



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

## ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΑΥΡΗΣ ΣΤΑΦΙΔΑΣ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ



**Καθ. Λέανδρος Α. Σκαλτσούνης**

**Κατά τον 19ο αιώνα η μαύρη σταφίδα αποτελούσε το 90% των εξαγωγών της Ελλάδας στην Ευρώπη.**

**η σταφίδα για την Ελλάδα ήταν «ό,τι και ο καφές για τη Βραζιλία».**

- 2000 tn
- 95% εξαγωγικό προϊόν
- 0.8-0.9 €
- Ετήσια παραγωγή

# Βιβλιογραφική ανασκόπηση για την χημική σύσταση της σταφίδας

**Φρουκτόζη**

**Ιχνοστοιχεία: Κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρο.**

**Πολυφαινόλες**

# Βιβλιογραφική ανασκόπηση για την φαρμακολογική δράση της σταφίδας

## □ Βιολογικές δράσεις

- Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση
- Καρδιοπροστατευτική
- Κυτταροπροστατευτική δράση
- 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

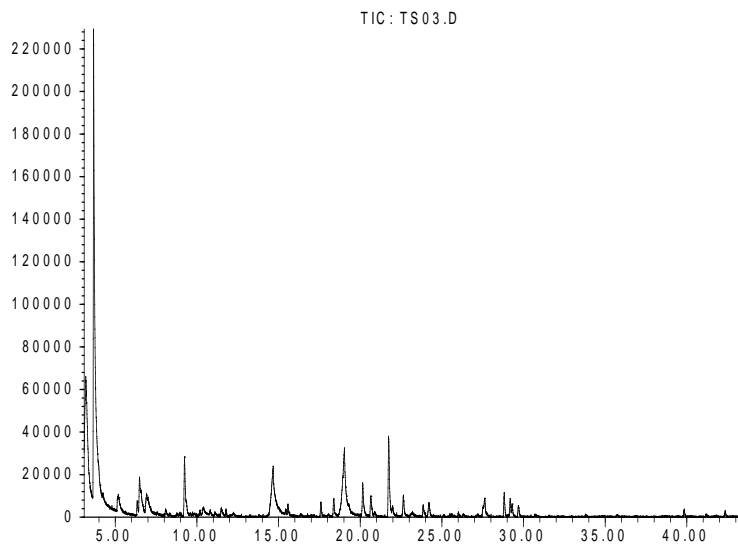
- Διαδοχική εκχύλιση (x2) με διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) & αιθανόλη (EtOH)
- Καθαρισμός σε σύστημα SPE C-18 για απομάκρυνση των σακχάρων και παραλαβή των φαινολών

- 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).

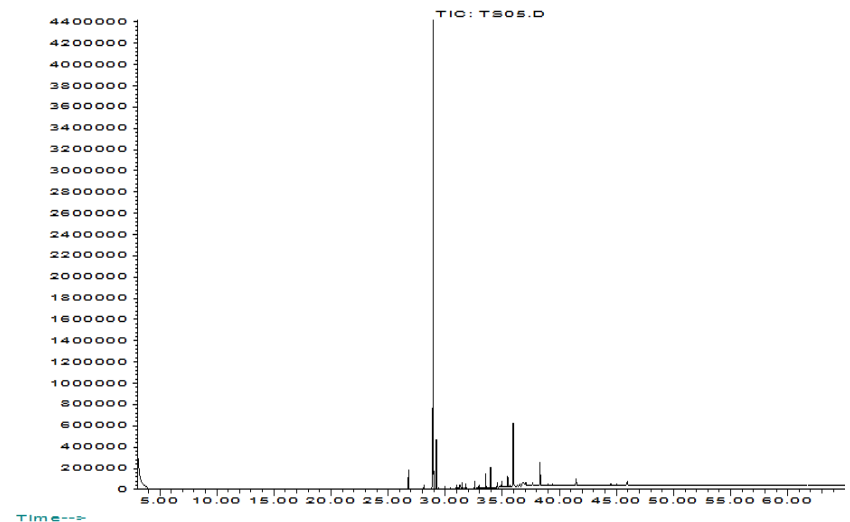
# Ανάλυση των πτητικών συστατικών GC-MS

- **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



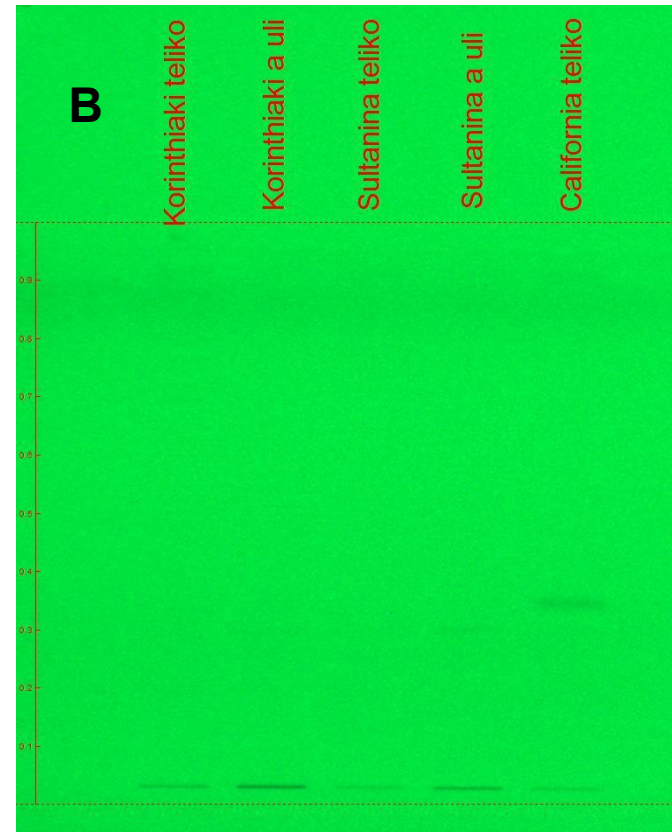
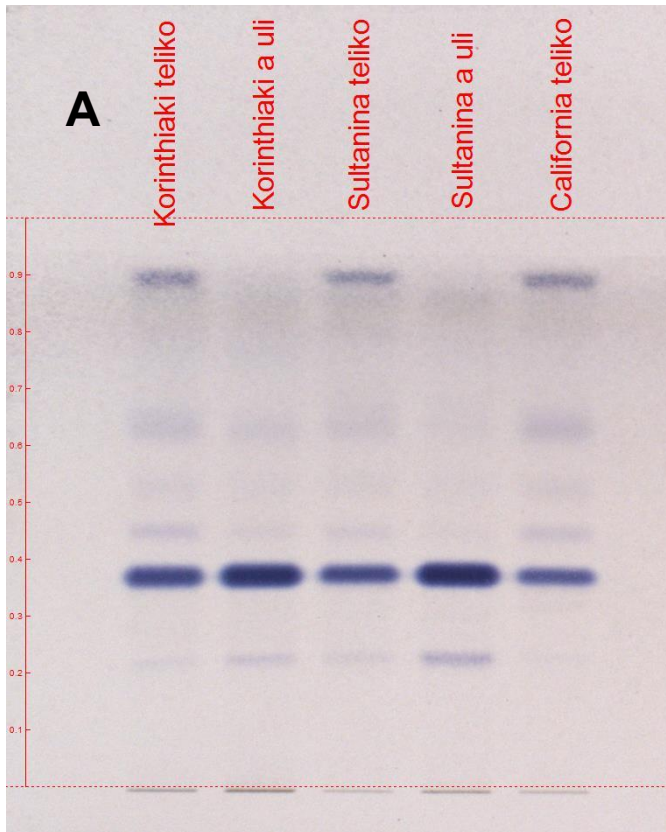
## Εκχυλίσεις δειγμάτων \* με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Ποσότητα (mg) εκχυλίματος	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
<b>Α' Ύλη</b>	190 /220 /200 <b>200</b>	230 /220 /240 <b>220</b>	-
<b>Τελικό</b>	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)



