρέμεινε για 3 ημέρες και ακολούθησε ανανέωσή του με στόχο την παραλαβή περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών του ξύλου. Μετά το πέρας των εκχυλίσεων, το εκάστοτε αρχικό υδατοαλκοολικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε διήθηση (Whatman, 30 μm) και ακολούθως, σε διαδικασία εξάτμισης χαμηλής θερμοκρασίας (32 °C) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό (RotaVapor, Büchi), έως ξηρού. Το εκάστοτε υδατοαλκοολικό εκχύλισμα διατηρήθηκε στη συντήρηση (4 °C).

Η απόδοση του ξηρού υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος για τα ξύλα των τεσσάρων ειδών, παρατίθεται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 20 Βάρος και απόδοση του ξηρού υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος για τα ξύλα των τεσσάρων φυτικών ειδών

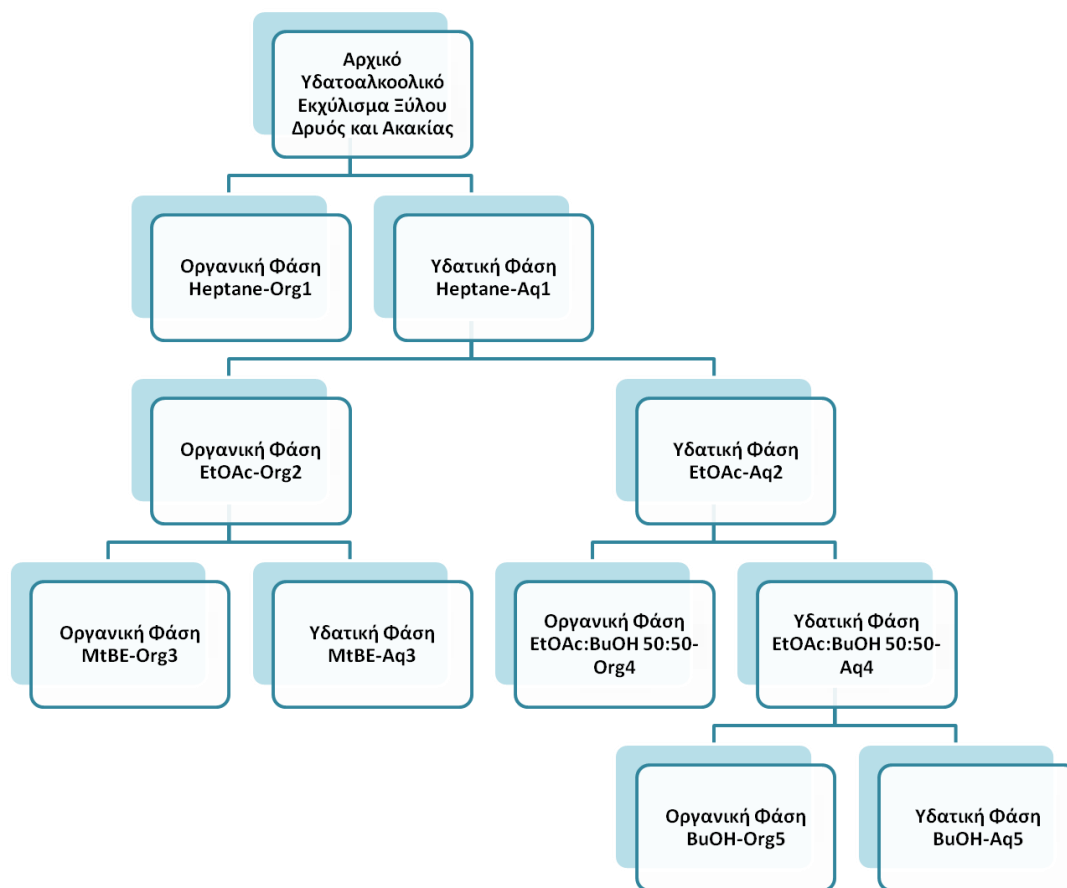
Είδος Ξύλου	Ποσότητα πούδρας (g)	Ποσότητα ξηρού υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος (g)	Απόδοση %
<i>Q. robur</i> (Slavoniak oak wood)	386.2	16.3	4.22
<i>Q. alba</i> (American oak wood)	404.4	16.7	4.13
<i>Q. petraea</i> (French oak wood)	998.6	45.9	4.60
<i>R. pseudoacacia</i> (False Acacia wood)	1003.1	64.4	6.42

9.2 Υγρή-Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction)

Συγκεκριμένη ποσότητα του εκάστοτε υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος που παραλήφθηκε με την προαναφερόμενη διαδικασία, υποβλήθηκε σε υγρή-υγρή εκχύλιση. Στο εκάστοτε υδατοαλκοολικό εκχύλισμα, προστέθηκαν περίπου 2 L H₂O, θερμοκρασίας 30-50 °C. Το υδατικό διάλυμα μεταφέρθηκε εντός διαχωριστικής χοάνης όπου εκχυλίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου διαδοχικά, με επτάνιο (Hept), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρα (MtBE), οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και βουτανόλη (BuOH) σε αναλογία 50:50, ενώ στο τέλος πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με βουτανόλη (BuOH).

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η προσθήκη NaCl που πραγματοποιήθηκε στο τελευταίο στάδιο του εκχυλιστικού σχήματος για το είδος *Robinia pseudoacacia* αποσκοπούσε στη διάσπαση του γαλακτώματος που σχηματίστηκε στη μεσεπιφάνεια υδατικής (W.ACA._Aq5) και οργανικής φάσης (W.ACA._Org5). Ωστόσο, το NaCl παρέμεινε στην υδατική φάση, μη επιτρέποντας την περαιτέρω μελέτη της.

Η πορεία των εκχυλίσεων που απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα, ακολουθήθηκε για την υγρή-υγρή εκχύλιση των ξύλων και των τεσσάρων ειδών:



Εικόνα 53 Σχηματική αναπαράσταση της πορείας υγρής-υγρής εκχύλισης των ξύλων και των τεσσάρων φυτικών ειδών

Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθεται για καθένα από τα 4 μελετώμενα είδη το βάρος του αρχικού υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος (EtOH:H₂O 50:50), που χρησιμοποιήθηκε προς εκχύλιση στο ανωτέρω εκχυλιστικό σχήμα, το βάρος των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων και η απόδοση σε εκχύλισμα που προέκυψε από κάθε χρησιμοποιούμενο διαλύτη.

Πίνακας 21 Συγκεντρωτικός πίνακας που περιλαμβάνει το βάρος και την απόδοση όλων των λαμβανόμενων εκχυλισμάτων και των τεσσάρων φυτικών ειδών, με τη διαδικασία της υγρής-υγρής εκχύλισης

Φυτικό Είδος	Διαλύτης	Φάση	Βάρος (g)	Απόδοση %
Q. robur (Slavonian oak wood)	Υδατοαλκοολικό εκχύλισμα ξύλου Q. robur προς εκχύλιση		8.235	
	n-heptane	W.SL._Org1	0.066	0.80
	EtOAc	W.SL._Org2	2.645	32.12
	MtBE	W.SL._Org3	2.329	28.28
		W.SL._Aq3	0.187	2.27
	EtOAc:BuOH 50:50	W.SL._Org4	1.099	13.34
	BuOH	W.SL._Org5	0.288	3.50
		W.SL._Aq5	1.115	13.54
	Q. robur (Slavonian oak wood)	Υδατοαλκοολικό		12.837

	εκχύλισμα ξύλου <i>Q.alba</i> προς εκχύλιση			
	<i>n</i> -heptane	W.AME._Org1	0.088	0.68
	EtOAc	W.AME._Org2	3.429	26.71
	MtBE	W.AME._Org3	2.079	16.19
		W.AME._Aq3	0.371	2.89
	EtOAc:BuOH 50:50	W.AME._Org4	1.978	15.41
	BuOH	W.AME._Org5	0.617	4.81
		W.AME._Aq5	2.657	20.70
<i>Q. petraea</i> (French oak wood)	Υδατοαλκοολικό εκχύλισμα ξύλου <i>Q.</i> <i>petraea</i> προς εκχύλιση		30.103	
	<i>n</i> -heptane	W.FRE._Org1	0.125	0.41
	EtOAc	W.FRE._Org2	6.380	21.19
	MtBE	W.FRE._Org3	4.683	15.56
		W.FRE._Aq3	0.548	1.82
	EtOAc/BuOH 50:50	W.FRE._Org4	5.066	16.83
	BuOH	W.FRE._Org5	1.022	3.39
W.FRE._Aq5		9.756	32.41	
<i>R. pseudoacacia</i> (False Acacia wood)	Υδατοαλκοολικό εκχύλισμα ξύλου <i>Robinia</i> <i>pseudoacacia</i> προς εκχύλιση		60.000	
	<i>n</i> -heptane	W.ACA._Org1	0.352	0.59
	EtOAc	W.ACA._Org2	27.818	46.36
	MtBE	W.ACA._Org3	20.712	34.52
		W.ACA._Aq3	2.979	4.96
	EtOAc:BuOH 50:50	W.ACA._Org4	14.919	24.86
	BuOH	W.ACA._Org5	11.224	18.71
W.ACA._Aq5		Δεν υπολογίσθηκε λόγω NaCl	-	

9.3 Επιταχυνόμενη Εκχύλιση (ASE)

Τα εμπορικά διαθέσιμα θραύσματα ξύλου (wood chips) μέσου βαθμού ψησίματος (MT: Medium Toasted) από την εταιρεία Nadalié USA των τεσσάρων ειδών (*Quercus robur*, *Quercus alba*, *Quercus petraea* και *Robinia pseudoacacia*) κονιοποιήθηκαν και σε μορφή πούδρας, υποβλήθηκαν στη διαδικασία της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction). Η διαδικασία της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης πραγματοποιήθηκε με στόχο την παραλαβή των κατά το δυνατόν περισσότερων περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών. Ποσότητα περίπου 20 g κάθε δείγματος τοποθετήθηκε εντός κελιού του ASE (cell size: 100 mL) και πραγματοποιήθηκαν δύο μέθοδοι εκχυλίσεων, τόσο με διαλύτη εκχύλισης

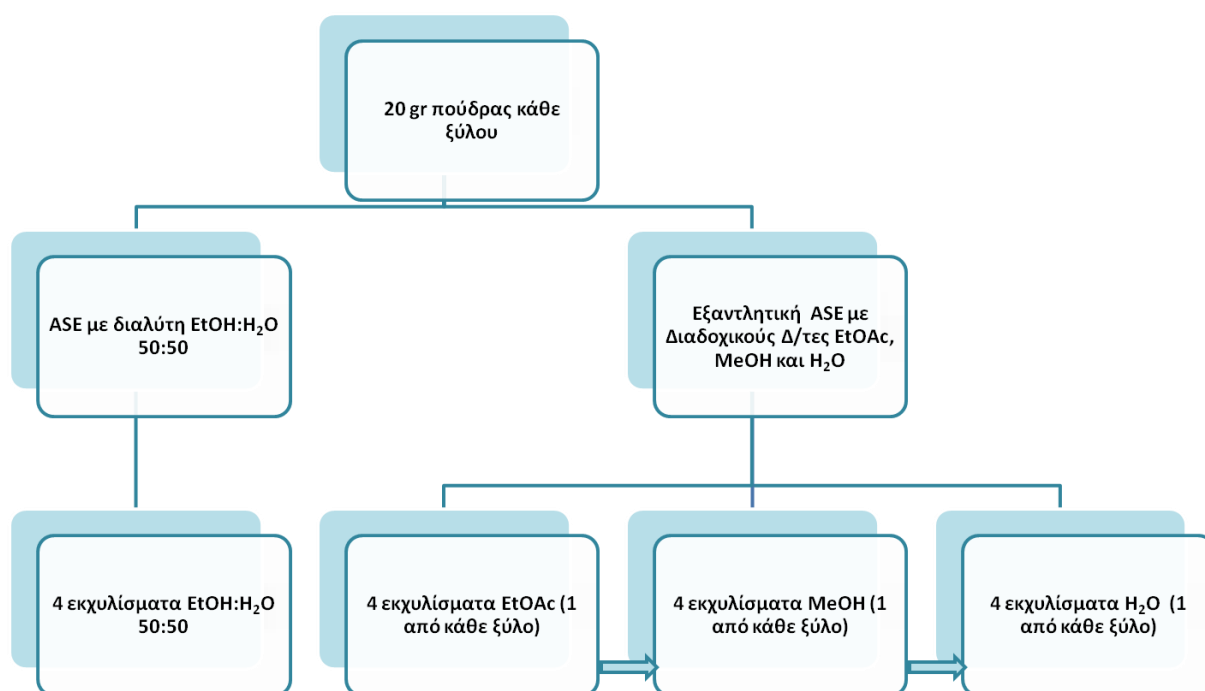
EtOH:H₂O 50:50 όσο και εξαντλητική εκχύλιση με διαδοχικούς διαλύτες EtOAc, MeOH και H₂O.

Η μέθοδος της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 22 Μέθοδος της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης

Διαλύτης	Θερμοκρασία (°C)	Πίεση (psi)	Preheating (min)	Heating (min)	Static (min)	Flash	Κύκλοι ανά Διαλύτη
EtOH:H ₂ O 50:50	70	1500	2	5	15	60%	4
EtOAc	70	1500	2	5	15	60%	4
MeOH	70	1500	2	5	15	60%	4
H ₂ O	70	1500	2	5	15	60%	4

Το εκχυλιστικό σχήμα που ακολουθήθηκε με τη συσκευή Επιταχυνόμενης Εκχύλισης ASE 300 Accelerated Solvent Extraction System (Dionex Corporation) δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 54 Εκχυλιστικό σχήμα που ακολουθήθηκε με τη συσκευή Επιταχυνόμενης Εκχύλισης ASE

Τα 4 εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαλύτη εκχύλισης EtOH:H₂O 50:50 συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα μπουκάλια. Τα βάρη των 4 υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων και η απόδοση της εκχύλισης με EtOH:H₂O 50:50 για κάθε είδος, δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 23 Βάρη των τεσσάρων υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων και απόδοση της εκχύλισης με EtOH:H₂O 50:50 για κάθε φυτικό είδος

Είδος Ξύλου	Βάρος (g)	% Απόδοση ASE
<i>Q. robur</i>	3.0922	15.46
<i>Q. alba</i>	2.1844	10.92
<i>Q. petraea</i>	3.3893	16.95
<i>R. pseudoacacia</i>	2.3154	11.58

Όπως παρατηρείται και από τον Πίνακα 23, οι αποδόσεις των εκχυλίσεων με τη διαδικασία της επιταχυνόμενης εκχύλισης ήταν τρεις με τεσσέρις φορές μεγαλύτερες σε σύγκριση με τη διαδικασία της συμβατικής εκχύλισης. Η διαδικασία διήρκησε περίπου 90 λεπτά (4 κύκλοι).

Επιπλέον, τα 12 εκχυλίματα που παραλήφθηκαν με διαδοχικούς διαλύτες εκχύλισης EtOAc, MeOH και H₂O συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα μπουκάλια. Τα βάρη των 12 εκχυλισμάτων και η απόδοση της εκχύλισης με κάθε διαλύτη για κάθε φυτικό είδος, δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

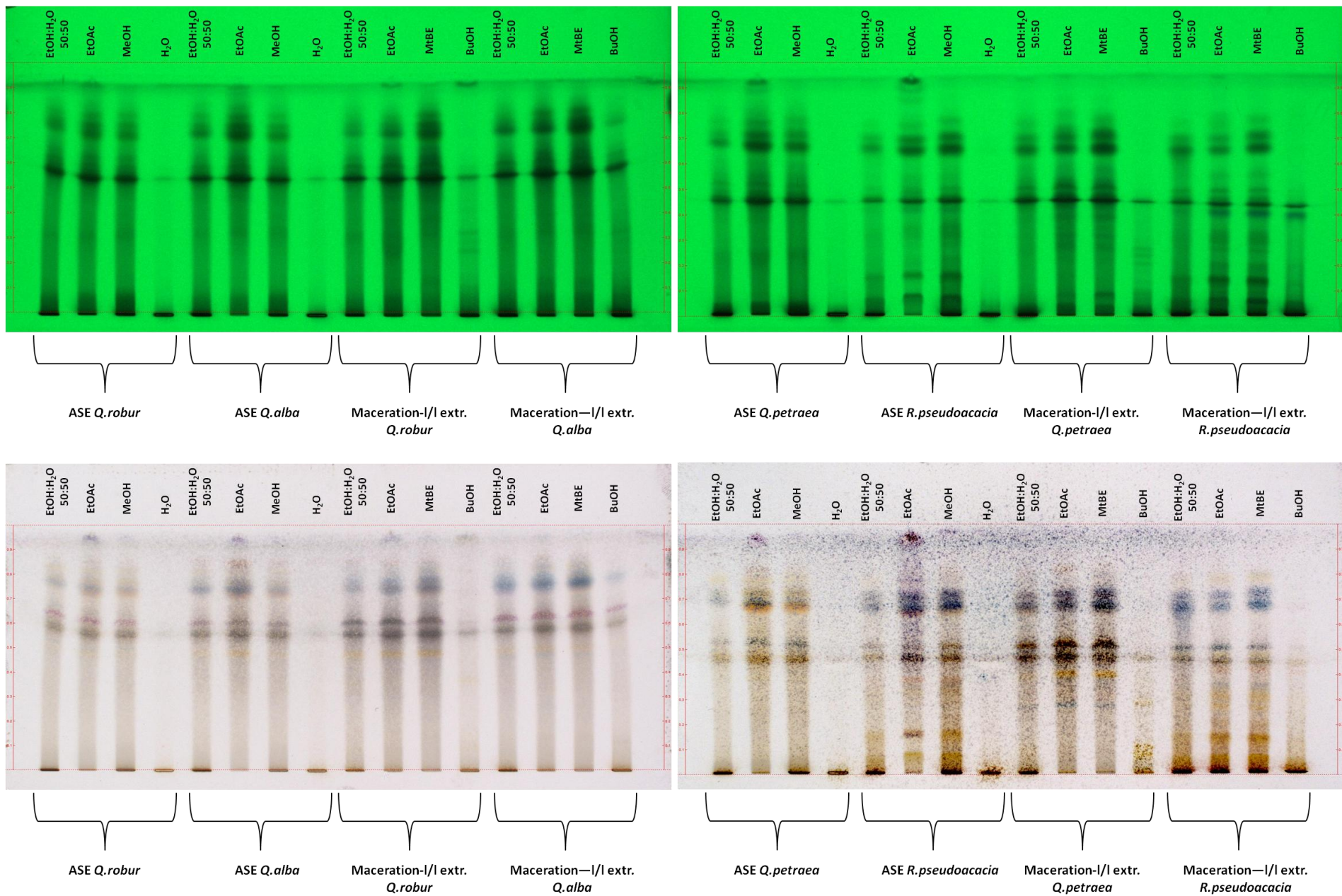
Πίνακας 24 Τα βάρη των δώδεκα εκχυλισμάτων και η απόδοση της εκχύλισης με κάθε διαλύτη για κάθε φυτικό είδος

Είδος Ξύλου	Διαλύτης	Βάρος (g)	% Απόδοση ASE
<i>Q. robur</i>	EtOAc	0.2128	1.06
	MeOH	2.1816	10.91
	H ₂ O	0.0556	0.28
<i>Q. alba</i>	EtOAc	0.4703	2.35
	MeOH	1.2216	6.11
	H ₂ O	0.1827	0.91
<i>Q. petraea</i>	EtOAc	0.2676	1.34
	MeOH	2.3256	11.63
	H ₂ O	0.2987	1.49
<i>R. pseudoacacia</i>	EtOAc	0.1068	0.53
	MeOH	1.4552	7.27
	H ₂ O	0.3782	1.89

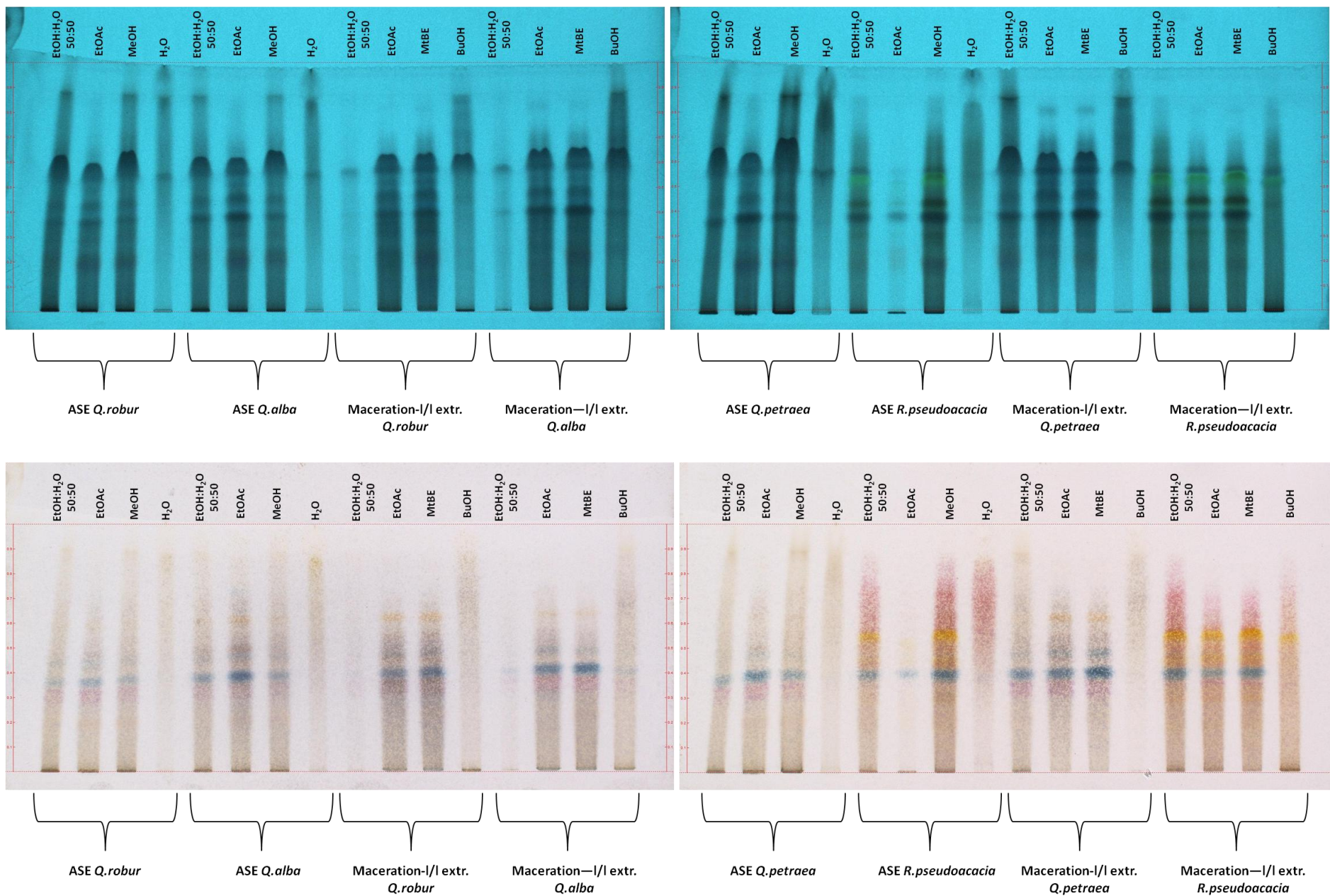
9.4 Σύγκριση φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC)

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκτέλεση της Συμβατικής Εκχύλισης με Διαβροχή (Maceration), της Υγρής-Υγρής Εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) και με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (ASE), υποβλήθηκαν ακολούθως σε Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), με απώτερο στόχο τον έλεγχο του φυτοχημικού τους προφίλ και τη σύγκριση των παραληφθέντων εκχυλισμάτων από την τεχνική της Συμβατικής Εκχύλισης με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης. Κατά τη διαδικασία της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), πραγματοποιήθηκε για όλα τα εκχυλίσματα παρασκευή συγκέντρωσης 5mg/mL και στη συνέχεια απόθεση ποσότητας 25 μ L εκάστου εκχυλίσματος σε κάθε 'spot' επί της πλάκας. Η παραλαβή των χρωματογραφημάτων όλων των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε πλάκες HPTLC κανονικής φάσης (Np) με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH:FA σε αναλογία 92:7:1 και σε πλάκες αντίστροφης φάσης (Rp) με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:5. Όλα τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στα 254 nm και 366 nm, ενώ πραγματοποιήθηκε εμφάνιση των κηλίδων στο ορατό ύστερα από ψεκασμό με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης και θέρμανση.

Από τη σύγκριση του φυτοχημικού προφίλ του συνόλου των παραληφθέντων εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPTLC, καθίσταται εμφανές ότι και οι δύο μέθοδοι εκχύλισης που ακολουθήθηκαν οδήγησαν στην παραλαβή του συνόλου των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών σε κάθε είδος, χωρίς έντονες διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων αντίστοιχης πολικότητας. Βάσει των δεδομένων της HPTLC κανονικής και αντίστροφης φάσης, τα ξύλα των ειδών *Q. robur* και *Q. alba* έχουν παρόμοιο χημικό προφίλ, ενώ το ξύλο του είδους *Q. petraea* παρουσιάζει πλουσιότερο χημικό φορτίο, γεγονός που αιτιολογεί την παραδοσιακή χρήση της γαλλικής δρυός στα βαρέλια παλαίωσης του οίνου. Το ξύλο του είδους *R. pseudoacacia* παρουσιάζει πλούσιο χημικό προφίλ και διαφορετικό σε σχέση με τα άλλα υπό μελέτη είδη του γένους *Quercus*, λόγω της παρουσίας φλαβονοειδών και συμπυκνωμένων ταννινών τύπου προρομπινετινιδίνης (προρομπινετίνες).



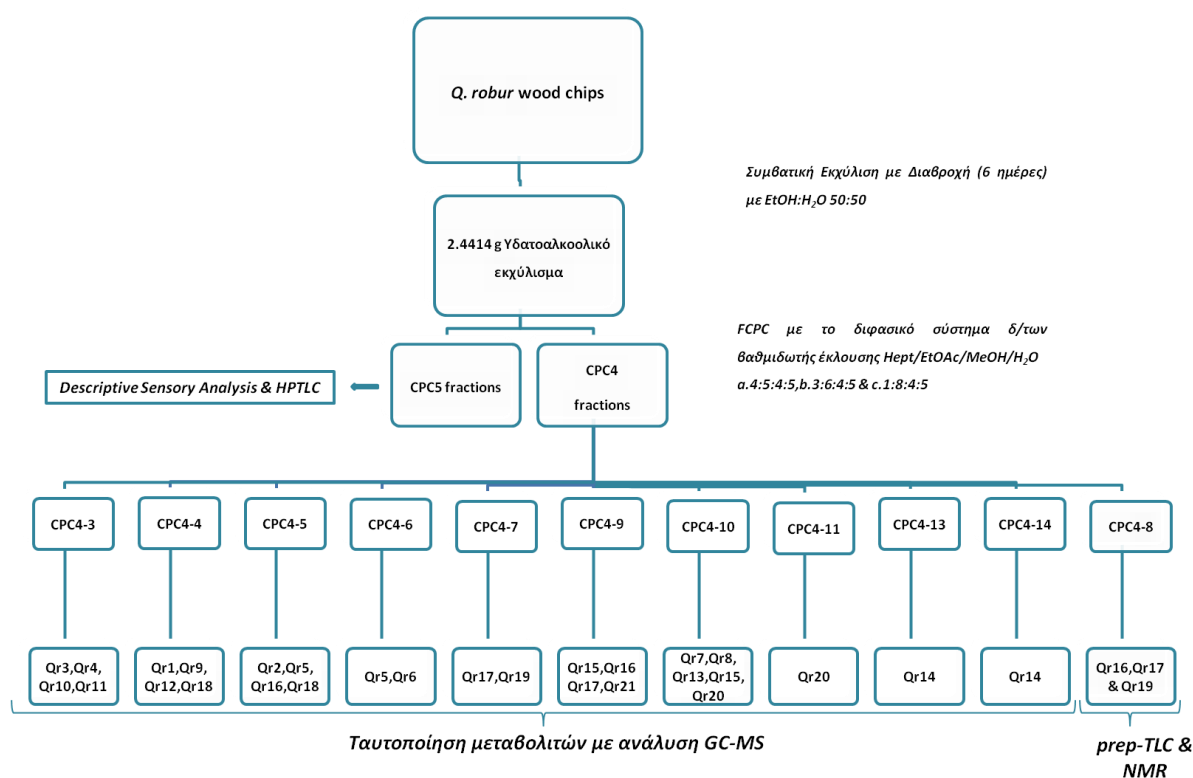
Εικόνα 55 Νρ ΗΡΤΙC όλων των εκχυλισμάτων και με τις δύο μεθόδους εκχύλισης, σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH:FA 92:7:1. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 56 Rp HPTLC όλων των εκχυλισμάτων και με τις δύο μεθόδους εκχύλισης σε σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA 40:60:5. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκάσμου με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση.

10 Μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου Σλαβονικής δρυός (*Quercus robur*)

Η χρήση του *Q. robur* στην παλαίωση του οίνου, η ελλιπής βιβλιογραφία ειδικά για το ξύλο *Q. robur* μετρίου βαθμού ψησίματος (MT: Medium Toasted) και η μη εφαρμογή της συζευγμένης τεχνικής FCPC-gustatometry σε μελέτες που αφορούν το συγκεκριμένο είδος, οδήγησαν στην περαιτέρω διερεύνηση της σύστασής του. Η μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου δρυός του είδους *Quercus robur*, που προέκυψε με την τεχνική της Συμβατικής Εκχύλισης με Διαβροχή, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το σχηματικό διάγραμμα που παρατίθεται κατωτέρω και κάθε απεικονιζόμενο σε αυτό πειραματικό στάδιο θα αναλυθεί στα υποκεφάλαια που ακολουθούν.



Εικόνα 57 Σχηματικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου Σλαβονικής δρυός (*Quercus robur*)

10.1 Κλασμάτωση εκχυλίσματος *Q. robur* με FCPC

Η μέθοδος της Ταχείας Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρωση (FCPC) χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου Σλαβονικής Δρυός (*Q. Robur*), το οποίο παραλήφθηκε με την τεχνική της Συμβατικής Εκχύλισης με Διαβροχή (Maceration). Η παρουσία στο υπό μελέτη υδατοαλκοολικό εκχύλισμα πλήθους συστατικών διαφορετικής χημικής κατηγορίας και πολικότητας (από άπολα απλά φαινολικά μόρια ως πολικές ταννίνες), κατέστησε δύσκολη την εύρεση του κατάλληλου συστήματος διαλυτών έκλουσης για την ικανοποιητική κλασμάτωση του εκχυλίσματος.

10.1.1 Επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών έκλουσης

Κατόπιν αναζήτησης σε σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα και με τη βοήθεια τριγωνικών διαγραμμάτων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διάφορα διφασικά και τριφασικά συστήματα διαλυτών, ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης, με τρεις ή και περισσότερους διαλύτες, σε διαφορετικές αναλογίες. Τα υπό δοκιμή συστήματα αξιολογήθηκαν ως προς τους κάτωθι παράγοντες:

- την ικανότητά τους να διαλύσουν ικανοποιητικά το προς κλασμάτωση δείγμα,
- την ικανότητα διαχωρισμού των φάσεων σε χρόνο μικρότερο του 1 min,
- την ικανοποιητική κατανομή των ουσιών και στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος αντίστοιχα (ιδανικά ο συντελεστής κατανομής κάθε ουσίας στις 2 φάσεις ενός διφασικού συστήματος $K_D = 1$).

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με ποσότητα εκχυλίσματος ανά δοκιμή 10-15 mg σε συνολικό όγκο συστήματος διαλυτών 4 mL. Το εκχύλισμα εφόσον, διαλύθηκε στο εκάστοτε διφασικό ή τριφασικό σύστημα και μετά από έντονη ανακίνηση, αφέθηκε σε ηρεμία έως ότου διαχωρίστηκαν οι δύο ή τρεις φάσεις αντίστοιχα. Στα συστήματα που παρατηρήθηκε επιτυχής διαχωρισμός των φάσεων, κάθε φάση ελέγχθηκε με χρωματογραφία TLC.

Τα διφασικά συστήματα ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης, που υποβλήθηκαν σε δοκιμές με την ανωτέρω περιγραφείσα διαδικασία παρατίθενται συνοπτικά στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 25 Διφασικά συστήματα ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης που υποβλήθηκαν σε δοκιμές

Διφασικά Συστήματα	Αναλογίες	Δοκιμές
Heptane: EtOAc: MeOH: H ₂ O	x/γ/z/w	12
Heptane: EtOAc: EtOH: H ₂ O	x/γ/z/w	1
Heptane: EtOAc: BuOH: MeOH: H ₂ O	x/γ/z/w/v	4
MtBE: EtOAc: MeOH: H ₂ O	x/γ/z/w	3
MtBE: EtOAc: AcN: H ₂ O	x/γ/z/w	5
Hept: EtOAc: AcN: H ₂ O	x/γ/z/w	1
H ₂ O:propan-2-ol:EtOAc	x/γ/z	1

Τα τριφασικά συστήματα που υποβλήθηκαν σε δοκιμές παρατίθενται συνοπτικά στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 26 Τριφασικά συστήματα που υποβλήθηκαν σε δοκιμές

Τριφασικά Συστήματα	Αναλογίες	Δοκιμές
Hept: EtOAc: AcN: H ₂ O	x/γ/z/w	2
Hept: MtBE: AcN: H ₂ O	x/γ/z/w	4

Συνολικά, υποβλήθηκαν σε δοκιμές 33 συστήματα από τα οποία απορρίφθηκαν τα 16 κατά τη διάρκεια του πρώτου ελέγχου, είτε λόγω κακής διαλυτότητας του εκχυλίσματος είτε λόγω δυσκολίας διαχωρισμού των φάσεων. Ακολούθησε ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC των υπόλοιπων 17 συστημάτων, από τον οποίο απορρίφθηκαν 11 συστήματα, λόγω της κατανομής της πλειονότητας των ουσιών στη μία από τις δύο φάσεις. Για την εκτέλεση του διαχωρισμού του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου Σλαβονικής Δρυός *Q. robur* (EtOH:H₂O 50:50), επιλέχθηκε αρχικά η μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης (gradient):

Πίνακας 27 Αρχικά επιλεχθέντα διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient)

Αριθμός Συστήματος	n-Hept	EtOAc	BuOH	MeOH	H ₂ O
A	2	4	0	1	5
B	1	5	0	1	5
C	1	4.5	0.5	1	5
D	0.5	4.5	1.5	1	5
E	0.5	3	2.5	1	5
F	0.5	2	4.5	1	5

Με το προαναφερόμενα διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης, πραγματοποιήθηκε αναλυτικό CPC (στήλη 50 mL) δύο φορές για την λήψη κλασμάτων επαρκούς ποσότητας (CPC-1 και CPC-2), με αρχική ποσότητα εκχυλίσματος *Q. robur* περίπου 330 mg στο CPC-1 και 320 mg στο CPC-2, καθένα από τα οποία διαλύθηκαν σε 2 mL στατικής φάσης MeOH:H₂O 1:5 και σε 2 mL της κινητής φάσης B. Ωστόσο, με τα συγκεκριμένα διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης, δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητική κλασμάτωση του

υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του είδους *Q. robur*. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε η μη κατακράτηση περιεχόμενων μεταβολιτών στην στατική φάση και έτσι αποφασίστηκε η εφαρμογή διφασικών συστημάτων βαθμιδωτής έκλυσης (gradient) με μειωμένη πολικότητα στατικής φάσης, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 28 Διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλυσης (gradient) που ακολούθως επιλέχθηκε

Αριθμός Συστήματος	n-Hept	EtOAc	EtOH	H ₂ O
a	40	50	40	50
b	30	60	40	50
c	10	80	40	50

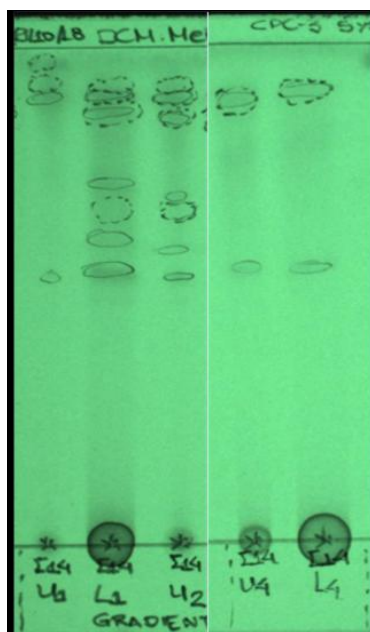
Με τα ανωτέρω διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλυσης, πραγματοποιήθηκε αναλυτικό (50 mL) CPC (CPC-3), το οποίο επίσης δεν οδήγησε σε ικανοποιητική κλασμάτωση του υπό μελέτη υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος καθώς δημιουργήθηκε γαλάκτωμα μέσα στη στήλη. Στη συνέχεια, αντικαταστάθηκε η αιθανόλη με μεθανόλη και με την ίδια αναλογία διαλυτών πραγματοποιήθηκε ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία (200 mL) CPC (CPC-4), με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Καταληκτικά, για την εκτέλεση του διαχωρισμού του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου Σλαβονικής Δρυός *Q. robur* (EtOH:H₂O 50:50) επιλέχθηκαν τα παρακάτω διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλυσης (gradient):

Πίνακας 29 Βέλτιστα διφασικά συστήματα βαθμιδωτής έκλυσης (gradient) για την εκτέλεση του διαχωρισμού

Αριθμός Συστήματος	n-Hept	EtOAc	MeOH	H ₂ O
a	40	50	40	50
b	30	60	40	50
c	10	80	40	50

Η επιλογή των συγκεκριμένων συστημάτων έκλυσης έγινε με βάση την ικανότητα της πολικής (MeOH/H₂O) κάτω φάσης (Lower phase), να συγκρατεί τις υδατοδιαλυτές ταννίνες και να επιτρέπει τον εμπλουτισμό του εκχυλίσματος με τα υπόλοιπα περιεχόμενα συστατικά, τα οποία και κλασματώνονται ικανοποιητικά. Παρατίθεται η TLC κανονικής φάσης (Np) στα 254 nm και σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10, με την προσομοίωση του διαχωρισμού με τα συγκεκριμένα συστήματα έκλυσης.



