

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΣΤΑΦΥΛΗΣ ΣΤΑ ΤΡΙΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ
ΑΠΟΣΤΑΞΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR**



Όνομα φοιτήτριας:
Κοντούδη Μαρκέλλα

Επιβλέπων καθηγητής:
Απόστολος Σπύρος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ NMR – ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Απόστολο Σπύρο, για την ανάθεση του θέματος, καθώς και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την κ. Αμαργιανιτάκη Μαρία, για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας, αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα.

Θερμό ευχαριστώ οφείλω επίσης και στα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, που ο καθένας ξεχωριστά συνέβαλε με τον δικό του τρόπο στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τον εργαστηριακό εξοπλισμό που μου διέθεσε, καθώς και τους αποσταγματοποιούς για την προμήθεια δειγμάτων αποστάγματος στεμφύλων σταφύλης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας, ήταν ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύστασης στα τρία κλάσματα της απόσταξης ("κεφαλή", "καρδιά", "ουρά"), σε αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης που προέρχονται από παραγωγούς της Κρήτης. Επίσης, σημαντικό μέρος αυτής της έρευνας ήταν η σύγκριση των συγκεντρώσεων των ενώσεων μεταξύ των τριών κλασμάτων, για να προσδιοριστεί σε πιο κλάσμα η κάθε ένωση βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και γιατί.

Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας NMR, κυρίως μιας διάστασης και πιο συγκεκριμένα με τη χρήση πυρήνα ^1H NMR. Πρόκειται για μια μέθοδο που είναι αρκετά απλή και γρήγορη και βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς. Επίσης, έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ένα μεγάλο αριθμό συστατικών χαμηλής μοριακής μάζας, όπως αυτό των αποσταγμάτων στεμφύλων.

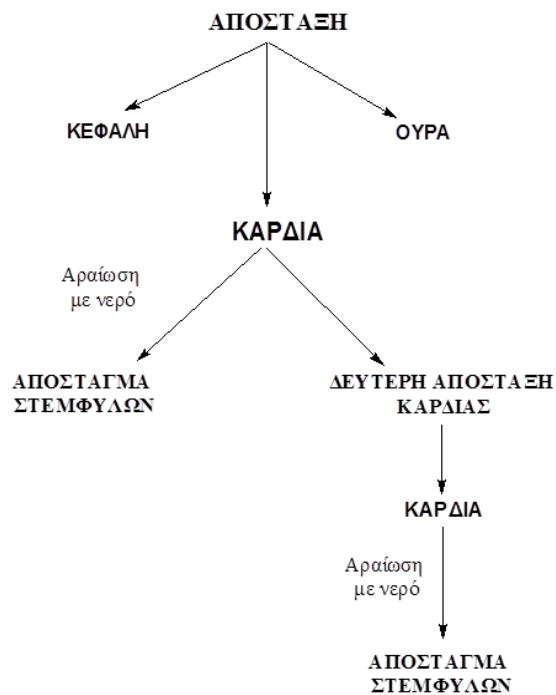
Κατά την επεξεργασία των φασμάτων με το κατάλληλο λογισμικό, έγινε η ανάθεση των κορυφών, έπειτα η ολοκλήρωσή τους και, τέλος, η ποσοτικοποίηση αυτών, σε κάθε κλάσμα της απόσταξης, για να γίνει η σύγκριση. Στην συνέχεια, ακολούθησε στατιστική ανάλυση των δειγμάτων, με τη χρήση του μοντέλου PCA, το οποίο απεικονίζει οποιαδήποτε σχέση μεταξύ των δειγμάτων, και του μοντέλου OPLS-DA, το οποίο αποτελεί προέκταση του PCA. Τέλος, οι συγκεντρώσεις των ενώσεων ελέγχθηκαν για το αν είναι σε συμφωνία με τα κοινά αποδεκτά όρια σύμφωνα με την Νομοθεσία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|--------|
| 1. Εισαγωγή | σελ:4 |
| 2. Νομοθεσία για το απόσταγμα στεμφύλων σταφύλης | σελ:7 |
| 3. Θεωρία NMR | σελ:8 |
| 3.1. Εφαρμογές NMR | σελ:9 |
| 3.2. Επιλογή τεχνικής NMR | σελ:9 |
| 4. Σκοπός πτυχιακής | σελ:10 |
| 5. Πειραματικό μέρος | σελ:11 |
| 6. Αποτελέσματα | σελ:13 |
| 6.1. Ανάλυση μονοδιάστατων φασμάτων ^1H NMR | σελ:13 |
| 6.2. Ανάλυση δυσδιάστατων φασμάτων ^1H NMR | σελ:17 |
| 6.3. Ταυτοποίηση χημικών μετατοπίσεων αποστάγματος σε D_2O -TSP..... | σελ:19 |
| 6.4. Ποσοτικοποίηση των χημικών ενώσεων | σελ:24 |
| 6.5. Σχολιασμός των συγκεντρώσεων των χημικών ενώσεων στα τρία κλάσματα της απόσταξης | σελ:26 |
| 6.6. Σύγκριση φασμάτων πιο αναλυτικά | σελ:28 |
| 6.7. Στατιστική ανάλυση των φασμάτων | σελ:31 |
| 7. Συμπεράσματα | σελ:35 |
| 8. Παράρτημα | σελ:36 |
| 8.1. Φάσματα που λήφθηκαν κατά την διάρκεια της έρευνας | σελ:36 |
| 8.2. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων | σελ:41 |
| 9. Βιβλιογραφία | σελ:43 |

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ονομασία "**ρακί**" χρησιμοποιείται για το απόσταγμα στεμφύλων που προέρχονται από το νησί της Κρήτης, ενώ η ονομασία "τσίπουρο" για το απόσταγμα στεμφύλων που παράγεται στην Ηπειρωτική Ελλάδα. Το αλκοολούχο αυτό ποτό, λαμβάνεται με απόσταξη ζυμωμένων στεμφύλων σταφύλης, που προκύπτουν από την πίεση των σταφυλιών κατά την οινοποίηση, με ή χωρίς την προσθήκη οινολάσπης σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο από 25% κατά βάρος (EC 1990). Πρόσφατα, σε ορισμένες περιοχές αμπελουργίας τα αλκοολούχα ποτά έχουν αναγνωρισθεί ως προϊόντα Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ονομασίας (παράρτημα III, του κανονισμού [ΕΚ] αριθ 110/2008).



Εικόνα 1: Πορεία απόσταξης

Αφού ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση και εκτιμηθεί ότι έχει αναπτυχθεί το επιθυμητό άρωμα, ακολουθεί η διαδικασία της απόσταξης, η οποία πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν αμέσως μετά το τέλος της ζύμωσης. Η απόσταξη είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται με αργό ρυθμό ώστε να αποφεύγεται η τυχόν θερμική αποικοδόμηση του τελικού προϊόντος. Η διαδικασία της απόσταξης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε άμβυκα συνεχούς λειτουργίας, ή σε στήλη συνεχούς απόσταξης. Τα ζυμωμένα στέμφυλα μέσα στους άμβυκες αραιώνονται με νερό και στη συνέχεια θερμαίνονται με τη χρήση καυστήρα ή με υπερκορεσμένο ατμό, προκαλώντας εξάτμιση. Οι ατμοί συμπυκνώνονται σε ψυκτήρα και το απόσταγμα συλλέγεται σε τρία διαδοχικά κλάσματα: την "**κεφαλή**", την "**καρδιά**" και την "**ουρά**" αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη μελέτη θα πραγματοποιηθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός και στα 3 κλάσματα της απόσταξης.

“Κεφαλή”: Έτσι ονομάζεται το πρώτο κλάσμα, που βγαίνει από τον ψυκτήρα, έχει τους υψηλότερους βαθμούς, αλλά συνοδεύεται και από ουσίες που δεν είναι ευχάριστες στην γεύση. Τέτοιες, είναι κυρίως η μεθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακεταλδεΐδη κλπ. Γι αυτό το λόγο, συνίσταται η συγκέντρωσή του κλάσματος χωριστά, η ρίψη στο επόμενο βράσιμο και τέλος η απόρριψή του. Ο διαχωρισμός της κεφαλής δεν γίνεται παρά μόνο από συνειδητοποιημένους παραγωγούς που προτιμούν την ποιότητα από το κέρδος. Η ποσότητα της κεφαλής που πρέπει να κρατηθεί, εξαρτάται από την ποιότητα της πρώτης ύλης (π.χ περισσότερο αν υπάρχει πολύς οξικός αιθυλεστέρας) και την εμπειρία του αποσταγματοποιού.

“Καρδιά”: Η μεσαία και μεγαλύτερη χρονικά και ποσοτικά φάση της απόσταξης. Το κλάσμα που βγαίνει είναι το καλύτερο ποιοτικά. Η καρδιά, περιέχει τα πολύτιμα πτητικά συστατικά του γλεύκους, που χαρακτηρίζουν την ποιότητα και την αξία του αποστάγματος. Η ποσότητα σε αιθανόλη, ελαττώνεται αλλά με αργό ρυθμό και συνοδεύεται από ουσίες, που αρχίζουν να αποστάζουν αργότερα.

“Ουρά”: Το τελευταίο κλάσμα της απόσταξης. Μπορεί να ελεγχθεί με το γραδόμετρο και να απορριφθεί (ή να μεταφερθεί στο επόμενο βράσιμο). Περιέχει την επικίνδυνη μεθανόλη και έλαια με δυσάρεστες μυρωδιές. Ανάλογα πάλι με τη σχέση ποιότητας και οικονομίας, οι αποσταγματοποιοί το κόβουν στα 33-40% vol.

Όσον αφορά τη **σύσταση των αποσταγμάτων** γενικά, ένα απόσταγμα στεμφύλων είναι ένα υδροαλκοολικό διάλυμα, που περιέχει εκτός από την αιθυλική αλκοόλη και διάφορα άλλα συστατικά, τα οποία συναποστάζουν με την αλκοόλη κατά τη διάρκεια της απόσταξης (Mac Namara, 1984). Τα συστατικά αυτά είναι:

▪ **Αλκοόλες**

Η κύρια αλκοόλη που παρουσιάζεται και συμβάλλει τόσο στην γεύση όσο και στο άρωμα αυτών, αποτελεί η *αιθυλική αλκοόλη* και βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία μετά το νερό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει επίσης η *μεθυλική αλκοόλη*. Η ίδια η μεθανόλη δεν είναι τοξική, όμως πολύ τοξικά είναι τα προϊόντα διάσπασής της. Πηγή της μεθανόλης, αποτελεί το σταφύλι και δεν παράγεται κατά την ζύμωση όπως οι άλλες αλκοόλες. Ωστόσο, σημαντικότερες θεωρούνται οι *ανώτερες* (3 άτομα C έως 6 άτομα C), οι οποίες επηρεάζουν κατά πολύ το άρωμα, όπως η 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, 1-προπανόλη. Οι περισσότερες ανώτερες αλκοόλες, είναι υποπροϊόντα των ζυμών και των βακτηρίων.

▪ **Αλδεΐδες**

Κύρια αλδεΐδη, θεωρείται η *ακεταλδεΐδη*, η οποία είναι τοξική και σχηματίζεται από την οξείδωση της αιθυλικής αλκοόλης, κατά την αλκοολική ζύμωση. Η ύπαρξη μεγάλων συγκεντρώσεων στα αποστάγματα, θεωρείται ως ένδειξη οξείδωσης ή ανεπιθύμητης μόλυνσης από βακτήρια.

▪ **Εστέρες**

Εμφανίζονται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση και αποτελούν το δευτερογενές άρωμα. Ορισμένοι απ αυτούς, είναι ο *οξικός αιθυλεστέρας* και ο *γαλακτικός αιθυλεστέρας*.

▪ **Πτητικά οξέα**

Τα οξέα αυτά, σχηματίζονται ως δευτερογενή προϊόντα κατά την αλκοολική ζύμωση. Ένας μικρός αριθμός από σταθερά οξέα που υπάρχουν στο τσίπουρο, προέρχονται από τον οίνο και τα στέμφυλα, που παρασύρθηκαν κατά την απόσταξη από το ρεύμα των ατμών.

2.ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΣΤΑΦΥΛΗΣ

Το 1989 σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή κοινοτική Νομοθεσία (Καν. 1576/1989) αναγνωρίστηκε η ονομασία «Τσίπουρο» και «Τσικουδιά». Σύμφωνα με τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) αριθ. 110/2008:

α) Απόσταγμα στεμφύλων σταφυλής είναι το αλκοολούχο ποτό το οποίο:

- ✓ Λαμβάνεται με ζύμωση και απόσταξη στεμφύλων σταφυλής, είτε απευθείας με υδρατμούς, είτε ύστερα από προσθήκη νερού, στο οποίο μπορεί να προστεθεί οινολάσπη σε καθορισμένη αναλογία. Η απόσταξη γίνεται με τα στέμφυλα μέσα στον άμβυκα, σε λιγότερο από 86% vol και στον ίδιο βαθμό επιτρέπεται και η επαναπόσταξη.
- ✓ Η ποιότητα της προερχόμενης από την οινολάσπη αλκοόλης, δεν μπορεί να υπερβαίνει το 35% vol, της συνολικής ποσότητας αλκοόλης που περιέχει το τελικό προϊόν.

β) Έχει περιεκτικότητα σε πτητικές ουσίες ίση ή ανώτερη των 140gr/hl αλκοόλης σε 100% vol, μέγιστη περιεκτικότητα σε μεθανόλη 1000gr/hl αλκοόλης σε 100% vol και μέγιστη περιεκτικότητα σε ακεταλδεΐδη 500gr/hl αλκοόλης σε 100% vol..

γ) Ως ελάχιστος κατ' όγκο αλκοολικός τίτλος του αποστάγματος ορίζεται το 37,5 % vol.

δ) Δεν μπορεί να προστίθεται αλκοόλη αραιωμένη ή μη.

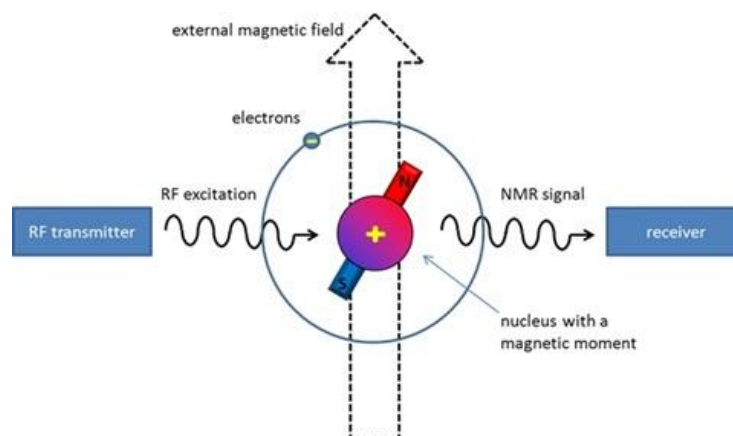
ε) Το απόσταγμα στεμφύλων σταφυλής δεν μπορεί να αρωματίζεται. Αυτό δεν αποκλείει τις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής.

3.ΘΕΩΡΙΑ NMR

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο, στο οποίο οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο, απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού που εξαρτάται, από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισότοπου των ατόμων. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, αρχικά περιγράφηκε και μετρήθηκε σε μοριακές δέσμες από τον Isidor Rabi το 1938. Αργότερα το 1946, οι Felix Bloch και Edward Mills Purcell, επέκτειναν την τεχνική ώστε να χρησιμοποιηθεί σε υγρά και στερεά.



Γενικά η φασματοσκοπία NMR εφαρμόζεται σε οποιοδήποτε δείγμα περιέχει μόρια με πυρήνα, με περιττό αριθμό νουκλεονίων. Οι πυρήνες που μελετούνται συνήθως είναι ^1H και ^{13}C . Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των πυρήνων βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων και έχει συχνότητα $3 \times 10^6 - 3 \times 10^8$ Hz.



Ανάλογα με το είδος του μορίου που μελετάται, χρησιμοποιείται και διαφορετική τεχνική φάσματος όπως 1-D, 2-D, 3-D. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς, στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων, ενώ η τεχνική NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών.