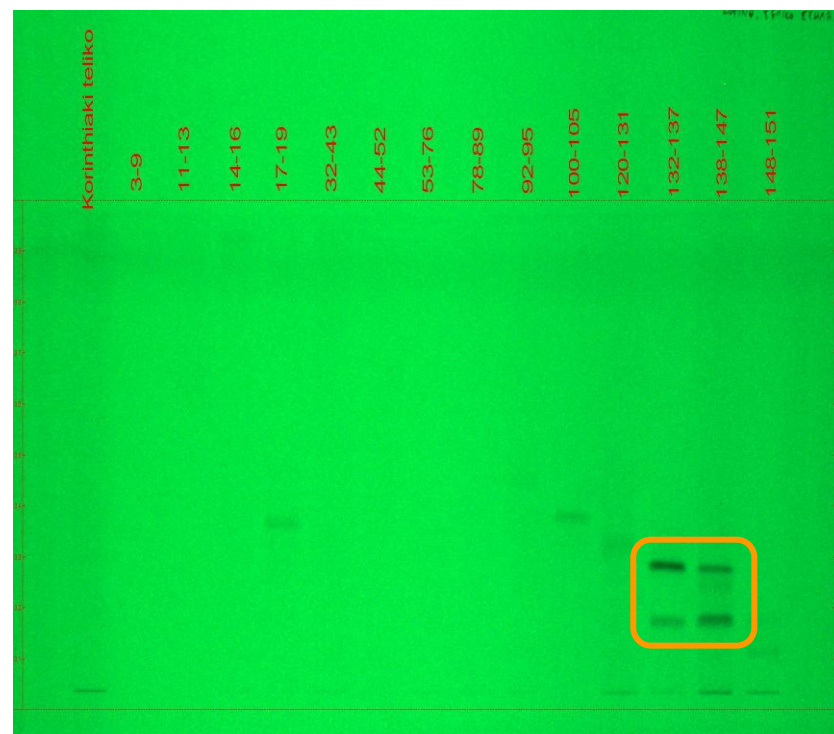
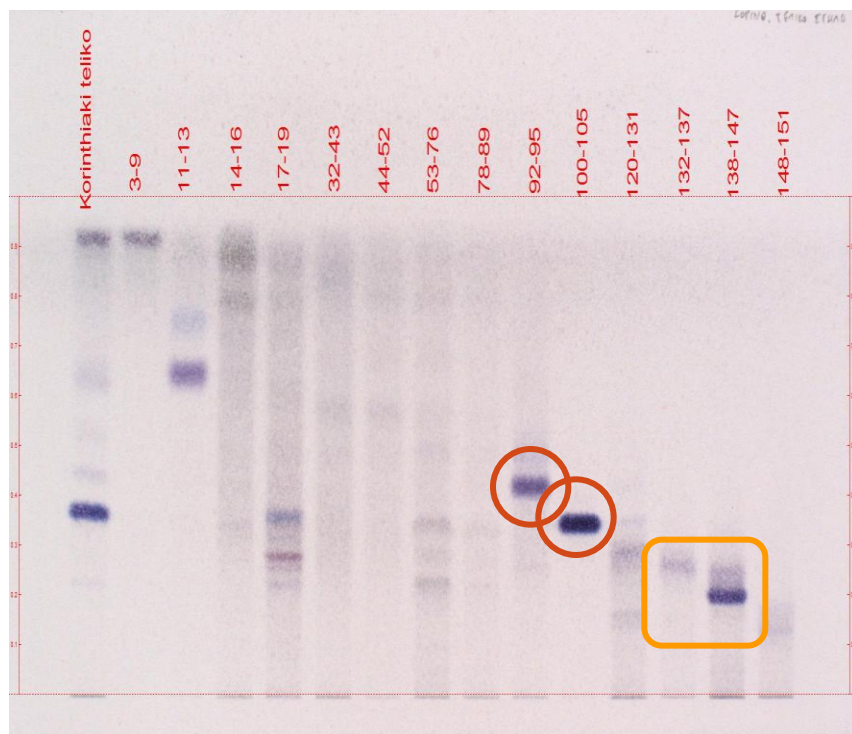
**Χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας:** (A) εμφάνιση με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης και παρατήρηση στο ορατό (B) παρατήρηση στα 254 nm

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



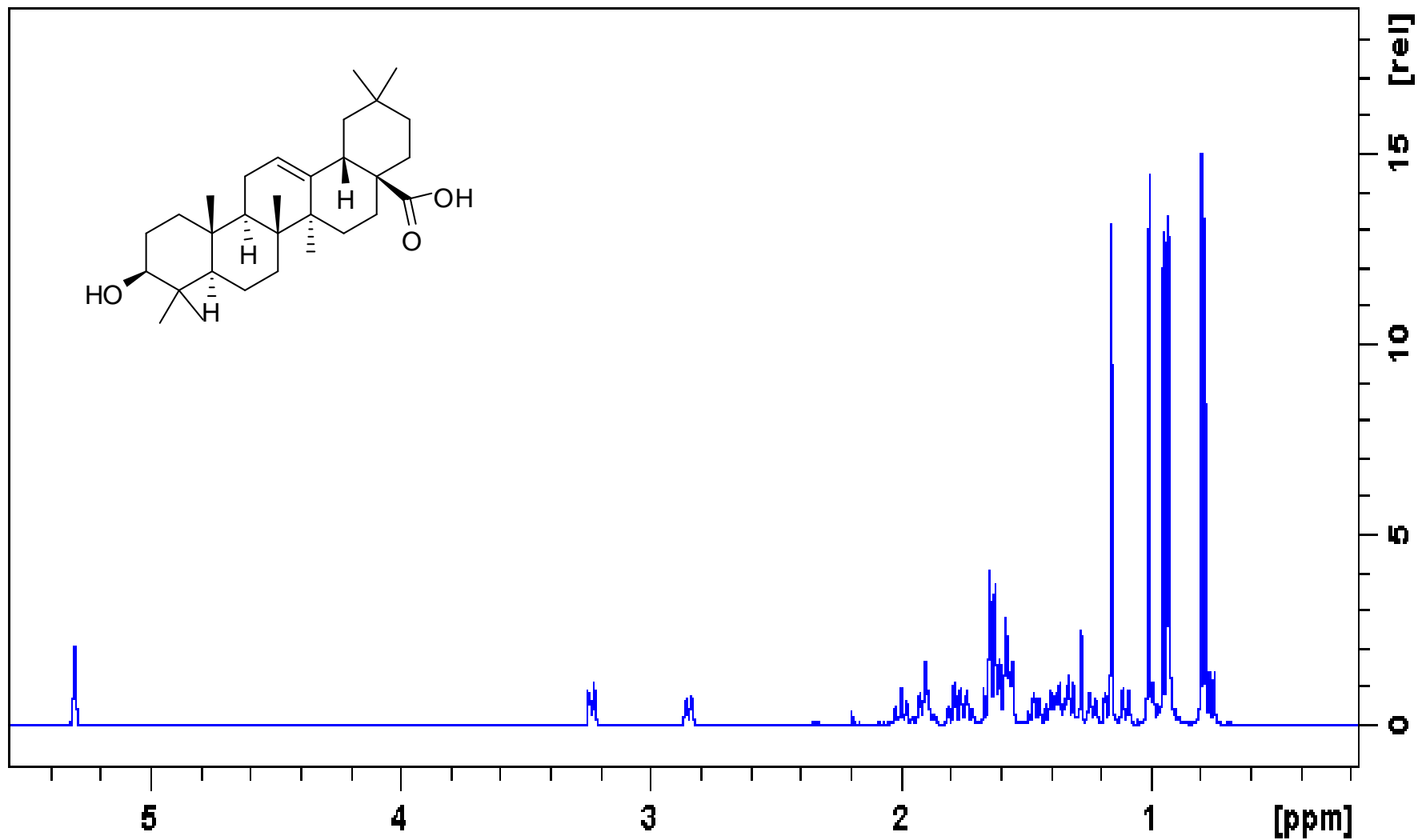
# Απομόνωση και ταυτοποίηση τερπενοειδών

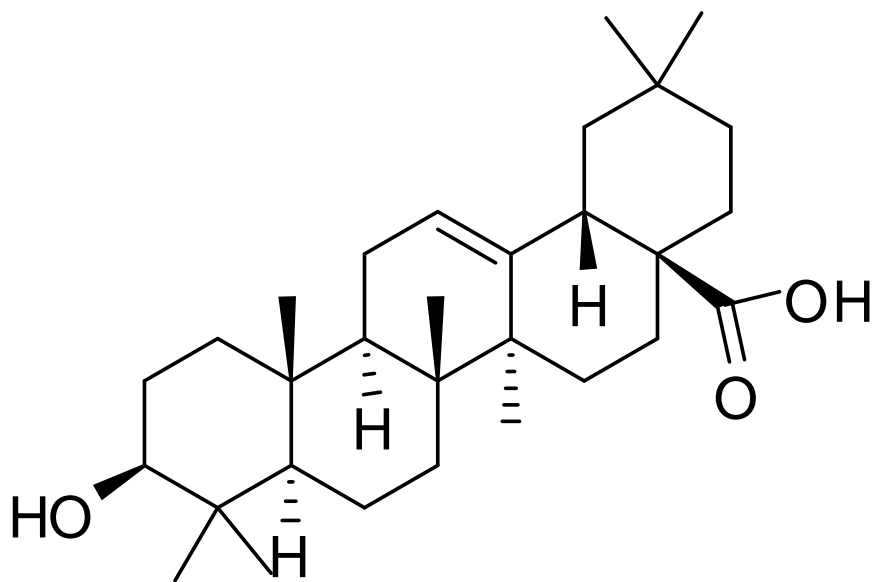
Υγρή χρωματογραφία στήλης (Στατική φάση: Γέλη πυριτίου κανονικής φάσεως, Κινητή φάση: Μίγμα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  αυξανόμενης πολικότητας)



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

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





## Ολεανολικό οξύ

Εχει ισχυρή ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση

## Εκχυλίσεις δειγμάτων \* με EtOH

Ποσότητα (g) εκχυλίματος	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
Α΄ Ύλη	15.5 /15 /20.3 <b>17.0</b>	6.3 /6 /7 <b>6.5</b>	-
Τελικό	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

