

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΜΑΥΡΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ  
ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ**  
Σύγκριση με τη Σουλτανίνα Κρήτης και τη σταφίδα Καλιφόρνιας



Απρίλιος 2015

## Προγραμματισμένες δράσεις

- Βιβλιογραφική ανασκόπηση του θέματος
- Εκχύλιση, ανάλυση και χαρακτηρισμός των λιπόφιλων και πτητικών συστατικών
- Εκχύλιση, ανάλυση και χαρακτηρισμός των πιο πολικών δευτερογενών μεταβολιτών
- Απομόνωση και διευκρίνιση της δομής κύριων συστατικών
- Καταμέτρηση συνολικού φορτίου πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής δράσης
- Ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών δύο ανταγωνιστικών ειδών
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

## Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις σταφίδες, τη σύστασή τους και τους τρόπους εκχύλισης και ανάλυσης των συστατικών ΤΟΥΣ

- **Andrew P. Breksa III, Gary R. Takeoka, Marlene B. Hidalgo, Ana Vilches, Justine Vasse, David W. Ramming. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry* 121 (2010) 740–745**
- Bin Zhao, Clifford A. Hall III. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry* 108 (2008) 511–518
- **Antonia Chiou, Vaios T. Karathanos, Anastasia Mylona, Fotini N. Salta, Fani Preventi, Nikolaos K. Andrikopoulos. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry* 102 (2007) 516–522**
- Jiangfei Meng, Yulin Fang, Ang Zhang, Shuxia Chen, Tengfei Xu, Zhangcheng Ren, Guomin Han, Jinchuan Liu, Hua Li, Zhenwen Zhang, Hua Wang. Phenolic content and antioxidant capacity of Chinese raisins produced in Xinjiang Province. *Food Research International* 44 (2011) 2830–2836
- Ana Marquez, Montserrat Dueñas, María P. Serratosa, and Julieta Merida. Identification by HPLC-MS of Anthocyanin Derivatives in Raisins. *Journal of Chemistry* Volume 2013, Article ID 274893, 7 pages
- **Antonia Chiou, Eirini A. Panagopoulou, Fotini Gatzali, Stephania De Marchi, Vaios T. Karathanos. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). *Food Chemistry* 146 (2014) 157–165**

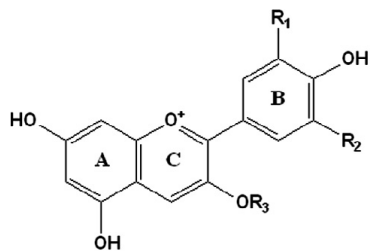
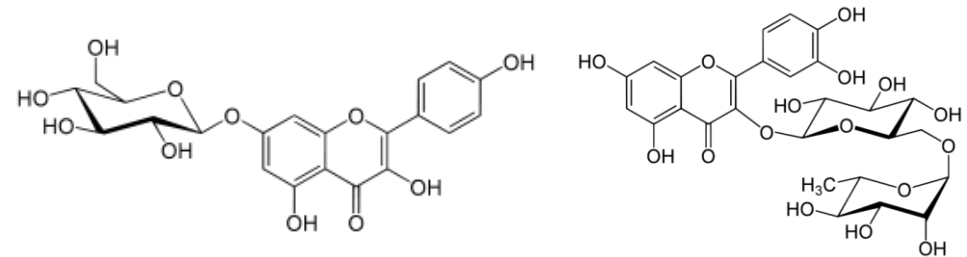
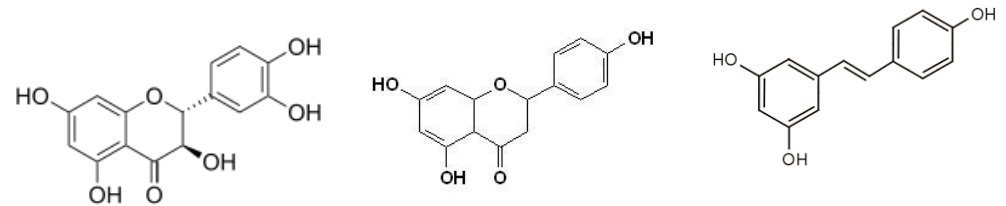
## Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις σταφίδες, τη σύστασή τους και τους τρόπους εκχύλισης και ανάλυσης των συστατικών τους

- F.B. El-kassas, A.M. Ali, S.E. Mostafa. Phenolic compounds as antioxidants of some products manufactured from two cultivated Egyptian varieties of seedless grapes. *Annals of Agricultural Science* (2014) 59(2), 195–199
- Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra Vitis vinifera L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSn. Novel phenolic compounds in Vitis vinifera L. grape. *Food Chemistry* 135 (2012) 94–104
- Gary Williamson, Arianna Carughib. Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutrition Research* 30 (2010) 511–519
- Dong Wang, Jian Cai, Bao-Qing Zhu, Guang-Feng Wu, Chang-Qing Duan, Guang Chen, Ying Shi. Study of free and glycosidically bound volatile compounds in air-dried raisins from three seedless grape varieties using HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry* 177 (2015) 346–353
- Hasim Kelebek, Michael Jourdes, Serkan Selli and Pierre-Louis Teissedre. Comparative evaluation of the phenolic content and antioxidant capacity of sun-dried raisins. *J Sci Food Agric* 2013; 93: 2963–2972
- Feng Zhang, Eisuke Daimaru, Masao Ohnishi, Mikio Kinoshita and Yoshihiko Tokuji. Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Commercial Dried Fruits. *Food Sci. Technol. Res.*, 19 (1), 113 – 116, 2013

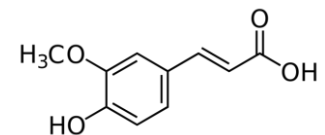
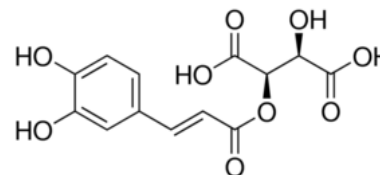
# Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις σταφίδες, τη σύστασή τους και τους τρόπους εκχύλισης και ανάλυσης των συστατικών τους

## □ Κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών

- Φλαβονοειδή (φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες)
- Ανθοκυανίνες
- Στιλβένια
- Υδροξυκιναμμωμικά οξέα
- Υδροξυβενζοϊκά οξέα
- Τριτερπενικά οξέα



Anthocyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Delphinidin	OH	OH	H
Cyanidin	OH	H	H
Pelargonidin	H	H	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	H
Petunidin	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H



## Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις σταφίδες, τη σύστασή τους και τους τρόπους εκχύλισης και ανάλυσης των συστατικών τους

### □ Βιολογικές δράσεις

- Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση
- Καρδιοπροστατευτική
- Αντικαρκινική
- Αντιφλεγμονώδης
- Αντιμικροβιακή
- Αντιική
- Αντιαλλεργική

# Ανάπτυξη πρωτόκολλων εκχύλισης για την παραλαβή των πτητικών & μη πτητικών συστατικών

## A. Πτητικά συστατικά

- Υδραπόσταξη σε μικροκύματα δείγματος της κορινθιακής σταφίδας Μεσσηνίας (τελικό προϊόν) και συλλογή του αρωματικού ύδατος (Hydrosol).
- Εκχύλιση του αρωματικού ύδατος με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{GC-MS}$
- Εκχύλιση δείγματος της σταφίδας με n-pentane  $\rightarrow \text{GC-MS}$  λιπαρά οξέα.

## B. Λιπόφιλα συστατικά

- Εκχύλιση (x2) με διχλωρομεθάνιο

## Γ. Φαινολικά συστατικά και σάκχαρα

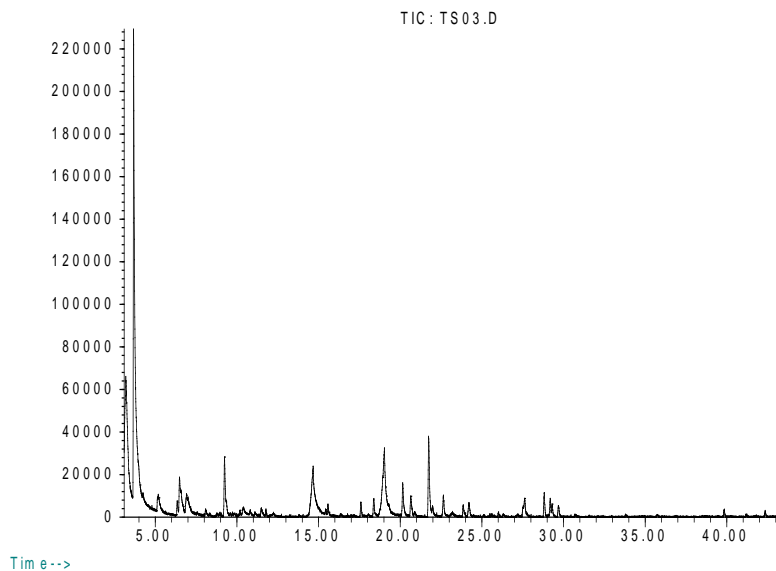
- Διαδοχική εκχύλιση (x2) με διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) & αιθανόλη (EtOH)
- Καθαρισμός σε σύστημα SPE C-18 για απομάκρυνση των σακχάρων και παραλαβή των φαινολών

- Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε κομμένες και άκοπες σταφίδες, οι οποίες δεν έδειξαν ιδιαίτερη διαφορά στην ποσότητα του εκχυλίσματος.
- Όλες οι εκχυλίσεις (με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και EtOH) πραγματοποιήθηκαν 3 φορές για το κάθε δείγμα σταφίδας (αξιολόγηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων).