3.1 Εφαρμογές NMR

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για τη σαφή ταυτοποίηση γνωστών και καινοτόμων ενώσεων καθώς και την επιβεβαίωση της ταυτότητας των συντιθέμενων νέων ενώσεων. Η ταυτοποίηση των ενώσεων επιτυγχάνεται μελετώντας τις κορυφές των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως:

- ✓ Στην ιατρική, καθώς με την μαγνητική τομογραφία (MRI), υπάρχει η δυνατότητα απεικόνισης του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος, χωρίς να υπάρχουν τομές και επικίνδυνη ακτινοβολία.
- ✓ Στην ανάλυση τροφίμων, όπως τον έλεγχο παλαιότητας του οίνου, την μελέτη μηχανισμών αλλοίωσης τροφίμων κλπ.
- ✓ Σε περιβαλλοντικές εφαρμογές, για τη μελέτη περιβαλλοντικών προβλημάτων τόσο του αέρα όσο και του υπεδάφους.

3.2 Επιλογή τεχνικής NMR

- I. Ανάλυση δειγμάτων χωρίς καταστροφή του δείγματος
- II. Μικρός χρόνος ανάλυσης
- III. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση
- IV. Ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού συστατικών χαμηλής μοριακής μάζας, όπως αυτό των αποσταγμάτων στεμφύλων

4.ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας, είναι ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύστασης, στα τρία κλάσματα της απόσταξης (“κεφαλή”, “καρδιά”, “ουρά”), σε αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης (χύμα), που προέρχονται από παραγωγούς της Κρήτης. Και τα τρία κλάσματα, περιέχουν της ίδιες ενώσεις, όμως σε διαφορετική συγκέντρωση το καθένα. Γι αυτό το λόγο, σημαντικό μέρος αυτής της έρευνας, αποτελεί και η σύγκριση των συγκεντρώσεων των ενώσεων, μεταξύ των τριών κλασμάτων της απόσταξης, για να προσδιοριστεί, σε πιο κλάσμα η κάθε ένωση, βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και γιατί. Οι παραπάνω διαδικασίες, πραγματοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας NMR, κυρίως μιας διάστασης και πιο συγκεκριμένα με τη χρήση πυρήνα ^1H NMR.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

❖ Τα δείγματα

Η παρούσα έρευνα, περιλαμβάνει την μελέτη οκτώ σειρών δειγμάτων αποσταγμάτων στεμφύλων σταφύλης. Η καθεμία σειρά, αποτελούνταν από τα αποστάγματα της “κεφαλής”, της “καρδιάς” και της “ουράς”, τα οποία προέρχονταν από παραγωγούς της Κρήτης.

❖ Προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη φασμάτων

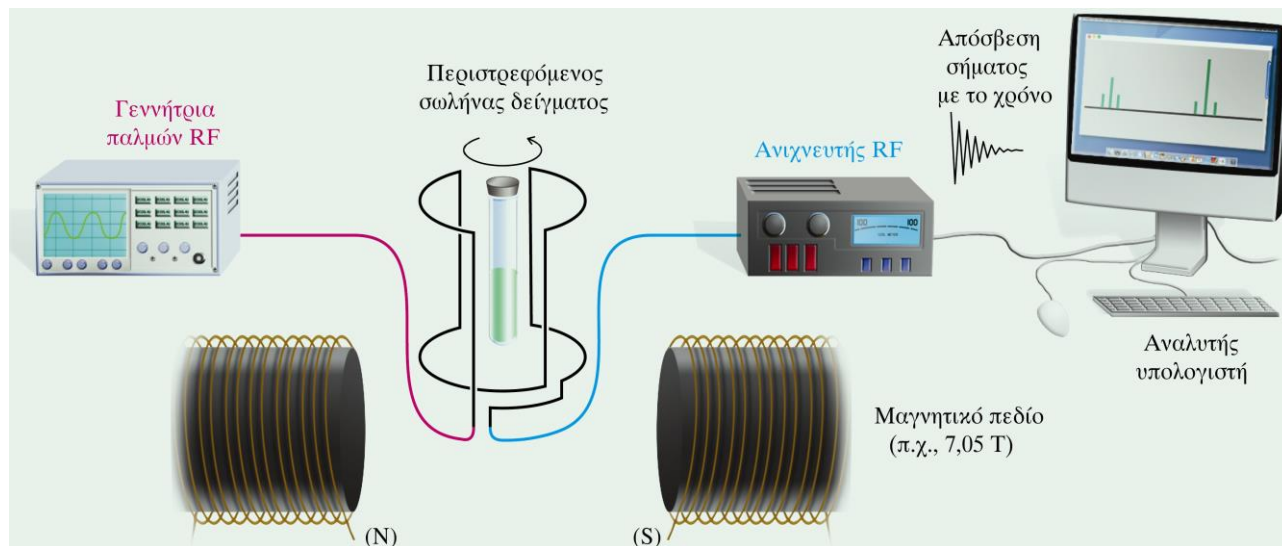
Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων, ήταν αρκετά απλή και γρήγορη, καθώς το μόνο που χρειαζόταν κάθε φορά, ήταν 600ml του εκάστοτε αποστάγματος και 100ml D₂O. Το D₂O περιείχε την πρότυπη ουσία TSP [3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetra deuteriopropionic acid] 0,05 wt%. Τα δύο αυτά αντιδραστήρια, μεταφέρονταν σε NMR tube και στην συνέχεια ακολουθούσε ανάδευση για την ομογενοποίηση του διαλύματος.



Εικόνα 1: Προετοιμασία δειγμάτων

❖ Λήψη φασμάτων

Η λήψη των φασμάτων, πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού *Brüker Avance III, 500 MHz*. Μετά τον μετασχηματισμό *Fourier* (με τον οποίο διεγείρονται όλες οι μεταπτώσεις NMR των απλών κβάντων), ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction). Η κλίμακα στο κάτω μέρος του φάσματος, υποδηλώνει τη χημική μετατόπιση δ των σημάτων ¹H NMR από το πρότυπο διάλυμα (TSP), το οποίο εμφανίζεται πάντα σε χημική μετατόπιση δ 0,0 ppm. Τέλος, κατά την επεξεργασία των φασμάτων, ολοκληρώθηκαν οι κορυφές στις οποίες έγινε η ανάθεση. Όλα τα φάσματα λήφθηκαν κάτω από ακριβώς ίδιες συνθήκες, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των κορυφών τους.



Εικόνα 2: Καταγραφή ενός φάσματος NMR

6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, προέκυψαν από την ανάλυση φασμάτων 1D και 2D NMR, καθώς και από την στατιστική τους ανάλυση .

Φάσματα 1D: ^1H

Φάσματα 2D: gCOSY

Στατιστική ανάλυση: PCA και OPLC-DA

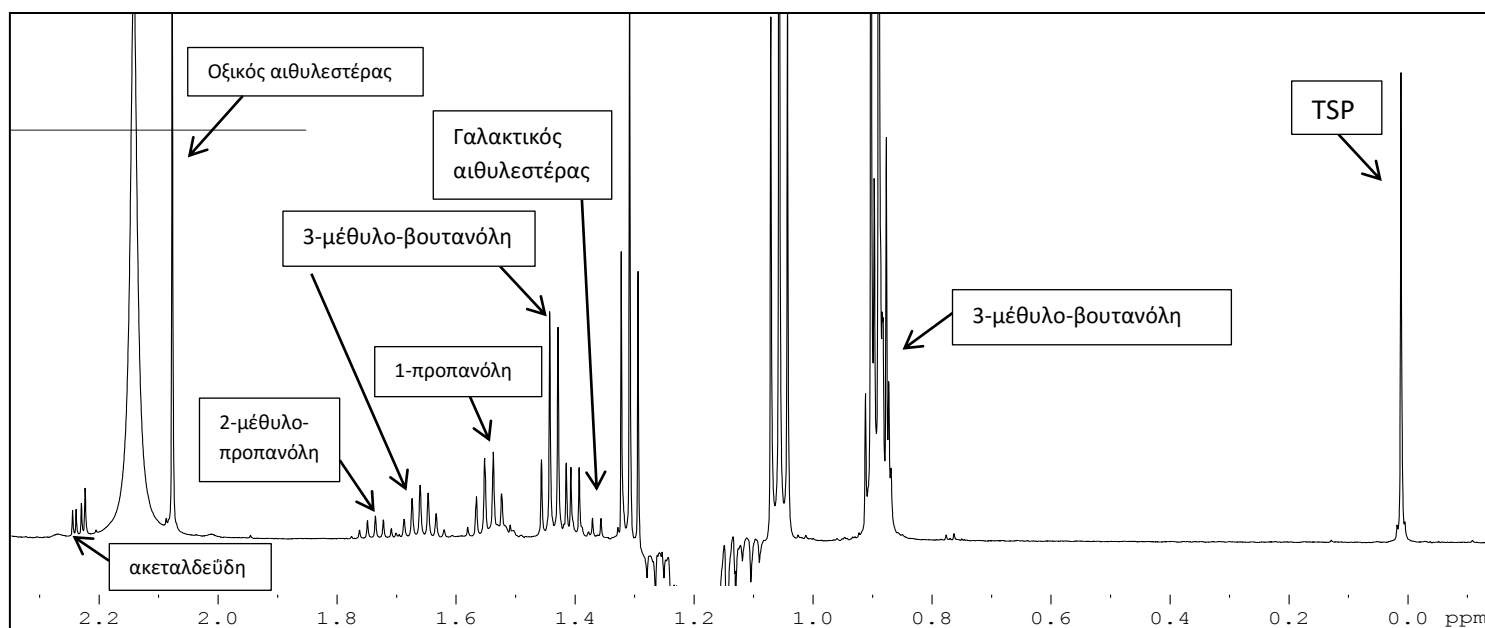
6.1 Ανάλυση μονοδιάστατων φασμάτων (1D) ^1H NMR

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1), παρουσιάζονται οι ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στο απόσταγμα στεμφύλων σταφύλης, καθώς και οι χημικές τους μετατοπίσεις. Σύμφωνα με την ανάλυση του φάσματος ^1H NMR, ταυτοποιήθηκαν 11 κορυφές, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω.

Πίνακας 1 : Χημικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα φάσματα και οι χημικές μετατοπίσεις τους

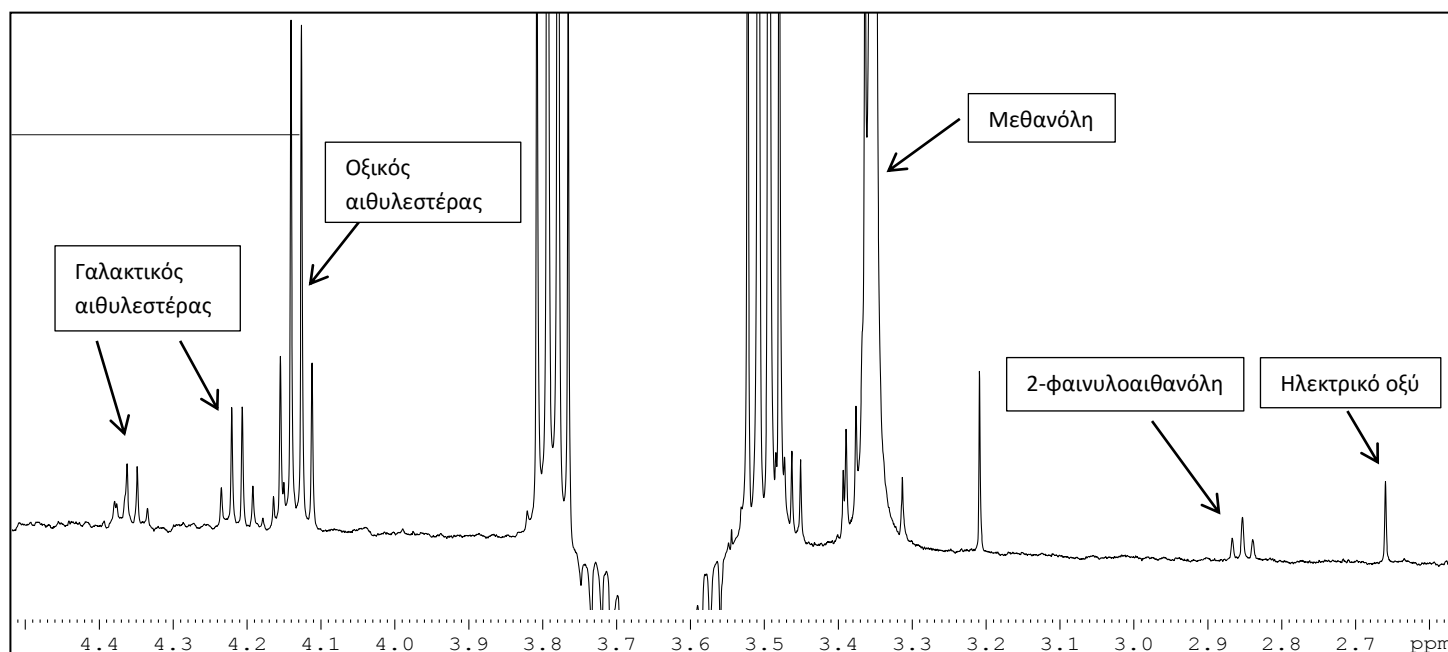
| Χημική μετατόπιση δ (ppm) | Χημικές ενώσεις |
|--|-------------------------|
| 1,53 | 1-προπανόλη |
| 0,88 / 1,42 / 1,65 | Ισοπεντανόλη |
| 1,72 | 2-μέθυλο προπανόλη |
| 2,2 / 9,7 | Ακεταλδεΐδη |
| 2,6 | ηλεκτρικό οξύ |
| 2,83 / 7,3 | 2-φαινυλοαιθανόλη |
| 3,35 | Μεθανόλη |
| 2,06 / 4,12 | Οξικός αιθυλεστέρας |
| 1,38 / 4,2 / 4,3 | Γαλακτικός αιθυλεστέρας |
| 1,17 / 3,65 | Αιθανόλη |
| 4,8 | Νερό |

Το παρακάτω φάσμα, αντιπροσωπεύει το πρώτο κλάσμα της απόσταξης (όλα τα φάσματα και στα 3 κλάσματα της απόσταξης είχαν την ίδια μορφή), το οποίο λήφθηκε με ακολουθία παλμών WET 1D, έτσι ώστε να καταστέλλονται οι κορυφές της αιθανόλης και του νερού, για να είναι ευδιάκριτες ακόμα και οι μικρές ενώσεις.



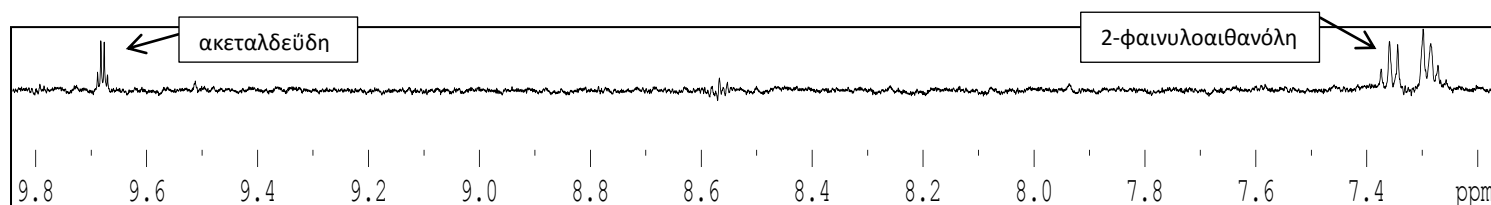
Φάσμα 1.1: Φάσμα ^1H NMR – περιοχή κορεσμένων και αλλυλικών πρωτονίων

Στο φάσμα 1.1 (0 ppm – 2,2 ppm), παρουσιάζονται οι κορυφές των κορεσμένων και αλλυλικών πρωτονίων. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή των 1,42 ppm και 1,65 ppm περίπου, διακρίνονται οι πολλαπλές κορυφές της 3-μεθυλοβουτανόλης, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται και στα 0,88 ppm, εμφανίζεται η διπλή κορυφή της 3-μεθυλοβουτανόλης. Στην συνέχεια στα 1,38 ppm, φαίνεται η διπλή κορυφή του γαλακτικού αιθυλεστέρα, ενώ στα 1,53 ppm και στα 1,72 ppm, εμφανίζονται οι κορυφές της 1-προπανόλης και της 2-μεθυλοπροπανόλης αντίστοιχα. Στα 2,06 ppm, παρατηρείται μια απλή κορυφή, η οποία οφείλεται στον οξικό αιθυλεστέρα και στα 2,2 ppm μια διπλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στην ακεταλδεΐδη.