Εικόνα 58 Προσομοίωση του διαχωρισμού για το διφασικό σύστημα που επιλέχθηκε σε Nr TLC στα 254 nm και σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10

10.1.2 Εκτέλεση διαχωρισμού με FCPC

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) με ημιπαρασκευαστική στήλη 200 mL. Η ποσότητα του προς διαχωρισμού εκχυλίσματος, τόσο στο CPC4 όσο και στο CPC5 (αποτελεί επανάληψη του CPC4, προς αύξηση των ποσοτήτων των παραληφθέντων κλασμάτων), ήταν περίπου 1 g. Η παρασκευή του διφασικού συστήματος βαθμιδωτής έκλυσης (gradient) της σειράς Hept/EtOAc/MeOH/H₂O έγινε κατά απόλυτη αναλογία, με τη δοκιμή του συγκεκριμένου διφασικού συστήματος, κατά την προσομοίωση διαχωρισμού εντός του δοκιμαστικού σωλήνα. Για την παρασκευή συνολικού όγκου 1200 mL διφασικού συστήματος α, αναμίχθηκαν εντός της διαχωριστικής χοάνης 2 L: 266.7 mL Heptane, 333.3 mL EtOAc, 266.7 mL MeOH και 333.3 mL H₂O, βάσει της αναλογίας 40/50/40/50. Κατόπιν ανακίνησης της διαχωριστικής χοάνης, εξισορρόπησης των διαλυτών και διαχωρισμού των 2 φάσεων, απομακρύνθηκε η άνω φάση (UP) η οποία και αποτέλεσε την πρώτη κινητή και η κάτω φάση (LP) χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση. Η ανωτέρω διαδικασία επαναλήφθηκε κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο, για την παρασκευή και των κινητών φάσεων b και c, με ανάμιξη εκ νέου των ποσοτήτων που προβλέπονταν, σύμφωνα με τις αναλογίες των συστημάτων b και c που φαίνονται στον παραπάνω πίνακα. Επομένως, η κινητή φάση b αποτέλεσε τη δεύτερη κινητή και η κινητή φάση c αποτέλεσε την τρίτη κινητή φάση. Οι εξισορροπημένες στατικές φάσεις από την προετοιμασία των συστημάτων

b και c, χρησιμοποιήθηκαν κατά την τελευταία φάση εκτέλεσης του διαχωρισμού, τη φάση της “εξώθησης” (extrusion).

Η πλήρωση της στήλης με τη στατική φάση (LP) πραγματοποιήθηκε σε ‘descending mode’ χωρίς περιστροφή, με ροή 25 mL/min για 16 min. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αλλαγή σε ‘ascending mode’ και πλήρωση της στήλης με την πρώτη κινητή φάση (UP) με ροή 10 mL/min και 1200 rpm, έως την εξισορρόπηση των δύο φάσεων μέσα στη στήλη. Μετά την εξισορρόπηση, έγινε εισαγωγή του δείγματος με ένεση στο “loop” της συσκευής και ξεκίνησε η συλλογή κλασμάτων. Κατόπιν της εισαγωγής του δείγματος και κατά τη διάρκεια της έκλουσης με την πρώτη κινητή φάση (UP), οι στροφές αυξήθηκαν στις 1500 rpm, για την ελαχιστοποίηση της απώλειας στατικής φάσης (λόγω διαταραχής της ισορροπίας των διαλυτών εξαιτίας της εισαγωγής του δείγματος). Κατά την έκλουση με τη δεύτερη κινητή, οι στροφές αυξήθηκαν στις 1700 rpm και η ροή κατέβηκε στα 9.5 mL/min. Κατά την έκλουση με την τρίτη κινητή φάση, οι στροφές αυξήθηκαν στις 1900 rpm και η ροή κατέβηκε στα 9 mL/min, λόγω της δημιουργίας γαλακτώματος στη μεσεπιφάνεια του διαφασικού συστήματος, φαινόμενο που μετά τη συλλογή 5 κλασμάτων εξαλείφθηκε. Καταληκτικά, με τη διαδικασία της “εξώθησης” (extrusion), η στατική φάση η οποία προέκυψε από την εξισορρόπηση του συστήματος c, χρησιμοποιήθηκε ως κινητή για την εξώθηση των συστατικών, που είχαν παραμείνει εντός της στήλης.

10.1.2.1 FCPC στο υδατοαλκοολικό (Maceration EtOH:H₂O 50:50) εκχύλισμα του ξύλου του φυτού *Quercus robur*-CPC4

Κατά την εκτέλεση του CPC4, 950 mg του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του φυτού *Quercus robur* διαλύθηκαν σε 10 mL του διαφασικού συστήματος (3 mL UP_a, 7 mL LP), για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη. Συνολικά, συλλέχθηκαν 157 κλάσματα των 10 mL και πραγματοποιήθηκε έκπλυση της στήλης με MeOH:H₂O 50:50, μίγμα διαλυτών στο οποίο γίνεται και η αποθήκευση της στήλης του CPC.

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν με την πρώτη κινητή φάση (UP_a), με τη δεύτερη κινητή φάση (UP_b) και με την τρίτη κινητή φάση (UP_c) καθώς και με τη στατική φάση που προήλθε από την εξισορρόπηση του συστήματος c (LP’), δίνονται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 30 Παραληφθέντα κλάσματα με κάθε κινητή φάση

Κινητές φάσεις	Κλάσματα
UP _a	1-30
UP _b	31-76

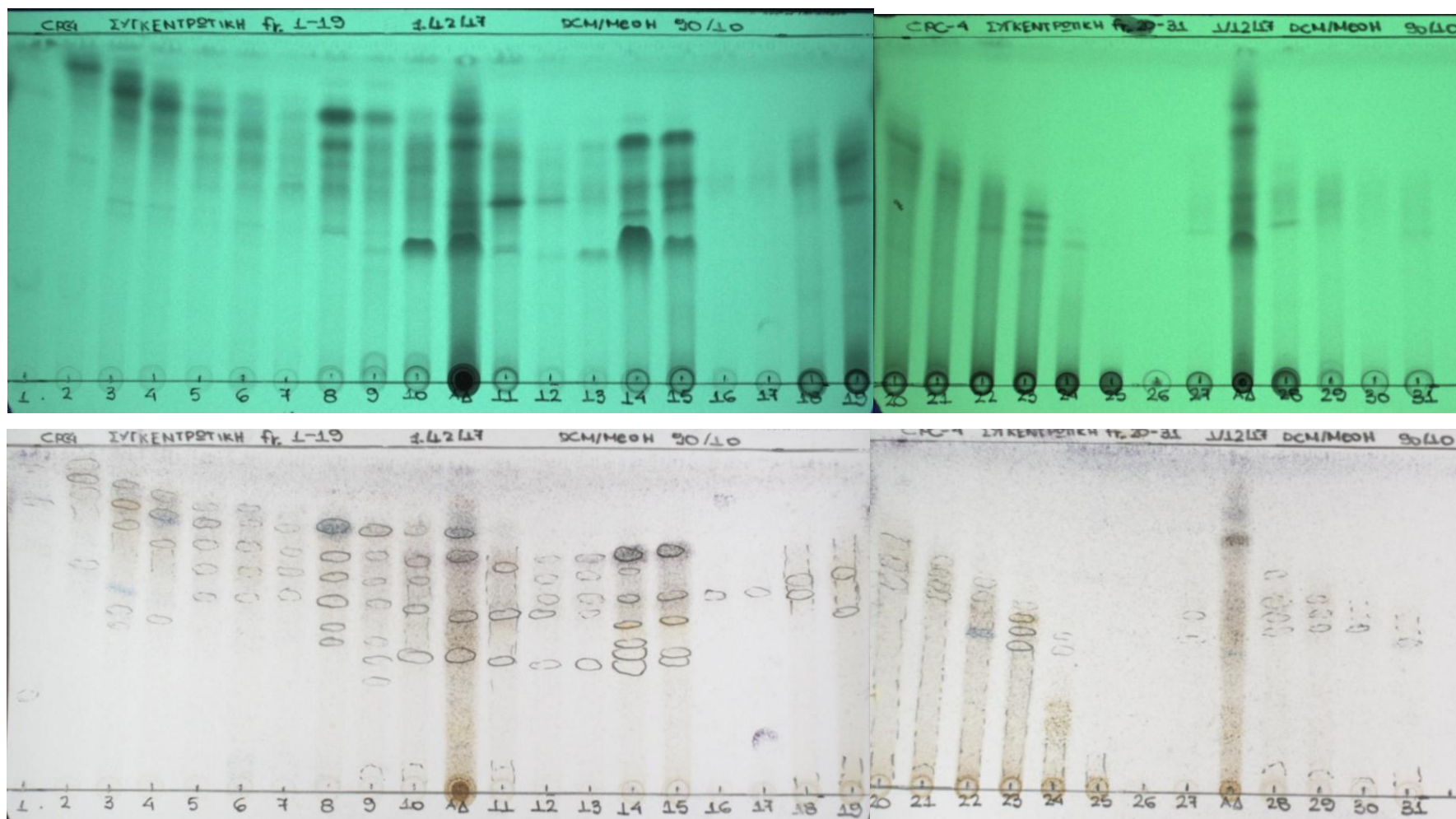
UP _c	77-106
LP'	107-157

Τα 157 συλλεχθέντα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης Np-TLC με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10. Ακολούθως, βάσει παρόμοιου χημικού προφίλ, τα αρχικά κλάσματα συνενώθηκαν. Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν καθώς και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 31 Βάρη των συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από το CPC-4

Συνενωμένα Κλάσματα CPC4	Βάρος (mg)
EK.W.SLAV. CPC4-1 Fr.1-5	4.7
EK.W.SLAV. CPC4-2 Fr.6-10	8.1
EK.W.SLAV. CPC4-3 Fr.11-20	17.5
EK.W.SLAV. CPC4-4 Fr.21-31	20.1
EK.W.SLAV. CPC4-5 Fr.32-36	9.8
EK.W.SLAV. CPC4-6 Fr.37-40	8.4
EK.W.SLAV. CPC4-7 Fr.41-43	10.5
EK.W.SLAV. CPC4-8 Fr. 44-48	24
EK.W.SLAV. CPC4-9 Fr.49-53	14.3
EK.W.SLAV. CPC4-10 Fr.54-65	23.7
EK.W.SLAV. CPC4-11 Fr.66-78	27.5
EK.W.SLAV. CPC4-12 Fr.79-81	5.3
EK.W.SLAV. CPC4-13 Fr.82-83	5.3
EK.W.SLAV. CPC4-14 Fr.84-87	36.7
EK.W.SLAV. CPC4-15 Fr.88-92	46.4
EK.W.SLAV. CPC4-16 Fr.93U	0.7
EK.W.SLAV. CPC4-17 Fr.93L	4.7
EK.W.SLAV. CPC4-18 Fr.94-95	13.9
EK.W.SLAV. CPC4-19+27+28 Fr.96-100	35.1
EK.W.SLAV. CPC4-20 Fr.101-104U	35.1
EK.W.SLAV. CPC4-21 Fr.105-111U	49.4
EK.W.SLAV. CPC4-22+30 Fr.112-121U	48.9
EK.W.SLAV. CPC4-23 Fr.122-125 Extr.	49.2
EK.W.SLAV. CPC4-24 Fr.126-130 Extr.	205.8
EK.W.SLAV. CPC4-25 Fr.131-137	152.1
EK.W.SLAV. CPC4-26 Fr.138-πλυσ. Extr.	11
EK.W.SLAV. CPC4-29 Fr.102-110L	7.3
EK.W.SLAV. CPC4-31 Fr.114-121L	5.4
Άθροισμα βάρους κλασμάτων	880.9
Απόδοση %	92.7

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων 1-31, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC), σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH σε αναλογία 90:10, στα 254 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και θέρμανση, δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 59 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-31 του CPC4 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 90:10

10.1.2.2 Επαναληπτικό FCPC στο υδατοαλκοολικό (Maceration EtOH:H₂O 50:50) εκχύλισμα του ξύλου του φυτού *Quercus robur*-CPC5

Κατά την εκτέλεση του CPC5, 1,4914 g του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του *Quercus robur* διαλύθηκαν σε 10 mL του διφασικού συστήματος (3 mL UP_a, 7 mL LP), για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη. Συνολικά, συλλέχθηκαν 120 κλάσματα των 10 mL και πραγματοποιήθηκε έκπλυση της στήλης με MeOH:H₂O 50:50, μίγμα διαλυτών στο οποίο γίνεται και η αποθήκευση της στήλης του CPC.

Το CPC5 πραγματοποιήθηκε με ανάλογο τρόπο με το CPC4, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή επαναληψιμότητα της κλασμάτωσης του εκχυλίσματος. Να σημειωθεί ότι η εκτέλεση του CPC5 αποσκοπούσε στην αύξηση των ποσοτήτων των CPC κλασμάτων του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του *Quercus robur*, γεγονός που θα διευκόλυne ακολούθως τη διεξοδικότερη μελέτη του συγκεκριμένου εκχυλίσματος.

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν με την πρώτη κινητή φάση (UP_a), με τη δεύτερη κινητή φάση (UP_b) και με την τρίτη κινητή φάση (UP_c) καθώς και με τη στατική φάση που προήλθε από την εξισορρόπηση του συστήματος c (LP'), δίνονται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 32 Παραληφθέντα κλάσματα με κάθε κινητή φάση

Κινητές φάσεις	Κλάσματα
UP _a	1-28
UP _b	29-62
UP _c	63-87
LP'	88-120

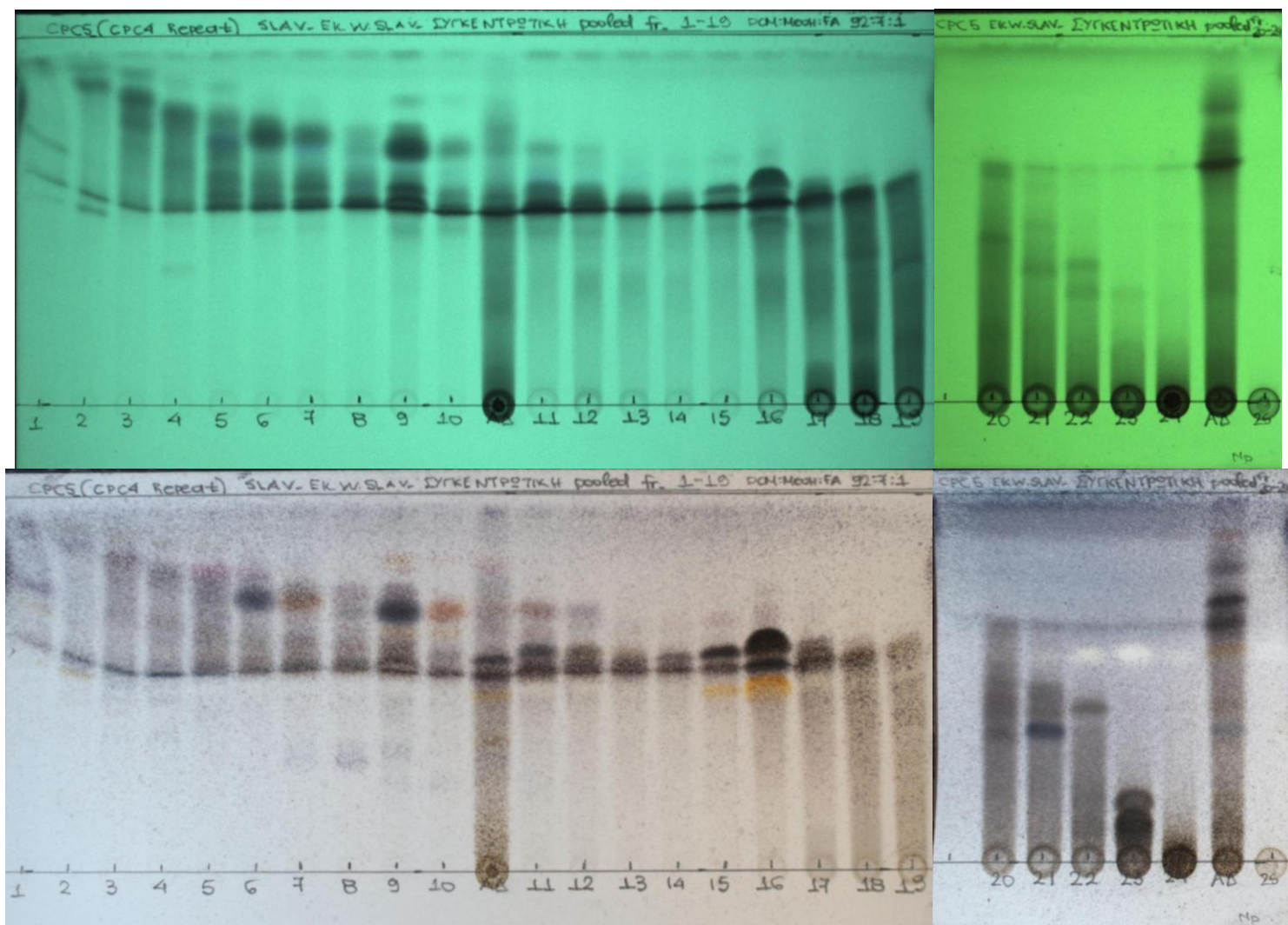
Τα 120 συλλεχθέντα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης Np-TLC με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10. Ακολούθως, βάσει παρόμοιου χημικού προφίλ, τα αρχικά κλάσματα συνενώθηκαν. Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν καθώς και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 33 Βάρη των συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από το CPC-5

Συνενωμένα Κλάσματα CPC5	Βάρος (mg)
EK.W.SLAV. CPC5-1 Fr. 1-4	8.3
EK.W.SLAV. CPC5-2 Fr. 5-7	6.5
EK.W.SLAV. CPC5-3 Fr.8-11	10.4
EK.W.SLAV. CPC5-4 Fr.12-15	12.6
EK.W.SLAV. CPC5-5 Fr.16-20	15.4
EK.W.SLAV. CPC5-6 Fr. 21-24	15.2
EK.W.SLAV. CPC5-7 Fr.25-28	13.8
EK.W.SLAV. CPC5-8 Fr.29-34	18.7
EK.W.SLAV. CPC5-9 Fr.35-40	46.6
EK.W.SLAV. CPC5-10 Fr.41-43	17.8

EK.W.SLAV. CPC5-11 Fr.44-50	42.2
EK.W.SLAV. CPC5-12 Fr.51-54	22.1
EK.W.SLAV. CPC5-13 Fr.55-59	25.1
EK.W.SLAV. CPC5-14 Fr.60-61	8.2
EK.W.SLAV. CPC5-15 Fr.62-66	30.9
EK.W.SLAV. CPC5-16 Fr.67-72	87
EK.W.SLAV. CPC5-17 Fr.73-76	62.2
EK.W.SLAV. CPC5-18 Fr.77-81	108.3
EK.W.SLAV. CPC5-19 Fr.82-86	88.7
EK.W.SLAV. CPC5-20 Fr.87-91	55.5
EK.W.SLAV. CPC5-21 Fr.92-98	60.8
EK.W.SLAV. CPC5-22 Fr.99-102	102.7
EK.W.SLAV. CPC5-23 Fr. 103-105	211.5
EK.W.SLAV. CPC5-24 Fr.106-108	326.3
EK.W.SLAV. CPC5-25 FR.109-120	9.1
Άθροισμα βάρους κλασμάτων	1405.9
Απόδοση %	94.3

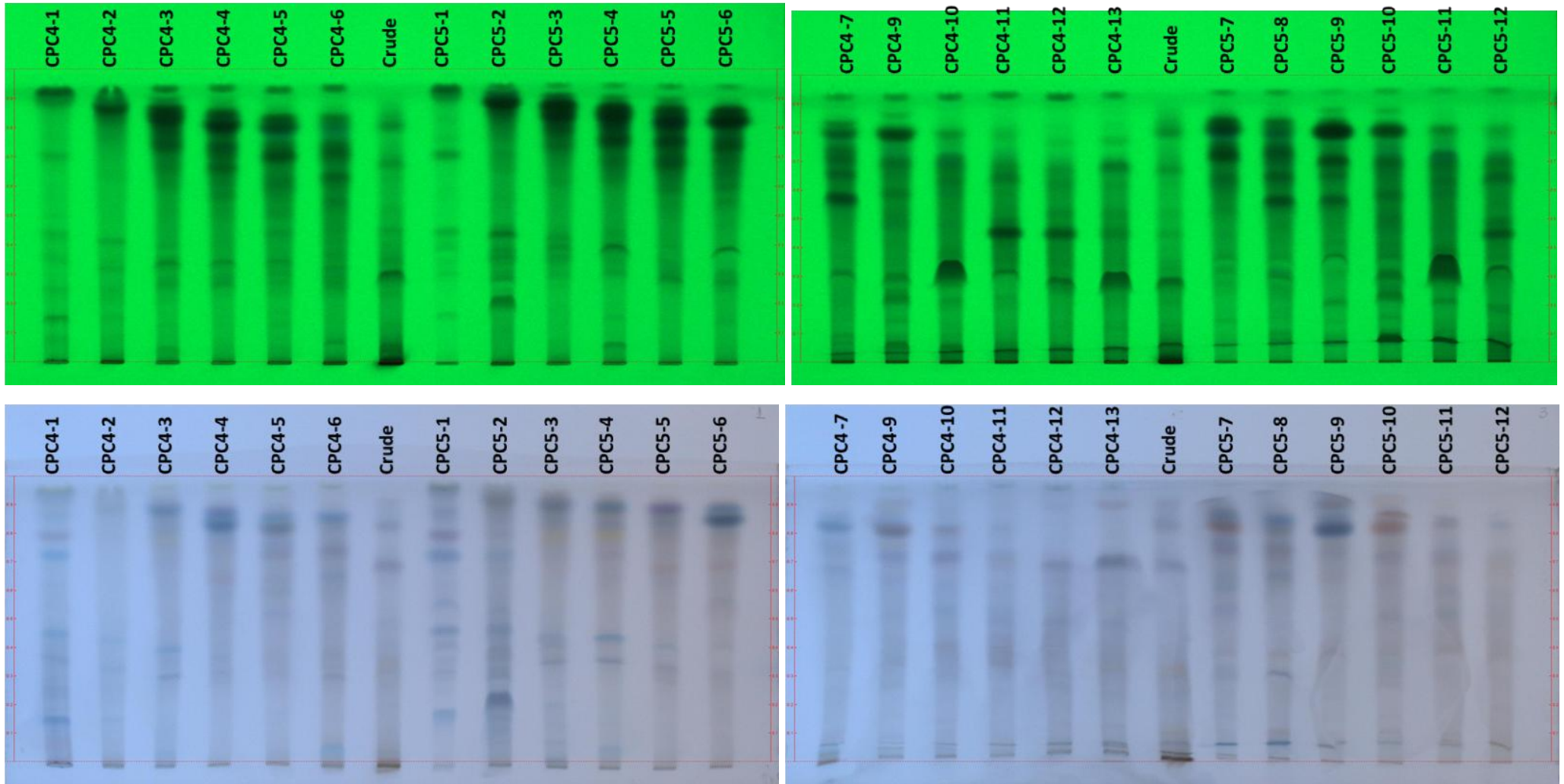
Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων 1-19, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC), με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH σε αναλογία 90:10, στα 254 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και θέρμανση, δίνεται παρακάτω:



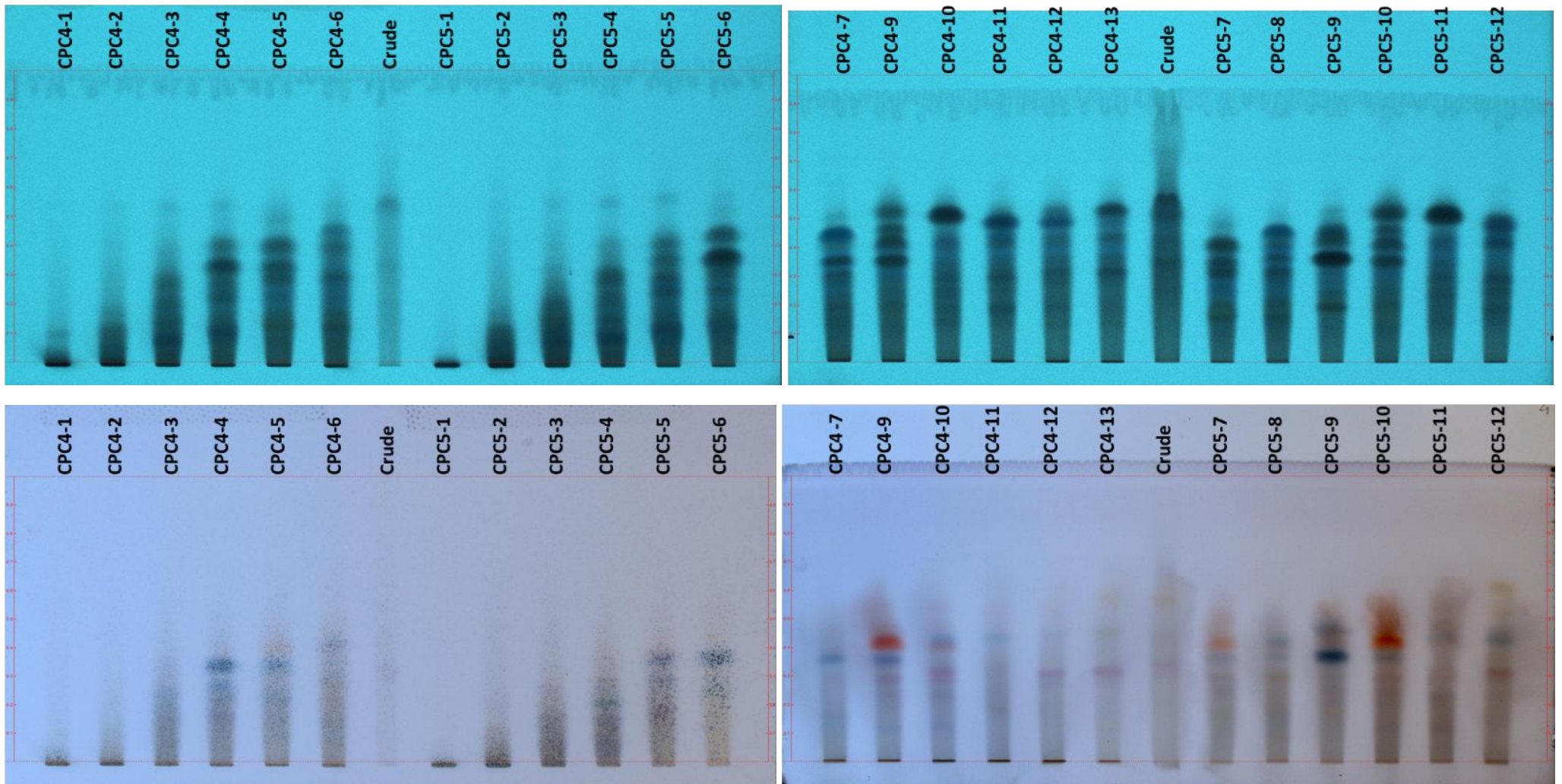
Εικόνα 60 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-25 του CPC5 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 90:10

10.2 Έλεγχος φυτοχημικού προφίλ κλασμάτων FCPC (CPC4 και CPC5) με HPTLC

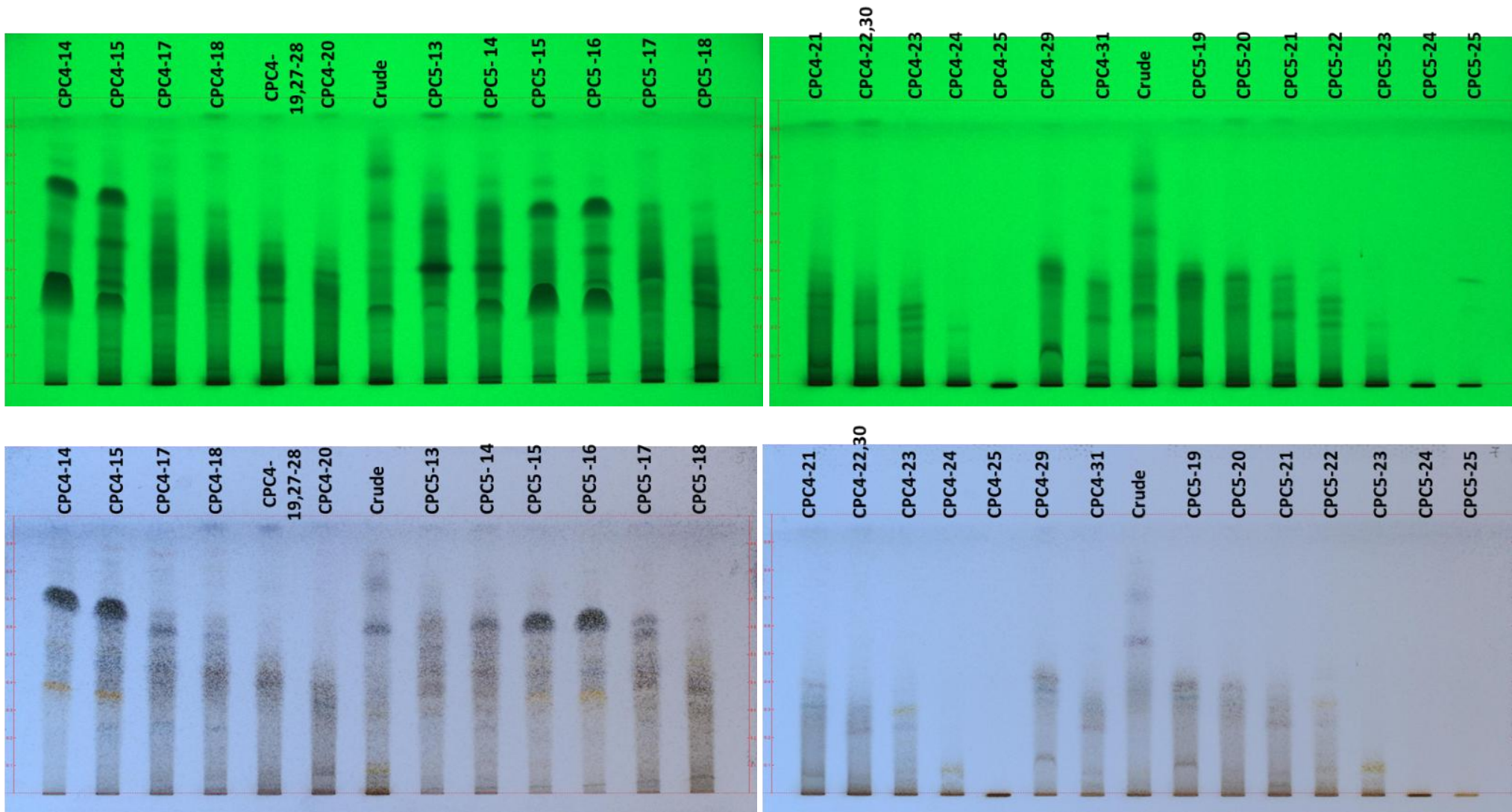
Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την εκτέλεση της Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση CPC4 και CPC5, υποβλήθηκαν ακολούθως σε συγχρωματογράφιση με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), με απώτερο στόχο τον πλήρη έλεγχο του φυτοχημικού τους προφίλ και τη σύγκριση μεταξύ του φυτοχημικού προφίλ των κλασμάτων του CPC4 και του CPC5. Η διαδικασία της Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), πραγματοποιήθηκε με παρασκευή διαλυμάτων των κλασμάτων σε συγκέντρωση 5 mg/mL και με απόθεση ποσότητας 25 μ L έκαστου κλάσματος σε κάθε 'spot' επί της πλάκας. Πραγματοποιήθηκε HPTLC κανονικής φάσης για το σύνολο των κλασμάτων των δύο CPC, με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH σε αναλογία 93:7. Επίσης, πραγματοποιήθηκε HPTLC αντίστροφης φάσης για το σύνολο των κλασμάτων των δύο CPC, με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:0.5. Όπως φαίνεται και από τις HPTLC που ακολουθούν, υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση του φυτοχημικού προφίλ των κλασμάτων του CPC-4 με τα κλάσματα του CPC-5, γεγονός που καταδεικνύει την επαναληψιμότητα της τεχνικής του FCPC.