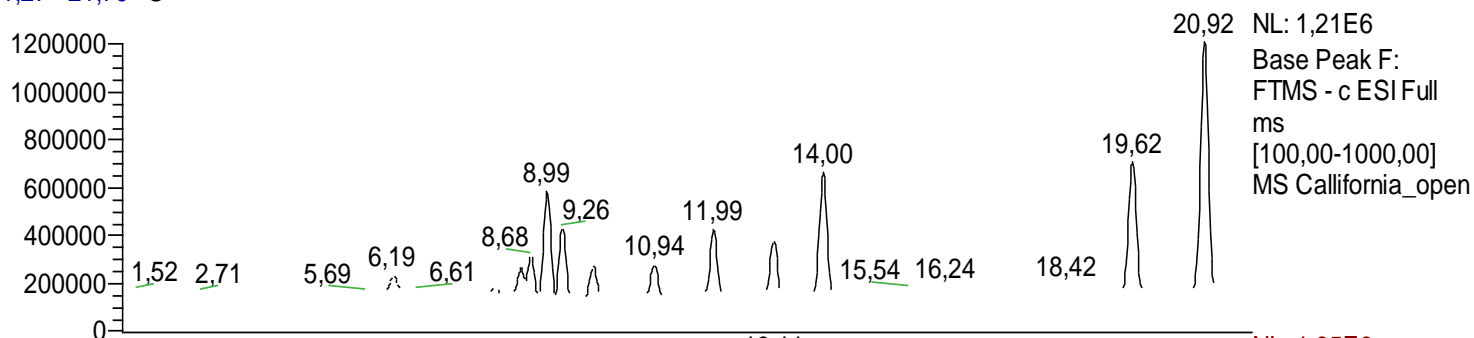
Ποσότητα (mg)	Κορινθιακή	Σουλτανίνα	Καλιφόρνια
Α' Υλη	12	2	-
Τελικό	10	4	3

\* Για όλες τις ανακτήσεις χρησιμοποιήθηκαν 500 mg αρχικό εκχύλισμα

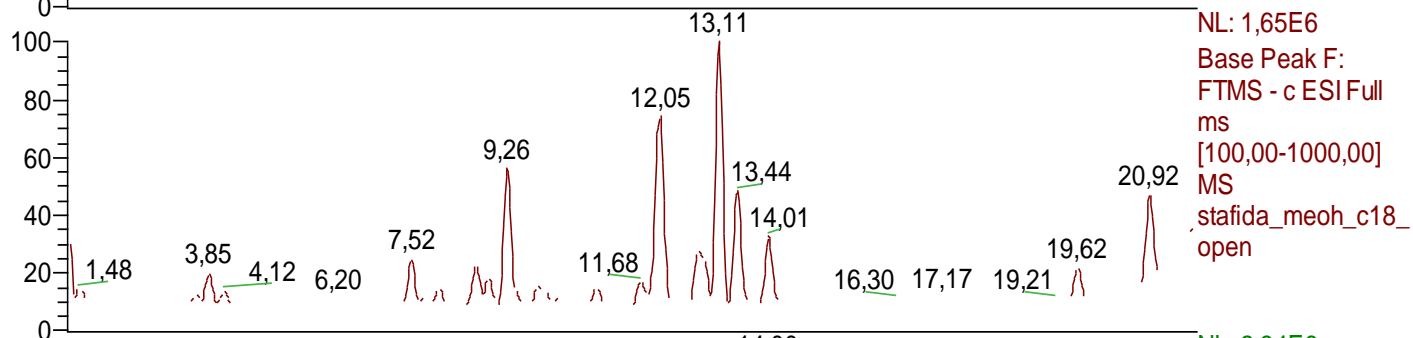
→ Η Κορινθιακή δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό (2.4%) φαινολικού κλάσματος σε σύγκριση με τη Σουλτανίνα (0.4-0.8%) και τη Καλιφόρνια (0.6%)