Φάσμα 1.2: Φάσμα ^1H NMR – περιοχή πρωτονίων που βρίσκονται δίπλα σε άνθρακα με ηλεκτραρνητικά άτομα

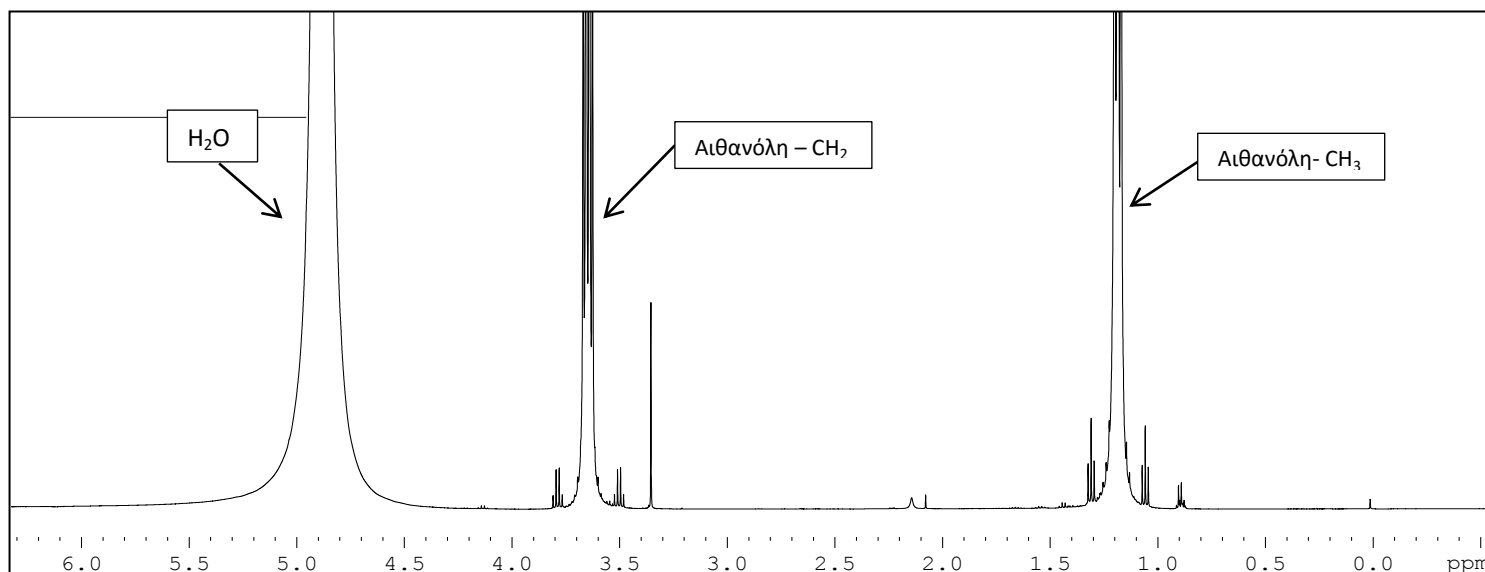
Στο φάσμα 1.2 (2,6 ppm – 4,5 ppm), παρουσιάζεται η περιοχή των πρωτονίων που βρίσκονται δίπλα σε άνθρακα με ηλεκτραρνητικά άτομα. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή των 2,6 ppm περίπου, φαίνεται η ευδιάκριτη απλή κορυφή του ηλεκτρικού οξέος. Έπειτα, στα 2,83 ppm, διακρίνεται η τριπλή κορυφή της 2 φαινυλοαιθανόλης. Στην συνέχεια, η απλή κορυφή της μεθανόλης, παρατηρείται περίπου στα 3,35 ppm, ενώ στα 4,12 ppm, εμφανίζεται η τετραπλή κορυφή του οξικού αιθυλεστέρα. Τέλος, οι δύο τετραπλές κορυφές στα 4,2 ppm και 4,3 ppm, οφείλονται στον γαλακτικό αιθυλεστέρα.



Φάσμα 1.3: Φάσμα ^1H NMR – περιοχή αρωματικών και βινυλικών πρωτονίων

Στο φάσμα 1.3 (7,3 ppm – 9,7 ppm), παρουσιάζεται η περιοχή των αρωματικών και των βινυλικών πρωτονίων. Στα 7,3 ppm, εμφανίζεται η πολλαπλή κορυφή της 2-φαινυλοαιθανόλης, ενώ στα 9,7 ppm περίπου, φαίνεται η τετραπλή κορυφή της ακεταλδεΰδης.

Το παρακάτω φάσμα, είναι ένα φάσμα zg30 και αντιπροσωπεύει το πρώτο κλάσμα της απόσταξης όπως και στο προηγούμενο. Σ αυτό το φάσμα, φαίνονται οι κορυφές της αιθανόλης και του νερού, καθώς αυτές δεν έχουν κατασταλεί.



Φάσμα 2: Φάσμα ¹H NMR – κορυφές αιθανόλης και νερού

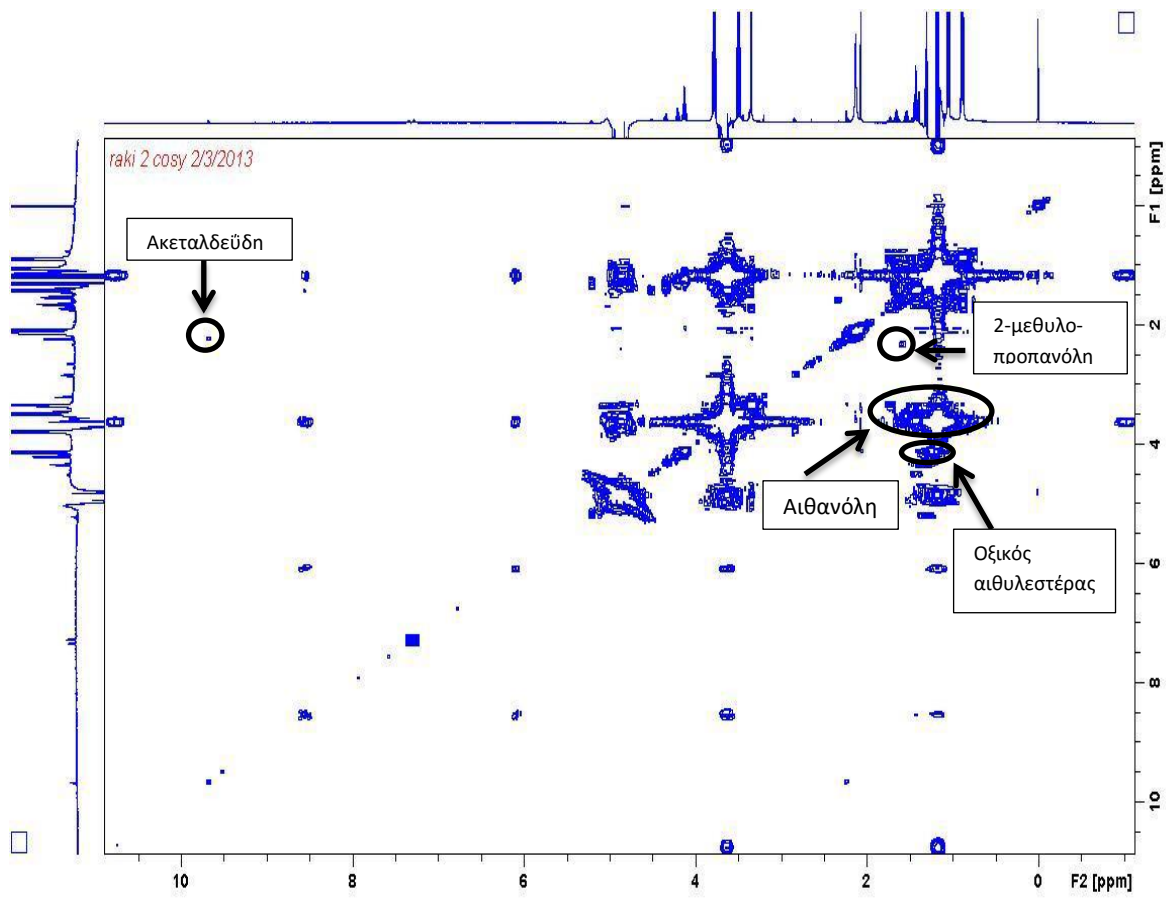
Στο φάσμα 2, φαίνονται οι κορυφές της αιθανόλης και του νερού. Πιο συγκεκριμένα, στα 1,17 ppm περίπου, διακρίνεται η τριπλή κορυφή της αιθανόλης, ενώ στα 3,65 ppm, εμφανίζεται η τετραπλή κορυφή της αιθανόλης. Τέλος, στα 4,8 ppm περίπου, φαίνεται η απλή κορυφή του νερού. Σ' αυτό το φάσμα, παρατηρείται ότι οι κορυφές έχουν μεγαλύτερη ένταση και αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι η αιθανόλη και το νερό, βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στα αποστάγματα.

6.2 Ανάλυση δυσδιάστατων φασμάτων (2D) NMR, ^1H - ^1H COSY NMR

Στο φάσμα 2D NMR, γίνεται καταγραφή μαγνητικών πληροφοριών σε δύο διαστάσεις. Στη μία διάσταση, καταγράφονται συνήθως οι απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα μιας ουσίας και στην άλλη διάσταση οι σταθερές σύζευξης ή απορρόφησης άλλων πυρήνων, που αλληλεπιδρούν ή συσχετίζονται με τους πυρήνες της πρώτης διάστασης. Το τελικό φάσμα 2D NMR, δίνει την εικόνα δύο διαστάσεων με εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παράσταση των συμμετρικών συσχετισμών των διαφόρων πυρήνων της ουσίας μέσα στο τρισδιάστατο χώρο.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ένα δυσδιάστατο φάσμα 2D NMR, ^1H - ^1H COSY (COrelated Spectroscopy) NMR, στο οποίο αναπαριστώνται οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων των ενώσεων και έτσι επαληθεύεται η ανάθεση κορυφών που πραγματοποιήθηκε στο μονοδιάστατο φάσμα. Στη διαγώνιο, φαίνονται τα πρωτόνια του μονοδιάστατου φάσματος. Οι συμμετρικές κορυφές εκτός διαγωνίου, σημαίνουν ότι οι πυρήνες αυτοί συζευγνύονται και όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των διασταυρούμενων κορυφών, τόσο μεγαλύτερη είναι και η σύζευξη.

Στο παρακάτω φάσμα (φάσμα 3), φαίνονται κάποιες ευδιάκριτες συζεύξεις, οι οποίες βοηθούν στην ανάθεση ορισμένων κορυφών στα μονοδιάστατα φάσματα. Πιο συγκεκριμένα, στα 1,17 ppm - 3,65 ppm, παρατηρείται η σύζευξη των πρωτονίων της αιθανόλης. Επίσης στα 1,72 ppm - 3,37 ppm η σύζευξη των πρωτονίων της 2-μεθυλοπροπανόλης. Τέλος στα 1,2 ppm - 4,12 ppm, παρουσιάζεται σύζευξη των πρωτονίων του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ στα 2,2 ppm και 9,7 ppm, εμφανίζεται η σύζευξη των πρωτονίων της ακεταλδεΐδης.



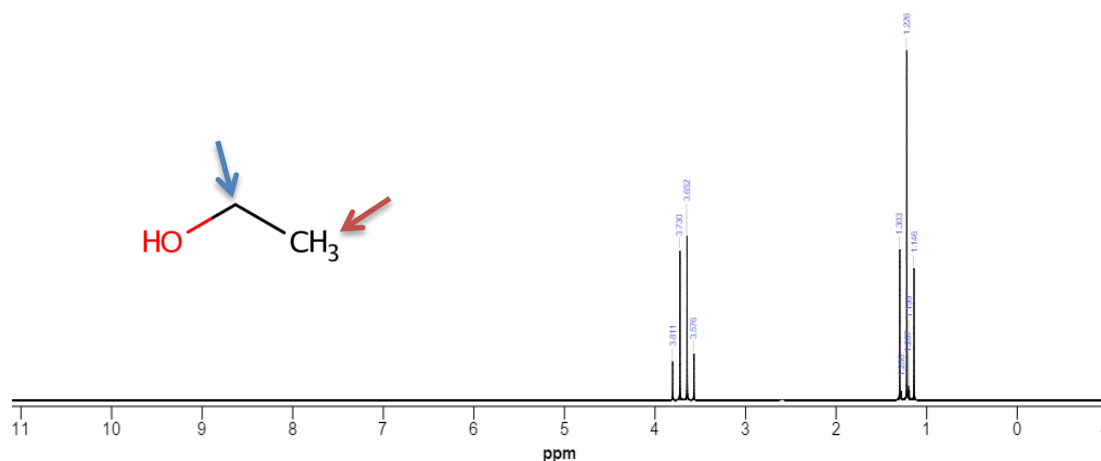
Φάσμα 3: Φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY 2D NMR

6.3 Ταυτοποίηση χημικών μετατοπίσεων αποστάγματος σε D_2O -TSP

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι: οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες, τα πτητικά οξέα και οι εστέρες. Παρακάτω, θα γίνει η ταυτοποίηση αυτών των ενώσεων, σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

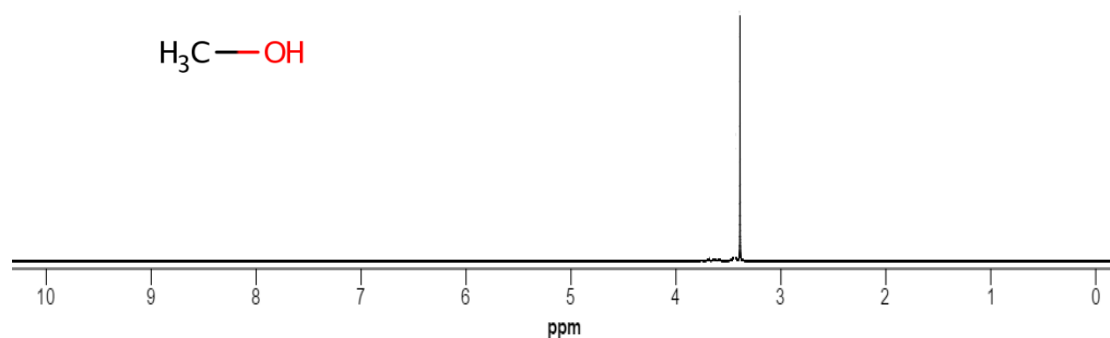
➤ Αλκοόλες

- Στο φάσμα ανιχνεύθηκαν 2 κορυφές της **αιθανόλης**. Η τριπλή κορυφή στα **1,17 ppm**, οφείλεται στα πρωτόνια που είναι σημειωμένα με κόκκινο βέλος, ενώ η τετραπλή κορυφή στα **3,65 ppm**, οφείλεται στα πρωτόνια με το μπλε βέλος. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 4), οι κορυφές φαίνεται ότι ταυτοποιούν τα πρωτόνια που προαναφέρθηκαν.



Φάσμα 4 : Φάσμα 1H NMR για την αιθανόλη

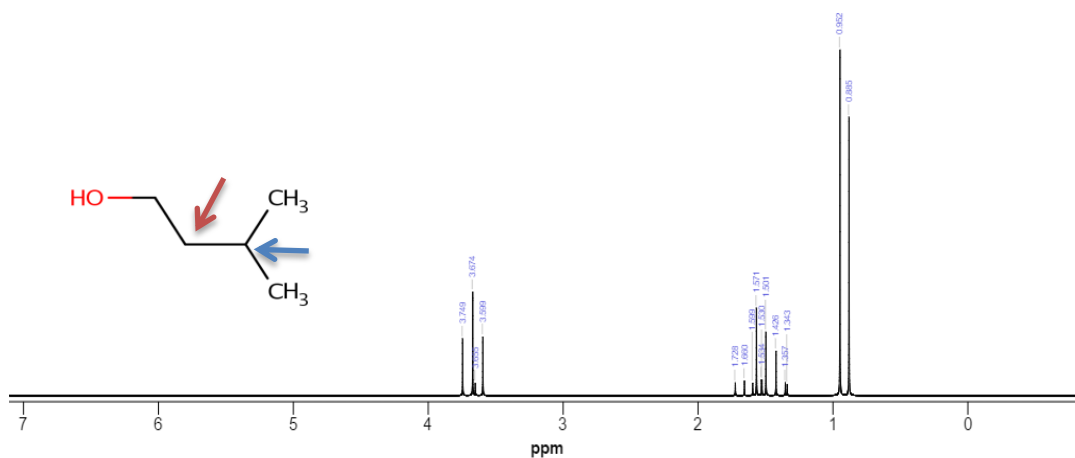
- Επίσης, στο φάσμα ανιχνεύθηκε μια κορυφή της μεθανόλης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 5), η απλή κορυφή που εμφανίζεται στα **3,35 ppm**, οφείλεται στα μεθυλικά πρωτόνια. Επομένως, η κορυφή που εμφανίστηκε στο φάσμα, φαίνεται να ταυτοποιεί τα μεθυλικά πρωτόνια.