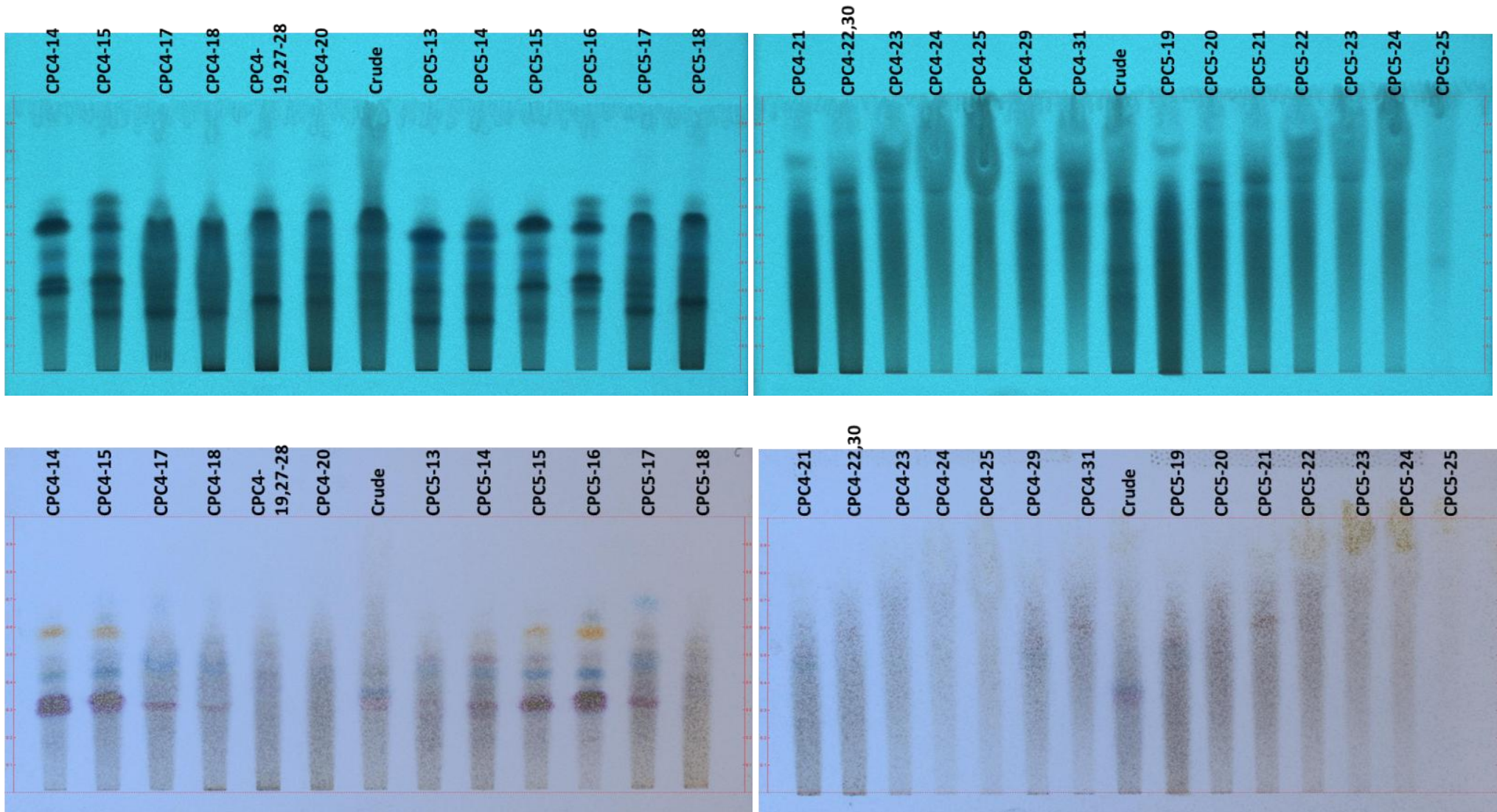
Εικόνα 61 Nr HPTLC των κλασμάτων CPC4 1-13 και CPC5 1-12 σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 93:7. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 62 Rp HPTLC των κλασμάτων CPC4 1-13 και CPC5 1-12 σε σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA 40:60:0.5. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 63 Νρ ΗΡΤΛC των κλασμάτων CPC4 14-31 και CPC5 13-25 σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 93:7. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση.



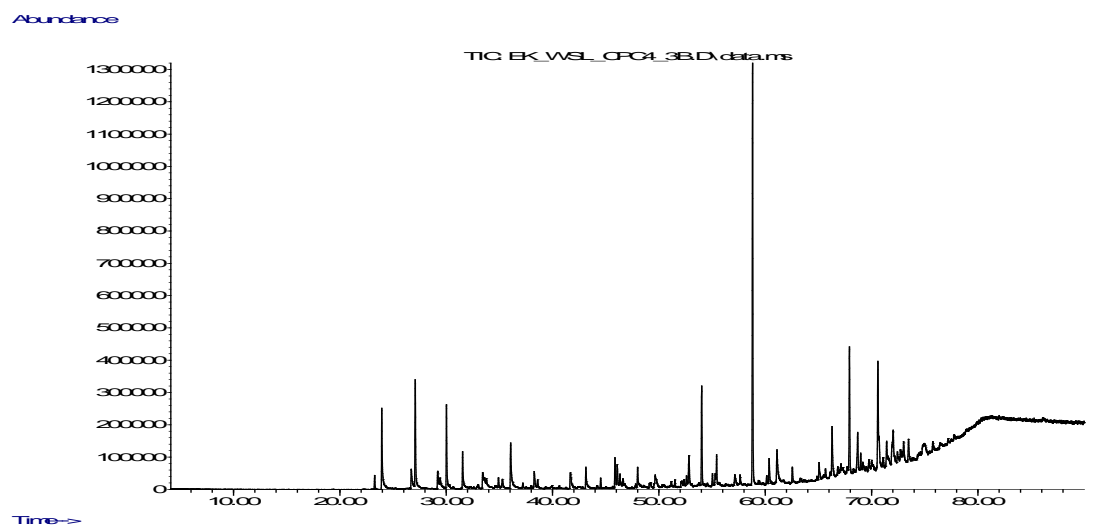
Εικόνα 64 Rp HPTLC των κλασμάτων CPC4 14-31 και CPC5 13-25 σε σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA 40:60:0.5. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.

10.3 Έλεγχος πτητικών συστατικών κλασμάτων FCPC με GC-MS

Τα συνενωμένα κλάσματα CPC4 1-14 υποβλήθηκαν σε Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS), προς ταυτοποίηση των κυριότερων πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών τους. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή “Agilent Hewlett Packard 5973-6890 GC-MS” (EI mode), με στήλη “HP-5MS” (30 m x 0.25 mm με 0.25 μm) και φέρον αέριο He (ροή 1 mL/min). Το πρόγραμμα μεταβολής της θερμοκρασίας της στήλης, το οποίο ακολουθήθηκε για τη βαθμιδωτή έκλυση των συστατικών είχε αρχική τιμή θερμοκρασίας 60 °C και ρυθμό ανόδου 3 °C/min μέχρι τους 280 °C, όπου και παρέμεινε σταθερή για 15 λεπτά. Συνεπώς, ο συνολικός χρόνος ανάλυσης υπολογίζεται στα 93 min. Παρακάτω, παρατίθενται τα χρωματογραφήματα των κλασμάτων του CPC4 και τα κυριότερα περιεχόμενα σε κάθε κλάσμα πτητικά συστατικά σε πίνακες:

Τα κλάσματα CPC4-1 και CPC4-2 περιείχαν κυρίως παράγωγα φθαλικού εστέρα και σιλανίου, συνεπώς επιμολύνσεις προερχόμενες από τη στήλη και όχι κάποιο αξιόλογο δευτερογενή μεταβολίτη για αυτό, και τα χρωματογραφήματά τους δεν παρατίθενται.

- **Κλάσμα CPC4-3**

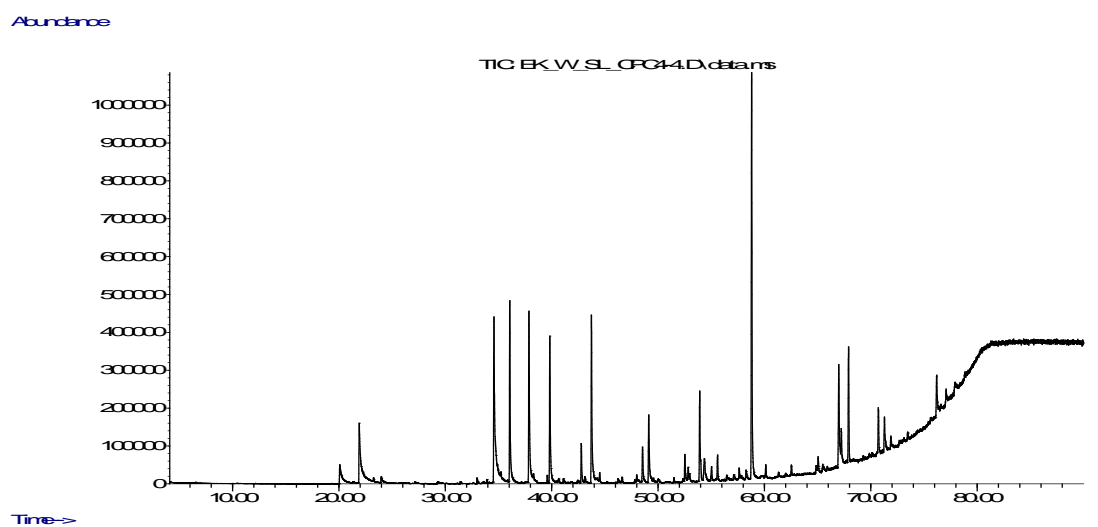


Εικόνα 65 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-3

Πίνακας 34 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-3

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time:RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	23.944	4-μεθυλοσυριγγόλη	5.03
2	26.723	Βανιλλικός μεθυλεστέρας	1.71
3	30.025	4-αλλυλοσυριγγόλη	4.25
4	31.545	Ομοβανιλλικός αιθυλεστέρας	2.18

- **Κλάσμα CPC4-4**

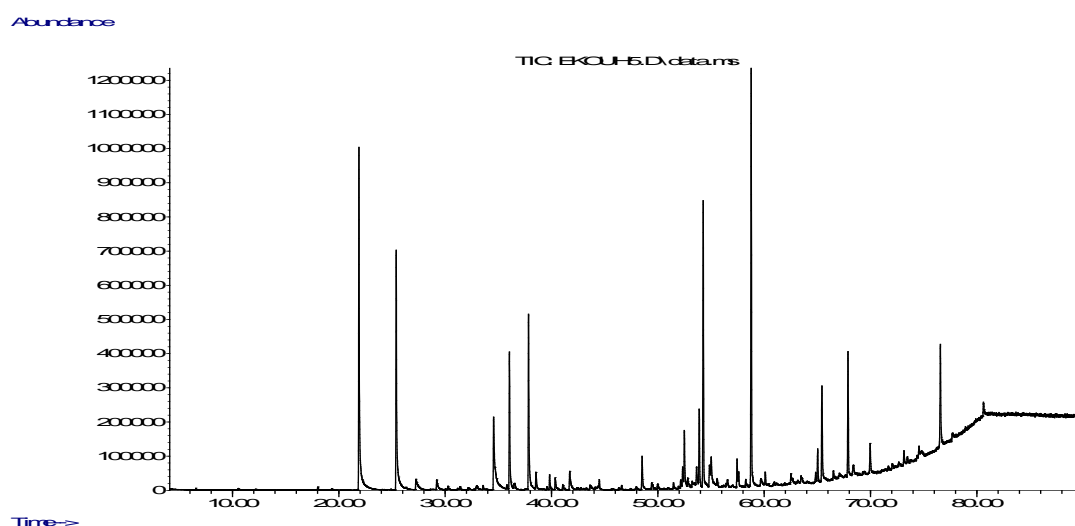


Εικόνα 66 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-4

Πίνακας 35 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-4

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time:RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	20.091	συριγγόλη	1.14
2	21.920	βανιλίνη	3.18
3	34.579	κονιφεραλδεΐδη	6.14
4	36.063	Συριγγικός μεθυλεστέρας	4.46
5	39.828	Οξικός διφαιθυλεστέρας	3.88

- **Κλάσμα CPC4-5**

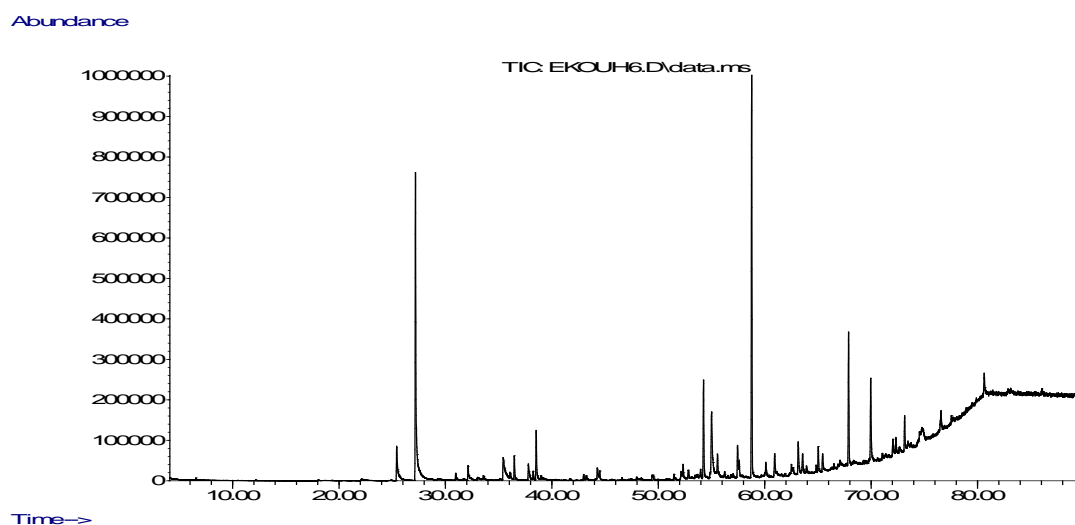


Εικόνα 67 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-5

Πίνακας 36 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-5

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time:RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	21.891	βανιλίνη	12.86%
2	25.396	ακετοβανιλλόνη	9.53%
3	27.264	μεθυλοβανιλλόνη	0.88%
4	34.565	κονιφεραλδεύδη	5.12%
5	36.044	συριγγικός μεθυλεστέρας	4.64%
6	37.844	4-φαινυλοπροπιοφαινόνη	6.50%

- **Κλάσμα CPC4-6**

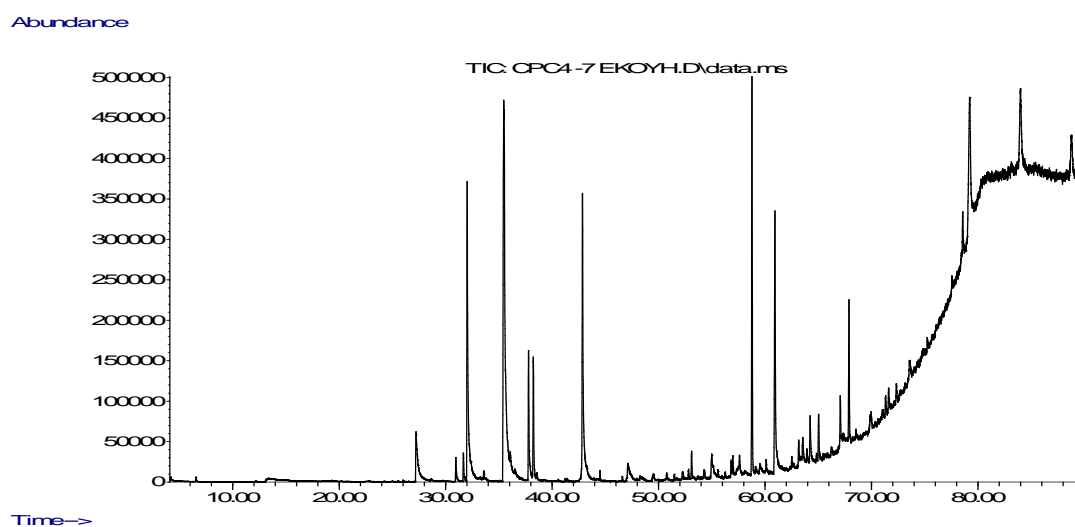


Εικόνα 68 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-6

Πίνακας 37 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-6

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time:RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	25.424	ακετοβανιλλόνη	2.48%
2	27.185	μεθυλοβανιλλόνη	16.57%
3	36.472	3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο-2-προπανόνη	1.10%
4	55.009	4,4'-διγουαγιακόλη	6.01%

- **Κλάσμα CPC4-7**

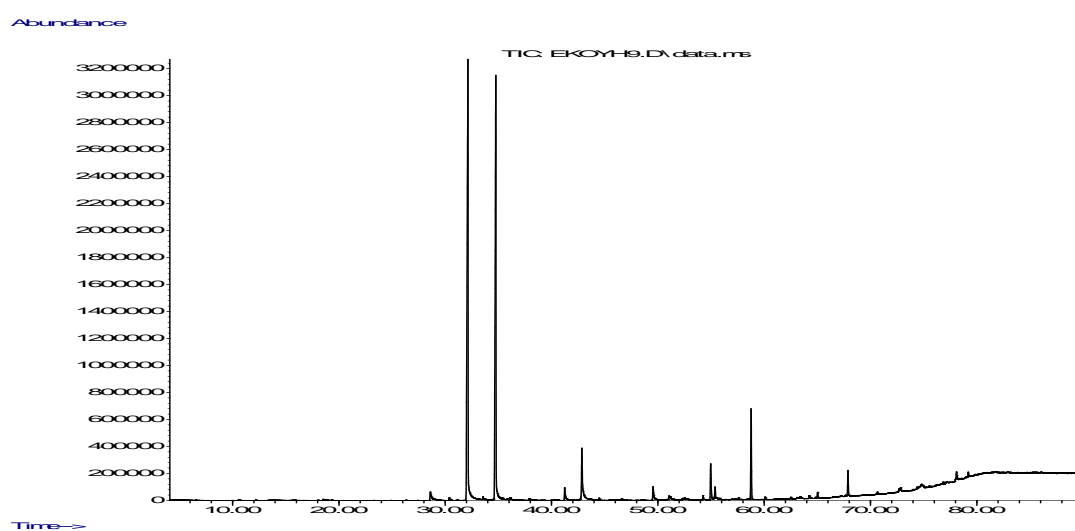


Εικόνα 69 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-7

Πίνακας 38 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-7

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	27.228	μεθυλοβανιλόνη	2.24%
2	32.026	συριγγαλδεΐδη	8.35%
3	37.791	(1,1'-διφαινυλο)-4-προπανοϊκό οξύ	2.70%
4	42.857	σιναπαλδεΐδη	7.97%

- **Κλάσμα CPC4-9**

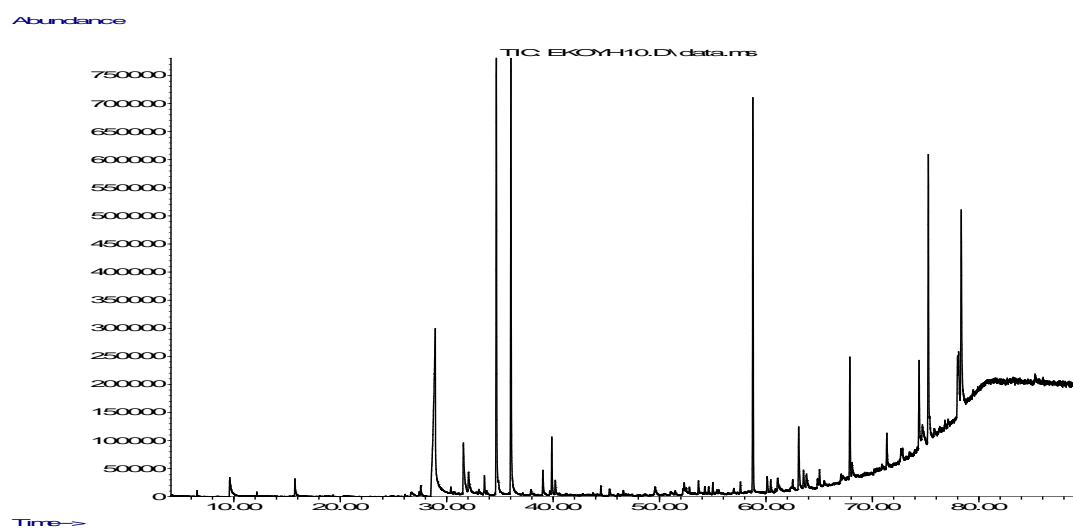


Εικόνα 70 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-9

Πίνακας 39 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-9

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	28.608	2,6-διμεθοξυβενζοκινόνη	0.83%
2	32.119	συριγγαλδεΐδη	36.92%
3	34.750	ακετοσυριγγόνη	32.10%
4	41.246	ασαρόνη	1.05%
5	42.853	σιναπαλδεΐδη	4.91%

- **Κλάσμα CPC4-10**

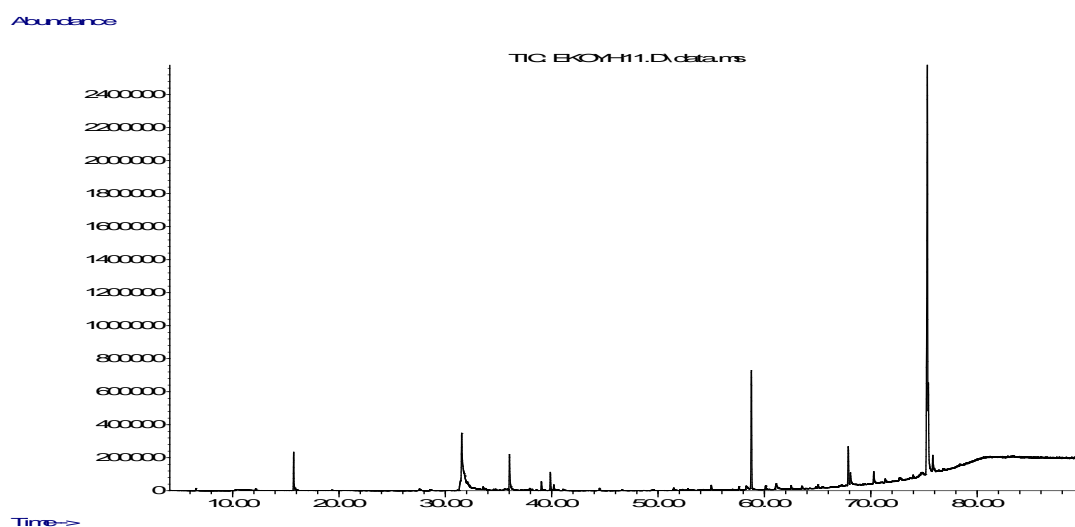


Εικόνα 71 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-10

Πίνακας 40 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-10

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	9.626	ο-γουαγιακόλη	1.06%
2	28.908	Ισοβανιλικό οξύ	14.57%
3	31.580	Διϋδροκονιφερυλική αλκοόλη	2.72%
4	32.059	συριγγαλδεΐδη	1.15%
5	33.553	<i>trans</i> -4-προπενυλοσυριγγόλη	0.48%
6	34.664	ακετοσυριγγόνη	11.65%
7	36.036	1-(2,6-διϋδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)βουταν-1-όνη	11.93%

- **Κλάσμα CPC4-11**



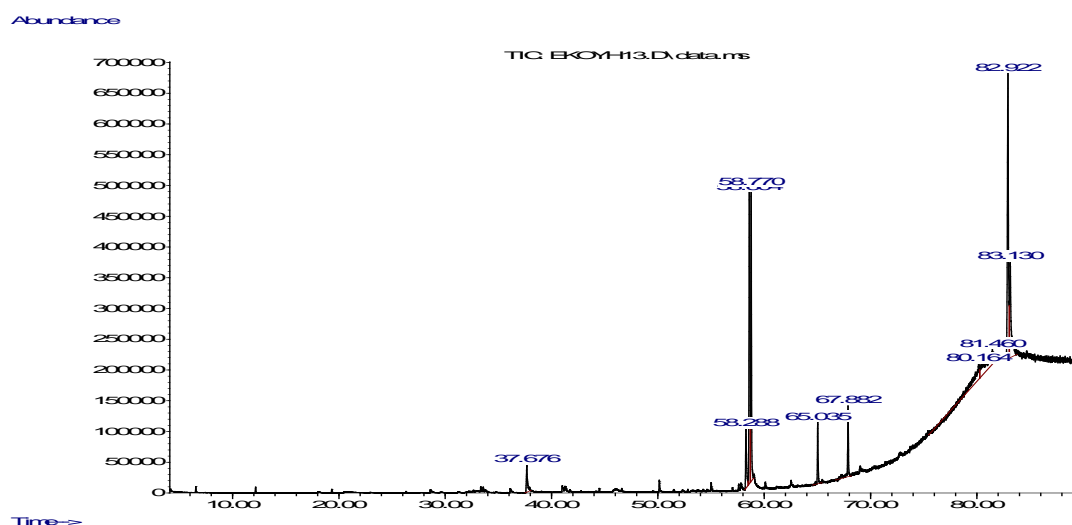
Εικόνα 72 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-11

Πίνακας 41 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-11

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	31.545	Διϋδροκονιφερυλική αλκοόλη	11.37%
2	36.035	1-(2,6-διϋδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)βουταν-1-όνη	3.02%

Το κλάσμα CPC4-12 περιέχει κυρίως παράγωγα φθαλικού εστέρα και σιλανίου, συνεπώς επιμολύνσεις προερχόμενες και από τη στήλη και όχι κάποιο αξιόλογο δευτερογενή μεταβολίτη γι αυτό, και το χρωματογράφημά του δεν παρατίθενται.

- **Κλάσμα CPC4-13**

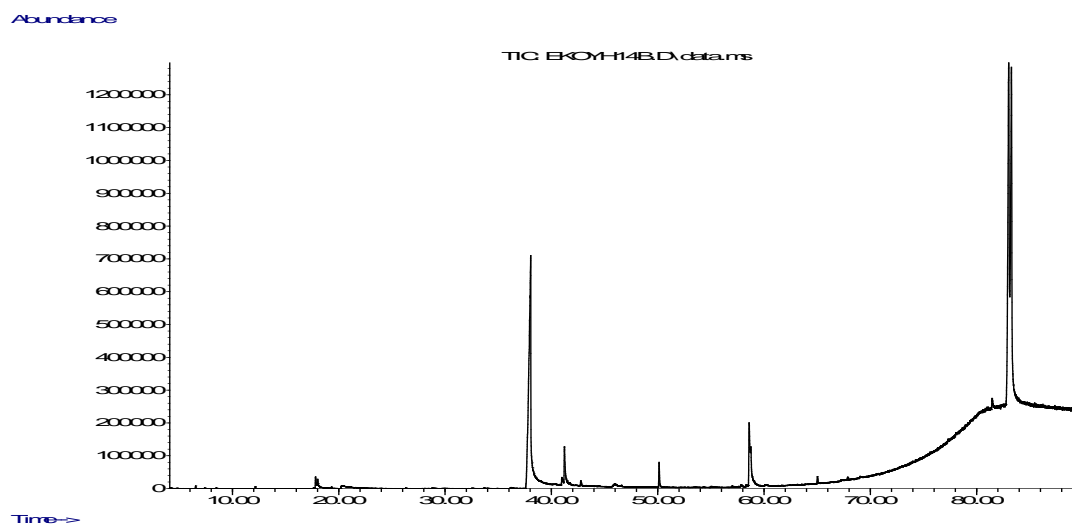


Εικόνα 73 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-13

Πίνακας 42 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-13

Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	37.676	Συριγγικό οξύ	2.50%
2	58.604	1-μεθυλο-3-φαινυλομεθυλο-βενζόλιο	18.05%

- **Κλάσμα CPC4-14**



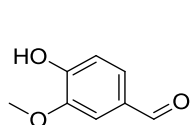
Εικόνα 74 Χρωματογράφημα του κλάσματος CPC4-14

Πίνακας 43 Πτητικά συστατικά που περιέχονται στο κλάσμα CPC4-14

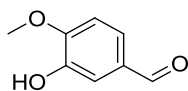
Κορυφή	Χρόνος συγκράτησης (Retention Time RT min)	Συστατικό	Ποσοστό %
1	18.015	Θυμόλη	0.49%
2	38.032	Συριγγικό οξύ	29.39%

Να σημειωθεί ότι η παρουσία κετονών στα κλάσματα του FCPC αιτιολογείται από την επεξεργασία των “chips” του ξύλου του *Q. robur* (που μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία) με κάπνισμα μετρίου βαθμού, όπως εξηγείται και στο Υποκεφάλαιο 2.1.3 της Εισαγωγής “Επίδραση του ψησίματος στο φυτοχημικό προφίλ του ξύλου του είδους *Q. robur*”.

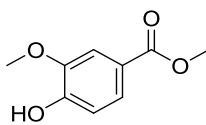
Οι δομές των κυριότερων πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν στα συλλεχθέντα κλάσματα του FCPC με την τεχνική του GC-MS παρατίθενται κατωτέρω:



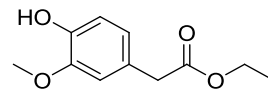
Qr1:Vanillin



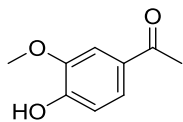
Qr2:Isovanillin



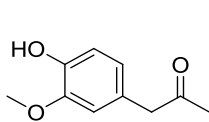
Qr3:Vanillic acid, methyl ester



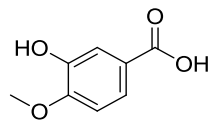
Qr4:Ethyl homovanillate



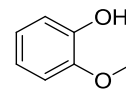
Qr5:acetovanillone



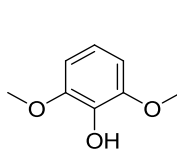
Qr6:Vanillyl methyl ketone



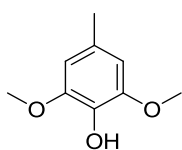
Qr7:isovanillic acid



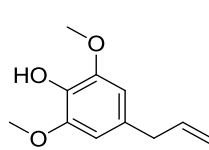
Qr8:o-Guaiacol



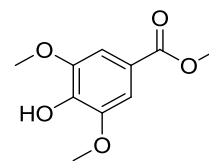
Qr9:syringol



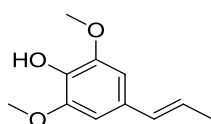
Qr10:4-Methylsyringol



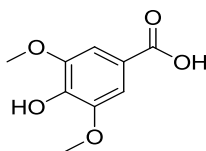
Qr11:4-Allylsyringol



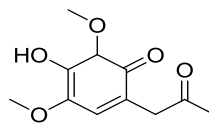
Qr12:Methyl syringate



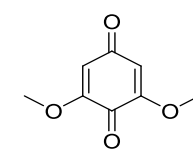
Qr13:
4-Propenylsyringol



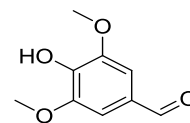
Qr14: Syringic acid



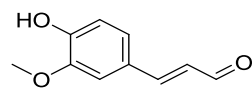
Qr15:Acetosyringone



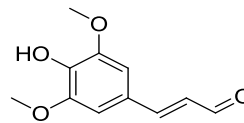
Qr16:
2,6-Dimethoxybenzoquinone



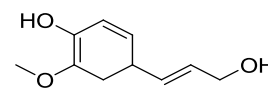
Qr17:syringic aldehyde



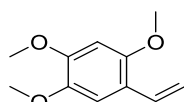
Qr18:Coniferyl aldehyde



Qr19:Sinapic aldehyde



Qr20:Dihydroconiferyl alcohol



Qr21:b-Asarone

10.4 Γευστικός και Οσφρητικός Έλεγχος κλασμάτων FCPC

Τα κλάσματα του CPC5 συνενώθηκαν περαιτέρω προς τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα, βάσει του παρόμοιου χημικού τους προφίλ, το οποίο αποτυπώθηκε με τη μέθοδο της HPTLC. Ποσότητα περίπου 10 mg των κλασμάτων που προέκυψαν από τις τελικές συνενώσεις, στάλθηκαν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, προς έλεγχο της οσμής και της γεύσης τους. Σε συγκέντρωση 10 mg/100 mL, τα κλάσματα του CPC5 δοκιμάστηκαν ως προς το άρωμα και τη γεύση τους από πάνελ εξειδικευμένων γευσιγνωστών. Η διάλυση των κλασμάτων έγινε σε μίγμα EtOH:H₂O σε αναλογία 10:90, με απώτερο στόχο την επίτευξη της συνήθους περιεκτικότητας των οίνων σε αιθυλική αλκοόλη (περίπου 10% η περιεκτικότητά τους σε αιθυλική αλκοόλη, ακριβέστερα 8%-16%).

Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από το CPC5, τα ακριβή βάρη των κλασμάτων που στάλθηκαν στο ΓΠΑ, τα οσφρητικά και γευστικά χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 44 Οσφρητικά και γευστικά χαρακτηριστικά των τελικών συνενωμένων κλασμάτων του CPC5. Ο χαρακτηρισμός του αρώματος και της γεύσης διατηρήθηκαν στην μορφή που στάλθηκαν από το πάνελ.

	Κωδικός κλάσματος	Βάρος (mg)	Άρωμα	Γεύση	Κύρια Πτητικά Συστατικά (GC-MS Ανάλυση)
1	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-1+2 fr.1-7	6.1	ξύλο, γαρύφαλλο	Γλυκίζον, ελαφρύ	-
2	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-3+4 fr.8-15	10.7	βανίλλια	πικρό, στυφό	4-μεθυλοσυριγγόλη 4-άλλυλοσυριγγόλη
3	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-5 fr.16-20	10.8	λάστιχο	πολύ στυφό	κονιφεραλδεΐδη συριγγικός μεθυλεστέρας, βανιλίνη
4	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-6 fr.21-24	10.9	nutella !!!	γλυκεια επίγευση	συριγγικός μεθυλεστέρας, βανιλίνη
5	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-7 fr.25-28	9.9	φρούτο-ξύλο	στυφό	βανιλίνη, ακετοβανιλόνη, 4-φαινυλοπροπιοφαινόνη, κονιφεραλδεΐδη
6	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-8 fr.29-34	10.8	βανιλάτο	γλυκό	γουαΐακυλοακετόνη, 4,4'- διγουαΐακόλη
7	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-9 fr.35-40	10.1	μπαχάρι πιπέρι-κάρυ	πικρό, στυφό	συριγγαλδεΐδη σιναπαλδεΐδη
8	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-10 fr.41-43	10.1	βανίλια- φρούτο	πικρό	συριγγαλδεΐδη ακετοσυριγγόνη
9	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-11 fr.44-50	10.0	ξύλο	γλυκό- ξινό-πικρό	Ισοβανιλλικό οξύ, ακετοσυριγγόνη, 1-(2,6- διϋδροξυ-4- μεθοξυφαινυλο)βουταν-1- όνη
10	ΓΠΑ EK.W.SLAV.CPC5-12	10.1	σύκο/βανίλλια	πικρό	Διϋδροκονιφερυλική

	fr.51-54				αλκοόλη
11	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-13+14 fr.55-61	10.0	κανένα άρωμα?	ελαφρώς στυφό	1-μεθυλο-3-φαινυλομεθυλο-βενζόλιο
12	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-15 fr.62-66	10.2	φρούτο/ξύλο	ήπια γεύση	συριγγικό οξύ
13	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-16 fr.67-72	10.3	μπαχάρι	γλυκό ?	-
14	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-17 fr.73-76	10.2	βανίλια	πικρό	-
15	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-18 fr.77-81	10.3	nutella σοκολάτα	γλυκίζον	-
16	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-19 fr.82-86	10.2		πικρό	-
17	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-20 fr.87-91	10.1	ανώτερες αλκοόλες, whiskey	γλυκίζει	-
18	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-21 fr.92-98	10.1	βαρέλι-ξύλο	γλυκό	-
19	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-22 fr.99-102	10.1	απόσταγμα?	πικρό	-
20	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-23 fr.103-105	10.2	λάστιχο	πικρό	-
21	ΓΠΑ ΕΚ. W.SLAV.CPC5-CRUDE	10.1	λάστιχο	πικρό	-

10.5 Απομόνωση Δευτερογενών Μεταβολιτών εκχυλίσματος *Q. robur*

Το κλάσμα QR_CPC4_8 (24 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-prep), με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων σε αυτό δευτερογενών μεταβολιτών. Από τη διαδικασία της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, παραλήφθηκαν τα κλάσματα που παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 45 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος QR_CPC4_8 με TLC-prep

Κλάσματα TLC-prep	Βάρος (mg)
QR_CPC4_8 prep Z1	1.3
QR_CPC4_8 prepA Z2	2.4
QR_CPC4_8 prepA Z3	1.6
QR_CPC4_8 prep Z3b	1.3
QR_CPC4_8 prepB Z2+Z3	3.9
QR_CPC4_8 prep Z4	8.3
QR_CPC4_8 prep Z5	0.7

Από την ανωτέρω διαδικασία, απομονώθηκε ο μεταβολίτης 2,5-διμεθοξυ-1,4-βενζοκινόνη (*Qr16*) από το κλάσμα QR_CPC4_8 prepZ5 και μίγμα των μεταβολιτών συριγγαλδεΐδη (*Qr17*) και σιναπαλδεΐδη (*Qr19*) από το κλάσμα QR_CPC4_8 prep Z4, η ταυτοποίηση των οποίων πραγματοποιήθηκε τόσο από το φάσμα πρωτονίου NMR 1D όσο και με ανάλυση με

την τεχνική GC-MS. Η διαδικασία της απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών όσον αφορά τα πολικότερα κλάσματα του CPC4 (16-23) βρίσκεται σε εξέλιξη.