# Comparative chromatograms for the three species

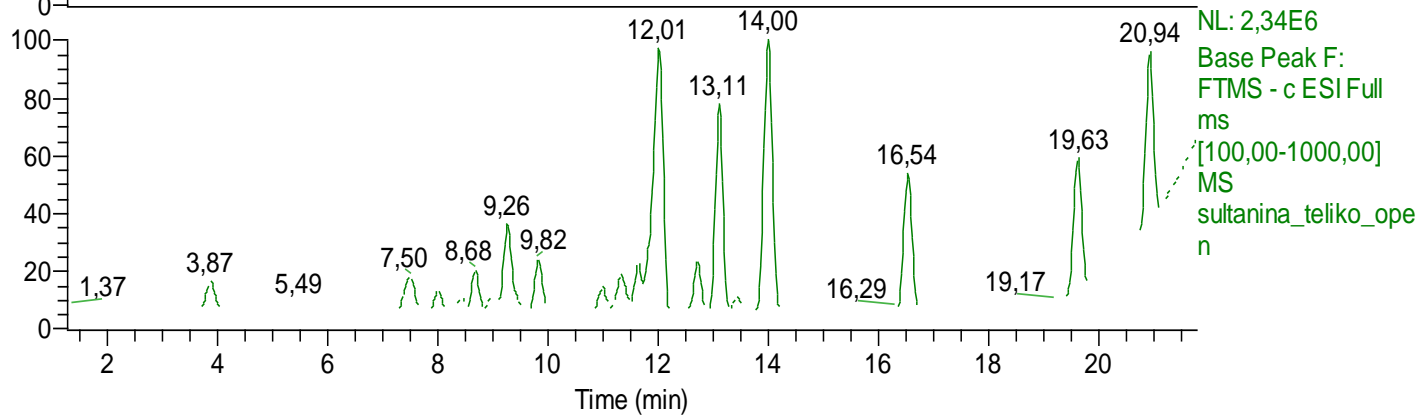
RT: 1,27 - 21,79 S



California



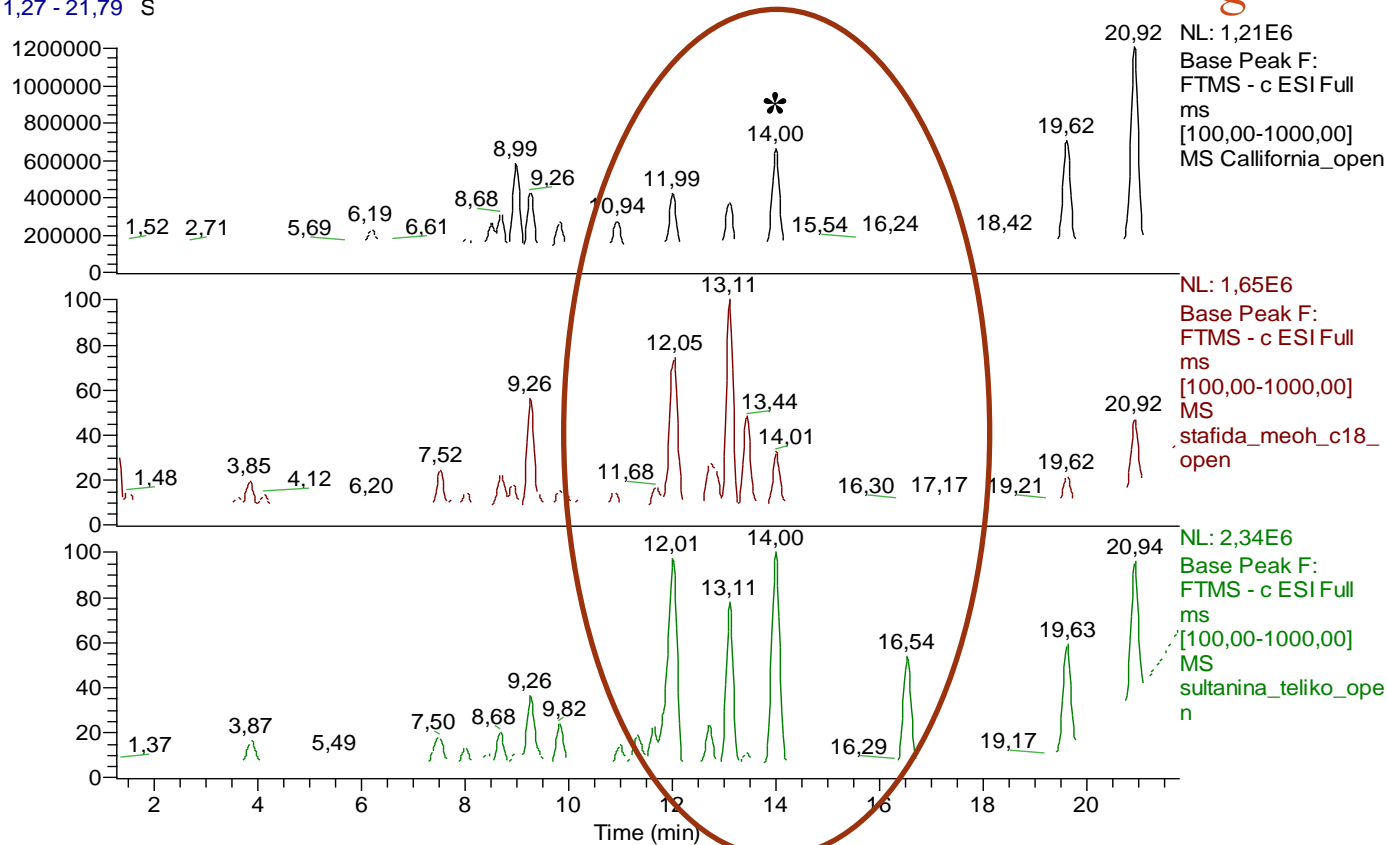
Corinthian



Sultanina

## Flavonols region

RT: 1,27 - 21,79 S



\* Rt 14.00min: azelaic acid

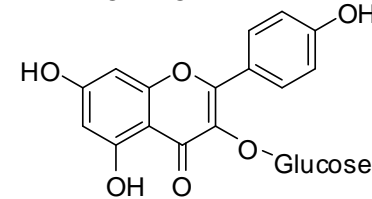
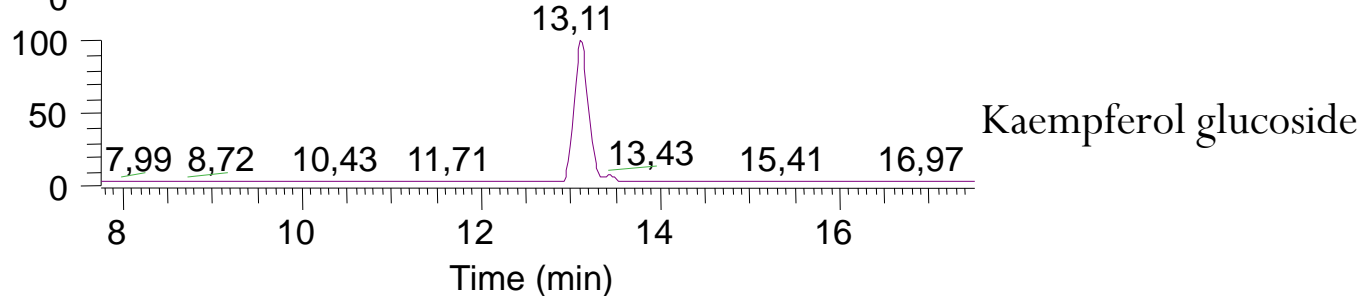
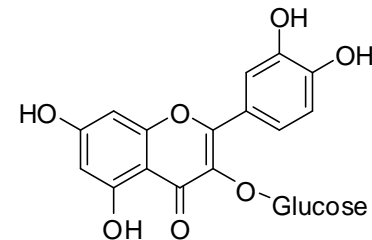
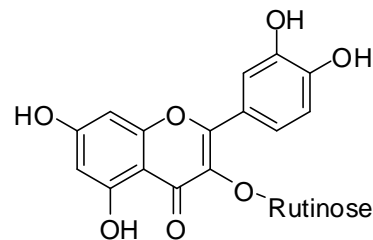
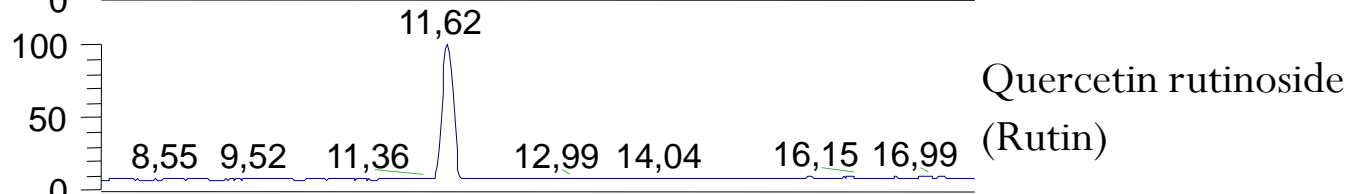
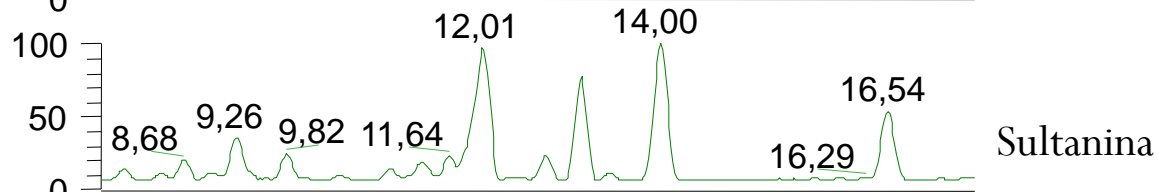
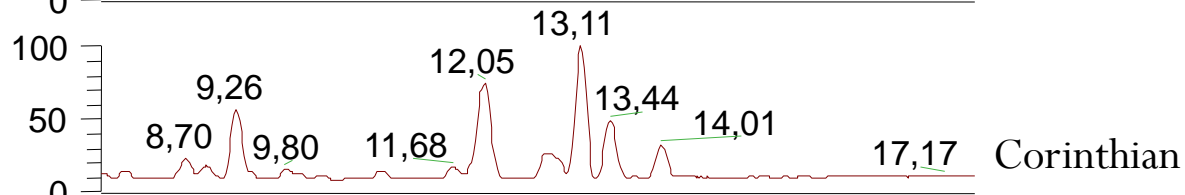
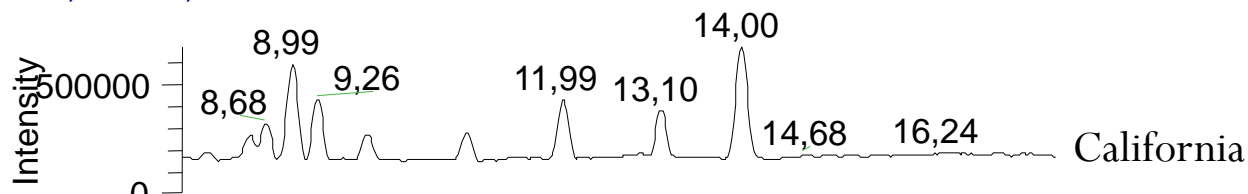
Sultanina has intense flavonol peaks

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

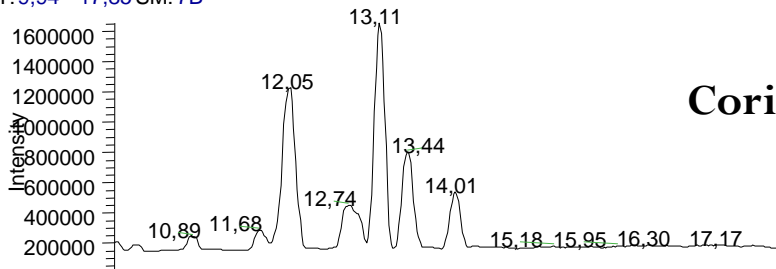
Comparison with authentic standards from our Chemical library





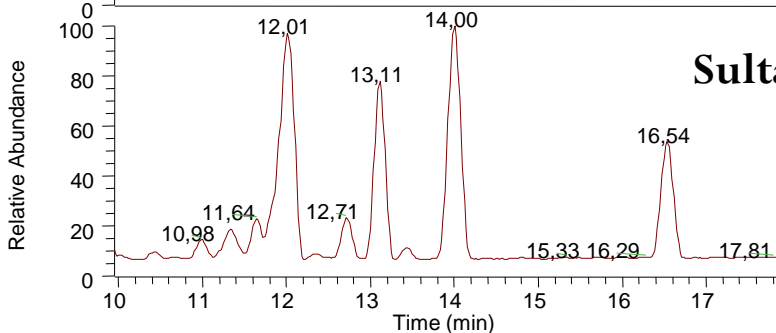
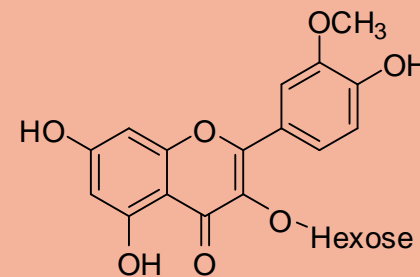
# Insight in the Flavonols region