Φάσμα 5: Φάσμα 1H NMR για την μεθανόλη

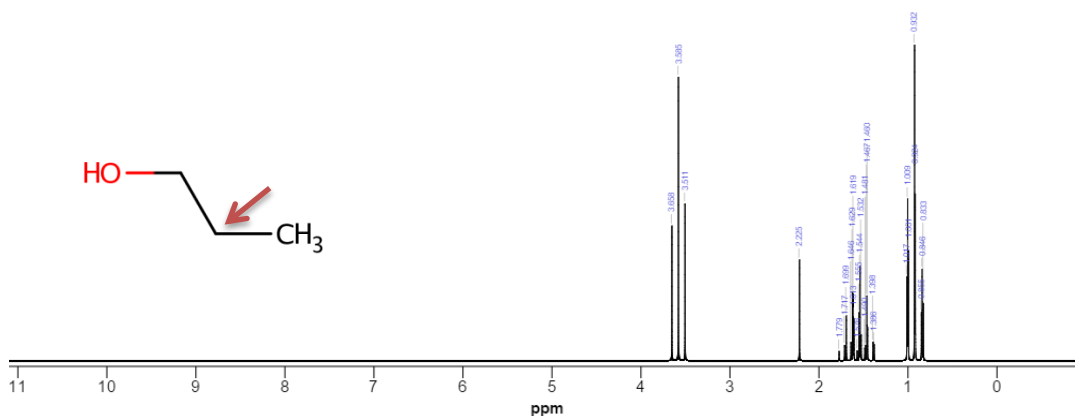
✚ Παρακάτω, περιγράφονται οι μετατοπίσεις των ανώτερων αλκοολών, δηλαδή αυτών με περισσότερα από 2 άτομα C.

- **Ισοπεντανόλη**: Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 6), τα 2 μεθύλια που φαίνονται στην ένωση, είναι υπεύθυνα για την διπλή κορυφή που παρουσιάζεται στα **0,88 ppm** στο φάσμα. Επίσης, το πρωτόνιο που σημειώνεται με μπλε βέλος στην ένωση, ευθύνεται για την πολλαπλή κορυφή στα **1,65 ppm**, ενώ το πρωτόνιο που σημειώνεται με κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνο για την πολλαπλή κορυφή στα **1,42 ppm**. Σύμφωνα με αυτό, οι κορυφές της ισοπεντανόλης που εμφανίστηκαν στο φάσμα, φαίνεται ότι ταυτοποιούν τα πρωτόνια που προαναφέρθηκαν.



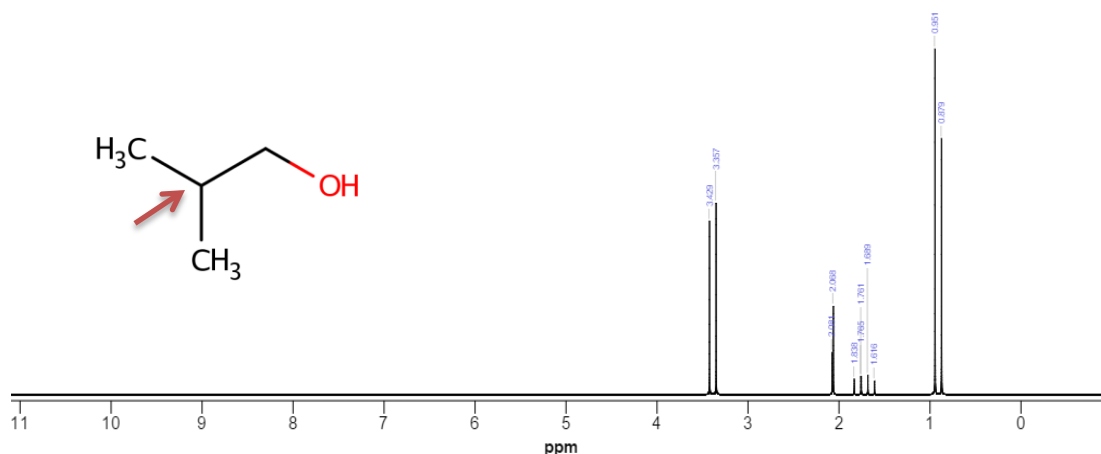
Φάσμα 6 : Φάσμα ¹H NMR για την ισοπεντανόλη

- **1-προπανόλη**: Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 7), τα 2 πρωτόνια που σημειώνονται στην ένωση με το κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνα για την πολλαπλή κορυφή που φαίνεται στο φάσμα στα **1,53 ppm**. Επομένως, η κορυφή της 1-προπανόλης που εμφανίστηκε στο φάσμα, φαίνεται ότι ταυτοποιεί τα πρωτόνια που προαναφέρθηκαν.



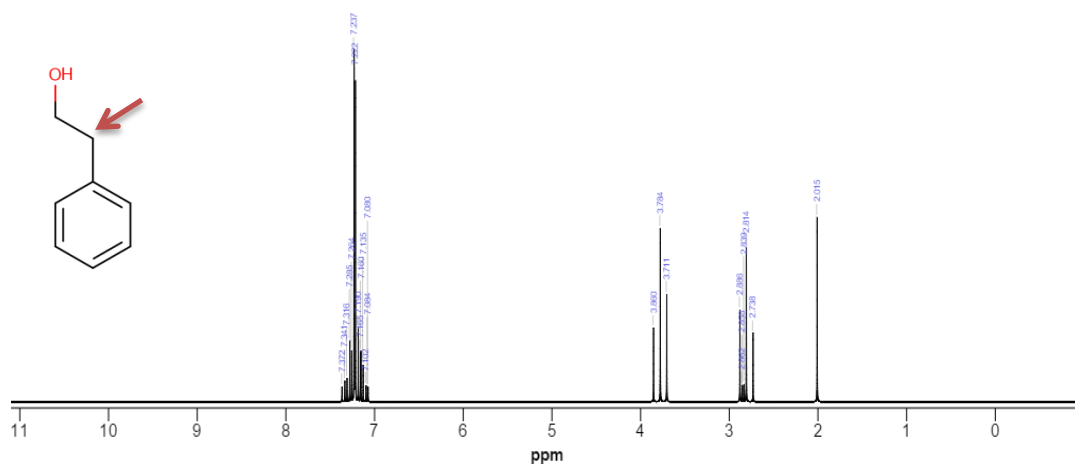
Φάσμα 7: Φάσμα ¹H NMR για την 1-προπανόλη

- **2-μέθυλο-προπανόλη:** Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 8), το πρωτόνιο που σημειώνεται με το κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνο για την πολλαπλή κορυφή στα **1,72 ppm**. Επομένως, η κορυφή αυτής της ένωσης, φαίνεται ότι ταυτοποιεί το πρωτόνιο που προαναφέρθηκε.



Φάσμα 8: Φάσμα ^1H NMR για την 2-μέθυλο-προπανόλη

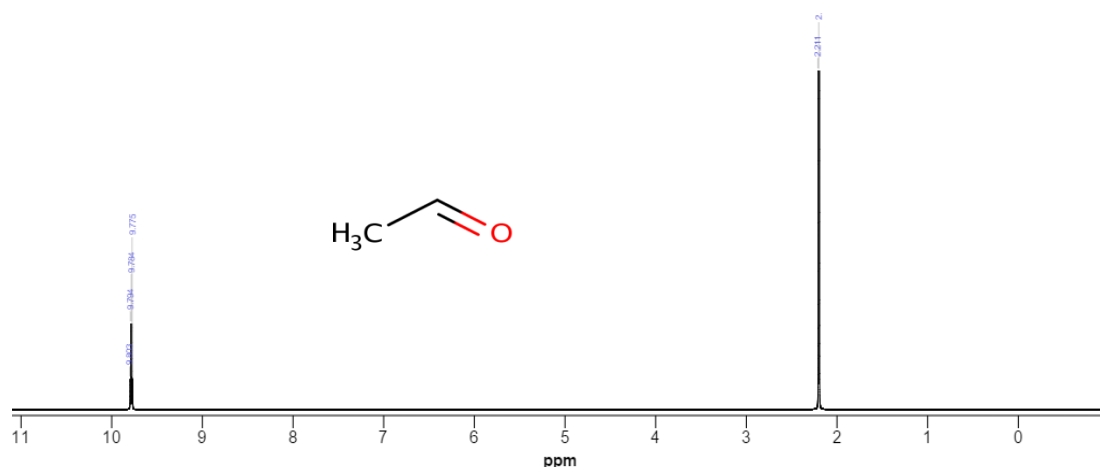
- **2-φαινυλοαιθανόλη:** Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 9), τα πρωτόνια που σημειώνονται με κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνα για την τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα **2,83 ppm**, ενώ τα πρωτόνια του δακτυλίου, είναι υπεύθυνα για την πολλαπλή κορυφή που παρατηρείται στα **7,7 ppm**. Σύμφωνα με αυτό, οι κορυφές της 2-φαινυλοαιθανόλης που εμφανίστηκαν στο φάσμα, φαίνεται ότι ταυτοποιούν τα πρωτόνια που προαναφέρθηκαν



Φάσμα 9: Φάσμα ^1H NMR για την 2-φαινυλοαιθανόλη

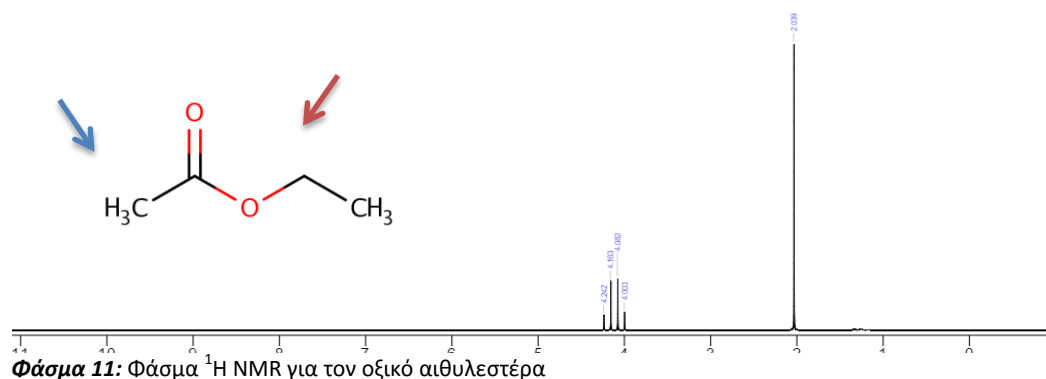
➤ Αλδεΐδες

- Στην κατηγορία αυτή, η αλδεΐδη που ταυτοποιήθηκε είναι η **ακεταλδεΐδη**. Πιο συγκεκριμένα, το μεθύλιο είναι υπεύθυνο για την διπλή κορυφή στα **2,2 ppm**, ενώ το πρωτόνιο της αλδεΐδομάδας, είναι αυτό που δίνει την τετραπλή κορυφή στα **9,7 ppm**. Επομένως, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 10), τα πρωτόνια που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στην ακεταλδεΐδη.

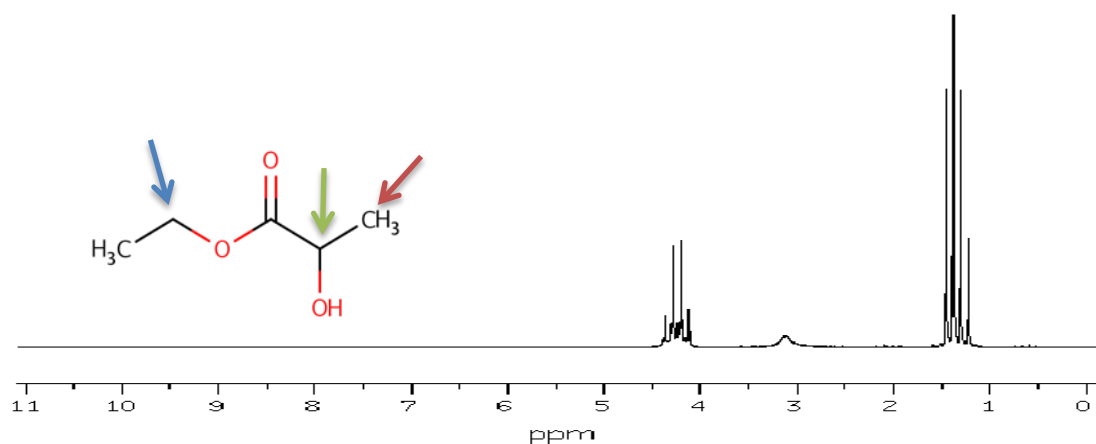


➤ Εστέρες

- Στα φάσματα ανιχνεύτηκαν και άλλες ενώσεις, όπως ο **οξικός αιθυλεστέρας**. Πιο συγκεκριμένα, το μεθύλιο που σημειώνεται με μπλε βέλος στην ένωση, είναι υπεύθυνο για την απλή κορυφή που εμφανίζεται στα **2,06 ppm**, ενώ τα πρωτόνια που σημειώνονται με κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνα για την τετραπλή κορυφή στα **4,12 ppm**. Άρα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 11) τα πρωτόνια που ταυτοποιήθηκαν, ανήκουν στον οξικό αιθυλεστέρα.



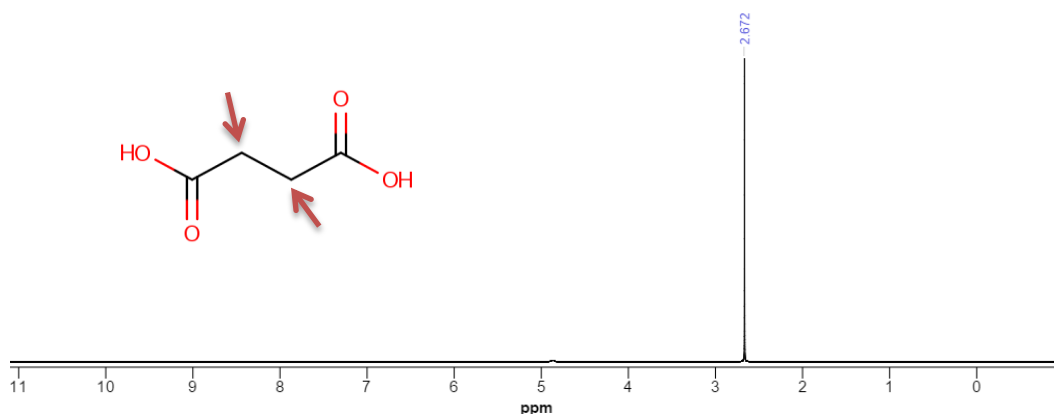
- Μία άλλη ένωση που ανιχνεύθηκε και ανήκει σ αυτή την κατηγορία, είναι ο **γαλακτικός αιθυλεστέρας**. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 12), τα πρωτόνια που σημειώνονται με κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνα για την διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα **1,38 ppm**, ενώ τα πρωτόνια που σημειώνονται με μπλε βέλος είναι υπεύθυνα για την τετραπλή κορυφή στα **4,2 ppm**. Τέλος, τα πρωτόνια με το πράσινο βέλος στην ένωση, είναι υπεύθυνα για την τετραπλή κορυφή τα **4,3 ppm**. Επομένως, οι κορυφές του γαλακτικού αιθυλεστέρα που εμφανίστηκαν στο φάσμα, φαίνεται ότι ταυτοποιούν τα πρωτόνια που προαναφέρθηκαν.



Φάσμα 12: Φάσμα ^1H NMR για τον γαλακτικό αιθυλεστέρα

➤ Οργανικά οξέα

- Στην κατηγορία αυτή το οξύ που ανιχνεύθηκε είναι το **ηλεκτρικό οξύ**. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (φάσμα 13), τα πρωτόνια που σημειώνονται με κόκκινο βέλος, είναι υπεύθυνα για την απλή κορυφή που εμφανίζεται στα **2,6 ppm**. Επομένως, η κορυφή του ηλεκτρικού οξέος, φαίνεται ότι ταυτοποιεί τα πρωτόνια αυτά.



Φάσμα 13: Φάσμα ^1H NMR για το ηλεκτρικό οξύ

6.4 Ποσοτικοποίηση των χημικών ενώσεων

Μετά από την ταυτοποίηση των ενώσεων του δείγματος, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των βασικών συστατικών, για να επιβεβαιωθεί αν αυτά κυμαίνονται στα επιτρεπόμενα όρια μέσα στα δείγματα.