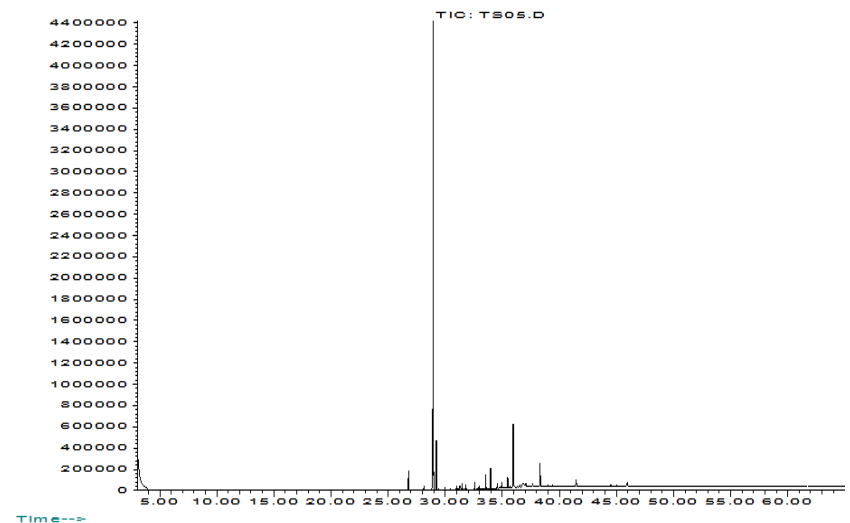
# Ανάλυση των πτητικών συστατικών GC-MS

- **Αρωματικό ύδωρ (Hydrosol):** Furfural (3,67min), 2E-Heptanal (6,34min), Hexanoic acid (6.90min), Benzene acetaldehyde (9.24), Octanoic acid (14.66min), Nonanoic acid (19.02min),  $\gamma$ -nonalactone (22.78min)
- **Πτητικό κλάσμα (Volatile fraction):** Ethyl hexadecanoate, 8-Octadecenoic acid, Methyl linoleate, 9-Octadecenoic acid (Z)-ethyl ester, Ethyl octadecanoate, Dotriacontane, Pentacosane, Eicosane, 1-Eicosanol, Hexadecanal, 1-Hexacosanal

Abundance



Abundance





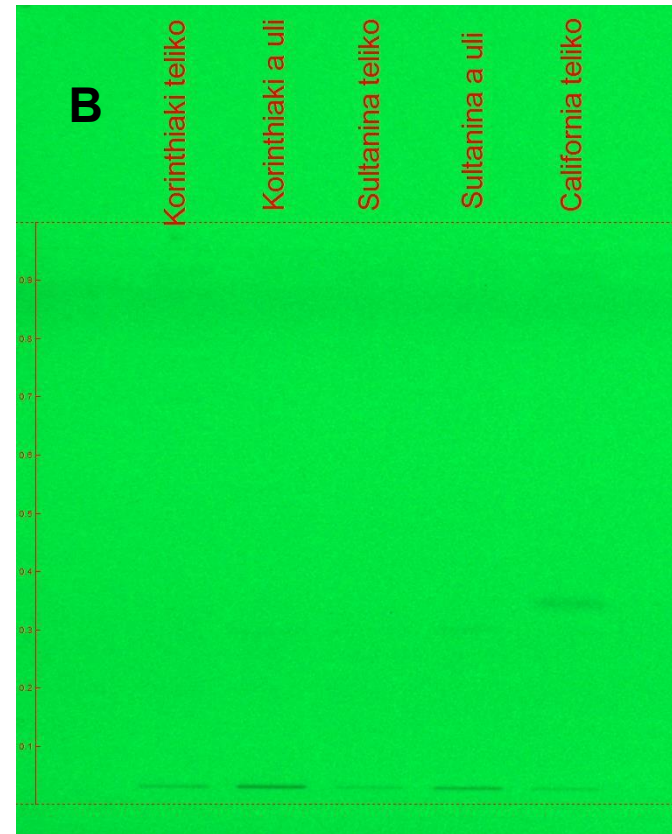
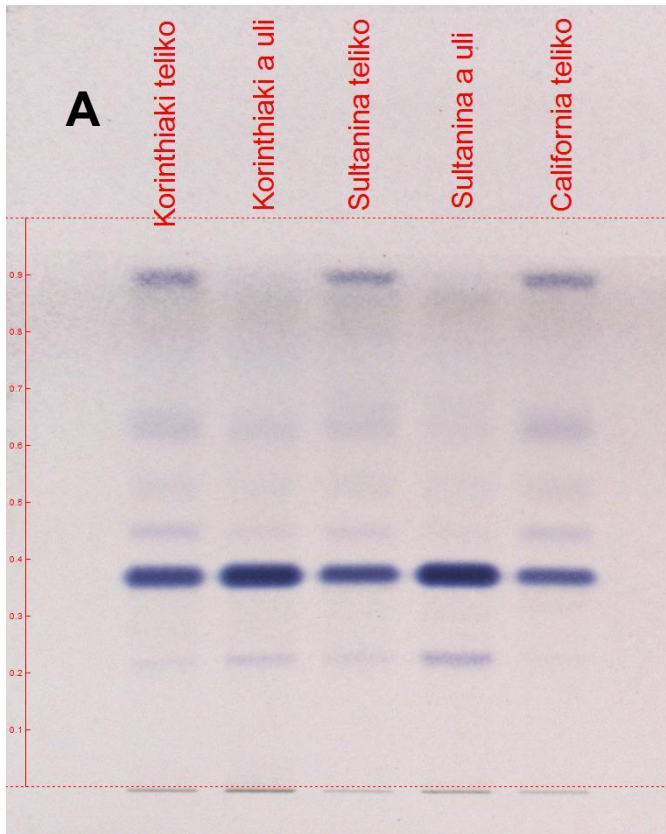
## Εκχυλίσεις δειγμάτων \* με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Ποσότητα (mg) εκχυλίματος	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
Α' Ύλη	190 /220 /200 <b>200</b>	230 /220 /240 <b>220</b>	-
Τελικό	520 /500 /480 <b>500</b>	360 /370 /380 <b>370</b>	530 /540/ 550 <b>540</b>

\* Για όλες τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκαν 100g δείγματος.

- Καλή επαναληψιμότητα της εκχυλιστικής διαδικασίας
- Η απόδοση του άπολου κλάσματος είναι μεγαλύτερη στο τελικό προϊόν σε σύγκριση με την πρώτη ύλη
- Μεγαλύτερη απόδοση στο δείγμα του τελικού Καλιφόρνιας (0.54 %) και μικρότερη σε αυτό της α'-ύλης Σουλτανίνας (0.2 %)

# Ποιοτικός έλεγχος (TLC)

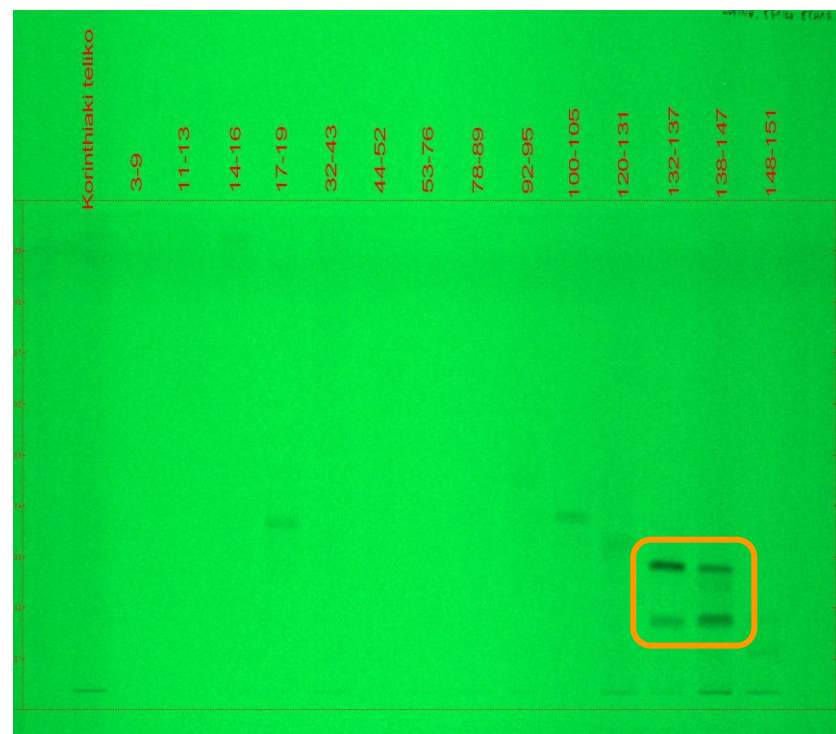
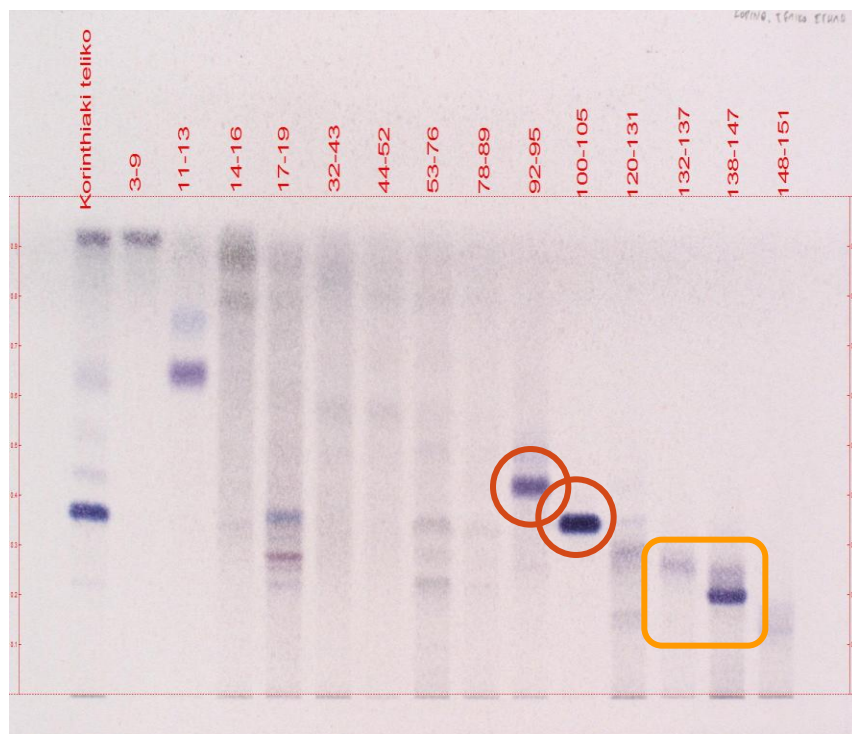


**Χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας:** (A) εμφάνιση με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης και παρατήρηση στο ορατό (B) παρατήρηση στα 254 nm

- Παρουσία τερπενοειδών
- Παρόμοια ποιοτική σύσταση
- Μικρότερη περιεκτικότητα μη πτητικών συστατικών στο δείγμα Καλιφόρνιας

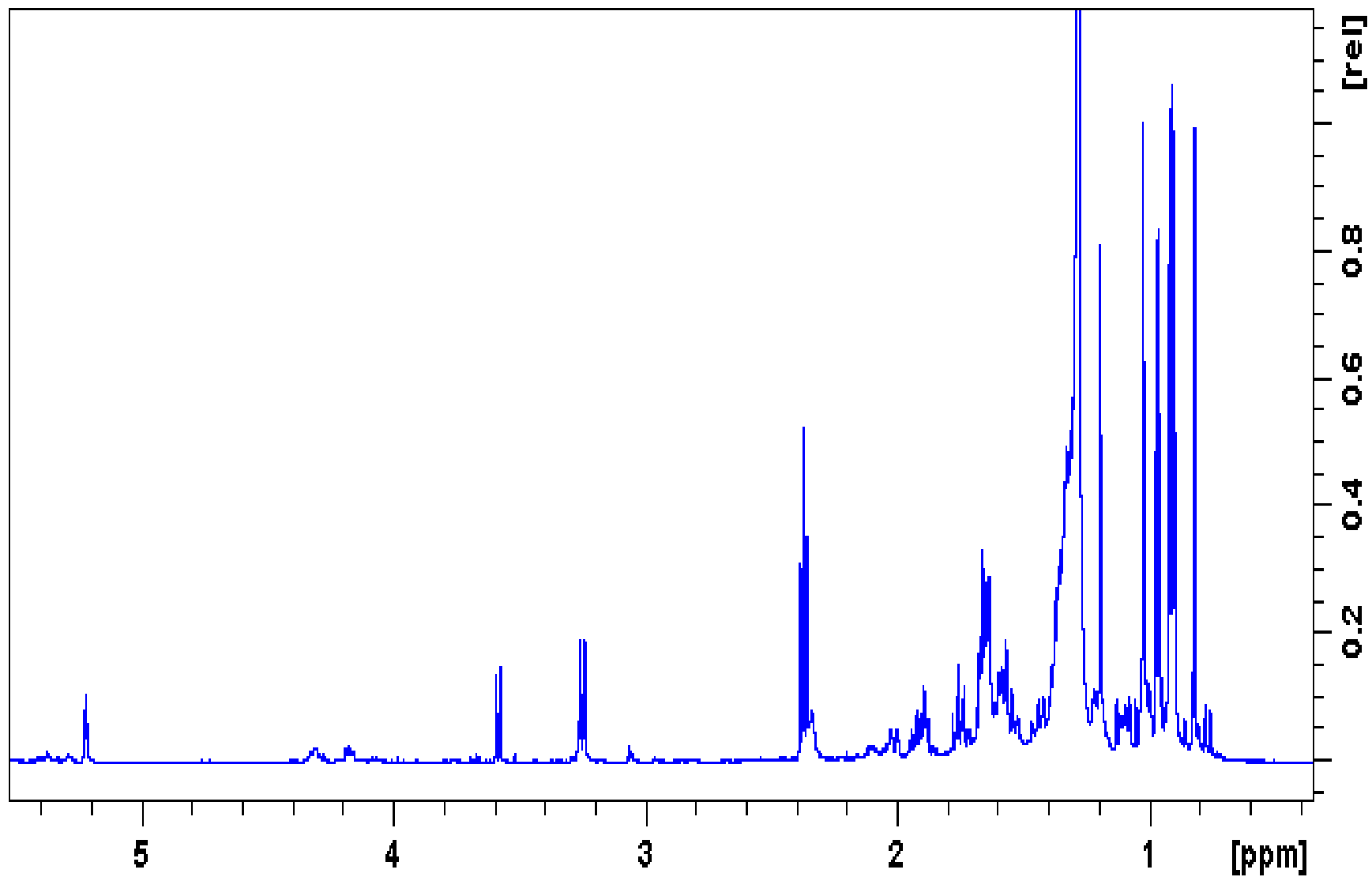
# Απομόνωση και ταυτοποίηση τερπενοειδών

**Υγρή χρωματογραφία στήλης (Στατική φάση:** Γέλη πυριτίου κανονικής φάσεως,  
**Κινητή φάση:** Μίγμα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  αυξανόμενης πολικότητας)

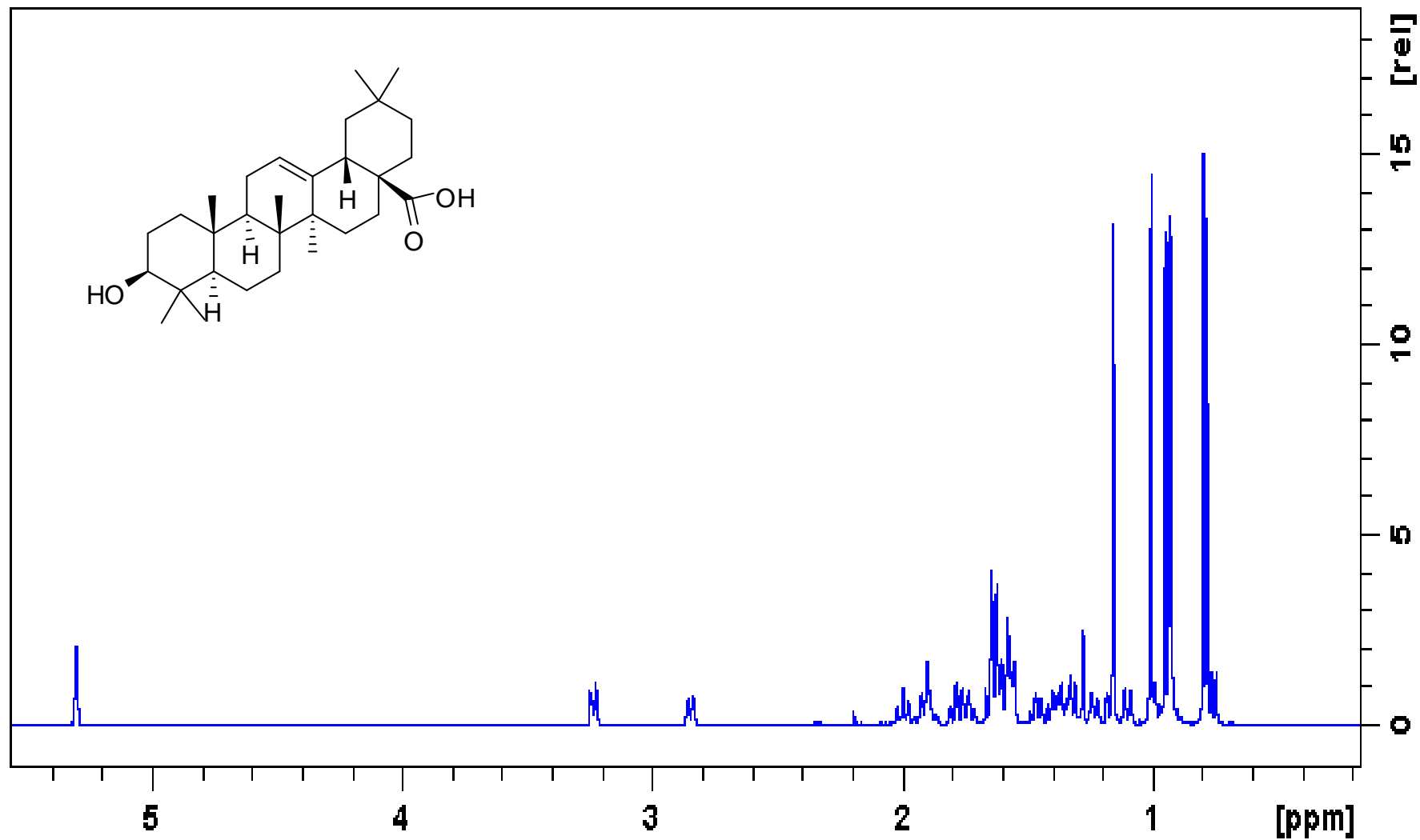


**Χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας:** (A) εμφάνιση με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης και παρατήρηση στο ορατό (B) παρατήρηση στα 254 nm

# I. Κλάσμα 92-95: Τριτερπενικός εστέρας



## II. Κλάσμα 100-105: Ολεανολικό οξύ (~ 20% του άπολου κλάσματος)



## Εκχυλίσεις δειγμάτων \* με EtOH

Ποσότητα (g) εκχυλίματος	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
<b>Α΄ Ύλη</b>	15.5 /15 /20.3 <b>17.0</b>	6.3 /6 /7 <b>6.5</b>	-
<b>Τελικό</b>	20 /20.5 /20.5 <b>20.3</b>	7 /6.4 /9 <b>7.5</b>	11.3 /12/ 13.5 <b>12.3</b>

\* Για όλες τις εκχυλίσεις χρησιμοποιήθηκαν 100g δείγματος.