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



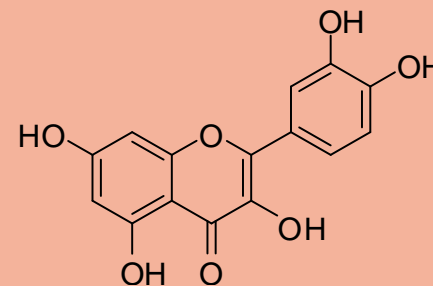
**Corinthian**

**Rt 13.44min  
Isorhamnetin  
hexoside**

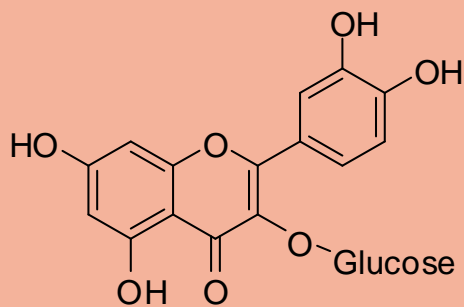


**Sultanina**

**Rt 16.54min  
Quercetin**

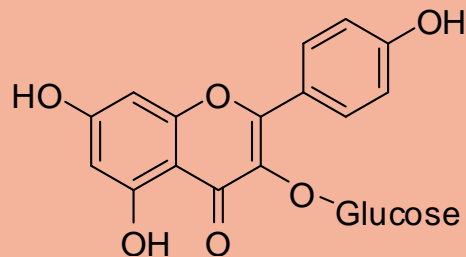


**Rt 12.05min**



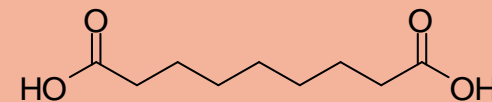
**Quercetin 3-O-glucoside**

**Rt 13.11min**



**Kaempferol 3-O-glucoside**

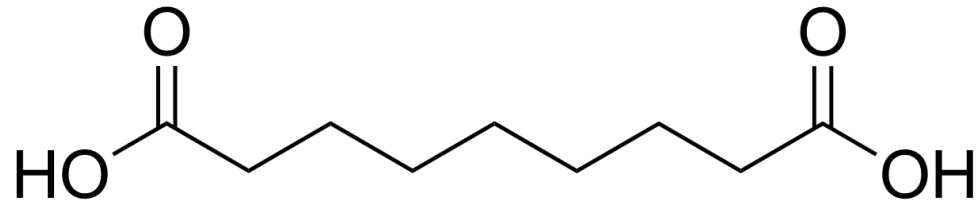
**Rt 14.00 min**



**Azelaic acid**

Compound produced during stress

- Antimicrobial
- Anti-inflammatory
- Tyrosinase inhibitor



**Azelaic acid:**

έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση

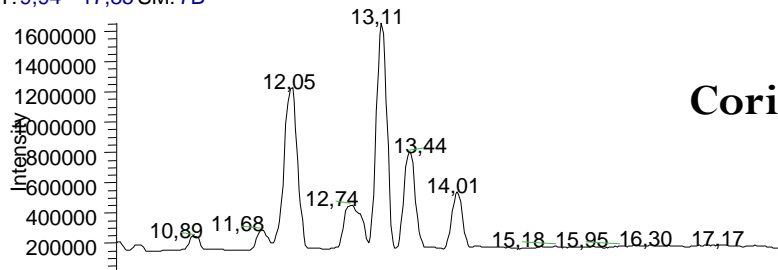
Χρησιμοποιείται στην θεραπεία της ακμής

Αναστολέας τυροσινάσης, μετριάζει την σύνθεση μελανίνης και

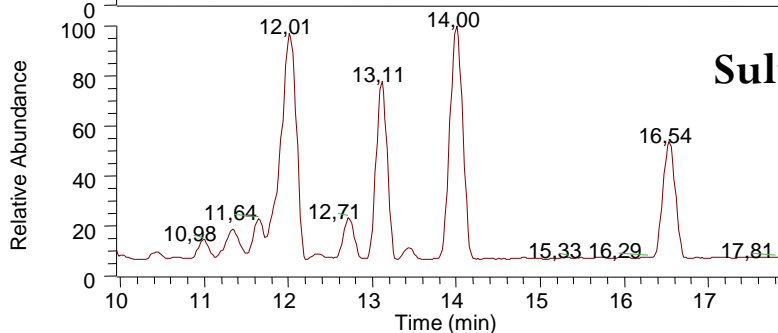
έχει λευκαντική δράση στο δέρμα

# Insight in the Flavonols region

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

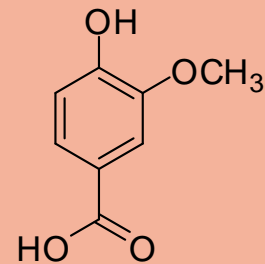


**Corinthian**

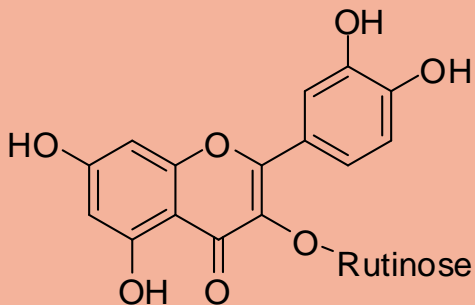


**Sultanas**

**Rt 12.88min  
Dimmer of  
Vanillic acid**

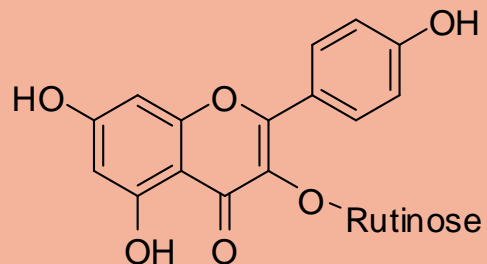


**Rt 11.68min**



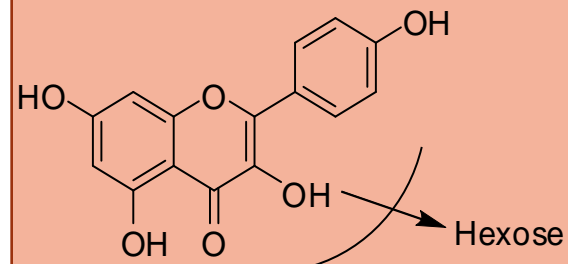
**Quercetin 3-O-rutinoside**

**Rt 12.71min**



**Kaempferol O-rutinoside**

**Rt 12.74 min**



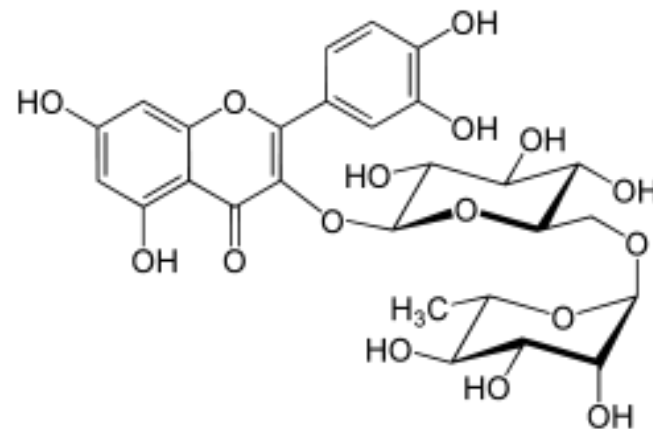
**Kaempferol hexoside**



Η παρουσία φλαβονοειδών στα φρούτα και τα λαχανικά θεωρείται ότι επεξηγεί τις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσής τους. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η διαιτητική πρόσληψη των φλαβονοειδών είναι αντιστρόφως ανάλογη της θνητότητας από καρδιαγγειακά. Μελετάται η επίδρασή τους στην πρόληψη του καρκίνου και των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

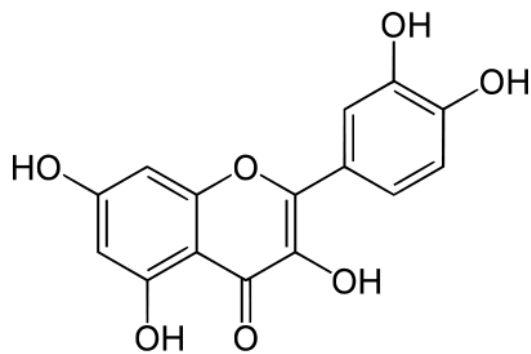
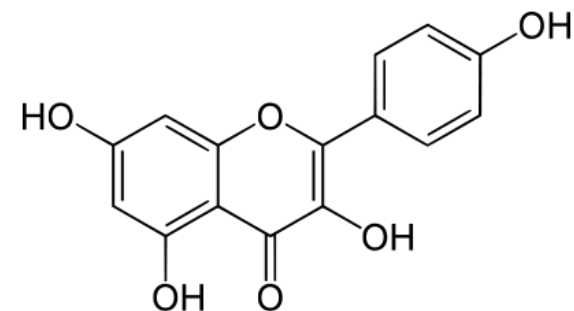


Η ρουτίνη αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μειώνει την διαπερατότητα των τριχοειδών βελτιώνοντας την κυκλοφορία, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (θεραπεία αιμορροΐδων, κίρσων και μικροαγγειοπάθειας), έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.



## Κεμπφερόλη:

αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης,  
αντιμικροβιακή, οιστρογονική δράση