Η διαδικασία ποσοτικοποίησης ξεκίνησε ως εξής:

✚ Αρχικά, σε ένα φάσμα WET 1D ^1H NMR, ολοκληρώθηκε η απλή κορυφή της πρότυπης ουσίας TSP. Έτσι, με σημείο αναφοράς την ολοκλήρωση του TSP, ολοκληρώθηκαν και οι υπόλοιπες ενώσεις του φάσματος για την εξαγωγή των ποσοτήτων τους, ενώ οι κορυφές της αιθανόλης και του νερού, ολοκληρώθηκαν στο φάσμα zg30. Οι ολοκληρώσεις των ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος WINNMR της εταιρείας Bruker.

✚ Έπειτα, ακολούθησε η **ποσοτικοποίηση της αιθανόλης**, η οποία έγινε ως εξής:

- i.* Ολοκλήρωση της κορυφής του νερού, στο φάσμα zg30
- ii.* Ολοκλήρωση της τριπλής κορυφής της αιθανόλης στο φάσμα zg30
- iii.* Από το ολοκλήρωμα του νερού (v), αφαιρείται το ολοκλήρωμα της αιθανόλης (α), το οποίο είναι διαιρεμένο με τον αριθμό των πρωτονίων της αιθανόλης. Έπειτα, όλη αυτή η ποσότητα πολλαπλασιάζεται με το μοριακό βάρος του νερού (18,0153 amu) και στην συνέχεια διαιρείται με το ολοκλήρωμα της αιθανόλης, πολλαπλασιασμένο με το 2/3 και το μοριακό βάρος αυτής (46,0684 amu). Πιο συγκεκριμένα, η πράξη που γίνεται είναι η εξής:

$$\omega = \frac{18,0153 \times [v - \left(\frac{\alpha}{3}\right)]}{2/3 \times \alpha \times 46,0684}$$

- iv.* Στην συνέχεια, υπολογίζεται η %w ποσότητα της αιθανόλης για την κάθε ένωση ως εξής:

$$\%w = \frac{100}{1 + \omega}$$

- v.* Τέλος, για τον υπολογισμό του %v της αιθανόλης, πολλαπλασιάζεται το %w με την αντίστοιχη πυκνότητα (kg/l), (η οποία είναι διαφορετική κάθε φορά ανάλογα με την τιμή του %w) και διαιρείται με το 0,78924.

$$\%v = \frac{\%w \times \text{πυκνότητα}}{0,78924}$$

✚ Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση και των υπόλοιπων κορυφών ως εξής:

- i.* Ολοκλήρωση της κορυφής της ένωσης που μας ενδιαφέρει, από το φάσμα WET 1D
- ii.* Εύρεση των moles της ένωσης, πολλαπλασιάζοντας το ολοκλήρωμα με 10^{-6} και διαιρώντας το με τον αριθμό των πρωτονίων της ένωσης
- iii.* Εύρεση των γραμμαρίων της ένωσης στα 100ml του διαλύματος, πολλαπλασιάζοντας τα moles με το μοριακό βάρος της ένωσης και το 100 και διαιρώντας όλη αυτή την ποσότητα με τα ml του δείγματος που έχουν χρησιμοποιηθεί (0,6 ml στην περίπτωση μας).

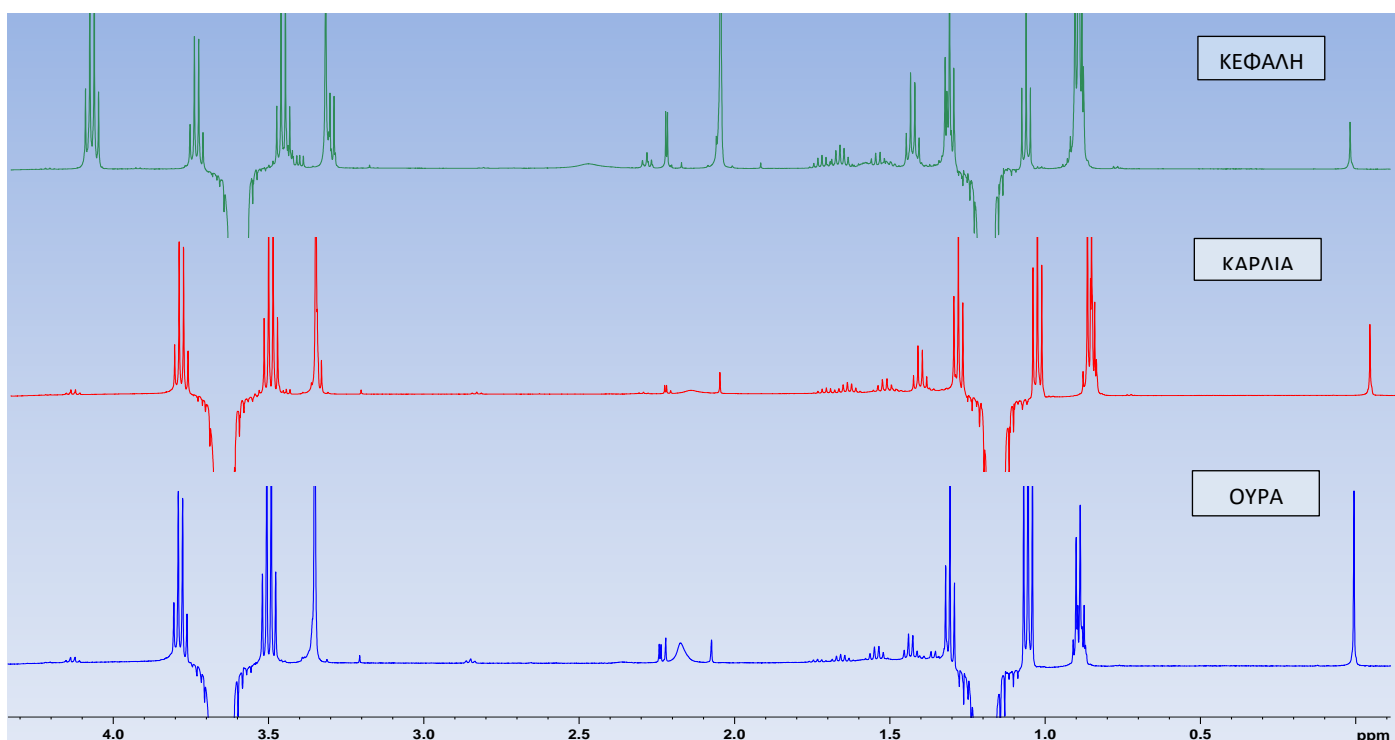
$$y = \frac{\text{moles} \times M.B \times 100}{0,6}$$

- iv.* Τέλος για την εύρεση των γραμμαρίων σε 100lt άνυδρης αλκοόλης πραγματοποιείται η εξής πράξη:

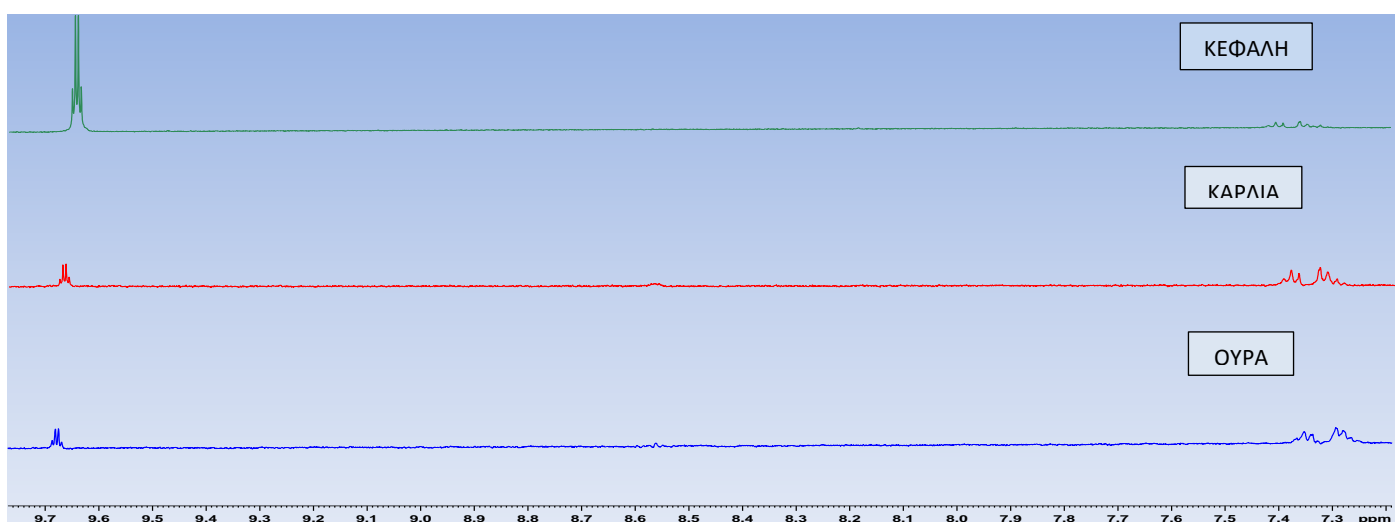
$$\frac{y \times 1000 \times 100}{\%v}$$

6.5 Σχολιασμός των συγκεντρώσεων των χημικών ενώσεων στα τρία κλάσματα της απόσταξης

Το παρακάτω φάσμα απεικονίζει και τα τρία κλάσματα του αποστάγματος. Το πρώτο φάσμα είναι από το απόσταξη της “κεφαλής”, το δεύτερο από την απόσταξη της “καρδιάς” και το τρίτο από την απόσταξη της “ουράς”.



Φάσμα 14.1: Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR των τριών κλασμάτων της απόσταξης



Φάσμα 14.2: Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR των 3 κλασμάτων της απόσταξης – περιοχή αρωματικών και βινυλικών πρωτονίων

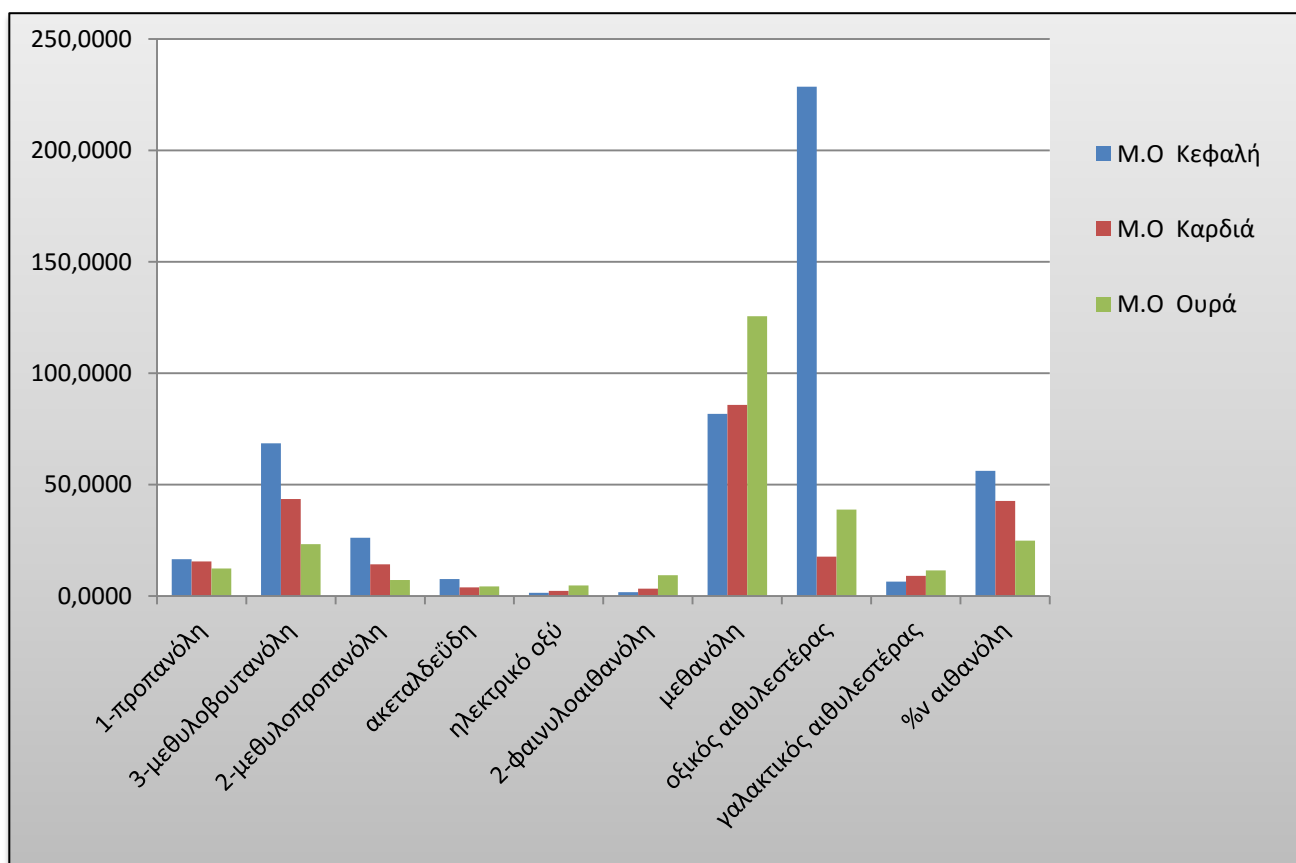
Όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, τα φάσματα των τριών κλασμάτων της απόσταξης, παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά την ένταση των κορυφών τους. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα 14.1 οι ανώτερες αλκοόλες (3-μεθυλοβουτανόλη, 1-προπανόλη και 2-μεθυλοπροπανόλη), φαίνεται να εμφανίζουν κορυφές μεγαλύτερης έντασης στην πρώτο κλάσμα της απόσταξης και έπειτα, η ένταση τους μειώνεται μέχρι το τέλος της απόσταξης. Ο οξικός αιθυλεστέρας στα 2,06 ppm και στα 4,12 ppm εμφανίζει κορυφή μεγάλης έντασης στο φάσμα της “κεφαλής”. Επίσης, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας στα 1,34 ppm εμφανίζει μεγαλύτερη κορυφή στο φάσμα της “ουράς”. Ακόμα, στο φάσμα 14.2 παρατηρείται ότι, η πολλαπλή κορυφή της 2-φαινυλοαιθανόλης, εμφανίζει μεγαλύτερη κορυφή στο τελευταίο κλάσμα της απόσταξης, ενώ η ακεταλδεΐδη έχει μεγαλύτερη σε ένταση κορυφή στο πρώτο κλάσμα της απόσταξης.

6.6 Σύγκριση φασμάτων πιο αναλυτικά

Σε αυτό το σημείο, θα πραγματοποιηθεί μια πιο αναλυτική σύγκριση μεταξύ των φασμάτων των τριών κλασμάτων της απόσταξης. Πιο συγκεκριμένα, αφού πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση όλων των ενώσεων στα κλάσματα της “κεφαλής” της “καρδιάς” και της “ουράς”, κατασκευάστηκε ένα γράφημα με τον μέσο όρο της συγκέντρωσης της κάθε ένωσης, σε κάθε κλάσμα της απόσταξης και έπειτα, έγινε σύγκριση των ενώσεων αυτών.

Πίνακας 1: Μέσος όρος της συγκέντρωσης κάθε ένωσης σε κάθε κλάσμα της απόσταξης

| Χημικές Ενώσεις | Μέσος όρος αποστάγματος “κεφαλής” | Μέσος όρος αποστάγματος “καρδιάς” | Μέσος όρος αποστάγματος “ουράς” |
|---|--|--|--|
| 1-προπανόλη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 16,4396 | 15,5461 | 12,3551 |
| 3-μεθυλοβουτανόλη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 68,5224 | 43,4991 | 23,2637 |
| 2-μεθυλοπροπανόλη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 26,1006 | 14,1139 | 7,0732 |
| Ακεταλδεΐδη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 7,5950 | 3,8733 | 4,2098 |
| Ηλεκτρικό οξύ (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 1,3671 | 2,1878 | 4,6881 |
| 2-φαινυλοαιθανόλη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 1,7057 | 3,2606 | 9,3582 |
| Μεθανόλη (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 81,7780 | 85,7002 | 125,6295 |
| Οξικός αιθυλεστέρας (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 228,6057 | 17,5618 | 38,7860 |
| Γαλακτικός αιθυλεστέρας (gr/100lt άνυδρης αλκοόλης) | 6,3533 | 9,0180 | 11,4537 |
| Αιθανόλη (% αλκοόλ) | 56,1848 | 42,6285 | 24,7792 |



Γράφημα 1: Το γράφημα αυτό δείχνει το μέσο όρο της συγκέντρωσης της κάθε ένωσης στο κάθε κλάσμα χωριστά

Η **1-προπανόλη** σύμφωνα με το γράφημα 1, παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στα κλάσματα της “κεφαλής” και της “καρδιάς”, ενώ μειώνεται στο τελευταίο κλάσμα της απόσταξης.