10.5.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Q*.

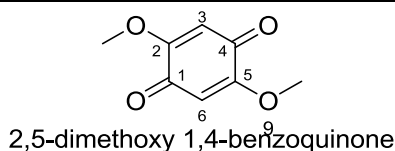
robur

10.5.1.1 Μεταβολίτης *Qr16*

Ο μεταβολίτης ***Qr16*** παραλήφθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης μετά την επεξεργασία του κλάσματος QR_CPC4_8 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *Q. robur*, με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-prep). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR έδειξε ότι ο μεταβολίτης ***Qr16*** είναι η 2,5-διμεθοξυ-1,4-βενζοκινόνη.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται η ύπαρξη μίας απλής κορυφής στα 5.84 ppm, που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-3 και H-6. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια της θέσης C-2 και C-5.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Sun et al., 2015)

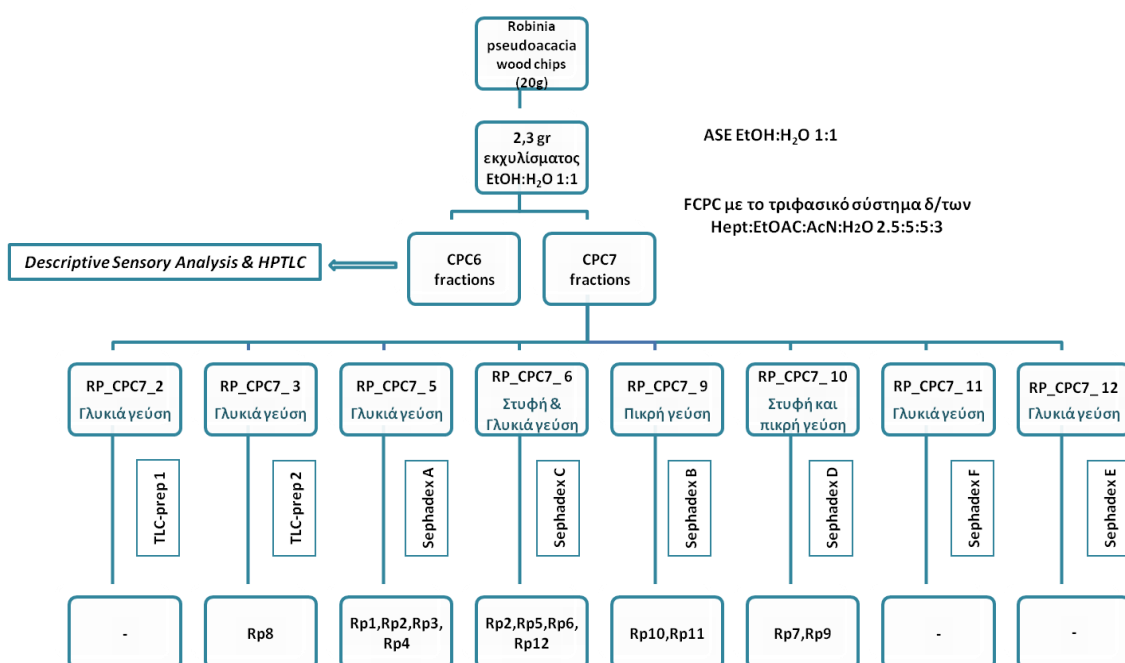


Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1/4	-	187.2
2/5	-	159.3
3/6	5.84 (2H, s)	108.0
OCH ₃	3.80 (6H, s)	57.1

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των μεταβολιτών *Qr17* και *Qr19* παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο, καθώς απομονώθηκαν και από το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα του *R. pseudoacacia* με κωδικούς ως ***Rp 5*** και ***Rp 2*** αντίστοιχα.

11 Μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου Ακακίας (*Robinia pseudoacacia*)

Το πλούσιο φυτοχημικό προφίλ του φυτικού είδους *Robinia pseudoacacia*, όπως έγινε εμφανές από τις HPTLC, η ελλιπής βιβλιογραφία και η μη εφαρμογή της συζευγμένης τεχνικής FCPC-gustatometry σε μελέτες που αφορούν το συγκεκριμένο είδος, οδήγησαν στην επιλογή της περαιτέρω μελέτης του. Το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα του ξύλου ακακίας του είδους *Robinia pseudoacacia*, το οποίο παρασκευάστηκε με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης ASE, υποβλήθηκε σε επεξεργασία σύμφωνα με το σχηματικό διάγραμμα που παρατίθεται κατωτέρω και κάθε απεικονιζόμενο σε αυτό πειραματικό στάδιο θα αναλυθεί στα υποκεφάλαια που ακολουθούν.



Εικόνα 75 Σχηματικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου ακακίας *Robinia pseudoacacia*

11.1 Κλασμάτωση του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος ξύλου *R.*

pseudoacacia με τη μέθοδο FCPC

Η μέθοδος της Ταχείας Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση (FCPC) χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου *Robinia pseudoacacia*, το οποίο παραλήφθηκε με την τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης ASE. Η παρουσία στο υπό μελέτη υδατοαλκοολικό εκχύλισμα πλήθους συστατικών διαφορετικής χημικής κατηγορίας και πολικότητας (από άπολα απλά φαινολικά μόρια ως πολικές ταννίνες), σε συνδυασμό με την ύπαρξη πολυμερών ταννινών, κατέστησε απαραίτητη την εύρεση ενός συστήματος διαλυτών έκλουσης που θα συγκρατούσε στη στατική του φάση τις ταννίνες και τα πολυμερή αυτών, επιτρέποντας την ικανοποιητική κλασμάτωση των υπόλοιπων περιεχόμενων συστατικών.

11.1.1 Επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών έκλουσης

Κατόπιν αναζήτησης σε σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα και με τη βοήθεια τριγωνικών διαγραμμάτων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διάφορα διφασικά και τριφασικά συστήματα διαλυτών, ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης, με τρεις ή και περισσότερους διαλύτες, σε διαφορετικές αναλογίες. Τα υπό δοκιμή συστήματα αξιολογήθηκαν ως προς τους κάτωθι παράγοντες:

- την ικανότητά τους να διαλύσουν ικανοποιητικά το προς κλασμάτωση δείγμα,
- την ικανότητα διαχωρισμού των φάσεων σε χρόνο μικρότερο του 1 min
- την ικανοποιητική κατανομή των ουσιών και στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος (ιδανικά ο συντελεστής κατανομής κάθε ουσίας στις 2 φάσεις ενός διφασικού συστήματος $K_D = 1$)

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με ποσότητα εκχυλίσματος ανά δοκιμή 10 mg σε συνολικό όγκο συστήματος διαλυτών 4 mL. Το εκχύλισμα διαλύθηκε στο εκάστοτε διφασικό ή τριφασικό σύστημα και μετά από έντονη ανακίνηση, αφέθηκε σε ηρεμία έως ότου διαχωρίστηκαν οι δύο ή τρεις φάσεις αντίστοιχα. Στα συστήματα που παρατηρήθηκε επιτυχής διαχωρισμός των φάσεων, κάθε φάση ελέγχθηκε με χρωματογραφία TLC.

Τα διφασικά συστήματα ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης, που υποβλήθηκαν σε δοκιμές με την ανωτέρω περιγραφείσα διαδικασία παρατίθενται συνοπτικά στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 46 Διφασικά συστήματα ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης που υποβλήθηκαν σε δοκιμές

Διφασικά Συστήματα	Αναλογίες	Δοκιμές
Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	x/y/z/w	21
Hept/EtOAc/propan-2-ol/MeOH/H ₂ O	x/y/z/w/v	1
MtBE/EtOAc/AcN/ H ₂ O	x/y/z/w	9
MtBE/EtOAc/MeOH/ H ₂ O	x/y/z/w	6
MtBE/AcN/H ₂ O	x/y/z	14
MtBE/MeOH/H ₂ O	x/y/z	6
EtOAc /MeOH/H ₂ O	x/y/z	2
EtOAc /n-BuOH/MeOH/H ₂ O	x/y/z/w	1
EtOAc/n-BuOH/EtOH/ H ₂ O	x/y/z/w	2
EtOAc/ EtOH/ H ₂ O	x/y/z	2

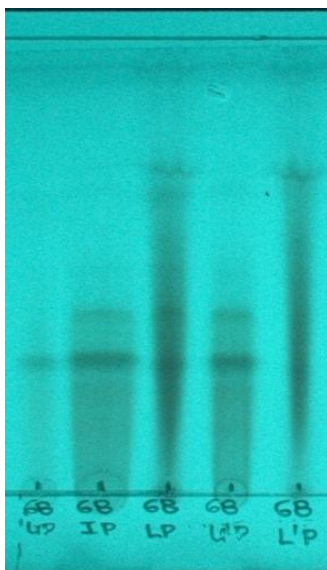
Τα τριφασικά συστήματα που υποβλήθηκαν σε δοκιμές παρατίθενται συνοπτικά στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 47 Τριφασικά συστήματα που υποβλήθηκαν σε δοκιμές

Τριφασικά Συστήματα	Αναλογίες	Δοκιμές
Hept/EtOAc/AcN/ H ₂ O	x/y/z/w	4
Hept/MtBE/AcN/ H ₂ O	x/y/z/w	6

Συνολικά, υποβλήθηκαν σε δοκιμές 74 συστήματα από τα οποία απορρίφθηκαν τα 49 κατά τη διάρκεια του πρώτου ελέγχου, είτε λόγω κακής διαλυτότητας του εκχυλίσματος είτε λόγω δυσκολίας διαχωρισμού των φάσεων. Ακολούθησε ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC των υπόλοιπων 25 συστημάτων, από τον οποίο απορρίφθηκαν 17 συστήματα, λόγω της κατανομής της πλειονότητας των ουσιών στη μία από τις δύο φάσεις.

Καταληκτικά, για την εκτέλεση του διαχωρισμού του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος (EtOH:H₂O 50:50) ξύλου ακακίας *Robinia pseudoacacia* επιλέχθηκε το τριφασικό σύστημα Hept/MtBE/AcN/H₂O 2.5/5/5/3. Η επιλογή του συγκεκριμένου συστήματος έκλουσης πραγματοποιήθηκε λόγω της ικανότητας της πολικής (AcN/H₂O) κάτω φάσης (Lower phase), να συγκρατεί τις υδατοδιαλυτές ταννίνες και να επιτρέπει τον εμπλουτισμό του εκχυλίσματος με τα υπόλοιπα περιεχόμενα συστατικά, τα οποία και κλασματώνονται ικανοποιητικά με το συγκεκριμένο σύστημα έκλουσης.



Εικόνα 76 R_f TLC στα 254 nm. Προσομοίωση του διαχωρισμού του τριφασικού συστήματος διαλυτών που επιλέχθηκε για το διαχωρισμό του υδατοαλκολικού εκχυλίσματος.

11.1.2 Εκτέλεση διαχωρισμού με FCPC

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) με ημιπαρασκευαστική στήλη 200 mL. Η ποσότητα του προς διαχωρισμού εκχυλίσματος, τόσο στο CPC6 όσο και στο CPC7 (αποτελεί επανάληψη του CPC6), ήταν περίπου 1 g. Η παρασκευή του τριφασικού συστήματος έκλουσης Hept/MtBE/AcN/H₂O 2.5/5/5/3 έγινε κατά απόλυτη αναλογία, με τη δοκιμή του συγκεκριμένου τριφασικού συστήματος, κατά την προσομοίωση διαχωρισμού εντός του δοκιμαστικού σωλήνα. Για την παρασκευή συνολικού όγκου 1800 mL τριφασικού συστήματος, αναμίχθηκαν εντός διαχωριστικής χοάνης 2 L: 290.4 mL Heptane, 580.6 mL MtBE, 580.6 mL AcN και 348.4 mL H₂O, βάσει της αναλογίας 2.5/5/5/3. Κατόπιν ανακίνησης της διαχωριστικής χοάνης, εξισορρόπησης των διαλυτών και διαχωρισμού των 3 φάσεων, απομακρύνθηκε η άνω φάση(UP) η οποία και αποτέλεσε την πρώτη κινητή, η μεσαία φάση (MP) η οποία και αποτέλεσε τη δεύτερη κινητή και η κάτω φάση (LP) χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση. Η ανωτέρω διαδικασία επαναλήφθηκε κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο, για την παρασκευή 1000 mL τριφασικού συστήματος, με ανάμιξη 161.3 mL Heptane, 322.6 mL MtBE, 322.6 mL AcN και 193.5 mL H₂O. Κατόπιν διαχωρισμού των 3 φάσεων εντός της διαχωριστικής χοάνης, απομακρύνθηκε και πάλι η άνω φάση(UP) και προστέθηκε ισοδύναμο MtBE (322.6 mL MtBE), προς ήπια μείωση της πολικότητας των περιεχόμενων στη διαχωριστική χοάνη δύο φάσεων. Οι δύο φάσεις που προέκυψαν, παραλήφθηκαν και η άνω, δηλαδή η ισοδύναμη μεσαία φάση (MP equivalent) αποτέλεσε την τρίτη κινητή ενώ η κάτω, δηλαδή η στατική κατόπιν της

εξισορρόπησης και με το ισοδύναμο MtBE (LP equivalent) αποτέλεσε τη στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε κατά την τελευταία φάση εκτέλεσης του διαχωρισμού, τη φάση της “εξώθησης” (extrusion).

Η πλήρωση της στήλης με τη στατική φάση (LP) πραγματοποιήθηκε σε ‘descending mode’ χωρίς περιστροφή, με ροή 25 mL/min για 16 min. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αλλαγή σε ‘ascending mode’ και πλήρωση της στήλης με την πρώτη κινητή φάση (UP) με ροή 10 mL/min και 1500 rpm, έως την εξισορρόπηση των δύο φάσεων μέσα στη στήλη. Μετά την εξισορρόπηση, έγινε εισαγωγή του δείγματος με ένεση στο “loop” της συσκευής και ξεκίνησε η συλλογή κλασμάτων. Κατόπιν της εισαγωγής του δείγματος και κατά τη διάρκεια της έκλουσης με την πρώτη κινητή φάση (UP), οι στροφές ανέβηκαν και διατηρήθηκαν στις 1700 rpm, για την ελαχιστοποίηση της απώλειας στατικής φάσης (λόγω διαταραχής της ισορροπίας των διαλυτών, εξαιτίας της εισαγωγής του δείγματος). Κατά την έκλουση με τη δεύτερη κινητή (MP), οι στροφές ανέβηκαν στις 1800 rpm, όπως και διατηρήθηκαν και στην έκλουση με την τρίτη κινητή φάση (MP equivalent). Καθ’ όλη τη διάρκεια της έκλουσης, η ροή διατηρήθηκε στα 10 mL/min. Καταληκτικά, με τη διαδικασία της “εξώθησης” (extrusion), η στατική κατόπιν της εξισορρόπησης και με το ισοδύναμο του MtBE (LP equivalent) χρησιμοποιήθηκε ως κινητή για την εξώθηση των συστατικών, που είχαν παραμείνει εντός της στήλης.

11.1.2.1 FCPC στο υδατοαλκοολικό (ASE EtOH:H₂O 50:50) εκχύλισμα του ξύλου του είδους

***R. Pseudoacacia* - CPC6**

Κατά την εκτέλεση του CPC6, 870 mg του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του είδους *Robinia pseudoacacia* διαλύθηκαν σε 10 mL του τριφασικού συστήματος (2 mL UP, 3 mL MP, 5 mL LP), για την εισαγωγή του δείγματος. Συνολικά, συλλέχθηκαν 152 κλάσματα των 10 mL και πραγματοποιήθηκε έκπλυση της στήλης αρχικά με AcN:H₂O 50:50 και καταληκτικά, με MeOH:H₂O 50:50, μίγμα διαλυτών στο οποίο γίνεται και η αποθήκευση της στήλης.

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν με την πρώτη κινητή φάση (UP), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), με την τρίτη κινητή φάση (MP equivalent), καθώς και με τη στατική κατόπιν της εξισορρόπησης της και με το ισοδύναμο του MtBE (LP equivalent), δίνονται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 48 Παραληφθέντα κλάσματα με κάθε κινητή φάση

Κινητές φάσεις	Κλάσματα
UP	1-46
MP	47-84
MP equivalent	85-117
LP equivalent	118-138
AcN:H ₂ O 50:50	139-152
MeOH:H ₂ O 50:50	πλύσιμο

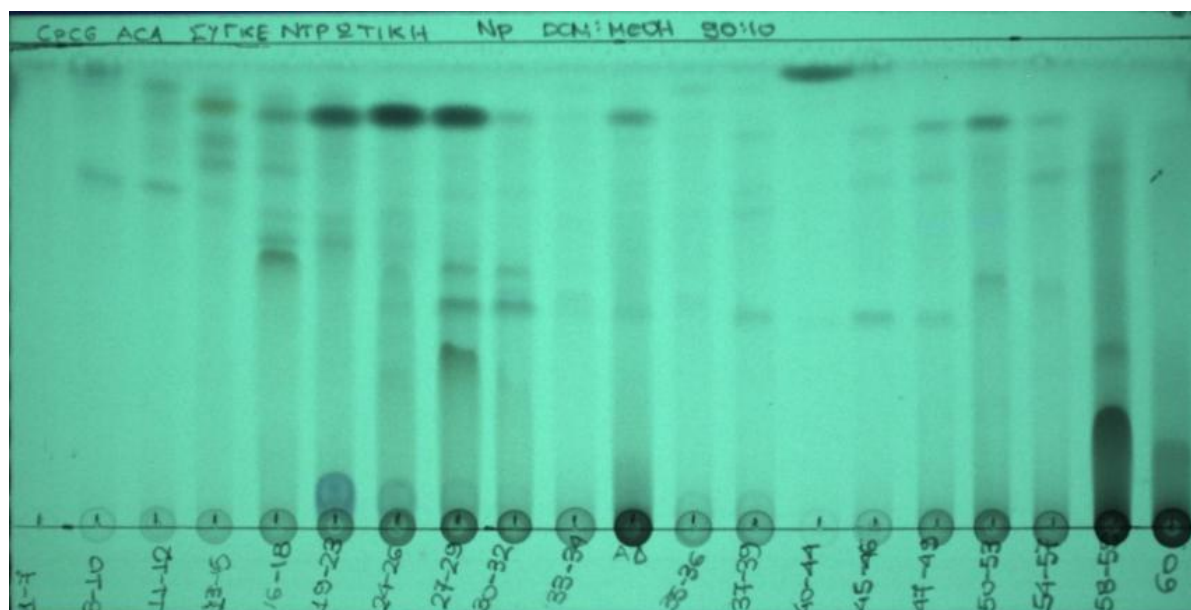
Τα 152 συλλεχθέντα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης Rp-TLC με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O 35:65 (τα αρχικά κλάσματα 1-60 ελέγχθηκαν και σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης Np-TLC, με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10). Ακολούθως, βάσει παρόμοιου χημικού προφίλ, τα αρχικά κλάσματα συνενώθηκαν. Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν καθώς και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

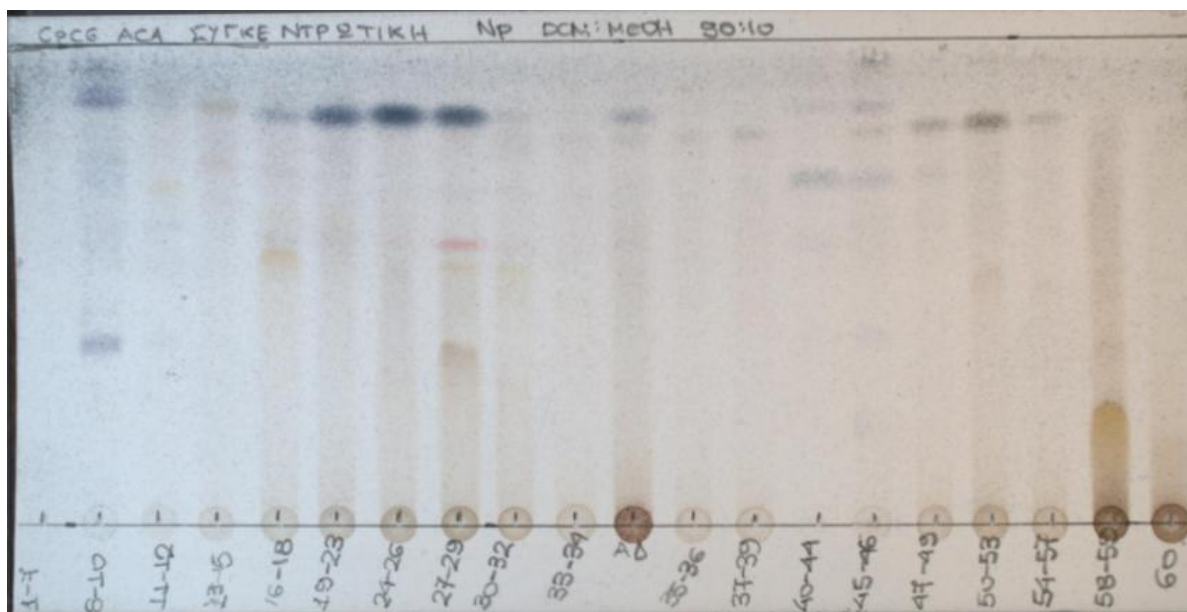
Πίνακας 49 Βάρη των συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από το CPC-6

Συνενωμένα Κλάσματα CPC6	Βάρος (mg)
EK.W.ACA 1-10 fr.	12.0
EK.W.ACA 11-12fr.	5.0
EK.W.ACA 13-15fr.	9.5
EK.W.ACA 16-18fr.	10.5
EK.W.ACA 19-23 fr.	21.7
EK.W.ACA 24-26 fr.	19.7
EK.W.ACA 27-29 fr.	22.8
EK.W.ACA 30-32 fr.	9.3
EK.W.ACA 33-34fr.	5.9
EK.W.ACA 35-36 fr.	5.0
EK.W.ACA 37-39 fr.	6.7
EK.W.ACA 40-46 fr.	17.5
EK.W.ACA 47-49 fr.	6.6
EK.W.ACA 50-53 fr.	11.2
EK.W.ACA 54-57 fr.	8.9
EK.W.ACA 58-59 fr.	65.3
EK.W.ACA 60 fr.	25.0
EK.W.ACA 61-62 fr.	35.4
EK.W.ACA 63-65 fr.	46.7
EK.W.ACA 66-73 fr.	61.1
EK.W.ACA 74-85 fr.	48.3
EK.W.ACA 86-93fr.	20.4
EK.W.ACA 94-100fr.	28.7
EK.W.ACA 101-113 fr.	14.0
EK.W.ACA 114-123 fr.	18.5
EK.W.ACA 124-133 fr.	132.1
EK.W.ACA 134-πλυσ.	29.9

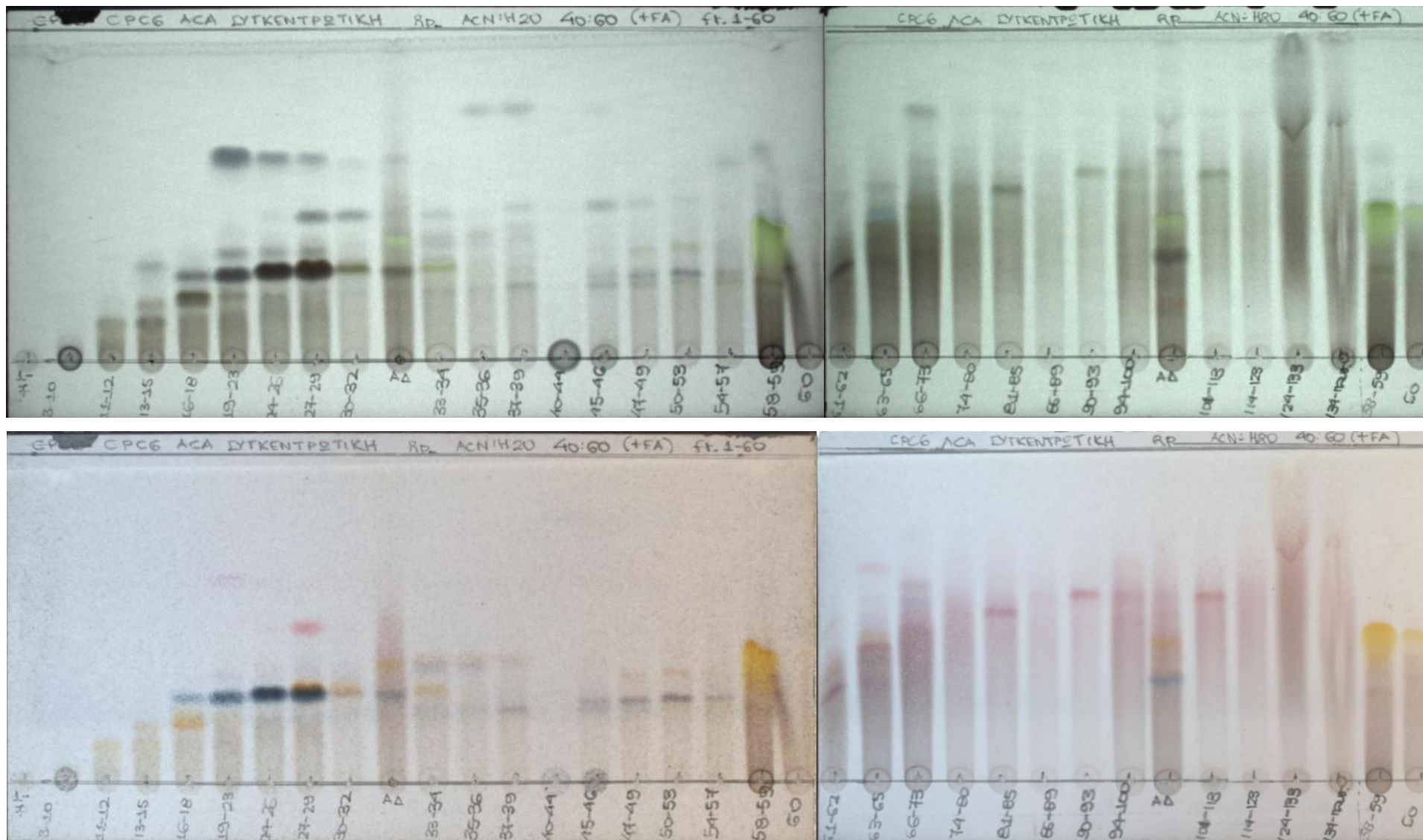
Άθροισμα βάρους κλασμάτων	697.7
Απόδοση %	80.2%

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων 1-60, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC), με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH σε αναλογία 90:10, καθώς και των κλασμάτων 1-134 και με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:0.1 στα 254 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:





Εικόνα 77 Np-TLC των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-60 του CPC6. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 90:10



Εικόνα 78 Rp-TLC των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-152 του CPC6. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:0.1

11.1.2.2 Επαναληπτικό FCPC στο υδατοαλκοολικό (EtOH:H₂O 50:50) εκχυλίσμα του ξύλου

του είδους *R. pseudoacacia* - CPC7

Κατά την εκτέλεση του CPC7, 990 mg του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του φυτού *Robinia pseudoacacia* διαλύθηκαν σε 10 mL του τριφασικού συστήματος (2 mL UP, 3 mL MP, 5 mL LP), για την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη. Συνολικά, συλλέχθηκαν 140 κλάσματα των 10 mL και ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έκπλυση της στήλης αρχικά με AcN:H₂O 50:50 και καταληκτικά, με MeOH:H₂O 50:50, μίγμα διαλυτών στο οποίο γίνεται και η αποθήκευση της στήλης.

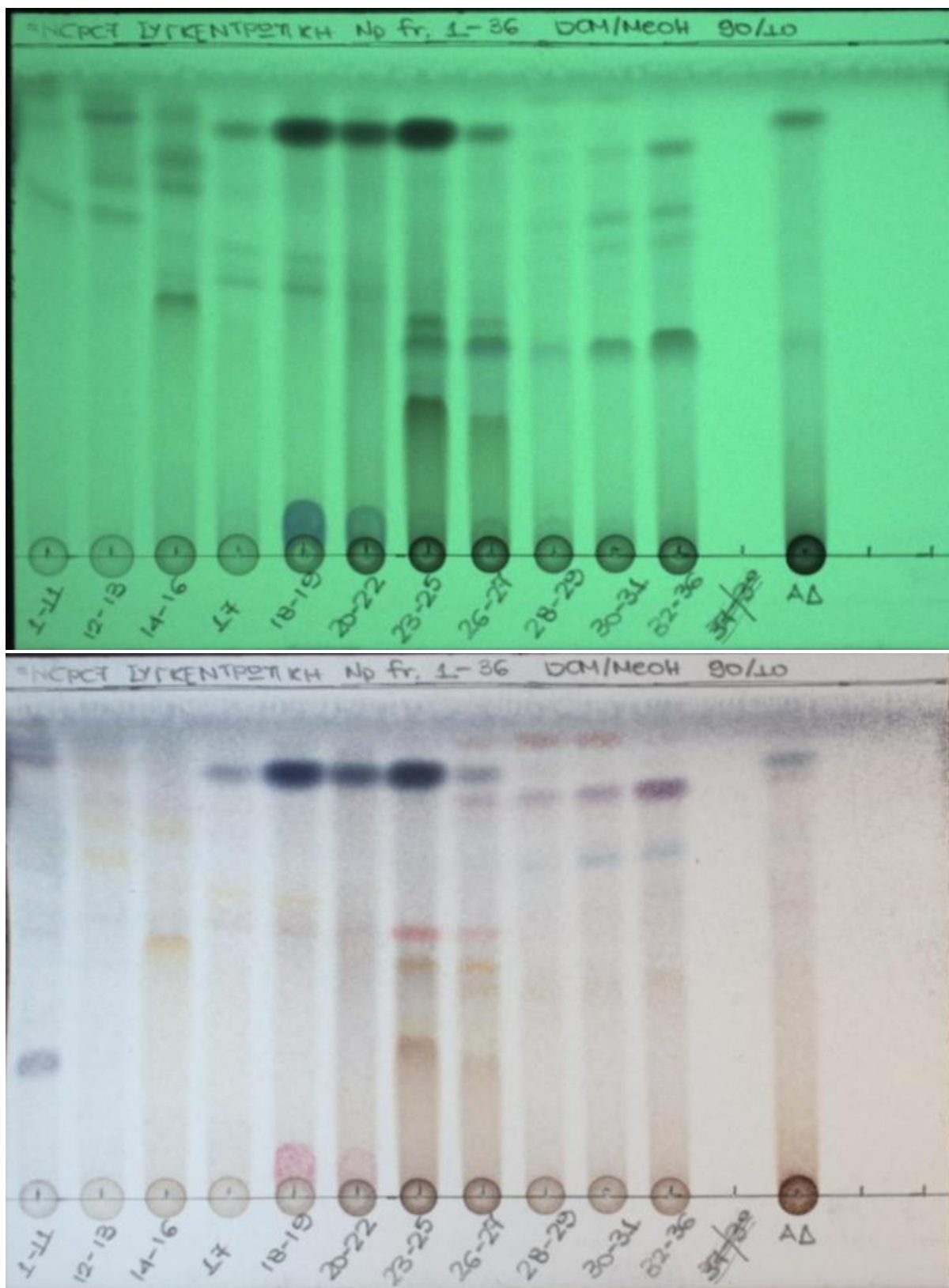
Το CPC7 πραγματοποιήθηκε, κατά ακριβώς ανάλογο τρόπο, με το CPC6 με στόχο τη μέγιστη δυνατή επαναληψιμότητα της κλασμάτωσης του εκχυλίσματος, με σκοπό την αύξηση των ποσοτήτων των CPC κλασμάτων του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του είδους *Robinia pseudoacacia*, γεγονός που θα διευκόλυνε ακολούθως τη διεξοδικότερη μελέτη του συγκεκριμένου εκχυλίσματος.

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν με την πρώτη κινητή φάση (UP), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), με την τρίτη κινητή φάση (MP equivalent), καθώς και με τη στατική κατόπιν της εξισορρόπησης της και με το ισοδύναμο του MtBE (LP equivalent), δίνονται στον κατωτέρω πίνακα:

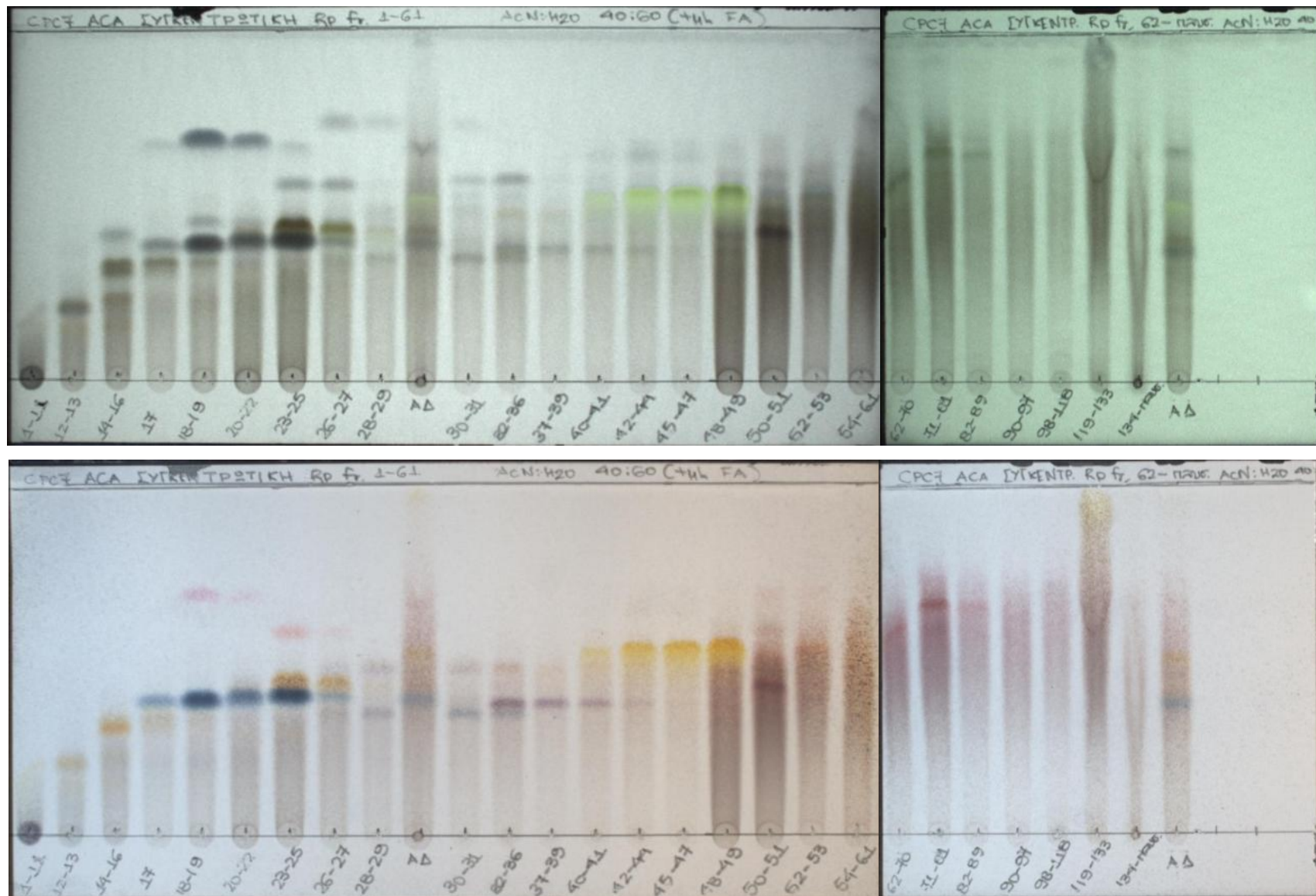
Πίνακας 50 Παραληφθέντα κλάσματα με κάθε κινητή φάση

Κινητές φάσεις	Κλάσματα
UP	1-34
MP	35-80
MP equivalent	81-109
LP equivalent	110-130
AcN:H ₂ O 50:50	131-140
MeOH:H ₂ O 50:50	πλύσιμο

Τα 140 συλλεχθέντα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης Rp-TLC με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA 40:60:0.5 (τα αρχικά κλάσματα 1-60 ελέγχθησαν και σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κανονικής φάσης Np-TLC, με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 90:10). Ακολούθως, βάσει παρόμοιου χημικού προφίλ, τα αρχικά κλάσματα συνενώθηκαν. Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν παρατίθενται στις κατωτέρω Np-TLC και Rp-TLC.