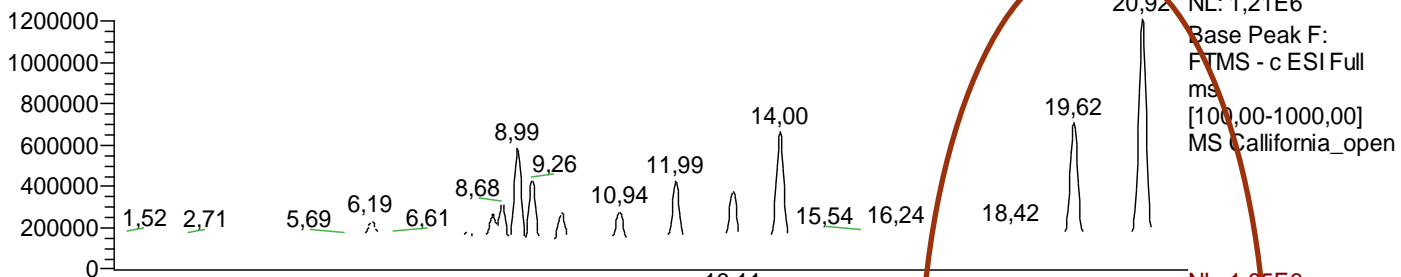


**Κερκετίνη:** ισχυρή αντιοξειδωτική δράση

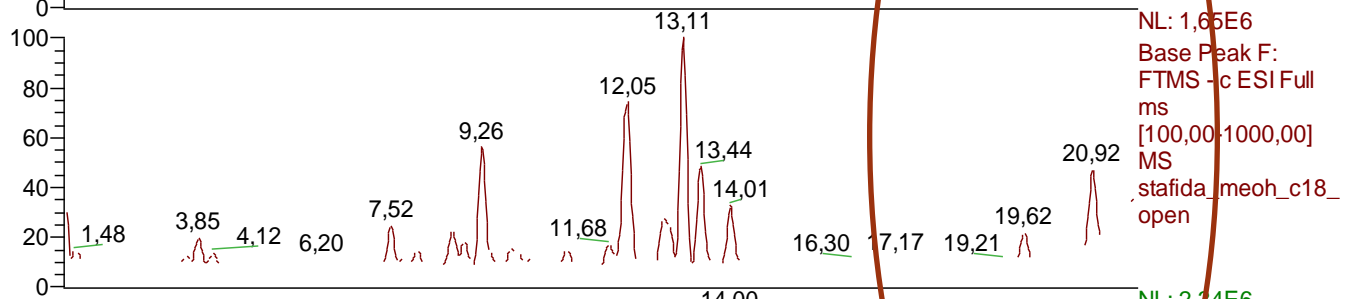


# Fatty acids region

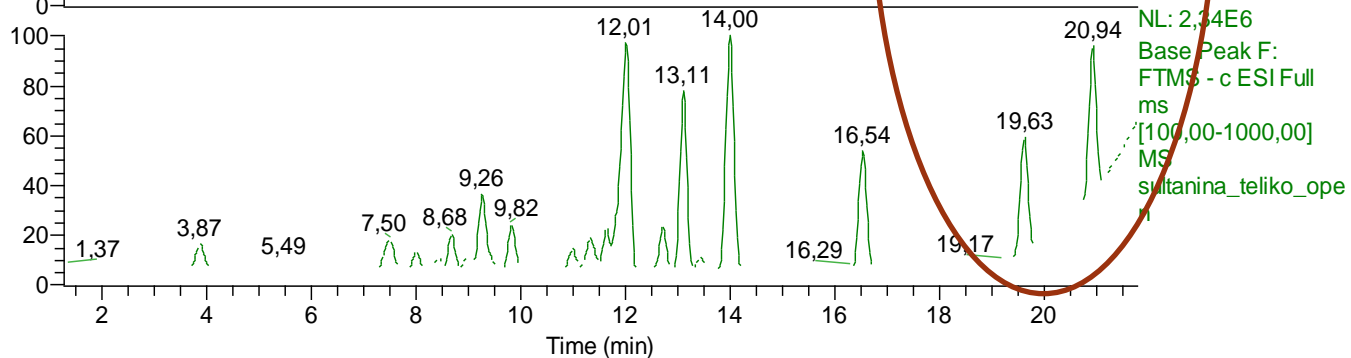
RT: 1,27 - 21,79 S



**California**

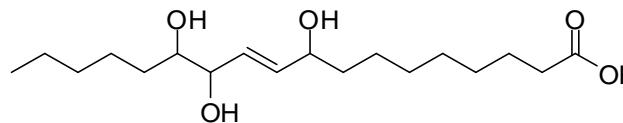


**Corinthian**



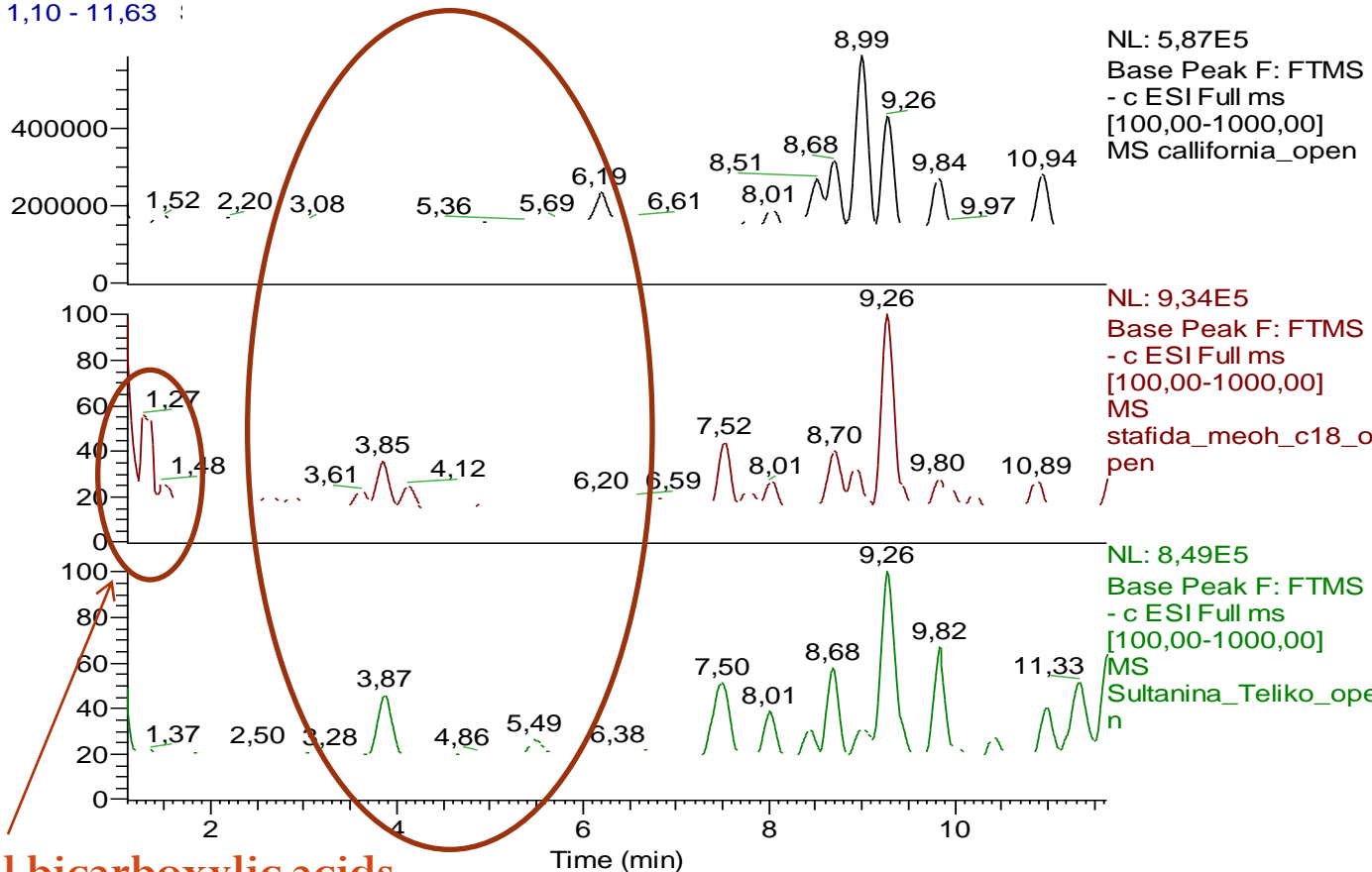
**Sultanina**

**C-18 unsaturated fatty acids**



## Benzoic acids region

RT: 1,10 - 11,63



California

Corinthian

Sultanina

Small bicarboxylic acids

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

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

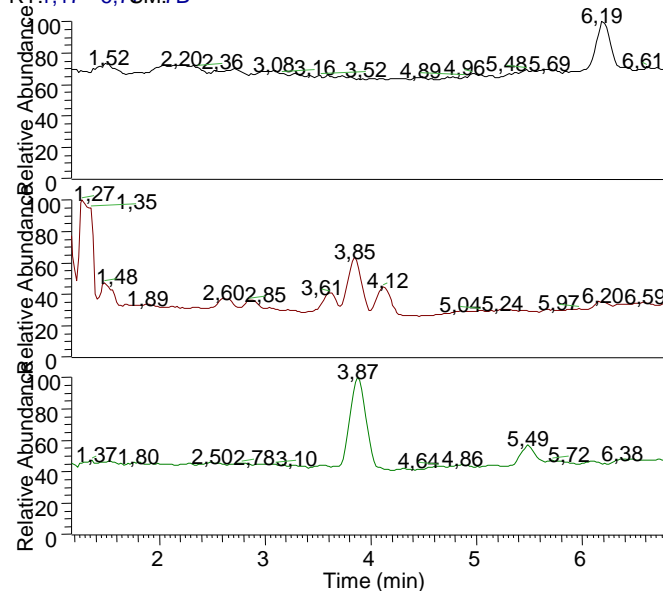
It can be found in initial material of Korinthiaki in small amounts.

**They are major constituents of Korinthiaki final product and protocatechuic acid glucoside in sultanina (final product).**



# The Benzoic acids region / small dicarboxylic acids

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



California

Corinthian

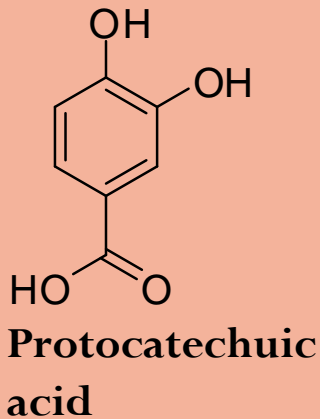
Sultanina

Rt 1.27 & 1.48 min  
Succinic acid,  
Malic acid

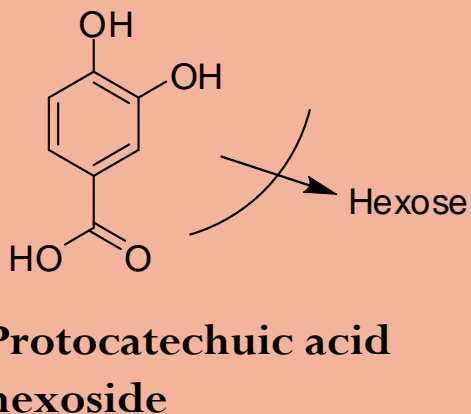
OC(=O)CCC(=O)O
OC(=O)C(O)CC(=O)O

Only present in Corinthian

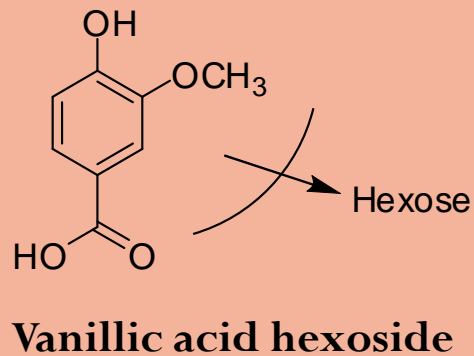
Rt 3.61min



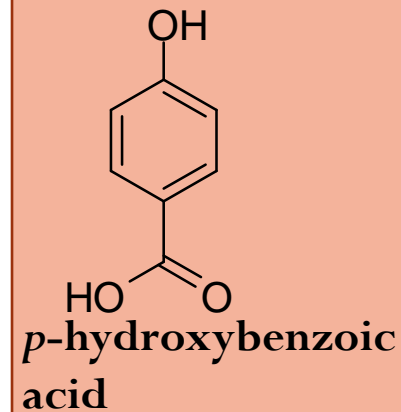
Rt 3.85min



Rt 4.12 min

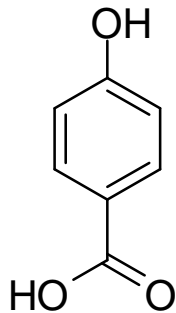
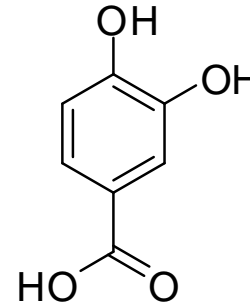