- Η απόδοση στα δείγματα της Κορινθιακής ήταν μεγαλύτερη από την απόδοση στα δείγματα της Καλιφόρνιας και της Σουλτανίνας
- Στην Κορινθιακή η απόδοση ήταν σχεδόν ίδια στο δείγμα της πρώτης ύλης και το δείγμα του τελικού προϊόντος
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε σάκχαρα

## Ανάκτηση φαινολών από το EtOH εκχύλισμα με SPE

Ποσότητα (mg)	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
Α΄ Υλη	12	2	-
Τελικό	10	4	3

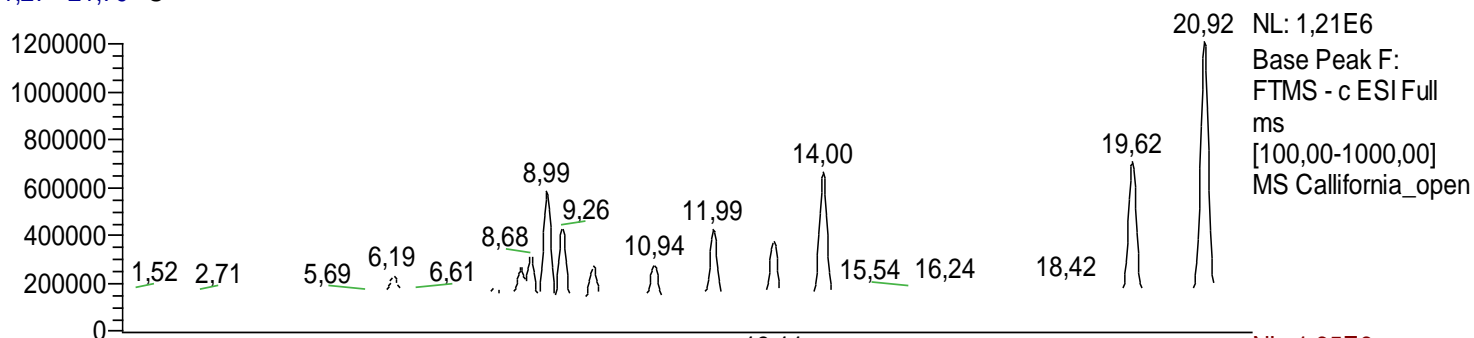
\* Για όλες τις ανακτήσεις χρησιμοποιήθηκαν 500 mg αρχικό εκχύλισμα

→ Η Κορινθιακή δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό (2.4 %) φαινολικού κλάσματος σε σύγκριση με τη Σουλτανίνα (0.4-0.8 %) και τη Καλιφόρνια (0.6 %)

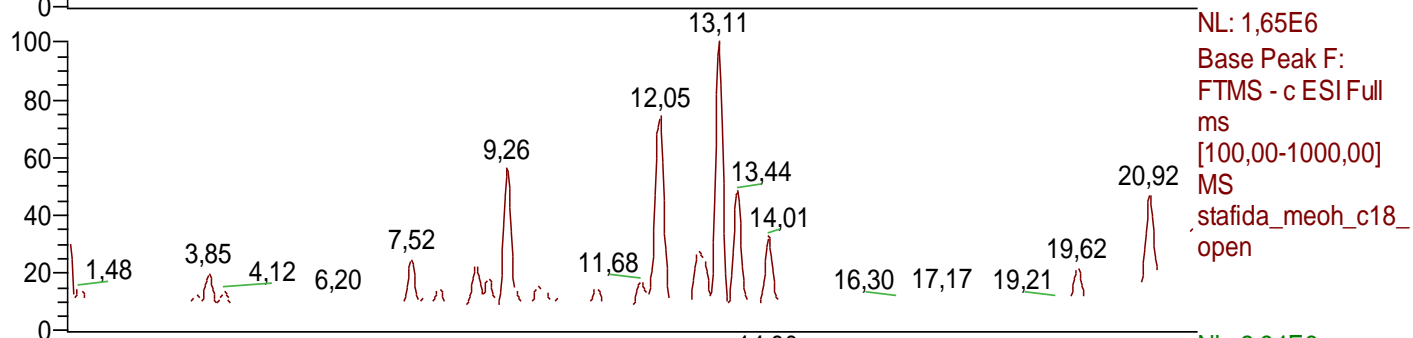
→ Το φαινολικό φορτίο (Μέθοδος Folin ciocalteau) ήταν παρόμοιο (4.53-5.65 % mg GAE/g εκχυλίσματος)

# Comparative chromatograms for the three species

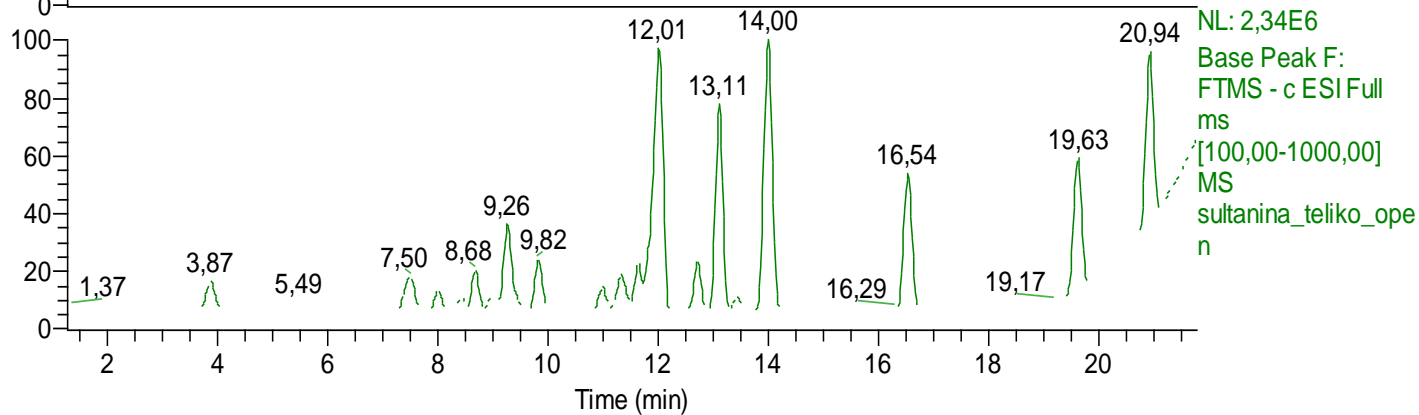
RT: 1,27 - 21,79 S



**California**



**Corinthian**

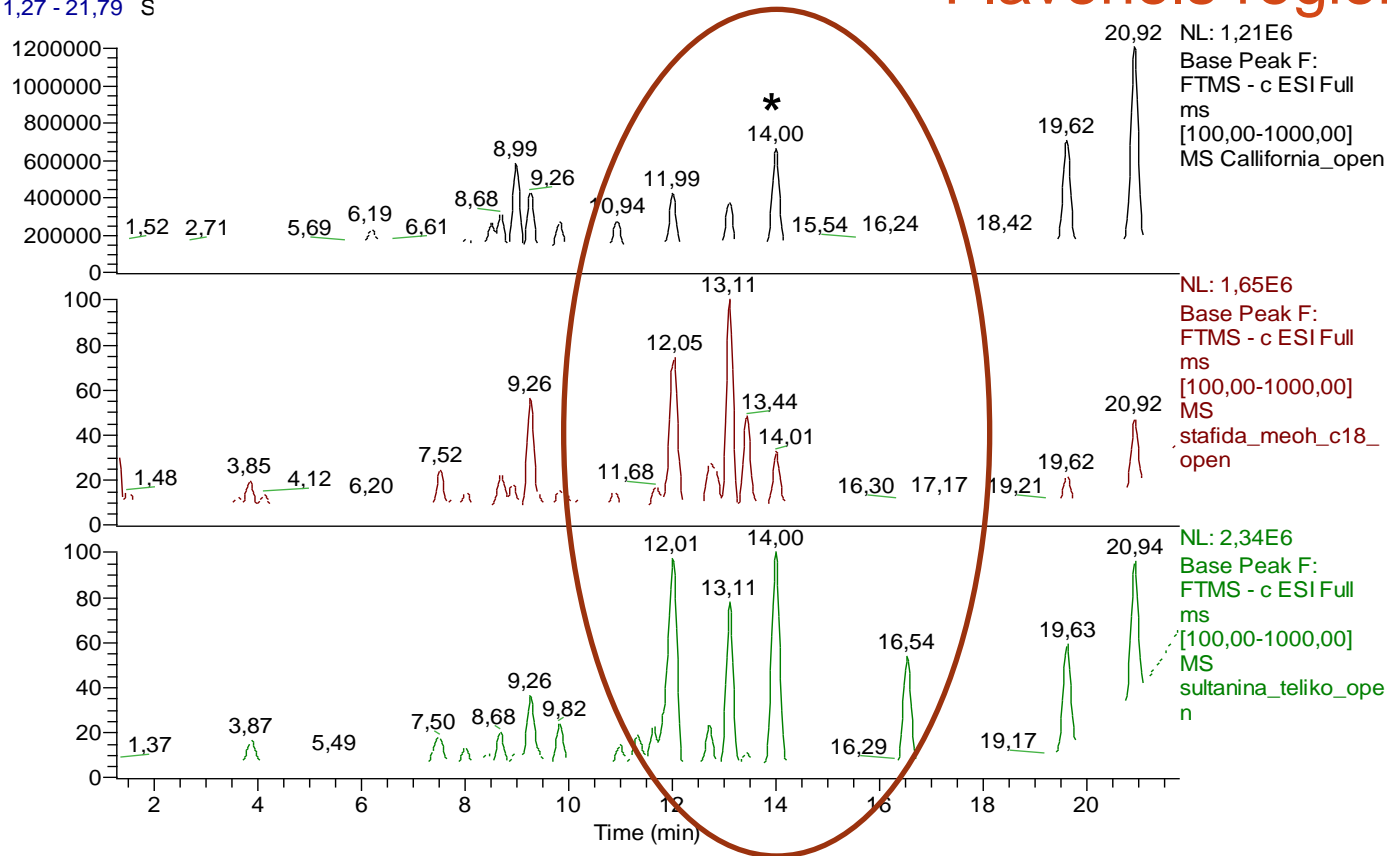


**Sultanina**



# Flavonols region

RT: 1,27 - 21,79 S



California

Corinthian

Sultanina

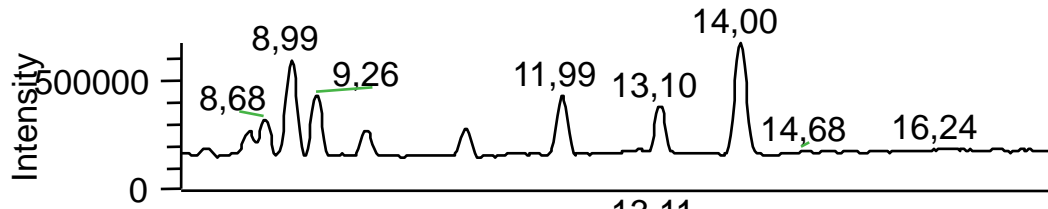
\* Rt 14.00min: azelaic acid

Sultanina has intense flavonol peaks

Corinthian has the most intense flavonol peaks: bigger range of flavonol structures and higher relative quantity (in comparison to the other groups)

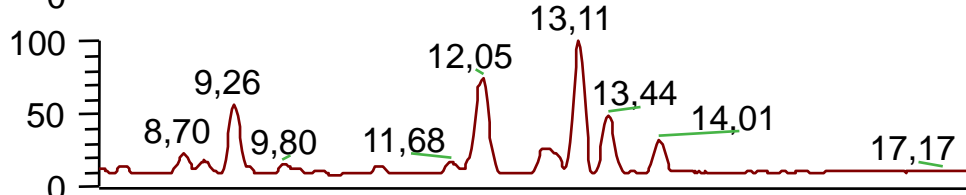
California contains the least flavonol structures.