Επίσης, η συγκέντρωση της **2-μεθυλοπροπανόλης** παρουσιάζει μια μεταβολή των συγκεντρώσεών της στις αποστάξεις, κατά την οποία το μέγιστο της συγκέντρωσής της εμφανίζεται μεταξύ της “κεφαλής” και του κλάσματος της “καρδιάς”. Στο κλάσμα της “ουράς” μειώνεται η συγκέντρωσή της σε χαμηλά επίπεδα.

Η **3-μεθυλοβουτανόλη** παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό στα κλάσματα της “κεφαλής” και της “καρδιάς”, ενώ παρατηρείται μείωση στο κλάσμα της “ουράς”. Οι συγκεντρώσεις της 3-μεθυλοβουτανόλης σε κάθε κλάσμα είναι υψηλότερες από αυτές της 2-μεθυλοπροπανόλης και της 1-προπανόλης για όλες τις αποστάξεις.

Η **ακεταλδεΐδη** επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος. Είναι πολύ πτητικό συστατικό και αποστάζει σε μεγάλο ποσοστό στα πρώτα κλάσματα του αποστάγματος. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 1, η ακεταλδεΐδη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κλάσμα της “κεφαλής”.

Η **2-φαινυλοαιθανόλη** και το **ηλεκτρικό οξύ** επηρεάζουν επίσης, το άρωμα του αποστάγματος. Σύμφωνα με το γράφημα 1, παρατηρείτε αύξηση της συγκέντρωσης μέχρι το τέλος της απόσταξης.

Η **μεθανόλη** αποτελεί το πιο τοξικό συστατικό του αποστάγματος. Η υψηλή συγκέντρωσή της μπορεί να αποδοθεί στην ποικιλία- ευνοείται από χοντρόφλουδες ποικιλίες- και στον αυξημένο χρόνο συμπαραμονής στεμφύλων και οίνου. Είναι πολύ υδατοδιαλυτή εξαιτίας της ιδιότητας της να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το νερό, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής της προς το τέλος της απόσταξης, παρ όλο που έχει χαμηλό σημείο βρασμού. Η ιδιότητά της να αποστάζει μαζί με το νερό μετά την αιθυλική αλκοόλη, την κάνει να θεωρείται προϊόν “ουράς” (Leaute, 1990). Στο γράφημα 1, παρατηρείται αύξηση της μεθανόλη μέχρι το τέλος της απόσταξης. Ωστόσο, οι Claus και Berglund (2005) βρήκαν ότι η περιεκτικότητα (% v/v) της μεθανόλης, είναι υψηλότερη στα κλάσματα της “κεφαλής” έπειτα, μειώνεται στα κλάσματα της “καρδιάς” και τελικά, αυξάνεται στα κλάσματα της “ουράς”. Στην συγκεκριμένη έρευνα, δεν παρατηρήθηκε αυτό ακριβώς. Αυτό πιθανόν, να οφείλεται στον μη σωστό διαχωρισμό των τριών κλασμάτων από τους αποσταγματοποιούς.

Ο **οξικός αιθυλεστέρας** έχει χαμηλό σημείο ζέσεως και θεωρείται προϊόν “κεφαλής”. Στο γράφημα 1, εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πρώτο κλάσμα της απόσταξης. Έπειτα, ακολουθεί μείωση των τιμών στο μεσαίο κλάσμα της απόσταξης, ενώ στο τελευταίο κλάσμα παρατηρείται μια μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων.

Ένας άλλος εστέρας που συμβάλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος είναι ο **γαλακτικός αιθυλεστέρας**, ο οποίος θεωρείται προϊόν “ουράς” (Silva και Malcata , 1998, Cortes S και Fernandez E, 2002). Σύμφωνα με το γράφημα ο γαλακτικός αιθυλεστέρας αυξάνεται μέχρι το τέλος της απόσταξης.

Τέλος, η **αιθανόλη** είναι το συστατικό που μετά το νερό περιέχεται στη μεγαλύτερη αναλογία στα αποστάγματα. Σύμφωνα με το γράφημα 1, βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην “κεφαλή” και έπειτα μειώνεται μέχρι το τέλος της απόσταξης.

6.7 Στατιστική ανάλυση φασμάτων

❖ Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

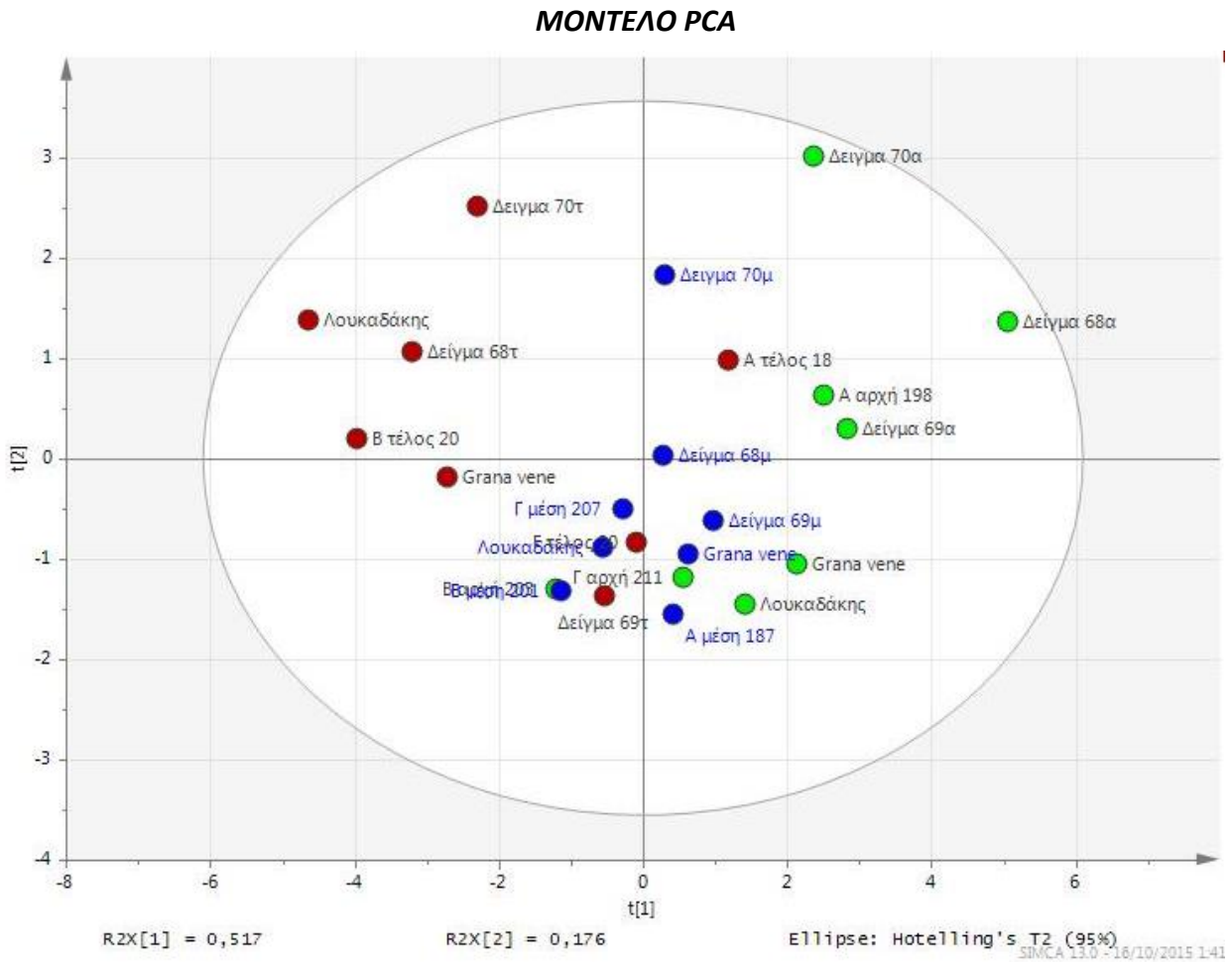
Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) θεωρείται η πιο εύκολη και εύχρηστη τεχνική αναγνώρισης προτύπων. Χρησιμοποιείται για να αντιμετωπίσει μεγάλο όγκο δεδομένων που προκύπτουν από μια ανάλυση. Γενικά απεικονίζει οποιαδήποτε σχέση (τάσεις, ακραίες τιμές) μεταξύ των παρατηρήσεων (δείγματα).

Επίσης με την μέθοδο PCA είναι δυνατή η ανακάλυψη ισχυρών και μέτριων έκτροπων δειγμάτων – σημείων. Έκτροπα σημεία είναι οι παρατηρήσεις με τιμές που δεν προσαρμόζονται στο μοντέλο. Επομένως η αναγνώριση ισχυρά έκτροπων σημείων είναι σημαντική για την αξιολόγηση της βάσης δεδομένων.

Η ποιότητα των μοντέλων που έχουν καλή προσαρμογή, περιγράφονται με την μεταβλητή R^2 , ενώ η προβλεπτική ικανότητα με την μεταβλητή Q^2 . Η R^2 ($0 \leq R^2 \leq 1$) εξηγεί την μεταβολή στο μοντέλο PCA, αποτελώντας έτσι ένα ποσοτικό μέτρο του πόσο καλά ήταν δυνατόν να αναπαραχθούν τα δεδομένα. Η συνολική προγνωστική ικανότητα του μοντέλου αξιολογείται από το Q^2 ($Q^2(cum) \geq 0.80$), το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα της μεταβολής του Y που μπορεί να προβλεφθεί από το μοντέλο. Παρακάτω, παρουσιάζεται το μοντέλο PCA για τις οκτώ σειρές των δειγμάτων (εικόνα 4).

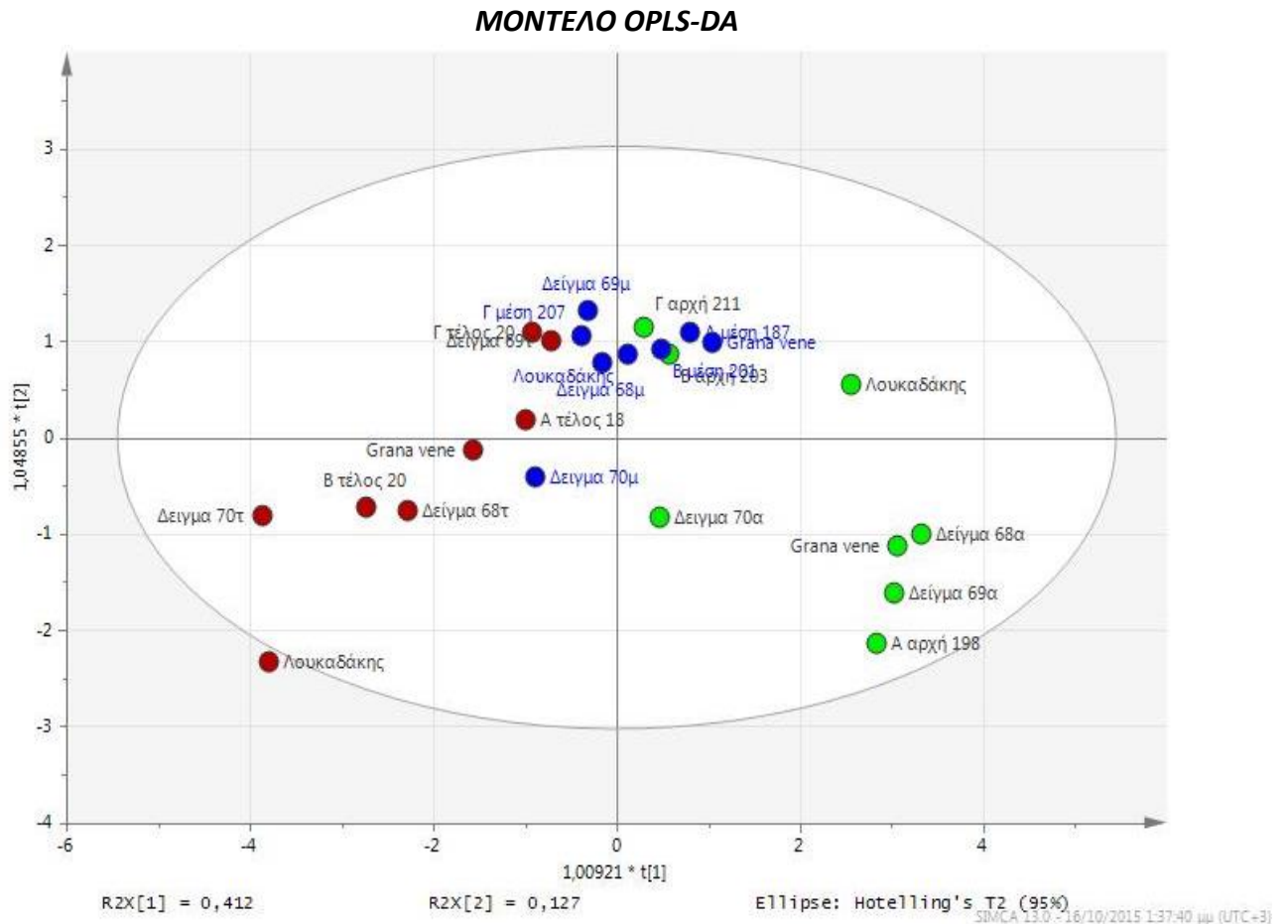
❖ OPLS-DA

Η μέθοδος αυτή είναι προέκταση της PCA και χρησιμοποιείται για να βοηθήσει περαιτέρω τον παρατηρούμενο σχηματισμό υποομάδας μέσα στα δείγματα που ανήκουν στο ίδιο κλάσμα απόσταξης. Επίσης, χρησιμοποιείται σε περίπτωση που θέλουμε να προβλέψουμε την ομάδα ή την τάξη στην οποία ανήκει ένα σύνολο δειγμάτων, με βάση ορισμένες πειραματικές μεταβλητές διαχωρισμού ή πρόγνωσης. Η στατιστική ανάλυση των φασμάτων, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος SIMCA 13.0.2. Παρακάτω παρουσιάζεται το μοντέλο OPLS-DA για τις οκτώ σειρές δειγμάτων (εικόνα 5).



Εικόνα 3: Διαχωρισμός 3 κλασμάτων απόσταξης για τις 8 σειρές δειγμάτων σε 2 κύριες συνιστώσες PCA

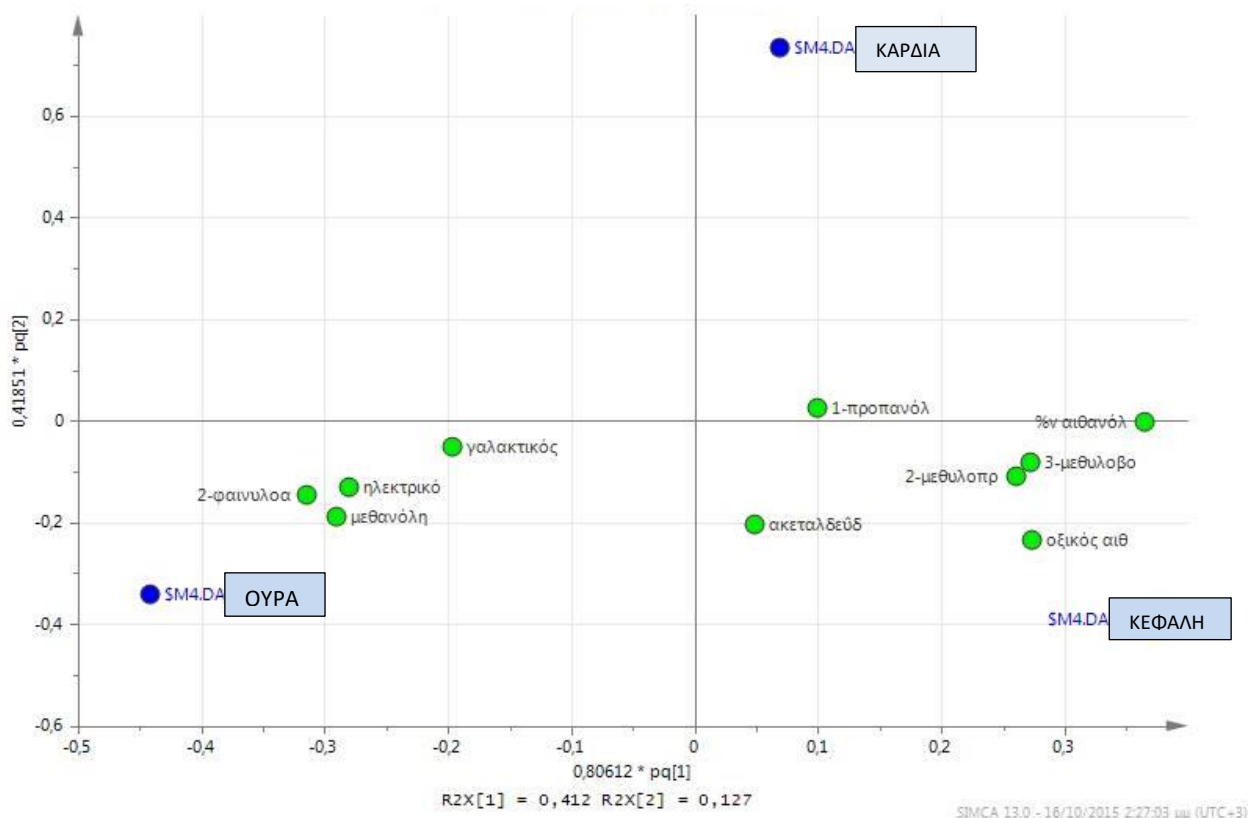
Σύμφωνα με την εικόνα 3, οι οκτώ σειρές των αποσταγμάτων στεμφύλων σταφύλης χωρίστηκαν σαφώς σε τρεις ομάδες στο PCA και διασκορπίστηκαν ανάλογα με τα τρία κλάσματα της απόσταξης. Τα δείγματα που είναι χρωματισμένα με **κόκκινο** χρώμα αντιπροσωπεύουν κλάσματα της **“ουράς”**, ενώ αυτά που είναι χρωματισμένα με **μπλε** και με **πράσινο** αντιπροσωπεύουν κλάσματα της **“καρδιάς”** και της **“κεφαλής”** αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι, ορισμένα δείγματα της **“κεφαλής”** και της **“ουράς”**, αποτελούν έκτροπα σημεία και βρίσκονται στην περιοχή που εμφανίζονται τα δείγματα της **“καρδιάς”**. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στον μη σωστό διαχωρισμό των τριών κλασμάτων της απόσταξης.