Εικόνα 79 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-36 του CPC7 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής σιβάδας κανονικής φάσης (Np-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 90:10



Εικόνα 80 Rp-TLC των τελικών συνενωμένων κλασμάτων 1-140 του CPC7. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:0.1

Τα συνενωμένα κλάσματα, των οποίων το χημικό προφίλ με Np-TLC και Rp-TLC φαίνεται παραπάνω, συνενώθηκαν περαιτέρω, με στόχο την αύξηση της ποσότητας των CPC7 κλασμάτων, που θα αποτελέσουν τα μητρικά για τη διαδικασία της απομόνωσης ουσιών, η οποία και θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

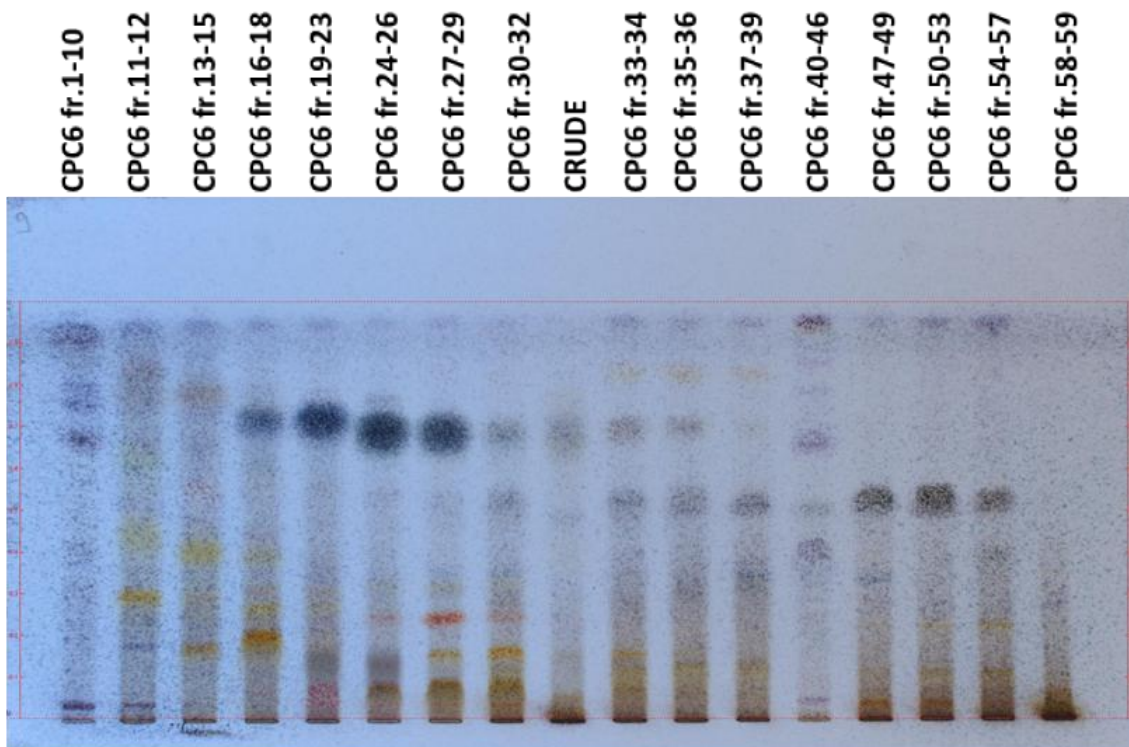
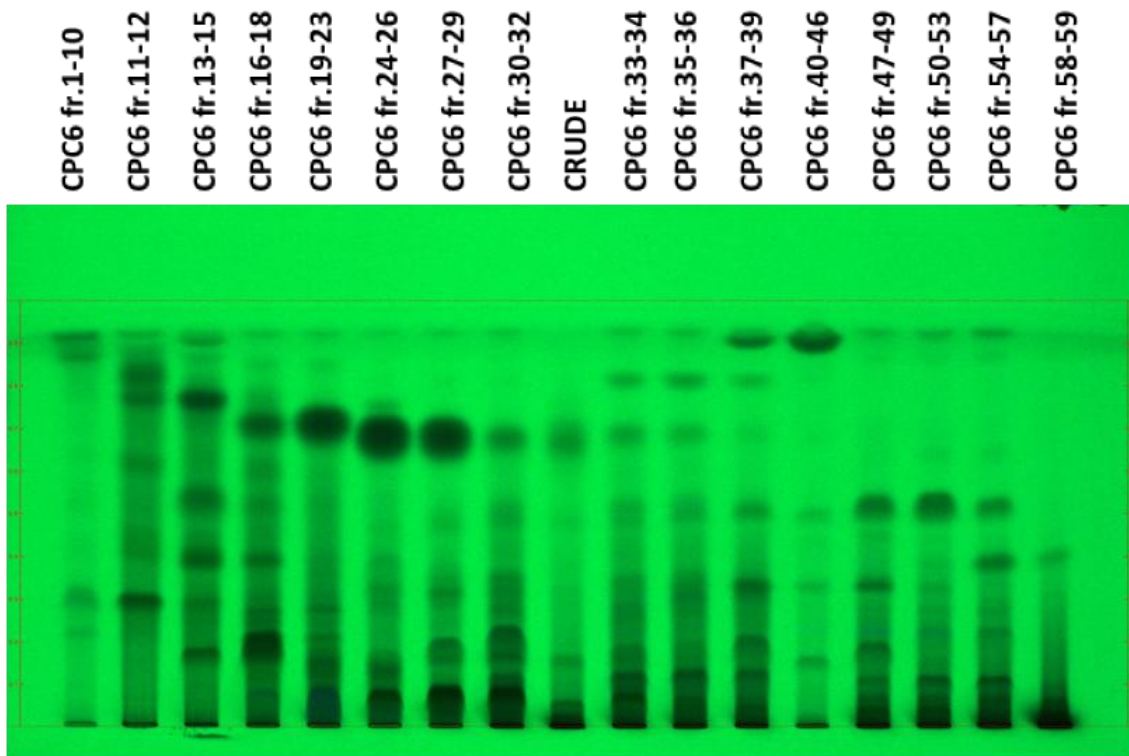
Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν καθώς και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 51 Βάρη των συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από το CPC-7

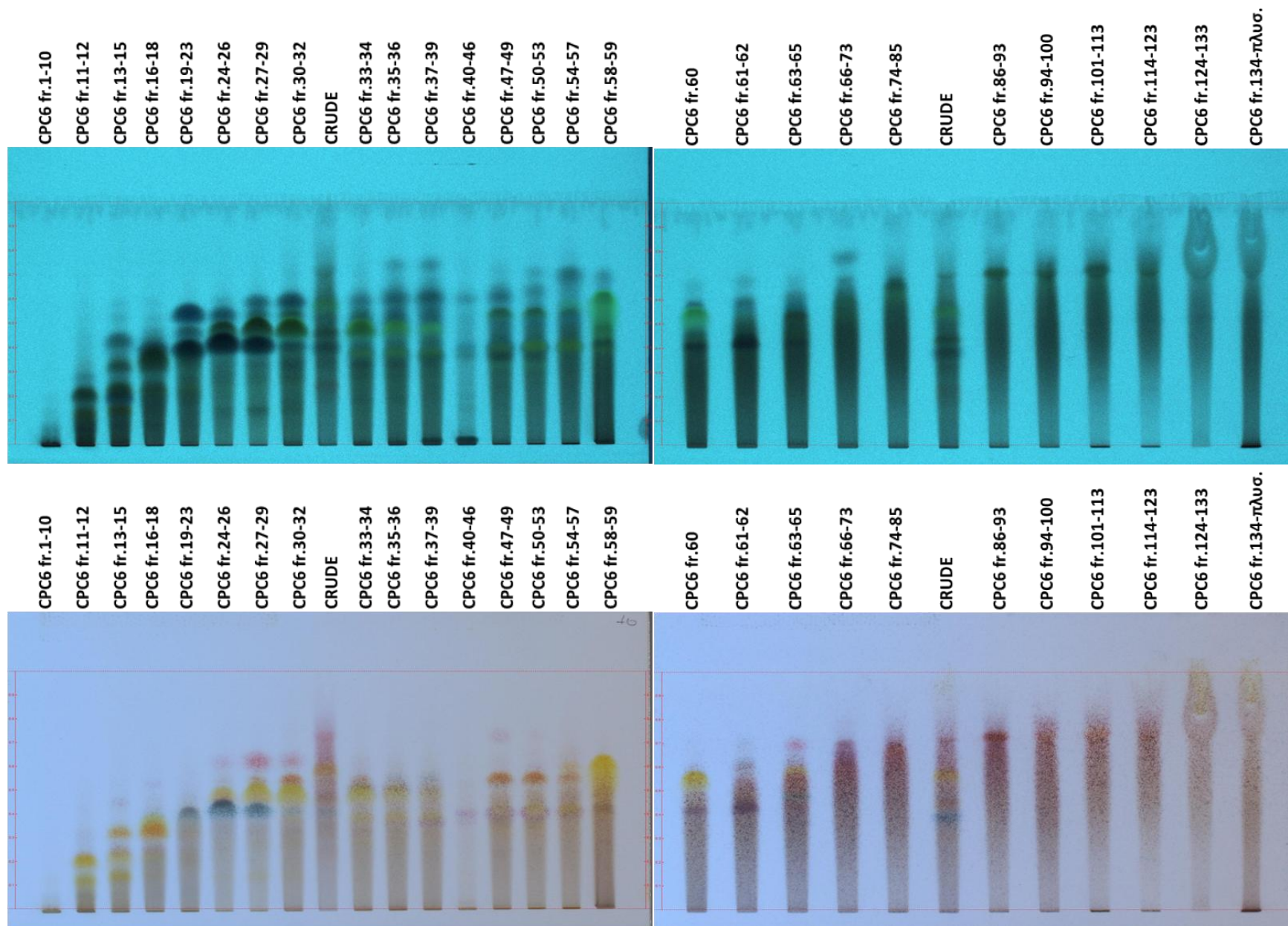
Τελικά Συνενωμένα Κλάσματα CPC7	Master code Συνενωμένων κλασμάτων	Βάρος (mg)
CPC7 EK.W.ACA fr. 1-11	RP_CPC7_1	15.4
CPC7 EK.W.ACA fr. 12-13	RP_CPC7_2	7.6
CPC7 EK.W.ACA fr.14-16	RP_CPC7_3	13.1
CPC7 EK.W.ACA fr.17	RP_CPC7_4	4.6
CPC7 EK.W.ACA fr.18-22	RP_CPC7_5	34.0
CPC7 EK.W.ACA fr.23-27	RP_CPC7_6	65.6
CPC7 EK.W.ACA fr.28-29	RP_CPC7_7	11.0
CPC7 EK.W.ACA fr.30-31	RP_CPC7_8	9.1
CPC7 EK.W.ACA fr.32-39	RP_CPC7_9	30.5
CPC7 EK.W.ACA fr.40-49	RP_CPC7_10	93.5
CPC7 EK.W.ACA fr.50-61	RP_CPC7_11	189.9
CPC7 EK.W.ACA fr.62-118	RP_CPC7_12	151.6
CPC7 EK.W.ACA fr.119-133	RP_CPC7_13	118.1
CPC7 EK.W.ACA fr.134-πλυσ.	RP_CPC7_14	8.7
Άθροισμα βάρους κλασμάτων		752.70
Απόδοση %		76.03%

11.2 Έλεγχος φυτοχημικού προφίλ κλασμάτων FCPC (CPC6 και CPC7) με HPTLC

Τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την εκτέλεση της Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρωση CPC6, υποβλήθηκαν ακολούθως σε Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), με απώτερο στόχο τον πλήρη έλεγχο του φυτοχημικού τους προφίλ. Η διαδικασία της Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), πραγματοποιήθηκε με συγκέντρωση των κλασμάτων 5mg/mL και με απόθεση ποσότητας 25 μL εκάστου κλάσματος σε κάθε 'spot' επί της πλάκας. Πραγματοποιήθηκε HPTLC κανονικής φάσης για τα άπολα και μέσης πολικότητας κλάσματα του CPC6_1-59, με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH σε αναλογία 95:5. Πραγματοποιήθηκε HPTLC αντίστροφης φάσης για το σύνολο των κλασμάτων του CPC6, με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 40:60:0.5



Εικόνα 81 Νρ HPTLC των κλασμάτων 1-59 σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 95:5. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκάσμου με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 82 Rp HPTLC των κλασμάτων 1-140 σε σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA 40:60:0.5. Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση.

11.3 Γευστικός και Οσφρητικός έλεγχος κλασμάτων FCPC

Τα κλάσματα του CPC6 συνενώθηκαν περαιτέρω προς τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα, βάσει του παρόμοιου χημικού τους προφίλ, όπως αυτό αποτυπώθηκε με τη μέθοδο της HPTLC.

Ποσότητα περίπου 10 mg των κλασμάτων που προέκυψαν από τις τελικές συνενώσεις, στάλθηκαν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, προς έλεγχο της οσμής και της γεύσης τους. Σε συγκέντρωση 10 mg/100 mL, τα κλάσματα του CPC6 δοκιμάστηκαν ως προς το άρωμα και τη γεύση τους από πάνελ εξειδικευμένων γευσιγνωστών. Η διάλυση των κλασμάτων έγινε σε μίγμα EtOH:H₂O σε αναλογία 10:90, με απώτερο στόχο την επίτευξη της συνήθους περιεκτικότητας των οίνων σε αιθυλική αλκοόλη (περίπου 10% η περιεκτικότητά τους σε αιθυλική αλκοόλη, ακριβέστερα 8%-16%).

Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από το CPC6, τα ακριβή βάρη των κλασμάτων που στάλθηκαν στο ΓΠΑ, τα οσφρητικά και γευστικά χαρακτηριστικά τους παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 52 Οσφρητικά και γευστικά χαρακτηριστικά των τελικών συνενωμένων κλασμάτων του CPC6. Ο χαρακτηρισμός του αρώματος και της γεύσης διατηρήθηκαν στην μορφή που στάλθηκαν από το πάνελ.

	Κωδικός κλάσματος	Βάρος (mg)	Άρωμα	Γεύση	Κύρια περιεχόμενα συστατικά
1	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.1-10	7.7	λάστιχο, ελαφριά βανίλλια	γλυκό	
2	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.11-15	9.1	σύκο, βανίλλια	πολύ γλυκό!	
3	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.16-18	7.2	Βανίλλια	πολύ γλυκό	μπουτεΐνη
4	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.19-23	8.5	βανίλλια, υποβρύχιο, κουραμπιές	πολύ γλυκό	κονιφεραλδεΐδη, σιναπαλδεΐδη, βανιλίνη, 4-υδροξυσαλικυλικό οξύ
5	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.24-26	9.3	Κάρυ	στυφό-γλυκό	σιναπαλδεΐδη, συριγγική αλδεΐδη, μπουτίνη, 6,3',4',5'-τετραυδροξυισσαουρόνη
6	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.27-29	8.8	κάρυ, sotolon	ήπιο-πικρό στο τελείωμα	
7	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6	7.0		γλυκίζον-πικρό	

	fr.30-32				
8	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.33-39	9.2	Βανίλια	πικρό	συριγγυλογλυκερόλη, συριγγικό οξύ
9	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.40-46	8.8	αδιάφορο	πικρό	
10	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.47-57	8.8	βανίλια	πικρό	ρομπινετίνη, ρομπτίνη
11	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.58-60	9.9		στυφό- πικρό	
12	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.61-62	10.1	vinsanto- σταφίδα	γλυκό	
13	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr. 63-65	10.1	whiskey	γλυκό- στυφό	
14	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr. 66-73	10.3	ξύσμα ξύλου, καπνιστό	πικρό	
15	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr. 74-85	9.9	βανίλια		
16	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.86-100	9.9		γλυκίζον	
17	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 fr.101-123	10.2	ξύλο-μπαχάρι		
18	ΓΠΑ EK.W.ACA.CPC6 CRUDE	10.2	βανίλια/φρούτο/ξύλο	γλυκίζει!	

11.4 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *R. pseudoacacia* από τα κλάσματα του CPC7

Η απομόνωση των κυριότερων δευτερογενών μεταβολιτών του υδατοαλκοολικού (EtOH:H₂O 50:50) εκχυλίσματος του ξύλου του είδους *Robinia pseudoacacia*, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (preparative TLC) και με την τεχνική της χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20. Πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση οκτώ κλασμάτων του CPC7. Εξ αυτών, τα έξι επεξεργάστηκαν με τη χρήση της χρωματογραφίας στήλης

μοριακού αποκλεισμού (Sephadex) και τα δύο με την τεχνική της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (preparative-TLC).

11.4.1 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_2

Το κλάσμα RP_CPC7_2 (7.6 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-prep1), με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων σε αυτό δευτερογενών μεταβολιτών. Από τη διαδικασία της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, παραλήφθηκαν τα 3 κλάσματα που παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 53 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_2 με TLC-prep

Κλάσματα TLC-prep1	Βάρος (mg)
RP_CPC7_2 prep1 z1	1.7
RP_CPC7_2 prep1 z2	1.0
RP_CPC7_2 prep1 z3	4.0

Από την ανωτέρω διαδικασία, δεν ταυτοποιήθηκαν μεταβολίτες καθώς οι ποσότητες δεν ήταν επαρκείς για την ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπία NMR ή αποτελούσαν πολύπλοκα μίγματα.

11.4.2 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_3

Το κλάσμα RP_CPC7_3 (13.1 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-prep2), με σκοπό την απομόνωση των περιεχόμενων σε αυτό δευτερογενών μεταβολιτών. Από τη διαδικασία της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, παραλήφθηκαν τα 2 κλάσματα που παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 54 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_3 με TLC-prep

Κλάσματα TLC-prep2	Βάρος (mg)
RP_CPC7_3 prep2 z1	1.1
RP_CPC7_3 prep2 z2	0.6

Από την ανωτέρω διαδικασία, ταυτοποιήθηκε ο μεταβολίτης **Rp8**.

11.4.3 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_5

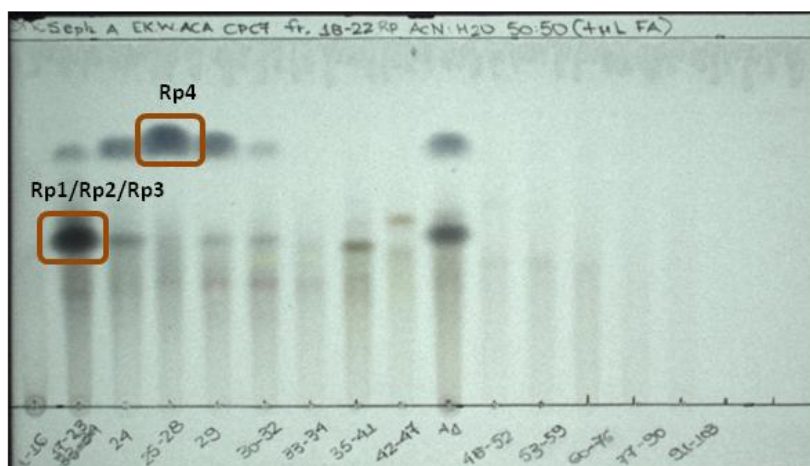
Το κλάσμα RP_CPC7_5 (34 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex A). Συνολικά παραλήφθηκαν 103 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC),

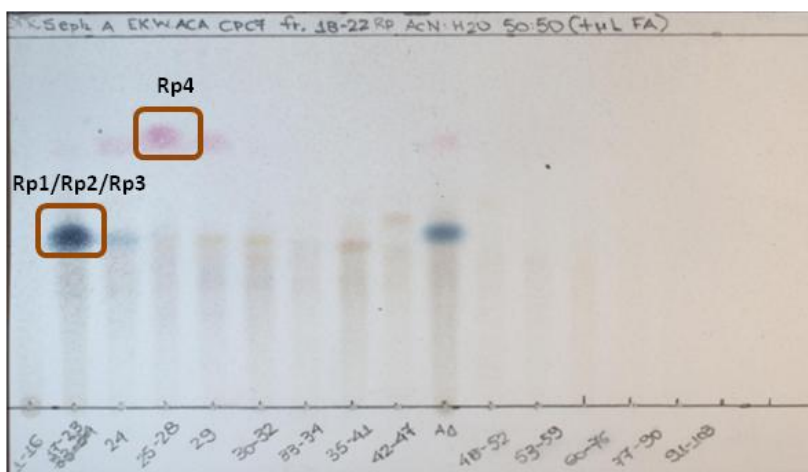
συνενώθηκαν σε 12 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 55 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_5 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex A	Βάρος (mg)
RP_CPC7_5 Seph.A fr.1-16	1.6
RP_CPC7_5 Seph.A fr.17-23	11.4
RP_CPC7_5 Seph.A fr.25-28	1.7
RP_CPC7_5 Seph.A fr.30-32	1.2
RP_CPC7_5 Seph.A fr.33-34	0.7
RP_CPC7_5 Seph.A fr.35-41	0.9
RP_CPC7_5 Seph.A fr.42-47	0.4
RP_CPC7_5 Seph.A fr.48-52	0.9
RP_CPC7_5 Seph.A fr.53-59	0.2
RP_CPC7_5 Seph.A fr.60-76	0.3
RP_CPC7_5 Seph.A fr.77-90	0.4
RP_CPC7_5 Seph.A fr.91-103	0.2

Η εικόνα των 12 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex A, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1 στα 254 nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:





Εικόνα 83 Απεικόνιση των 12 συνενωμένων κλάσμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex A με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR και ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **Rp1**, **Rp2**, **Rp3** και **Rp4**.

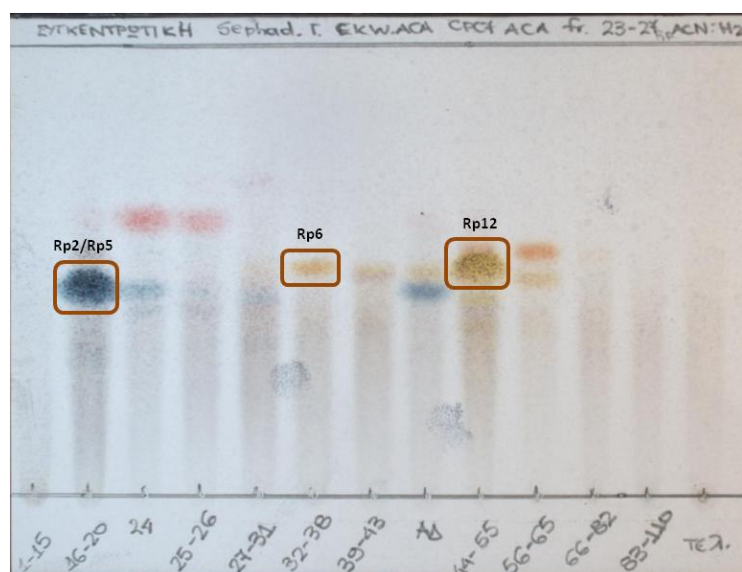
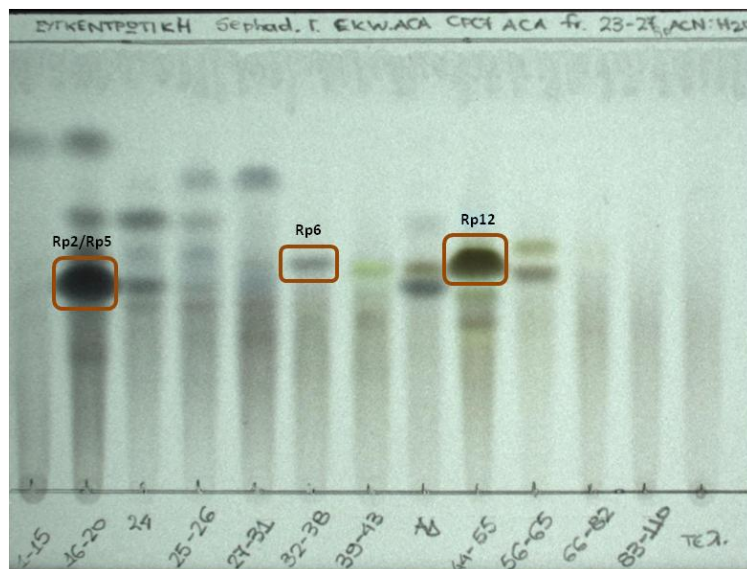
11.4.4 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_6

Το κλάσμα RP_CPC7_6 (65.6 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex C). Συνολικά παραλήφθηκαν 110 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), συνενώθηκαν σε 11 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 56 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_6 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex C	Βάρος (mg)
RP_CPC7_6 Seph.C fr.1-15	2.7
RP_CPC7_6 Seph.C fr.16-20	17.8
RP_CPC7_6 Seph.C fr.24-26	3.7
RP_CPC7_6 Seph.C fr.27-31	3.1
RP_CPC7_6 Seph.C fr.32-38	4.5
RP_CPC7_6 Seph.C fr.39-43	1.7
RP_CPC7_6 Seph.C fr.44-55	10.6
RP_CPC7_6 Seph.C fr.56-65	1.9
RP_CPC7_6 Seph.C fr.66-82	1.9
RP_CPC7_6 Seph.C fr.83-110	2.0
RP_CPC7_6 Seph.C fr.τελικό	1.7

Η εικόνα των 11 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex C, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1 στα 254 nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 84 Απεικόνιση των 11 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex C με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **Rp2**, **Rp5**, **Rp6** και **Rp12**.

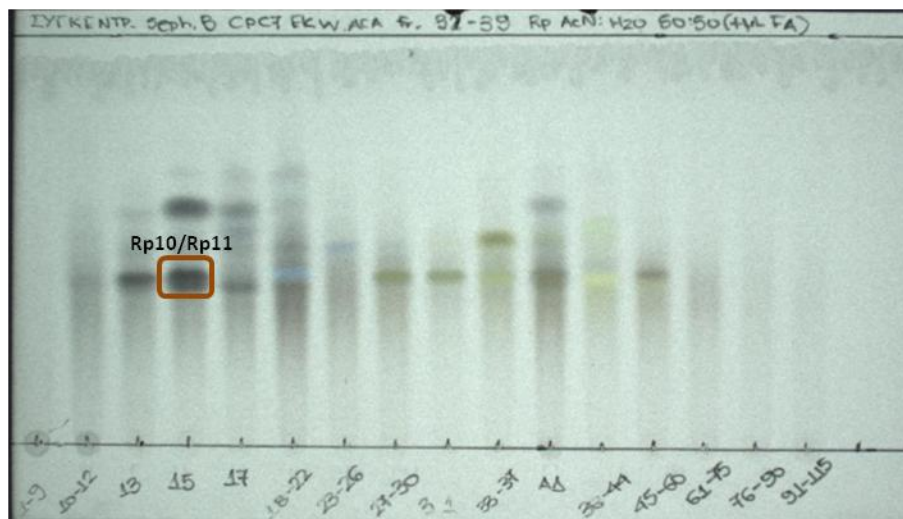
11.4.5 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_9

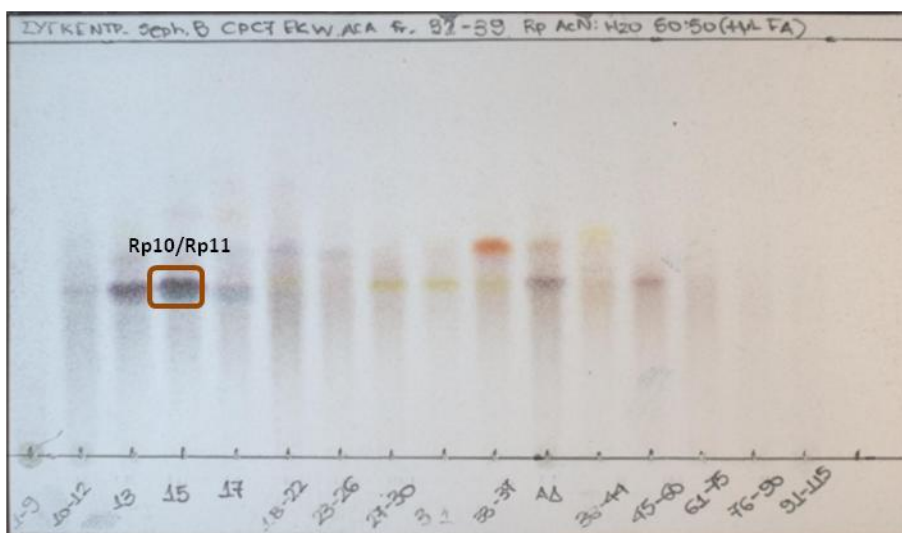
Το κλάσμα RP_CPC7_9 (30.5 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex B). Συνολικά παραλήφθηκαν 115 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), συνενώθηκαν σε 13 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 57 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_9 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex B	Βάρος (mg)
RP_CPC7_9 Seph.B fr.1-9	1.4
RP_CPC7_9 Seph.B fr.10-12	1.7
RP_CPC7_9 Seph.B fr.13	Ίχνη
RP_CPC7_9 Seph.B fr.14-15	Ίχνη
RP_CPC7_9 Seph.B fr.18-22	2.4
RP_CPC7_9 Seph.B fr.23-26	1.3
RP_CPC7_9 Seph.B fr.27-31	1.0
RP_CPC7_9 Seph.B fr.33-37	0.4
RP_CPC7_9 Seph.B fr.38-44	1.2
RP_CPC7_9 Seph.B fr.45-60	1.1
RP_CPC7_9 Seph.B fr.61-75	0.6
RP_CPC7_9 Seph.B fr.76-90	0.5
RP_CPC7_9 Seph.B fr.91-115	0.4

Η εικόνα των 13 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex B, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1 στα 254 nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:





Εικόνα 85 Απεικόνιση των 13 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex B με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι βάσει των παραπάνω TLC, το κλάσμα 14 συνενώθηκε με το κλάσμα 15 και στο συνενωμένο κλάσμα 27-30 προστέθηκε το κλάσμα 31, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα τελικά συνενωμένα κλάσματα 14-15 και 27-31, που με τα βάρη τους φαίνονται στον ανωτέρω πίνακα.

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **Rp10** και **Rp11**.

11.4.6 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_10

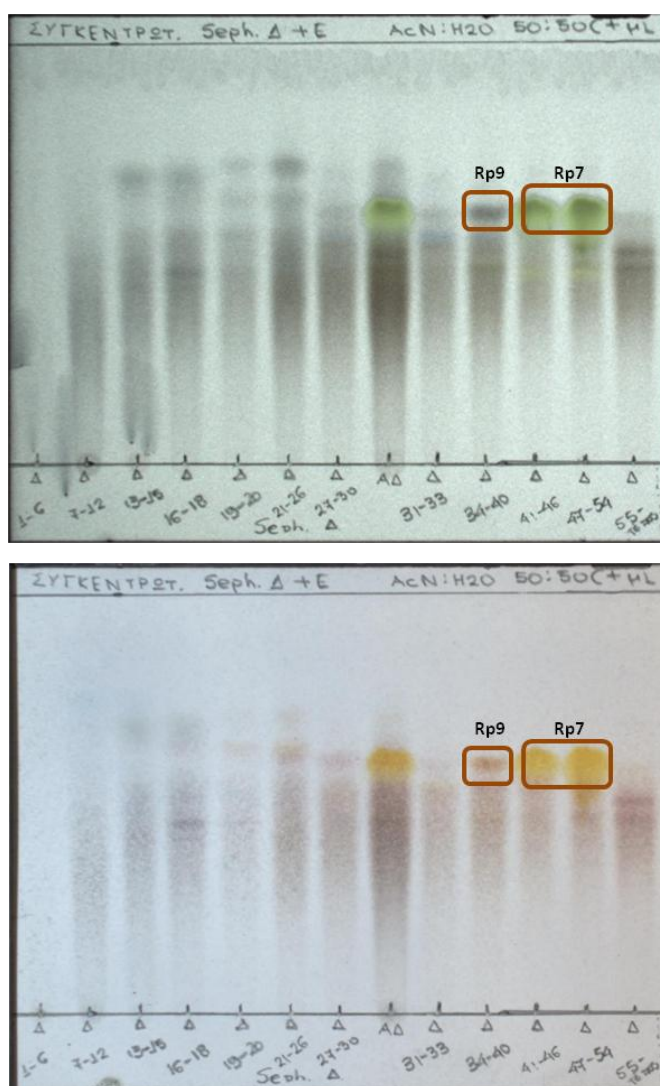
Το κλάσμα RP_CPC7_10 (93.5 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex D). Συνολικά παραλήφθηκαν 78 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), συνενώθηκαν σε 12 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 58 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_10 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex D	Βάρος (mg)
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 1-6	1.4
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 7-12	4.7
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 13-15	5.3
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 16-18	6.2
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 19-20	3.1
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 21-26	6.4

RP_CPC7_10 Seph.D fr. 27-30	4.3
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 31-33	3.0
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 34-40	7.1
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 41-46	11.7
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 47-54	12.1
RP_CPC7_10 Seph.D fr. 55-τέλος	4.4

Η εικόνα των 12 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex D, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC) (σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1), στα 254nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και θέρμανση, δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 86 Απεικόνιση των 12 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex D με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Αριστερά: εμφάνιση στα 254 nm. Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμαση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **Rp7 και Rp9**.