RT: 7,74 - 17,49 SM: 7B

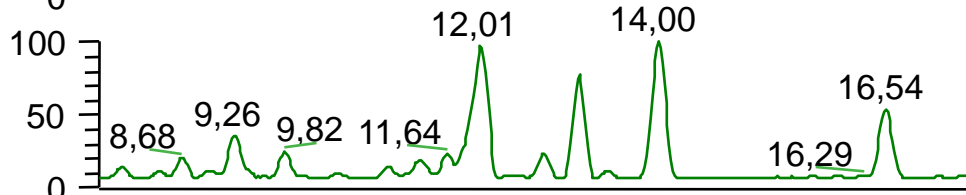


California

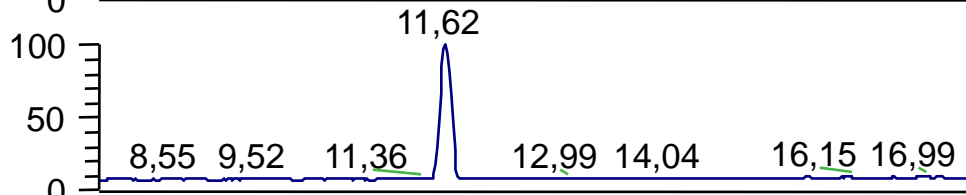
Comparison with authentic standards from our Chemical library



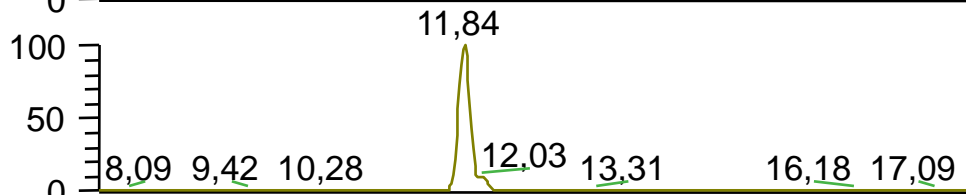
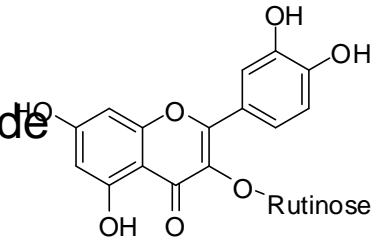
Corinthian



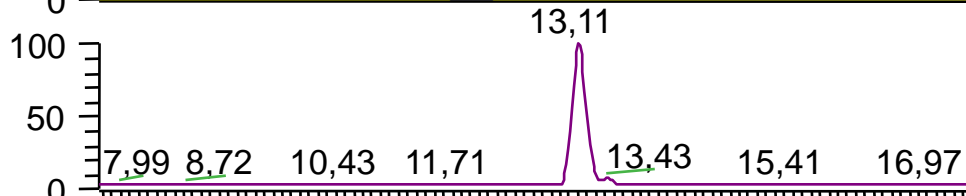
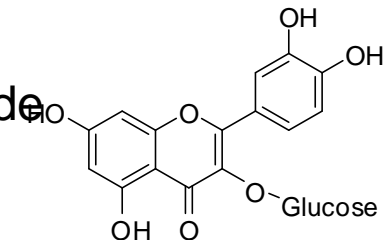
Sultanina



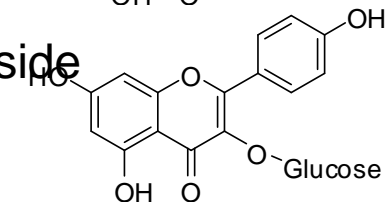
Quercetin rutinoside (Rutin)



Quercetin glucoside



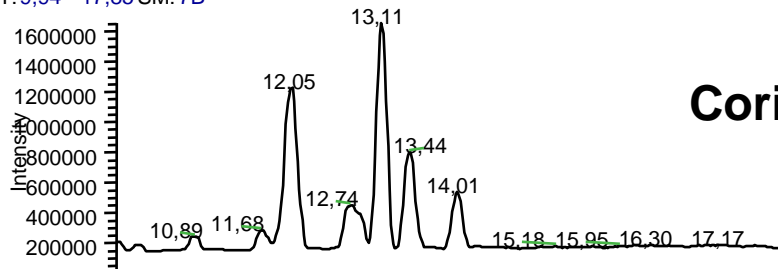
Kaempferol glucoside



Time (min)

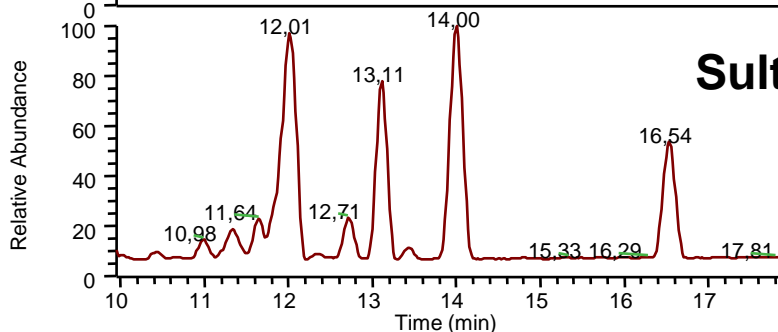
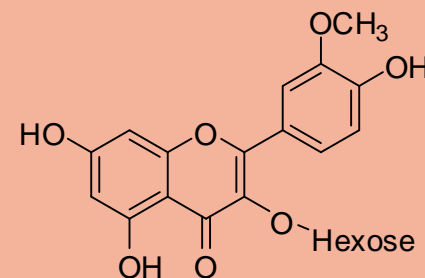
# Insight in the Flavonols region

RT: 9,94 - 17,85 SM: 7B



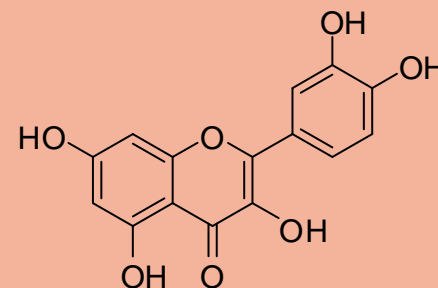
**Corinthian**

**Rt 12.05min  
Isorhamnetin  
hexoside**

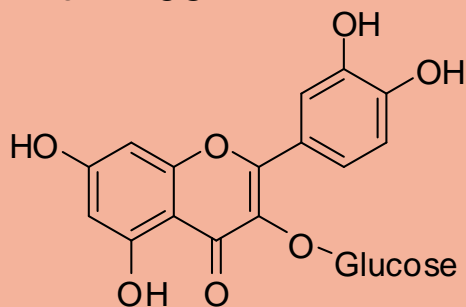


**Sultanina**

**Rt 12.05min  
Quercetin**

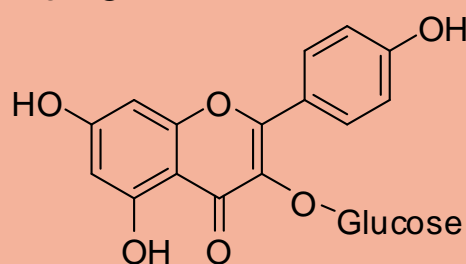


**Rt 12.05min**



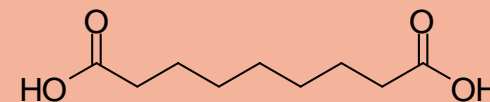
**Quercetin 3-O-glucoside**

**Rt 13.11min**



**Kaempferol 3-O-glucoside**

**Rt 14.00 min**



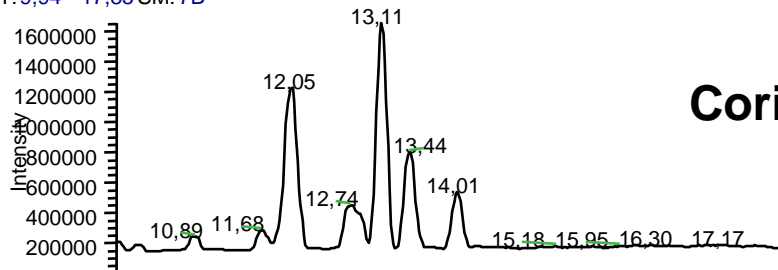
**Azelaic acid**

Compound produced during stress

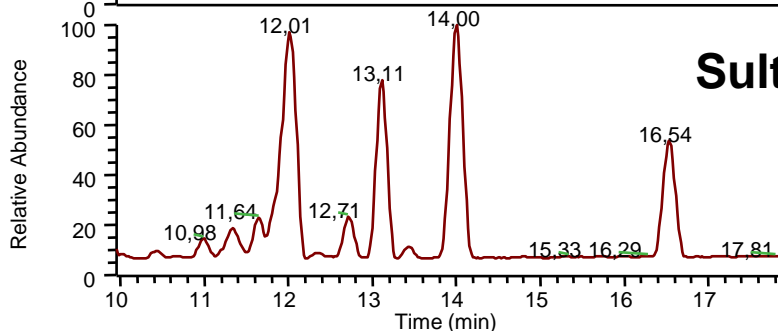
- Antimicrobial
- Anti-inflammatory
- Tyrosinase inhibitor