Rt 6.19min



**Protocatechuic acid:**

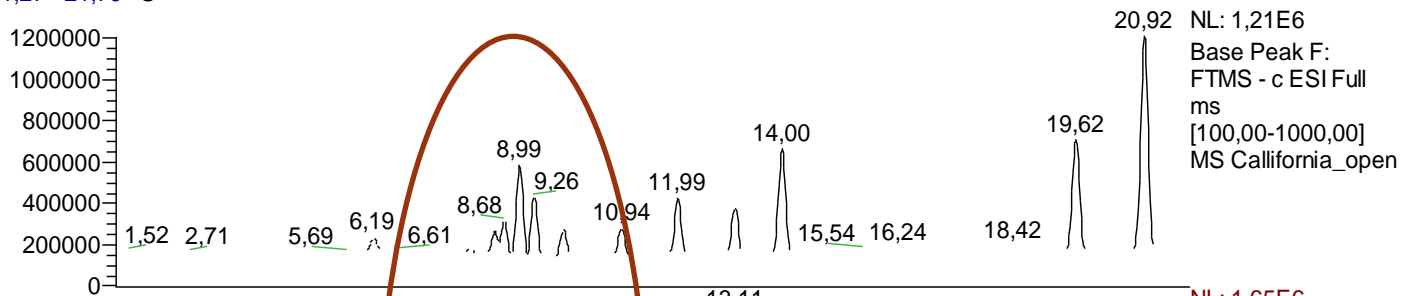
Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική και  
αντιφλεγμονώδη δράση,  
επάγει την απόπτωση *in vitro*



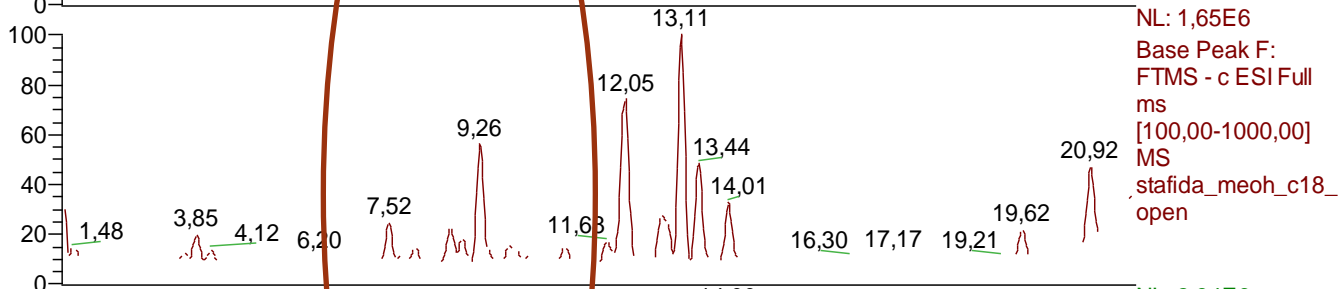
**p-hydroxybenzoic acid:** αντιοξειδωτικό

# Hydroxycinnamic acids/ Catechins/ ???Unidetified category

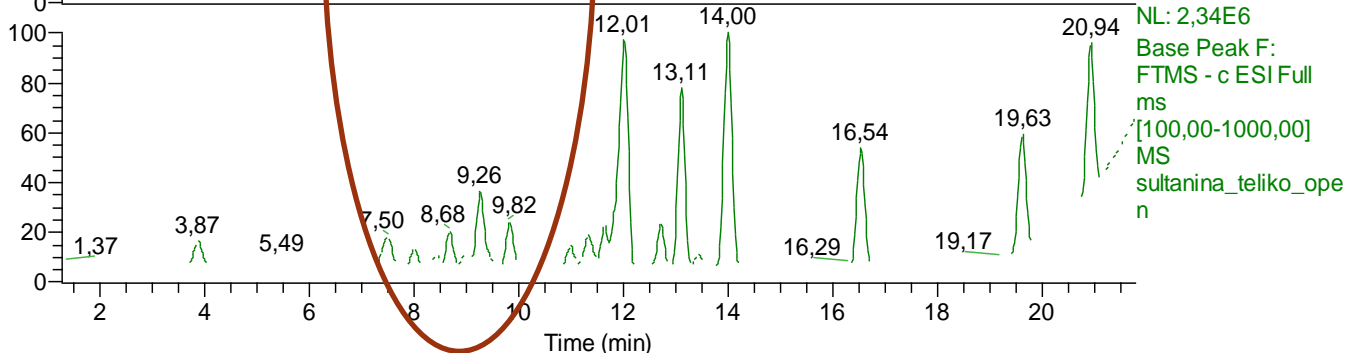
RT: 1,27 - 21,79 S



**California**



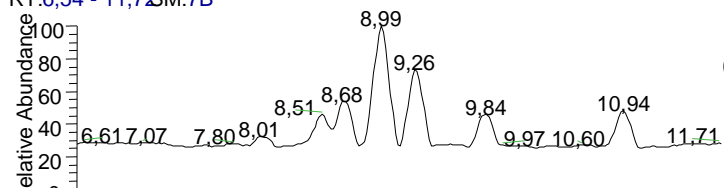
**Corinthian**



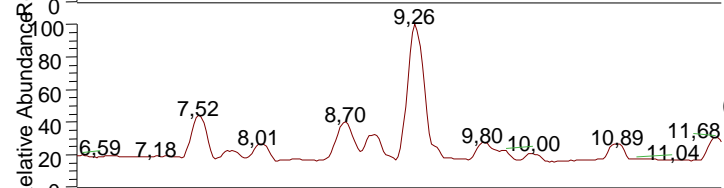
**Sultanina**

# Hydroxycinnamic acids/ Catechins

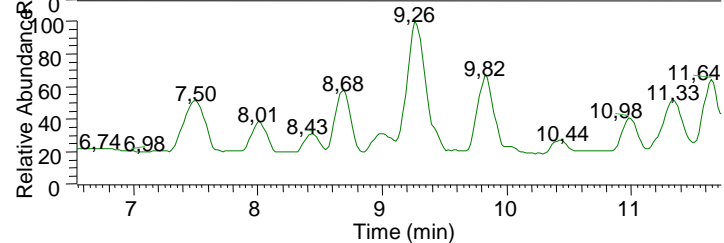
RT:6,54 - 11,72 SM:7B



California



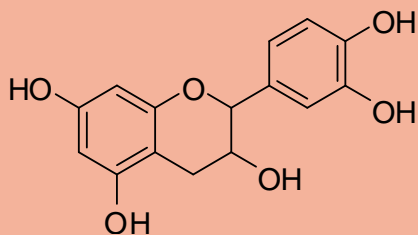
Corinthian



Sultanas

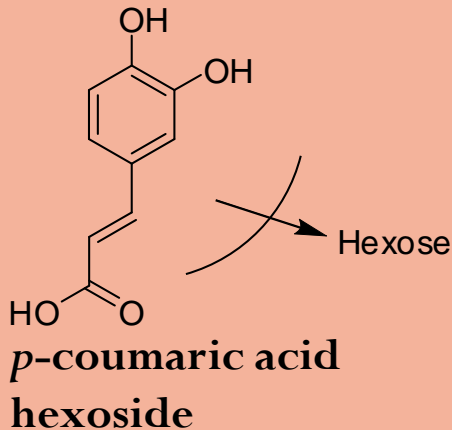
Some peaks of this region remain unidentified (Rts 8.70, 8.99 & 9.26 min)

Rt 7.52min



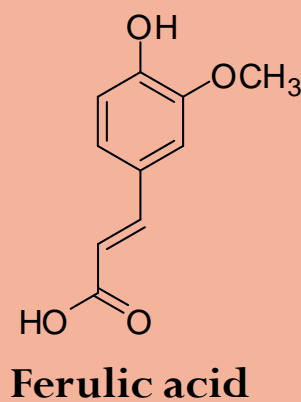
Catechin

Rt 8.01min



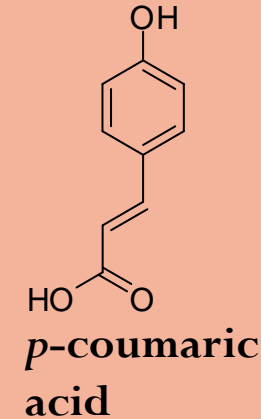
*p*-coumaric acid  
hexoside

Rt 9.03 min

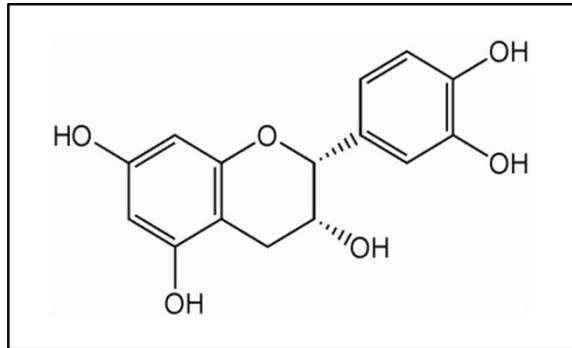


Ferulic acid

Rt 10.94min



*p*-coumaric acid

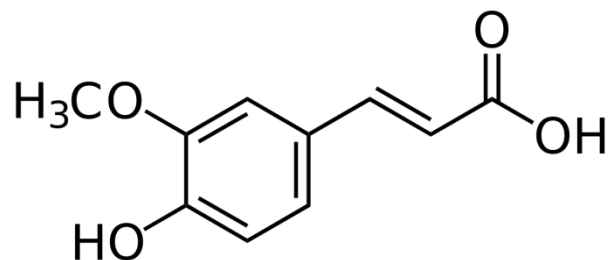


## **Κατεχίνες:**

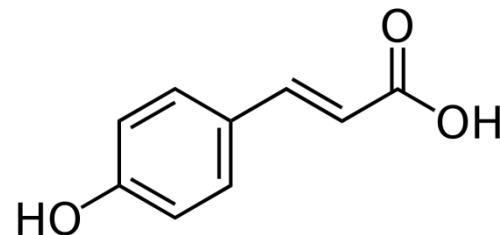
αντιοξειδωτικά παράγωγα με αντιμεταλλαξιογόνο δράση  
Σε φρούτα, λαχανικά, στο πράσινο τσάι και τον καφέ



## Ferulic acid



## *p*-Coumaric acid



Φαινολικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, είναι παράγωγα υδροξυκινναμικών οξέων.

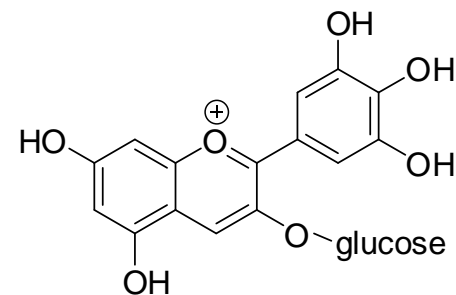
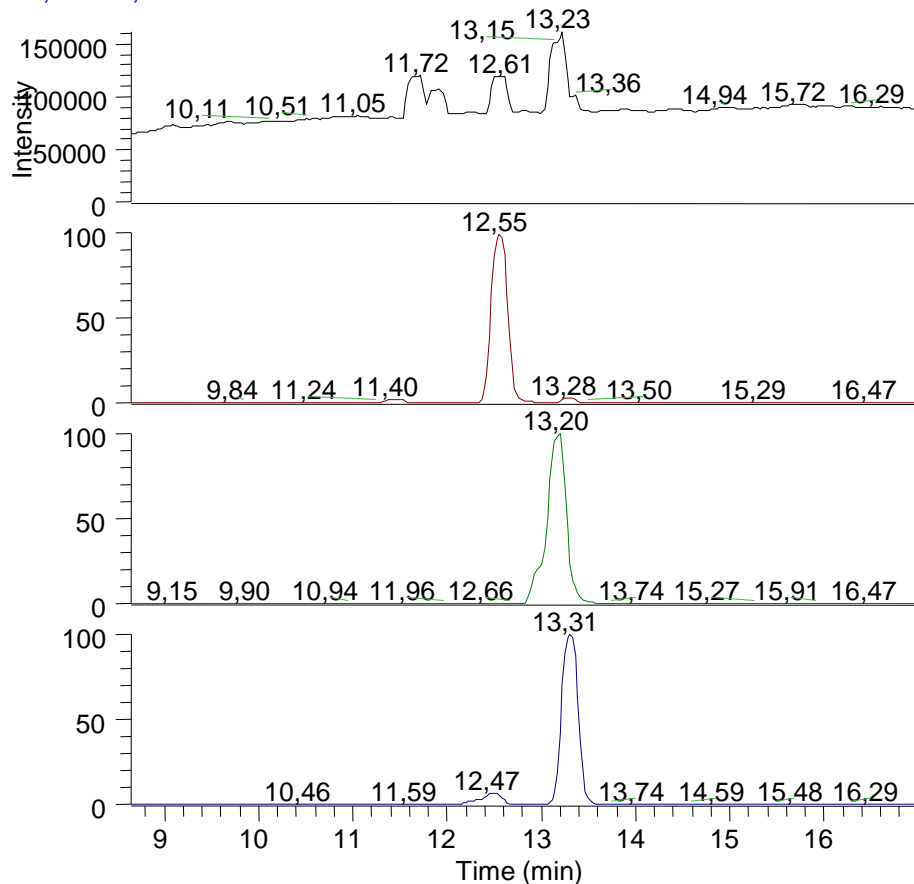
Εξουδετερώνουν τις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών (δραστικές μορφές οξυγόνου) που είναι μια από τις σημαντικότερες αιτίες της γήρανσης των κυττάρων: καταστρέφουν το κολλαγόνο και την ελασίνη του στηρικτικού ιστού

# Ειδικές εκχυλίσεις για ανάκτηση χρωστικών (ανθοκυανίνες)

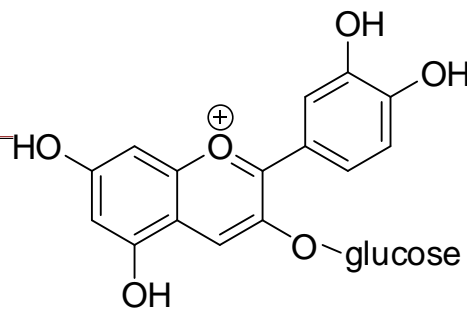
- Εκχύλιση με όξινη MeOH (HCl 0.01% v/v)
- Καθαρισμός σε SPE DSC-18 με χρήση H<sub>2</sub>O και MeOH (HCl 0,03% v/v). Απόδοση 0.56% (2.8mg κλάσματος χρωστικών από 500mg ποσότητας εκχυλίσματος)

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

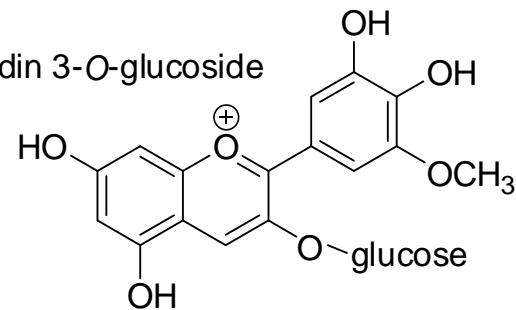
RT: 8,64 - 16,98 SM: 7B



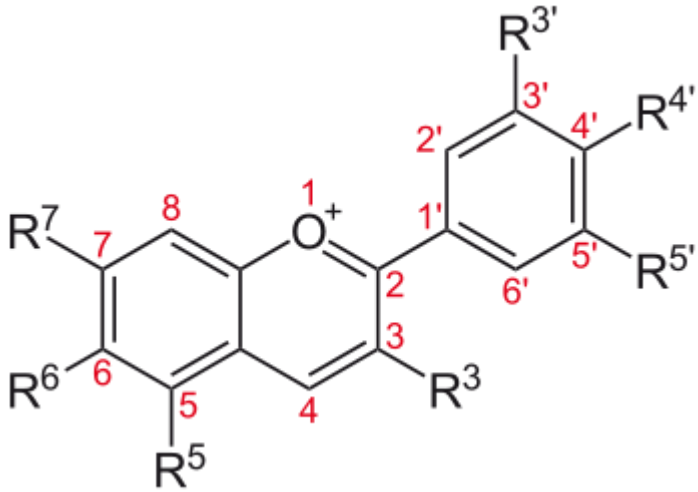
Delphinidin 3-O-glucoside



Cyanidin 3-O-glucoside



Petulidin 3-O-glucoside



## **Ανθοκυανιδίνες:**

φυσικές χρωστικές με ισχυρή  
αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη,  
καρδιοπροστατευτική  
και χημειοπροστατευτική δράση



## 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 καιμπφερόλης & κερκετίνης, φαινολικά οξέα και γλυκοσίδες τους & ανθοκυανίνες

- **Αντιοξειδωτική δράση: προστασία της LDL από οξείδωση –**
- **ελάττωση αποτιθέμενης χοληστερόλης στους ιστούς –**
- **μείωση αθηρωματικής πλάκας – μείωση κινδύνου καρδιοπαθειών**
- **Αντικαρκινική δράση (στο παχύ έντερο, απόπτωση καρκινικών κυττάρων)**
- **Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση**
- **Αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO**
- **Προστασία του DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές**

**Η μαύρη σταφίδα αποτελεί αναμφισβήτητα μία από τις σημαντικότερες Ελληνικές υπερτροφές (superfoods).**

**ένταξη της κορινθιακής σταφίδας στην καθημερινή διατροφή**

## Προοπτικές

- Βελτιστοποίηση πρωτόκολλου παραλαβής ανθοκυανινών
- Συγκριτική μελέτη των δειγμάτων ως προς τις περιεχόμενες χρωστικές
- Ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση όλων των συστατικών
- Σύγκριση με άλλα αντίστοιχα προϊόντα «berries”
- Παραγωγή βιοδραστικών εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα της σταφίδας.



**Acknowledgements:** “CAPTAIN VASSILIS FOUNDATION” & “PAPADIMITRIOU S.A.” for the financial support of the project