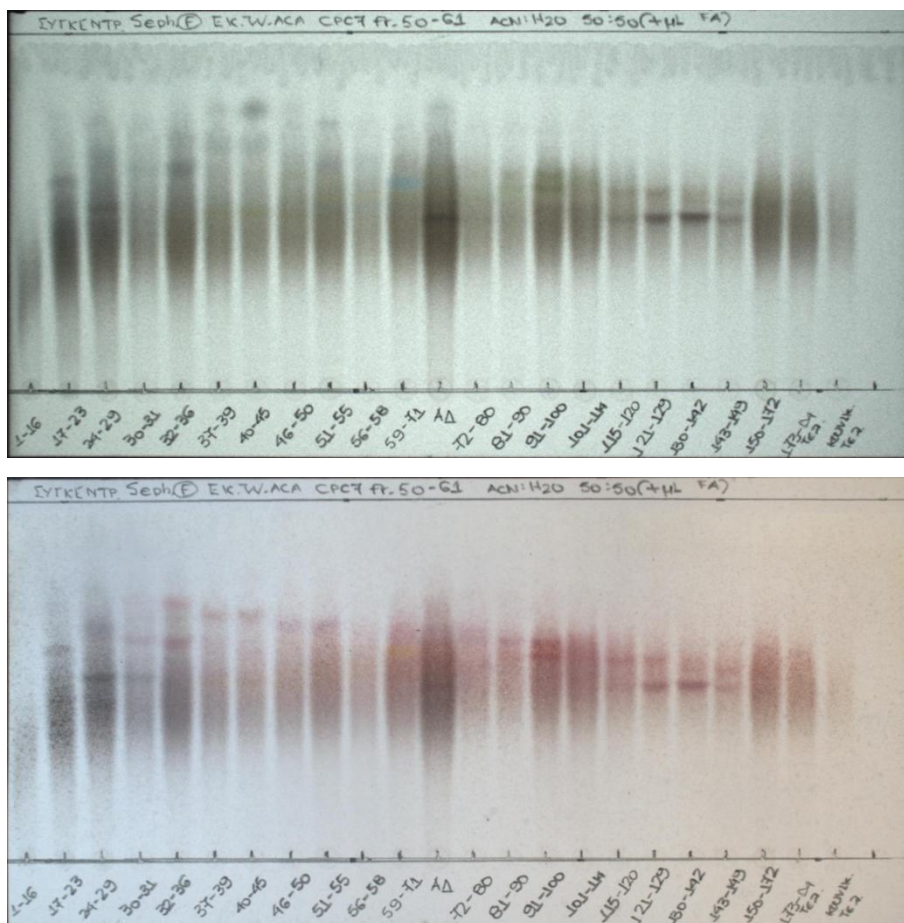
11.4.7 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_11

Το κλάσμα RP_CPC7_11 (189.9 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex F). Συνολικά παραλήφθηκαν 192 κλάσματα συν των κλασμάτων έκπλυσης της στήλης, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), συνενώθηκαν σε 22 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 59 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_11 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex F	Βάρος (mg)
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 1-16	4.5
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 17-23	17.3
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 24-29	22.1
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 30-31	5.4
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 32-36	10.6
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 37-39	5.4
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 40-45	11.3
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 46-50	8.4
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 51-55	9.5
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 56-58	3.8
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 59-71	14.2
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 72-80	9.6
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 81-90	8.0
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 91-100	8.5
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 101-114	8.6
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 115-120	3.6
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 121-129	5.0
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 130-142	5.5
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 143-149	2.4
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 150-172	5.5
RP_CPC7_11 Seph.F fr. 173-Δ4 τελ.	5.0
RP_CPC7_11 Seph.F τελ.κων.	3.0

Η εικόνα των 22 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex F, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC) (σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1) στα 254nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 87 Απεικόνιση των 22 συνενωμένων κλάσμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex F με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254 nm. Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR. Ωστόσο, λόγω της παρουσία πολύπλοκων μειγμάτων στα περισσότερα κλάσματα δεν ήταν εφικτή την ταυτοποίηση μεταβολιτών.

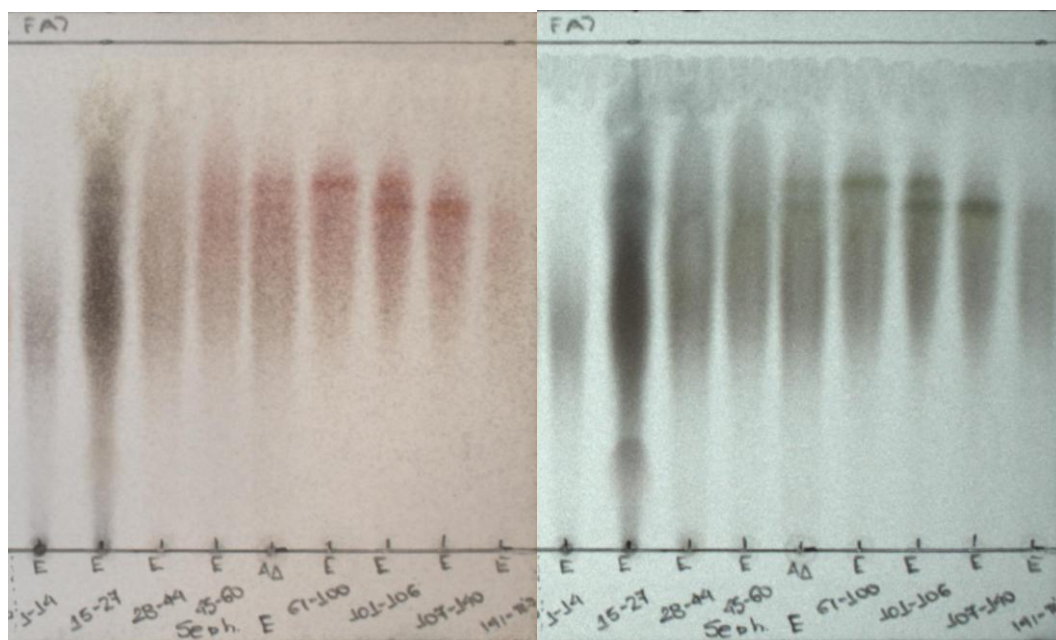
11.4.8 Μελέτη του κλάσματος RP_CPC7_12

Το κλάσμα RP_CPC7_12 (151.6 mg) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη (Sephadex E). Συνολικά παραλήφθηκαν 163 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), συνενώθηκαν σε 8 κλάσματα. Τα τελικά συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν και τα βάρη αυτών, παρατίθενται στον κατωτέρω πίνακα:

Πίνακας 60 Κωδικοί και βάρη των κλασμάτων που παραλήφθηκαν από την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_12 με τη στήλη Sephadex LH-20

Κλάσματα Sephadex E	Βάρος (mg)
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 1-14	6.4
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 15-27	24.6
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 28-44	22.6
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 45-60	15.1
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 61-100	27.7
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 101-106	2.6
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 107-140	11.7
RP_CPC7_12 Seph.E fr. 141-τελ.	10.8

Η εικόνα των 8 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex E, με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC), με σύστημα ανάπτυξης AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0.1 στα 254 nm και στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση, δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 88 Απεικόνιση των 8 συνενωμένων κλασμάτων που προέκυψαν από τη Sephadex E με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας αντίστροφης φάσης (Rp-TLC). Επάνω: εμφάνιση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: AcN:H₂O:FA σε αναλογία 50:50:0,1

Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR, αλλά η παρουσία πολύπλοκων μιγμάτων στα συνενωμένα κλάσματα κατέστησε αδύνατη την ταυτοποίηση μεταβολιτών.

11.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *R.*

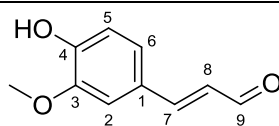
pseudoacacia

11.5.1 Μεταβολίτης Rp1

Ο μεταβολίτης **Rp1** παραλήφθηκε ως μείγμα με τους μεταβολίτες Rp2 και Rp3, με τη μορφή κίτρινης σκόνης μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_ 5 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex A). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται μπλε. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp1** είναι η κονιφεραλδεΐδη.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται η ύπαρξη ενός αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.57 ppm, αρωματικών πρωτονίων στην περιοχή 7.50-6.60 ppm, πρωτονίων που ανήκουν σε διπλό δεσμό στα 7.60-6.60 και χαρακτηριστικών μεθοξυλομάδων στη περιοχή από 3.95-3.75 ppm. Αρχικά, στα 9.57 ppm παρατηρούμε μία διπλή κορυφή με σύζευξη $J = 7.6$ Hz, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στην αλδεϋδομάδα (H-9). Στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε ένα ABX σύστημα και συγκεκριμένα δυο διπλές κορυφές στα 7.25 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 1.6$ Hz και 6.85 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.2$ Hz, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα H-2 και H-5 του αρωματικού δακτυλίου της κονιφεραλδεΐδης. Επίσης, εμφανίζεται μια διπλή διπλής κορυφή (*dd*) στα 7.16 ppm με σταθερές σύζευξης 8.2 και 1.6 Hz, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στη θέση C-6. Στα 7.57 ppm και στα 6.64 ppm παρατηρούμε μία διπλή κορυφή ($J = 15.9$ Hz) και μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 15.9$ και 7.6 Hz), οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-8 του διπλού δεσμού της κονιφεραλδεΐδης. Καταληκτικά, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια της θέσης C-3.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τη βιβλιογραφία και τα φασματικά δεδομένα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα: (Lim et al., 2005)



coniferyl aldehyde

Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	126.6
2	7.25 (1H, d, J = 1.6)	109.6
3	-	147.1
4	-	149.1
5	6.85 (1H, d, J = 8.2)	115.1
6	7.16 (1H, dd, J = 8.2 / 1.6)	124.3
7	7.57 (1H, d, J = 15.9)	153.0
8	6.64 (1H, dd, J = 15.9 / 7.6)	126.9
9	9.57 (1H, d, J = 7.6)	192.4
OCH ₃	3.90 (3H, s)	56.2

Η κονιφεραλδεΐδη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το είδος *R. pseudoacacia*. Η κονιφεραλδεΐδη έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλλιας και ξύλου (B. Cabrera et al., 2012) και καταγράφεται στη βιβλιογραφία ως αναστολέας της συνθάσης των προσταγλανδινών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. (Korkina, 2007)

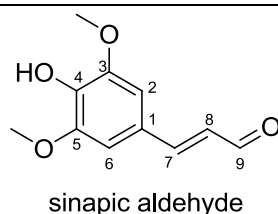
11.5.2 Μεταβολίτης Rp2

Ο μεταβολίτης **Rp2** παραλήφθηκε ως μείγμα με τους μεταβολίτες Rp1 και Rp3, μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_5 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex A). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται μπλε. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp2** είναι η σιναπαλδεΐδη.

Αρχικά στα 9.57 ppm παρατηρούμε μία διπλή κορυφή ($J = 7.9$ Hz), η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στη θέση C-9. Στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε μία απλή κορυφή στα 6.99 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2 και H-6 του αρωματικού δακτυλίου της σιναπαλδεΐδης. Επίσης, παρατηρούμε μια διπλή κορυφή ($J = 7.9$ Hz) και μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 15.9 / 7.9$ Hz) στα 7.57 και στα 6.65 ppm αντίστοιχα, καθεμία εκ των οποίων ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-8. Καταληκτικά, στην οξυγονωμένη

περιοχή του φάσματος παρουσιάζεται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια των θέσεων C-3 και C-5.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Dong et al., 2018)



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	125.6
2/6	6.99 (2H, s)	105.7
3/5	-	147.3
4	-	138.0
7	7.57 (1H, d, J = 15.9)	153.3
8	6.65 (1H, dd, J = 15.9 / 7.9)	126.7
9	9.57 (1H, d, J = 7.9)	193.5
OCH ₃	3.89 (6H, s)	56.4

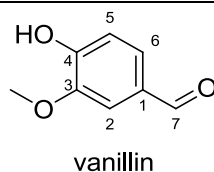
Η σιναπαλδεΐδη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το φυτικό είδος της *R. pseudoacacia*. Η σιναπαλδεΐδη έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλλιας (B. Cabrera et al., 2012) ενώ καταγράφεται στη βιβλιογραφία ως αναστολέας της συνθάσης των προσταγλανδινών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Korkina, 2007) και ως παράγοντας με κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς U373 του γλοιοβλαστώματος. (Brugère et al., 2011)

11.5.3 Μεταβολίτης Rp3

Ο μεταβολίτης **Rp3** παραλήφθηκε ως μείγμα με τους Rp1 και Rp2 μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_5 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex A). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται μπλε. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp3** είναι η βανιλίνη.

Αρχικά, στα 9.74 ppm παρατηρούμε μία απλή κορυφή, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο υδρογόνο της αλδεΰδομάδας (H-7). Στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε δυο αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές στα 7.44 ppm και 7.43 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-6 του αρωματικού δακτυλίου της βανιλίνης. Επίσης, εμφανίζεται μια ευρεία διπλή κορυφή στα 6.94 ppm ($J = 7.9$ Hz), η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-5. Καταληκτικά, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρουσιάζεται μία απλή κορυφή στα 3.90 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθοξύλιο της θέσης C-3.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Luo et al., 2009)



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	132.3
2	7.44 (1H, *)	114.5
3	-	147.2
4	-	151.8
5	6.94 (1H, d, J=7.90)	108.8
6	7.43 (1H, s*)	127.5
7	9.74 (1H, s)	191.0
OCH ₃	3.90 (3H, s)	56.0

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

Η βανιλίνη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το είδος της *R. pseudoacacia* και έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλλιας (B. Cabrera et al., 2012). Χρησιμοποιείται ως αρωματική ουσία, ενώ πέραν των αρωματικών της ιδιοτήτων παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. (Mourtzinou et al., 2009)

11.5.4 Μεταβολίτης Rp4

Ο μεταβολίτης **Rp4** παραλήφθηκε με τη μορφή λευκών κρυστάλλων μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_5 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex A). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία

απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται ροζ. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp4** είναι ο 4-υδροξυσαλικυλικό οξύ ή 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρείται η ύπαρξη αρωματικών πρωτονίων στην περιοχή 7.60-6.10 ppm. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε μια διπλή κορυφή ($J = 6.5$ Hz) στα 7.56 ppm και μια διπλή διπλής κορυφή ($J = 6.5 / 2.0$ Hz) στα 6.24 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-5 του αρωματικού δακτυλίου. Επίσης, εμφανίζεται μια διπλή κορυφή ($J = 2.0$ Hz) στα 6.18 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-3. Στο φάσμα HMBC, φαίνεται η σύζευξη ανάμεσα στο πρωτόνιο H-6 και τον C-7 της καρβοξυλομάδας στα 172.0 ppm. Αντίστοιχα, παρατηρούμε τη σύζευξη ανάμεσα στο H-3 και τους C-2 (163.4 ppm) και C-4 (163.2 ppm).

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Hessel et al., 2005)



Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1	-	104.0
2	-	163.4
3	6.18 (1H, <i>d</i> , $J = 2.0$)	102.3
4	-	163.2
5	6.24 (1H, <i>dd</i> , $J = 6.5 / 2.0$)	107.4
6	7.56 (1H, <i>d</i> , $J = 6.5$)	131.9
7	-	172.0

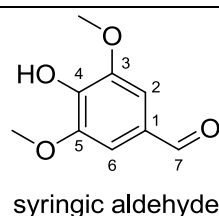
Η ουσία 4-υδροξυσαλικυλικό οξύ έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το είδος *R. pseudoacacia*. Χρησιμοποιείται ως προσθετικό τροφίμων, ενώ αποτελεί χρήσιμη πρόδρομη ουσία για την παραγωγή χημικών ουσιών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Το 4-υδροξυσαλικυλικό οξύ παρουσιάζει ισχυρή *in vitro* κυτταροτοξική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς TCA8113, η οποία ευθύνεται για το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου της γλώσσας. (Zhao et al., 2014)

11.5.5 Μεταβολίτης Rp5

Ο μεταβολίτης **Rp5** παραλήφθηκε ως μείγμα με το μεταβολίτη Rp2, μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_6 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex C). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται μπλε. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp5** είναι η συριγγαλδεΐδη.

Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρείται η ύπαρξη μιας απλής κορυφής στα 9.74 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αλδεϋδικό πρωτόνιο H-7. Στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε μία απλή κορυφή στα 7.21 ppm που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα H-2 και H-6 του αρωματικού δακτυλίου της συριγγαλδεΐδης, τα οποία είναι ισοδύναμα και παρουσιάζονται στην ίδια χημική μετατόπιση. Καταληκτικά, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζεται στα 3.91 ppm μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια των θέσεων C-3 και C-5.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Hong et al., 2016)



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	129.2
2/6	7.21 (1H, s)	108.2
3/5	-	149.6
4	-	143.7
7	9.74 (1H, s)	192.9
OCH ₃	3.91 (6H, s)	56.8

Η συριγγαλδεΐδη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το είδος της *R. pseudoacacia* και έχει χαρακτηριστικό άρωμα βανίλλιας (B. Cabrera et al., 2012). Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η συριγγαλδεΐδη μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης του

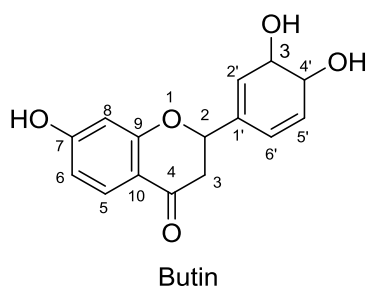
αίματος, αυξάνοντας την πρόσληψη της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς. (Huang et al., 2012)

11.5.6 Μεταβολίτης Rp6

Ο μεταβολίτης **Rp6** παραλήφθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_6 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του φυτικού είδους *Robinia pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex C). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται πορτοκαλί. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp6** είναι η μπουτίνη.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, παρατηρούμε τρεις διπλώς διπλές κορυφές στα 5.32 ppm ($J = 13.0 / 3.0$ Hz), 3.01 ppm ($J = 17.0 / 13.0$ Hz) και 2.70 ppm ($J = 17.0 / 3.0$ Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων C-2 και C-3, χαρακτηριστικό των φλαβονώνων. Στην αρωματική περιοχή, παρατηρούμε την ύπαρξη ενός ABX συστήματος και πιο συγκεκριμένα δύο διπλές κορυφές στα 7.72 ppm ($J = 8.7$ Hz) και στα 6.36 ppm ($J = 2.3$ Hz), καθώς και μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.50 ppm ($J = 8.7 / 2.3$), οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5, H-8 και H-6. Τα παραπάνω περιγραφέντα σήματα είναι χαρακτηριστικά ενός 1,2,4-τρι-υποκατεστημένου A δακτυλίου φλαβονόνης. Τέλος, τα αρωματικά πρωτόνια H-2', H-3' και H-6' του δακτυλίου B εμφανίζονται σε δ 6.80, 6.79 και 6.93, αντίστοιχα.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Cavalheiro et al., 2008) (Kitanaka and Takido, 1992)



Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
2	5.32 (1H_{ax} , dd , $J = 13.0 / 3.0$)	81.0
3	3.01 (1H_{ax} , dd , $J = 17.0 / 13.0$)	44.9

	2.70 (1H _{eq.} , dd, J = 17.0 / 3.0)	
4	-	193.5
5	7.72 (1H, d, J = 8.7)	129.8
6	6.50 (1H, dd, J = 8.7 / 2.3)	111.3
7	-	165.2
8	6.36 (1H, d, J = 2.3)	103.7
9		163.7
10		114.1
1'	-	132.0
2'	6.93 (1H, d, J = 1.8)	114.2
3'	-	146.0
4'	-	146.2
5'	6.79 (1H, *)	116.0
6'	6.80 (1H, *)	119.2

*Παρατηρείται αλληλεπικάλυψη σημάτων

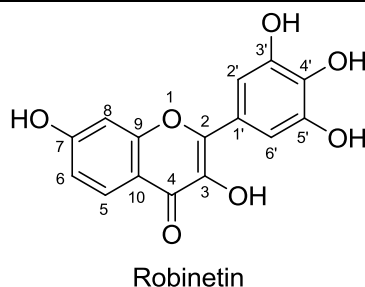
Η μπουτίνη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το είδος *R. pseudoacacia*. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η μπουτίνη, όπως και άλλα φυσικά παράγωγα φλαβονών, αποτελεί αποτελεσματικό, ασφαλή και καλά ανεκτό παράγοντα για τη θεραπεία της λεύκης, καθώς επιδρά στη μελανογένεση των κυττάρων B16F10. (Lv et al., 2015)

11.5.7 Μεταβολίτης Rp7

Ο μεταβολίτης **Rp7** παραλήφθηκε, ως σκόνη κίτρινου χρώματος, μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_10 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex D). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (DMSO-*d*₆) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp7** είναι η ρομπινετίνη.

Στο φάσμα ¹H-NMR, παρατηρούμε χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος στην αρωματική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 7.91 ppm (*J* = 8.7 Hz) και στα 6.85 ppm (*J* = 2.1 Hz) και μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.89 ppm (*J* = 8.7 / 2.1 Hz). Τα παραπάνω περιγραφέντα αρωματικά σήματα περιγράφουν ένα 1,2,4-τρι-υποκατεστημένο Α αρωματικό δακτύλιο φλαβονόλης και συγκεκριμένα της ρομπινετίνης. Τέλος, τα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' του αρωματικού δακτυλίου Β εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια στα 7.24 ppm.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Germanò et al., 2015)



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	147.9
3	-	139.4
4	-	176.0
5	7.91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7)	128.3
6	6.89 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.7/2.1)	115.5
7	-	164.7
8	6.85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1)	102.8
9	-	158.3
10	-	116.3
1'	-	123.5
2'/6'	7.24 (2H, <i>s</i>)	109.0
3'/5'	-	146.8
4'	-	136.0

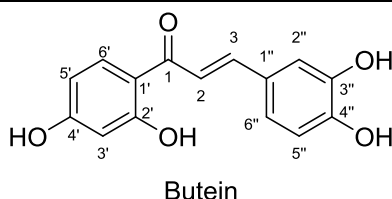
Η ρομπινετίνη έχει απομονωθεί από το είδος *R. pseudoacacia*. (Nasir et al., 2005) Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η ρομπινετίνη είναι δραστική έναντι των βακτηρίων *Proteus vulgaris* και *Staphylococcus aureus* (Morl et al., 1987), ενώ παράλληλα παρουσιάζει αντιαγγειογενετική δράση, που οφείλεται στον τρισυποκατεστημένο C δακτύλιο της. (Germanò et al., 2015)

11.5.8 Μεταβολίτης Rp8

Ο μεταβολίτης **Rp8** παραλήφθηκε με τη μορφή πορτοκαλοκίτρινης σκόνης, μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_3 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia*, με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-prep2). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται πορτοκαλί. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp8** είναι η μπουτεΐνη.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 7.54 ppm και στα 7.72 ppm με σταθερά σύζευξης 15.3 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-3 μιας χαλκόνης. Στην αρωματική περιοχή, παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα δυο ABX συστημάτων και πιο συγκεκριμένα, δύο διπλές κορυφές στα 7.94 ppm ($J = 8.9$ Hz) και στα 6.29 ppm ($J = 2.2$) και μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.42 ppm ($J = 8.9 / 2.2$), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα H-6', H-3', H-5' του δακτυλίου A. Επιπλέον παρατηρούμε τρεις κορυφές στα 7.19 ppm ($d, J = 1.6$), στα 6.82 ppm ($d, J = 8.1$) και στα 7.12 ppm ($dd, J = 8.1 / 1.6$), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν πρωτόνια H-2'', H-5'' και H-6'', του δακτυλίου B.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Prachayasittikul et al., 2008)



Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1'	-	113.2
2'	-	165.4
3'	6.29 (1H, $d, J = 2.2$)	102.6
4'	-	164.3
5'	6.42 (1H, $dd, J = 8.9 / 2.2$)	107.8
6'	7.94 (1H, $d, J = 8.9$)	131.5
1	-	191.8
2	7.72 (1H, $d, J = 15.3$)	116.8

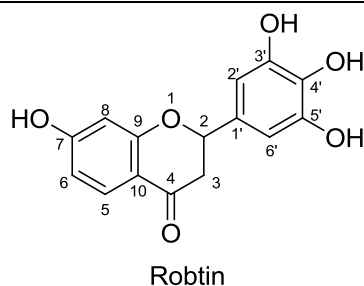
3	7.54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15.3)	144.6
1''	-	126.7
2''	7.19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.6)	114.2
3''	-	147.8
4''	-	144.8
5''	6.82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.1)	115.1
6''	7.12 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.1 / 1.6)	122.1

Η μπουτεΐνη έχει ταυτοποιηθεί αλλά δεν έχει απομονωθεί από το φυτικό είδος της *R. pseudoacacia*. Στη βιβλιογραφία, η μπουτεΐνη αναφέρεται ως ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων αλλά και ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας. (Prachayasittikul et al., 2008)

11.5.9 Μεταβολίτης Rp9

Ο μεταβολίτης **Rp9** παραλήφθηκε με τη μορφή κίτρινης σκόνης, μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_10 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex D). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται πορτοκαλί. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (MeOD) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp9** είναι η ρομπτίνη.

Στο φάσμα ¹H-NMR, παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα μιας φλαβανόνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε τρεις διπλές διπλών κορυφές στα 5.25 ppm (*J* = 12.8 / 2.7 Hz), στα 2.96 ppm (*J* = 16.7 / 12.8 Hz) και στα 2.70 ppm (*J* = 16.7 / 2.7 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2, H-3β και H-3α. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος, παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 7.71 ppm (*J* = 8.6 Hz) και στα 6.35 ppm (*J* = 2.3 Hz), καθώς και μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.49 ppm (*J* = 8.6 / 2.3 Hz), οι οποίες αντιστοιχούν στα H-5, H-8 και H-6. Επιπλέον, τα σήματα των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου Β, H-2' και H-6', εμφανίζονται στα 6.48 ppm ως μία ευρεία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Στο φάσμα COSY φαίνεται η σύζευξη ανάμεσα στα πρωτόνια H-5 και H-6 καθώς και η σύζευξη ανάμεσα στα πρωτόνια H-2, H-3β και H-3α. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	5.25 (1H, <i>dd</i> , J = 12.8 / 2.7)	80.7
3	2.70 (1H _{eq.} , <i>dd</i> , J = 16.7 / 2.7) 2.96 (1H _{ax.} , <i>dd</i> , J = 16.7 / 12.8)	44.8
4	-	193.8
5	7.71 (1H, <i>d</i> , J = 8.6)	129.6
6	6.49 (1H, <i>dd</i> , J = 8.6 / 2.3)	111.6
7	-	165.6
8	6.35 (1H, <i>d</i> , J = 2.3)	103.5
9	-	165.5
10	-	114.8
1'	-	130.7
2'/6'	6.48 (2H, <i>brs</i>)	106.3
3'/5'	-	146.7
4'	-	134.3

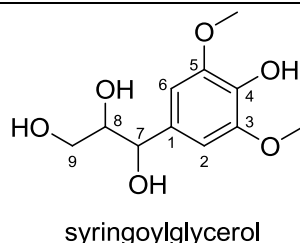
Η ρομπτίνη έχει απομονωθεί από το είδος της *R. pseudoacacia*. (Roux and Paulus, 1962) Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η ρομπτίνη, όπως και άλλα φλαβονοειδή, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω της αναστολής της σύνθεσης NO στα μακροφάγα κύτταρα. (Jiang et al., 2017)

11.5.10 Μεταβολίτης Rp10

Ο μεταβολίτης **Rp10** παραλήφθηκε σε μείγμα με το μεταβολίτη μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_9 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex B). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται γκρι. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp10** είναι η συριγγυλογλυκερόλη.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, παρατηρείται η ύπαρξη μίας απλής κορυφής που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια στα 6.66 ppm και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου H-2 και H-6. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος, παρουσιάζεται στα 4.72 ppm μία διπλή κορυφή ($J = 4.4 \text{ Hz}$), η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-7 και μια διπλή διπλής κορυφή ($J = 6.7 / 4.2 \text{ Hz}$) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8. Επιπλέον, στα 4.27 ($J = 8.7 / 6.7\text{Hz}$) και 3.90 ppm (m) παρατηρούνται δυο κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-9. Στο φάσμα COSY παρατηρούνται όλες οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων H-7/H-8, H-8/H-9a/H-9β. Καταληκτικά, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρείται και η ύπαρξη μίας απλής κορυφής σε δ 3.85 που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια των θέσεων C-3 και C-5. Στο φάσμα HMBC, φαίνεται η συσχέτιση των πρωτονίων H-2 και H-6 στα 6.66 ppm με τους άνθρακες των θέσεων C-1 (J^2) και C-7 (J^3).

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Otsuka et al., 1989)



Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1	-	135.7
2/6	6.66 (2H, s)	104.3
3/5	-	148.9
4	-	136.2
7	4.72 (1H, <i>d</i> , $J = 4.2$)	87.3
8	3.15 (1H, <i>dd</i> , $J = 6.7 / 4.2$)	55.2
9	4.27 (1H, <i>dd</i> , $J = 8.7 / 6.7$)	72.4
	3.90 (1H, <i>m</i>)	
OCH_3	3.85 (6H, s)	56.4

Η συριγγυλογλυκερόλη αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης της λιγνίνης με υδρόλυση. (Otsuka et al., 1989) και δεν έχει απομονωθεί ξανά από το είδος της *R. pseudoacacia*. Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η συριγγυλογλυκερόλη παρουσιάζει ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-12, IL-6 και TNF- α σε δενδριτικά

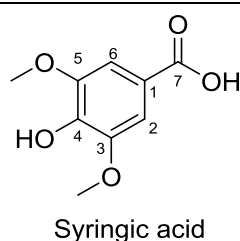
κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών. (Bone Marrow-derived Dendritic Cells-BMDCs). (Dat et al., 2015)

11.5.11 Μεταβολίτης Rp11

Ο μεταβολίτης **Rp11** παραλήφθηκε σε μείγμα με το μεταβολίτη **Rp10** μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_9 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex B). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται γκρι. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp11** είναι το συριγγικό οξύ.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$, παρατηρείται η ύπαρξη μίας απλής κορυφής που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια στα 7.33 ppm και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2 και H-6 του αρωματικού δακτυλίου. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος και συγκεκριμένα σε δ 3.85, παρατηρείται μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθοξύλια των θέσεων C-3 και C-5. Στο φάσμα HMBC, φαίνεται η συσχέτιση των πρωτονίων H-2 και H-6 στα 7.33 ppm με τους άνθρακες των θέσεων C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 και C-7, ενώ παρατηρείται και η συσχέτιση των πρωτονίων των μεθοξυλίων των θέσεων C-3 και C-5 στα 3.85 ppm με τους άνθρακες C-3 και C-5.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. (Nishanbaev et al., 2015)



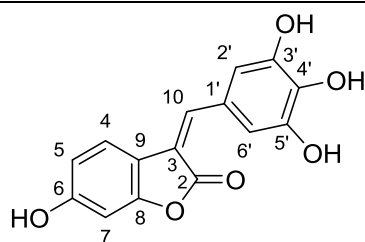
Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1	-	121.9
2/6	7.33 (2H, s)	108.1
3/5	-	148.9
4	-	141.2
7	-	170.1
OCH ₃	3.85 (6H, s)	56.5

Το συριγγικό οξύ δεν έχει απομονωθεί από το είδος της *R. pseudoacacia* αλλά έχει απομονωθεί από άλλα είδη της οικογένειας Fabaceae, όπως τα φυτικά είδη *Acacia leucorhloea* και *Acacia mearnsii*. Στη βιβλιογραφία, το συριγγικό οξύ αναφέρεται ως αναστολέας της αναγωγής της αλδόζης, που ενέχεται στην εκδήλωση καταρράκτη και αμφιβληστροειδοπάθειας, συμβάλλοντας στη μείωση της εμφάνισης αυτών των παθήσεων. (Chethan et al., 2008)

11.5.12 Μεταβολίτης Rp12

Ο μεταβολίτης **Rp12** παραλήφθηκε με τη μορφή κίτρινης σκόνης μετά την επεξεργασία του κλάσματος RP_CPC7_6 του CPC του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού και πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sephadex C). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα, η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **Rp12** είναι η 6,3',4',5'-τετραυδροξυισοαουρόνη.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR, παρατηρούμε μία απλή κορυφή στα 7.43 ppm που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό H-10. Στην αρωματική περιοχή, παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές στα 7.87 ppm (*J* = 8.4 Hz) και στα 6.60 ppm (*J* = 2.2 Hz), καθώς και μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.58 ppm (*J* = 8.4 / 2.2 Hz), οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4, H-7 και H-5. Τα αρωματικά πρωτόνια H-2' και H-6' του δακτυλίου Β είναι χημικά ισοδύναμα και εμφανίζονται στα 6.82 ppm ως μια απλή κορυφή. Στο φάσμα COSY, φαίνεται η σύζευξη ³*J* του πρωτονίου H-4 στα 7.84 ppm με το πρωτόνιο H-5 στα 6.56 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων των ανθράκων επιβεβαιώθηκαν από τα φάσματα δυο διαστάσεων HSQC και HMBC.



6,3',4',5'-tetrahydroxyisoaurone

Θέση	¹ H NMR	¹³ C NMR
------	--------------------	---------------------

	δ σε ppm (J σε Hz)	δ σε ppm
2	-	171.8
3	-	119.8
4	7.84 (1H, <i>d</i> , $J = 8.4$)	124.9
5	6.59 (1H, <i>dd</i> , $J = 8.4/2.2$)	111.7
6	-	161.2
7	6.60 (1H, <i>d</i> , $J = 2.2$)	99.9
8	-	156.8
9	-	115.0
10	7.43 (1H, <i>s</i>)	139.8
1'	-	138.8
2'/6'	6.82 (2H, <i>s</i>)	110.8
3'/5'	-	146.7
4'	-	137.5

Ο μεταβολίτης **Rp 12**, όπως διαπιστώθηκε από την αναζήτηση στη βάση δεδομένων REAXYS, δεν έχει απομονωθεί ως φυσικό προϊόν μέχρι σήμερα. (Hyun et al. 2010)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε (α) η συγκριτική μελέτη του φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων των μετρίως ψημένων ξύλων (MT) υπό τη μορφή “chips”, των τεσσάρων ειδών *Quercus petraea*, *Quercus alba*, *Quercus robur*, και *Robinia pseudoacacia* καθώς και (β) η φυτοχημική ανάλυση των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων (EtOH:H₂O 1:1) των λιγότερο μελετημένων ξύλων των ειδών *Quercus robur* και *Robinia pseudoacacia*.

Η συγκριτική μελέτη του φυτοχημικού προφίλ πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), για το σύνολο των εκχυλισμάτων, τα οποία παραλήφθηκαν με τις τεχνικές της Συμβατικής Εκχύλισης με Διαβροχή, της Υγρής-Υγρής Εκχύλισης και της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (ASE). Όσον αφορά τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα, με βάση τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων διαπιστώθηκε ότι η τεχνική της Επιταχυνόμενης Εκχύλισης είχε 2-3 φορές υψηλότερη απόδοση έναντι της Συμβατικής Εκχύλισης με Διαβροχή, και για τα τέσσερα υπό μελέτη είδη ξύλου. Ωστόσο, από τη σύγκριση του φυτοχημικού προφίλ του συνόλου των παραληφθέντων εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPTLC, καθίσταται εμφανές ότι και οι δύο μέθοδοι εκχύλισης που ακολουθήθηκαν οδήγησαν στην παραλαβή του συνόλου των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών από κάθε είδος, χωρίς έντονες ποιοτικές διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την HPTLC κανονικής και αντίστροφης φάσης, τα ξύλα των ειδών *Q. robur* και *Q. alba* έχουν παρόμοιο χημικό προφίλ, ενώ το ξύλο του είδους *Q. petraea* παρουσιάζει πλουσιότερο χημικό φορτίο, γεγονός που αιτιολογεί την παραδοσιακή χρήση της γαλλικής δρυός στα βαρέλια παλαίωσης του οίνου. Το ξύλο του είδους *R. pseudoacacia* παρουσιάζει πλούσιο και διαφορετικό χημικό προφίλ σε σχέση με τα άλλα υπό μελέτη είδη του γένους *Quercus*, λόγω της παρουσίας φλαβονοειδών και συμπυκνωμένων ταννινών τύπου προρομπινετινιδίνης (προρομπινετίνες). Η ελλιπή μελέτη του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του ξύλου του *Q. robur* σε συνδυασμό με την ελλιπή μελέτη και το πλούσιο χρωματογραφικό προφίλ του είδους *R. pseudoacacia* αποτέλεσαν τους λόγους επιλογής των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων των συγκεκριμένων ειδών προς περαιτέρω ανάλυση.