# Insight in the Flavonols region

RT: 9,94 - 17,85 SM: 7B

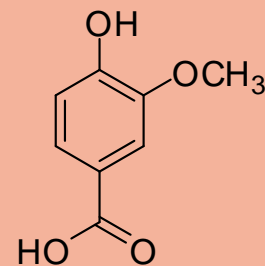


**Corinthian**

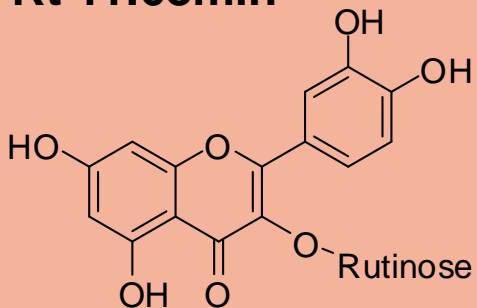


**Sultanina**

**Rt 12.88min  
Dimmer of  
Vanillic acid**

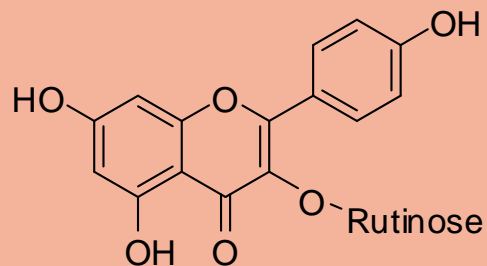


**Rt 11.68min**



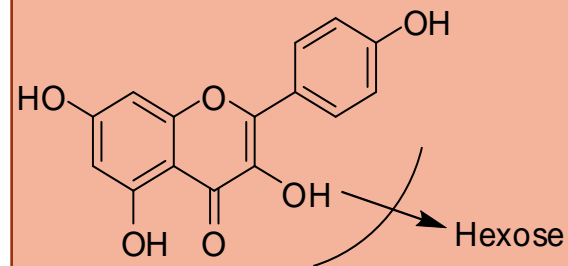
**Quercetin 3-O-rutinoside**

**Rt 12.71min**



**Kaempferol O-rutinoside**

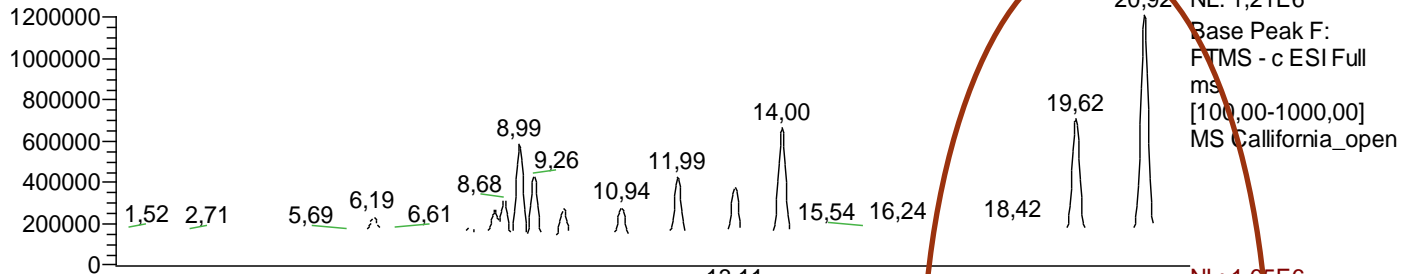
**Rt 12.74 min**



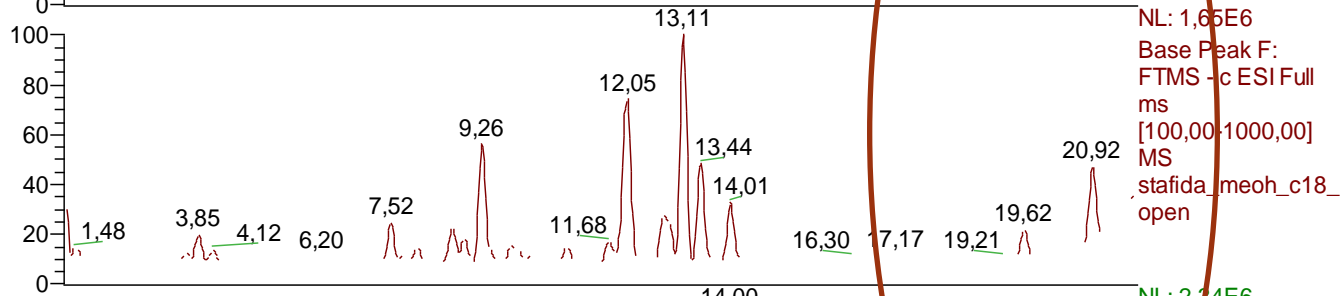
**Kaempferol hexoside**

# Fatty acids region

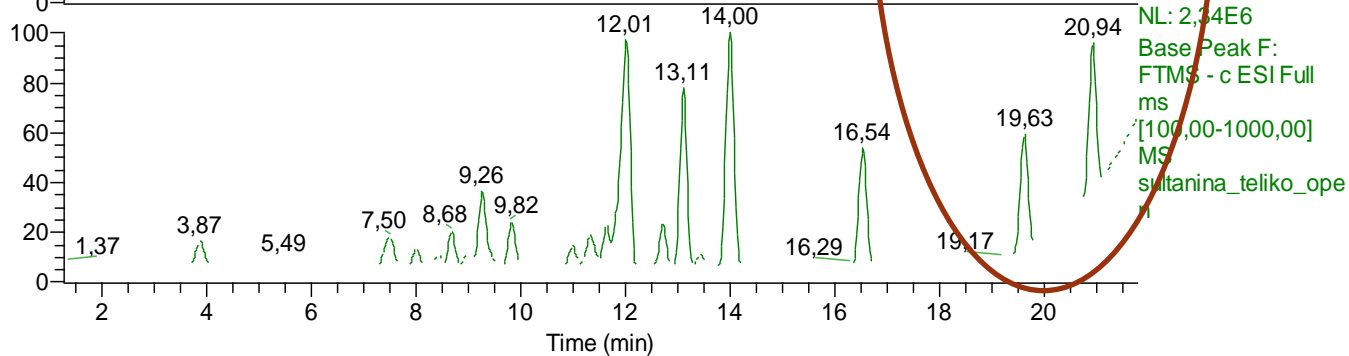
RT: 1,27 - 21,79 S



**California**

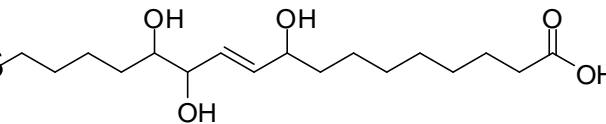


**Corinthian**



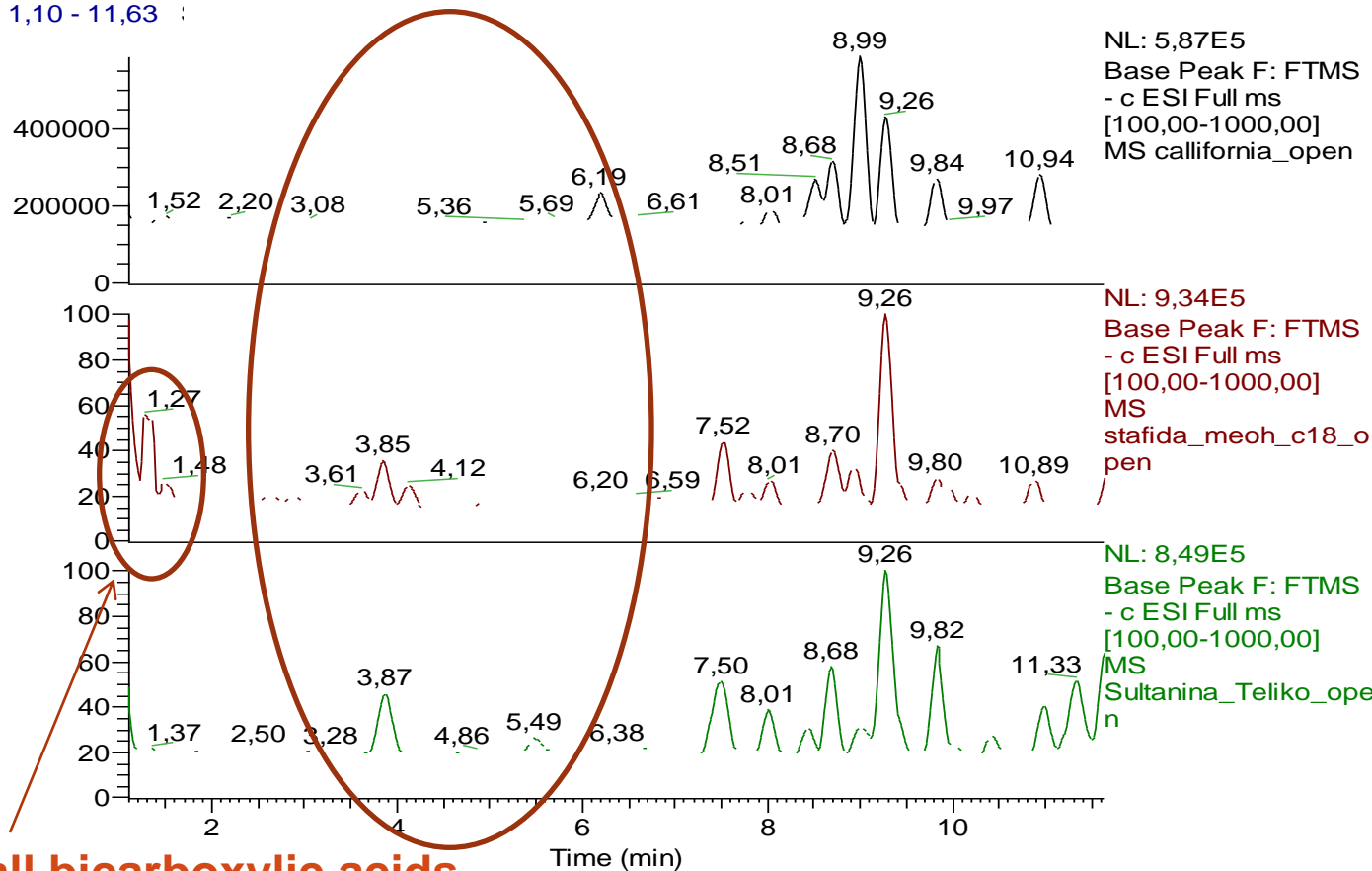
**Sultanina**

**C-18 unsaturated fatty acids**



# Benzoic acids region

RT: 1,10 - 11,63



## Small dicarboxylic acids

Small phenolic acids are absent from California raisin/ only p-hydroxybenzoic acid present.