Εικόνα 4: Προέκταση του μοντέλου PCA με τη βοήθεια του μοντέλου OPLS-DA

Όπως προαναφέρθηκε, το μοντέλο OPLS-DA αποτελεί προέκταση της PCA και χρησιμοποιείται για να βοηθήσει περαιτέρω τον παρατηρούμενο σχηματισμό υποομάδας μέσα στα δείγματα που ανήκουν στο ίδιο κλάσμα απόσταξης. Σύμφωνα με την εικόνα 4, τα δείγματα της “κεφαλής” ομαδοποιούνται στο δεύτερο και στο τρίτο τεταρτημόριο, ενώ τα δείγματα της “ουράς” στο πρώτο και στο τέταρτο τεταρτημόριο. Τα δείγματα της “καρδιάς” ομαδοποιούνται στο πρώτο και στο δεύτερο τεταρτημόριο. Παρατηρείται ότι, υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των τριών κλασμάτων της απόσταξης παρ όλο που υπάρχουν ορισμένα έκτροπα σημεία. Παρακάτω, στην εικόνα 5 φαίνονται τα loading plots τα οποία δείχνουν πως μεταβάλλονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων στα 3 κλάσματα της απόσταξης.

LOADING PLOTS



Εικόνα 5: Loadings plots για τις οκτώ σειρές δειγμάτων

Στην εικόνα 5 παρατηρείται ότι υπάρχει διαχωρισμός των ενώσεων στα αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης, στο πρώτο και στο τελευταίο κλάσμα της απόσταξης. Πιο συγκεκριμένα, στο τέταρτο τεταρτημόριο συγκεντρώνονται οι ενώσεις που συνεισφέρουν στο τελευταίο κλάσμα της απόσταξης την "ουρά". Οι ενώσεις αυτές είναι η ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, το ηλεκτρικό οξύ, η 2-φαινυλοαιθανόλη και η μεθανόλη. Αντιθέτως στο τρίτο τεταρτημόριο συγκεντρώνονται οι ενώσεις που συνεισφέρουν στο πρώτο κλάσμα της απόσταξης την "κεφαλή". Αυτές οι ενώσεις είναι οι ανώτερες αλκοόλες, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακεταλδεΐδη και η αιθανόλη. Όλα αυτά έχουν συζητηθεί και παραπάνω στο γράφημα 1.

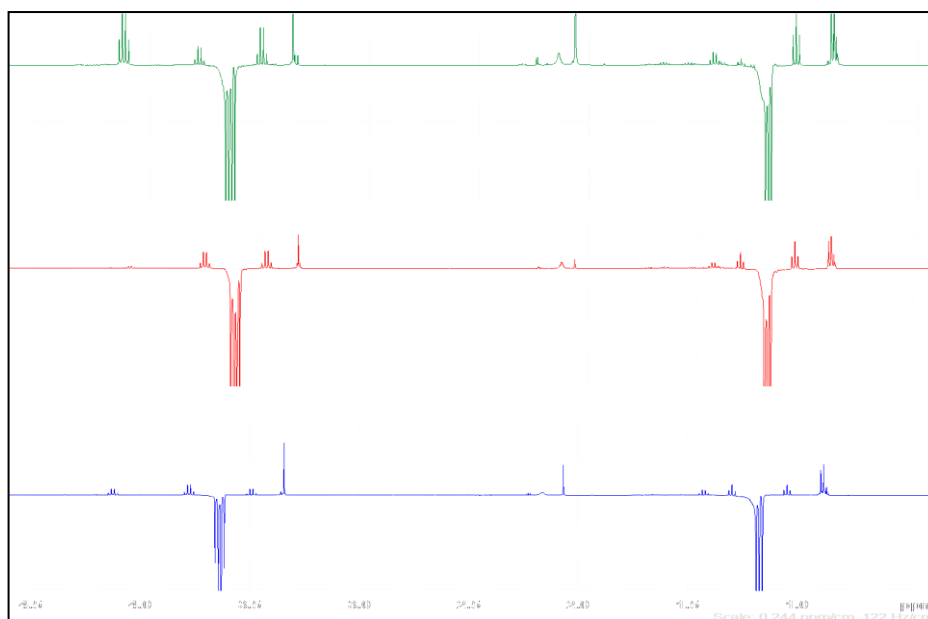
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα, διαπιστώνεται ότι η φασματοσκοπία NMR είναι μια τεχνική η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της σύστασης των αποσταγμάτων στεμφύλων σταφύλης, καθώς ανιχνεύει μεγάλο αριθμό συστατικών χαμηλής μοριακής μάζας. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων των αποσταγμάτων στεμφύλων στα τρία κλάσματα της απόσταξης, διαπιστώνεται ότι οι ενώσεις που εμπεριέχονται στο κλάσμα της “καρδιάς” κυμαίνονται μέσα στα επιτρεπόμενα όρια που προβλέπει η Νομοθεσία. Επίσης, οι τοξικές ουσίες μεθανόλη, ακεταλδεΐδη και οξικός αιθυλεστέρας βρίσκονται κάτω από τα μέγιστα όρια, γεγονός που τα καθιστά ασφαλή για ανθρώπινη κατανάλωση. Αντιθέτως, τα κλάσματα της “κεφαλής” και της “ουράς” δεν κρίνονται κατάλληλα για κατανάλωση διότι περιέχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τις τοξικές ενώσεις και αλλοιώνουν το άρωμα του αποστάγματος. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση αποτελούν ένα αξιόπιστο εργαλείο ελέγχου ταυτότητας, σύμφωνα με τα οποία καθορίζονται διάφοροι παράμετροι, όπως η γεωγραφική προέλευση των Ελληνικών αποσταγμάτων στεμφύλων, το κλάσμα της απόσταξης, το έτος συγκομιδής, η διαδικασία παραγωγής κλπ.

8.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

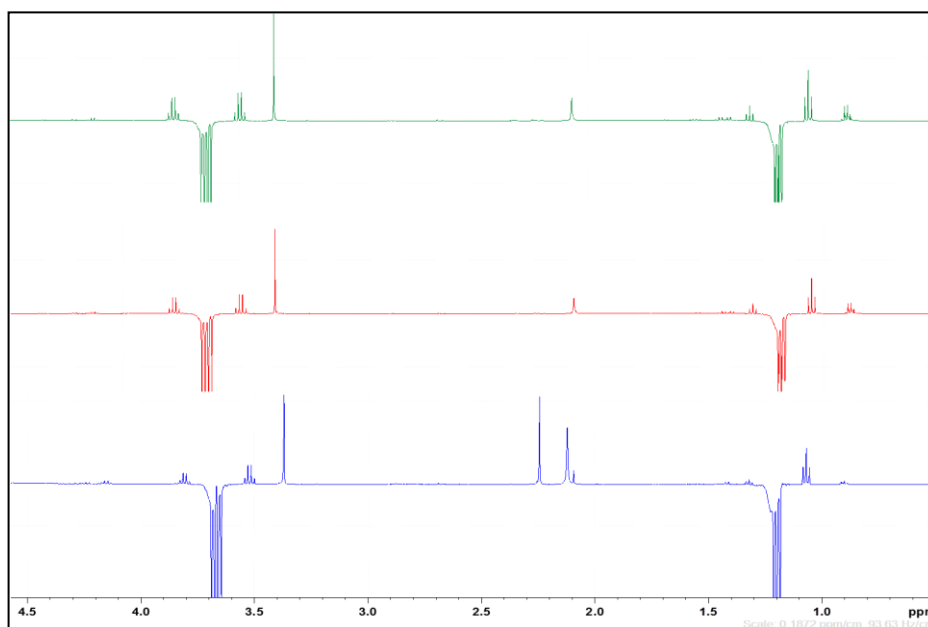
8.1 Φάσματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της έρευνας

1)



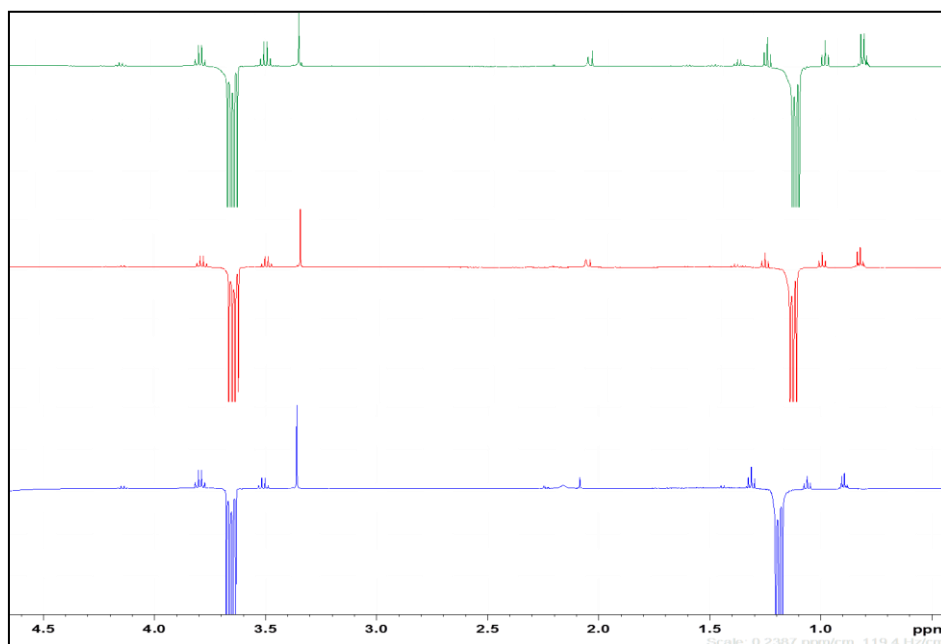
Φάσμα 15: Δείγμα Α. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.

2)



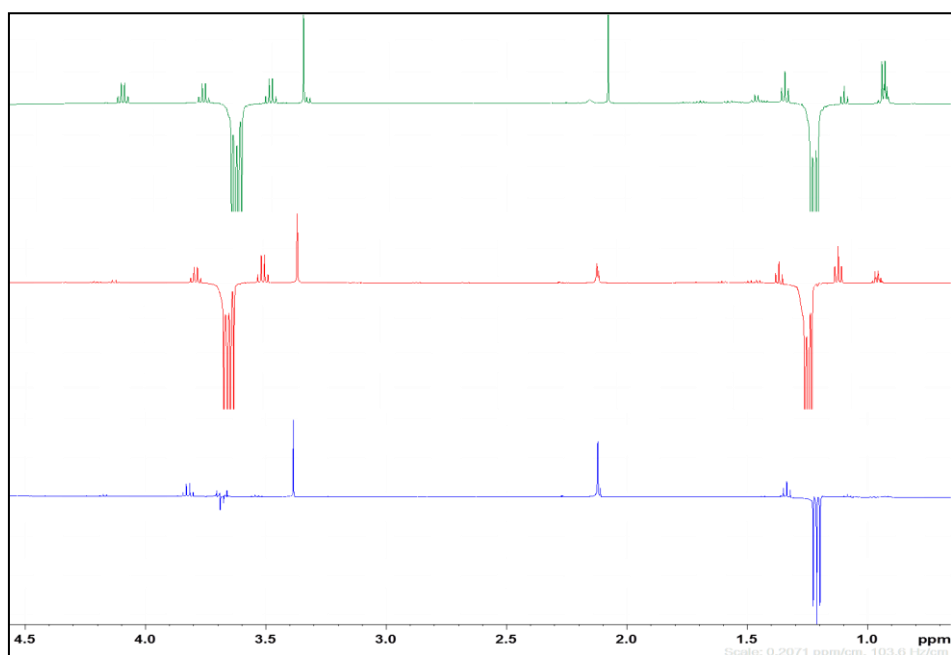
Φάσμα 16: Δείγμα Β. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.

3)

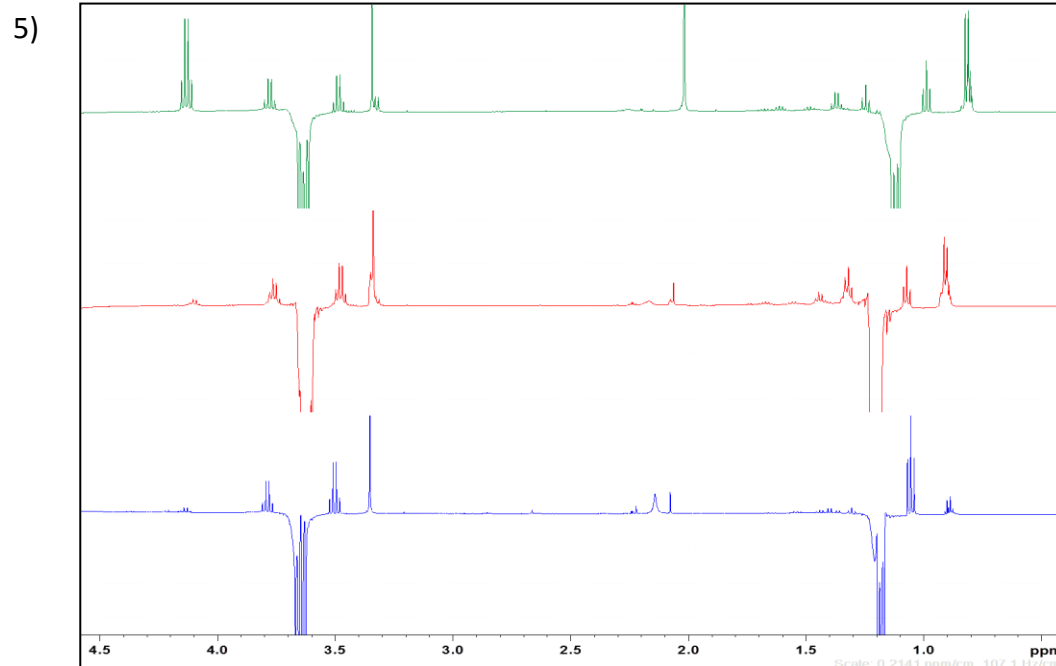


Φάσμα 17: Δείγμα Γ. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής”, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.