Η φυτοχημική ανάλυση του μετρίως ψημένου ξύλου υπό μορφή “chips” του είδους *Q. robur* οδήγησε στην ταυτοποίηση 21 περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών της κατηγορίας των φαινολικών συστατικών. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να επισημανθεί η απουσία τριτερπενοειδών στην υπό μελέτη πρώτη ύλη (παρότι καταγράφεται παρουσία

τριτερπενοειδών στο ακάπνιστο ξύλο του φυτικού είδους *Q. robur* στη βιβλιογραφία, όπως αναφέρεται και στο Υποκεφάλαιο 2.1.2.5.3 της Εισαγωγής), πιθανότατα εξαιτίας του μετρίου βαθμού ψησίματος του ξύλου.

Η φυτοχημική ανάλυση του μετρίως ψημένου ξύλου υπό μορφή “chips” του είδους *R. pseudoacacia* οδήγησε στην παραλαβή και ταυτοποίηση 12 δευτερογενών μεταβολιτών.

Η Ταχεία Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (FCPC) ήταν κυρίαρχης σημασίας στη φυτοχημική ανάλυση των δύο πρώτων υλών. Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την αποτελεσματική αρχική κλασμάτωση των εκχυλισμάτων και ακολούθησε ο Περιγραφικός Οργανοληπτικός Έλεγχος (Descriptive Sensory Analysis) των FCPC κλασμάτων για το χαρακτηρισμό τους ως προς την οσμή και τη γεύση, με σκοπό τον εντοπισμό των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών με ενδιαφέροντα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών στα FCPC κλάσματα του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *Q. robur* έγινε με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS).

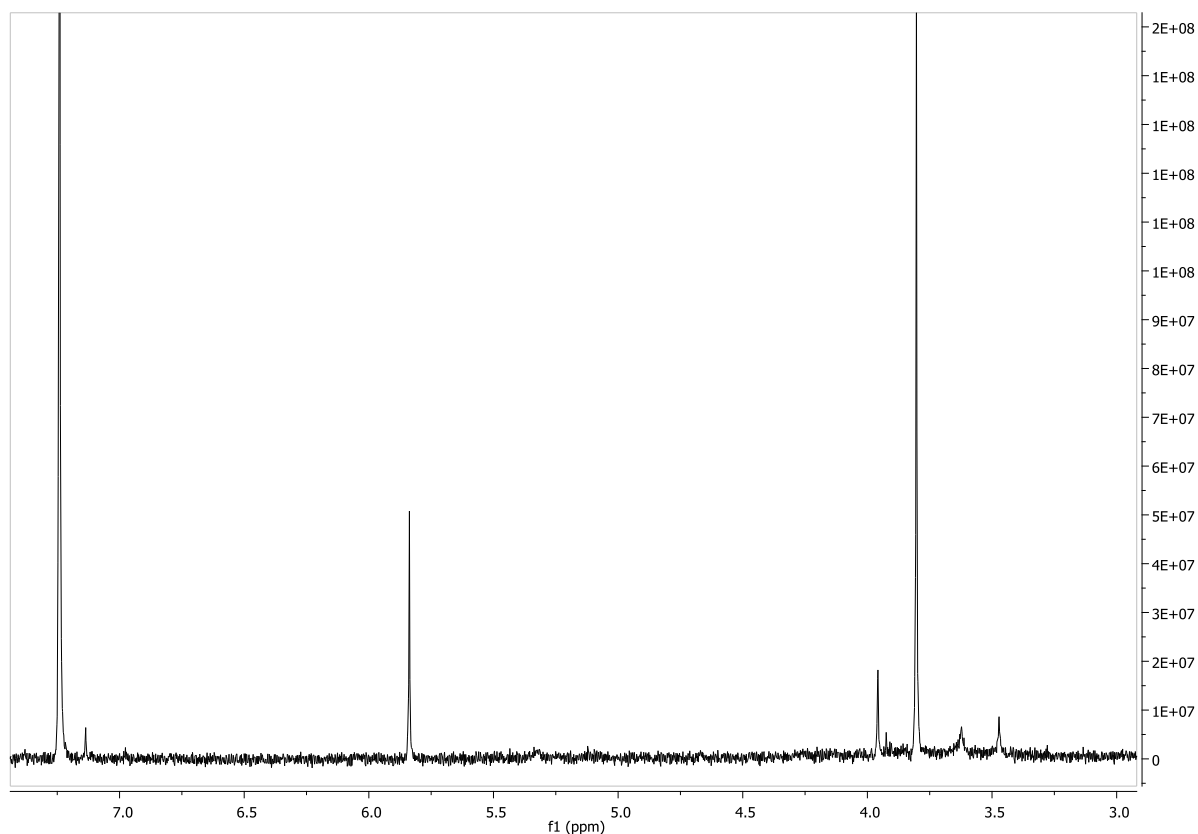
Η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών στα FCPC κλάσματα του υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *R. pseudoacacia* πραγματοποιήθηκε, κυρίως με την τεχνική της Χρωματογραφίας Στήλης Μοριακού Αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH20 και με την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep-TLC). Η απόδοση της δομής των απομονωθέντων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Μελλοντικές προοπτικές της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αποτελούν:

- Η εύρεση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών των πολικών FCPC κλασμάτων του είδους *Q. robur*, με ενδιαφέροντα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.
- Η φυτοχημική μελέτη των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων των “chips” των ειδών *Q. alba* και *Q. petraea*, μέσω της αρχικής κλασμάτωσης τους με την τεχνική της Ταχείας Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντρηση (FCPC).
- Η εκχύλιση και η φυτοχημική ανάλυση, βάσει των αποτελεσμάτων του Περιγραφικού Οργανοληπτικού Ελέγχου, ξύλων εναλλακτικών ειδών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία αρωματισμού του οίνου (π.χ. *Castanea sativa*).

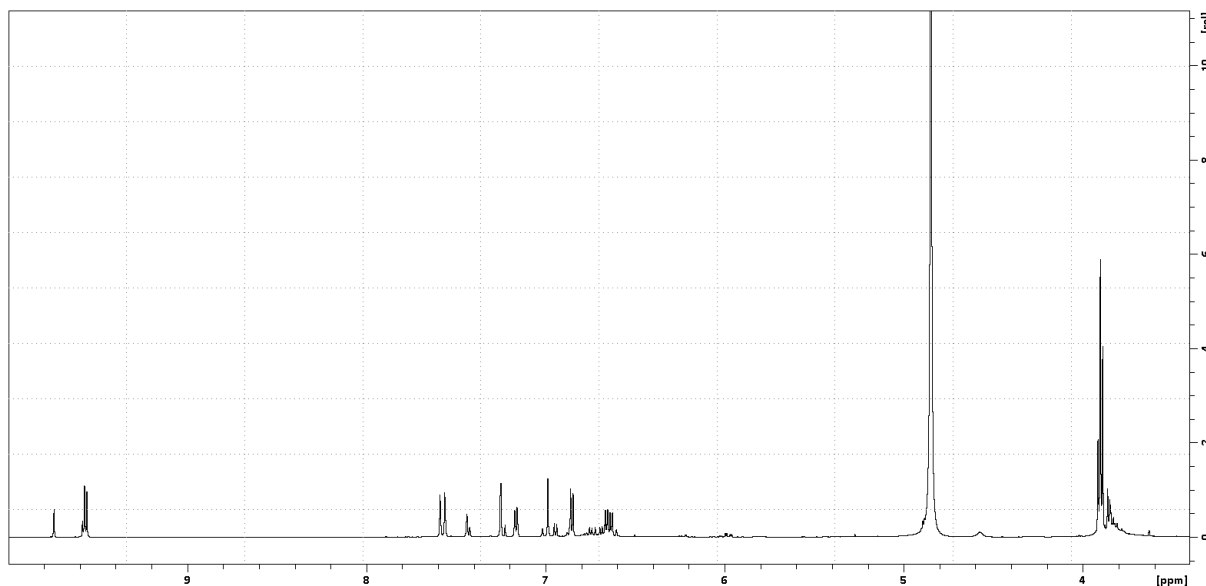
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Qr16



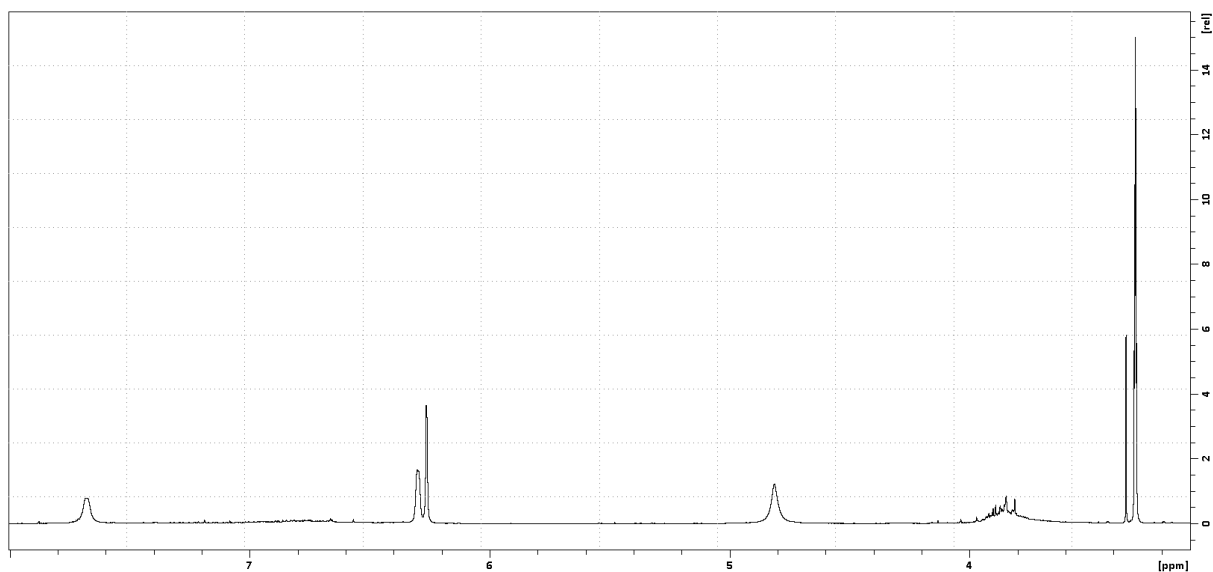
Εικόνα 89 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 400 MHz. Διαλύτης: CDCl_3 . Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 7.24.

Rp1/Rp2/Rp3



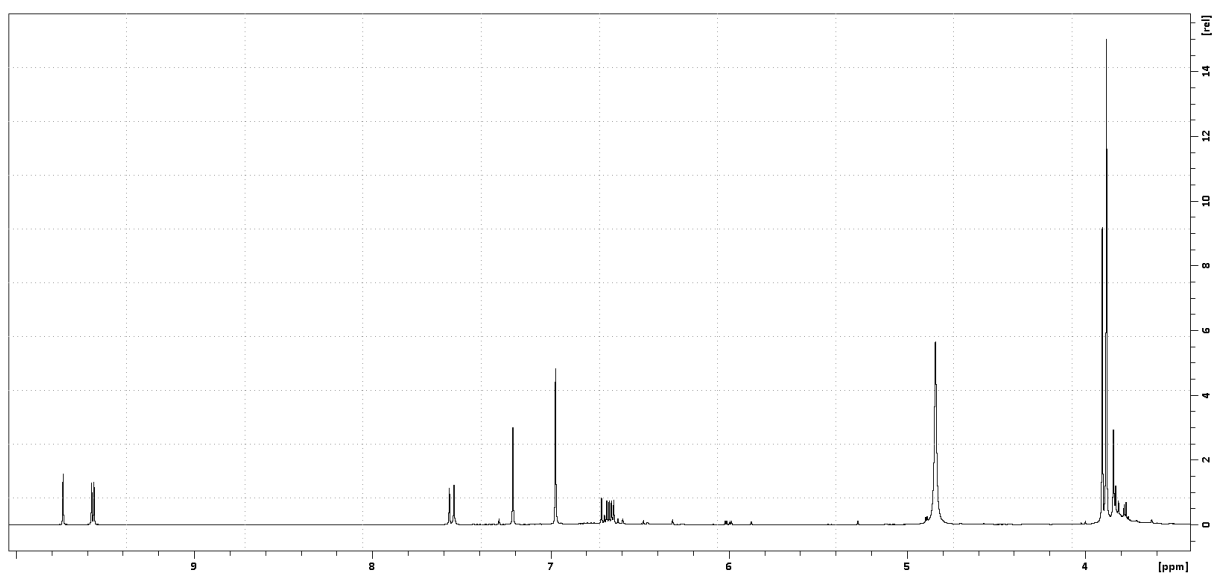
Εικόνα 90 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD . Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

Rp4



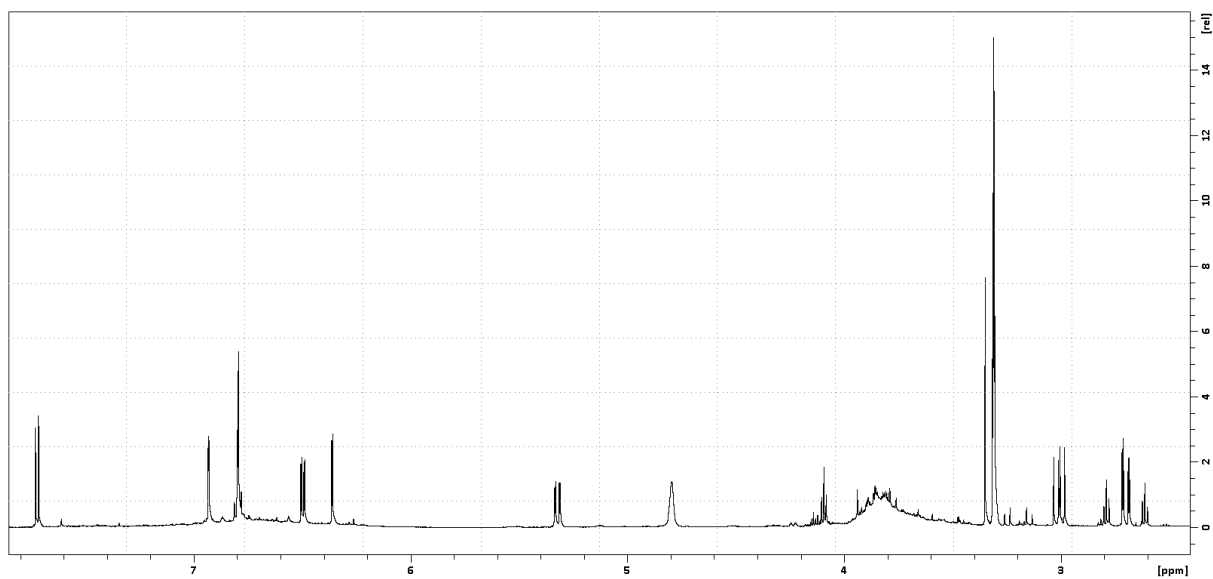
Εικόνα 91 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

Rp2/Rp5



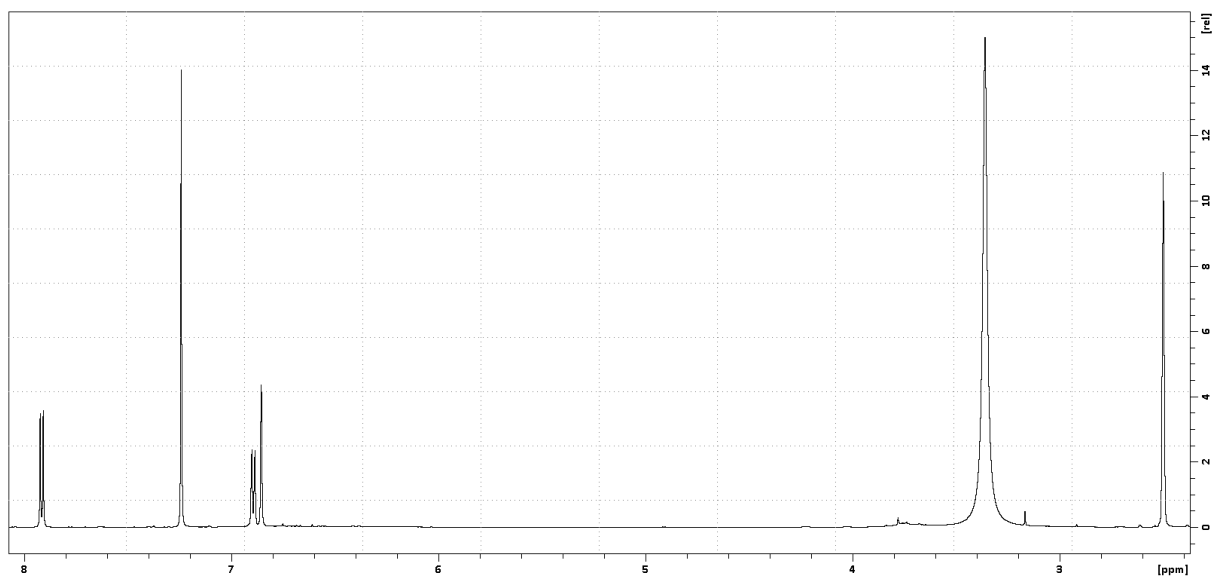
Εικόνα 92 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

Rp6



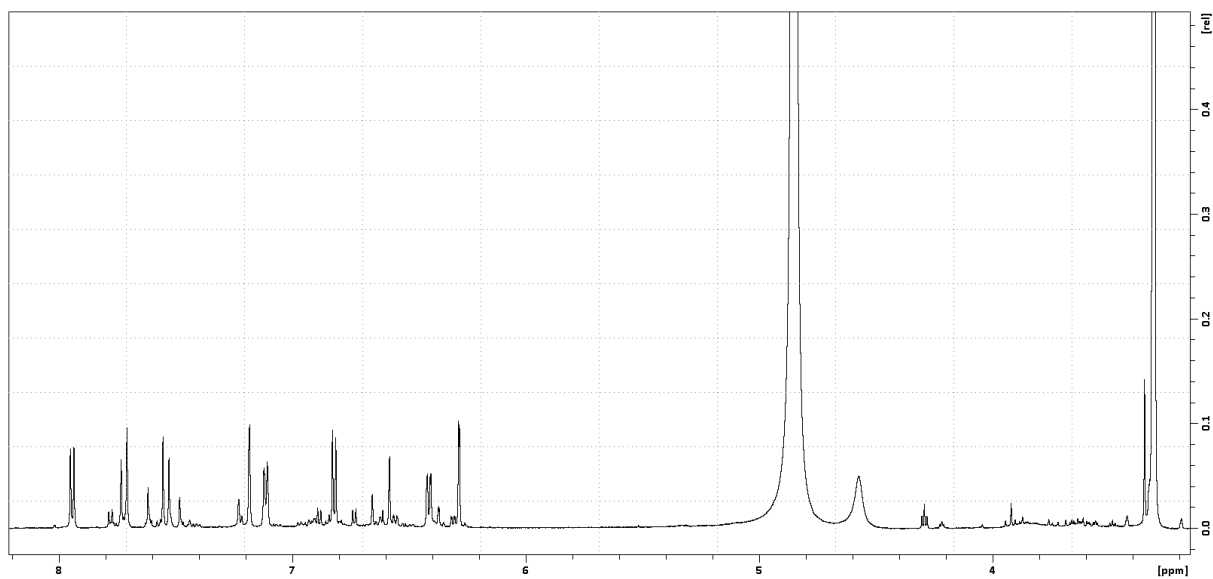
Εικόνα 93 Φάσμα ¹H-NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

Rp7



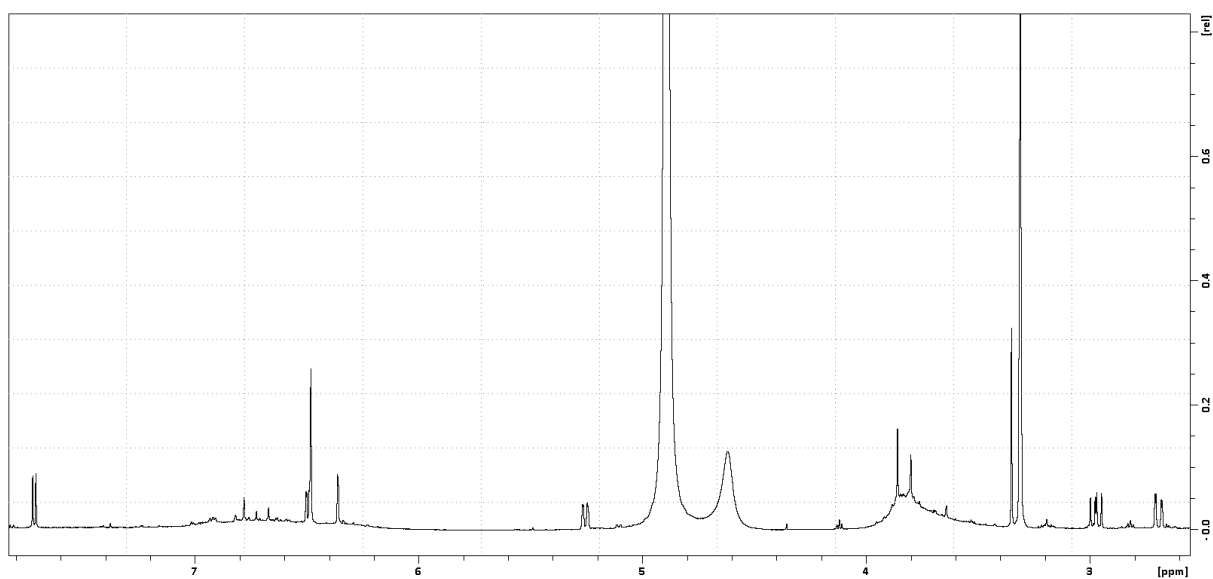
Εικόνα 94 Φάσμα ¹H-NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: DMSO-*d*₆. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 2.50.

Rp8

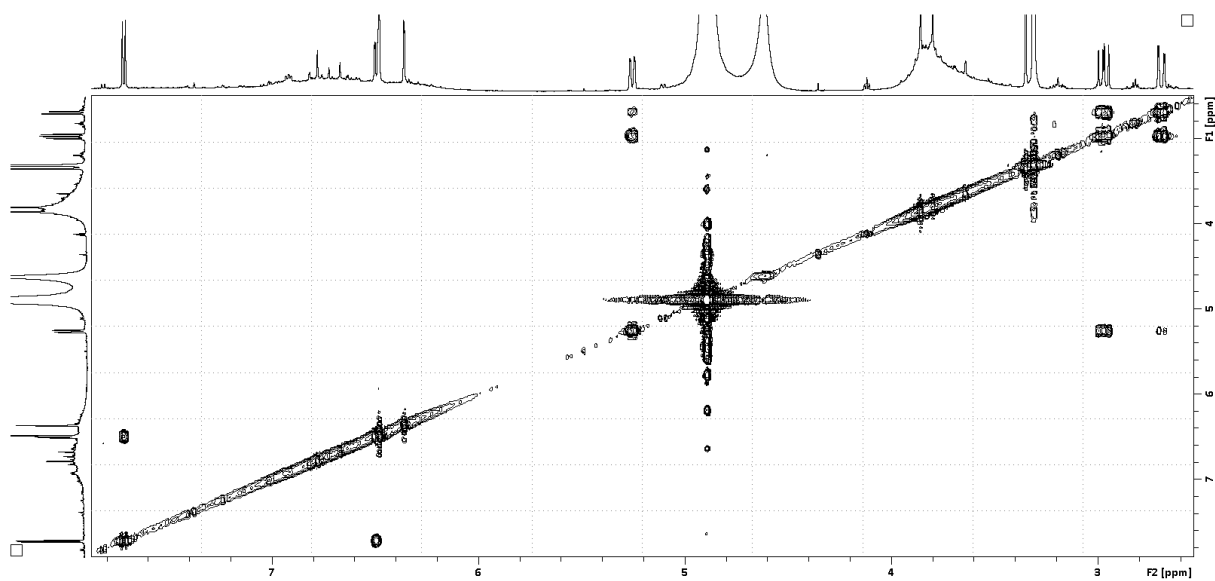


Εικόνα 95 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

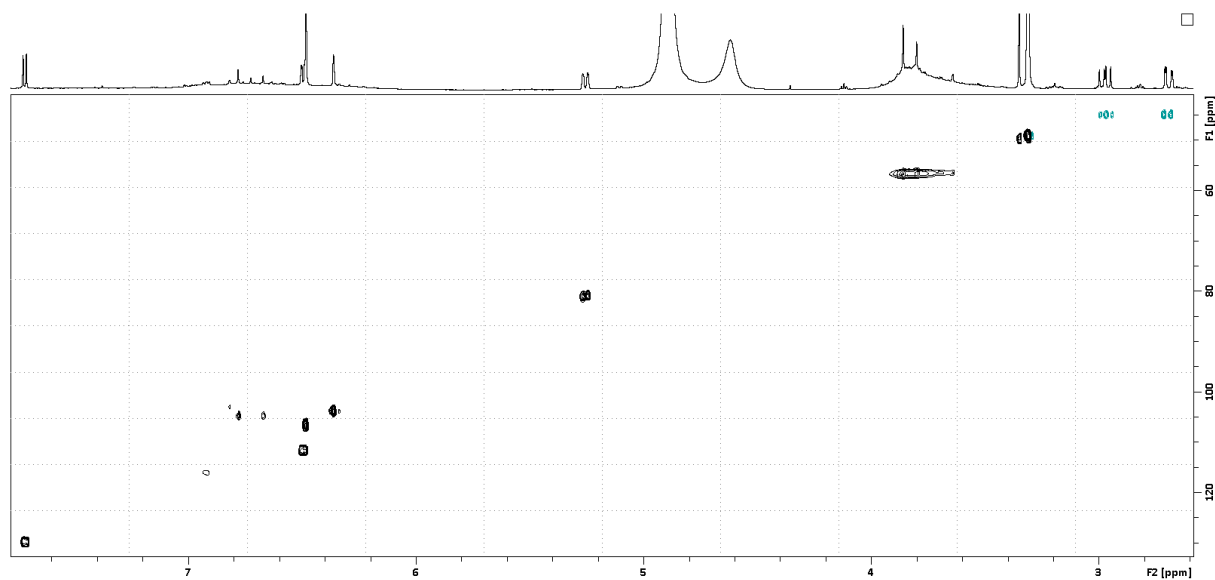
Rp9



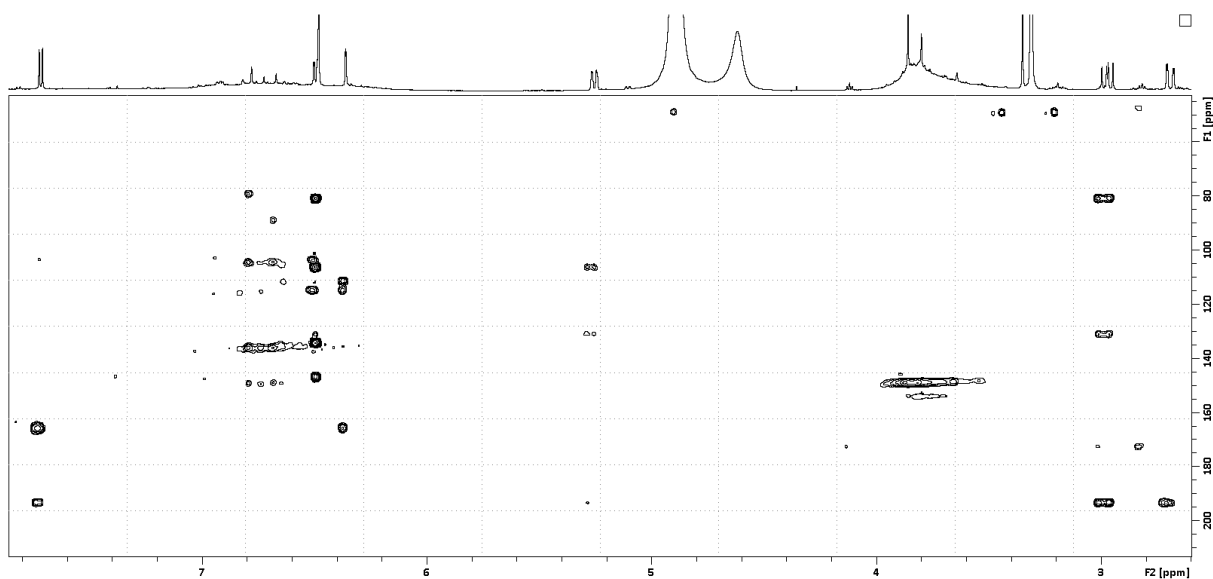
Εικόνα 96 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 97 Φάσμα COSY στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

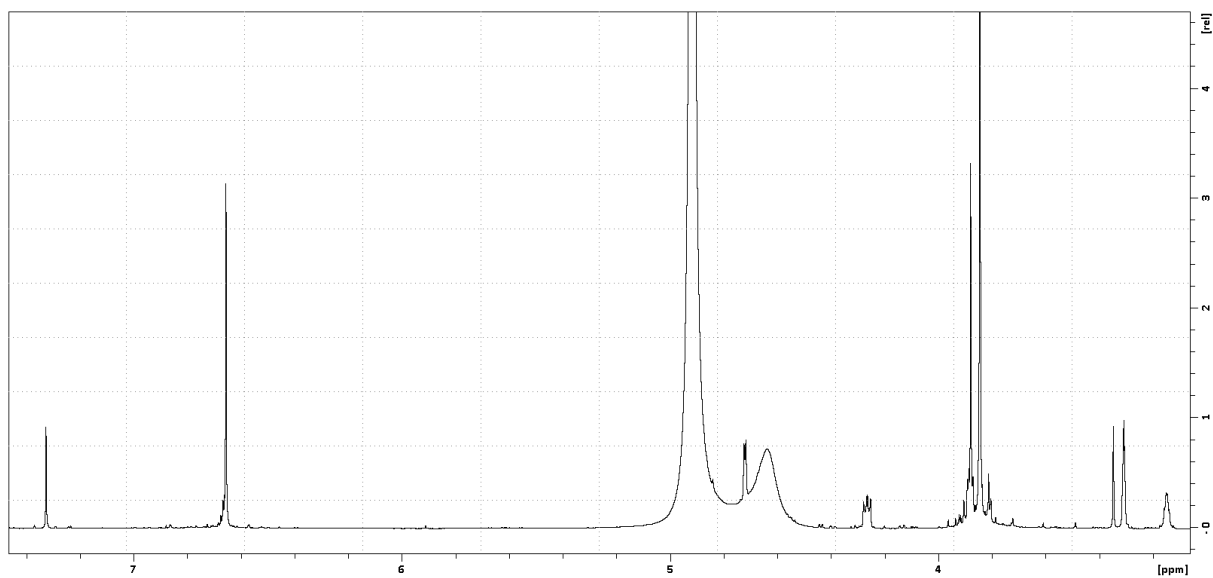


Εικόνα 98 Φάσμα HSQC στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

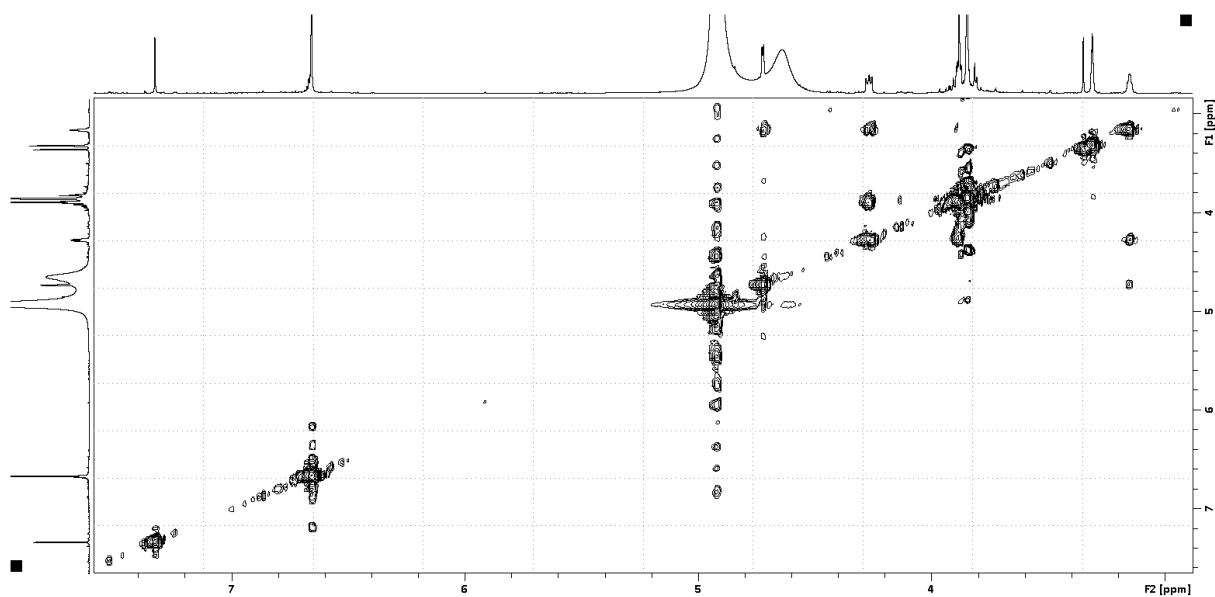


Εικόνα 99 Φάσμα HMBC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

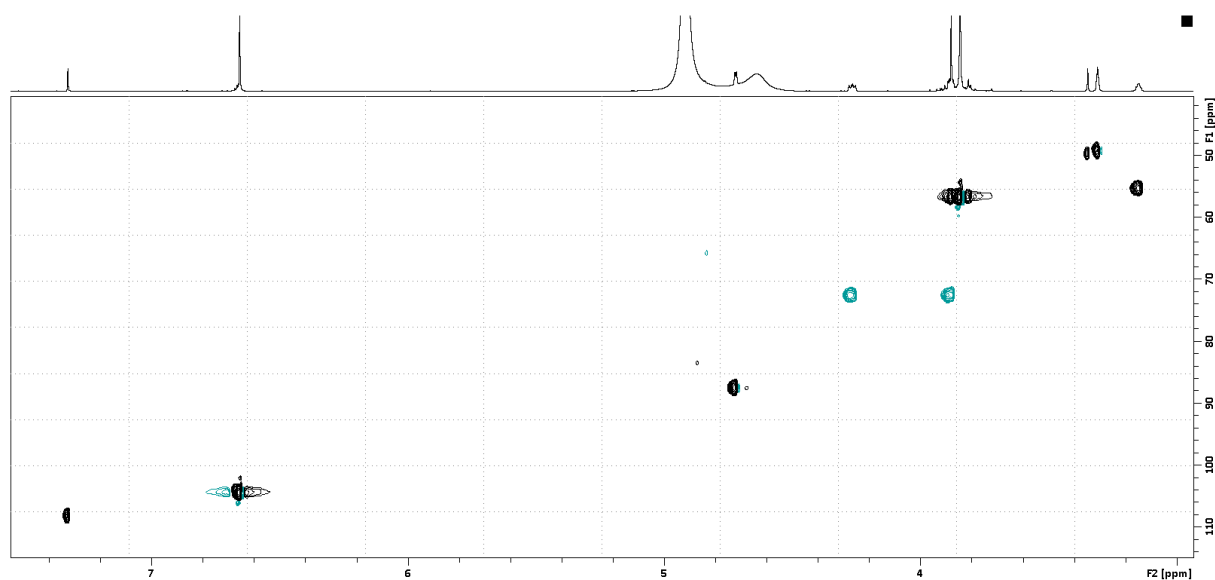
Rp10/Rp11



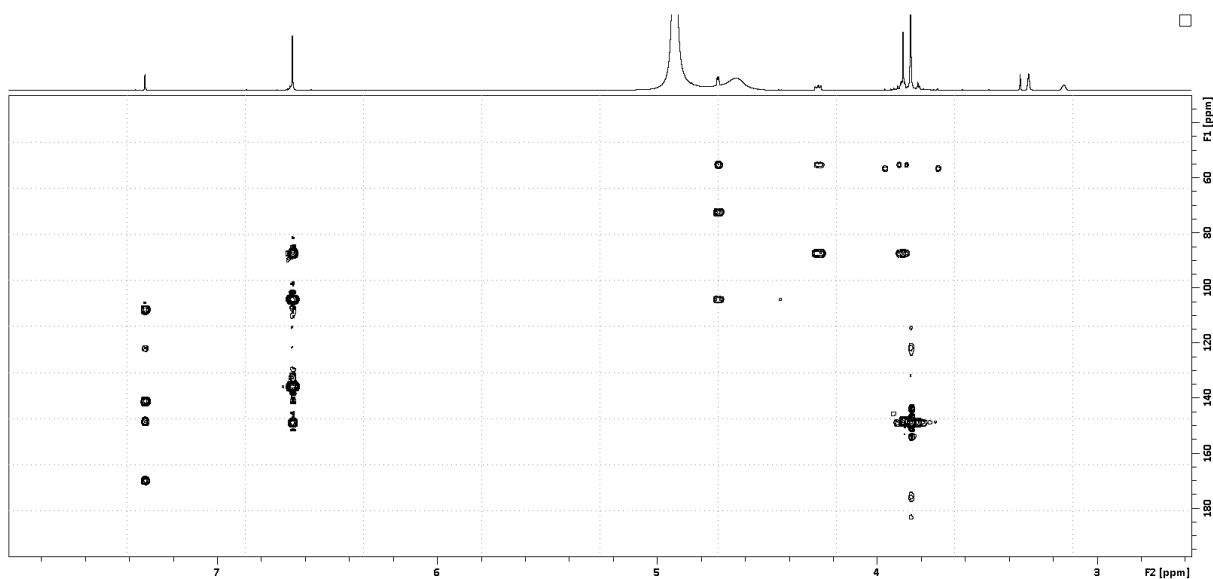
Εικόνα 100 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 101 Φάσμα COSY στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