Also they are absent from the initial material of Sultantina currents.

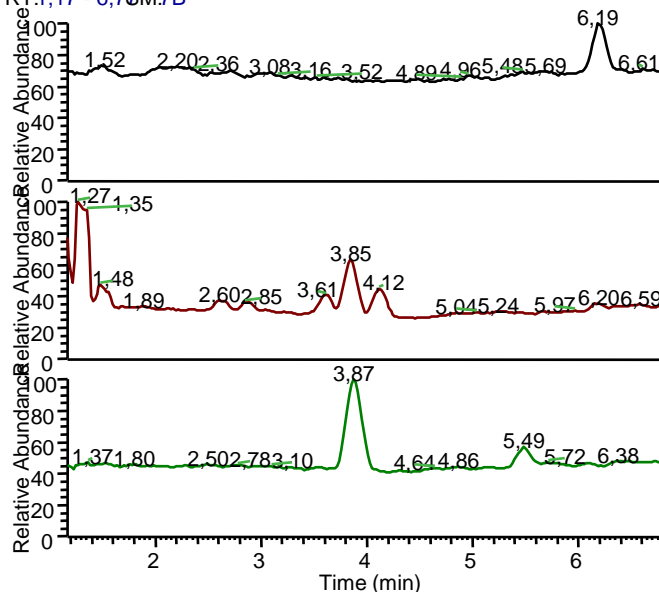
It can be found in initial material of Korinthiaki in small amounts.

**They are major constituents of Korinthiaki final product and**

**protocatechuic acid glucoside in sultantina (final product)**

# The Benzoic acids region / small dicarboxylic acids

RT:1,17 - 6,78M:7B

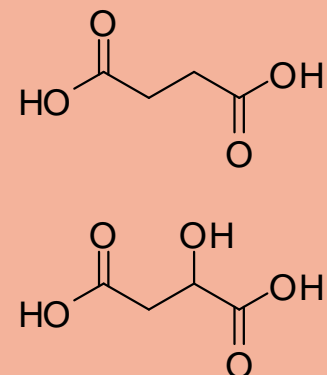


**California**

**Corinthian**

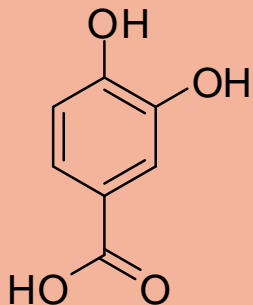
**Sultanina**

**Rt 1.27 &  
1.48 min  
Succinic  
acid,  
Malic acid**



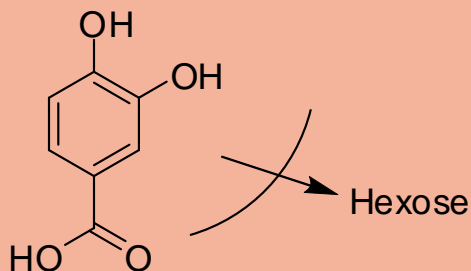
Only present in Corinthian

**Rt 3.61min**



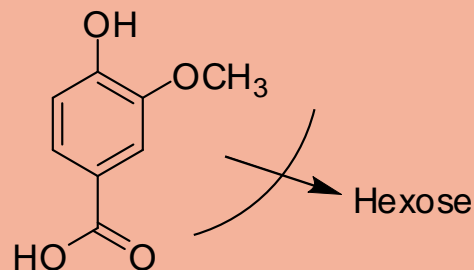
**Protocatechuic  
acid**

**Rt 3.85min**



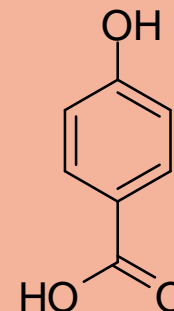
**Protocatechuic acid  
hexoside**

**Rt 4.12 min**



**Vanillic acid hexoside**

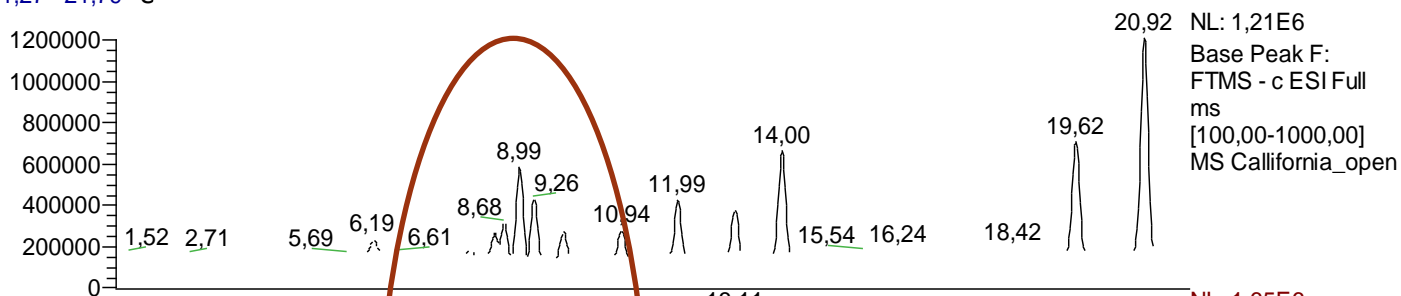
**Rt 6.19min**



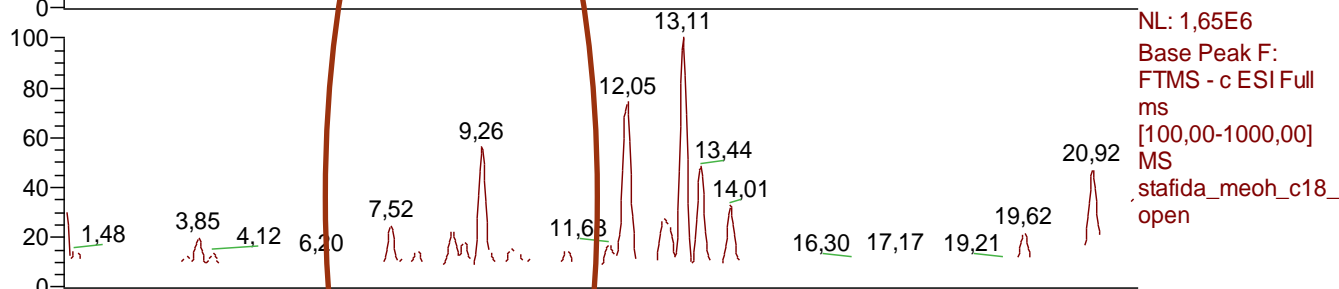
**p-hydroxybenzoic  
acid**

# Hydroxycinnamic acids/ Catechins/ ???Unidentified category

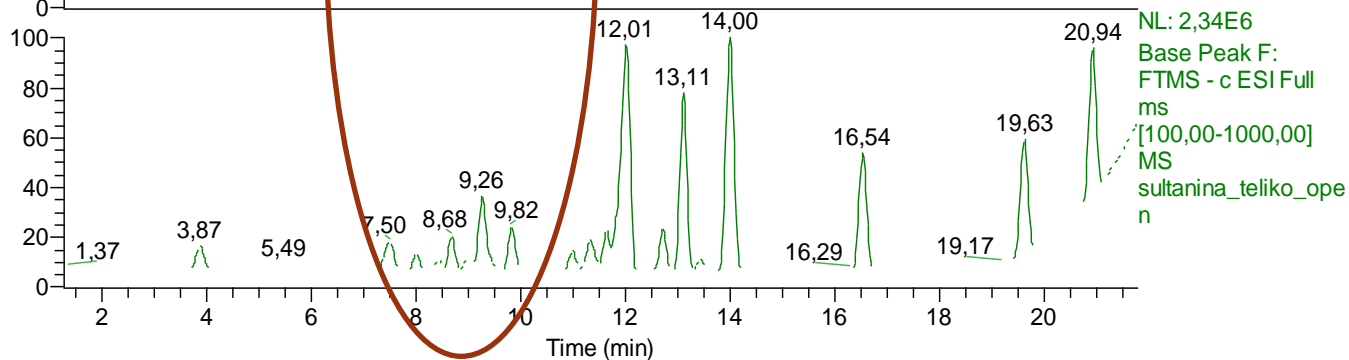
RT: 1,27 - 21,79 S



**California**



**Corinthian**

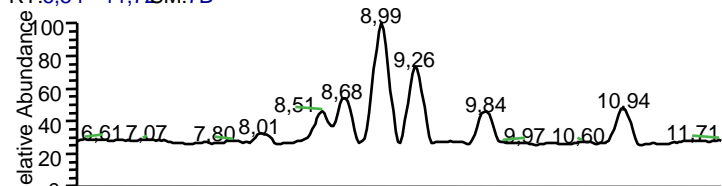


**Sultanina**

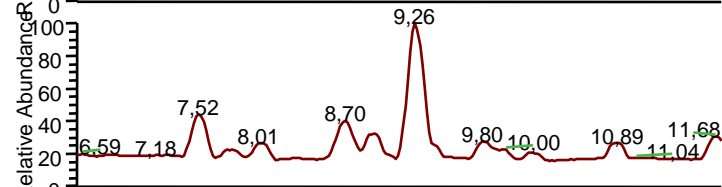


# Hydroxycinnamic acids/ Catechins

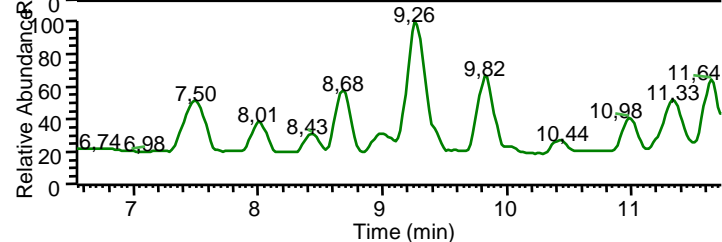
RT:6.54 - 11.72 SM:7B



California



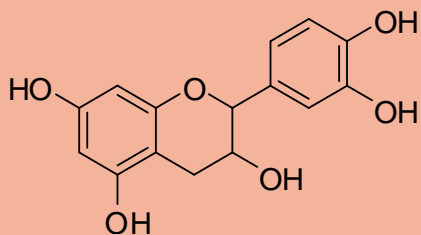
Corinthian



Sultanina

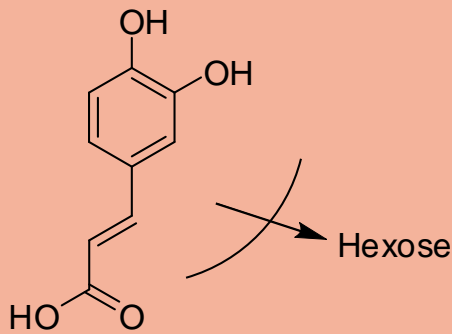
Some peaks of this region remain unidentified (Rts 8.70, 8.99 & 9.26 min)

Rt 7.52min



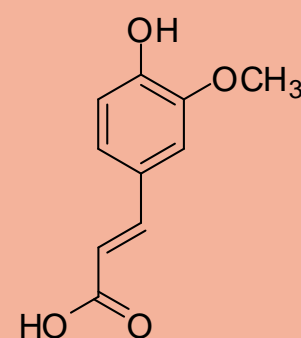
Catechin

Rt 8.01min



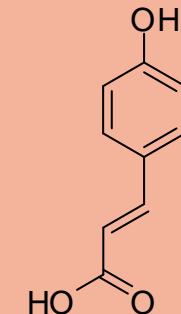
*p*-coumaric acid  
hexoside

Rt 9.03 min



Ferulic acid

Rt 10.94min



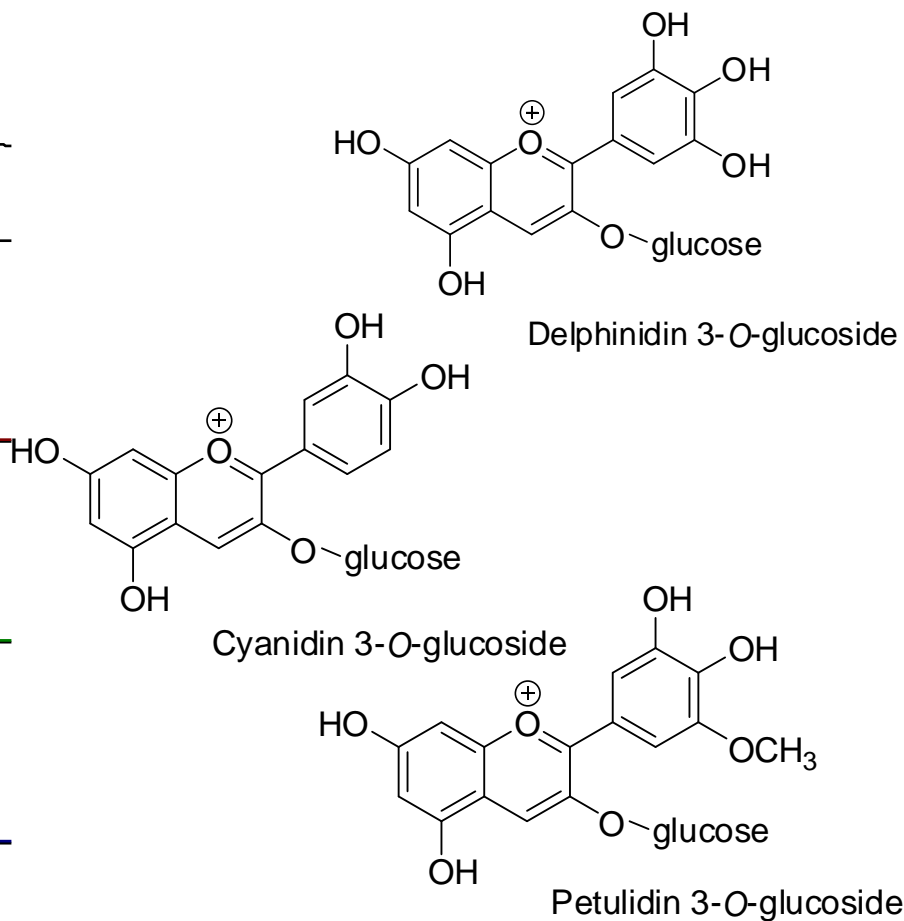
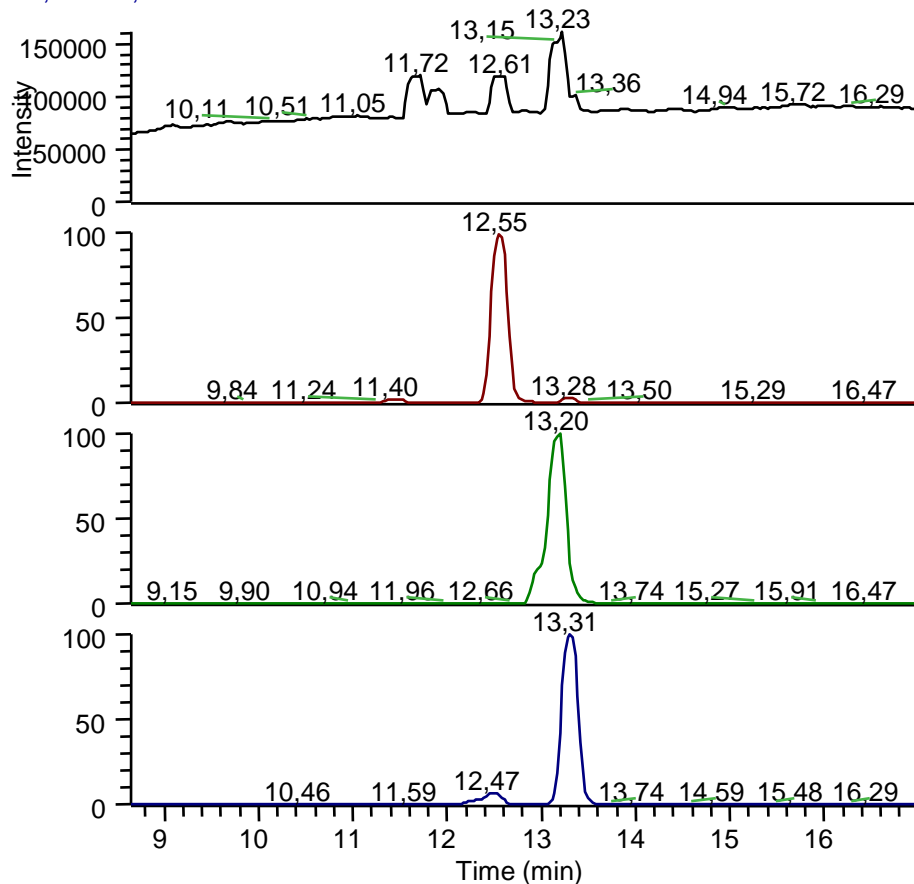
*p*-coumaric acid

# Ειδικές εκχυλίσεις για ανάκτηση χρωστικών (ανθοκυανίνες) Σύγκριση με πρότυπες ουσίες in process....

- Εκχύλιση με όξινη MeOH (HCl 0.01% v/v)
- Καθαρισμός σε SPE DSC-18 με χρήση H<sub>2</sub>O και MeOH (HCl 0,03% v/v). Απόδοση 0.56% (2.8mg κλάσματος χρωστικών από 500mg ποσότητας εκχυλίσματος)

## HPLC-HRMS/MS, positive mode- Comparison with standard compounds

RT: 8,64 - 16,98 SM: 7B



## Συμπεράσματα

- Το φυτοχημικό προφίλ της μαύρης σταφίδας Μεσσηνίας είναι πλουσιότερο σε σύγκριση με τα ανταγωνιστικά προϊόντα
- Τα κύρια συστατικά του άπολου κλάσματος των μεταβολιτών είναι τριτερπενικά παράγωγα
- Το φαινολικό φορτίο της μαύρης σταφίδας Μεσσηνίας είναι 3-4 φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα ανταγωνιστικά προϊόντα
- Τα κύρια συστατικά του φαινολικού κλάσματος είναι φλαβονοειδικοί γλυκοσίδες καιμπερόλης & κερκετίνης, φαινολικά οξέα και γλυκοσίδες τους & ανθοκυανίνες

## Προοπτικές

- Βελτιστοποίηση πρωτόκολλου παραλαβής ανθοκυανινών
- Συγκριτική μελέτη των δειγμάτων ως προς τις περιεχόμενες χρωστικές
- Ποσοτικοποίηση των κύριων τερπενοειδών στα δείγματα ?
- Απομόνωση και ταυτοποίηση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών από το άπολο (διχλωρομεθανικό ) κλάσμα ?