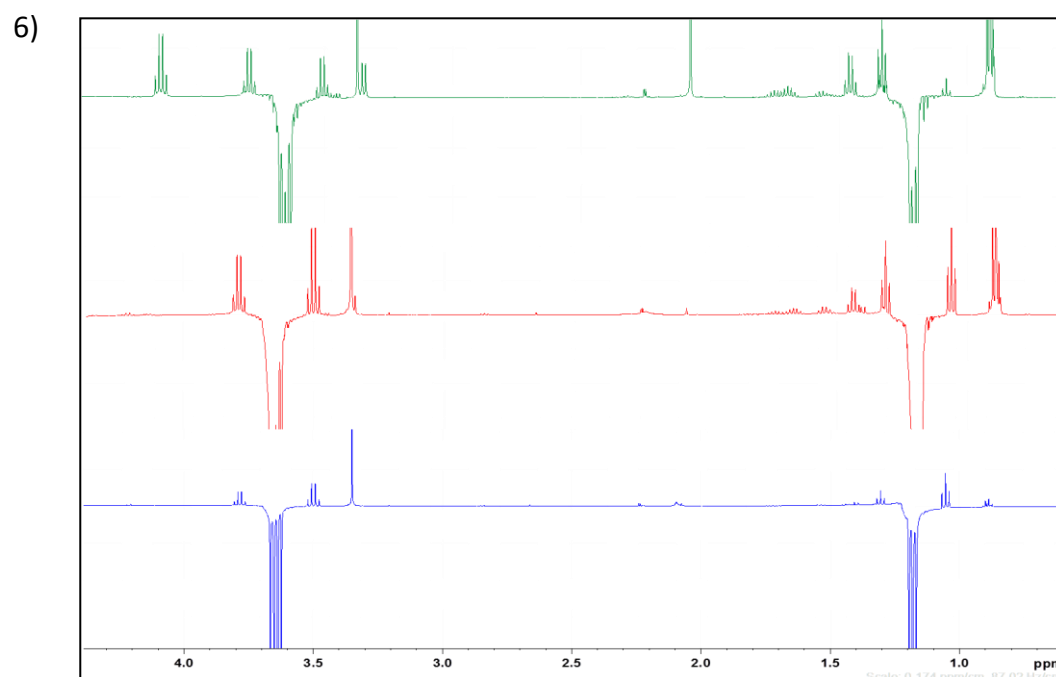
4)



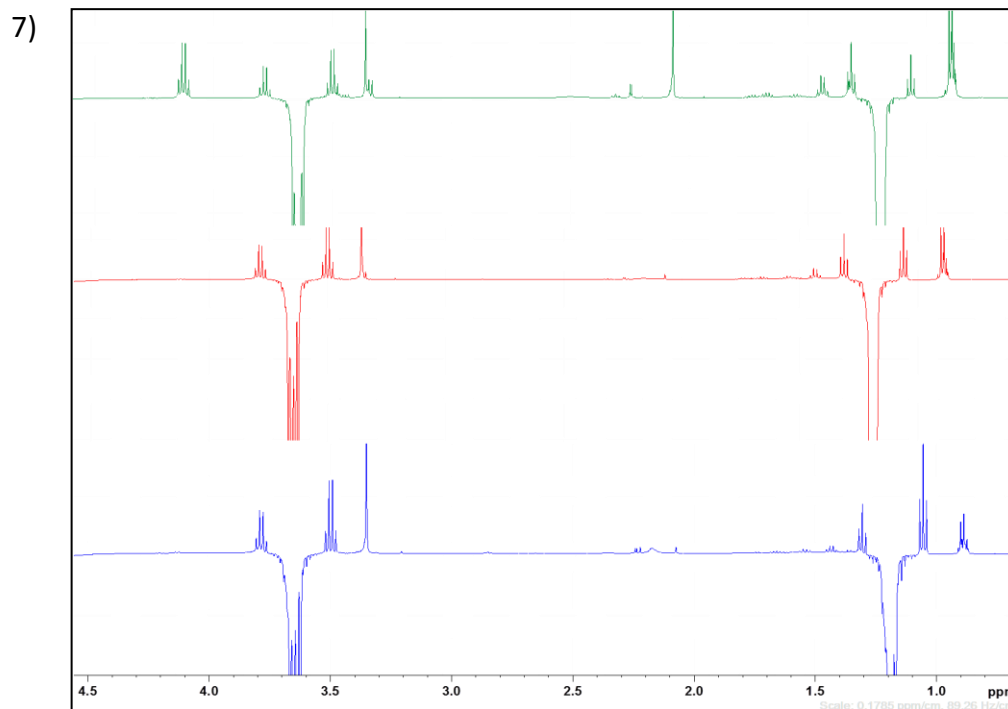
Φάσμα 18: Δείγμα Λουκαδάκης. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής”, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.



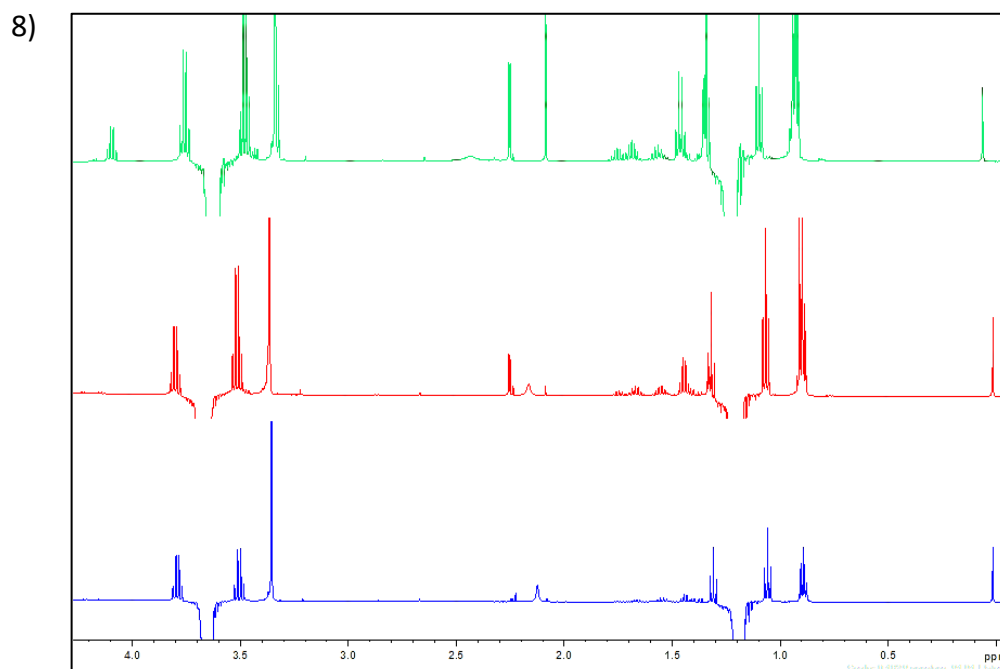
Φάσμα 19: Δείγμα Grana Venerato. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής”, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.



Φάσμα 20: Δείγμα 68. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής”, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.

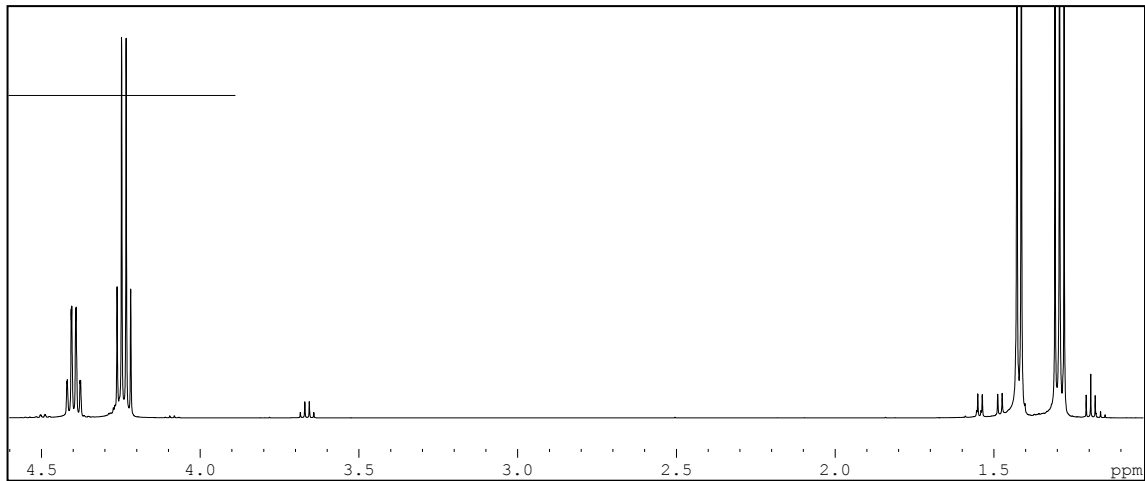


Φάσμα 21: Δείγμα 69. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.



Φάσμα 22: Δείγμα 70. Το πρώτο φάσμα αντιπροσωπεύει το κλάσμα της “κεφαλής, το δεύτερο της “καρδιάς” και το τρίτο της “ουράς”.

Παρακάτω φαίνεται το φάσμα του γαλακτικού αιθυλεστέρα σύμφωνα με το οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάθεση κορυφών.



Φάσμα 23: Φάσμα ^1H NMR γαλακτικού αιθυλεστέρα

8.2 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων**Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων**

| ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|--|--|--|---|---|
| Σειρές | Δείγματα | 1- προπανόλη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | 3- μέθυλοβουτανόλη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | 2- μέθυλοπροπανόλη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Ακεταλδεΰδη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Ηλεκτρικό οξύ (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) |
| A | κεφαλή | 21,2330 | 77,6093 | 23,6928 | 9,8806 | 1,0386 |
| | καρδιά | 9,7012 | 45,8720 | 18,9327 | 3,3495 | 1,0754 |
| | ουρά | 27,5171 | 90,4484 | 21,6778 | 6,3924 | 1,8181 |
| B | κεφαλή | 9,8014 | 19,8447 | 6,7045 | 1,7411 | 3,5431 |
| | καρδιά | 10,2078 | 19,0460 | 6,3088 | 1,7127 | 3,3230 |
| | ουρά | 6,6922 | 0,0000 | 0,0000 | 1,5013 | 6,6580 |
| Γ | κεφαλή | 14,1504 | 41,7934 | 11,2664 | 2,7404 | 0,2469 |
| | καρδιά | 18,1873 | 41,8454 | 13,5364 | 3,3659 | 1,2649 |
| | ουρά | 14,6772 | 27,7679 | 7,2695 | 5,2954 | 0,0000 |
| Grana Venerato | κεφαλή | 10,3809 | 59,1442 | 23,0591 | 1,7107 | 1,7805 |
| | καρδιά | 15,2469 | 43,1671 | 13,8384 | 2,7371 | 2,9584 |
| | ουρά | 8,2512 | 10,0762 | 2,5723 | 1,8827 | 8,0413 |
| Λουκα- δάκης | κεφαλή | 14,3950 | 46,5313 | 18,7271 | 1,3430 | 0,9687 |
| | καρδιά | 12,0128 | 51,8761 | 5,9475 | 1,8302 | 2,5336 |
| | ουρά | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 9,0160 | 5,9013 |
| 68 | κεφαλή | 24,4324 | 139,1391 | 62,4564 | 7,3200 | 0,8012 |
| | καρδιά | 19,7632 | 49,5598 | 18,1631 | 2,1409 | 2,7778 |
| | ουρά | 10,6860 | 11,0682 | 4,5052 | 4,3774 | 6,3693 |
| 69 | κεφαλή | 11,2481 | 83,2858 | 30,6407 | 12,6677 | 0,0509 |
| | καρδιά | 21,0420 | 43,4083 | 15,5674 | 1,8599 | 0,0654 |
| | ουρά | 9,7821 | 17,5867 | 5,8880 | 2,5380 | 0,4811 |
| 70 | κεφαλή | 25,8539 | 80,8317 | 32,2576 | 23,3568 | 2,5068 |
| | καρδιά | 18,2078 | 53,2178 | 20,6169 | 13,9900 | 3,5040 |
| | ουρά | 21,2351 | 29,1624 | 14,6726 | 2,6755 | 8,2359 |

| ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|---|--|---|---|--------------------------------|
| Σειρές | Δείγματα | 2-φαινυλοαιθάνολη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Μεθανόλη (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Οξικός αιθυλεστέρας (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Γαλακτικός αιθυλεστέρας (gr/100 lt άνυδρης αλκοόλης) | Αιθανόλη (% αλκοόλ) |
| A | κεφαλή | 1,6656 | 79,5229 | 546,4546 | 11,5806 | 52,0156 |
| | καρδιά | 3,7800 | 37,8928 | 23,6125 | 6,8340 | 38,4323 |
| | ουρά | 6,0028 | 80,5806 | 143,0746 | 9,4072 | 28,2544 |
| B | κεφαλή | 2,8212 | 70,9249 | 20,6786 | 16,7613 | 41,6057 |
| | καρδιά | 2,6431 | 71,7260 | 20,7452 | 15,6311 | 40,8668 |
| | ουρά | 12,7900 | 127,9567 | 44,6505 | 19,3716 | 16,6276 |
| Γ | κεφαλή | 3,1900 | 76,6359 | 30,4205 | 3,4439 | 43,8491 |
| | καρδιά | 3,6900 | 77,5745 | 26,9616 | 14,5701 | 31,1203 |
| | ουρά | 2,5569 | 85,8621 | 34,3705 | 3,2995 | 23,5704 |
| Grana Venerato | κεφαλή | 0,7352 | 79,4731 | 399,5130 | 1,3603 | 64,6633 |
| | καρδιά | 1,4847 | 72,3245 | 29,8304 | 5,9101 | 55,8833 |
| | ουρά | 7,1389 | 104,0319 | 18,2347 | 12,9818 | 29,2481 |
| Λουκα- δάκης | κεφαλή | 0,8943 | 61,1137 | 167,0921 | 8,6626 | 64,5480 |
| | καρδιά | 3,3685 | 85,2163 | 20,4420 | 12,6824 | 40,3165 |
| | ουρά | 22,3849 | 155,4714 | 54,4912 | 15,0549 | 12,4566 |
| 68 | κεφαλή | 0,8968 | 83,3520 | 277,5151 | 2,2586 | 74,9250 |
| | καρδιά | 3,7087 | 108,2823 | 3,7774 | 9,1636 | 49,7391 |
| | ουρά | 10,0432 | 160,4796 | 4,7521 | 19,5466 | 28,7371 |
| 69 | κεφαλή | 1,8986 | 80,3998 | 346,9364 | 2,3636 | 58,0170 |
| | καρδιά | 4,4792 | 92,3510 | 8,2338 | 1,3642 | 48,1608 |
| | ουρά | 5,9215 | 84,9300 | 5,4221 | 1,2890 | 34,3670 |
| 70 | κεφαλή | 1,5438 | 122,8085 | 40,2356 | 4,3954 | 49,8547 |
| | καρδιά | 2,9307 | 140,2341 | 6,8918 | 5,9887 | 36,5091 |
| | ουρά | 8,0270 | 205,7235 | 5,2922 | 10,6791 | 24,9723 |

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Κομνιανού Αικατερίνη, (2009), Το αρωματικό δυναμικό αποσταγμάτων στεμφύλων, που παράγονται με τη βοήθεια διαφορετικών αποστακτικών στηλών, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών ειδίκευση οινολογίας-αμπελουργίας, Γεωπονική σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- ❖ Έλενα Παπαϊωάννου Παπαγιάννη, (2012), Χημειομετρική διάκριση του κυπριακού παραδοσιακού κρασιού Κουμανδαρία, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Τμήμα Χημείας.
- ❖ Apostolos Spyros and Photis Dais (2013) ***NMR Spectroscopy in Food Analysis***. Published by the Royal Society of Chemistry.
- ❖ Food Research International 42 (2009) 1483–1491, Hong-Seok Son, Geum-Sook Hwang, Hyuk-Jin Ahn , Won-Mok Park, Cherl-Ho Lee, Young-Shick Hong, ***Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data***, σελίδα 1485.
- ❖ Food Chemistry 138 (2013) 1837–1846, Charalambos Fotakis, Dionysis Christodouleas, Katerina Kokkotou, Maria Zervou, Panagiotis Zoumpoulakis, Panagiotis Moulos, Maria Liouni, Antony Calokerinos, ***NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits***, σελίδες: 1837-1840 και 1844-1845.
- ❖ Food Research International 54 (2013) 1184–1194, Charalambos Fotakis, Katerina Kokkotou, Panagiotis Zoumpoulakis, Maria Zervou, ***NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview***, σελίδες: 1187 και 1190.
- ❖ ***Πηγές internet:***
 - <https://nomoi.info/%CE%A6%CE%95%CE%9A-%CE%91-281-2001-%CF%83%CE%B5%CE%BB-1.html>

- ❖ http://www.seaop.gr/userfiles/9d9c9654-0889-46c3-a607-1a938e37966c/R.110_2008.pdf

- ❖ https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A0%CF%85%CF%81%CE%B7%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CF%82_%CE%BC%CE%B1%CE%B3%CE%BD%CE%B7%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CF%82_%CF%83%CF%85%CE%BD%CF%84%CE%BF%CE%BD%CE%B9%CF%83%CE%BC%CF%8C%CF%82

- ❖ http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_9_10.pdf