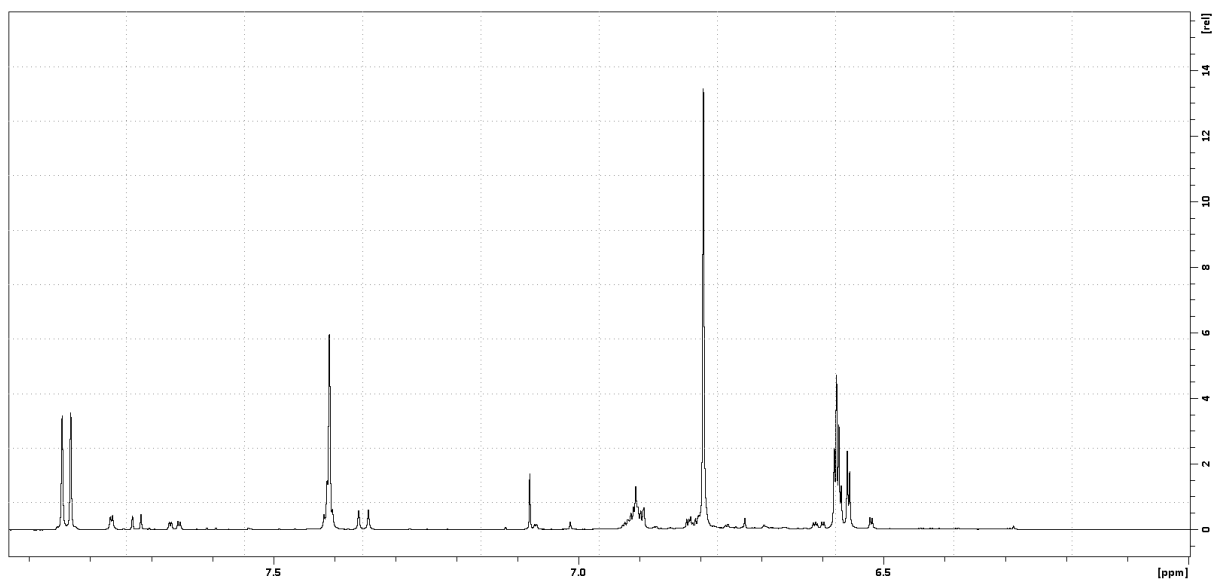


Εικόνα 102 Φάσμα HSQC στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

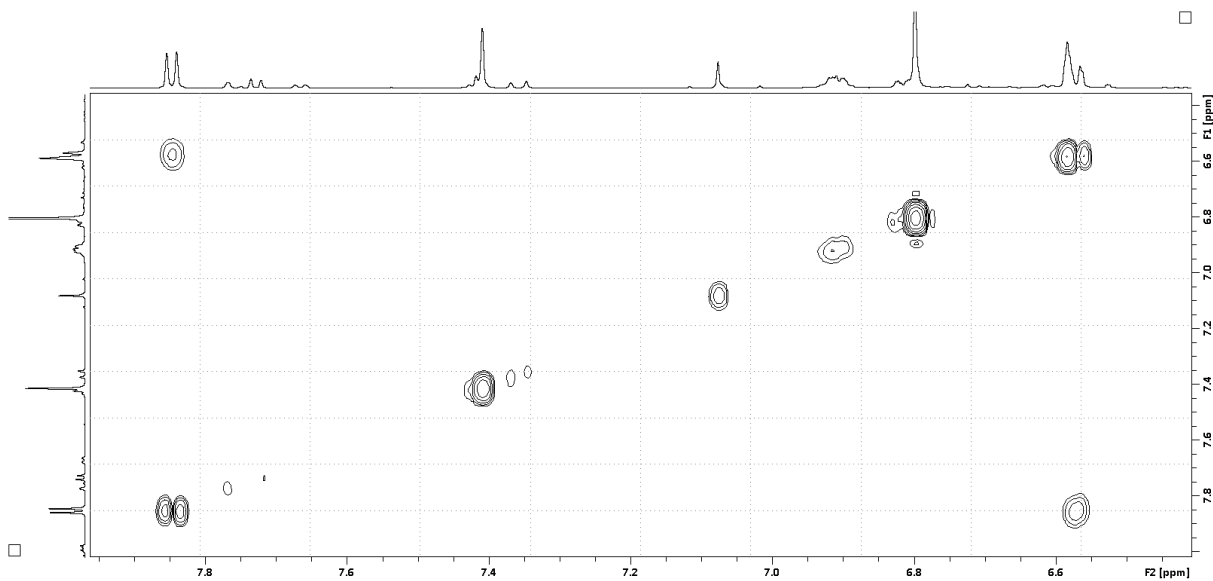


Εικόνα 103 Φάσμα HMBC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

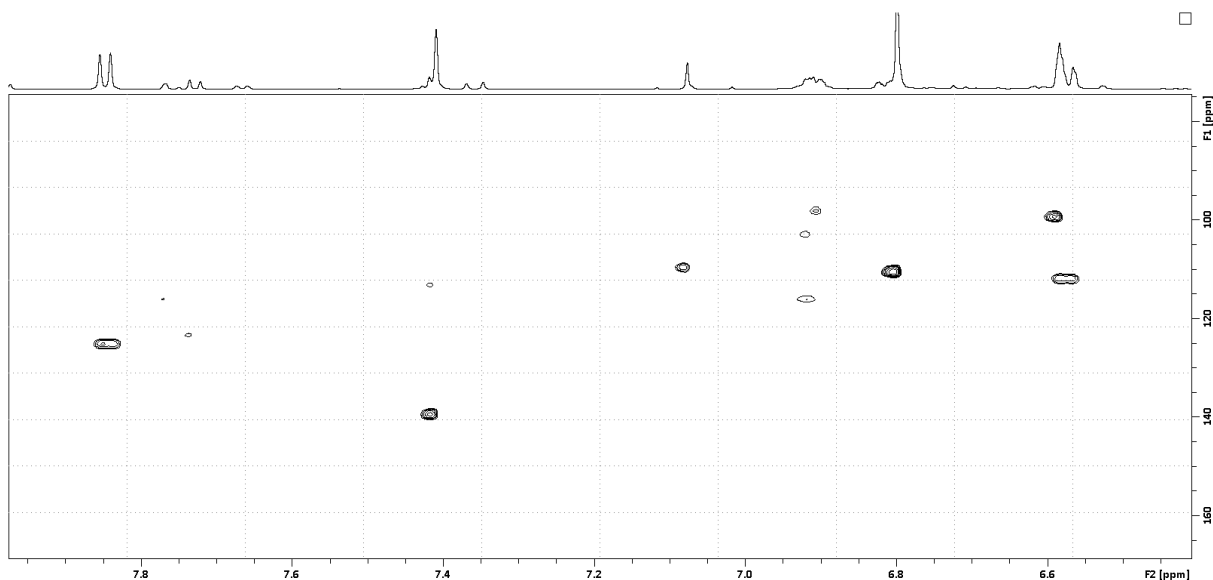
Rp12



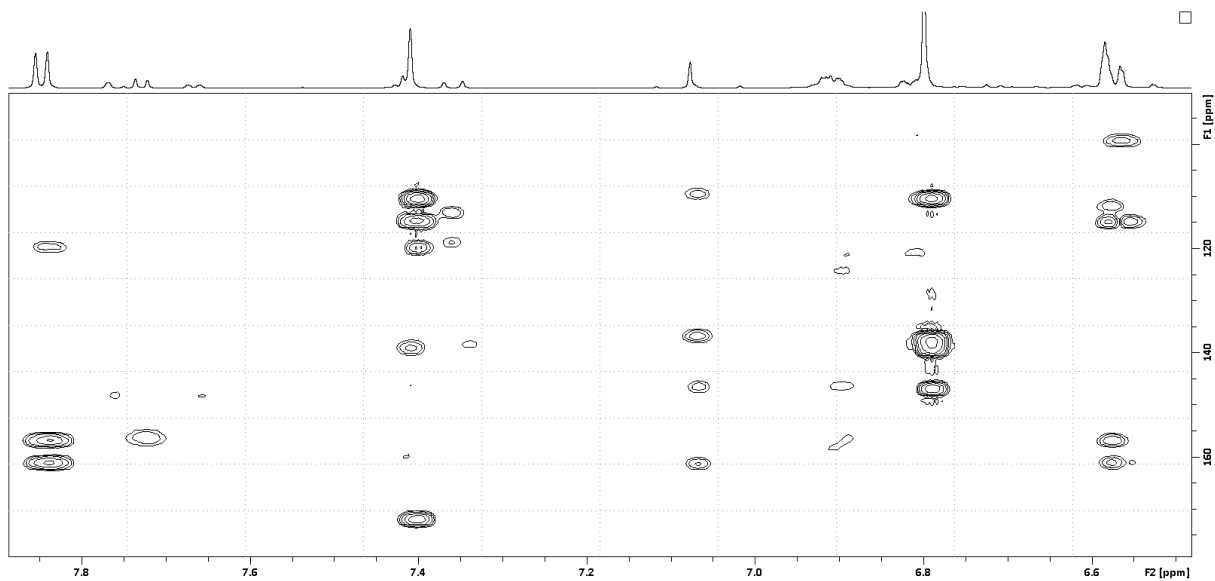
Εικόνα 104 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 105 Φάσμα COSY στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 106 Φάσμα HSQC στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



Εικόνα 107 Φάσμα HMBC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Gordon, M.H., Pérez-Coello, M.S., 2011. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry* 128, 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>

Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., 2012. Aromatic potential of *Castanea sativa* Mill. Compared to *Quercus* species to be used in cooperage. *Food Chem.* 130, 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.111>

Aldrich P. R., J., C.-B., 2011. *Quercus*, in: C.Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Forest Trees*. pp. 90–91. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>

Angele, H., 1971. Sephadex ° LH-20. *Journal of Chromatographic Science* 9, 1971.

Angioni, A., Pintore, G.A.M., Caboni, P., 2012. Determination of wine aroma compounds by dehydration followed by GC/MS. *Journal of AOAC International* 95, 813–819. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-313>

Arapitsas, P., Antonopoulos, A., Stefanou, E., Dourtoglou, V.G., 2004. Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry* 86, 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.003>

Arramon, G., Saucier, C., Colombani, D., Glories, Y., 2002. Identification of Triterpene Saponins in *Quercus robur* L. and *Q. petraea* Liebl. Heartwood by LC-ESI / MS and NMR 310, 305–310. <https://doi.org/10.1002/pca.658>

Attimarad, M., Mueen Ahmed, K.K., Aldhubaib, B.E., Harsha, S., 2011. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharmaceutical Methods* 2, 71–75. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>

Auzanneau, C., Montaudon, D., Jacquet, R., Puyo, S., Pouysegu, L., Deffieux, D., Elkaoukabi-

Chaibi, A., De Giorgi, F., Ichas, F., Quideau, S., Pourquier, P., 2012. The Polyphenolic Ellagitannin Vescalagin Acts As a Preferential Catalytic Inhibitor of the Isoform of Human DNA Topoisomerase II. *Molecular Pharmacology* 82, 134–141. <https://doi.org/10.1124/mol.111.077537>

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

B. Cabrita, M.J., Garcia, R., Martins, N., Gomes da Silva, M.D.R., Costa Freitas, A.M., 2012. Gas Chromatography in the Analysis of Compounds Released from Wood into Wine, in: Dr. Mustafa Ali Mohd (Ed.), *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech Published, pp. 185–208. <https://doi.org/10.5772/32659>

Baiano, A., Conte, A., Contò, F., Alessandro, M., Nobile, D., 2013. Recent Patents in Wine Industry. *Recent Patents on Engineering* 7, 25–40.

Banthorpe, D. V., Charlwood, B. V., Francis, M.J.O., 1972. The biosynthesis of monoterpenes. *Chemical Reviews* 72, 115–155. <https://doi.org/10.1021/cr60276a002>

Barstow, M. & Khela, S., 2017. *Quercus robur*, European Oak Assessment, in: *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T63532A3126467.en>

Bautista-Ortín, A.B., Lencina, A.G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E., 2008. The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: Effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 63–70. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00008.x>

Belwal, T., Ezzat, S.M., Rastrelli, L., Bhatt, I.D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H.P., Orhan, I.E., Patra, J.K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Atanasov, A.G., 2018. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 100, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>

Berk, Z., 2013. Extraction. *Food Process Engineering and Technology* 287–309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00011-3>

Berthod, A., Maryutina, T., Spivakov, B., Shpigun, O., Sutherland, I.A., 2009. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 81, 355–387. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-08-06-05>

Bojczuk, M., Żyżelewicz, D., Hodurek, P., 2017. Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references. *Journal of Separation Science* 40, 1597–1609. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601221>

Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1996. The Maturation and Aging of Wines, in: *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US, pp. 389–390. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1781-8>

Brouillard, R., Dangles, O., 1994. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chemistry* 51, 365–371. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90187-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90187-2)

Bruyère, C., Genovese, S., Lallemand, B., Ionescu-motatu, A., Curini, M., Kiss, R., Epifano, F., 2011. Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21, 4174–4179. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.089>

Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Jalocha, J., 2003. Volatile compounds in Spanish, French, and American oak woods after natural seasoning and toasting. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry 51, 5923–5932. <https://doi.org/10.1021/jf0302456>

Cadahía, E., Muñoz, L., De Simón, B.F., García-Vallejo, M.C., 2001. Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1790–1798. <https://doi.org/10.1021/jf0006168>

Casañal, A., Zander, U., Muñoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M.A., Schwab, W., Valpuesta, V., Marquez, J.A., 2013. The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 288, 35322–35332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501528>

Castiñeira, A., Peña, R.M., Herrero, C., García-Martín, S., 2002. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis* 15, 319–331. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1056>

Cavalheiro, A.J., Junior, G.M. V., Lago, J.H.G., Chaves, M.H., 2008. Phenolic Derivatives from Fruits of *Dipteryx lacunifera* D ucke and Evaluation of Their Antiradical Activities. *Helvetica Chimica Acta* 91, 2159–2167.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., 1998. Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for production of barrels used in barrel aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 79–85.

Chauhan, A., 2014. GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 5. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000222>

Chethan, S., Dharmesh, S.M., Malleshi, N.G., 2008. Inhibition of aldose reductase from cataracted eye lenses by finger millet (*Eleusine coracana*) polyphenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16, 10085–10090. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.003>

Chira, K., Teissedre, P.L., 2014. Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel: effect of oak species involved and toasting process. *European Food Research and Technology* 240, 533–547. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2352-3>

Chira, K., Teissedre, P.L., 2013. Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *European Food Research and Technology* 236, 735–746. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1930-0>

Christaki, T., Tzia, C., 2002. Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control* 13, 503–517. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00030-0)

Chung, H.-J., Son, J.-H., Park, E.-Y., Kim, E.-J., Lim, S.-T., 2008. Effect of vibration and storage on some physico-chemical properties of a commercial red wine. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 655–659. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.004>

Dat, L.D., Thao, N.P., Tai, B.H., Luyen, B.T.T., Kim, S., Koo, J.E., Koh, Y.S., Cuong, N.T., Thanh, N. Van, Cuong, N.X., Nam, N.H., Kiem, P. Van, Minh, C. Van, Kim, Y.H., 2015. Chemical constituents from *Kandelia candel* with their inhibitory effects on pro-inflammatory cytokines production in LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 25, 1412–1416. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.02.048>

De Simón, B.F., Esteruelas, E., Muñoz, À.M., Cadañia, E., Sanz, M., 2009. Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3217–3227. <https://doi.org/10.1021/jf803463h>

Del Alamo-Sanza, M., Cárcel, L.M., Nevares, I., 2017. Characterization of the oxygen transmission rate of oak wood species used in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 648–655. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05188>

Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S., 2008. Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta* 621, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.014>

Del Alamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., 2006. Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Analytica Chimica Acta* 563, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.030>

Deryabin, D.G., Tolmacheva, A.A., 2015. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from quercus cortex (Oak bark) extract. *Molecules* 20, 17093–17108. <https://doi.org/10.3390/molecules200917093>

Dewick, P.M., 2002. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids, in: John Wiley & Sons, L. (Ed.), *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*. School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, UK, p. 168. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>

Dong, M., Liu, D., Li, H., Yan, S., 2018. Chemical compounds from *Swertia bimaculata*. *Chemistry of Natural Compounds* 54, 817–821. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2523-8>

Dubrovina, A.S., Kiselev, K.V., 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* 246, 597–623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>

Eaton, E., Caudullo, G., Oliveira, S., de Rigo, D., 2016. *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *European Atlas of Forest Tree Species* 160–163. <https://doi.org/10.2788/038466>

Edwards, T., Singleton, V., Boulton, R., 1985. Formation of Ethyl Esters of Tartaric Acid During Wine Aging: Chemical and Sensory Effects. *American Journal Of Enology And Viticulture* 36, 118–124.

Eiro, M.J., Heinonen, M., 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage:

Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7461–7466. <https://doi.org/10.1021/jf0258306>

Escalona, H., Birkmyre, L., Piggott, J.R., Paterson, A., 2002. Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Analytica Chimica Acta* 458, 45–54. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01538-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01538-0)

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>

Fernández De Simón, B., Cadahía, E., Conde, E., García-Vallejo, M.C., 1996. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1507–1511. <https://doi.org/10.1021/jf9502461>

Fernández De Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., 2014. Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry* 147, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.158>

Fletouris, D.J., 2007. Clean-up and fractionation methods. *Food Toxicants Analysis* 299–348. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50011-0>

Foucault, a. P., Chevolot, L., 1998. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A* 808, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00121-6)

Fragasso, M., Antonacci, D., Pati, S., Tufariello, M., Baiano, A., Forleo, L.R., Caputo, A.R., La Notte, E., 2012. Influence of training system on volatile and sensory profiles of primitivo grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 63, 477–486. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.11074>

Frédérich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., Kiss, R., 2009. In vitro anticancer potential of tree extracts from the walloon region forest. *Planta Medica* 75, 1634–1637. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185867>

Friesen, J.B., Pauli, G.F., 2007. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1151, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.126>

Gao, Y., Zietsman, A., Vivier, M., Moore, J., Gao, Y., Zietsman, A.J.J., Vivier, M.A., Moore, J.P., 2019. Deconstructing Wine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology. *Molecules* 24, 165. <https://doi.org/10.3390/molecules24010165>

Germanò, M.P., Certo, G., D'Angelo, V., Sanogo, R., Malafronte, N., De Tommasi, N., Rapisarda, A., 2015. Anti-angiogenic activity of *Entada africana* root. *Natural Product Research* 29, 1551–1556. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.987773>

Giergielewicz-Mozajska, H., Dabrowski, L., Namieśnik, J., 2001. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples - Some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 149–165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>

Glabasnia, A., Hofmann, T., 2006. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3380–3390. <https://doi.org/10.1021/jf052617b>

Gomes, M.N., Muratov, E.N., Pereira, M., Peixoto, J.C., Rosseto, L.P., Cravo, P.V.L., Andrade, C.H., Neves, B.J., 2017. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. *Molecules* 22, 80–105. <https://doi.org/10.3390/molecules22081210>

Goode, J., 2010. Alternatives to cork in wine bottle closures, in: *Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality*. Woodhead Publishing Limited, pp. 255–270. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-798-3.50009-7>

Gray, A.I., 2012. An Introduction to Planar Chromatography, in: Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, A.I.G. (Ed.), *Natural Products Isolation*. Humana Press Inc., Totowa, p. 515. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>

Hamzaoui, M., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., Reynaud, R., Hubert, J., 2013. Stepwise elution of a three-phase solvent system in centrifugal partition extraction: A new strategy for the fractionation and phytochemical screening of a crude bark extract. *Phytochemical Analysis* 24, 367–373. <https://doi.org/10.1002/pca.2418>

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, Á.F., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., 2009. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry* 113, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.096>

Hessel, V., Hofmann, C., Lob, P., Lohndorf, J., Lowe, H., Ziogas, A., 2005. Aqueous Kolbe - Schmitt Synthesis Using Resorcinol in a Microreactor Laboratory Rig under High-p , T Conditions. *Organic Process Research & Development* 479–489.

(HMPC), C. on H.M.P., Community, 2011. Community herbal monograph on *Quercus robur* L., *Quercus petraea* .(Matt .) Liebl ., *Quercus pubescens* Willd ., cortex.

Hong, S.S., Choi, C.W., Choi, Y.-H., Oh, J.S., 2016. Phytochemistry Letters Coixlachryside A : A new lignan glycoside from the roots of Coix. *Phytochemistry Letters* 17, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.07.004>

Hosseinihashemi, S.K., Hosseinashrafi, S.K., Goldeh, A.J., Salem, M.Z.M., 2016. Antifungal and Antioxidant Activities of Heartwood, Bark, and Leaf Extracts of *Robinia pseudoacacia*. *BioResources* 11, 1634–1646.

Huang, C.-H., Chen, M.-F., Chung, H.-H., Cheng, J.-T., 2012. Antihyperglycemic Effect of Syringaldehyde in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats. *Journal of Natural Products* 75, 1465–1468.

Hubert, J., Angelis, A., Aligiannis, N., Rosalia, M., Abedini, A., Bakiri, A., Reynaud, R., Nuzillard, J.M., Gangloff, S.C., Skaltsounis, A.L., Renault, J.H., 2016. In vitro dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees. *Planta Medica* 82, 1351–1358. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110180>

Huie, C.W., 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>

Isely, D., Peabody, F., 1984. Robinia (Leguminosae : Papilionoidea). *Castanea* 49, 187–202.

Jarauta, I., Cacho, J., Ferreira, V., 2005. Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: An analytical study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4166–4177. <https://doi.org/10.1021/jf0481960>

Jayanta, K.P., Eun Si, K., Kyounghee, O., Hyeon-Jeong, K., Radhika, D., Yangseon, K., Kwang-Hyun, B., 2015. Bactericidal Effect of Extracts and Metabolites of Robinia pseudoacacia L. on Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis Causing Dental Plaque and Periodontal Inflammatory Diseases. *Molecules* 20, 6128–6139. <https://doi.org/10.3390/molecules20046128>

Jiang, W.J., Daikonya, A., Ohkawara, M., Nemoto, T., Noritake, R., Takamiya, T., Kitanaka, S., Iijima, H., 2017. Structure-activity relationship of the inhibitory effects of flavonoids on nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 25, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.11.055>

Kada, R., Knoppová, V., Jurášek, A., Kováč, J., 1976. Furan derivatives-LXXVII. Synthesis and

study of sulphides and sulphones of 5-nitrofurans series. *Tetrahedron* 32, 1411–1414.
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(76\)85021-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(76)85021-1)

Kanwar, K., Bhardwaj, A., Deepika, R., Sharma, D.R., 2007. *Robinia pseudoacacia*. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1, 74–80.

Kemp, S.E., Ng, M., Hollowood, T., Hort, J., 2018. Introduction Introduction to Descriptive Analysis, in: Sarah E. Kemp, Joanne Hort, T.H. (Ed.), *Descriptive Analysis in Sensory Evaluation*. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118991657>

Kitanaka, S., Takido, M., 1992. Demethyltorosaflavones C and D from *Cassia noname**. *Phytochemistry* 31, 2927–2929.

Klumpers, J., Scalbert, A., Janin, G., 1994. Ellagitannins in European oak wood: Polymerization during wood ageing. *Phytochemistry* 36, 1249–1252.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89646-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89646-6)

Korkina, L.G., 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology* 15–25.
<https://doi.org/10.1170/T772>

Kulbat, K., 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences* 80, 97–108.

Landete, J.M., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>

Li, L.F., Olsen, K.M., 2016. To Have and to Hold: Selection for Seed and Fruit Retention During Crop Domestication, in: *Current Topics in Developmental Biology*. 2016 Elsevier Inc., pp. 63–109. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.02.002>

Lim, E.K., Jackson, R.G., Bowles, D.J., 2005. Identification and characterisation of Arabidopsis glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *FEBS Letters* 579, 2802–2806. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.016>

Luo, J.R., Ma, Q.Y., Zhao, Y.X., Yi, T.M., Li, C. Sen, Zhou, J., 2009. Palaeophytochemical components from the miocene-fossil wood of pinus griffithii. *Journal of the Chinese Chemical Society* 56, 600–605. <https://doi.org/10.1002/jccs.200900089>

Lv, J., Zha, X., Pang, S., Jia, H., Zhang, Y., Shang, J., 2015. Synthesis and melanogenesis evaluation of 3', 4', 7- trihydroxyflavanone derivatives and characterization of flavanone-BODIPY. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 1607–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.072>

Maga, J.A., 1996. Oak lactones in alcoholic beverages. *Food Reviews International* 12, 105–130. <https://doi.org/10.1080/87559129609541069>

Manos, P.S., Zhou, Z.- K., Cannon, C.H., 2001. Systematics of Fagaceae : Phylogenetic Tests of Reproductive Trait Evolution. *International Journal of Plant Sciences* 162, 1361–1379. <https://doi.org/10.1086/322949>

Marchal, A., Prida, A., Dubourdieu, D., 2016. New Approach for Differentiating Sessile and Pedunculate Oak: Development of a LC-HRMS Method to Quantitate Triterpenoids in Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 618–626. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05056>

Marchal, A., Waffo-Teguo, P., Genin, E., Merillon, J.-M., Dubourdieu, D., 2011. Identification of New Natural Sweet Compounds in Wine Using Centrifugal Partition Chromatography-Gustatometry and Fourier Transform Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 83, 9629–9637.

Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G.L., Salinas, M.R., 2005. Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of*

Chromatography A 1098, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.126>

Martin, S., Canas, I., 2006. A comparison between underground wine cellars and aboveground storage for the aging of Spanish wines. *Transactions of the ASABE* 49, 1471–1478.

Masson, G., Baumes, R., Puech, J.-L., Razungles, A., 1997. Demonstration of the Presence of Carotenoids in Wood: Quantitative Study of Cooperage Oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1649–1652. <https://doi.org/10.1021/jf960668q>

McClure, C.K., 2017. Structural Chemistry Using NMR Spectroscopy, *Organic Molecules*, 3rd ed, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00294-6>

Michel, J., Jourdes, M., Silva, M.A., Giordanengo, T., Mourey, N., Teissedre, P.L., 2011. Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 5677–5683. <https://doi.org/10.1021/jf200275w>

Moharram, F.A.E., Marzouk, M.S., El Dib, R.A.M., El-Shenawy, S.M., Abdel-Rahman, R.F., Ibrahim, R.R., 2015. Hepatoprotective, Gastroprotective, Antioxidant activity and phenolic constituents of *Quercus robur* leaves. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7, 1055–1065.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., 2006. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry* 95, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.004>

Morl, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S., 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26, 2231–2234.

Morrison-Whittle, P., Goddard R., M., 2018. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environ. Microb.* 20, 114–141. <https://doi.org/10.1111/1462-2920>.

Mosedale, J.R., Savill, P.S., 1996. Variation of heartwood phenolics and oak lactones between the species and phenological types of *Quercus petraea* and *Q. robur*. *Forestry* 69, 47–55. <https://doi.org/10.1093/forestry/69.1.47>

Mourtzinou, I., Konteles, S., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T., 2009. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry* 114, 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.014>

Murray, J., Delahunty, C., Baxter, I., 2001. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International* 34, 461–471. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00070-9)

Nasir, H., Iqbal, Z., Hiradate, S., 2005. Allelopathic potential of *Robinia pseudoacacia* L. *Journal of Chemical Ecology* 31, 2179–2192. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-6084-5>

Nishanbaev, S.Z., Bobakulov, K.M., Abdullaev, N.D., Sham'Yanov, I.D., 2015. Phenolcarboxylic acids from *Quercus robur* growing in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* 51, 537–539. <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1334-4>

Nonier, M.F., De Gaulejac, N.V., Vivas, N., Vitry, C., 2004. Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood. *Comptes Rendus Chimie* 7, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2004.03.010>

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulie, P., Fouquet, E., 2006. Pyrolysis – gas chromatography / mass spectrometry of *Quercus* sp. wood Application to structural elucidation of macromolecules and aromatic profiles of different species. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75, 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2005.05.006>

Ortega-Heras, M., González-Sanjosé, M.L., González-Huerta, C., 2007. Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chemistry* 103, 1434–1448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.060>

Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., Cano-Mozo, E., González-San José, M.L., 2010. Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1533–1541. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.026>

Otsuka, H., Takeuchi, M., Inoshiri, S., Sato, T., Yamasaki, K., 1989. Phenolic compounds from *Coix lachryma-jobi* var. *Ma-yuen*. *Phytochemistry* 28, 883–886. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80136-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80136-0)

Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Patel, K., Patel, J., Patel, M., Rajput, G., Patel, H., 2010. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharmaceutical Methods* 1, 2. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.72222>

Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F., Gómez-Plaza, E., 2002. Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3272–3276. <https://doi.org/10.1021/jf011505r>

Pérez, A.J., Pecio, Ł., Kowalczyk, M., Kontek, R., Gajek, G., Stopinsek, L., Mirt, I., Oleszek, W., Stochmal, A., 2017. Triterpenoid Components from Oak Heartwood (*Quercus robur*) and Their Potential Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 4611–4623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01396>

Prachayasittikul, S., Buraparungsang, P., Worachartcheewan, A., Isarankura-Na-Ayudhya,

C., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V., 2008. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. *Molecules* 13, 904–921.

Rashmin, P., Mrunali, P., Nitin, D., Nidhi, D., Bharat, P., 2012. HPTLC Method Development and Validation: Strategy to Minimize Methodological Failures. *Journal of Food and Drug Analysis* 20, 794–804. <https://doi.org/10.6227/jfda.2012200408>

Reid, R.G., Sarker, S.D., 2012. Isolation of natural products by low-pressure column chromatography. *Methods in Molecular Biology* 864, 155–187. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_7

Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>

Ronald, S.J., 2008. Postfermentation Treatments and Related Topics : Aging, in: *Wine Science Principles and Applications*. Elsevier Inc., pp. 441–442.

Roux, D.G., Paulus, E., 1962. Interrelationships of flavonoid components from the heartwood of *Robinia pseudoacacia*. *Biochemical Journal* 82, 324–330. <https://doi.org/10.1080/09614520902866371>

Rozmer, Z., Perjési, P., 2016. Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews* 15, 87–120. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8>

Sanz, M., De Simón, B.F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, Á.M., Hernández, M.T., Estrella, I., 2012. Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta* 732, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.012>

Sanz, M., Fernández De Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, Á.M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E., 2011. Effect of Toasting Intensity at Cooperage on Phenolic Compounds in *Acacia* (*Robinia pseudoacacia*) Heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59,

3135–3145. <https://doi.org/10.1021/jf1042932>

Sawai, S., Saito, K., 2011. Triterpenoid Biosynthesis and Engineering in Plants. *Frontiers in Plant Science* 2, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00025>

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 21-40. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E., 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant Journal* 54, 712–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>

Sergent, T., Kohnen, S., Jourez, B., Beauve, C., Schneider, Y.-J., Vincke, C., 2014. Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia*) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. *Wood Sci. Technol.* 48, 1005–1017. <https://doi.org/10.1007/s00226-014-0656-x>

Shibusawa, Y., Yamakawa, Y., Noji, R., Yanagida, A., Shindo, H., Ito, Y., 2006. Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1133, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.004>

Sitzia, T., Cierjacks, A., de Rigo, D., Caudullo, G., 2016. *Robinia pseudoacacia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, in: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. EU, Luxembourg, pp. 166–167.

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11, 287–313. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1997\)11:5<287::AID-JCLA6>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1997)11:5<287::AID-JCLA6>3.0.CO;2-4)

Tao, Y., García, J.F., Sun, D.-W., 2013. Advances in Wine Ageing Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Ageing Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 817–835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.609949>

Tao, Y., García, J.F., Sun, D.W., 2014. Advances in Wine Aging Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Aging Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 817–835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.609949>

Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>

Tita, I., Mogosanu, G.D., Tita, M.G., 2009. Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the South-West of Romania. *Farmacologia* 57, 141–156.

Uddin, G., Rauf, A., 2012. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of aerial parts of *Quercus robur*. L. *Middle-East J. Med. Plant Res* 1, 1–4. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejmpr.2011.1.1.1101>

Wishart, D., 2005. NMR Spectroscopy and Protein Structure Determination: Applications to Drug Discovery and Development. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 6, 105–120. <https://doi.org/10.2174/1389201053642367>

Zhang, B., Cai, J., Duan, C.Q., Reeves, M.J., He, F., 2015a. A review of polyphenolics in oak woods. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 6978–7014. <https://doi.org/10.3390/ijms16046978>

Zhang, B., Liu, R., He, F., Zhou, P.P., Duan, C.Q., 2015b. Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. *Food Chemistry* 170, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.026>

Zhao, X., Wang, Q., Li, G., Chen, F., Qian, Y., Wang, R., 2014. In vitro antioxidant, anti-mutagenic, anti-cancer and anti-angiogenic effects of Chinese Bowl tea. *Journal of Functional Foods* 7, 590–598. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.026>

Zwergel, C., Gaascht, F., Valente, S., Diederich, M., Bagrel, D., Kirsch, G., 2012. Aurones: Interesting Natural and Synthetic Compounds with Emerging Biological Potential. *Natural Product Communications* 7, 389–394. <https://doi.org/10.1109/JPHOTOV.2011.2174967>

Τσακίρης Α., (2005) Οινολογία, Ερευνά & Εφαρμογές, Εκδόσεις Ψίχαλου, Αθήνα

Unwin T.,(2003).Οίνος και άμπελος, μια ιστορική γεωγραφία της αμπελοκαλλιέργειας και του οινεμπορίου. Εκδόσεις Ίων Αθήνα

Τσέτουρας Π. (2003). Οινοτεχνία, η επιστήμη του κρασιού στην πράξη. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα