



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Χημειομετρική διάκριση δειγμάτων τσίπουρου με χρήση
φασμάτων FT-IR, SNIF-NMR, IR-MS**

**ΤΙΚΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Χημειομετρική διάκριση δειγμάτων τσίπουρου με χρήση φασμάτων FT-IR,
SNIF-NMR, IR-MS**

ΤΙΚΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

A.M.: 41507

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Λιούνη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Λιούνη Μ., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Μαυρομούστακος Θ., Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Μεθενίτης Κ., Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 27/06/17

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν διττός. Αφενός έγινε προσπάθεια διάκρισης των ελληνικών τσίπουρων και αφετέρου μεταξύ τσίπουρων και άλλων αλκοολούχων ποτών. Η διαδικασία αυτή της διερεύνησης μεθοδολογίας διάκρισης των διαφόρων τύπων αλκοολούχων ποτών, αναδεικνύει ζητήματα γνησιότητας-αυθεντικότητας και αποφυγής νοθείας, τα οποία παραμένουν πάντα επίκαιρα

Συγκεκριμένα, η διάκριση επιτυγχάνεται με χρήση ενόργανων φασματοσκοπικών τεχνικών, οι οποίες βασίζονται στη μεταβολή ισοτοπικών λόγων βάσει γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης του εκάστοτε δείγματος (SNIF-NMR, IR-MS) , καθώς επίσης και στην απορρόφηση ακτινοβολίας υπερύθρου με μετασχηματισμούς Fourier (FT-IR), η οποία δίνει φάσματα που σχετίζονται με τη σύσταση των ποτών.

Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χημειομετρικές-στατιστικές μεθόδους, οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα δόμησης και ταξινόμησης των φασμάτων, των δειγμάτων σε ομάδες, η δημιουργία των οποίων ερμηνεύεται μέσω παραγόντων όπως η πρώτη ύλη, η διαδικασία παρασκευής, η γεωγραφική και η βοτανική προέλευση κ.α.

Τέλος, έμφαση δόθηκε σχετικά με τη λήψη των φασμάτων FT-IR στην προ-κατεργασία των δειγμάτων πριν να ληφθεί το κάθε φάσμα. Με αυτό τον τρόπο εξετάζεται η δυνατότητα βελτίωσης στη διάκριση των δειγμάτων τσίπουρου.

Σε ό,τι αφορά τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των φασμάτων FT-IR, διακρίθηκαν ικανοποιητικά, με χρήση μεθόδων PCA, HCA, τα δείγματα τσίπουρου σε σχέση με δείγματα ούζου και δείγματα άλλων αλκοολούχων ποτών. Επίσης μέσω της μεθόδου RDA, δείγματα ούζων και τσίπουρων ταξινομήθηκαν σχετικά ικανοποιητικά (70,45%).

Παρόλα αυτά, διάκριση τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο, έλαβε χώρα μέσω της ανάλυσης των ισοτοπικών λόγων με PLS-DA, PCA, δίνοντας άριστη ταξινόμηση (100%) στις δύο αυτές κλάσεις. Η χημειομετρική επεξεργασία των ισοτοπικών λόγων επίσης, έδωσε και βελτιωμένη ταξινόμηση των δειγμάτων τσίπουρου και ούζου (92,86%) μέσω PLS-DA.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οινολογία-Φασματοσκοπία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: τσίπουρο, χημειομετρία, φασματοσκοπικές τεχνικές, γνησιότητα, προ-κατεργασία, σταθερά ισότοπα

ABSTRACT

In this thesis we study the discrimination between greek spirit "tsipouro" and samples of other alcoholic beverages. This process, of development methodology for the differentiation of various types of alcoholic beverages, tends to remind us topics such as authenticity and adulteration problems, which are of great importance and very crucial.

For the above discrimination, different spectroscopic techniques -based on the change in isotopic ratios- have been applied for studying changes in the isotope ratio (SNIF-NMR,IR-MS) that are related with the geographical and botanical origin. Also, the IR absorption (FT-IR), which is related with the sample's composition, is tested.

Then, all the spectra gained have been analysed by the use of chemometrics, in order to create teams and find differences between the samples, or study the classification of our samples. These teams are explained in terms of geographical and botanical origin, raw materials and production process etc.

Last but not least, it was the pre-processing that was checked for the FT-IR spectra. Specifically, it was checked if the different pre-processing techniques helped us to have a better distinction of the tsipouro samples.

As for the results, the chemometrical process of the FT-IR spectra leads to a good classification between tsipouro and ouzo samples, using RDA (70,45%) and also to a excellent discrimination between tsipouro, ouzo and samples of other alcoholic beverages, using PCA and HCA.

However, the only way to distinguish tsipouro samples with anise, from tsipouro samples without anise, is by stable isotope analysis ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$). PLS-DA and PCA resulted to an excellent classification (100%) for the two classes. Also, the same methods achieved a better classification between ouzo and tsipouro samples (92,86%), than RDA in FT-IR spectra.

SUBJECT AREA: Oenology-Spectroscopy

KEYWORDS: tsipouro, chemometrics, spectroscopic techniques, authenticity, pre-process, stable isotopes

Αφιερώνεται στους φίλους και την οικογένεια μ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια , Λιούνη Μαρία, για τη συνεργασία και τη βοήθεια που μου παρείχε, καθώς επίσης και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου αυθεντικότητας τροφίμων του Γενικού Χημείου του Κράτους (ΓΧΚ) της Κύπρου (Κοκκινόφτα Ρεβέκκα, Οικονομίδου Νάσω, Τζιωνή Ελένη, Σαββίδου Χαρά και Λουκά Χαράλαμπο) στο οποίο υλοποίησα τα πειράματα της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες παράλα αυτά, θα ήθελα να αποδώσω στην υπεύθυνη του εργαστηρίου αυθεντικότητας τροφίμων κα. Ρεβέκκα Κοκκινόφτα-Διογένους για την καθοδήγηση, τη χημειομετρική επεξεργασία των φασματικών δεδομένων και γενικότερα τη βοήθεια της, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Στη συνέχεια, κρίνω απαραίτητο να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Θ. Μαυρομούστακο που μου σύστησε την επιλογή του Γ.Χ.Κ. της Κύπρου για την πραγματοποίηση του πειραματικού σκέλους της διατριβής, καθώς επίσης και την κα. Κανάρη, η οποία με αποδέχθηκε ως πρόεδρος του Γ.Χ.Κ. της Κύπρου, τον κ. Γιαννόπουλο, ο οποίος ήταν δίπλα μου ως υπεύθυνος του τομέα τροφίμων και τον λέκτορα του πανεπιστημίου Κύπρου κ. Αγαπίου για τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις συμβουλές του στη συγγραφή του βιβλιογραφικού τμήματος της διατριβής .

Κλείνοντας, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω το γραφείο του προγράμματος Erasmus για την ευκαιρία την οποία μου έδωσε για τη μετάβασή μου στην Κύπρο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	v
Κεφάλαιο 1: Τσίπουρο και Απόσταξη	1
1.1 Διευκρινίσεις ονομασίας τσίπουρου-τσικουδιάς	1
1.2 Ιστορικά στοιχεία	2
1.2.1 Ιστορικά στοιχεία απόσταξης	2
1.2.2 Ιστορικά στοιχεία τσίπουρου.....	5
1.3 Παραγωγική διαδικασία του τσίπουρου.....	7
1.3.1 Κατηγορίες-είδη απόσταξης.....	12
1.4 Η σύσταση του τσίπουρου	14
Κεφάλαιο 2: Χημειομετρία	25
2.1 Γενικά στοιχεία	25
2.2 Χημειομετρικές Μέθοδοι.....	27
2.2.1.: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis).....	27
2.2.2. Ανάλυση κατά συστάδες (Cluster Analysis).....	29
2.2.3. Διακριτική ανάλυση (Discriminant Analysis)	31
2.2.4. Δένδρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης (Classification and Regression Trees, CART)	32
2.2.5. Ανάλυση Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Analysis, PLS)	34
Κεφάλαιο 3: Γνησιότητα τροφίμων & ποτών - Αναλυτικές τεχνικές	35
3.1. Πιστοποίηση και σημασία της γνησιότητας	35
3.2. Αναλυτικές μέθοδοι	38
3.2.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	38
3.2.2.: IR-MS (Φασματομετρία μάζας ισοτοπικών λόγων).....	41
3.2.3. FT-IR (Φασματοσκοπία Υπερύθρου – Μετασχηματισμού Fourier).....	44

3.3. Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων	49
3.3.1. Περιστροφικός συμπυκνωτής/εξατμιστής (rotary evaporator).....	49
3.3.2. Διασπορά ελαίου περιστροφικού εξατμιστή σε δισκίο KBr	50
Κεφάλαιο 4: Πειραματικό μέρος	52
4.1. Δειγματοληψία.....	52
4.2. Ανάλυση FT-IR σε πλάκες ATR με απευθείας εφαρμογή.....	53
4.3. Συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή	54
4.4. Δημιουργία δισκίων KBr	54
4.5. Υπόλειμμα Απόσταξης.....	55
4.6. Λήψη φασμάτων με FT-IR.....	56
4.7. Προετοιμασία δειγμάτων για IR-MS (δ C ¹³ , δ O ¹⁸)	61
4.8. Προετοιμασία δειγμάτων για SNIF-NMR	62
Κεφάλαιο 5: Χημειομετρική ανάλυση	64
5.1.: Ανάλυση φασμάτων FT-IR.....	64
5.1.1. Διάκριση δειγμάτων τσίπουρου από άλλα ξένα αποστάγματα	64
5.1.2. Διάκριση δειγμάτων τσίπουρου από ούζου	68
5.1.3. Διάκριση τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο	73
5.1.4. Συμπεράσματα	79
5.2. Ανάλυση δεδομένων ισοτοπικών λόγων	80
5.2.1.: Σύγκριση τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο με PCA και PLS-DA	81
5.2.2. Διάκριση τσίπουρου από άλλα αποστάγματα με PCA.....	84
5.2.3.: Ταξινόμηση τσίπουρων και ούζων με PLS-DA.....	87
5.2.4.: Συμπεράσματα	91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92
Βιβλιογραφία εικόνων.....	100
Βιβλιογραφία σχημάτων.....	101
Πίνακας ορολογίας.....	102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1.1.: Αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης Π.Ο.Π. & Π.Γ.Ε.	37
Πίνακας 3.2.2.1.: Εφαρμογές SNIF-NMR και IR-MS σε αλκοολούχα ποτά	44
Πίνακας 3.2.3.1.: Εφαρμογές FT-IR σε αλκοολούχα ποτά	48
Πίνακας 4.1.1.: Τα δείγματα τσίπουρου της μελέτης	52
Πίνακας 4.6.1.: Φασματικές περιοχές ενώσεων αποσταγμάτων	57
Πίνακας 4.6.2.: Τυπικές περιοχές δονήσεων χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων	57
Πίνακας 5.1.2.1.: Αθροιστική διακύμανση κύριων συνιστωσών	68
Πίνακας 5.1.2.2.: Ταξινόμηση σε 2 ομάδες με RDA.....	72
Πίνακας 5.1.3.1.: Αθροιστική διακύμανση κύριων συνιστωσών.....	74
Πίνακας 5.1.3.2.: Ταξινόμηση σε δύο ομάδες μέσω CART.....	77
Πίνακας 5.2.1.: Οι τιμές των σταθερών ισοτοπικών λόγων των δειγμάτων της μελέτης	80
Πίνακας 5.2.1.1.: Ταξινόμηση δειγμάτων τσίπουρου με PLS.....	83
Πίνακας 5.2.3.1.: Ταξινόμηση δειγμάτων σε ομάδες.....	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.2.1.1.: Παράσταση Μεσαιωνικών αποστακτήρων.....	3
Εικόνα 1.2.1.2.: Σύγχρονη συσκευή απόσταξης με κλασματική στήλη.....	5
Εικόνα 1.4.3.: Αλκοόλες αποσταγμάτων στεμφύλων.....	18
Εικόνα 1.4.4.: Οξέα τα οποία απαντούν στο τσίπουρο και την τσικουδιά.....	19
Εικόνα 1.4.5.: Ο χημικός τύπος της φουρφουράλης.....	22
Εικόνα 1.4.7.: Οι ισομερείς μορφές της ανηθόλης.....	24
Εικόνα 3.1.1.: Τα σήματα Π.Ο.Π. και Π.Γ.Ε.	36
Εικόνα 3.2.1.1.: Οργανολογία φασματομέτρου NMR.....	39
Εικόνα 3.2.1.1.1.: Τυπικό φάσμα SNIF-NMR της αιθανόλης για έλεγχο αυθεντικότητας	41
Εικόνα 3.2.2.1.: Σχηματική απεικόνιση ενός φασματόμετρου μάζας λόγου ισοτόπων για μέτρηση CO ₂	43
Εικόνα 3.2.3.1.: Διαχωρισμός του μέσου IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων.....	46
Εικόνα 3.2.3.1.: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου IR διπλής δέσμης	46
Εικόνα 3.3.2.1.: Πρέσα και καλούπι για παρασκευή δισκίου KBr.....	51
Εικόνα 4.2.1.: Φασματοφωτόμετρο Υπερύθρου Jasco-6100 και οθόνη εργασίας.....	53
Εικόνα 4.2.2.: Βάση με πλάκα κρυστάλλου ATR	53
Εικόνα 4.3.1.: Περιστροφικός συμπυκνωτής Buchi R-124.....	54
Εικόνα 4.4.1.: Μεταλλικός υποδοχέας χαπιού KBr	55
Εικόνα 4.7.1.: Φασματόμετρο Eurovector IR-MS-Euro EA και οθόνη εργασίας.....	61
Εικόνα 4.8.1.: Φασματογράφος N.M.R. <i>Bruker Snif</i> - Ultrashield 400 MHz	62
Εικόνα 4.8.2.: Τιτλομετρική συσκευή Karl Fischer	63
Εικόνα 5.1.1.1.: Διάγραμμα σκέδασης της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών	65
Εικόνα 5.1.1.2.: Δενδρόγραμμα από Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες 18 δειγμάτων.....	66
Εικόνα 5.1.1.3.: Διάγραμμα σκέδασης 18 δειγμάτων αποσταγμάτων.....	67
Εικόνα 5.1.2.1.: Διάγραμμα σκέδασης 44 δειγμάτων ούζων-τσίπουρων-ζιβάνιας.....	70

Εικόνα 5.1.3.1.: Διάγραμμα σκέδασης 21 δειγμάτων τσίπουρων-τσικουδιάς	75
---	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.3.1.: Διάγραμμα ροής παραγωγής τσίπουρου.....	11
Σχήμα 1.3.1.1.: Τα είδη της απόσταξης	12
Σχήμα 1.4.1.: Η πορεία παραγωγής μεθανόλης.	16
Σχήμα 1.4.2.: Γενική πορεία σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα.	18
Σχήμα 1.4.6.: Αντίδραση σχηματισμού ακεταλών.....	23
Σχήμα 2.1.1.: Διάγραμμα ταξινόμησης μεθόδων Χημειομετρίας.....	26
Σχήμα 2.2.1: Βήματα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών.....	28
Σχήμα 2.2.2.1.: Δενδρόγραμμα HCA.....	30
Σχήμα 2.2.2.2.: Βήματα υλοποίησης	30
Σχήμα 2.2.3.1.: Απεικόνιση τετραγωνικών και γραμμικών ορίων	32
Σχήμα 2.2.4.1.: Δενδρογράμματα ομοιότητας και απόστασης παρατηρήσεων [40].....	33
Σχήμα 2.2.4.2.: Υπολογιστική διαδικασία της τεχνικής CART.....	33
Σχήμα 2.2.5.1.: Λογική λειτουργίας PLS [49].....	34
Σχήμα 3.1.1.: Συνοπτικό διάγραμμα για τα σήματα ποιότητας	35
Σχήμα 3.2.3.3.: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου FT-IR.....	47
Σχήμα 4.6.1: Φάσμα τσίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο.....	58
Σχήμα 4.6.2.: Φάσμα σύγκρισης αποσταγμάτων.....	58
Σχήμα 4.6.3.: Σύγκριση φασμάτων τσίπουρου διαφορετικής προκατεργασίας.....	59
Σχήμα 4.6.4.: Φάσμα πρώτης παραγωγού τσίπουρων στο NIR.....	60
Σχήμα 5.1.2.1.: Σχηματικό ποσοστό διακύμανσης μεταβλητών ανά συνιστώσα	69
Σχήμα 5.1.2.2.: Σχηματική συμπεριφορά των 44 δειγμάτων ούζου-τσίπουρου	73
Σχήμα 5.1.3.1.: Σχηματικό ποσοστό διακύμανσης μεταβλητών ανά συνιστώσα	74
Σχήμα 5.1.3.2.: Σχηματική συμπεριφορά 21 δειγμάτων τσίπουρου-τσικουδιάς.....	78

Σχήμα 5.2.1.1.: Διάγραμμα σκέδασης 19 δειγμάτων τσίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο	81
Σχήμα 5.2.1.2.: Διάγραμμα φορτίων για τη σημασία των μεταβλητών.....	82
Σχήμα 5.2.1.3.: Διάγραμμα προβλέψεων-παρατηρήσεων για έλεγχο προσαρμογής των δειγμάτων των τάξεων στο μοντέλο.....	83
Σχήμα 5.2.1.4.: Διάγραμμα σκέδασης τριών διαστάσεων μέσω PLS	84
Σχήμα 5.2.2.1.: Διαγράμματα σημασίας συνεισφοράς και διακύμανσης μεταβλητών	85
Σχήμα 5.2.2.2.: Διάγραμμα σκέδασης για διάκριση τσίπουρων από άλλα αποστάγματα (πράσινο=τσίπουρα, κόκκινο=ούζα, μπλε=τσικουδιά και κίτρινο=ξένα ποτά).....	86
Σχήμα 5.2.3.1.: Οι διακυμάνσεις των συντελεστών του μοντέλου παλινδρόμησης κάθε μεταβλητής και η σχετική σημασία τους (VIP) στη δόμηση.....	88
Σχήμα 5.2.3.2.: Διάγραμμα φορτίων για τη σημασία-των μεταβλητών	88
Σχήμα 5.2.3.3: Διάγραμμα προβλέψεων-παρατηρήσεων για έλεγχο προσαρμογής των δειγμάτων των τάξεων στο μοντέλο.....	89
Σχήμα 5.2.3.4.: Διάγραμμα σκέδασης PLS-DA για διάκριση τσίπουρου (1)από τσικουδιά (3) και ούζο (2).....	90

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Φαινόμενα εξαπάτησης και νοθείας με συνηθέστερο κίνητρο τη μεγιστοποίηση κέρδους, αποτελούν συνηθισμένη πρακτική στο χώρο των αλκοολούχων ποτών. Το τσίπουρο όπως και άλλα αλκοολούχα ποτά ανά τον κόσμο με σήματα ποιότητας-γνησιότητας (ΠΟΠ - ΠΓΕ) συχνά υπόκεινται σε τέτοιες πρακτικές μιας και πετυχαίνουν υψηλή προστιθέμενη αξία. Η ανάγκη, συνεπώς, προστασίας των καταναλωτών με ανάδειξη της μοναδικότητας του κάθε προϊόντος, αλλά και ελέγχου επιβεβαίωσης επισήμανσής του σε ότι αφορά την πρώτη ύλη, τα συστατικά, τη διαδικασία παραγωγής και τη γεωγραφική προέλευση, προβληματίζουν αρκετά την επιστημονική κοινότητα.

Η ευκαιρία γνωριμίας μου με τον έλεγχο για αποφυγή τέτοιων φαινομένων στο εργαστήριο αυθεντικότητας τροφίμων του ΓΧΚ της Κύπρου ήταν πρόσφορη. Με έφερε σε επαφή με εφαρμογή προηγμένων φασματοσκοπικών τεχνικών και με πρόσωπα αφοσιωμένα στον έλεγχο της αυθεντικότητας. Η καθοδήγηση κι η βοήθεια που έλαβα, με έκαναν να εξοικειωθώ με τη λογική της ανάλυσης των ισοτοπικών λόγων (IR-MS, SNIF-NMR) και με τη χρήση χημειομετρίας για επεξεργασία και διάκριση των ογκωδέστατων δεδομένων των φασμάτων.

Η δυνατότητα επίσης χρήσης φασματομέτρου FT-IR (Mid-IR και NIR) για λήψη φασμάτων τσίπουρου, με έκαναν να μελετήσω ενδελεχώς τη σύσταση αυτού του ποτού αλλά και να δοκιμάσω μεθόδους προ-κατεργασίας ώστε να βελτιωθεί η όποια διάκριση μέσω των διαφόρων τεχνικών χημειομετρίας.

Κεφάλαιο 1: Τσίπουρο και Απόσταξη

1.1 Διευκρινίσεις ονομασίας τσίπουρου-τσικουδιάς

«Τσίπουρο» ονομάζεται το ποτό το οποίο παρασκευάζεται από απόσταξη στεμφύλων σταφυλιών (τσίπουρα) με ή χωρίς υγιή οινολάσπη ή γλευκολάσπη σταφυλιών. Η πρώτη ύλη για την παραγωγή του τσίπουρου είναι πάντα τα στέμφυλα, δηλαδή τα υπολείμματα των σταφυλιών, λευκών ή κόκκινων, που μένουν μετά την έκθλιψη και την εξαγωγή του μούστου για την παραγωγή κρασιού. Στα διάφορα μέρη της Ελλάδας τα λένε «τσίπουρα» (Θεσσαλία, Μακεδονία, Ήπειρος) ή τσάμπουρα ή στράφυλα ενώ οι Κρητικοί τα ονομάζουν «τσίκουδα». Το ποτό λοιπόν με την παραπάνω προέλευση ονομάζεται τσίπουρο ή τσικουδιά [1,2,3,4,5].

Πιο συγκεκριμένα, τσικουδιά θεωρείται το αλκοολούχο απόσταγμα, το οποίο λαμβάνεται από την πρώτη απόσταξη των στεμφύλων και περιέχει μονάχα τα προϊόντα της ζύμωσης των στεμφύλων, χωρίς άλλη εξωγενή προσθήκη ή επεξεργασία. Το απόσταγμα αυτό παρασκευάζεται κυρίως στην Κρήτη και περιλαμβάνει μόνο τα αρωματικά συστατικά του σταφυλιού, σε αντίθεση με το τσίπουρο το οποίο μπορεί να περιέχει και άλλα αρωματικά συστατικά (π.χ. γλυκάνισο, μάραθο, κ.α.) [1,4,5].

Σύμφωνα με τη νομοθεσία ΕΚ 110/2008 (Ευρωπαϊκή Ένωση 2008), στην κατηγορία «αποστάγματα στεμφύλων», καθορίζονται τέσσερις ονομασίες προέλευσης και γεωγραφικής ένδειξης για την Ελλάδα (*τσίπουρο Θεσσαλίας, τσικουδιά Κρήτης, τσίπουρο Μακεδονίας, τσίπουρο Τυρνάβου*), καθώς και οι προδιαγραφές οι οποίες πρέπει να έχουν τα ποτά με την επωνυμία *τσίπουρο* ή *τσικουδιά*, οι οποίες είναι οι ακόλουθες: [1,4,5,6].

- Ο αλκοολικός βαθμός τους πρέπει να είναι τουλάχιστον 37% vol. στους 20°C.
- Το ανώτατο όριο απόσταξης να είναι το 86% vol.
- Το ανώτατο όριο μεθανόλης είναι 1000g/hL απόλυτης αλκοόλης.

1.2 Ιστορικά στοιχεία

1.2.1 Ιστορικά στοιχεία απόσταξης

Παραστάσεις σε αγγεία, νομίσματα καθώς και κείμενα μαρτυρούν την παραγωγή του οίνου 3000 χρόνια πριν τη γέννηση του Χριστού. Επίσης, σύμφωνα με μελέτες, ο άνθρωπος πήρε γλεύκος από πίεση σταφυλιών πριν περίπου 10.000 χρόνια χωρίς βέβαια να είναι γνωστός ο προορισμός του. Παρόλα αυτά όμως, η πρώτη εφαρμογή της απόσταξης σε αλκοολούχο ποτό αλλά και γενικότερα η χρήση της δεν είναι γνωστό πότε πρωτοέλαβε χώρα και από ποιόν. Οι εκτιμήσεις σχετίζονται με ευρήματα συσκευών παρεμφερών του άμβυκα και με χρονολόγηση αυτών [7,8].

Απλοί αποστακτήρες, οι οποίοι χρονολογούνται στο 4000 π.Χ. πιθανολογείται πως έχουν βρεθεί στη Μεσοποταμία, όπου σύμφωνα με σφηνοειδείς επιγραφές χρησιμοποιούνταν προς παρασκευή αρωμάτων και ροδόνηρου. Σε αρχαιολογικές ανασκαφές επίσης στην Tere Gawra, 20 χιλιόμετρα ανατολικά της Μοσούλης του Β.Ιράκ, ήρθε στην επιφάνεια δοχείο χωρητικότητας 37 λίτρων κατασκευασμένο από ψημμένη γη με περιλαίμιο 2 λίτρων, το οποίο χρονολογείται στο 3.500 π.Χ. και θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια πρώιμη προσπάθεια απόσταξης με τη μορφή που γνωρίζουμε σήμερα [1,2].

Η καταγωγή της απόσταξης δεν είναι γνωστή, μα η χρήση του άμβυκα τείνει να αποδοθεί στους Έλληνες, μιας και την εποχή της ακμής του Μυκηναϊκού πολιτισμού τον 16^ο αιώνα π.Χ. υπήρχαν και βάσει ευρημάτων, αξιόλογοι Έλληνες τεχνίτες στην κατεργασία του χαλκού. Η χρήση του άμβυκα επιπλέον φαίνεται πως ήταν διαδεδομένη στην Αίγυπτο τον 13^ο αιώνα π.Χ. για τη χρήση φαρμάκων και καλλυντικών, γεγονός το οποίο εξηγεί μια πιθανή εξάπλωση από την Ελλάδα [1,2,9].

Κείμενα όπως του Ησίοδου τον 7^ο αιώνα π.Χ., επίσης αναφέρουν τον άμβυκα για απόσταξη υδραργύρου αλλά και οι Ιπποκράτης και Αριστοτέλης (Μετεωρολογικά Β') αναφέρουν ότι οι Έλληνες του 5^{ου} και 4^{ου} αιώνα π.Χ. έκαναν χρήση της απόσταξης για μετατροπή του θαλασσινού νερού σε πόσιμο. Η ύπαρξη των αναφορών αυτών μαζί και με το γεγονός ότι η αρχαία ελληνική

λέξη άμβυξ αποτελεί τη ρίζα των λέξεων “alambic” των Γάλλων και “alembic” των Άγγλων για την απόσταξη, αφού προηγουμένως υπέστη αραβοποίηση με την προσθήκη του άρθρου “al”, συνηγορούν με τη σειρά τους στην ελληνική προέλευση της συσκευής του άμβυκα. Παρόλα αυτά, θεωρείται σχεδόν απίθανο οι Έλληνες να χρησιμοποιούσαν την απόσταξη για ενίσχυση των αλκοολούχων ποτών, μιας και ο οίνος ήταν σίγουρα αρκετός στη λιτή ζωή που έκαναν [1,9].

Οδεύοντας χρονικά προς το μεσαίωνα, οι Άραβες αλχημιστές είναι εκείνοι οι οποίοι έρχονται στο προσκήνιο μέσω της προσπάθειάς τους να δημιουργήσουν τη φιλοσοφική λίθο προς θεραπεία κάθε ασθένειας και για να παρασκευάσουν χρυσό από χαμηλής αξίας μέταλλα. Με αυτό τον τρόπο, οι αλχημιστές ανακαλύπτουν ξανά και βελτιώνουν την τεχνική της απόσταξης περισώζοντας με αυτό τον τρόπο και διευρύνοντας τις γνώσεις της αρχαιότητας, το έλλειμμα των οποίων στις μέρες μας, αποδίδεται σε σημαντικό βαθμό στις καταστροφές τις οποίες υπέστη η βιβλιοθήκη της Αλεξάνδρειας [5,9].



Εικόνα 1.2.1.1.: Παράσταση Μεσαιωνικών αποστακτήρων.

Οι μοναχοί των μοναστηριών του 14^{ου}-15^{ου} αιώνα και ιδιαίτερα οι Βενεδικτίνοι ανέδειξαν την απόσταξη αλκοολούχων ποτών. Τα μοναστήρια αυτά με την παραγωγή ποιοτικών κρασιών που διέθεταν, οδηγήθηκαν στην περαιτέρω κατεργασία τους με κυρίαρχο σκοπό την παρασκευή φαρμάκων, δημιουργώντας έτσι πολλές συνταγές, οι οποίες εμπορευματοποιήθηκαν και διαδόθηκαν. Τα φάρμακα αυτά λοιπόν δεν ήταν τίποτα περισσότερο από αλκοολούχα ποτά, τα οποία μέσω του

εμπορίου και της θρησκείας μεταφέρθηκαν στη δύση μαζί και με τη γνώση της απόσταξης [1,2,5,9].

Κάτι αντίστοιχο και για τα ελληνικά δεδομένα λοιπόν την εποχή εκείνη, λάμβανε χώρα και στο Άγιο Όρος. Σε συγγράμματα αγιορειτών μοναχών, δίδεται η εικόνα της εφαρμογής απόσταξης από αυτούς προς αξιοποίηση του καθετί το οποίο δεν είχε αξία από τα παραπροϊόντα του οίνου, όπως π.χ. οινολάσπη, στέμφυλα κ.α., μίας και στην αγιορείτικη κοινωνία το κρασί παρουσίαζε και από θεολογική σκοπιά τεράστιο ενδιαφέρον [1,5,10].

Σχετικά με τη χρήση του άμβυκα λοιπόν, καταγράφεται μια σειρά γεγονότων. Αρχικά δημιουργείται, ένα σκίτσο το 15^ο αιώνα ενός άμβυκα που μοιάζει αρκετά με τους σύγχρονους παραδοσιακούς αποστακτήρες από τον πολυεπιστήμονα Leonardo Da Vinci (1452-1519 μ.Χ.). Έπειτα, συγκροτούνται το 1537 μ.Χ. στο Παρίσι αυτοδύναμες ενώσεις αποσταγματοποιών, σχεδόν παράλληλα με γραπτές αναφορές για εξαγωγή κονιάκ στην Αγγλία και την Ιρλανδία το 1559 μ.Χ.. Τα γεγονότα αυτά, αποδεικνύουν περίτρανα όχι μόνο την εξάπλωση αποδοτικών συσκευών αλλά και τη συστηματική εκμετάλλευση της απόσταξης για παραγωγή αλκοολούχου αποστάγματος προς εμπορική εκμετάλλευση [1,2,5,9].

Συνεχίζοντας το ταξίδι στο χρόνο, είναι επίσης γεγονός πως στο τέλος του 18^{ου} αιώνα, τότε που οι βάσεις της χημείας θεμελιώνονταν από τον Λαβουαζιέ (1743-1794 μ.Χ.), εμφανίζονται συσκευές άμβυκα οι οποίες είναι παρεμφερείς με τους σύγχρονους. Συγκεκριμένα, ο Γάλλος ιατρός, χημικός και πολιτικός Σαπτάλ το 1780, αλλά και ο Edouard Adam το 1805 υλοποιούν αυτές τις βελτιώσεις [1,2,5,9].

Η πραγματικότητα αυτή, σε συνδυασμό με την ανακάλυψη του πυκνομέτρου και την υλοποίηση μελετών σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην εξάτμιση της αλκοόλης, δίνουν μια επιστημονική διάσταση στο φαινόμενο της απόσταξης.

Στο 19^ο αιώνα, οι αποστακτικές στήλες παρά τις βελτιώσεις είναι απλές που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα. Στον 20^ο αιώνα παράγονται αποστακτικές στήλες, οι οποίες μπορούν να αφαιρέσουν όλα τα

δευτερεύοντα συστατικά από ένα προϊόν απόσταξης και να δώσουν καθαρή αλκοόλη [1,2,4,5].



Εικόνα 1.2.1.2.: Σύγχρονη συσκευή απόσταξης με κλασματική στήλη.

1.2.2 Ιστορικά στοιχεία τσίπουρου

Η πρώτη χρήση στεμφύλων σταφυλιού για παραγωγή αλκοολούχου ποτού, ανάγεται στην αρχαία Ελλάδα. Συγκεκριμένα αναφέρεται η παρασκευή του οίνου «σαπρίας», του οποίου η ξεχωριστή ευωδία αποδίδεται στην προσθήκη αρωματικών κυρίως φυτών, τα οποία σάπιζαν σε αυτόν μαζί με τα στέμφυλα. Όμως, κάτι παρεμφερές με απόσταγμα στέμφυλων γίνεται στην αρχαία Ελλάδα για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια των Ελληνιστικών χρόνων (323 - 30 π.Χ.), όπου γίνεται λόγος για ένα ποτό, το «τρίμμα», το οποίο εικάζεται πως ήταν το αντίστοιχο του τσίπουρου, το οποίο παρασκευαζόταν από τη ζέστη και την απόσταξη επί της ουσίας των φλοιών του σταφυλιού, ακόμα και μαζί με πέταλα λουλουδιών, προφανώς για την προσθήκη αρώματος. Άλλη παρόμοια επίσης αναφορά αποδίδεται και στο ποτό «σίκερα». Από την ιστορική αναδρομή, φαίνεται ότι η τεχνική της απόσταξης για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών θα μπορούσε πρώτα να έλαβε σάρκα και οστά αρχικά στην Αίγυπτο, από τους χημικούς της Αλεξάνδρειας προς πειραματισμό [1,5].

Η απόσταξη με τη μορφή τέχνης όμως, αναπτύσσεται στον Ελλαδικό χώρο κατά τους Βυζαντινούς χρόνους, στις μονές του Αγίου Όρους στη χερσόνησο

του Άθω, όπως προαναφέρθηκε. Μοναχοί οι οποίοι διαβιούσαν εκεί απόσταζαν τα παραπροϊόντα του κρασιού, πράγμα που δηλώνει ότι ο άνθρωπος θέλησε να εκμεταλλευτεί όσον το δυνατόν περισσότερο το δώρο του θεού, την άμπελο. Οι μοναχοί του Αγίου Όρους με τη σειρά τους, μυσούν τους μοναχούς των Μετεώρων στα μυστικά της απόσταξης και με αυτόν τον τρόπο, ως τον 15ο αιώνα μ.Χ. η τέχνη της απόσταξης των στεμφύλων προς παραγωγή τσίπουρου ταξιδεύει και στις γύρω περιοχές. Η Ήπειρος, η Μακεδονία, η υπόλοιπη Θεσσαλία, αλλά και η Κρήτη καθώς και πολλά άλλα μέρη της Ελλάδας αρχίζουν να παρουσιάζουν αποστακτική δραστηριότητα [1,5,10].

Για πολλούς αιώνες, όπως άλλωστε είναι λογικό, το τσίπουρο παραγόταν ερασιτεχνικά από τους χωρικούς, ως ένα μέσο αξιοποίησης των στέμφυλων, τα οποία διαφορετικά θα απορρίπτονταν. Η κατανάλωσή του γινόταν κυρίως από τα ασθενέστερα κοινωνικά στρώματα και η παραγωγή του γίνονταν σε μικρούς χάλκινους άμβυκες, παλαιάς τεχνολογίας, σχεδόν ανεξέλεγκτα και κάτω από υποτυπώδεις συνθήκες υγιεινής. Σε ό,τι έχει να κάνει με το εμπόριο του νέου αυτού προϊόντος, λάμβανε χώρα μόνο μικρή εμπορία μέσα στο νομό παραγωγής του και στους όμορους νομούς, πάντα σε χύμα μορφή, αφού κάθε είδος τυποποίησης ήταν απαγορευμένος [1,2,5,10]

Το 1883, το επίσημο Ελληνικό κράτος θεσπίζει τον πρώτο νόμο για την φορολόγηση της αλκοόλης και το 1896 δίνονται οι πρώτες επίσημες άδειες για την παραγωγή αποστάγματος στέμφυλων. Παρόλα αυτά βέβαια, μόλις το 1989, με την αντίστοιχη θέσπιση της Εθνικής και Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για τα αποστάγματα (Ν. 1802/1988 και Καν. 1576/1989), επιτρέπεται η παραγωγή και εμφιάλωση τσίπουρου από επίσημες αποσταγματοποιείες [1,5,11,12]. Η παραπάνω νομοθετική μετατροπή σήμανε και την τεράστια στροφή στην ποιοτική εξέλιξη του τσίπουρου. Συνέβαλε καθοριστικά στην ανάπτυξη «αποστακτικής» κουλτούρας και στην άνθιση της βιομηχανικής παραγωγής του.

1.3 Παραγωγική διαδικασία του τσίπουρου

A. Η Πρώτη ύλη

Η πρώτη ύλη για την παραγωγή του τσίπουρου είναι πάντα **τα στέμφυλα**, δηλαδή τα ράκη των σταφυλιών, λευκών ή κόκκινων, που μένουν μετά την έκθλιψη και την εξαγωγή του μούστου για την παραγωγή κρασιού. Τα στέμφυλα αποτελούνται από βοστρύχους (κοτσάνια), γίγαρτα (κουκούτσια), φλοιούς και περικλείουν κάποιο ποσοστό γλεύκους αζύμωτου, γλεύκους σε ζύμωση ή και κρασί. Γενικά, τα γίγαρτα αποτελούν το 3-6%, η φλούδα το 6-9% και η σάρκα το 75-85% αυτής της μάζας. Τα στέμφυλα συνεπώς διακρίνονται τρεις κατηγορίες [1,4,5,8,10,13]:

α) Τα αζύμωτα στέμφυλα τα οποία εξάγονται από τα πιεστήρια μετά την πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του γλεύκους και προέρχονται συνήθως από λευκά σταφύλια.

β) Τα ζυμωμένα στέμφυλα τα οποία προέρχονται από ερυθρή οινοποίηση και περιέχουν μικρότερη ή μεγαλύτερη ποσότητα κρασιού, ανάλογα με τη συμπίεση την οποία έχουν υποστεί κατά την παραλαβή του κρασιού.

γ) Τα ημιζυμωμένα στέμφυλα, τα οποία προκύπτουν όταν η απομάκρυνση των υγρών γίνει πριν το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και συνεπώς περιέχουν σάκχαρα αζύμωτα και ταυτόχρονα αιθανόλη.

B. Η ζύμωση των στεμφύλων

Για να μας δώσουν αλκοολούχο απόσταγμα τα στέμφυλα, θα πρέπει αφενός να μην έχουν αποστραγγιστεί εντελώς και αφετέρου να έχουν υποστεί αλκοολική ζύμωση, ώστε τα σάκχαρα του εναπομένου στα στέμφυλα μούστου να μετατραπούν σε αλκοόλη [1,5].

Γενικότερα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στέμφυλα τα οποία ζυμώνονται ξεχωριστά από τον κύριο όγκο του γλεύκους, τα οποία προέρχονται από λευκή οινοποίηση αλλά και από «ερυθρά

οινοποίηση», όπου έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ροζέ ή λευκού κρασιού με απευθείας συμπίεση. Μετά την έξοδο λοιπόν από το πιεστήριο είναι απαραίτητο στην περίπτωση της ξεχωριστής ζύμωσης, τα στέμφυλα να διαβραχούν, ώστε να διαχυθούν στη μάζα τους οι ζύμες οι οποίες υπάρχουν και να αρχίσει η ζύμωση. Για το σκοπό αυτό στο δοχείο τοποθετούνται διαδοχικά νερό και στέμφυλα σε αναλογία 1:1. Εάν η θερμοκρασία είναι χαμηλή, πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη διαβροχή θερμό νερό και τα δοχεία πρέπει να είναι στεγανά. Για διευκόλυνση επίσης της έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης κι εφόσον στα αζύμωτα στέμφυλα δεν υπάρχουν πολλές ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν οινολάσπες από ζυμωμένο κρασί, οι οποίες πρέπει να αναμιγνύονται με νερό και να προσθέτονται διαδοχικά στα στέμφυλα όπως προαναφέρθηκε. Η ζύμωση διαρκεί περίπου 30 μέρες όταν τα στέμφυλα ζυμώνονται μόνα τους και πολύ λιγότερο (περίπου 15 μέρες) όταν ζυμώνονται μαζί με το μούστο (ερυθρά οινοποίηση). Φροντίζεται μάλιστα τα στέμφυλα να ζυμώνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (20°C) για να διατηρηθούν τα ποικίλα αρώματά τους [5,8,13,14,15].

Τέλος, θα πρέπει να δίνεται πολύ μεγάλη προσοχή στην αποφυγή οξικής ζύμωσης κατά τη διάρκεια της επιθυμητής αλκοολικής ζύμωσης στα στέμφυλα, μιας και δεν πραγματοποιείται προσθήκη θειώδους ανυδρίτη, αφού αυτός περνά στο τελικό απόσταγμα δίνοντας δυσάρεστες οσμές, οι οποίες αποδίδονται σε υδρόθειο, μερκαπτάνες κι άλλα θειούχα παράγωγα [8,13,14,15].

Γ. Η απόσταξη

Όταν η ζύμωση των στεμφύλων έχει ολοκληρωθεί, αυτά οδηγούνται στα καζάνια (αποστακτήρες ή άμβυκες) μαζί με την οινολάσπη που έχουν κατακρατήσει στη μάζα τους, για να γίνει η απόσταξη. Οι παραδοσιακοί άμβυκες είναι συνήθως χάλκινοι, ένας μέτριος έχει χωρητικότητα περίπου 100 λίτρων. Το λαμβανόμενο απόσταγμα διαφέρει ως προς τη χημική σύσταση και τα οργανοληπτικά συστατικά από το απόσταγμα που θα παίρναμε αποστάζοντας το αντίστοιχο κρασί. Η διαφορά βρίσκεται στα αρωματικά συστατικά τα οποία θυμίζουν την

προέλευση του. Είναι συστατικά που υπάρχουν στα στέμφυλα και σε πολλούς καταναλωτές είναι ιδιαίτερα ευχάριστα [1,5,14,15,16,17].

Μέσα στα καζάνια επίσης προσθέτονται, κατά βούληση, διάφορα αρωματικά ή μίγματα αρωματικών (συνήθως σπόροι ή και φυτικά τμήματα), σε ποσότητες και αναλογίες που συνήθως είναι τα μυστικά του κάθε αποστάγματος, συναποστάζονται με τα στέμφυλα και καταλήγουν κάθε φορά σε ένα ιδιαίτερο απόσταγμα με αρωματικό χαρακτήρα. Συνήθως, το τσίπουρο αρωματίζεται με γλυκάνισο ή μάραθο, οι σπόροι των οποίων προσθέτονται επίσης στον άμβυκα. Η γλυκανισιάτη γεύση προέρχεται από το αιθέριο έλαιο του γλυκάνισου, το οποίο αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό του από την ανηθόλη. Το αιθέριο έλαιο ανοίγει την όρεξη, βοηθάει την πέψη κι είναι καταπραϋντικό [1,5,14,15].

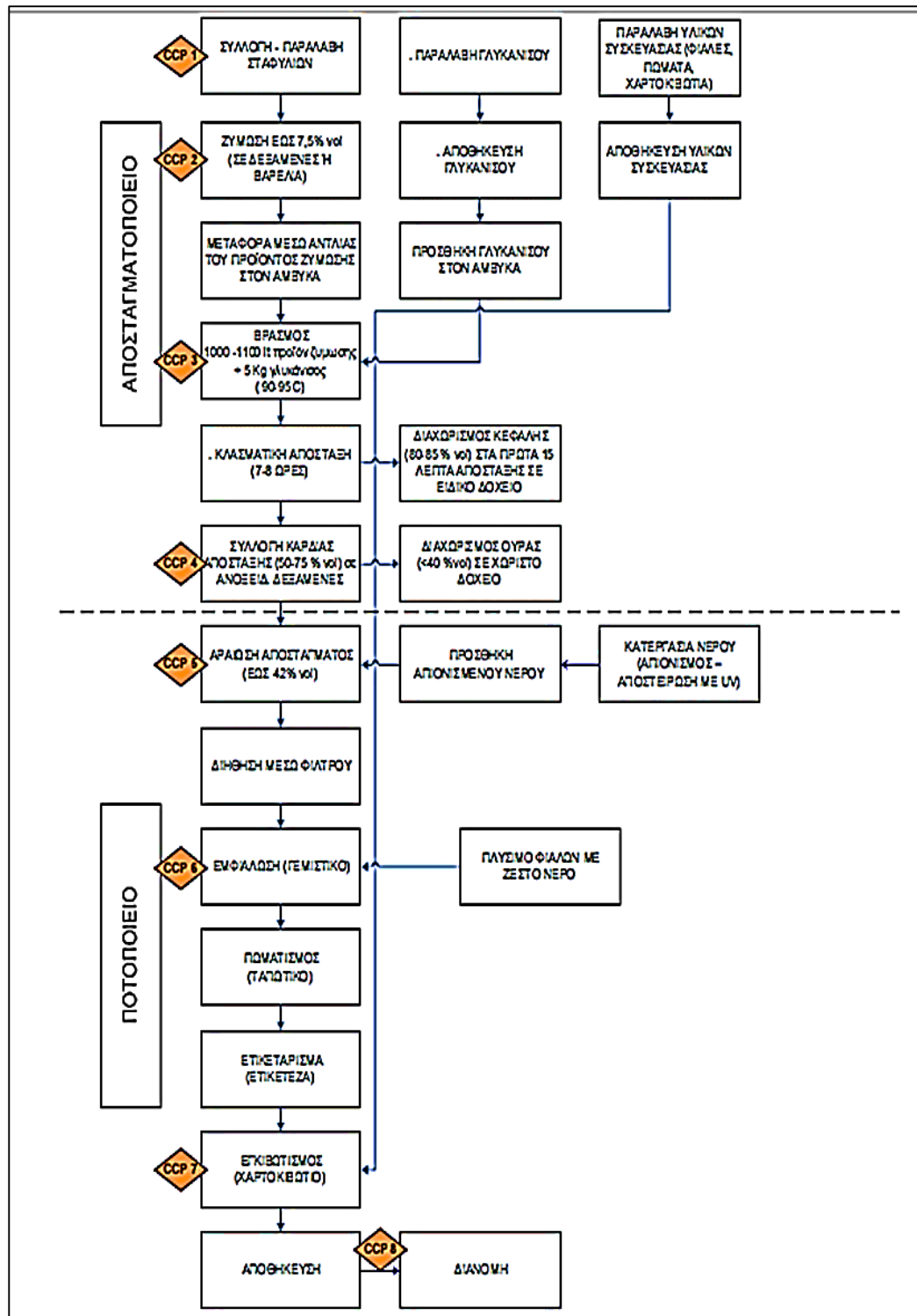
Με ή χωρίς αρωματικούς σπόρους, το καζάνι σφραγίζεται ερμητικά και η απόσταξη αρχίζει. Η απόσταξη είναι αργή και η θερμοκρασία παρακολουθείται συνεχώς. Καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει, οι ατμοί περνούν και οδηγούνται στον ψυκτήρα, όπου και υγροποιούνται. Σταγόνα- σταγόνα αρχίζουν να συγκεντρώνονται στο δοχείο συλλογής. Συλλέγονται ξεχωριστά οι κεφαλές, η καρδιά και οι ουρές (τα πρώτα, τα μεσαία και τα τελευταία αποστάγματα, αντίστοιχα) [1,4,5,13,14,15,16].

Η κεφαλή έχει μεγάλο αλκοολικό βαθμό (60-80% v/v) και είναι πλούσια σε αλδεΐδες, οι οποίες προσδίδουν μια σκουριασμένη γεύση στο τσίπουρο, ενώ η ουρά περιέχει πολλές ανώτερες αλκοόλες καθώς και μεθανόλη, λόγω του γεγονότος πως είναι υδατοδιαλυτή, που βαραίνουν τη γεύση και το άρωμα. Απομακρύνονται και μπαίνουν ξανά στον αποστακτήρα μαζί με την επόμενη παρτίδα, ενώ η καρδιά συλλέγεται. Ο διαχωρισμός αυτός έχει σκοπό την απομάκρυνση ουσιών με δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και ουσιών επιβλαβών για τον ανθρώπινο οργανισμό και γίνεται εμπειρικά με βάση κυρίως τα οργανοληπτικά κριτήρια του τεχνίτη και τις συνταγές, οι οποίες κληροδοτούνται από γενιά σε γενιά. Το κύριο πρόβλημα πάντως είναι η περιεχόμενη μεθανόλη στα σχετικά αποστάγματα [5,15,16,17,18].

Κατά την πρώτη απόσταξη συλλέγεται ένα απόσταγμα (σούμα), το οποίο αποτελεί το 15 με 20% του αρχικού όγκου. Μετά το τέλος της απόσταξης, το υπόλειμμα απορρίπτεται. Στη δεύτερη απόσταξη

γεμίζεται ο άμβυκας κατά 80-90% με σούμα και λαμβάνεται η καρδιά. Η καρδιά της δεύτερης απόσταξης συνήθως αραιώνεται με νερό για να φτάσει στον αλκοολικό τίτλο των 40-45 % vol, με τον οποίο και το τσίπουρο κυκλοφορεί στο εμπόριο. Πολλές φορές βέβαια, το προϊόν που λαμβάνεται από την πρώτη απόσταξη (καρδιά) καταναλώνεται χωρίς να υποστεί δεύτερη απόσταξη. Το διπλό αποσταγμένο τσίπουρο, όμως, είναι καθαρότερο και λεπτότερο σε άρωμα και γεύση [1,4,5,13,14,16,17,18].

Τεράστια προσοχή θα πρέπει να δίνεται όταν υπάρχει επαφή στέμφυλων με τον πυθμένα του βραστήρα, όπου προκαλείται απανθράκωση τους, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυσάρεστες οσμές καμένου υλικού, οι οποίες φυσικά θα διέλθουν στο απόσταγμα. Το νερό διαβροχής των στεμφύλων εδώ διευκολύνει τη θέρμανση των στέμφυλων και την μετατροπή της αλκοόλης σε ατμούς. Αντίστοιχα με τα στέμφυλα στο καζάνι συχνά προσθέτονται, σε ένα μικρό ποσοστό, και οινολάσπες οι οποίες λόγω της ρευστότητας τους καταλήγουν στον πυθμένα. Η υπερθέρμανση τους είναι πιθανό να δημιουργήσει δυσάρεστες οσμές από την πυρόλυση των οργανικών ουσιών που περιέχουν, οι οποίες και θα διέλθουν επίσης στο απόσταγμα. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η μηχανική ανάδευση εντός του άμβυκα, η οποία αποτρέπει τη σταθερή επαφή της οινολάσπης με τον πυθμένα [4,8,14,15].



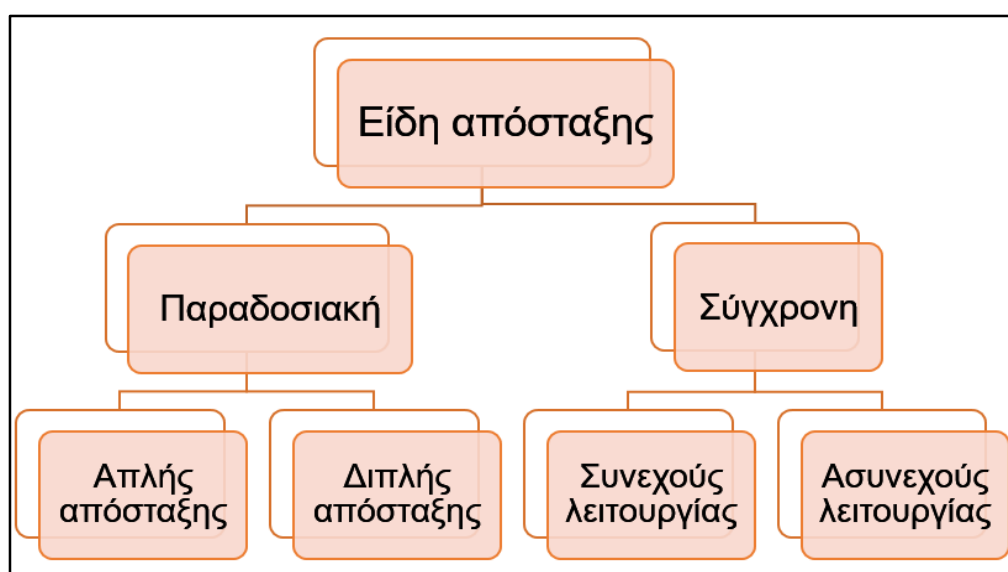
Σχήμα 1.3.1.: Διάγραμμα ροής παραγωγής τσίπουρου.

1.3.1 Κατηγορίες-είδη απόσταξης

Οι αποστακτικές συσκευές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αποσταγμάτων στέμφυλων σταφυλής και ιδιαίτερα του τσίπουρου, μπορεί να είναι απλές αποστακτικές συσκευές χωρίς στήλες (άμβυκες παραδοσιακοί ή μη), όπως επίσης και συσκευές με αποστακτική στήλη, ασυνεχούς ή συνεχούς λειτουργίας [1,5,8,15].

Γενικότερα και προς αποφυγή παρανοήσεων παρουσιάζεται ο εξής διαχωρισμός :

- Παραδοσιακή απόσταξη
- Σύγχρονη απόσταξη



Σχήμα 1.3.1.1.: Τα είδη της απόσταξης

Οι μέθοδοι απόσταξης, οι οποίες παρουσιάζονται στο σχήμα 1.3.1.1., εμφανίζουν διαφορές. Οι κυριότερες εξ αυτών, εντοπίζονται στα πολύ μεγαλύτερα μεγέθη άμβυκα στη σύγχρονη απόσταξη (~1000L) σε σχέση με την παραδοσιακή (~100L) καθώς επίσης στην ύπαρξη κλασματικής στήλης στη σύγχρονη απόσταξη, η οποία απουσιάζει από την παραδοσιακή απόσταξη (όπου υπάρχει ο λουλάς-κάλυμμα) και παρέχει ένα πολλαπλώς αποσταγμένο προϊόν [1,5,8,15,19].

Οι παραδοσιακές αποστάξεις μπορούν να υλοποιηθούν είτε με απλή απόσταξη και συλλογή της καρδιάς, είτε με διπλή όπου συλλέγεται η σούμα και επαναποστάζεται για συλλογή της καρδιάς. Ο πιθανός

αρωματισμός λαμβάνει χώρα αντίστοιχα πριν από την πρώτη και πριν από τη δεύτερη απόσταξη. Οι σύγχρονες αποστάξεις με τη σειρά τους, λόγω και της κλασματικής στήλης που διαθέτουν, διακρίνονται σε συνεχείς και ασυνεχείς όπου: [1,5,15,19]

- Ασυνεχείς συσκευές: Μετά από ένα πλήρη κύκλο απόσταξης και πλήρη εξάντληση της αλκοόλης διακόπτεται η λειτουργία και ο νέος κύκλος προετοιμάζεται.
- Συνεχείς συσκευές: Εδώ η τροφοδοσία της πρώτης ύλης και η παραγωγή του αποστάγματος γίνονται με συνεχή ροή. Η λειτουργία μιας αποστακτικής στήλης συνεχούς λειτουργίας μπορεί να θεωρηθεί ως μια σειρά απλών αποστάξεων ισορροπίας, όπου τα προϊόντα κάθε βαθμίδας είναι οι τροφοδοτήσεις της προηγούμενης και επόμενης βαθμίδας. Οι συσκευές αυτές είναι βιομηχανικής εμβέλειας.

Στην Ελλάδα οι αποστακτικές συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι όλες ασυνεχούς λειτουργίας. Τα εξαρτήματα-μέρη της σύγχρονης απόσταξης είναι τα εξής: Λέβητας, στήλη ανακαθαρισμού ή κλασματική στήλη, ψυκτήρας ή συμπυκνωτήρας [1,5].

1.4 Η σύσταση του τσίπουρου

Τα βασικά συστατικά ενός «αποστάγματος στεμφύλων» είναι η αιθανόλη και το νερό. Συστατικά, τα οποία βρίσκονται σε μικρή αναλογία αλλά παίζουν καθοριστικό ρόλο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι οι ανώτερες αλκοόλες, τα πτητικά οξέα, οι αλδεύδες, οι αιθυλεστέρες αλλά και διάφορες άλλες οργανικές ενώσεις, οι οποίες προσδίδουν ξεχωριστό χαρακτήρα, άρωμα και γεύση στα αποστάγματα στεμφύλων. Η μεγάλη περιεκτικότητα κάποιου από αυτά τα συστατικά αλλά και η μικρότερη αντίστοιχα κάποιων άλλων, κάνουν το απόσταγμα μοναδικό και ανάλογο και με τον καταναλωτή περισσότερο ή λιγότερο ελκυστικό [1,2,4,5,10].

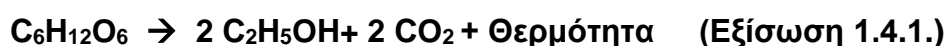
A) Το νερό → H_2O / σ.β. : $100^{\circ}C$ / ειδικό βάρος: 1

Το νερό είναι το συστατικό, το οποίο περιέχεται συνήθως σε μεγαλύτερη ποσότητα στα οινοπνευματώδη ποτά, κάτι που συμβαίνει και στο τσίπουρο. Προέρχεται από το σταφύλι και επιπλέον προστίθεται στον άμβυκα πριν την απόσταξη αλλά και μετά από αυτή κατά την αραίωση του αποστάγματος στον επιθυμητό αλκοολικό βαθμό [1,4,5,8].

B) Οι αλκοόλες

B₁) Η αιθυλική αλκοόλη → C_2H_5OH / σ.β. : $78,4^{\circ}C$ / ειδικό βάρος: 0,7943

Η αιθυλική αλκοόλη είναι η μοναδική ασφαλής για ανθρώπινη κατανάλωση, ταξινομείται φαρμακολογικά, ως γενικό κατασταλτικό και μπορεί να προκαλέσει καταστολή του κεντρικού νευρικού συστήματος. Είναι το κύριο προϊόν της ζύμωσης των σακχάρων από τους ζυμομύκητες κατά τη διεργασία της αλκοολικής ζύμωσης σύμφωνα με την αντίδραση:



Η αιθυλική αλκοόλη είναι το συστατικό, το οποίο μετά το νερό, περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία στα αποστάγματα. Η περιεκτικότητά της, % κατ' όγκον στους $20^{\circ} C$, αποτελεί τον αλκοολικό τίτλο ή

αλκοολομετρικό τίτλο, ο οποίος κυμαίνεται από 47 έως 56% vol στην παραδοσιακή απόσταξη και 42 έως 46% vol στο τσίπουρο αποσταγματοποιίας. Σύμφωνα με τον πρόσφατο Κανονισμό 110/2008 της ΕΟΚ ορίζεται πως η απόσταξη συντελείται παρουσία των στεμφύλων, σε λιγότερο από 86% vol, ενώ ως ελάχιστος κατ' όγκο αλκοολικός τίτλος του αποστάγματος ορίζεται το 37.5% vol, το οποίο ποσοστό αλκοόλης έχει υιοθετηθεί και από την εθνική νομοθεσία για το τυποποιημένο απόσταγμα. Για το τσίπουρο και την τσικουδιά, τα οποία παράγονται στην παραδοσιακή απόσταξη και διατίθενται χύμα από τους αποσταγματοποιούς, η εθνική νομοθεσία αναφέρει ότι ο ελάχιστος αλκοολικός τίτλος ανέρχεται σε 35% vol.

Ο αλκοολικός τίτλος στα αποστάγματα εξαρτάται εκτός από την τελική αραίωση του αποστάγματος με νερό και από τη μέθοδο απόσταξης των στεμφύλων, αλλά και από τον αλκοολικό τίτλο του περιεχομένου στα στέμφυλα οίνου [4,5,8,20,21,22].

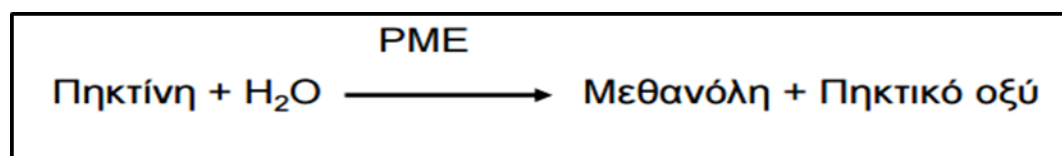
B2) Η μεθυλική αλκοόλη → CH_3OH / σ.β. : 64,7°C / ειδικό βάρος: 0,796

Η μεθυλική αλκοόλη παρατηρήθηκε το 1661, από τον Robert Boyle ως ουδέτερη ουσία στο υγρό το οποίο λαμβάνεται από την απόσταξη του ξύλου. Οι Dumas και Peligot απομονώνουν τη μεθανόλη και προσδιορίζουν τη δομή της το 1834 [23].

Η μεθανόλη αποτελεί μια ουσία με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί είναι πολύ τοξική. Η λήψη της μεθανόλης από τον ανθρώπινο οργανισμό σε μεγάλες ποσότητες, οδηγεί σε σοβαρή μέθη εξαιτίας της συγκέντρωσης ιδιαίτερα τοξικών προϊόντων μεταβολισμού της, όπως της φορμαλδεΐδης και του μυρμηκικού οξέος καθώς και λόγω της παρεμπόδισης την οποία προκαλεί στο μεταβολισμό της αιθανόλης. Σε υπερβολικές συγκεντρώσεις η μεθανόλη συνήθως προκαλεί πονοκέφαλο, κόπωση, ίλιγγο, ναυτία, διαταραχές της όρασης, τύφλωση, ακόμα και θάνατο. Η μεθανόλη μεταβολίζεται στο ανθρώπινο σώμα βραδέως, παράγοντας φορμαλδεΐδη και μυρμηκικό οξύ, το οποίο είναι εξαιρετικά τοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ακόμη και 2 μέρες μετά τη λήψη της το 1/3 αυτής παραμένει στο σώμα. Ως εκ τούτου, σε παρα

πολλές χώρες, η περιεκτικότητα σε μεθανόλη των αλκοολούχων ποτών ελέγχεται [23,24].

Πηγή της μεθανόλης είναι το σταφύλι αλλά δεν αποτελεί προϊόν της ζύμωσης, όπως οι άλλες αλκοόλες οι οποίες υπάρχουν στα αποστάγματα. Η μεθανόλη παράγεται με την επίδραση πηκτινολυτικών ενζύμων στις πηκτίνες του σταφυλιού με τη βοήθεια του ενζύμου *πηκτίνο-μεθυλο-εστεράση* και είναι συνεπώς προϊόν υδρόλυσης των πηκτινών [1,8,22,23]. Οι πηκτίνες είναι πολυμερισμένα παράγωγα του γαλακτουρονικού οξέος, μερικώς εστεροποιημένα από τη μεθανόλη και συμμετέχουν στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών των ξυλωδών μερών (βόστρυχες), με την επίδραση των πηκτινολυτικών ενζύμων απελευθερώνουν γαλακτουρονικό οξύ και μεθανόλη. Η αύξηση της μεθανόλης γίνεται τόσο κατά την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους όσο και κατά το διάστημα, κατά το οποίο τα στέμφυλα βρίσκονται σε επαφή μ' αυτό. Η περιεκτικότητα της μεθανόλης στα αποστάγματα ευνοείται από χοντρόφλουδες ποικιλίες σταφυλιών πλούσιων σε πηκτίνες, αλλά και από την παρουσία πολλών βοστρύχων [18,22-26].



Σχήμα 1.4.1.: Η πορεία παραγωγής μεθανόλης.

Η μεθανόλη αποτελεί ανεπιθύμητο συστατικό στα αποστάγματα και γι' αυτό η συγκέντρωσή της στα τσίπουρα πρέπει να είναι μικρότερη από 1000 g/hl άνυδρης αλκοόλης σύμφωνα με τον Κανονισμό 1576/1989 της ΕΟΚ [12].

Τέλος, η μεθανόλη είναι πολύ υδατοδιαλυτή με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής της προς το τέλος της απόσταξης, αν και έχει χαμηλό σημείο βρασμού. Η ιδιότητά της να αποστάζει μαζί με το νερό, μετά την αιθυλική αλκοόλη, την κάνει να θεωρείται προϊόν «ουράς» [1,5,18].

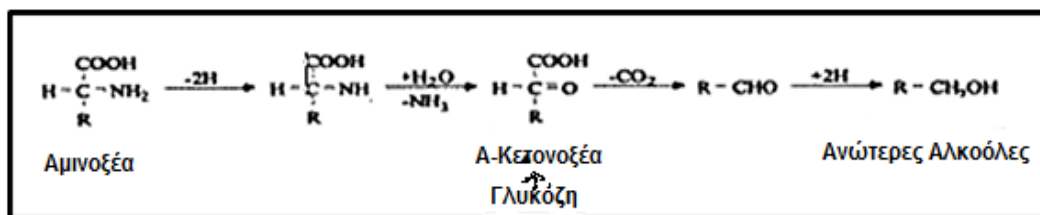
B₃) Ανώτερες Αλκοόλες (ζυμέλαια)

Τα αλκοολούχα ποτά, τα οποία προέρχονται από απόσταξη, όπως και το τσίπουρο, περιέχουν αλειφατικές αλκοόλες, οι οποίες περιέχουν περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα και έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος και σημείο ζέσεως από την αιθανόλη. Αποτελούν γενικά άχρωμα υγρά με περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό [7,8,18].

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι η μεγαλύτερη ποσοτικά ομάδα αρωματικών ενώσεων, οι οποίες υπάρχουν στα αλκοολούχα ποτά, και αποτελούν παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης με εξαίρεση την 1-εξανόλη, η οποία προέρχεται από τα σταφύλια. Συγκεκριμένα, σχηματίζονται από τα κετονοξέα (δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης) τα οποία προέρχονται από σάκχαρα με βάση την παρακάτω πορεία:

Σάκχαρα → Κετονοξέα → Ανώτερες αλκοόλες + CO₂ (Εξίσωση 1.4.2.)

Επίσης, παραγωγή ανώτερων αλκοολών μπορεί να προέλθει και από την απαμίνωση αμινοξέων, με κύρια τη βαλίνη, τη λευκίνη, την ισολευκίνη τη θρεονίνη και τη φαινυλαλανίνη, προς σχηματισμό ξανά κετονοξέων. Με τον τρόπο αυτό, παράγεται και η απαραίτητη αμμωνία για το μεταβολισμό των ζυμών [18,24,27]. Τα ζυμέλαια μπορούν να αναγνωριστούν από την δυνατή, δριμεία οσμή και γεύση και παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην γεύση και τον χαρακτήρα των κρασιών και των αποσταγμάτων, είτε θετικό είτε αρνητικό [1,5]. Η συγκέντρωσή τους στο απόσταγμα εξαρτάται από τη μέθοδο οινοποίησης, τις συνθήκες ζύμωσης, αλλά και από την τεχνική της απόσταξης. Ευνοϊκοί παράγοντες για την υψηλή συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών είναι το είδος και το γένος των ζυμών, τα οποία παράγουν υψηλό αλκοολομετρικό τίτλο, το υψηλότερο σχετικά pH, η χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης και ο επαρκής αερισμός του γλεύκους στη διάρκεια ζύμωσης [1,5,18,28].



Σχήμα 1.4.2.: Γενική πορεία σχηματισμού ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, βρέθηκε ότι ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες *S. kudriavzevii* και *S. Uvarum* παράγουν τέσσερις φορές περισσότερη ποσότητα (~216 mg/L σε σχέση με 45mg/L) 2-φαινυλο-αιθυλική αλκοόλη σε σχέση με τις μεσόφιλες ζύμες του γένους *Saccharomyces* και επίσης παράγουν δυο φορές περισσότερη ισοβουτυλική και ισοαμυλική αλκοόλη από τις μεσόφιλες ζύμες [28].

Οι ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες ανιχνεύονται συνήθως στο τσίπουρο περιλαμβάνουν τις 1-προπανόλη, ισοπροπανόλη, 1-βουτανόλη, ισοβουτανόλη, πεντανόλες ή αμυλικές αλκοόλες, 1-εξανόλη, 1-επτανόλη, 2-φαινυλο-αιθανόλη, τυροσόλη, οκτανόλη, εννεανόλη, δεκανόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες, αν και αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στη διαμόρφωση του αρώματος των αποσταγμάτων, σε μεγάλες συγκεντρώσεις, πάνω από 500-600 mg/L είναι ανεπιθύμητες, γιατί είναι συστατικά ελαφρά τοξικά, όταν η συγκέντρωσή τους υπερβαίνει, τα συνηθισμένα όρια που προσδιορίζονται στα αποστάγματα (140-600 mg/L) [18,28].

Αλκοόλες
Αιθανόλη %
Μεθανόλη
1-Βουτανόλη
2-μέθυλο-1-προπανόλη
2-μέθυλο-1-βουτανόλη
3-μέθυλο-1-βουτανόλη
1-Εξάνιο
<i>trans</i> -3-εξεν-1-όλη
<i>cis</i> -3-εξεν-1-όλη

Εικόνα 1.4.3.: Αλκοόλες αποσταγμάτων στεμφύλων [18].

Γ) Τα οξέα

Το τσίπουρο περιέχει μεγάλο αριθμό οξέων, τα οποία συνεισφέρουν στο αρωματικό δυναμικό του. Τα οξέα του τσίπουρου, τα οποία στην πλειονότητά τους είναι πτητικά, σχηματίζονται ως δευτερογενή προϊόντα κατά την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση. Με τον όρο πτητικά οξέα αναφέρονται γενικά τα οξέα, τα οποία μπορούν να συναποσταχθούν με αλκοόλη και νερό και να συλληχθούν στα αποστάγματα. Ένας μικρός αριθμός από σταθερά οξέα, τα οποία υπάρχουν στο τσίπουρο, προέρχονται από τον οίνο και τα στέμφυλα και παρασύρθηκαν κατά την απόσταξη από το ρεύμα των ατμών [1,5,18].

Το **οξικό οξύ (CH₃COOH)** περιέχεται στη μεγαλύτερη αναλογία, ενώ τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, όπως: προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, ισοβαλεριανικό, βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας με 6 έως 18 άτομα άνθρακα, έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο τσίπουρο, αλλά έχουν λιγότερο δυνατό άρωμα και απλώς αυξάνουν την οξύτητα του αποστάγματος. Μακράς αλυσίδας ακόρεστα λιπαρά οξέα και στερόλες υπάρχουν και στην κυτταρική μεμβράνη των ζυμών διευκολύνοντας την μεταφορά ποικιλίας ενώσεων στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων των ζυμών, κάνοντας τις ζύμες ανθεκτικότερες, στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης [18,29,30].

Η συγκέντρωση των πτητικών οξέων, τα οποία περιέχονται στο τσίπουρο, εξαρτάται από τις συνθήκες οινοποίησης, την υγιεινή κατάσταση των στεμφύλων, αλλά και από την τεχνική της απόσταξης [1,4,5,8,18].

Οξέα
Βουτανικό οξύ Ισοβουτανικό οξύ (2-μέθυλο-προπανικό οξύ) Ισοβαλερικό οξύ (μέθυλο βουτυρικό οξύ) Εξανικό οξύ (καπροϊκό οξύ) Οκτανικό οξύ (καπρυλικό οξύ) Δεκανικό οξύ (καπρικό οξύ) Δωδεκανικό οξύ (λαυρικό οξύ)

Εικόνα 1.4.4.: Οξέα τα οποία απαντούν στο τσίπουρο και την τσικουδιά

Δ) Εστέρες

Οι εστέρες ανήκουν στην ομάδα των πτητικών συστατικών στις οποίες οφείλεται το ευχάριστο και ιδιαίτερο άρωμα τόσο των οίνων όσο και των αποσταγμάτων. Παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των σακχάρων. Παράλληλα και κατά τη διάρκεια της παλαίωσης είναι δυνατό να συμβούν διάφορες χημικές μεταβολές, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ορισμένων εστέρων, αφού είναι γνωστό ότι τα ελεύθερα οργανικά οξέα του οίνου αντιδρούν με την αιθανόλη και σχηματίζουν τους εστέρες [1,4,5,7,8,18,28].

Η αντίδραση αυτή, η οποία στην θερμοκρασία περιβάλλοντος εξελίσσεται πολύ αργά, δίνεται από την παρακάτω εξίσωση (για το σχηματισμό του οξικού μεθυλεστέρα).



Οι εστέρες οι οποίοι υπάρχουν στο τσίπουρο και συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμά του είναι οι αιθυλεστέρες των οξέων: βαλεριανικό, καπρικό, οινανθικό, καπρυλικό, καπρικό, λαυρικό, παλμιτικό, οι αμυλεστέρες των οξέων: οξικό, βαλεριανικό και οι ισοαμυλεστέρες των οξέων: οξικό, καπρικό. Η τεχνική της απόσταξης διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παρουσία των εστέρων στο απόσταγμα, ενώ η παρουσία των εστέρων στα στέμφυλα ευνοείται από τις ζύμες υψηλής ζυμωτικής ικανότητας, τις χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης, το υψηλό pH και την έλλειψη αερισμού [18,28,29,30].

Οι εστέρες με τη μεγαλύτερη αναλογία οι οποίοι περνάνε από τα στέμφυλα στο τσίπουρο, είναι ο γαλακτικός και ο οξικός αιθυλεστέρας. Ο οξικός αιθυλεστέρας έχει δυσάρεστη οσμή, ενώ ο γαλακτικός έχει ουδέτερη γεύση σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι αιθυλεστέρες των οξέων καπρονικού, καπρυλικού, καπρινικού και λαυρικού δίνουν ευχάριστο άρωμα και συντελούν στην αναβάθμιση της ποιότητας του αποστάγματος [5,7,8,18,29,30].

E) Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες είναι καρβονυλικές ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζονται ως δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Οι αλδεΐδες, σχηματίζονται και κατά τη διάρκεια της απόσταξης και περνούν στο απόσταγμα, κυρίως, ως προϊόντα «κεφαλής» (χαμηλά σημεία ζέσης). Παρόλα αυτά, ένα ποσοστό αλδευδών μπορεί να σχηματισθεί κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του αποστάγματος μέσω της οξειδωσης των αλκοολών [1,5,7,18,31].

E1) Η ακεταλδεΐδη → CH₃CHO / σ.β.: 20,5°C / ειδικό βάρος: 0,788

Από τις αλδεΐδες σε μεγαλύτερη αναλογία στα αποστάγματα βρίσκεται η ακεταλδεΐδη, η οποία μπορεί να αποτελέσει ως και το 90% των αλδευδών στο τσίπουρο και αποστάζει στα πρώτα λεπτά της απόσταξης. Έτσι, λογίζεται ως ουσία «κεφαλής» πράγμα το οποίο οφείλεται στο πολύ χαμηλό σημείο ζέσεως το οποίο έχει, προσδίδοντας μια γεύση κομμένης άψητης πατάτας. Λόγω της δριμείας γεύσης της, η ακεταλδεΐδη δίνει στο ποτό οξύ άρωμα, αν και συνήθως η οσμή της καλύπτεται από αυτή των αμυλικών αλκοολών. Η ύπαρξη μεγάλων συγκεντρώσεων αλδευδών στα αποστάγματα θεωρείται ως ένδειξη οξειδωσης ή ανεπιθύμητης μόλυνσης από βακτήρια [35,36,37,45].

Έχουν παρουσιαστεί επίσης διαφορές στην ποσότητα παραγωγής ακεταλδεΐδης από διαφορετικά στελέχη ζυμών, όπου ο *Saccharomyces cerevisiae* για παράδειγμα αποδίδει 0,5-286 mg/L ακεταλδεΐδης, ενώ ο *Kloeckera apiculata* 9,5-66 mg/L ακεταλδεΐδης στο απόσταγμα [23,24,32].

Ο σχηματισμός της αποδίδεται στους εξής 2 λόγους:

- Ενζυματική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος (ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης).
- Η οξειδωση της αιθυλικής αλκοόλης από το οξυγόνο του αέρα κατά την απόσταξη ή την ωρίμανση.

Αντίδραση οξειδωσης της αιθανόλης:

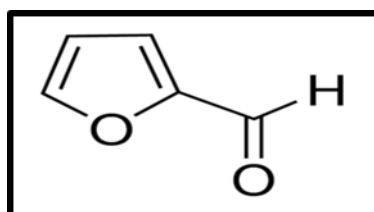


Πρέπει τέλος, να τονιστεί πως η ακεταλδεΐδη σε μελέτες εισπνοής, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε ζώα, έδειξε ικανή να παράγει καρκινώματα. Παρόλα αυτά όμως, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη χρόνια τοξικότητα της λήψης ακεταλδεΐδης από το στόμα [23].

E₂) Η φουρφουράλη → (C₄H₃O)CHO / σ.β.: 162°C / ειδικό βάρος: 1,16

Η φουρφουράλη είναι μια αλδεΐδη με δακτύλιο φουρανίου και σχηματίζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της απόσταξης (καθ' όλη τη διάρκεια) από την αφυδάτωση ορισμένων μη ζυμώσιμων ζαχάρων, των πεντοζών, που προκαλείται από τη θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Μάλιστα επειδή μεγάλο ποσοστό από μη ζυμώσιμες πεντόζες περιέχεται στο εσωτερικό των ραγών είναι γεγονός πως η φουρφουράλη απαντάται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα αποστάγματα στεμφύλων συγκριτικά με τα αποστάγματα οίνου [5,18,33].

Η φουρφουράλη είναι υγρή και άχρωμη και μετατρέπεται σε καστανή όταν έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η οσμή της θυμίζει πικραμύγδαλο και κανέλλα αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις πέραν της τοξικότητάς της, έχει δυσμενή επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος. Η υψηλή συγκέντρωσή της αποτελεί ακόμη, δείκτη υπερθέρμανσης της πρώτης ύλης κατά την απόσταξη [1,5,7,18,33,34], ενώ χαρακτηρίζεται ως πιθανά τοξική ουσία [34].

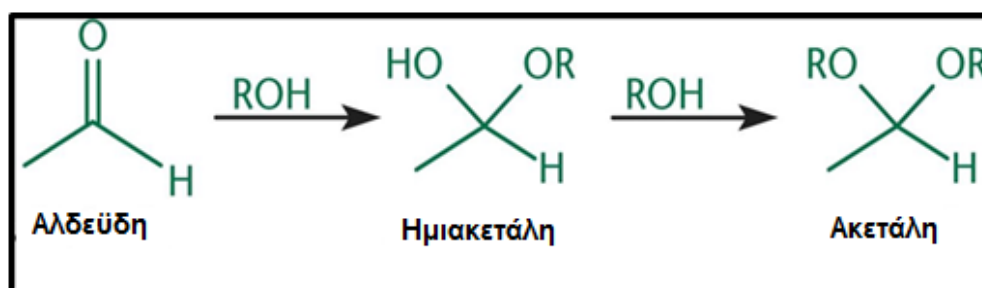


Εικόνα 1.4.5.: Ο χημικός τύπος της φουρφουράλης

E₃) Οι ακετάλες

Προέρχονται από την αντίδραση της ακεταλδεΐδης με την αιθανόλη. Ο σχηματισμός τους γίνεται σε δύο διαδοχικά στάδια. Στο πρώτο η αλδεΐδη αντιδρά με ένα μόριο αλκοόλης και σχηματίζει ημιακετάλη. Στο

δεύτερο η ημιακετάλη αντιδρά με ένα επιπλέον μόριο αλκοόλης και σχηματίζει την ακετάλη. Ο σχηματισμός των ακεταλών μειώνει το ποσοστό των ελευθέρων αλδευδών στο απόσταγμα. Ταυτόχρονα, με το σχηματισμό των ακεταλών βελτιώνεται και η δριμεία γεύση, η οποία προκαλείται από τις αλδεύδες. Ο σχηματισμός των ακεταλών λαμβάνει χώρα στα αποστάγματα με μεγάλη ταχύτητα, λόγω του υψηλού αλκοολικού βαθμού, αλλά επηρεάζεται επίσης και από το pH. Όξινο pH ευνοεί το σχηματισμό με μεγαλύτερη ταχύτητα [5,7,8,33].



Σχήμα 1.4.6.: Αντίδραση σχηματισμού ακεταλών

ΣΤ) Αρωματικά συστατικά

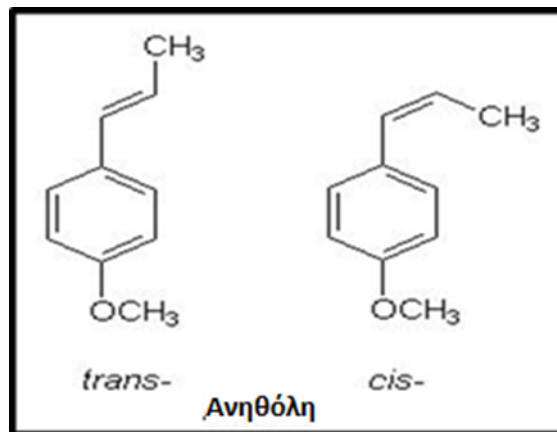
Η ανηθόλη, η ανισαλδεΐδη, η εστραγόλη, η ευγενόλη, οι ισοαμυλικές αλκοόλες, το λιμονένιο και η λιναλοόλη, έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετές έρευνες, ως σημαντικά συστατικά του αρώματος σε αποστάγματα γλυκάνισου και φυσικά και στο αρωματισμένο τσίπουρο. Άλλα πτητικά συστατικά, τα οποία αποστάζουν στο τελικό προϊόν είναι διάφορες τερπενικές ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από το σταφύλι, αλλά και η γλυκερόλη σε πολύ μικρές ποσότητες με μορφή εστέρων του παλμιτικού (C₁₆) και του στεατικού οξέος (C₁₈). Στο τσίπουρο βρίσκονται επιπροσθέτως σε ίχνη και διάφορα ανόργανα συστατικά σε ενώσεις τους, οι οποίες περνάνε στο απόσταγμα, επειδή παρασύρονται από τους ατμούς. Χημική ανάλυση σε οينوπνευματώδη ποτά γλυκάνισου έχει εκτελεστεί σε μια σειρά από μελέτες [1,5,18,35].

Η ανηθόλη (C₁₀H₁₂O / ειδικό βάρος 0,988) είναι η ουσία, το άρωμα της οποίας κυριαρχεί στο συνολικό μπουκέτο του τσίπουρου. Είναι

ευδιάλυτη στο οινόπνευμα άλλα όχι σε κάθε αναλογία, αφού σε χαμηλές θερμοκρασίες και αλκοολικό βαθμό σχηματίζει γαλάκτωμα ή θόλωμα. Η ανηθόλη επίσης, εμφανίζεται σε δύο ισομερείς μορφές τη *cis* και τη *trans*, με τη *trans* να αποτελεί το 99,5% και να είναι εκείνη στην οποία οφείλεται το μεγαλύτερο μέρος των αρωματικών στοιχείων. Αντίθετα η *cis*-ανηθόλη βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα (περίπου 10 mg/L αλκοολούχου ποτού) και παρουσιάζει τοξικότητα 20 φορές μεγαλύτερη της *trans*-ανηθόλης. Για το λόγο αυτό και απαγορεύεται η χρησιμοποίηση συνθετικής ανηθόλης στα ποτά [5,18,35,].

Η οξείδωση της ανηθόλης παράγει ένα επίσης αρωματικό συστατικό την ανισαλδεΐδη ($C_8H_8O_2$), η οποία και αποτελεί το δεύτερο σε ποσότητα συστατικό των ανισούχων εκχυλισμάτων [1,5,18,36].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η ανισαλδεΐδη, η *cis* και *trans* ανηθόλη αποτελούν προϊόντα «κεφαλής», ενώ οι εστραγόλη (ύπαρξη σε κανέλλα) και η ευγενόλη (ύπαρξη σε γαρύφαλλο) είναι προϊόντα «ουράς» [18,35,36].



Εικόνα 1.4.7: Οι ισομερείς μορφές της ανηθόλης

Κεφάλαιο 2: Χημειομετρία

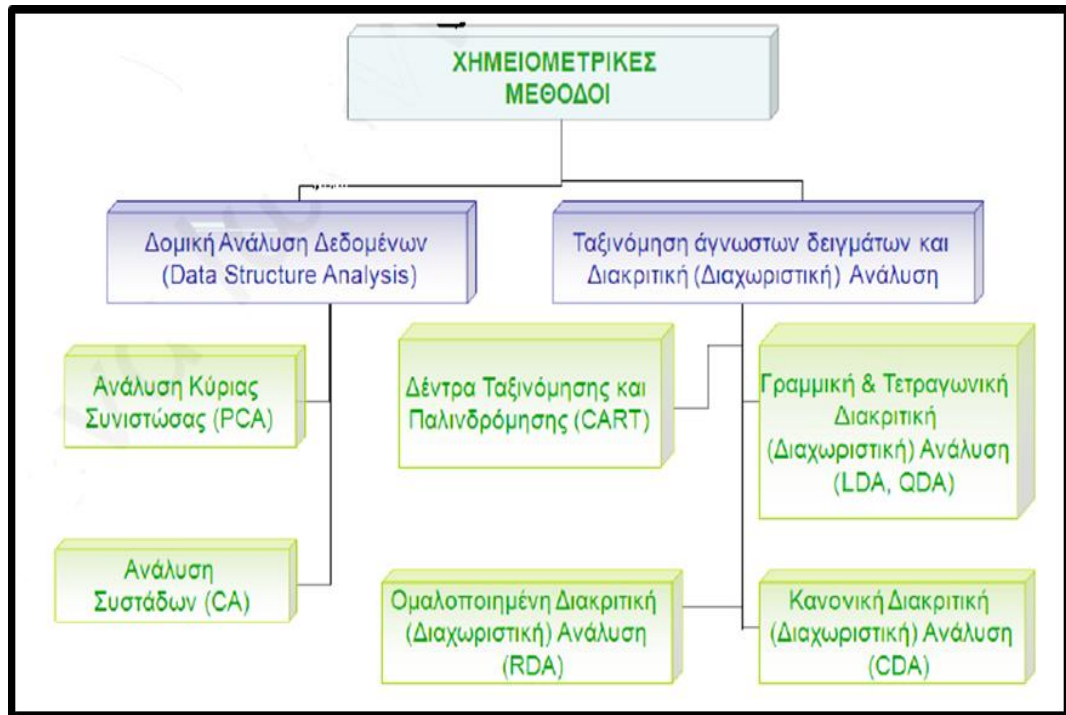
2.1 Γενικά στοιχεία

Η Χημειομετρία είναι ο επιστημονικός κλάδος, που αποσκοπεί στην άντληση πληροφοριών από τα δεδομένα διαφόρων χημικών συστημάτων. Η ονομασία «Χημειομετρία» εισήχθη το 1972 από το Σουηδό Svante Wold και τον Αμερικανό Bruce R. Kowalski και διαδόθηκε εξαιτίας της άφιξης των ηλεκτρονικών υπολογιστών σε κάθε χημικό εργαστήριο, η οποία έκανε δυνατή τη χρήση στατιστικών πολυπαραμετρικών μεθόδων ανάλυσης και μαθηματικών στην ανάλυση χημικών δεδομένων [37]. Όπως γίνεται άμεσα αντιληπτό, η Χημειομετρία είναι η επιστήμη της Χημείας που χρησιμοποιεί Μαθηματικά, Στατιστική και Πληροφορική με στόχο την επιλογή των βέλτιστων διαδικασιών για τα πειράματα και τη συγκέντρωση των μέγιστων χρήσιμων πληροφοριών από όλα τα πειραματικά χημικά δεδομένα [38].

Η Χημειομετρία επωφελείται ενόργανων αναλύσεων για την εξαγωγή της μέγιστης φυσικής και χημικής πληροφορίας και δημιουργεί μοντέλα για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση-πρόβλεψη. Τα μοντέλα αυτά, δημιουργούνται είτε από συγκεκριμένη φυσική/χημική πληροφορία είτε από το χημικό αποτύπωμα (π.χ. φάσμα). Φυσικά, πριν την εφαρμογή των πολυπαραμετρικών μεθόδων της Χημειομετρίας σε κάποιο αριθμό φασματικών δεδομένων, απαιτείται η μετατροπή των φασμάτων (π.χ. FT-IR, NMR) σε περιγραφικές μεταβλητές, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμησή τους. Η μετατροπή του φάσματος σε μια σειρά από μεταβλητές ώστε να είναι δυνατή η εξαγωγή συνιστωσών μπορεί να γίνει με χρήση της έντασης κορυφής κάθε σημείου του φάσματος ή και της έντασης μιας κορυφής αναφοράς [39,40].

Συγκεκριμένα στην περίπτωση της σύγκρισης των τροφίμων και των ποτών, η Χημειομετρία είναι βασικό εργαλείο επεξεργασίας των δεδομένων από τις αναλύσεις, που στόχο έχουν τη μελέτη της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης του τροφίμου ή ποτού και συνεπώς και την ύπαρξη νοθείας μέσω συσχέτισης και ομαδοποίησης

των δειγμάτων, πράγμα που συμβαίνει με αξιοποίηση των διάφορων μεθόδων της, οι οποίες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν όπως στο σχήμα 2.1.1. [40].



Σχήμα 2.1.1.: Διάγραμμα ταξινόμησης μεθόδων Χημειομετρίας [40].

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή αναπτύσσονται συνοπτικά στο επόμενο υποκεφάλαιο.

2.2 Χημειομετρικές Μέθοδοι

Το υποκεφάλαιο αυτό αποσκοπεί στην συνοπτική παρουσίαση των χημειομετρικών μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας. Έμφαση θα δοθεί στο αποτέλεσμα που επιτυγχάνεται με χρήση της εκάστοτε μεθόδου, στο πώς υλοποιείται η μέθοδος βηματικά και όχι στην αναλυτική μαθηματική επεξήγηση.

2.2.1.: Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis)

Η πρώτη περιγραφή της *Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)* έγινε από τον Pearson το 1901 και αργότερα ο Hotelling (1933) ανέπτυξε τη μέθοδο στη σημερινή της μορφή. Παρόλο που η μέθοδος ήταν ιδανική για τη λύση χημικών προβλημάτων, άρχισε να εφαρμόζεται από τους χημικούς επιστήμονες το 1970 [38-42].

Η PCA χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση δειγμάτων και κυρίως για μείωση του αριθμού-διαστάσεων των μεταβλητών σε ένα σετ δεδομένων, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους. Με την PCA αντικαθίσταται ένας μεγάλος αριθμός αρχικών μεταβλητών, από ένα μικρότερο αριθμό νέων μεταβλητών, διατηρώντας όσο το δυνατόν περισσότερη από την διασπορά (variation) ή αλλιώς την πληροφορία των δεδομένων. Αυτό μπορεί να γίνει με μετασχηματισμό δεδομένων σε μια καινούργια ομάδα μεταβλητών, τις κύριες συνιστώσες (PCs, Principal Components), οι οποίοι δεν συσχετίζονται μεταξύ τους και ταξινομούνται έτσι ώστε οι πρώτοι PCs να έχουν την περισσότερη διασπορά-πληροφορία από το σύνολο [38-42].

Αρχικά λοιπόν, γίνεται κανονικοποίηση (standardization) των αρχικών μεταβλητών των δεδομένων κάθε δείγματος. Δηλαδή ο μέσος όρος αφαιρείται από κάθε μεταβλητή ξεχωριστά και διαιρείται με την τυπική απόκλιση. Η κανονικοποίηση γίνεται για να προσαρμόσει όλες τις μεταβλητές στην ίδια κλίμακα ώστε να αποκτήσουν ίση σημασία. Έτσι δημιουργείται ο πίνακας διακύμανσης [38-40,42].

Οι κύριες συνιστώσες, οι οποίες συχνά αναφέρονται και ως λανθάνουσες μεταβλητές (PCs) είναι ιδιοτιμές, οι οποίες δημιουργούνται από τη

διαγωνοποίηση του πίνακα διακύμανσης, ο οποίος προέρχεται από τον πίνακα δεδομένων. Οι νέες λανθάνουσες μεταβλητές που προκύπτουν, είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών με χρήση συντελεστών βαρύτητας οι οποίοι αποσκοπούν [38-42]:

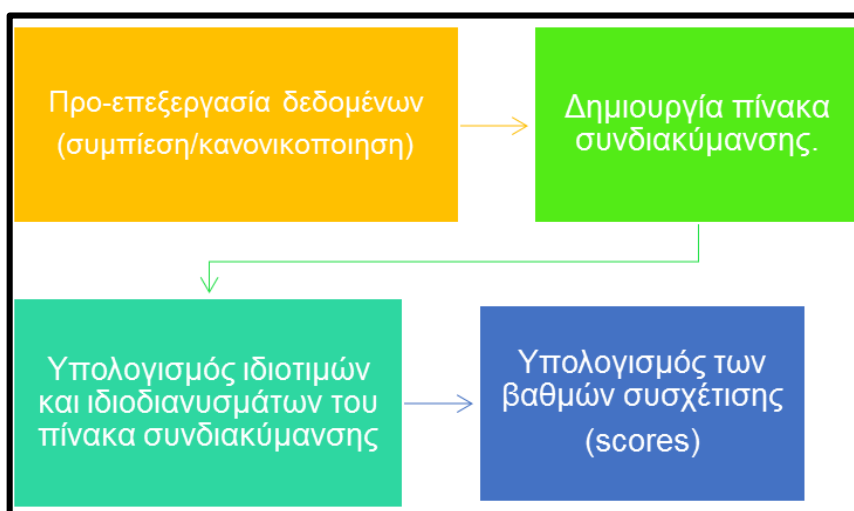
A) Η πρώτη Κύρια Συνιστώσα ($PC1$), να συγκεντρώνει τη μεγαλύτερη δυνατή πληροφορία των δεδομένων. Η δεύτερη Κύρια Συνιστώσα ($PC2$), να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο μέρος από την εναπομείνουσα διασπορά, κ.ο.κ. Μη σημαντικές PCs άλλωστε, περιγράφουν περισσότερο θόρυβο παρά δεδομένα. Επομένως η αφαίρεσή τους από το σύνολο των PCs φιλτράρει το θόρυβο από τα δεδομένα.

B) Οι Κύριες Συνιστώσες ($PC1, PC2, \dots, PCn$) να είναι ασυσχέτιστες-κάθετες μεταξύ τους.

Γ) Ο μέγιστος αριθμός των PCs να είναι πάντα μικρότερος από τον αριθμό των μεταβλητών

Δ) Ο αριθμός των PC να ορίζει την ήδη υπάρχουσα διαστασικότητα (dimensionality) του μοντέλου.

Οι συντεταγμένες των σημείων (δειγμάτων) σε διάγραμμα ως προς τους PCs ονομάζονται scores (βαθμοί συσχέτισης) και αποτελούν την εικονική αναπαράσταση της τάσης των δειγμάτων για ομαδοποίηση ή εκτροπή [39,40,41,42].



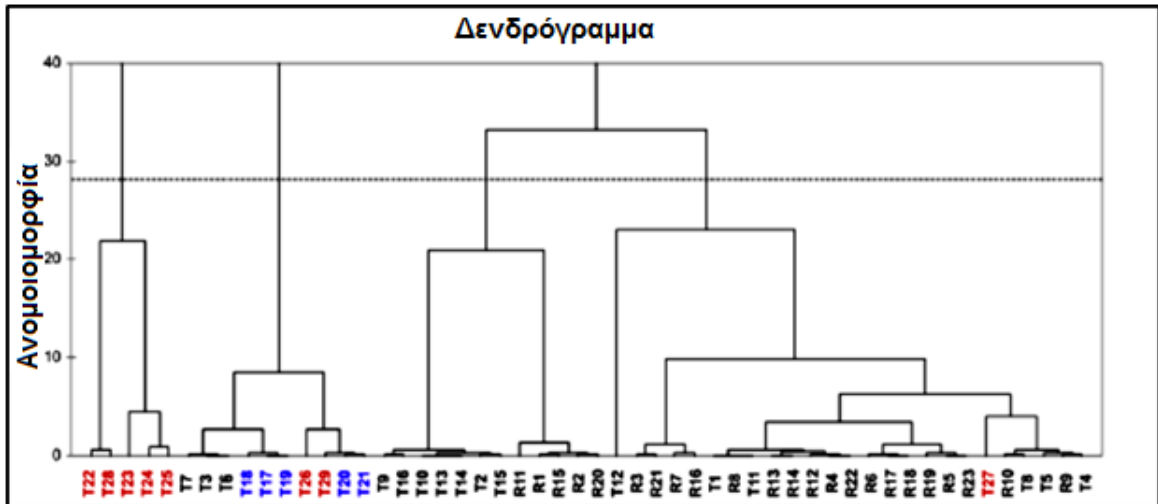
Σχήμα 2.2.1: Βήματα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών

2.2.2. Ανάλυση κατά συστάδες (Cluster Analysis)

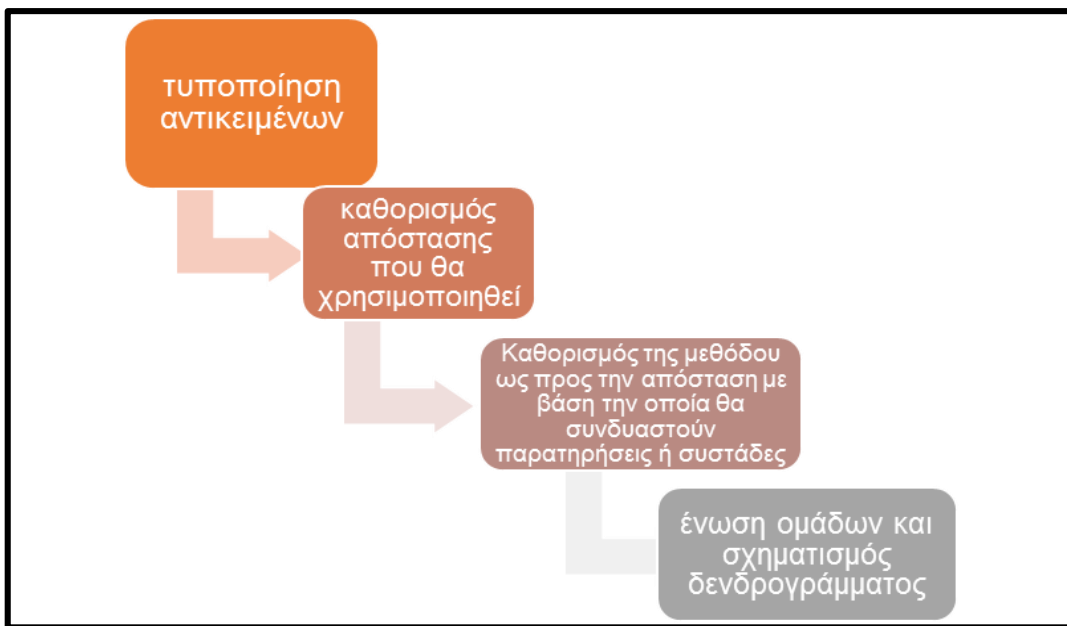
Η Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες είναι η δομική ανάλυση των δεδομένων με σκοπό τον εντοπισμό των τάξεων-συστάδων (clusters) ανάμεσα στα δεδομένα, χωρίς να απαιτείται οποιαδήποτε προηγούμενη πληροφορία σχετικά με τις πιθανές τάξεις (άγνωστα δείγματα). Στόχος της μεθόδου είναι να ταξινομηθούν τα δείγματα με βάση τα κοινά τους χαρακτηριστικά [38-44].

Υπάρχουν πολλά κριτήρια, τα οποία καθορίζουν ποιες παρατηρήσεις ή ομάδες πρέπει να συνδυαστούν, και διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο εκτιμούν τις αποστάσεις μεταξύ των ομάδων. Ανάλογα με το κριτήριο που χρησιμοποιείται λαμβάνονται διαφορετικές κάθε φορά ομαδοποιήσεις. Όλα τα κριτήρια στηρίζονται σε πίνακα αποστάσεων μεταξύ ζευγών των παρατηρήσεων. Γενικότερα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε απόσταση μεταξύ ομάδων ή παρατηρήσεων, συνήθως όμως χρησιμοποιείται η Ευκλείδεια απόσταση, η απόσταση Chebychev, η απόσταση Manhattan κ.α. Έπειτα τα αντικείμενα-ομάδες δομούνται σε συστάδες βάσει μεθόδου ταξινόμησης ομάδων (π.χ. μέθοδος κέντρου, πλησιέστερου γείτονα, μέσου ομάδας, μακρινότερου γείτονα κ.α.) [40,42,44,45,46]

Η συνηθέστερη ανάλυση κατά συστάδες βέβαια και αυτή η οποία χρησιμοποιείται ευρύτερα είναι η *ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (HCA)*. Στην HCA, κάθε αντικείμενο αποτελεί από μόνο του μία ομάδα. Σε κάθε βήμα, με βάση τη μέθοδο του πλησιέστερου γείτονα, ενώνονται δύο αντικείμενα τα οποία απέχουν ελάχιστα και δημιουργούν νέα ομάδα. Στη συνέχεια η ομάδα αυτή ενώνεται με τη γειτονικότερη ομάδα ή αντικείμενο σχηματίζοντας μία καινούργια ομάδα. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται όταν όλες οι ομάδες ενωθούν σχηματίζοντας ένα δενδρόγραμμα όπως στο σχήμα 2.2.2.1.[40,45,46].



Σχήμα 2.2.2.1.: Δενδρόγραμμα HCA [40]



Σχήμα 2.2.2.2.: Βήματα υλοποίησης CA

2.2.3. Διακριτική ανάλυση (Discriminant Analysis)

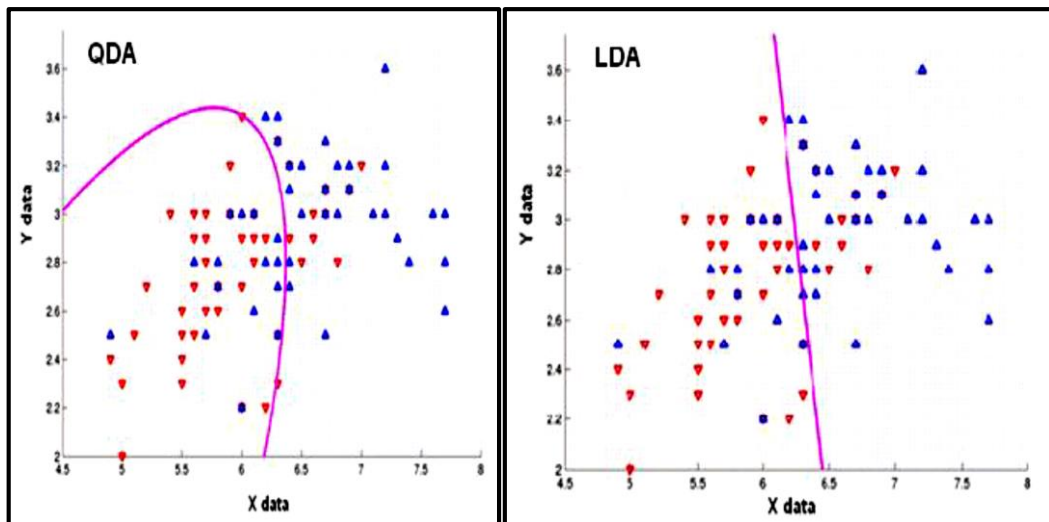
Η Διακριτική Ανάλυση εφαρμόζεται στην περίπτωση που θέλουμε να προβλέψουμε την ομάδα ή την τάξη στην οποία ανήκει ένα σύνολο δειγμάτων, με βάση ορισμένες πειραματικές μεταβλητές διαχωρισμού ή πρόγνωσης. Στην διακριτική ανάλυση μάλιστα, οι ομάδες είναι γνωστές από πριν, μιας και στο σύνολο των παρατηρήσεων έχει εφαρμοστεί η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών. Η Διακριτική Ανάλυση περιγράφει την κατάταξη σε συγκεκριμένη ομάδα, ώστε οι μελλοντικές παρατηρήσεις άγνωστων δειγμάτων να ενταχθούν στην ομάδα με μεγαλύτερη πιθανότητα (μέθοδος ταξινόμησης) [38,40,42,44].

Η διακριτική ανάλυση συνεπώς:

- Είναι μέθοδος κατάταξης, η οποία περιλαμβάνει δοκιμές για τον προσδιορισμό της διάστασης των ομάδων.
- Διαμορφώνει κάποιο αλγόριθμο ή ένα σύνολο από γραμμικές διεργασίες των αρχικών μεταβλητών, ικανές να προβλέψουν την κατάταξη των δειγμάτων στις ομάδες, με βάση το κριτήριο λάμδα (Wilk's) [46,47,48].

Ανάμεσα στις μεθόδους διακριτικής ανάλυσης, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αλλά και εκείνες οι οποίες θα αξιοποιηθούν στην παρούσα μελέτη είναι η γραμμική διακριτική ανάλυση (LDA), η τετραγωνική διακριτική ανάλυση (QDA) και η ομαλοποιημένη διακριτική ανάλυση (RDA)[49].

Οι LDA και QDA προϋποθέτουν ως μέθοδοι διάκρισης, ότι τα δεδομένα ακολουθούν μια πολυμεταβλητή κανονική κατανομή. Η LDA συγκεκριμένα, υποθέτει επίσης ότι κάθε κλάση-ομάδα έχει την ίδια περίπου διασπορά, η οποία είναι μια κοινή διακύμανση, καταλήγοντας σε γραμμικά όρια μεταξύ των ομάδων, ενώ στη QDA «χαλαρώνεται» αυτή η τελευταία υπόθεση και επιτρέπει τετραγωνικά όρια μεταξύ των ομάδων. Η LDA ή η QDA χρησιμοποιούνται ανάλογα με τη δομή των δεδομένων, αλλά συνήθως η LDA οδηγεί σε βελτιωμένα ταξινομημένα αποτελέσματα από την QDA, ακόμη και όταν η διασπορά των ομάδων των παρατηρήσεων δεν είναι ισομεγέθους, διότι με την LDA πρέπει να εκτιμηθούν λιγότερες παράμετροι μοντέλου, γεγονός που την καθιστά πιο ισχυρή έναντι των αποκλίσεων [38,40,46,49].



Σχήμα 2.2.3.1.: Απεικόνιση τετραγωνικών και γραμμικών ορίων [40]

2.2.4. Δένδρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης (Classification and Regression Trees, CART)

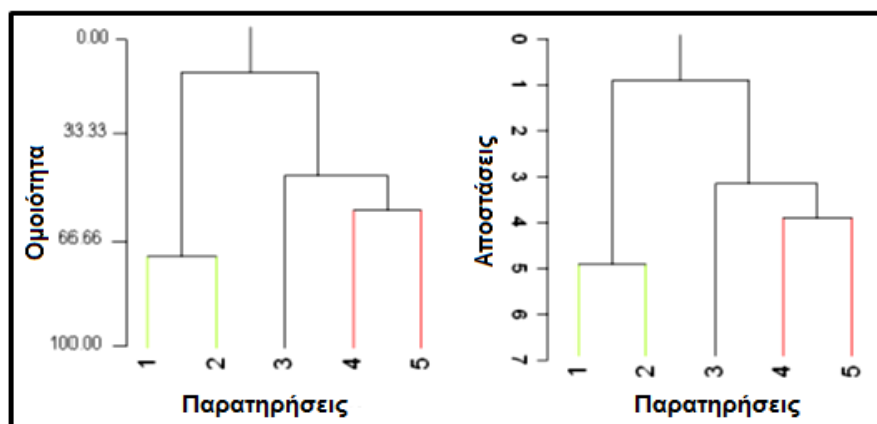
Ο αλγόριθμος CART δημιουργήθηκε χάρις στις προσπάθειες των Breimen *et al* (1984) και των συνακόλουθων Loh and Vanichestakul (1988) και Loh and Shih (1997) και ουσιαστικά βασίζεται στην εφαρμογή μίας οικογένειας συναφών αλγόριθμων, οι οποίοι στοχεύουν στην ανάπτυξη δισχιδούς δενδρικής ιεραρχίας, υιοθετώντας συνθήκες τμήσης των παρατηρήσεων του τύπου «αν-τότε» [50].

Τα Δένδρα Ταξινόμησης είναι κυρίως δένδρα πολυριζικά με ποικίλους τρόπους διάσπασης σε άλλα και επίσης δένδρα διαγραμματικής απεικόνισης των τάξεων, οι οποίες προκύπτουν λόγω αλγόριθμων. Τα CART, χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν την κατανομή των παρατηρήσεων στις κλάσεις (ομάδες) μίας κατηγορικής ή ποσοτικής εξαρτημένης μεταβλητής, εκτελώντας μετρήσεις σε μία ή περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές. Ειδικοί αλγόριθμοι έπειτα, παράγουν διχοτόμους-κλάδους δένδρων, βασιζόμενοι σε ατομικές τμήσεις των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι οποίες μπορεί να είναι ποσοτικές, κατηγορικές ή και διαβαθμισμένες. Ιδιαίτερα στην περίπτωση που υπάρχουν περισσότερες από μια μεταβλητές παλινδρόμησης, τα δένδρα CART

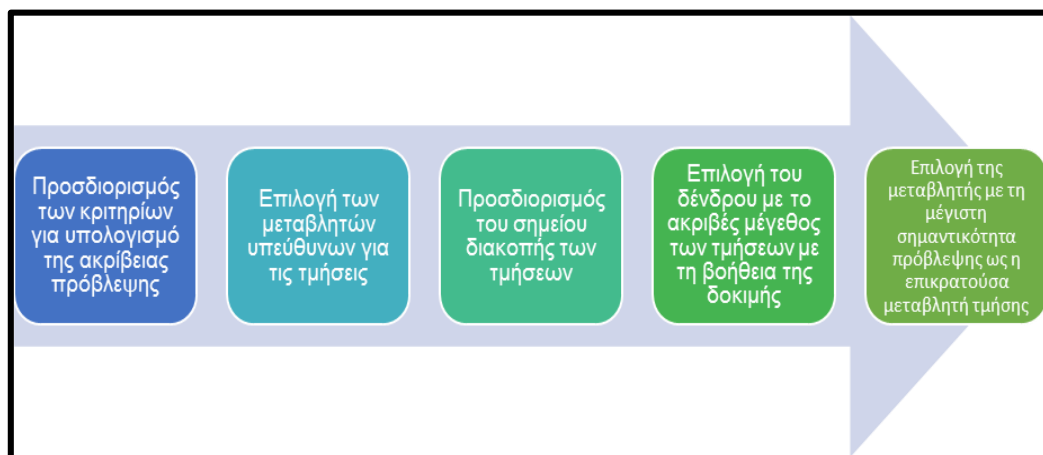
είναι πολύ χρήσιμα τόσο για την κατάταξη όσο και για τον εντοπισμό των κυριότερων παραμέτρων οι οποίες ευθύνονται για αυτή [40,44,46,49]

Μία δενδρική διχοτόμηση, πρέπει να τονιστεί πως θεωρείται επιτυχημένη όταν η επιλογή των τμήσεων στις προβλεπτικές μεταβλητές είναι τέτοια ώστε αυτές να εξασφαλίζουν σε ικανοποιητικό βαθμό την πρόβλεψη των μελών (παρατηρήσεων) των κλάσεων της εξαρτημένης μεταβλητής [40,44,49,50].

Τέλος πρέπει να ληφθεί σοβαρά πως στα Δέντρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης πρέπει να οριστεί πως ακριβώς θα γίνεται ο διαχωρισμός και τα κριτήρια για την επιλογή ενός βέλτιστου ή ενός τελικού δέντρου για ανάλυση σε αντίθεση με την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών που η εφαρμογή της δεν μπορεί να παρέχει συγκεκριμένες πληροφορίες όταν υπάρχουν πολλές μεταβλητές πρόβλεψης [38,40,50].



Σχήμα 2.2.4.1.: Δενδρογράμματα ομοιότητας και απόστασης παρατηρήσεων [40]

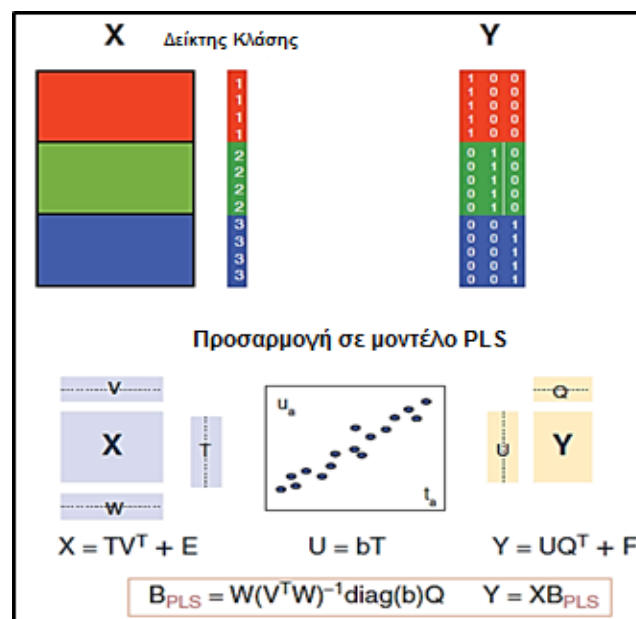


Σχήμα 2.2.4.2.: Υπολογιστική διαδικασία της τεχνικής CART

2.2.5. Ανάλυση Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Analysis, PLS)

Η μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) αποτελεί κυρίως προέκταση της μεθόδου Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, PCA και εφαρμόζεται, όταν είναι αναγκαία η σύνδεση-επαλήθευση και πρόβλεψη της πληροφορίας ενός πίνακα Y , ο οποίος αποτελείται από αποκρίσεις και του πίνακα X των περιγραφικών μεταβλητών. Οι πίνακες, αναλύονται σε PCA και συνδέονται με στόχο τη μέγιστη συνδιακύμανση [40,51].

Συγκεκριμένα, μέσω της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων, ένα πρόβλημα διακριτικής ταξινόμησης μετατρέπεται σε ζήτημα παλινδρόμησης, όπου ένας πίνακας Y περιέχει σε δυαδική μορφή τις πληροφορίες κάθε τάξης και συνεπώς κάθε στήλη του, η οποία αναφέρεται σε αληθινή τάξη, παίρνει την τιμή 1 ενώ στην αντίθετη περίπτωση τιμή 0. Κατά συνέπεια, η ταξινόμηση μπορεί να αναδιατυπωθεί ως εύρεση του πιο βελτιωμένου μοντέλου παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο μερικών ελαχίστων τετραγώνων, ο οποίος συνδέει τα πειραματικά δεδομένα που μετρήθηκαν στα δείγματα X με τη δυαδική κωδικοποιημένη μήτρα Y (βλέπε σχήμα 2.2.5.1) [49,52]. Επιπλέον, για κάθε λανθάνουσα μεταβλητή υπολογίζεται ένας φορέας βαρύτητας w , ο οποίος δείχνει τη συνεισφορά κάθε μεταβλητής στο X για να μοντελοποιηθούν οι αποκρίσεις στο Y .



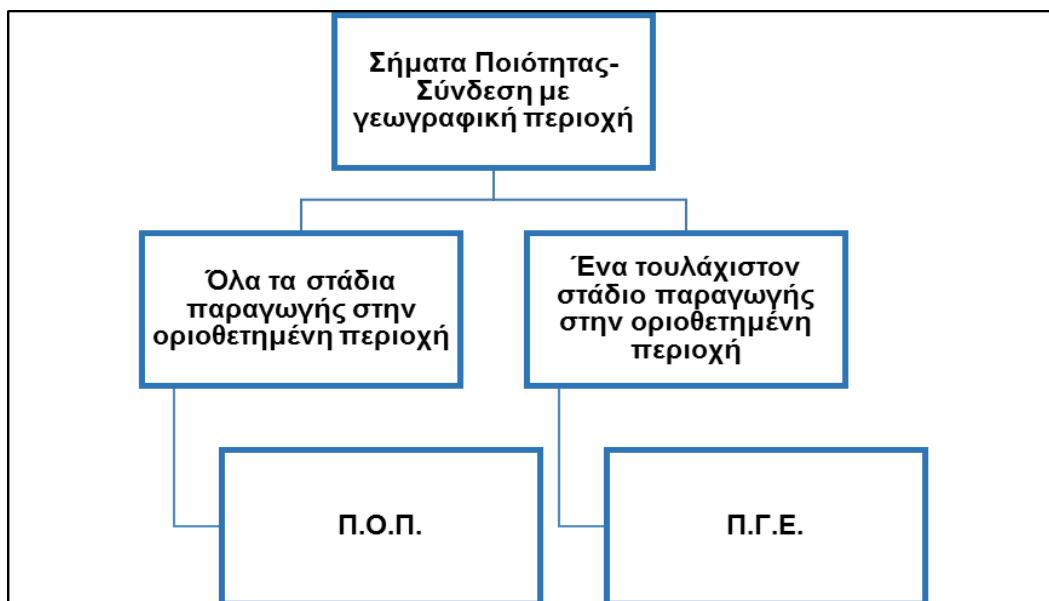
Σχήμα 2.2.5.1.: Λογική λειτουργίας PLS [49]

Κεφάλαιο 3: Γνησιότητα τροφίμων & ποτών - Αναλυτικές τεχνικές

3.1. Πιστοποίηση και σημασία της γνησιότητας

Η ανάγκη ύπαρξης ορολογίας σχετικής με τη γνησιότητα και τη μοναδικότητα σε προϊόντα γεωργικής προέλευσης, για λόγους όπως η ενθάρρυνση της αγροτικής παραγωγής, η προστασία ονομασιών από λανθασμένη χρήση, νοθεία και μίμηση και η καλύτερη κατανόηση του ειδικού χαρακτήρα των προϊόντων από τους καταναλωτές, οδήγησε στη δημιουργία των σημάτων Προστατευόμενης. Ονομασίας. Προέλευσης.(Π.Ο.Π.) και Προστατευόμενης. Γεωγραφικής. Ένδειξης.(Π.Γ.Ε.). Οι έννοιες αυτές κατοχυρώνονται από τους εξής ευρωπαϊκούς κανόνες:

- KAN. (ΕΚ) 510/2006 (σε αντικατάσταση του ΚΑΝ. (ΕΚ) 2081/92): για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης [53].
- KAN. (ΕΚ) 1898/2006: σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του ΚΑΝ. (ΕΚ) 510/2006 [54].
- KAN. (ΕΚ) 509/2006 (σε αντικατάσταση του ΚΑΝ. (ΕΚ) 2082/92): για τα εγγυημένα παραδοσιακά ιδιότυπα προϊόντα [55].



Σχήμα 3.1.1.: Συνοπτικό διάγραμμα για τα σήματα ποιότητας

Προϊόν Π.Ο.Π. (Προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης)

Η ορολογία Π.Ο.Π. αναφέρεται στο όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος. Κριτήρια για να γίνει αποδεκτή αυτή η ένδειξη αποτελούν, το να κατάγεται το προϊόν από τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή (βάσει και ιστορικών στοιχείων), η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά του να οφείλονται ουσιαστικά ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον (φυσικοί και ανθρώπινοι παράγοντες, κλίμα, ποιότητα εδάφους κ.α.) και η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία του να πραγματοποιούνται αποκλειστικά στην εκάστοτε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή [56,57].

Προϊόν Π.Γ.Ε. (Προστατευόμενης γεωγραφικής ένδειξης)

Η ορολογία Π.Γ.Ε. αναφέρεται με τη σειρά της κι αυτή στο όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις, μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος, το οποίο συμμορφώνεται στα ακόλουθα κριτήρια: να κατάγεται από την εν λόγω αυστηρά οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή, η ποιότητα και η φήμη του προϊόντος να μπορούν να αποδοθούν στην εν λόγω γεωγραφική καταγωγή, ένα τουλάχιστον στάδιο της παραγωγής και η μεταποίηση-επεξεργασία του εν λόγω προϊόντος να πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή [56,57].



Εικόνα 3.1.1.: Τα σήματα Π.Ο.Π. και Π.Γ.Ε.

Πίνακας 3.1.1.: Αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης Π.Ο.Π. & Π.Γ.Ε.

Χώρα καταγωγής	Γεωγραφική ένδειξη
Γαλλία	Marc d'Alsace Gewürztraminer
Γαλλία	Marc de Lorraine
Γαλλία	Marc d'Auvergne
Γαλλία	Marc du Jura
Πορτογαλία	Aguardente Bagaceira Bairrada
Πορτογαλία	Aguardente Bagaceira Alentejo
Πορτογαλία	Aguardente Bagaceira da Região dos Vinhos Verdes
Πορτογαλία	Aguardente Bagaceira da Região dos Vinhos Verdes de Alvarinho
Ισπανία	Orujo de Galicia
Ιταλία	Grappa
Ιταλία	Grappa di Barolo
Ιταλία	Grappa di Marsala
Ελλάδα	Τσικουδιά
Ελλάδα	Τσικουδιά Κρήτης
Ελλάδα	Τσίπουρο
Ελλάδα	Τσίπουρο Μακεδονίας
Ελλάδα	Τσίπουρο Θεσσαλίας
Ελλάδα	Τσίπουρο Τυρνάβου
Λουξεμβούργο	Eau-de-vie de marc de marque nationale luxembourgeoise
Κύπρος	Ζιβανία/Τζιβανία/Ζιβάνα/Zivania
Ουγγαρία	Törkölypálinka

Η θέσπιση των σημάτων ποιότητας και η ανάγκη ελέγχου των προϊόντων, ώστε να συμμορφώνονται με την επισήμανση τους, έχει οδηγήσει στην επιστράτευση σύγχρονων ενόργανων αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες σε συνδυασμό με τη χημειομετρία, μπορούν να αποφανθούν για την γνησιότητα και για τη διαφορετικότητα των εκάστοτε προϊόντων, όσο και αν αυτά

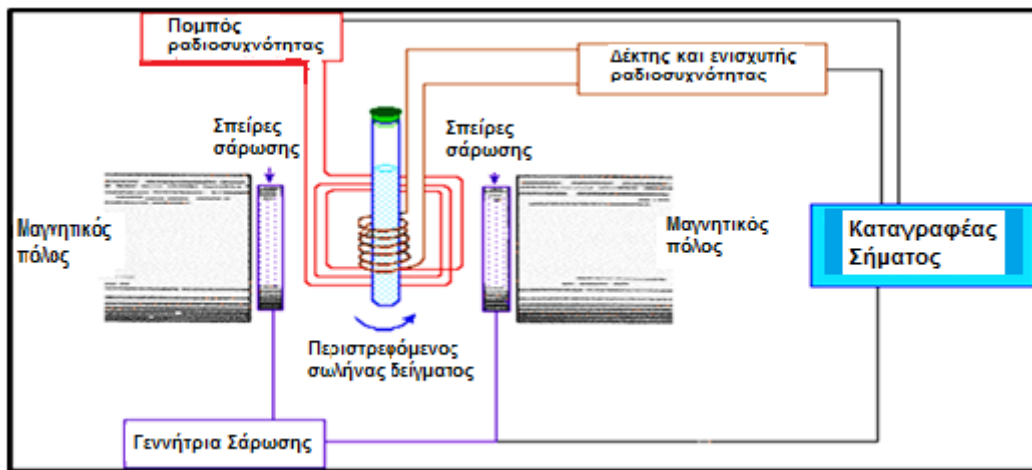
φαινομενικά μοιάζουν. Τα κριτήρια στα οποία στηρίζεται η διάκριση προϊόντων σχετίζονται με παράγοντες όπως η πρώτη ύλη, η γεωγραφική προέλευση, η διαδικασία παραγωγής κ.α. Οι παράγοντες αυτοί λοιπόν, προσδίδουν διαφορές που ανιχνεύονται αναλυτικά για κάθε δείγμα, και μέσω της χημειομετρίας ταξινομούνται τα δείγματα σε ομάδες βάσει της ομοιότητας [38-40,42,45].

Συγκεκριμένα, σχετικά με αλκοολούχα αποστάγματα στεμφύλων σταφύλης, τα οποία φέρουν τα σήματα ποιότητας Π.Ο.Π. και Π.Γ.Ε., είτε από την Ελλάδα, είτε από διάφορες χώρες (βλέπε πίνακα 3.1.1.), αυτά μελετώνται στην παρούσα εργασία. Στόχο της μελέτης αποτελεί η ικανότητα διάκρισης αλλά και η βελτίωση αυτής μέσω χημειομετρικών τεχνικών συνδυασμένων με ενόργανες τεχνικές, οι οποίες θα αναλυθούν στο επόμενο υποκεφάλαιο.

3.2. Αναλυτικές μέθοδοι

3.2.1. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance) (NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες ατόμων, που διαθέτουν περιττό ατομικό ή μαζικό αριθμό, σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού, η οποία εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισοτόπου των ατόμων. Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις κύριες τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη λήψη φυσικών, χημικών, ηλεκτρονικών και δομικών πληροφοριών για τα μόρια, οι οποίες οφείλονται στη χημική μετατόπιση (δ) των συχνοτήτων συντονισμού των πυρήνων, που είναι παρόντες στο δείγμα, στους χρόνους αποδιέγερσης και στις συζεύξεις των πυρήνων. Η φασματοσκοπία NMR είναι μια ισχυρή τεχνική, η οποία μπορεί να δώσει λεπτομερείς πληροφορίες για την τοπολογία, τη δυναμική και την τρισδιάστατη δομή των μορίων σε διάλυμα και σε στερεή κατάσταση και μπορεί να εφαρμοστεί τόσο για ταυτοποίηση ενώσεων όσο και για ποσοτικούς προσδιορισμούς με ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος [38,40,42,58,59].



Εικόνα 3.2.1.1.: Οργανολογία φασματομέτρου NMR

Η παρασκευή των δειγμάτων γίνεται με διάλυση σε δευτεριωμένο διαλύτη και μεταφορά τους σε σωλήνες κατάλληλης διαμέτρου, οι οποίοι εισάγονται στον αισθητήρα και περιστρέφονται με χρήση ξηρού αέρα καθώς εκτίθενται σε δυο μαγνητικά πεδία, ένα στατικό κι ένα που διαφέρει σε κάποια ραδιοσυχνότητα (RF). Μόλις επέλθει συντονισμός όλων των πυρήνων, η αποδιέγερση τους επάγει στο πηνίο παρατήρησης ρεύμα, το οποίο ενισχύεται και έπειτα ψηφιοποιείται και υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier [38,40,42,58,59].

Κύρια ισότοπα στα οποία βρίσκει εφαρμογή η φασματοσκοπία NMR σε συνδυασμό με τη Χημειομετρία για ανάλυση γνησιότητας και γεωγραφικής προέλευσης σε τρόφιμα και ποτά είναι το ^1H (τεχνική $^1\text{H-NMR}$), το οποίο είναι πολύ άφθονο, ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα και είναι ο πιο ευαίσθητος πυρήνας στο σήμα NMR και το ^2H (δευτέριο) μέσω της τεχνικής του SNIF-NMR με την οποία και θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία [59,60].

3.2.1.1. SNIF-NMR (Site Natural Isotope Fractionation)

Η τεχνική SNIF-NMR μελετά το φυσικό ισοτοπικό διαχωρισμό (λόγο δευτερίου/υδρογόνου) σε κάθε θέση του προσδιοριζόμενου μορίου. Αυτή η δυνατότητα στηρίζεται στη διαφορά, την οποία παρουσιάζουν οι ποσότητες δευτερίου (^2H), που ενσωματώνουν τα φυτά με διαφορετικές φωτοσυνθετικές πορείες λόγω του μεταβολικού τους κύκλου. Έτσι, σάκχαρα προερχόμενα από φυτά που ανήκουν στον C_4 κύκλο (π.χ. καλαμπόκι, σακχαροκάλαμο κ.ά.) περιέχουν αυξημένη ποσότητα δευτερίου συγκριτικά με φυτά του κύκλου C_3 (π.χ. σταφύλι, μήλο, ζαχαρότευτλα κ.α.). Συνεπώς, παρατηρείται φυσικός

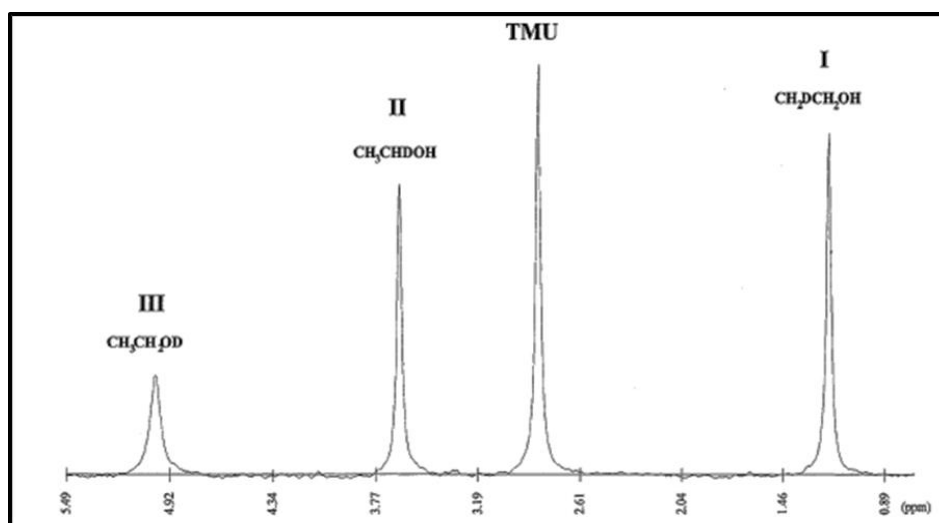
ισοτοπικός διαχωρισμός ανάλογα με το μεταβολισμό του φυτού, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης νοθείας σε προϊόντα, τα οποία για λόγους οικονομικού οφέλους εξαπατούν τους καταναλωτές σχετικά με τη σύστασή τους, μιας και ενώσεις εξωγενούς πρόσμιξης, όπως η ζάχαρη σε γλεύκη (σαπταλισμός) ή η βιομηχανική αλκοόλη, ή και συνθετικές παρουσιάζουν διαφορετική αφθονία σε δευτέριο. Επίσης, με ισοτοπικό διαχωρισμό λαμβάνονται στοιχεία ακόμη και για τις γεωκλιματικές συνθήκες του φυτού, πληροφορία χρήσιμη όσον αφορά τις ενδείξεις Π.Ο.Π.-Π.Γ.Ε [38,60,61].

Ιστορικά πρέπει να αναφερθεί, πως η μέθοδος του SNIF-NMR προτάθηκε από τον Καθηγητή Martin και υιοθετήθηκε ως η επίσημη μέθοδος για τον έλεγχο της εξωτερικής προσθήκης ζάχαρης, για αύξηση της οξύτητας ή του αλκοολικού βαθμού, σε αλκοολούχα ποτά στην Ευρώπη το 1990 [62].

Σχετικά με τον προσδιορισμό, ως εσωτερικό πρότυπο για τη μέθοδο SNIF-NMR χρησιμοποιείται η τετραμεθυλουρία (TMU) καθαρότητας 99% και η λήψη του φάσματος γίνεται συνήθως στα 61,4 MHz με προσθήκη και φθοριούχων ουσιών (C_6F_6 , CF_3COOH) στο σωλήνα του δείγματος 10 mm, για την σταθεροποίηση του πεδίου συχνότητας (μείωση πλάτους σημάτων). Η ουσία, η οποία προσδιορίζεται θα πρέπει να είναι καθαρότητας μεγαλύτερης του 95%, ενώ ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε νερό του δείγματος καθώς και της TMU λαμβάνουν χώρα μέσω της πιλομετρικής μεθόδου Karl Fischer [38,60,62].

Για τη μελέτη της γνησιότητας-μοναδικότητας των αλκοολούχων ποτών, προσδιοριζόμενο μόριο αποτελεί η αιθανόλη (βλέπε φάσμα εικόνα 3.2.1.1.1.), η οποία λαμβάνεται με απόσταξη του εκάστοτε εξεταζόμενου ποτού σε ελάχιστη συγκέντρωση 95% v/v στο απόσταγμα. Μάλιστα η ισοτοπική αναλογία του δευτερίου στο μεθύλιο της αιθανόλης (D/H_I) σχετίζεται με το φυτικό είδος που έχει συνθέσει το σάκχαρο, η ισοτοπική αναλογία στο μεθυλένιο της αιθανόλης (D/H_{II}) με τα γεωκλιματικά χαρακτηριστικά του τόπου παραγωγής, ενώ ο συντελεστής $R \{R=2(D/H)_{II}/(D/H)_I\}$ τη σχετική κατανομή του δευτερίου στις θέσεις I και II [38,60-62]. Περίπου το 85% του 2H του ζυμώσιμου σάκχαρου μεταφέρεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στη μεθυλική ομάδα της αιθανόλης, ενώ περίπου το 75% του 2H του νερού των σταφυλιών μεταφέρεται σε

μεθυλενο-ομάδα. Τυπικές τιμές του λόγου (D/H_i) για τα ζαχαρότευτλα, τα σάκχαρα μούστου σταφυλιού και σάκχαρα ζαχαροκάλαμου είναι 91,5 έως 93,5 ppm, 98-104 και 109-112 ppm, αντίστοιχα [60,61].



Εικόνα 3.2.1.1.1.: Τυπικό φάσμα SNIF-NMR της αιθανόλης για έλεγχο αυθεντικότητας

3.2.2.: IR-MS (Φασματομετρία μάζας ισοτοπικών λόγων)

Η ανάπτυξη οινολογικών κυρίως πρακτικών με στόχο να προσπεραστεί η ανίχνευση νοθείας με SNIF-NMR, οδήγησε στην ανάπτυξη της μεθόδου IR-MS για τον προσδιορισμό των ισοτοπικών λόγων ¹³C/¹²C (δ C¹³) και ¹⁸O/¹⁶O (δ O¹⁸). Οι δύο μέθοδοι του SNIF-NMR και του IR-MS είναι στενά συνυφασμένες και χρησιμοποιούνται συνδυαστικά σε πολλές εφαρμογές [63,64].

Η ιδιαιτερότητα αυτών των ισοτοπικών λόγων έγκειται στο γεγονός πως από το λόγο άνθρακα (δ ¹³C) λαμβάνεται σαφής ένδειξη της βοτανικής προέλευσης της πρώτης ύλης και από το λόγο των ισοτόπων του οξυγόνου πληροφορία σχετικά με τη γεωγραφική προέλευση. Η εξήγηση για τις λειτουργίες αυτών των ισοτοπικών λόγων, όσον αφορά το λόγο ¹³C/¹²C, σχετίζεται με ότι κατά τη φωτοσύνθεση, η αφομοίωση του CO₂ από τα φυτά γίνεται με δύο κυρίως τύπους μεταβολισμού, τον κύκλο C₃ και τον κύκλο C₄, τα φυτά του οποίου (φυτά Hatch-Slack π.χ. σακχαροκάλαμο, αραβόσιτος κ.α.) παρέχουν προϊόντα με αυξημένη περιεκτικότητα σε ¹³C (τιμές δ ¹³C από -16 έως -10‰) σε σύγκριση με εκείνα του κύκλου C₃ (τιμές δ ¹³C από -33 έως -24‰) (φυτά Calvin π.χ. σταφύλι, σακχαρότευτλο, μήλο κ.α.) [61,63-65]. Αντίστοιχα σε ότι αφορά το

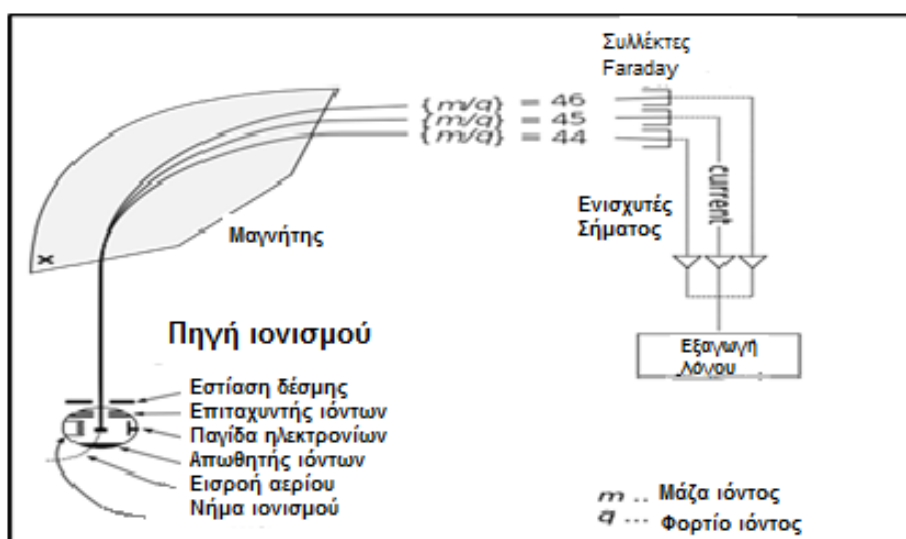
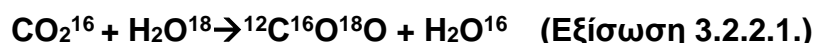
λόγο $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, επειδή το νερό και ο ατμοσφαιρικός αέρας αποτελούν τις κύριες πηγές οξυγόνου ενός φυτού και αφού κατά τη διαδικασία της διαπνοής και της φωτοσύνθεσης επέρχεται εμπλουτισμός του ισοτοπικού διαχωρισμού του υδρογόνου και του οξυγόνου, η τιμή του ^{18}O του νερού επηρεάζεται από τις γεωκλιματικές συνθήκες [61,63-65]. Συνεπώς, η τεχνική IR-MS μπορεί με τη σειρά της και σε συνδυασμό με τη μέθοδο SNIF-NMR, να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο νοθείας και γεωγραφικής προέλευσης.

Η λήψη δείγματος για ανάλυση IR-MS γίνεται σε φιαλίδιο αμέσως μετά το άνοιγμα της συσκευασίας (και ακολουθεί ταχύ εκ νέου κλείσιμο της) προς αποφυγή εξάτμισης και αλλαγής της ισοτοπικής σύνθεσης για $\delta^{18}\text{O}$. Έπειτα για εύρεση της περιεκτικότητας του $\delta^{13}\text{C}$ μέσω IR-MS πραγματοποιείται πλήρης καύση του δείγματος του προσδιοριζόμενου μορίου (αιθανόλης για αλκοολούχα ποτά-συλλογή με απόσταξη 95% v/v) και προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των κυρίων ισοτόπων του μορίου του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) μέσω ιονικών ρευμάτων m/z (όπου m: μάζα, z: φορτίο), τα οποία μετρούνται σε τρεις διαφορετικούς ανιχνευτές φασματόμετρου μοριακής μάζας με φέρον αέριο το ήλιο (He). Τα κύρια ισότοπα του CO_2 , τα οποία συνεισφέρουν στη μέτρηση είναι τα εξής: $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ με μοριακές μάζες 44, 45, 46 αντίστοιχα [65-67]. Οι τιμές του λόγου δίδονται από τη σχετική διαφορά από το διεθνές πρότυπο VPDB [65-67].

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του ισοτοπικού λόγου για το οξυγόνο, ακολουθείται για τα υγρά δείγματα εξάτμιση του νερού το οποίο περιέχουν. Σε κάποιες διαδικασίες παρόλα αυτά, λαμβάνει χώρα και λυοφιλίωση για λήψη του νερού της εκάστοτε ποσότητας δείγματος και έπειτα ακολουθεί ισοτοπική ανταλλαγή με πρότυπο αέριο CO_2 σε ροή, προς παραγωγή ισοτόπων CO_2 . Τα ισότοπα αυτά ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ με m/z=44 και $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ με m/z=46) διαχωρίζονται με ιονικά ρεύματα m/z λόγω της διαφορετικής τους μάζας. Ο λόγος του οξυγόνου (δ) έπειτα μπορεί να υπολογιστεί βάσει του κυρίου πρότυπου ισοτόπου του CO_2 και εκφράζεται έπειτα η σχετική διαφορά του λόγου από το διεθνές πρότυπο νερό ωκεανού V-SMOW για εκτίμηση γεωγραφικής προέλευσης [65,68,69]

Σε θερμά και ξηρά κλίματα, όπως στην Αυστραλία, τη Νότια Αφρική και τη νότια Ισπανία, παρατηρούνται υψηλές τιμές $\delta^{18}\text{O}$ παρατηρούνται (7.5, 8.5 και 6.0, αντίστοιχα) ενώ, λαμβάνοντας υπόψη ότι η Χιλή μετριάζεται από το παράκτιο κλίμα ($\delta^{18}\text{O} = 3.5$) και η Αργεντινή επηρεάζεται από το κρύο ηπειρωτικό κλίμα των Άνδεων, παρουσιάζουν αρκετά χαμηλές τιμές ($\delta^{18}\text{O} = -1.0$), σε σύγκριση ακόμη και με την Ευρώπη ($\delta^{18}\text{O} = -0.5 / + 3.0$) [61].

Η εξίσωση της αντίδρασης ισοτοπικής ανταλλαγής:



Εικόνα 3.2.2.1.: Σχηματική απεικόνιση ενός φασματομέτρου μάζας λόγου ισοτόπων για μέτρηση CO_2

Πλήθος εφαρμογών για τη διάκριση και τον έλεγχο αλκοολούχων ποτών για λόγους πιστοποίησης γνησιότητας, γεωγραφικής προέλευσης και εύρεσης νοθείας έχουν λάβει χώρα με χρήση των μεθόδων SNIF-NMR και IR-MS σε συνδυασμό με στατιστικές και χημειομετρικές τεχνικές. Μια εικόνα κάποιων εφαρμογών δίνεται στον πίνακα 3.2.2.1. όπου παρουσιάζεται τόσο η αναλυτική τεχνική, όσο και η χημειομετρική μέθοδος και η ικανότητα-αξιοπιστία διάκρισης από το πλήθος των δειγμάτων.

Πίνακας 3.2.2.1.: Εφαρμογές SNIF-NMR και IR-MS σε αλκοολούχα ποτά

Έρευνα	Αναλυτική τεχνική	Χημειομετρική μέθοδος	Βιβλιογραφία
Μελέτη αυθεντικότητας σε μπράντυ από τη Βραζιλία	SNIF-NMR	PCA, HCA	[70]
Όριο ανίχνευσης αποστάγματος μελάσσας σε αποστάγματα ρυζιού	SNIF-NMR	SLR	[71]
Έλεγχος Σαπταλισμού και γεωγραφικής προέλευσης σε οίνους από τη Σλοβενία	SNIF-NMR, IR-MS	PCA, HCA	[72]
Έλεγχος νοθείας ερυθρών οίνων της ρουμανικής αγοράς	SNIF-NMR, IR-MS	HCA, LDA	[65]

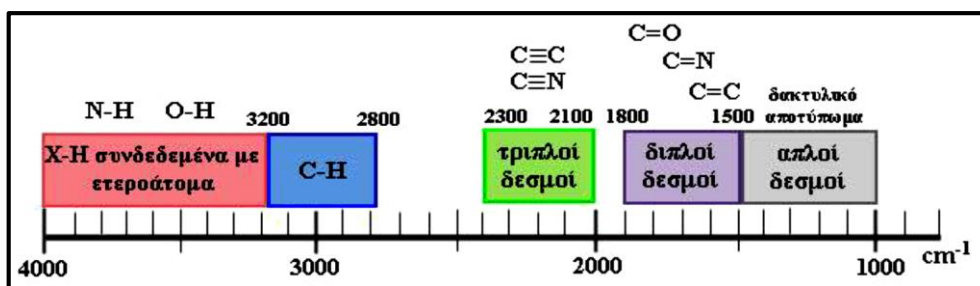
3.2.3. FT-IR (Φασματοσκοπία Υπερύθρου – Μετασχηματισμού Fourier)

Η Υπέρυθρη Φασματοσκοπία αναπτύχθηκε τη δεκαετία 1850 από τους Γερμανούς Kirchoff και Bunsen. και από κοινού με τη φασματοσκοπία NMR και τη Χρωματογραφία, παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή δομή μιας ένωσης [40].

Τα φάσματα υπέρυθρου απεικονίζονται γραφικά ως μεταβολές Απορρόφησης (A) ή της Διαπερατότητας (T%) σε σχέση με το μήκος κύματος. Ολόκληρη η περιοχή υπέρυθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή μετά το ορατό (780 nm) μέχρι και την περιοχή των μικροκυμάτων ($\sim 10^{-2}$ cm). Η πιο χρήσιμη υπέρυθρη περιοχή βέβαια, καλύπτει την περιοχή σε κυματάριθμους ($\nu=1/\lambda$) $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ή μήκους κύματος 2,5-25 μm . Συνεπώς, στο σύνολό της η υπέρυθρη περιοχή μπορεί να διαιρεθεί σε μικρότερες περιοχές, ανάλογα με το ενδιαφέρον, το οποίο παρουσιάζει στη χημική ανάλυση και τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή και μελέτη των φασμάτων, όπως φαίνεται παρακάτω [40,59,73]:

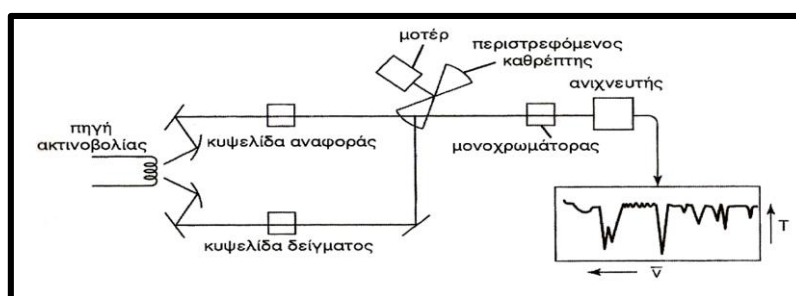
- *Εγγύς υπέρυθρο (NIR):* $10000-4000\text{ cm}^{-1}$, οι απορροφήσεις προέρχονται από υπερτονικές δονήσεις ή δονήσεις συνδυασμού και είναι ασθενείς.
- $4000-1600\text{ cm}^{-1}$, οι απορροφήσεις αποδίδονται σε δονήσεις τάσεων διαφόρων ομάδων και χαρακτηρίζεται ως *περιοχή χαρακτηριστικών συχνοτήτων*.
- *Περιοχή Αποτυπώματος (fingerprint region):* $1650-650\text{ cm}^{-1}$, οι απορροφήσεις δεν είναι χαρακτηριστικές ομάδων αλλά ειδικές για το μόριο ως σύνολο.
- *Άπω υπέρυθρο (FIR):* κάτω των 650 cm^{-1} , οι απορροφήσεις είναι απορροφήσεις σκελετού. Η περιοχή αυτή καλύπτεται από ειδικά φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Η προέλευση των απορροφήσεων στο IR φάσμα είναι αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου. Ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία, όταν η διπολική ροπή ($\Delta\mu \neq 0$) του μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια δόνησης (κατά μέτρο ή διεύθυνση) διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο ($\Delta\mu = 0$). Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση [40,59,73].



Εικόνα 3.2.3.1.: Διαχωρισμός του μέσου IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων

Σχετικά με την οργανολογία της φασματοσκοπίας υπέρυθρου, η αρχή λειτουργίας ενός κλασικού φασματοφωτόμετρου απορρόφησης *IR* διπλής δέσμης (βλέπε σχήμα 3.2.3.2.) μπορεί να περιγράψει συνοπτικά ως εξής: Η υπέρυθρη ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται από την πηγή διαχωρίζεται αφού υποστεί ανάκλαση από ένα σύστημα επίπεδων κάτοπτρων σε δύο δέσμες όπου η μία διέρχεται μέσω του συστήματος αναφοράς (τυφλό) και η άλλη διέρχεται από το δείγμα. Οι δύο δέσμες ανακλώνται από ένα σύστημα περιστρεφόμενων κάτοπτρων το οποίο εναλλάσσεται προκαλώντας την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της δέσμης αναφοράς, για να προσπέσει τελικά στον μονοχρωμάτορα. Καθώς οι δέσμες εναλλάσσονται, το κάτοπτρο περιστρέφεται αργά και διαφορετικές συχνότητες υπέρυθρης ακτινοβολίας καταλήγουν στον ανιχνευτή, ο οποίος μετατρέπει την ενέργεια της *IR* ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα καταγράφοντας το φάσμα [40,59,74].



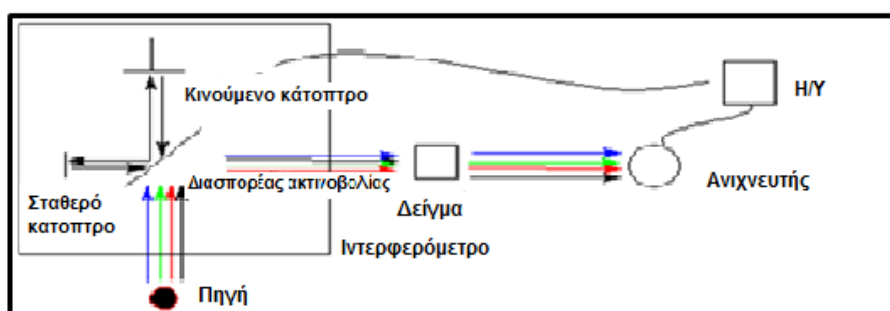
Εικόνα 3.2.3.1.: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου IR διπλής δέσμης

Η εισαγωγή μετασχηματισμών Fourier για την επεξεργασία των παραγόμενων σημάτων παρόλα αυτά, ήταν εκείνη η οποία χάρισε στη φασματοσκοπία υπέρυθρου τεράστια διάδοση αφού, τα πλεονεκτήματα ενός

οργάνου FT-IR σε σχέση με τα κλασικά φασματοφωτόμετρα υπερύθρου διπλής δέσμης είναι πως με το φασματόμετρο FT-IR λαμβάνονται φάσματα υπερύθρου, μετρώντας το σύνολο των υπέρυθρων συχνοτήτων ταυτόχρονα γεγονός το οποίο επιτρέπει ένα πολύ γρήγορο διαχωρισμό και καλύτερη ποσοτικοποίηση των στοιχείων. Επίσης, τα φάσματα FT-IR έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα σε όλη την περιοχή του φάσματος, έχουν βελτιωμένη αναλογία σήματος/θορύβου και μεγαλύτερη ευαισθησία, η οποία καταγράφεται αυτόματα και είναι το άθροισμα πολλών σαρώσεων σε μικρό χρονικό διάστημα [38,40,59,74].

Αυτό το οποίο αξίζει να αναφερθεί για τα όργανα FT-IR είναι η ύπαρξη συμβολομέτρου αντί μονοχρωμάτορα, η οποία και είναι υπεύθυνη για τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν. Ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα συμβολόμετρα είναι το συμβολόμετρο *Michelson* (ιντερφερόμετρο) (βλέπε εικόνα 3.2.3.3.) το οποίο συμμετέχει συνήθως σε συνδυασμό με κρυστάλλο υποδοχής δείγματος ATR (εξασθενημένης ολικής ανάκλασης) στην ανάλυση τροφίμων και ποτών [40,74].

Σχετικά με τη λειτουργία του συμβολομέτρου αρκεί να αναφερθεί η δημιουργία συμβολογραφήματος (θετικές ή μη συμβολές των δύο ακτινοβολιών) λόγω της εναλλασσόμενης διαφοράς διαδρομής κινητού με σταθερό κάτοπτρο, η οποία και επιτρέπει στον ανιχνευτή βάσει και της απορρόφησης του δείγματος να συσχετίσει την ενέργεια που φτάνει σε αυτόν με τον χρόνο για κάθε μήκος κύματος ταυτόχρονα [74].



Σχήμα 3.2.3.3.: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτόμετρου FT-IR

Πλήθος εφαρμογών για λόγους διάκρισης γνησιότητας και γεωγραφικής ή ποικιλιακής-βοτανικής προέλευσης έχουν λάβει χώρα σε αλκοολούχα ποτά με

χρήση FT-IR σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους με εξαιρετικά αποτελέσματα διάκρισης (βλέπε πίνακα 3.2.3.1. για κάποιες εφαρμογές). Συγκεκριμένα, τις περισσότερες φορές γίνεται απευθείας έγχυση του δείγματος σε κρύσταλλο ATR ή σε δισκίο KBr και συνήθως απομόνωση τμήματος του ληφθέντος φάσματος προς ανάλυση. Παρόλα αυτά, σε κάποιες περιπτώσεις λαμβάνει χώρα προ-κατεργασία του δείγματος κι όχι απευθείας λήψη φάσματος. Στόχος της εκάστοτε προ-κατεργασίας, είναι η λήψη συγκεκριμένης ομάδας ενώσεων ώστε να επιτευχθεί πιο ειδικός προσδιορισμός μέσω των φασμάτων και της εφαρμογής της χημειομετρίας.

Πίνακας 3.2.3.1.: Εφαρμογές FT-IR σε αλκοολούχα ποτά

Έρευνα	Αναλυτική τεχνική	Χημειομετρική μέθοδος	Βιβλιογραφία
Πιστοποίηση αυθεντικότητας κυπριακής Κουμανταρίας	ATR-FT-IR	PCA, HCA, LDA, CART, RDA	[75]
Έλεγχος ποιότητας και γνησιότητας σε ρουμάνικα κρασία	ATR-FT-IR	PCA, HCA	[76]
Ποικιλιακή διάκριση οίνων από την Αυστραλία	FT-IR	PCA, LDA	[77]
Διάκριση αυθεντικότητας μονοποικιλιακών οίνων από την Κρήτη βάσει του φαινολικού τους περιεχομένου	SPE, ATR-FT-IR	PCA, LDA	[78]

3.3. Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων

3.3.1. Περιστροφικός συμπυκνωτής/εξατμιστής (rotary evaporator)

Συνήθης διαδικασία στο εργαστήριο, είναι η απομάκρυνση ενός πτητικού διαλύτη από ένα μίγμα αντίδρασης ή από κλάσματα χρωματογραφίας ή από το διάλυμά μιας ανακρυστάλλωσης. Αυτή μπορεί να γίνει με απλή απόσταξη. Ταχύτερη τεχνική όμως είναι η χρήση του περιστρεφόμενου εξατμιστή (rotary evaporator) [79].

Η βασική αρχή λειτουργίας του εξατμιστή, που τον διαφοροποιεί από την απόσταξη με ελαττωμένη πίεση είναι, ότι η φιάλη απόσταξης περιστρέφεται κατά την απομάκρυνση του διαλύτη. Η περιστροφή αυτή βοηθάει στην αποφυγή της απότομης απόσταξης του διαλύτη και στην αύξηση της ταχύτητας απόσταξης λόγω διαβροχής των θερμαινόμενων τοιχωμάτων της φιάλης και σχηματισμού λεπτού υμενίου διαλύτη σ' αυτά. Πλεονεκτήματα του εξατμιστή σε σχέση με την απλή απόσταξη είναι η απλότητα, η ταχύτητα της διαδικασίας και οι ήπιες συνθήκες [79,80].

Η συσκευή αποτελείται από ένα ηλεκτρικό κινητήρα με ρυθμιζόμενη ταχύτητα περιστροφής, στηριγμένο σε μεταλλικό στήριγμα, που φέρει γυάλινο σωλήνα σε γωνία 45° ως προς το επίπεδο εργασίας με εσμύρισμα για την εφαρμογή της φιάλης απόσταξης (σφαιρική ή απιοειδής). Το άλλο άκρο του σωλήνα συνδέεται μέσω εξωτερικού τοιχώματος ενός ψυκτήρα με, σύστημα δημιουργίας ελαττωμένης πίεσης (υδραντλία, αντλία κενού κ.λπ.) και περιβάλλεται από τον εσωτερικό ελικοειδή σωλήνα του ψυκτήρα στον οποίο κυκλοφορεί νερό. Οι ατμοί που συμπυκνώνονται συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη συνδεδεμένη με το εξωτερικό τοίχωμα του ψυκτήρα διαμέσου ημισφαιρικής γυάλινης εσμυρισμένης σύνδεσης με τη βοήθεια σφιγκτήρα. Ο ψυκτήρας συνδέεται ερμητικά με το γυάλινο στέλεχος του κινητήρα έτσι ώστε να διατηρείται το κενό και να επιτρέπεται η περιστροφή του γυάλινου σωλήνα που φέρει τη φιάλη απόσταξης. Στο άλλο άκρο του ψυκτήρα απέναντι από το σημείο της σύνδεσης, υπάρχει εσμυρισμένη στρόφιγγα με οπή για την αποκατάσταση της πίεσης στο σύστημα μέσω δύο οπών στο εσμυρισμένο τοίχωμα του ψυκτήρα. Μια από τις δύο οπές καταλήγει σε γυάλινο σωλήνα από τον οποίο με εφαρμογή λεπτού σωλήνα μπορεί με την ελαττωμένη πίεση να

μεταφερθεί διαλύτης από κάποια φιάλη στη φιάλη απόσταξης διαμέσου γυάλινου σωλήνα προσαρμοσμένου στο πώμα του ψυκτήρα και να υπάρχει συνεχής απόσταξη του διαλύτη στη συνέχεια χωρίς διάλυση της συσκευής [80]. Η όλη διάταξη παρατίθεται στο σχήμα 3.3.1.1.

Για την εφαρμογή της διαδικασίας περιστροφικής συμπύκνωσης/εξάτμισης, η φιάλη της απόσταξης γεμίζεται μέχρι τη μέση το πολύ και βυθίζεται σε θερμαινόμενο υδρόλουτρο, ενώ συγχρόνως περιστρέφεται με ταυτόχρονη εφαρμογή κενού από αντλία. Ο διαλύτης εξατμίζεται συλλεγόμενος στη φιάλη συλλογής με ψύξη των ατμών του από τον ελικοειδή ψυκτήρα. Η φιάλη της απόσταξης αν δεν βυθιστεί σε υδρόλουτρο κατά την εξάτμιση του διαλύτη ψύχεται εξωτερικά καλυπτόμενη σταδιακά από στρώμα πάγου και έτσι καθυστερεί η απομάκρυνση του διαλύτη. Για τη λειτουργία του εξατμιστή αρχικά ανοίγεται η αντλία, τοποθετείται η φιάλη απόσταξης με το διαλύτη στον εσφυρισμένο σωλήνα, σφίγγεται με το σφιγκτήρα, κλείνεται η στρόφιγγα για την εφαρμογή της ελαττωμένης πίεσης στο σύστημα, αρχίζει η περιστροφή της φιάλης η οποία βυθίζεται στο υδρόλουτρο. Μετά το τέλος της απόσταξης το υδρόλουτρο απομακρύνεται, σταματά η περιστροφή και αποκαθίσταται η ατμοσφαιρική πίεση, ενώ η φιάλη απόσταξης συγκρατείται με το χέρι εφόσον δε συγκρατείται με σφιγκτήρα [80,81]. Η διαδικασία μπορεί να υλοποιηθεί μέχρι ξηρού ή μέχρις ελαίου, όπως και έγινε στην παρούσα εργασία.

3.3.2. Διασπορά ελαίου περιστροφικού εξατμιστή σε δισκίο KBr

Η λογική της εν λόγω προκατεργασίας στηρίζεται στην διασπορά-προσρόφηση του παραγόμενου ελαίου της περιστροφικής συμπύκνωσης/εξάτμισης του εκάστοτε δείγματος τσίπουρου επάνω σε δισκίο KBr.

Η παρασκευή δισκίου KBr στις λήψεις φασμάτων IR, αποτελεί καθιερωμένη πρακτική στις περιπτώσεις ιοντικών και γενικότερα αδιάλυτων σε κατάλληλους διαλύτες στερεών. Ο λόγος της επιλογής του KBr σχετίζεται με το γεγονός πως επειδή το KBr αποτελείται από πλέγμα μονοατομικών ιόντων, δεν εμφανίζει IR φάσμα (είναι διαπερατό) και συνεπώς δεν παρεμβάλλει στις μετρήσεις [59,74,82].

Σχετικά με τη διαδικασία παρασκευής του δισκίου απαιτείται ποσότητα 80-100 mg φασματοσκοπικής καθαρότητας KBr, το οποίο πρέπει να είναι καλά αποξηραμένο (διατήρηση σε ξηραντήρα) και το οποίο κονιορτοποιείται με χρήση γουδιού. Έπειτα, η σκόνη η οποία δημιουργήθηκε, μεταφέρεται σε καλούπι, όπου με χρήση πρέσας ασκείται μεγάλη πίεση (10.000 έως 15.000 psi) η οποία και μορφοποιεί διαφανές δισκίο πάχους ~1 mm [59,82].

Στο δισκίο τα οποίο δημιουργήθηκε στη συνέχεια, στάζεται ποσότητα ελαίου, που λήφθηκε ύστερα από τη χρήση του περιστροφικού συμπυκνωτή και αυτό αφήνεται να προσροφηθεί από το δισκίο σε φιαλίδιο εντός ξηραντήρα. Έπειτα, το δισκίο απομακρύνεται από το φιαλίδιο και με χρήση σπάτουλας τοποθετείται σε μεταλλικό υποδοχέα, όπου εφάπτεται άψογα. Επάνω στον υποδοχέα λαμβάνει χώρα η ακτινοβολή και η λήψη του φάσματος.



Εικόνα 3.3.2.1.: Πρέσα και καλούπι για παρασκευή δισκίου KBr

Κεφάλαιο 4: Πειραματικό μέρος

4.1. Δειγματοληψία

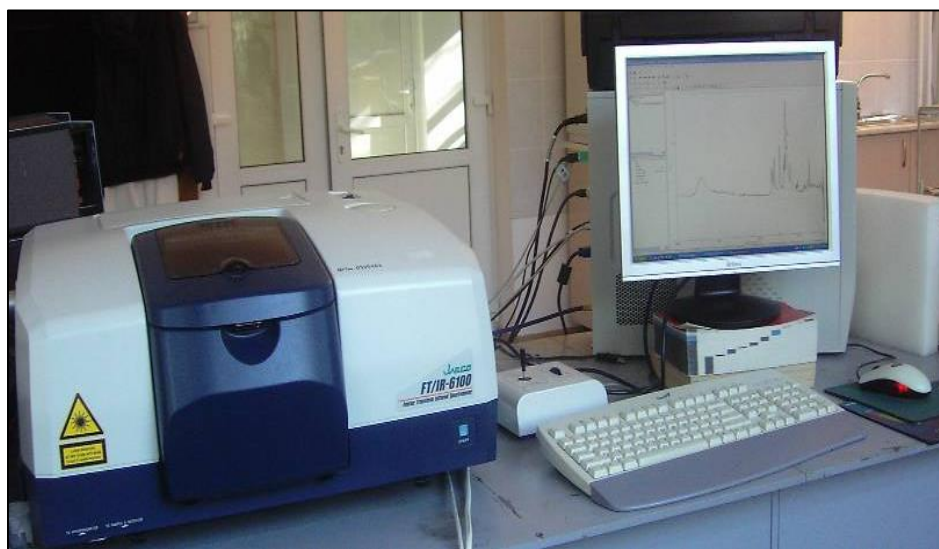
Στην παρούσα μελέτη θα μελετηθούν είκοσι ένα (21) δείγματα τσίπουρου-τσικουδιάς, από τα οποία τα δεκατρία (13) είναι χωρίς προσθήκη γλυκάνισου και τα επτά (7) με γλυκάνισο, ενώ ένα (1) δείγμα ήταν κρητική τσικουδιά. Η διαφοροποίηση αυτή υποδηλώνεται μέσω της ένδειξης «με» ή «χωρίς». Παρόλα αυτά, για λόγους διάκρισης βάσει είδους, γεωγραφικής προέλευσης, και πρώτης ύλης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κι άλλων αποσταγμάτων όπως ούζου, ζιβανίας, αράκ, ρακιάς, σάκε, ουίσκι κ.α. τα οποία σκοπό έχουν να καταδείξουν τη διάκριση των δειγμάτων.

Πίνακας 4.1.1.: Τα δείγματα τσίπουρου της μελέτης

α/α	Εμπορική Ονομασία	Κατηγορία	Αλκοολικός Βαθμός (% v/v)
1	Γάτσιου	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
2	Βρυσά	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
3	Ο Ταυρωπός	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
4	Ο Ταυρωπός	Τσίπουρο Με	44,0
5	Κωστέας Κλασσικό	Τσίπουρο Χωρίς	38,0
6	Κωστέας	Τσίπουρο Χωρίς	41,0
7	Κωστέας Special	Τσίπουρο Χωρίς	41,0
8	Μυθικό	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
9	Μυθικό	Τσίπουρο Με	40,0
10	Τσίπουρο Θεσσαλίας	Τσίπουρο Χωρίς	42,0
11	Τσίπουρο Θεσσαλίας	Τσίπουρο Με	42,0
12	Τσιλιλή	Τσίπουρο Με	42,0
13	Τσιλιλή	Τσίπουρο Χωρίς	41,0
14	Αποστολάκη	Τσίπουρο Με	42,5
15	Αποστολάκη	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
16	Χατζόπουλος	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
17	Δεκαράκι	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
18	Τσάνταλη Μακεδονικό	Τσίπουρο Με	42,0
19	Τσίπουρο Γαλαξίας	Τσίπουρο Με	40,0
20	Τσίπουρο Athenee	Τσίπουρο Χωρίς	40,0
21	Kreta Raki	Τσικουδιά	40,0

4.2. Ανάλυση FT-IR σε πλάκες ATR με απευθείας εφαρμογή

Για την εν λόγω ανάλυση στάχθηκε ποσότητα ~1 ml του εκάστοτε δείγματος σε κρύσταλλο ZnSe πλάκας ATR (εξασθενημένης ολικής ανάκλασης). Έπειτα έλαβε χώρα λήψη φάσματος με 124 σαρώσεις και διακριτικής ανάλυσης 16 cm^{-1} σε φασματοφωτόμετρο *Jasco-6100*. Μετά το πέρας της λήψης του φάσματος, ο κρύσταλλος σκουπίζεται με απορροφητικό χαρτί και νερό εις διπλούν και επανατοποθετείται το επόμενο δείγμα. Μετά την μέτρηση κάθε δέκα δειγμάτων έλαβε χώρα καθαρισμός και με ακετόνη πέραν του νερού.



Εικόνα 4.2.1.: Φασματοφωτόμετρο Υπερύθρου Jasco-6100 και οθόνη εργασίας



Εικόνα 4.2.2.: Βάση με πλάκα κρυστάλλου ATR

4.3. Συμπύκνωση σε περιστροφικό συμπυκνωτή

Για τη συμπύκνωση των δειγμάτων έγινε χρήση περιστροφικού συμπυκνωτή Buchi R-124. Για κάθε δείγμα ποσότητα 40 ml τοποθετήθηκε στην φιάλη του συμπυκνωτή και η συμπύκνωση έλαβε χώρα υπό κενό σε θερμοκρασία 80°C και σε ταχύτητα περιστροφής 200 rpm. Η συμπύκνωση έγινε για κάθε δείγμα μέχρις ελαίου.



Εικόνα 4.3.1.: Περιστροφικός συμπυκνωτής Buchi R-124

4.4. Δημιουργία δισκίων KBr

Για τη λήψη φάσματος IR των ελαίων, που δημιουργήθηκαν στον περιστροφικό συμπυκνωτή, χρησιμοποιούνται δισκία KBr, τα οποία παρασκευάζονται από 100 mg KBr φασματοσκοπικής καθαρότητας, το οποίο πρέπει να είναι καλά αποξηραμένο (διατήρηση σε ξηραντήρα) και το οποίο κονιορτοποιείται με χρήση γουδιού. Έπειτα, η σκόνη η οποία δημιουργήθηκε, μεταφέρεται σε καλούπι, όπου με χρήση πρέσας ασκείται μεγάλη πίεση (10.000 έως 15.000 psi) η οποία και μορφοποιεί διαφανές δισκίο πάχους ~1 mm και διαμέτρου 13 mm.

Στη συνέχεια, το κάθε δισκίο τοποθετείται σε φιαλίδιο όπου με χρήση πιπέτας Παστέρ στάζουμε μία σταγόνα ελαίου κάθε δείγματος σε διαφορετικό δισκίο, και

έπειτα αφήνουμε το χάπι να προσροφήσει τη σταγόνα για μια μέρα σε ξηραντήρα. Με τη βοήθεια μεταλλικού υποδοχέα, στον οποίο εφαρμόζουμε το κάθε δισκίο λαμβάνουμε το προς ανάλυση φάσμα.



Εικόνα 4.4.1.: Μεταλλικός υποδοχέας χαπιού KBr

4.5. Υπόλειμμα Απόσταξης

Υπόλειμμα απόσταξης των δειγμάτων μελετάται σε κρύσταλλο ATR. Η απόσταξη πραγματοποιείται, ούτως ή αλλιώς, για τη λήψη της αιθανόλης κάθε δείγματος (σε καθαρότητα >95 %) ώστε να γίνει η ανάλυση του SNIF-NMR και συνεπώς χρησιμοποιείται υπόλειμμα για ανάλυση FT-IR. Εφαρμογή ποσότητας υπολείμματος (~1 ml) στον κρύσταλλο ATR, τα οποία χρησιμοποιήσαμε για την απευθείας ανάλυση του δείγματος, μας παρέχει φάσματα προς επεξεργασία.

4.6. Λήψη φασμάτων με FT-IR

Τα φάσματα που ελήφθησαν για κάθε δείγμα και με την εκάστοτε προκατεργασία χρησιμοποιήθηκαν είτε ολόκληρα είτε τμήματα αυτών για χημειομετρική ανάλυση με στόχο την διάκριση ομάδων και τάσεων. Στο τμήμα αυτό όμως έμφαση δίνεται στην ερμηνεία των περιοχών των φασμάτων και στη σύγκριση αυτών είτε λόγω διαφορετικής προκατεργασίας, είτε λόγω της φύσης του δείγματος.

Σχετικά με την ανάλυση των φασμάτων FT-IR των δειγμάτων τσίπουρου, αρκεί να αναφερθεί ότι παρατηρούνται δονήσεις τάσης του O–H στην περιοχή $3600-3000\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες οφείλονται σε αλκοόλες, φαινόλες και νερό. Επίσης εμφανείς κορυφές διακρίνονται και στην περιοχή $1500-1000\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες και αντιστοιχούν στα σάκχαρα του δείγματος καθώς επίσης και στα κύρια οργανικά οξέα και στα αρωματικά συστατικά των τσίπουρων. Αντίθετα, μπορούμε να αποδώσουμε ελάχιστες πληροφορίες στην περιοχή $4000-3600\text{ cm}^{-1}$ [40,76,83].

Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή $1600-700\text{ cm}^{-1}$, αποτελεί την περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος (βλέπε εικόνα 3.2.3.1. & πίνακα 4.7.2.) και οι πολλές δονήσεις, οι οποίες παρατηρούνται είναι αδύνατο να ταυτοποιηθούν σε πολύπλοκα δείγματα όπως το τσίπουρο. Παρόλα αυτά, κάποιοι δεσμοί μπορούν να τοποθετηθούν στην περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος όπως δεσμοί C=C, C-C, C-O, οι οποίοι εντοπίζονται σε σάκχαρα όπως γλυκόζη, μαλτόζη και φρουκτόζη ή σε οξέα. Οι δεσμοί C≡N, C-H επίσης “ανήκουν” στην περιοχή αυτή [76,83,84,85]. Ειδικότερα, η επεξήγηση των φασματικών ζωνών και των ομάδων στις οποίες οφείλονται οι εκάστοτε κορυφές αποσταγμάτων, παρατίθενται συνοπτικά στους πίνακες 4.6.1. και 4.6.2.

Σχετικά τώρα με κάποιες άλλες χαρακτηριστικές δονήσεις, στα φάσματα παρατηρούνται ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης του -CH- στους 2946 cm^{-1} και 2900 cm^{-1} . Η δόνηση τάσης C=O στους 1720 cm^{-1} και στους 1640 cm^{-1} επίσης, αποδίδεται σε δονήσεις τάσης αλδεϋδών, κετονών, οξέων και εστέρων [83,84]. Η ύπαρξη των οξέων και εστέρων ενισχύεται επιπλέον και από τη δόνηση τάσης του δεσμού C-O στους 1260 cm^{-1} . Αναφορικά με τη σύσταση του τσίπουρου λοιπόν, όπου περιέχεται ακεταλδεϋδη, πλήθος από αιθυλεστέστερες, αρωματικά συστατικά με καρβονυλική ομάδα ή και δεσμό

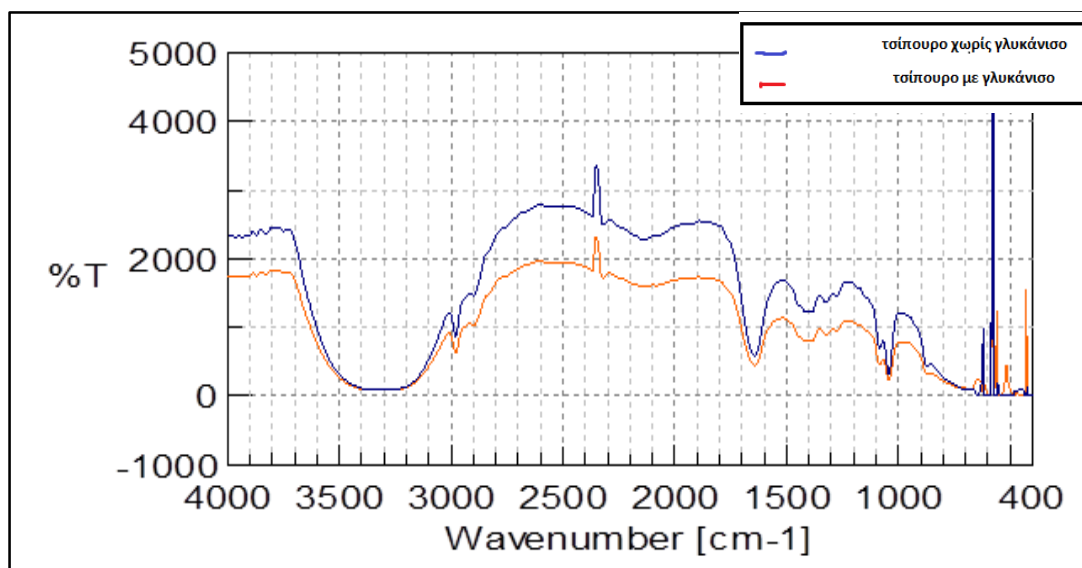
C-O, δικαιολογεί το μεγάλο αριθμό κορυφών στην περιοχή 1750-1000 cm^{-1} : [40,83]

Πίνακας 4.6.1.: Φασματικές περιοχές ενώσεων αποσταγμάτων [76,83]

Ζώνη στο φάσμα (cm^{-1})	Ενώσεις / Κατηγορίες Ενώσεων
< 970	Φωσφορικά, ακόρεστα λιπίδια, μονοϋποκατεστημένα φαινυλο παράγωγα
970-1100	Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Σουκρόζη, Ολιγοσακχαρίτες, Πολυσακχαρίτες, Ανάγοντα σάκχαρα
1100-1500	Οργανικά οξέα (τρυγικό, ηλεκτρικό, οξικό κ.α.), Φαινόλες
1500-1700	Τάσεις Αρωματικού δακτυλίου C=C, Εστέρες, Οργανικά οξέα, Αμινοξέα, Φαινολικά οξέα
2800-2950	Λιπαρά οξέα, Τάση δεσμού C-H αιθανόλης, C-H υδατανθράκων, Πολυόλες (Γλυκερόλη)
3000-3600	Τάση δεσμού O-H νερού, αλκοολών, φαινολών

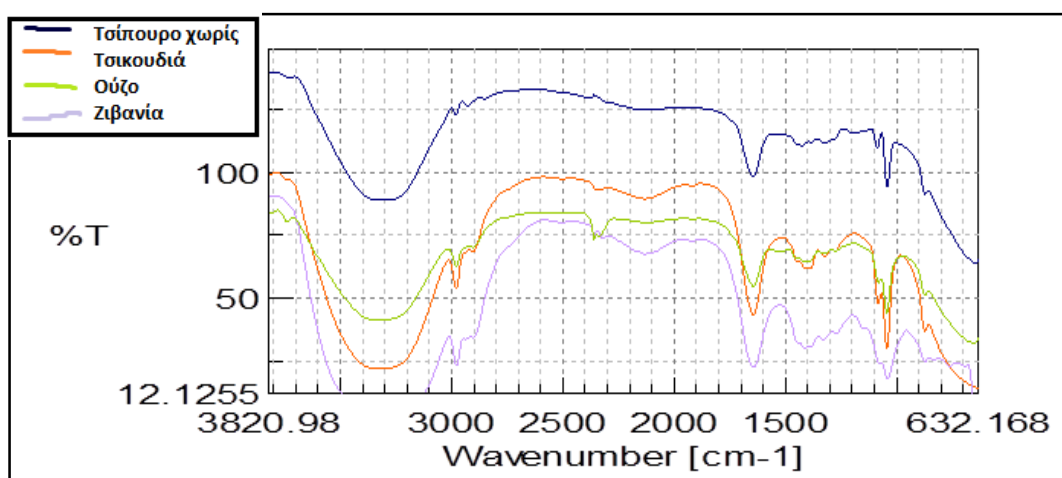
Πίνακας 4.6.2.: Τυπικές περιοχές δονήσεων χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων

Κορυφή (cm^{-1})	Απόδοση
3505-3451	-OH, δονήσεις τάσης
2965-2926	-CH, ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις τάσης
1721-1718	C=O, δονήσεις τάσης
1632-1630	C=C, δονήσεις τάσης
1454-1375	-CH, των -CH ₃ ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις παραμόρφωσης (δύο κορυφές)
1291-1229	Σκελετικές δονήσεις C-H δακτυλίου
1021-1014	Σκελετικές δονήσεις C-C δακτυλίου



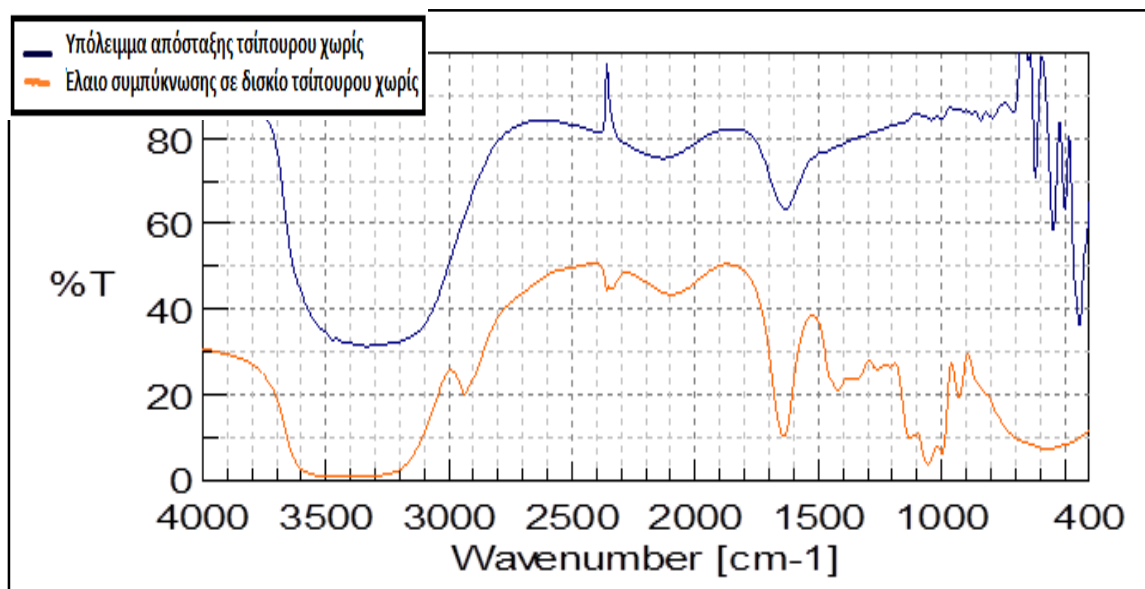
Σχήμα 4.6.1: Φάσμα ταίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο

Στο σχήμα 4.6.1 παρατηρούνται τα φάσματα χωρίς προ-κατεργασία σε κρύσταλλο ATR για δείγματα ταίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο, στα οποία όμως δεν διακρίνονται ποιοτικές διαφορές. Παρόλα αυτά αξίζει να καταδειχθεί το πλήθος κορυφών στην περιοχή $1600-1000\text{ cm}^{-1}$ που όπως προαναφέρθηκε αποδίδεται σε σάκχαρα, οξέα, εστέρες και αρωματικές ενώσεις (εστραγόλη, ευγενόλη, ανηθόλη) και η δόνηση τάσης O-H στην περιοχή $3700-3000\text{ cm}^{-1}$. Οι διακριτές απορροφήσεις στη ζώνη $3000-2900\text{ cm}^{-1}$, αποδίδονται σε τάσεις δεσμού C-H αιθανόλης ή υδατανθράκων.



Σχήμα 4.6.2.: Φάσμα σύγκρισης αποσταγμάτων

Στο παραπάνω φάσμα 4.6.2. αποσταγμάτων παρατηρείται μια γενική ομοιομορφία ζωνών του τσίπουρου και της τσικουδιάς με τη ζιβανία και το ούζο με διαφορές στις εντάσεις των κορυφών στα 1630 και 1100 cm^{-1} και στην ενδιάμεση τους περιοχή. Αυτές οι διαφορές ίσως αποτελέσουν αιτία διάκρισης μέσω χημειομετρικής ανάλυσης.

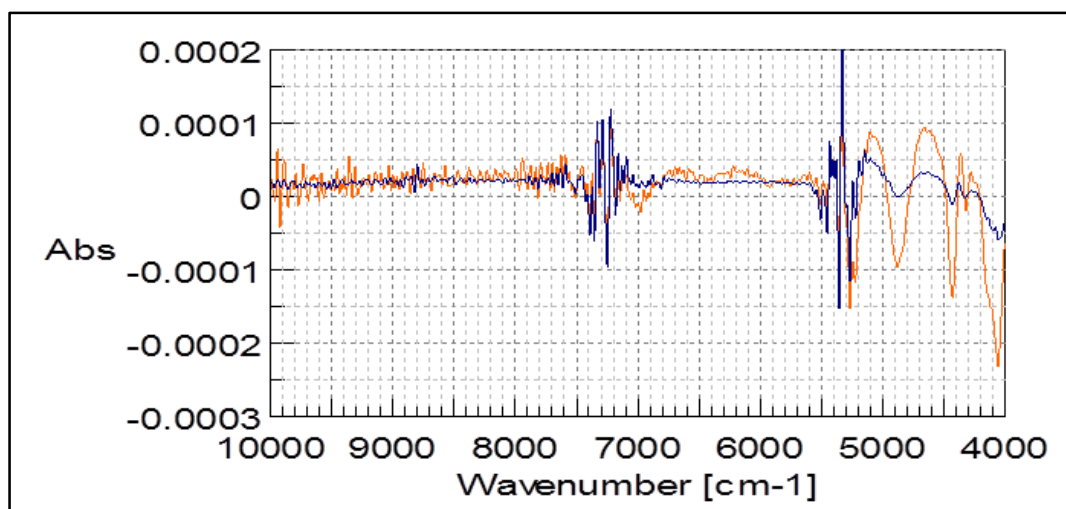


Σχήμα 4.6.3.: Σύγκριση φασμάτων τσίπουρου διαφορετικής προκατεργασίας

Για το φάσμα στο σχήμα 4.6.3., ισχύει πως προέρχεται από ίδιο δείγμα τσίπουρου έπειτα όμως από διαφορετική προ-κατεργασία. Εύκολα από το σχήμα 4.6.3. γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη κορυφών στην περιοχή 1650-1000 cm^{-1} στο φάσμα του δισκίου KBr. Αυτή η διάκριση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός, πως η περιστροφική συμπύκνωση αποτελεί ήπια διαδικασία απομάκρυνσης της αιθανόλης και του νερού των αποσταγμάτων με αποτέλεσμα την ανάδειξη της περιοχής όπου κυριαρχούν τα σάκχαρα και τα οξέα, αντίθετα με την απόσταξη, η οποία συντελείται για λήψη της αιθανόλης, και αποτελεί έντονη διαδικασία. Συνεπώς στο υπόλειμμα της απόσταξης (μπλε φάσμα) περιμένουμε ύπαρξη περισσότερου νερού (κορυφή 3600-3000 cm^{-1}) και συνεπώς μικρότερη συγκέντρωση σακχάρων (έλλειψη κορυφών 1650-1000 cm^{-1}).

Καταλήγοντας, πρέπει να αναφερθεί πως έγινε και χρήση μετατροπής, μέσω πρώτης παραγώγου, των φασμάτων που ελήφθησαν. Τα νέα φάσματα των

παραγώγων επεξεργάστηκαν κι αυτά με χημειομετρικά στατιστικά εργαλεία, ώστε να ελεγχθεί αν συντελούν στην οποιαδήποτε επιθυμητή διάκριση. Ανάλογη διαδικασία έλαβε χώρα και σε φάσματα του NIR.



Σχήμα 4.6.4.: Φάσμα πρώτης παραγώγου σίτουρων στο NIR

Στο σχήμα 4.6.4. παρατηρούνται περιοχές στα φάσματα πρώτης παραγώγου του NIR. Η περιοχή μεταξύ 5000-4000 cm^{-1} αποδίδεται σε συνδυασμό δεσμών C-H, η περιοχή στα 5500-5000 cm^{-1} σε συνδυασμό δεσμών O-H της αλκοόλης και του νερού των δειγμάτων, και η περιοχή 7700-6500 cm^{-1} σε υπέρτονες τάσεις των δεσμών O-H και C-H [86]. Γενικότερα, όπως και στα απλά φάσματα απορρόφησης του NIR, η πρώτη περιοχή είναι εκείνη, η οποία παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη διάκριση δειγμάτων μέσω χημειομετρίας μιας και αφορά πλήθος ενώσεων (σάκχαρα, οξέα κ.α.) [87].

4.7. Προετοιμασία δειγμάτων για IR-MS (δC^{13} , δO^{18})

Η λήψη των δεδομένων για τους ισοτοπικούς λόγους C^{13}/C^{12} , O^{18}/O^{16} έλαβε χώρα στα δείγματα του πίνακα 4.1.1. σε φασματόμετρο μάζας ισοτοπικών λόγων *Eurovector IR-MS – Euro EA Elemental Analyser* (Βλέπε εικόνα 4.7.1.). Η διαδικασία προετοιμασίας, για την υλοποίηση των μετρήσεων του εκάστοτε δείγματος, ήταν σύμφωνη με την ευρωπαϊκή νομοθεσία [66-69] και θα αναλυθεί συνοπτικά στη συνέχεια.



Εικόνα 4.7.1.: Φασματόμετρο Eurovector IR-MS-Euro EA και οθόνη εργασίας

Σχετικά με την προετοιμασία των δειγμάτων τσίπουρου-τσικουδιάς για την ανάλυση δO^{18} αμέσως μετά το άνοιγμα του κάθε δείγματος και πριν την οποιαδήποτε άλλη διαδικασία, έγινε λήψη με πιπέτα Pasteur ποσότητας ~2 ml. Η ποσότητα αυτή οδηγήθηκε σε φιαλίδιο, στο οποίο γράφηκαν τα στοιχεία του δείγματος, κλείστηκε προσεκτικά με parafilm μέχρι την ανάλυση. Ο λόγος λήψης ποσότητας αμέσως μετά το άνοιγμα της κάθε φιάλης έγινε για να αποφευχθεί η οποιαδήποτε πιθανή αλλοίωση του ισοτοπικού λόγου του οξυγόνου του δείγματος με έκθεση αυτού στο οξυγόνο του περιβάλλοντος. Η λογική της ανάλυσης δO^{18} επεξηγήθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2.2.

Σε ό,τι σχετίζεται με την εύρεση του δC^{13} και σύμφωνα με τη νομοθεσία για τα αλκοολούχα ποτά, 50 ml από το κάθε δείγμα-απόσταγμα οδηγούνται σε

σφαιρική φιάλη των 200 ml και λαμβάνει χώρα απόσταξη. Στόχος είναι η συλλογή αποστάγματος καθαρότητας >95% σε αιθανόλη (προσδιοριζόμενο μόριο), μέρος του οποίου συλλέγεται σε φιαλίδιο, το οποίο κλείνεται ερμητικά, και οδηγείται για ανάλυση. Η λογική της ανάλυσης για εύρεση δ C^{13} επεξηγήθηκε στο υπό-κεφάλαιο 3.2.2.

4.8. Προετοιμασία δειγμάτων για SNIF-NMR

Η ανάλυση για τον προσδιορισμό των λόγων δευτερίου (D/H)_I, (D/H)_{II} της αιθανόλης των δειγμάτων του πίνακα 4.1.1. λαμβάνει χώρα σε φασματογράφο N.M.R. *Bruker Snif- Ultrashield 400 MHz* (βλέπε εικόνα 4.8.1.). Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων, έτσι ώστε να ληφθεί τελικώς το φάσμα της αιθανόλης έγινε σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία [62,88].



Εικόνα 4.8.1.: Φασματογράφος N.M.R. *Bruker Snif - Ultrashield 400 MHz*

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων περιλαμβάνει την απόσταξη 50 ml δείγματος τσίπουρου-τσικουδιάς, τη λήψη του αποστάγματος σε ικανοποιητική απόδοση απόσταξης, τη μέτρηση της υγρασίας στο απόσταγμα μέσω της τιτλομετρικής μεθόδου Karl Fischer σε συσκευή (βλέπε εικόνα 4.8.2.) και τέλος την προετοιμασία του σωλήνα, ο οποίος θα τοποθετηθεί στο φασματογράφο.

Για την προετοιμασία σωλήνα SNIF-NMR διαμέτρου 10 mm απαιτούνται [88]:

- Προζύγιση φιαλιδίου παρασκευής
- Προσθήκη προτύπου TMU (N,N-τετραμεθυλουρία 99,9% καθαρότητας) 1,3 ml σε απαγωγό
- Προσθήκη αιθανόλης απόσταξης (95% v/v) 3,2 ml και ομογενοποίηση
- Προσθήκη 150 μL C_6F_6 για σταθεροποίηση του πεδίου συχνότητας (μείωση πλάτους του σήματος $-\text{OH}$)
- Μετάγγιση του μείγματος σε προζυγισμένο σωλήνα SNIF-NMR 10 mm, με σύριγγα και καπάκι φιλτραρίσματος
- Ζύγιση σωλήνα πριν την εφαρμογή πεδίου ώστε να μελετηθεί τυχόν απώλεια.



Εικόνα 4.8.2.: Τιτλομετρική συσκευή Karl Fischer

Κεφάλαιο 5: Χημειομετρική ανάλυση

5.1.: Ανάλυση φασμάτων FT-IR

Στο κεφάλαιο αυτό, θα παρατεθούν τα αποτελέσματα της χημειομετρικής ανάλυσης των φασμάτων FT-IR, τα οποία κατέδειξαν σημαντική διάκριση, ταξινόμηση και ομαδοποίηση των δειγμάτων. Έπειτα θα γίνει μια εκτίμηση-επεξήγηση του λόγου διαφοροποίησης. Για τη χημειομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά SIMCA και SCAN, τα οποία παρέχουν τη δυνατότητα διάκρισης δειγμάτων με πολλές ομοιότητες.

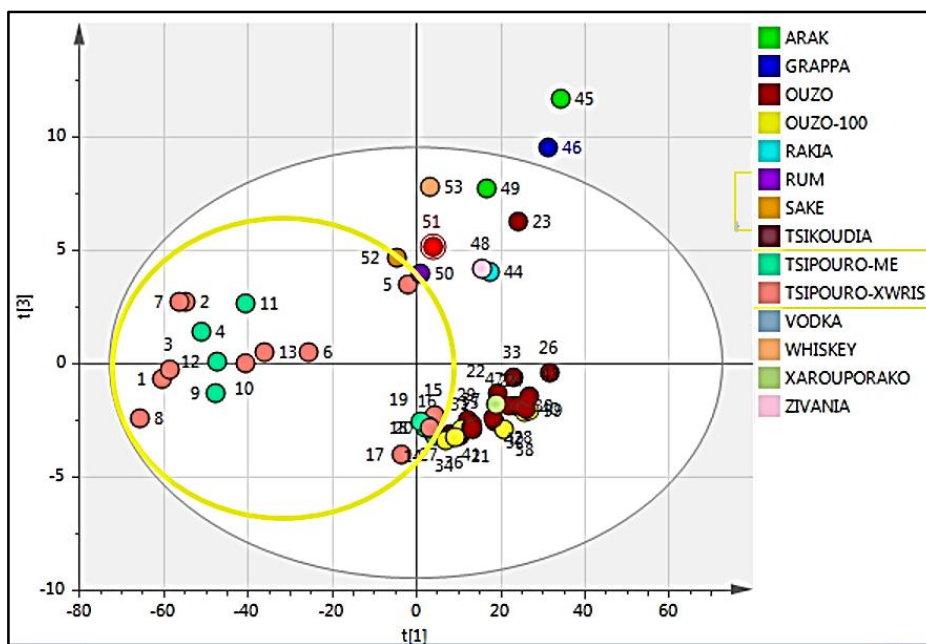
5.1.1. Διάκριση δειγμάτων τσίπουρου από άλλα ξένα αποστάγματα

A) PCA σε φάσματα αποσταγμάτων χωρίς προ-κατεργασία

Αναγνωριστική χημειομετρική ανάλυση έλαβε χώρα σε 53 φάσματα αποσταγμάτων, εκ των οποίων τα 21 ήταν τσίπουρα (βλέπε παράρτημα Πίνακας 1). Χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η περιοχή μέσου υπερύθρου ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) και σε κάθε φάσμα δείγματος αντιστοιχίστηκαν 940 μεταβλητές/σημεία. Η λήψη του καθε φάσματος έγινε σε κρύσταλλο ATR χωρίς προ-κατεργασία των δειγμάτων και η ανάλυση έγινε στα φάσματα απορρόφησης.

Η μέθοδος συνδιακύμανσης (covariance) και η μέθοδος συσχέτισης (correlation) είναι οι μέθοδοι υπολογισμού των κύριων συνιστωσών με τη χρήση του πίνακα συνδιακύμανσης και του πίνακα συσχέτισης αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτή έγινε εφαρμογή της μεθόδου συνδιακύμανσης.

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) σε δύο άξονες διέκρινε τα τσίπουρα με και χωρίς γλυκάνισο σε μία ενιαία ομάδα/περιοχή του διαγράμματος σκέδασης σε σχέση με τα υπόλοιπα αποστάγματα (Εικόνα 5.1.1.1.). Το αθροιστικό ποσοστό της πρώτης και της δεύτερης συνιστώσας αντιπροσωπεύουν το 90,26% της συνολικής πληροφορίας σχετικά με τα φασματοσκοπικά δεδομένα. Το σύνολο της πληροφορίας (~100%), δίνεται από πέντε πρώτες κύριες συνιστώσες.



Εικόνα 5.1.1.1.: Διάγραμμα σκέδασης της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών

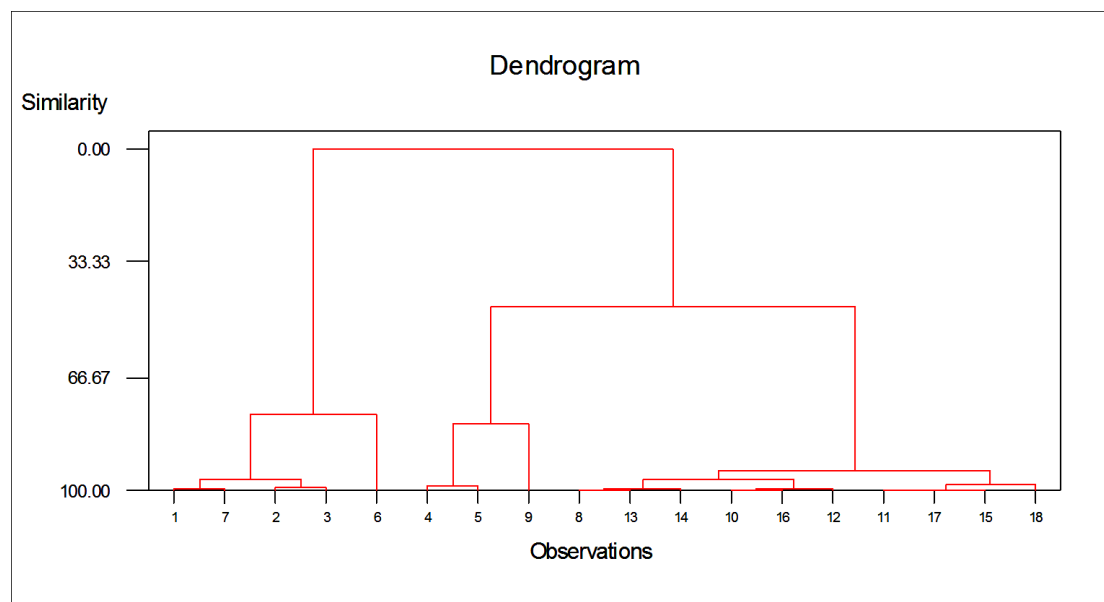
B) HCA, PCA σε φάσματα από δισκίο KBr στο NIR

Ανάλογη διαδικασία υλοποιήθηκε στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (NIR) σε 18 δείγματα αποσταγμάτων (Παράρτημα πίνακας 2) εκ των οποίων τα τρία ήταν τσίπουρα του πίνακα 4.1.1.. Πιο συγκεκριμένα, 40 ml κάθε δείγματος συμπυκνώθηκαν μέχρις ελαίου σε περιστροφικό εξατμιστή και μικρή ποσότητα από το έλαιο στάχθηκε σε δισκίο KBr ώστε να ληφθεί φάσμα. Χρησιμοποιήθηκε από το NIR η περιοχή $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ και τα φάσματα απορρόφησης ήταν εκείνα που επεξεργάστηκαν χημειομετρικά μέσω PCA και HCA.

B₁) Σε ότι αφορά την Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες (HCA), αυτή γίνεται με σκοπό τον εντοπισμό συστάδων (ομάδων) χωρίς να απαιτείται οποιοδήποτε κριτήριο, το οποίο να χαρακτηρίζει κάθε συστάδα ή τη δημιουργία μοντέλου. Στηρίζεται μόνο στην απόσταση μεταξύ των δειγμάτων που αποτελεί και το κριτήριο διαχωρισμού τους. Η απόσταση, η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη ανάλυση, είναι η απόσταση Manhattan.

Όπως παρατηρείται στο δενδρόγραμμα της εικόνας 5.1.1.2., υπάρχουν τρεις συστάδες με ομοιότητα μεγαλύτερη του 75%. Η πρώτη συστάδα αποτελείται

από 5 δείγματα στα οποία έχουν ταξινομηθεί και τα τρία τσίπουρα (αριθμοί 1,2,3) μαζί με 2 δείγματα κυπριακής ζιβανίας (6,7). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει 3 μόνο δείγματα τα οποία είναι 2 δείγματα ούζου (αριθμοί 4,5) και ένα δείγμα αράκ ιορδανίας (αριθμός 9). Η τρίτη και μεγαλύτερη ομάδα διαθέτει 11 δείγματα αποσταγμάτων (αριθμοί 10-18) διαφόρων χωρών.



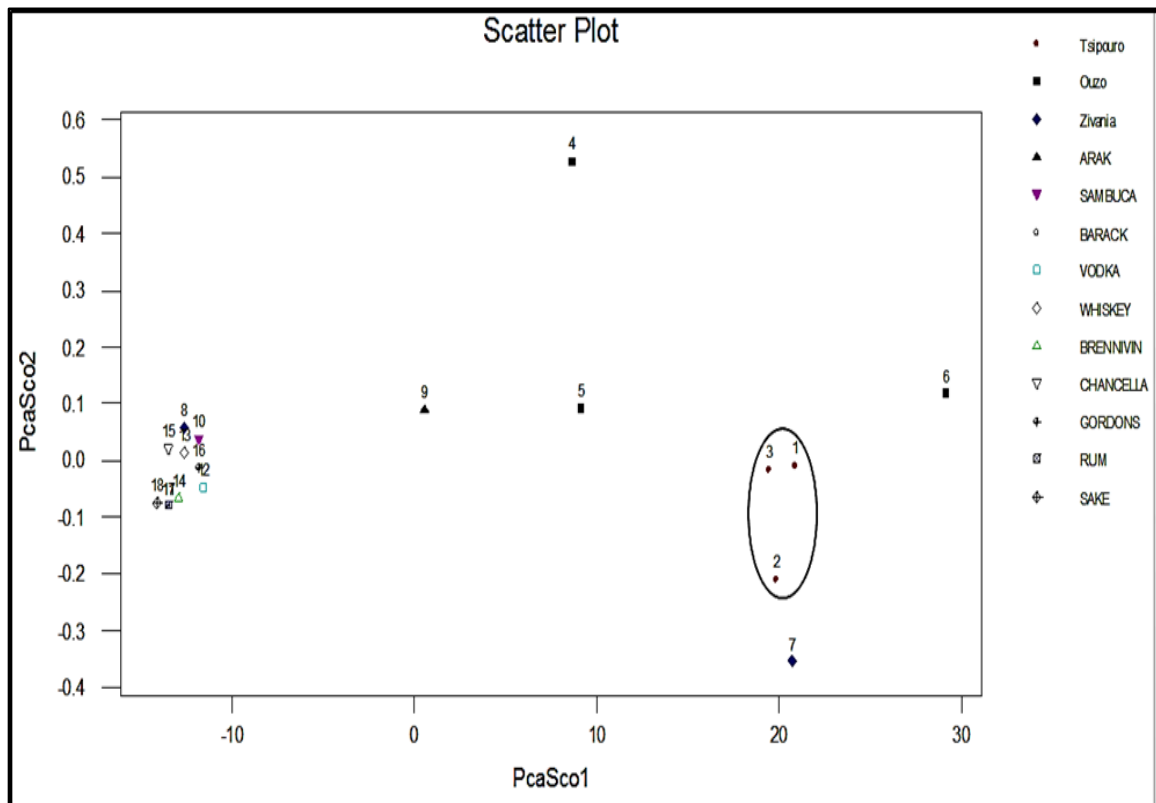
Εικόνα 5.1.1.2.: Δενδρόγραμμα από Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες 18 δειγμάτων

Η ομαδοποίηση των δειγμάτων τσίπουρου με τα δείγματα της κυπριακής ζιβανίας μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως τα δυο αυτά αποστάγματα είναι σχεδόν όμοια μιας και έχουν ως πρώτη ύλη τα στέμφυλα του σταφυλιού και παράγονται με πανομοιότυπη διαδικασία απόσταξης. Οι δύο αυτοί παράγοντες είναι εξαιρετικά σημαντικοί και εξηγούν ικανοποιητικά την ομαδοποίηση. Κάτι ανάλογο παρατηρείται και στην περίπτωση των ούζων με το αράκ.

B₂) Σχετικά με την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), εφαρμόστηκε κι αυτή σε φάσματα NIR δισκίου KBr με έλαιο στην περιοχή $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ σε 18 δείγματα αποσταγμάτων, όπου τα 3 ήταν δείγματα τσίπουρου (βλέπε Παράρτημα πίνακας 2).

Ο υπολογισμός των συνιστωσών έγινε με τη μέθοδο της συσχέτισης και η ανάλυση δόμησε τα τσίπουρα σε μια ευδιάκριτη ομάδα-περιοχή του διαγράμματος σκέδασης για την πρώτη και τη δεύτερη κύρια συνιστώσα

(Εικόνα 5.1.1.3.). Πιο συγκεκριμένα το σύνολο της πληροφορίας (100%) παρέχεται από τις δυο πρώτες κύριες συνιστώσες, ενώ οι υπόλοιπες περιέχουν μηδενική πληροφορία. Το γεγονός της επάρκειας μόνο δύο συνιστωσών οφείλεται στο μικρό όγκο δεδομένων, μιας και τα δείγματα είναι 18 με σαφώς καθορισμένες διαφορές. Τα είδη των ποτών παρέχονται και στην εικόνα 5.1.1.3. και όπως και πριν, στην ανάλυση HCA, τα τσίπουρα φέρουν τους αριθμούς 1,2,3.



Εικόνα 5.1.1.3.: Διάγραμμα σκέδασης 18 δειγμάτων αποσταγμάτων

5.1.2. Διάκριση δειγμάτων τσίπουρου από ούζου

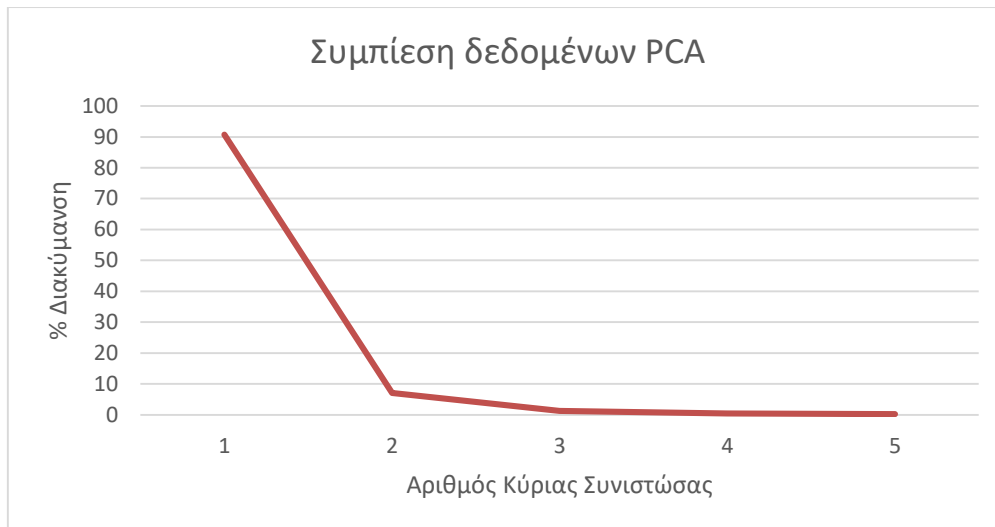
Η λογική της μελέτης για διάκριση τσίπουρων από ούζα ενισχύθηκε από το γεγονός ότι και τα δύο αποτελούν ελλαδικά αποστάγματα, καθώς επίσης και λόγω του ότι τόσο τα ούζα όσο και κάποια τσίπουρα περιέχουν γλυκάνισο. Η μελέτη έλαβε χώρα στο υπόλειμμα της απόσταξης των 44 δειγμάτων (21 τσίπουρα, 21 ούζα, 1 ζιβανία (βλέπε Παράρτημα πίνακας 3)) και χρησιμοποιήθηκε η πρώτη παράγωγος των φασμάτων απορρόφησης για χημειομετρική μελέτη. Για όλες τις χημειομετρικές μεθόδους χρησιμοποιήθηκε περιοχή του φάσματος 1200-720 cm^{-1} .

A) Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA

Για την ανάλυση PCA σε υπόλειμμα απόσταξης των 44 δειγμάτων η εξαγωγή των κυρίων συνιστωσών έγινε με τη μέθοδο της συν-διακύμανσης. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες είχαν αθροιστικό ποσοστό διακύμανσης 97,8% της συνολικής πληροφορίας. Η μεγάλη αυτή τιμή της αθροιστικής διακύμανσης των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών οφείλεται και στο μικρότερο αριθμό των μεταβλητών της περιοχής 1200-720 cm^{-1} από το σύνολο του φάσματος. Η συνολική πληροφορία (~100%) περιέχεται σε πέντε κύριες συνιστώσες.

Πίνακας 5.1.2.1.: Αθροιστική διακύμανση κύριων συνιστωσών

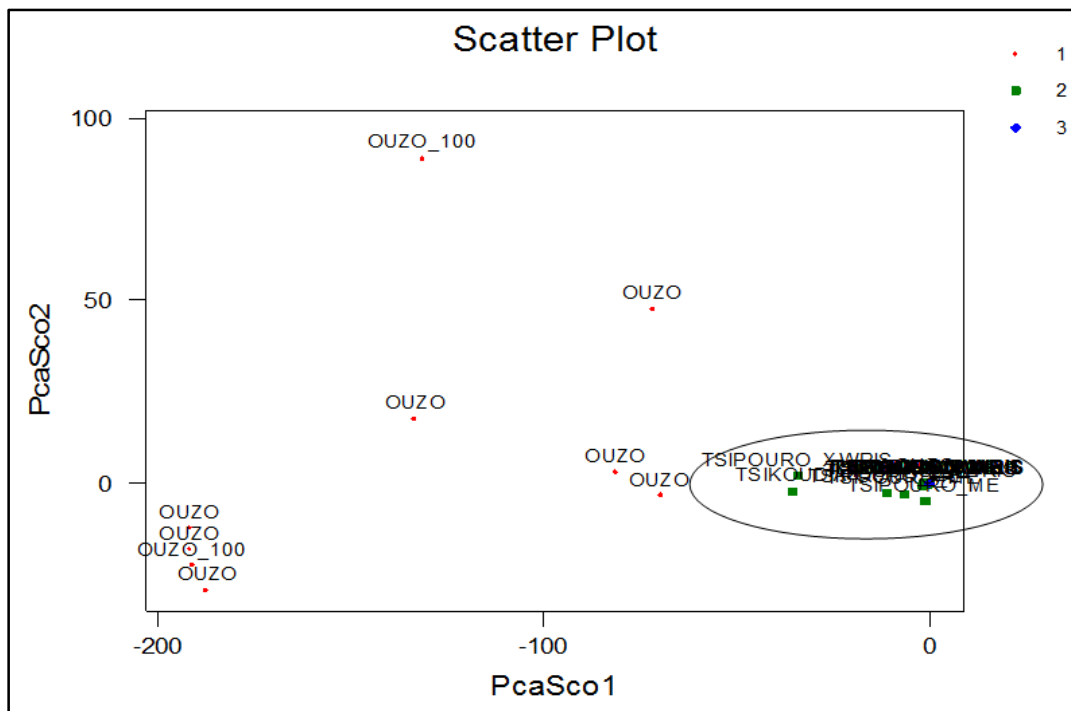
Κύρια Συνιστώσα	% Διακύμανση	Αθροιστικό ποσοστό διακύμανσης
1	90,7	90,70
2	7,1	97,80
3	1,3	99,10
4	0,4	99,50
5	0,2	99,70



Σχήμα 5.1.2.1.: Σχηματικό ποσοστό διακύμανσης μεταβλητών ανά συνιστώσα

Σχετικά με το διάγραμμα σκέδασης (Εικόνα 5.1.2.1.) των δύο πρώτων κυρίων συνιστωσών, παρατηρείται ομαδοποίηση των τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο σε μια περιοχή του χώρου μαζί με το δείγμα της κυπριακής ζιβανίας και κάποιων δειγμάτων ούζου. Η ταύτιση του χώρου ύπαρξης των τσίπουρων με τη ζιβανία μπορεί να βασιστεί στο γεγονός ότι και η ζιβανία αποτελεί απόσταγμα στεμφύλων ενώ το ούζο είναι ποτό ανάμειξης, το οποίο όμως προέρχεται από αλκοόλη είτε μελασσική είτε οινική. Τα οινικής προέλευσης ούζα λοιπόν, ίσως έχουν λόγο ύπαρξης στην περιοχή των τσίπουρων, λόγω ομοιότητας στην πρώτη ύλη παραγωγής της αλκοόλης. Ενδεικτικά αναφέρεται η χρωματική διάκριση των ομάδων των δειγμάτων:

- 1) Ούζο (κόκκινο)
- 2) Τσίπουρο με & Τσίπουρο χωρίς (πράσινο)
- 3) Ζιβανία (μπλέ)



Εικόνα 5.1.2.1.: Διάγραμμα σκέδασης 44 δειγμάτων ούζων-τσιπουρών-ζιβάνιας

B) Ταξινόμηση με Ομαλοποιημένη Διακριτική Ανάλυση (RDA)

Η Ομαλοποιημένη Διακριτική Ανάλυση (RDA) είναι μέθοδος ταξινόμησης, η οποία στηρίζεται σε πιθανότητες, απορρίπτοντας τα απομακρυσμένα δείγματα οριστικά. Για τη δόμηση του μοντέλου χρησιμοποιείται η μέθοδος «Leave one out». Αφού έχουν οριστεί οι ομάδες μελετάται η συμπεριφορά κάθε άγνωστου δείγματος ως προς τις μεταβλητές διάκρισης και κατάταξης στο μοντέλο. Αυτό επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα μέχρι τη δόμηση του μοντέλου και την ταξινόμηση των δειγμάτων σε αυτό [38]. Η Διακριτική Ανάλυση γενικότερα (DA), στηρίζεται στους βαθμούς των κύριων συνιστωσών, οι οποίοι έχουν ήδη προσδιοριστεί, υπολογίζεται η μέση τιμή των μετρήσεων σε κάθε μήκος κύματος για κάθε ομάδα και στη συνέχεια, υπολογίζεται η απόσταση κάθε παρατήρησης από τη μέση τιμή!

Οι ομάδες, οι οποίες ορίζονται για την συγκεκριμένη ανάλυση είναι οι εξής:

- 1) Ούζα (22 δείγματα με αριθμούς δειγμάτων 1-22)
- 2) Τσίπουρα-Τσικουδιά-Ζιβανία (22 δείγματα με αριθμούς δειγμάτων 23-44)

Παράμετροι διασταυρωμένης επικύρωσης

Τάξη	Πιθανότητα	Αρ. Δειγμάτων	Αποστάσεις κέντρων τάξεων
1	0.500	22	0.0 1.0
2	0.500	22	1.0 0.0

Συχνότητα σφάλματος δόμησης (No-model Error Rate) : 0.500

Επικινδυνότητα (No-model Risk) : 0.500

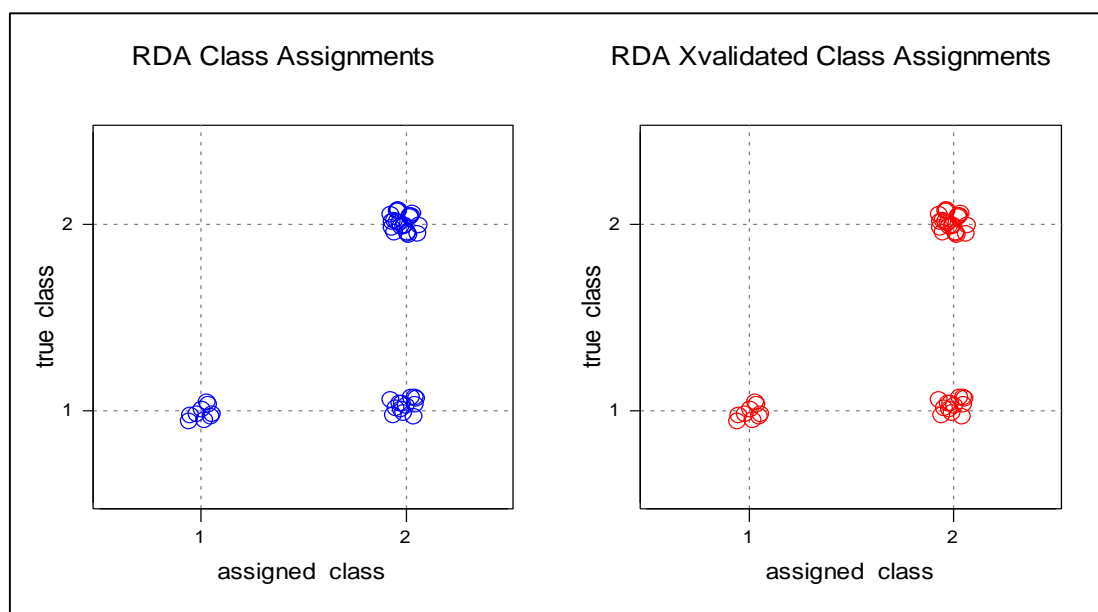
Στον πίνακα 5.1.2.2. και στο σχήμα 5.1.2.2. δίνεται περιγραφή της επιτυχίας δόμησης του μοντέλου των 44 δειγμάτων καθώς και η επιτυχία ταξινόμησης. Στο σχετικό πίνακα δίνεται το ποσοστό ορθής πρόβλεψης στη δόμηση του μοντέλου και για την ομάδα 2, η οποία αποτελεί το ερευνητικό ενδιαφέρον, σε επίπεδο 100%. Όλα τα δείγματα τσίπουρου-τσικουδιάς-ζιβανίας εφαρμόζουν στο μοντέλο. Αντιθέτως, σχετικά με την ομάδα 1 των ούζων υπήρχε ποσοστό επιτυχούς κατάταξης 40,9% με το υπόλοιπο 59,1% να κατατάσσεται στην ομάδα 2 των τσίπουρων. Το σφάλμα δόμησης του μοντέλου είναι 29,55%.

Πίνακας 5.1.2.2.: Ταξινόμηση σε 2 ομάδες με RDA

	Πραγματική ταξη	Αρ. Δειγμάτων	Προκαθορισμένη τάξη		% ορθής πρόβλεψης
			1	2	
Τσίπουρα/ Ζιβανία	2	22	0	22	100%
Ούζα	1	22	9	13	40,9%
Ποσοστό Σφάλματος = 29,55%					
Cross-validation					
Τσίπουρα/ Ζιβανία	2	22	0	22	100%
Ούζα	1	22	9	13	40,9%
Ποσοστό Σφάλματος = 29,55%					

Σχηματικά, τα αποτελέσματα του ανωτέρω πίνακα δίνονται από το σχήμα 5.1.2.2.. Η ταξινόμηση των αγνώστων δειγμάτων στο μοντέλο που ακολουθήθηκε γίνεται με σφάλμα 29,55%, μιας και 13 δείγματα ούζου ταξινομούνται στην ομάδα των τσίπουρων, η οποία είναι αμιγής δίχως καμία εσφαλμένη κατάταξη και ποσοστό επιτυχίας ταξινόμησης 100%.

Η λάθος ταξινόμηση δειγμάτων ούζου στην ομάδα των τσίπουρων θα μπορούσε να αποδοθεί, όπως προαναφέρθηκε, στο γεγονός ότι η αλκοόλη των ούζων μπορεί να είναι είτε μελασσικής, είτε οινικής προέλευσης. Συνέπεια του προηγούμενου αποτελεί, πως τα ούζα αλκοόλης οινικής προέλευσης παρουσιάζουν ομοιότητες με τα τσίπουρα στις περιεχόμενες σε αυτά ενώσεις δίνοντας παρόμοια φάσματα με κοινές συχνότητες απορρόφησης στο IR.



Σχήμα 5.1.2.2.: Σχηματική συμπεριφορά των 44 δειγμάτων ούζου-τσίπουρου

5.1.3. Διάκριση τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο

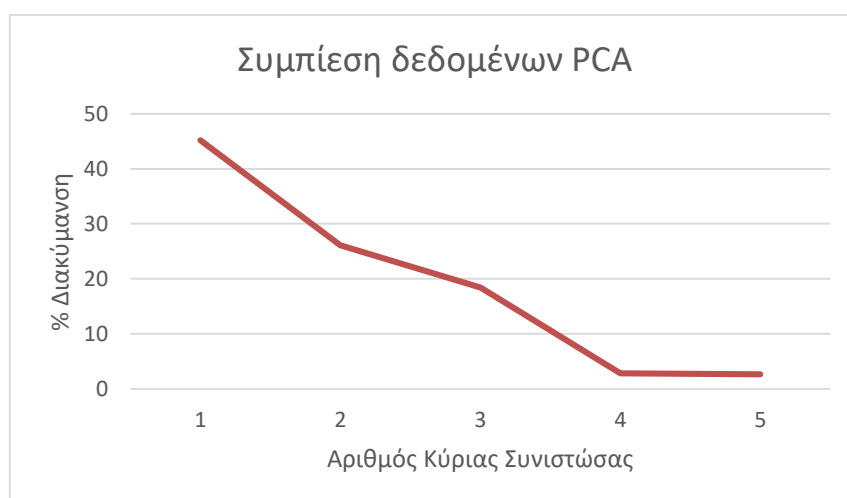
Με τη δοκιμή διάκρισης των τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο επιδιώκεται να κατανοηθεί η σημασία της προσθήκης αρωματικών σπόρων κατά την απόσταξη, και το κατά πόσο οι ενώσεις αυτές συντελούν σε διαφορές στα φάσματα FT-IR, σε σχέση με τσίπουρα χωρίς γλυκάνισο ή τσικουδιάς. Η λήψη φασμάτων έγινε σε δισκίο KBr στο οποίο στάχθηκε έλαιο του κάθε δείγματος τσίπουρου (βλέπε πίνακας 4.1.1.), που προήλθε από περιστροφικό εξατμιστή. Τα φάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για χημειομετρική διάκριση ήταν αυτά της πρώτης παραγωγού της απορρόφησης, ενώ για μείωση των μεταβλητών αλλά και για λήψη της περιοχής του αποτυπώματος, χρησιμοποιήθηκε η περιοχή κυματήριμων $1350-400\text{ cm}^{-1}$. Η περιοχή μάλιστα $1350-900\text{ cm}^{-1}$ αποτελεί περιοχή όπου η ύπαρξη ή όχι της ανηθόλης παίζει ρόλο στις παρατηρούμενες απορροφήσεις.

A) Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA)

Για την ανάλυση PCA σε έλαιο συμπύκνωσης σε δισκίο KBr για 21 δείγματα τσίπουρου (βλέπε πίνακα 4.1.1.) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συνδιακύμανσης για την εξαγωγή των κυρίων συνιστωσών. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες είχαν αθροιστικό ποσοστό διακύμανση 71,2% της συνολικής πληροφορίας ενώ η συνολική πληροφορία παρέχεται από πέντε συνιστώσες όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.1.3.1. Σχετικά με τα δείγματα πρέπει να αναφερθεί πως 14 είναι δείγματα χωρίς γλυκάνισο και 7 είναι αυτά με γλυκάνισο

Πίνακας 5.1.3.1.: Αθροιστική διακύμανση κύριων συνιστωσών

Κύρια Συνιστώσα	% Διακύμανση	Αθροιστικό ποσοστό διακύμανσης
1	45,2%	45,2%
2	26,1%	71,2%
3	18,4%	89,6%
4	2,8%	92,4%
5	2,6%	95,1%

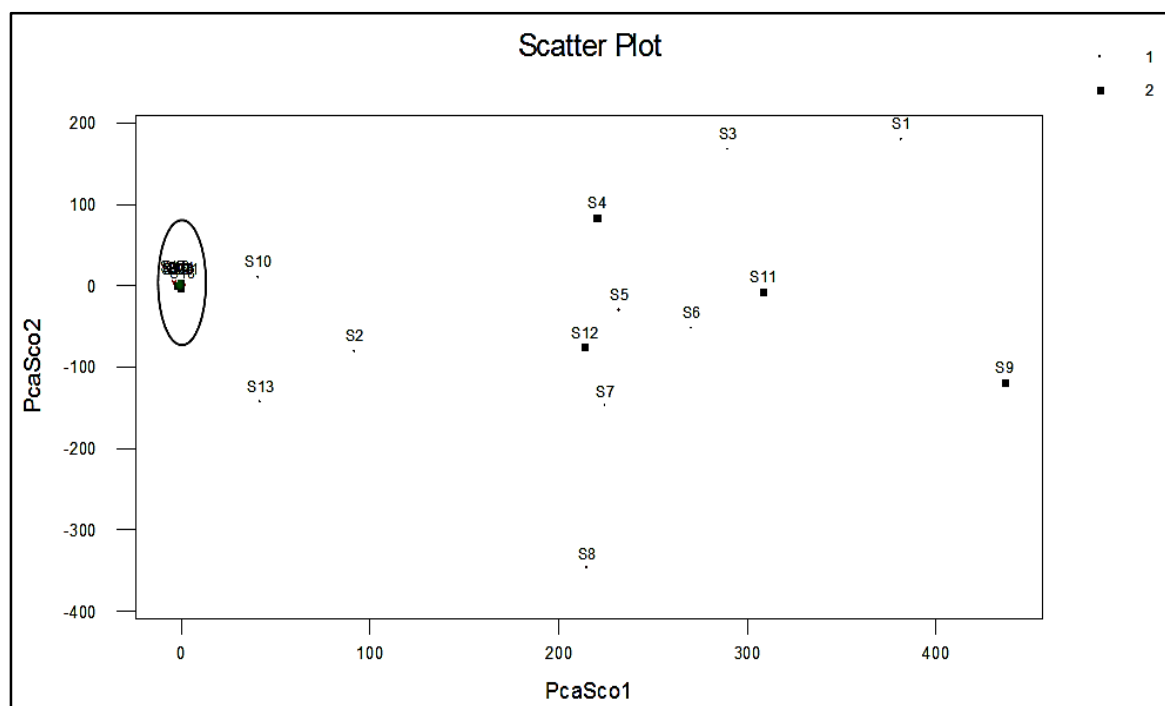


Σχήμα 5.1.3.1.: Σχηματικό ποσοστό διακύμανσης μεταβλητών ανά συνιστώσα

Σε ότι αφορά το διάγραμμα σκέδασης (Εικόνα 5.1.3.1.), όπως γίνεται αντιληπτό κι από το χαμηλό ποσοστό πληροφορίας που αντιπροσωπεύεται στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (μεγάλη διαστασικότητα των παρατηρήσεων) δεν παρατηρείται κάποια εμφανής ομαδοποίηση δειγμάτων με και χωρίς γλυκάνισο. Η αιτία της μη ομαδοποίησης μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως στην επιλεγμένη περιοχή μηκών κύματος, κάθε δείγμα παρουσιάζει πολλές σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις απορροφήσεις ή και τις εντάσεις αυτών. Η παραδοχή αυτή συνεπάγεται, πως η ύπαρξη των αρωματικών ενώσεων του γλυκάνισου δεν συντελεί σε ουσιαστική διαφοροποίηση των αρωματισμένων δειγμάτων. Άλλωστε στη μοναδική περιοχή συσσώρευσης παρατηρήσεων στο διάγραμμα, παρατηρούνται τόσο δείγματα με όσο και χωρίς γλυκάνισο, το οποίο υποδηλώνει σημαντική ομοιότητα φασμάτων-σύστασης. Σχετικά με τη διάκριση στο διάγραμμα σκέδασης, αναφέρεται ο αριθμός των ομάδων:

Ομάδα 1: Τσίπουρα χωρίς γλυκάνισο & Τσικουδιά

Ομάδα 2: Τσίπουρα με γλυκάνισο



Εικόνα 5.1.3.1.: Διάγραμμα σκέδασης 21 δειγμάτων τσίπουρων-τσικουδιάς

B) Ταξινόμηση με Δένδρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης (CART)

Η τεχνική CART επιτρέπει να διακριθεί μια ομαδοποίηση μεταβλητών και ένας διαχωρισμός ομάδων. Τα δεδομένα των δειγμάτων τσίπουρου διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες βάσει του κριτηρίου Gini με σφάλμα δόμησης μοντέλου 33,3%. Η αρχή δόμησης του μοντέλου, πρέπει να τονιστεί πως λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τη μέθοδο *Leave one out*, δηλαδή ένα-ένα τα δείγματα ξεχωρίζουν από το σύνολο των δειγμάτων, τα οποία αποτελούν το δείγμα εκπαίδευσης (training set), στο οποίο στηρίζεται η δόμηση του μοντέλου και έπειτα γίνεται έλεγχος/ εξακρίβωση της ταξινόμησής του εκάστοτε δείγματος. Αυτό επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα μέχρι τη δόμηση του μοντέλου και την ταξινόμηση των δειγμάτων σε αυτό. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν βάσει αλγορίθμων δίνονται παρακάτω:

Παράγοντας ταξινόμησης F_k για 21 δείγματα

Τάξη	Πιθανότητα	Αρ.Δειγμάτων	Αποστάσεις Κέντρων Τάξεων	
1	0,667	14	0.0	1.0
2	0,333	7	1.0	0.0

Συχνότητα σφάλματος δόμησης (No-model Error Rate) : 0.333

Επικινδυνότητα (No-model Risk) : 0.333

Η ικανότητα ταξινόμησης των τσίπουρων χωρίς γλυκάνισο στην ομάδα 1 είναι άριστη, αφού όλα τα δείγματα τσίπουρου χωρίς γλυκάνισο (14 δείγματα) τοποθετήθηκαν στην ομάδα 1 (100%). Αντίστοιχα άριστη ταξινόμηση έλαβε χώρα και στην διασταυρωτική επιβεβαίωση για τα τσίπουρα χωρίς γλυκάνισο, σε αντίθεση με τα τσίπουρα με γλυκάνισο (7 δείγματα) όπου το ποσοστό ορθής ταξινόμησης στην ομάδα 2 ήταν 0%, με συνέπεια όλα τα τσίπουρα με γλυκάνισο να λογίζονται ως τσίπουρα χωρίς (βλέπε Πίνακα 5.1.3.2.)! Σχηματικά ο πίνακας και η ταξινόμηση-συμπεριφορά των δειγμάτων απεικονίζονται στο σχήμα 5.1.3.2.

Πίνακας 5.1.3.2.: Ταξινόμηση σε δύο ομάδες μέσω CART

	Προκαθορισμένη τάξη				% ορθής πρόβλεψης
	Πραγματική τάξη	Αρ. Δειγμάτων	1	2	
Τσίπουρα χωρίς	1	14	14	0	100%
Τσίπουρα με	2	7	7	0	0,0%

%Ποσοστό Σφάλματος = 33,3%

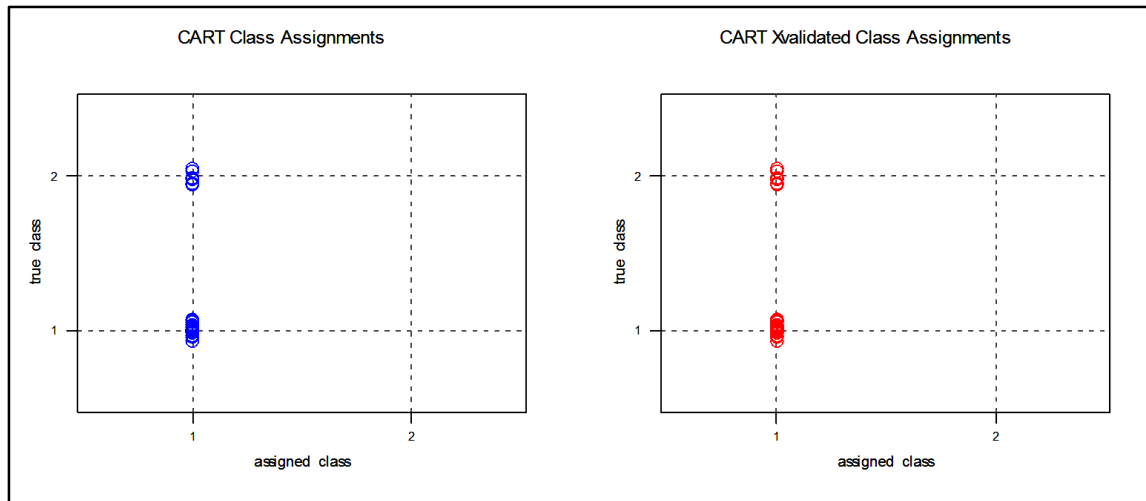
Cross-validation

Τσίπουρα χωρίς	1	14	14	0	100%
Τσίπουρα με	2	7	7	0	0,0%

%Ποσοστό Σφάλματος = 33,3%

Η ταξινόμηση των δειγμάτων με και χωρίς γλυκάνισο όλων μαζί στην ομάδα των τσίπουρων χωρίς γλυκάνισο, κάνει ξεκάθαρα αντιληπτό το γεγονός πως η διάκριση με αυτό το κριτήριο δεν είναι δυνατή με χρήση φασμάτων FT-IR. Αιτία της αδυναμίας ίσως αποτελεί η τεράστια ομοιότητα ομάδων ενώσεων των τσίπουρων με συνέπεια, μια διαφορά μη στατιστικά σημαντική, των δειγμάτων με γλυκάνισο, πόσο δε μάλλον εντός της περιοχής του αποτυπώματος ($1350-650\text{ cm}^{-1}$), όπου πλήθος ενώσεων απορροφούν.

Στο σχήμα 5.1.3.2. διακρίνεται η ταξινόμηση όλων των δειγμάτων τσίπουρου είτε με είτε χωρίς γλυκάνισο στην ίδια τάξη.



Σχήμα 5.1.3.2.: Σχηματική συμπεριφορά 21 δειγμάτων τσίπουρου-τσικουδιάς

Τέλος, σχετικά με τα στοιχεία δόμησης του μοντέλου CART, υπάρχει μόνο ένας τερματικός κόμβος και κανένας ενδιάμεσος, βάσει και της ταξινόμησης όλων των δειγμάτων στην ίδια ομάδα, με συνέπεια τον μη σχηματισμό δενδρογράμματος.

5.1.4. Συμπεράσματα

Τα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν από τη λήψη φασμάτων FT-IR μέσω όλων των τεχνικών προ-επεξεργασίας των δειγμάτων, δίνουν πολύ καλή διάκριση των τσίπουρων από διάφορα ξένα αποστάγματα, αλλά και από το ελληνικό ούζο. Η αιτία αυτής της διάκρισης μπορεί να εντοπιστεί στην πρώτη ύλη του τσίπουρου, τα στέμφυλα σταφυλιών, η οποία διαφέρει από αυτή των ξένων αποσταγμάτων και του ούζου, και η οποία δίνει ομάδες ενώσεων με απορροφήσεις μοναδικές στα φάσματα FT-IR. Η ομαδοποίηση επίσης της κυπριακής ζιβανιάς και της τσικουδιάς με τα τσίπουρα, συνηγορεί κι αυτή στο παραπάνω συμπέρασμα αφού τα συγκεκριμένα ποτά έχουν την ίδια πρώτη ύλη, ενώ και κάποια ούζα, πιθανά οινικής αλκοόλης ομαδοποιήθηκαν κοινά. Αυτός ο συμπαγής χαρακτήρας των αποσταγμάτων στεμφύλων σταφυλιών λοιπόν, είναι που δεν επέτρεψε διάκριση των τσίπουρων μεταξύ τους σε με και χωρίς γλυκάνισο.

Διάκριση των τσίπουρων μεταξύ τους θα διερευνηθεί πλέον στο επόμενο κεφάλαιο από τα δεδομένα, τα οποία προέκυψαν μέσω των τεχνικών λόγου σταθερών ισοτόπων (SNIF-NMR, IR-MS). Οι παράμετροι, οι οποίες μελετώνται μέσω αυτών των τεχνικών είναι πιο πιθανό να οδηγήσουν σε διάκριση μεταξύ των δειγμάτων τσίπουρων-τσικουδιάς αφού εξετάζεται η γεωγραφική και βοτανική (ποικιλία σταφυλιού) προέλευση.

5.2. Ανάλυση δεδομένων ισοτοπικών λόγων

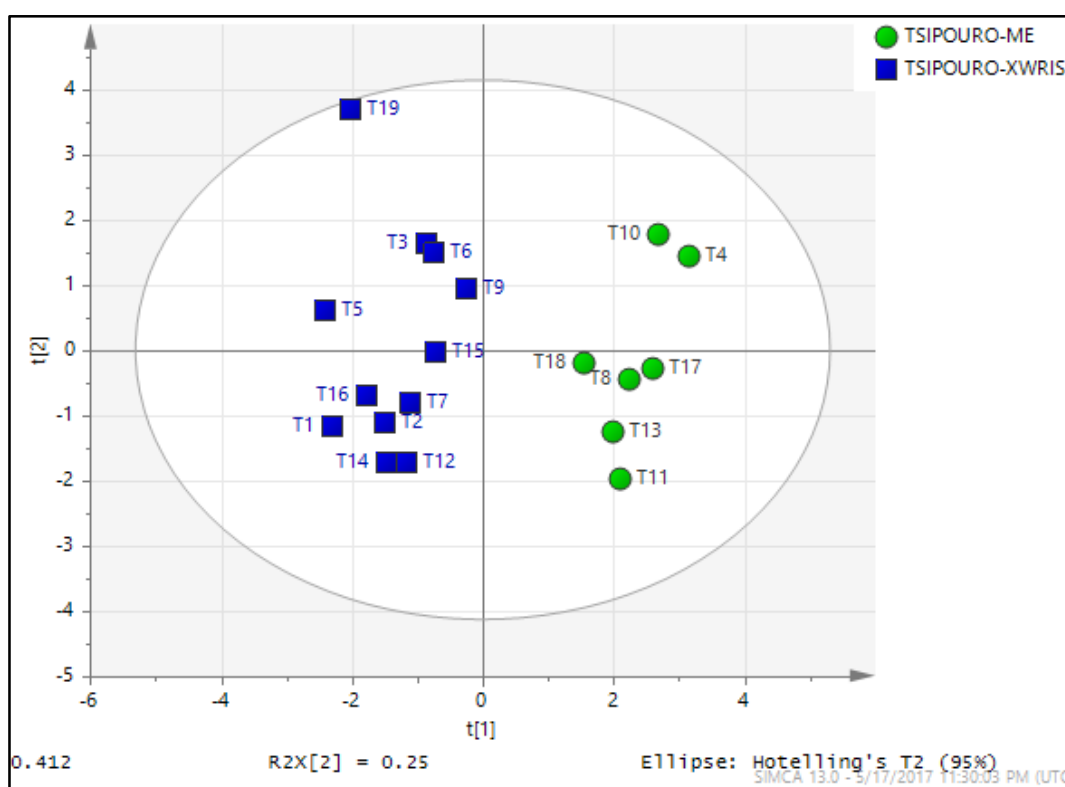
Στο κεφάλαιο αυτό, θα παρατεθούν τα αποτελέσματα της χημειομετρικής ανάλυσης των τιμών των ισοτοπικών λόγων των δειγμάτων του πίνακα 4.1.1. (βλέπε πίνακας 5.2.1.). Οι τιμές των λόγων ισοτόπων του δευτερίου (D/H)_I, (D/H)_{II} και η αναλογία R {2(D/H)_{II}/(D/H)_I}, καθώς επίσης του άνθρακα ¹³C/¹²C και του οξυγόνου ¹⁸O/¹⁶O, κατέδειξαν σημαντική ικανότητα διάκρισης, ταξινόμησης και ομαδοποίησης των δειγμάτων τσίπουρου τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με το ούζο μα και με άλλα αλκοολούχα ποτά. Για την χημειομετρική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο SIMCA, ενώ στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί επεξήγηση των αιτίων της διαφοροποίησης που παρατηρείται.

Πίνακας 5.2.1.: Οι τιμές των σταθερών ισοτοπικών λόγων των δειγμάτων της μελέτης

Τύπος δείγματος	Κωδικός δείγματος	Αλκοολικός βαθμός (% v/v)	(D/H) _I (ppm)	(D/H) _{II} (ppm)	R	δ ¹³ C (‰)	δ ¹⁸ O (‰)
Τσίπουρο χωρίς	T1	40,00	105,44	129,46	2,456	-26,20	-5,46
Τσίπουρο χωρίς	T2	40,00	104,80	130,41	2,489	-27,21	-8,46
Τσίπουρο χωρίς	T3	40,00	103,39	132,37	2,561	-27,18	-6,10
Τσίπουρο με	T4	44,00	104,12	133,00	2,555	-27,34	-6,37
Τσίπουρο χωρίς	T5	38,00	104,86	131,07	2,500	-25,13	-5,85
Τσίπουρο χωρίς	T6	41,00	102,40	130,85	2,556	-26,67	-4,40
Τσίπουρο χωρίς	T7	40,00	103,70	130,27	2,512	-27,54	-8,49
Τσίπουρο με	T8	40,00	103,47	131,26	2,537	-27,87	-9,11
Τσίπουρο χωρίς	T9	42,00	103,05	131,43	2,551	-26,75	-7,76
Τσίπουρο με	T10	42,00	103,65	132,88	2,564	-26,34	-6,87
Τσίπουρο με	T11	42,00	104,32	129,58	2,484	-27,75	-8,47
Τσίπουρο χωρίς	T12	41,00	104,35	129,56	2,483	-27,71	-8,62
Τσίπουρο με	T13	42,50	103,92	129,21	2,487	-27,34	-5,46
Τσίπουρο χωρίς	T14	40,00	104,25	129,45	2,484	-27,84	-8,11
Τσίπουρο χωρίς	T15	40,00	102,53	130,33	2,542	-27,19	-8,45
Τσίπουρο χωρίς	T16	40,00	105,09	130,69	2,487	-28,01	-5,42
Τσίπουρο με	T17	42,00	103,73	131,00	2,526	-25,83	-10,39
Τσίπουρο με	T18	40,00	104,10	130,71	2,511	-26,48	-6,67
Τσίπουρο χωρίς	T19	40,00	105,30	133,45	2,535	-22,59	-3,40
Τσικουδιά	K1	40,00	105,59	135,71	2,570	-25,14	-0,77

5.2.1.: Σύγκριση τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο με PCA και PLS-DA

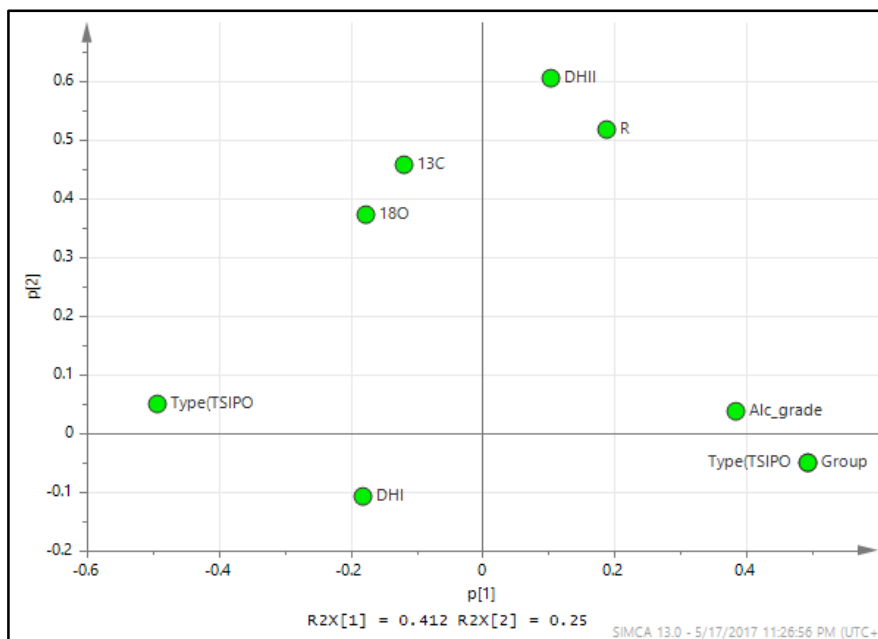
Οι τιμές των ισοτοπικών λόγων χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) στα δείγματα των τσίπουρων με χρήση της μεθόδου συνδιακύμανσης. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες, που προέκυψαν περιέχουν το 66,2% της συνολικής πληροφορίας και το διάγραμμα σκέδασης (σχήμα 5.2.1.1.) αναδεικνύει την ύπαρξη διαχωρισμού μεταξύ τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο.



Σχήμα 5.2.1.1.: Διάγραμμα σκέδασης 19 δειγμάτων τσίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο

Η διακριτική ικανότητα κάθε παραμέτρου, όπως και τα δείγματα τα οποία χαρακτηρίζει ιδιαίτερα, δίνονται στο διάγραμμα φορτίων και της απόστασης από το κέντρο των αξόνων (βλέπε σχήμα 5.2.1.2.). Οι ενδείξεις στο διάγραμμα φορτίων αποτελούν σταθμισμένους μέσους όρους. Διαπιστώνεται, πως όλες οι παράμετροι έχουν ιδιαίτερο ρόλο στο διαχωρισμό των ομάδων των δειγμάτων. Μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα παρουσιάζει ο λόγος $(D/H)_{II}$ ως προς τη 2^η κύρια συνιστώσα, ενώ μικρότερη διακριτική ικανότητα παρουσιάζει ο λόγος

(D/H)_i, ο οποίος απέχει εμφανώς λιγότερο από το κέντρο και κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην κοινή βοτανική προέλευση (σταφύλι) όλων των δειγμάτων. Ο λόγος (D/H)_{ii}, η αναλογία R και ο αλκοολικός βαθμός χαρακτηρίζουν τα τσίπουρα με γλυκάνισο, ενώ η χρήση των λόγων (D/H)_i, δ¹³C και δ¹⁸O οδηγεί στην κατάταξη των τσίπουρων χωρίς γλυκάνισο. Οι λόγοι του άνθρακα και οξυγόνου, διακρίνουν τα δείγματα T3, T5, T6 και T9 σε ξεχωριστή υποομάδα.



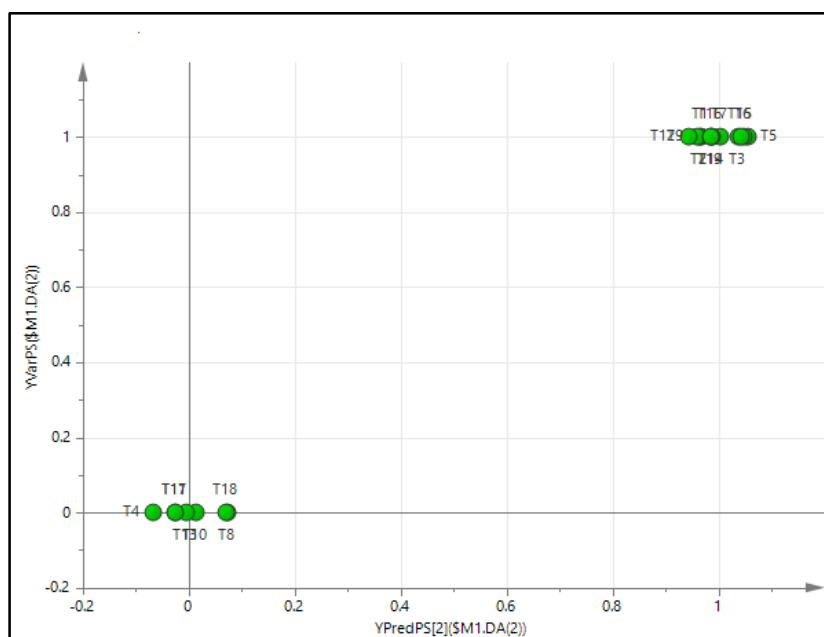
Σχήμα 5.2.1.2.: Διάγραμμα φορτίων για τη σημασία των μεταβλητών

Για τον έλεγχο της ορθής ταξινόμησης των δειγμάτων στο προτεινόμενο μοντέλο, ακολούθησε χημειομετρική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και διαπιστώθηκε μέσω διαγράμματος πρόβλεψης-παρατήρησης ελάχιστη διασπορά μεταξύ των δειγμάτων που είχαν δομηθεί στις ομάδες με και χωρίς γλυκάνισο, με απουσία έκτροπων δειγμάτων. Συνεπώς επιτεύχθηκε άριστη προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο (σχήμα 5.2.1.3.). Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στη βελτίωση της διάκρισης (σχήμα 5.2.1.4.) και στην 100% ορθή ταξινόμηση των δειγμάτων σε περίπτωση κατά την οποία αυτά θεωρηθούν άγνωστα.

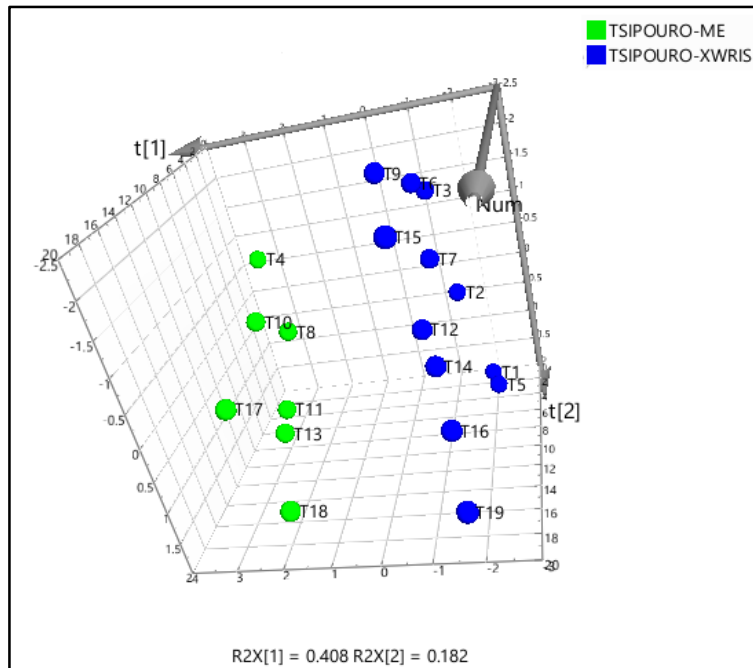
Πίνακας 5.2.1.1.: Ταξινόμηση δειγμάτων τσίπουρου με PLS

Τάξη	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό ορθής κατάταξης	2	1
2	12	100%	12	0
1	7	100%	0	7
Καμία Τάξη	0		0	0
Σύνολο	19	100%	12	7
Πιθανότητα Fisher	2e-005			

Η ανάλυση κατέταξε και τα 7 δείγματα τσίπουρων με γλυκάνισο στην 1^η ομάδα και αντίστοιχα τα 12 δείγματα τσίπουρων χωρίς γλυκάνισο στη 2^η ομάδα, δηλαδή δεν παρατηρήθηκε κανένα σφάλμα κατάταξης (100% ορθή).



Σχήμα 5.2.1.3.: Διάγραμμα προβλέψεων-παρατηρήσεων για έλεγχο προσαρμογής των δειγμάτων των τάξεων στο μοντέλο



Σχήμα 5.2.1.4.: Διάγραμμα σκέδασης τριών διαστάσεων μέσω PLS

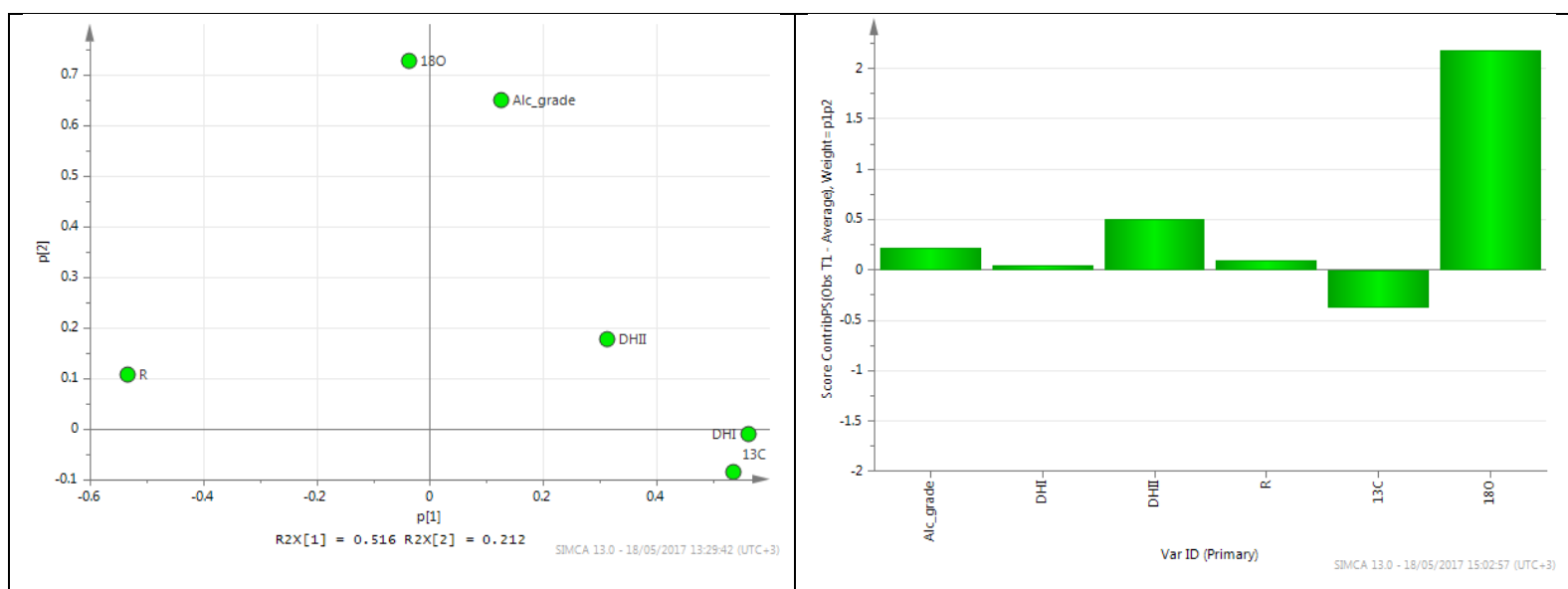
Παρότι επιτεύχθηκε πολύ ικανοποιητική διάκριση των τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο, είναι δύσκολο να αποδώσουμε τη διάκριση αυτή σε κάποια από τις παραμέτρους που προσδιορίσαμε με τις ισοτοπικές μεθόδους, αφού όπως προαναφέρθηκε υπήρξε συνεισφορά όλων. Πιθανόν ο διαχωρισμός τους να οφείλεται σε ενώσεις που έχουν εκχυλιστεί από τον γλυκάνισο και οι οποίες μπορούν να προσδιοριστούν με αναλυτικές μεθόδους, όπως η αέρια και η υγρή χρωματογραφία (GC, GC-MS, HPLC).

5.2.2. Διάκριση τσίπουρου από άλλα αποστάγματα με PCA

Η διάκριση των δειγμάτων (αναλυτικά βλέπε πίνακα 4 παράρτημα) στηρίχθηκε σε 6 μεταβλητές (5 ισοτοπικοί λόγοι δευτερίου, άνθρακα και οξυγόνου και αλκοολικός βαθμός) και τα δεδομένα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες:

- 1) Τσίπουρα (19 δείγματα)
- 2) Ούζα (22 δείγματα)
- 3) Τσικουδιά (1 δείγμα)
- 4) Άλλα αποστάγματα (6 δείγματα: S1= ρακέα Βουλγαρίας, S2=arak Λιβάνου, S3=κυπριακό χαρουπόρακο, S4=κυπριακή ζιβανία, S5=arak ιορδανίας και S6=sake ιαπωνίας)

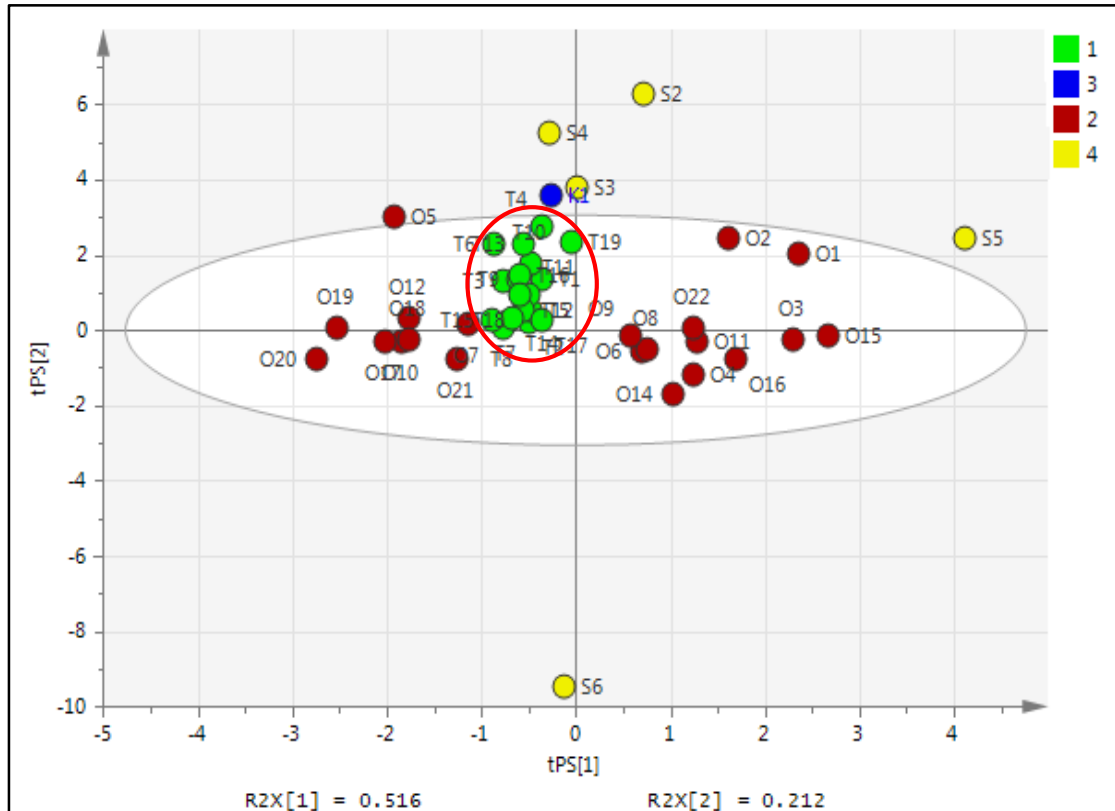
Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) απέδωσε ικανοποιητική διάκριση των ομάδων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συνδιακύμανσης και οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εμπεριείχαν το 72,8% της συνολικής πληροφορίας. Επιπλέον, σύμφωνα και με το διάγραμμα φορτίων (σημασία ανάλογη της απόστασης από το κέντρο) αλλά και το διάγραμμα διακύμανσης μεταβλητών, σημαντικότερες για τη νέα 1^η κύρια συνιστώσα ήταν οι τιμές των $\delta^{13}\text{C}$ και R, ενώ για τη νέα 2^η κύρια συνιστώσα ήταν το $\delta^{18}\text{O}$, το οποίο παρουσιάζει και το μεγαλύτερο εύρος τιμών αφού χαρακτηρίζει το νερό στις διάφορες περιοχές παραγωγής. Σημαντική διακύμανση τιμών παρουσιάζει επίσης και ο λόγος $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$, ο οποίος οφείλεται κυρίως στη γεωγραφική προέλευση της πρώτης ύλης, σε αντίθεση με το λόγο $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$, ο οποίος οφείλεται κυρίως στη βοτανική προέλευση, ενώ η αναλογία R είναι μεταβλητή χωρίς βιολογική σημασία (Βλέπε σχήμα 5.2.2.1.).



Σχήμα 5.2.2.1.: Διαγράμματα σημασίας συνεισφοράς και διακύμανσης μεταβλητών

Σχετικά με το διάγραμμα σκέδασης (βλέπε σχήμα 5.2.2.2.), αυτό πληροφορεί για τη διακύμανση των τιμών κάθε παραμέτρου. Εδώ, αξίζει να αναφερθεί η τεράστια διαφοροποίηση του δείγματος S6, το οποίο είναι ιαπωνικό σάκε, καθώς επίσης και η μικρή διαφοροποίηση της τσικουδιάς, από την απόλυτη ομαδοποίηση των τσίπουρων. Τα άλλα αποστάγματα, τα οποία έχουν ως βάση το σταφύλι (αράκ, ζιβανία, ρακέα, γκράττα) δεν έχουν τόσο μεγάλη απόσταση

από την ομάδα των τσίπουρων αφού έχουν κοινή πρώτη ύλη και μικρή σχετικά γεωγραφική απόσταση σε σύγκριση με το σάκε, αλλά παρόλα αυτά είναι εκτός της έλλειψης με τα τσίπουρα. Εμφανής είναι συνεπώς η διασπορά των δειγμάτων ούζου εκατέρωθεν των δειγμάτων τσίπουρου με μοναδική εξαίρεση το δείγμα O7 και της τσικουδιάς.



Σχήμα 5.2.2.2.: Διάγραμμα σκέδασης για διάκριση τσίπουρων από άλλα αποστάγματα (πράσινο=τσίπουρα, κόκκινο=ούζα, μπλε=τσικουδιά και κίτρινο=ξένα ποτά)

5.2.3.: Ταξινόμηση τσίπουρων και ούζων με PLS-DA

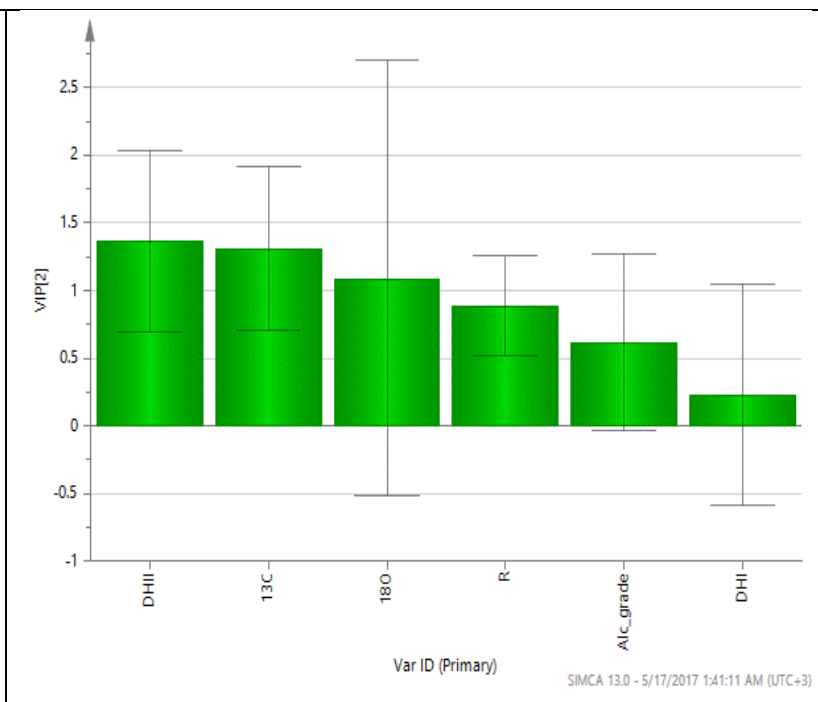
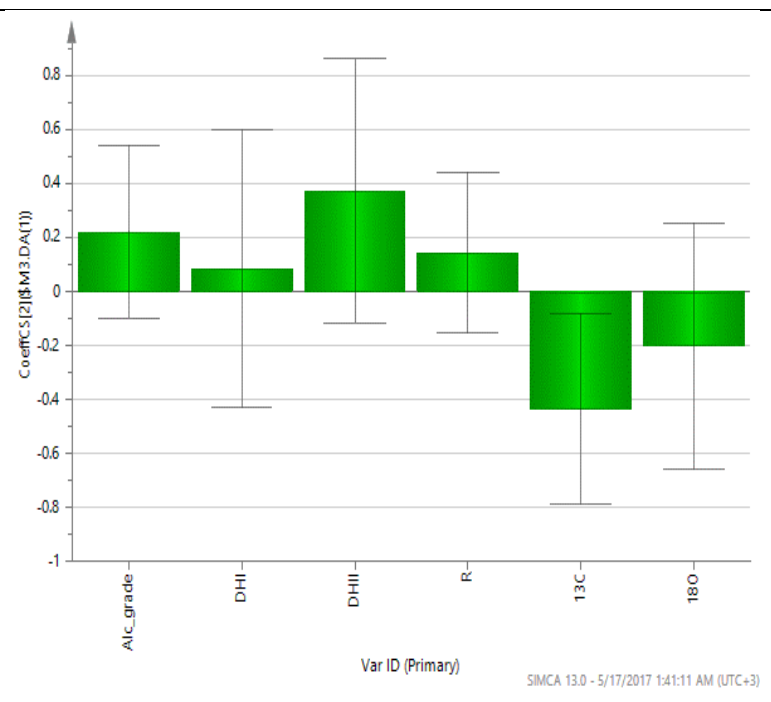
Η ταξινόμηση δειγμάτων τσίπουρου (ομάδα 1), τσικουδιάς (ομάδα 3) και ούζου (ομάδα 2) σε τρεις τάξεις-ομάδες με χρήση 6 μεταβλητών (ισοτοπικοί λόγοι και αλκοολικός βαθμός) με χρήση PLS-DA έλαβε χώρα και επιτεύχθηκε ποσοστό διάκρισης-ορθής ταξινόμησης 92,86% (Πίνακας 5.2.3.1.). Τα δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4 του παραρτήματος.

Πίνακας 5.2.3.1.: Ταξινόμηση δειγμάτων σε ομάδες

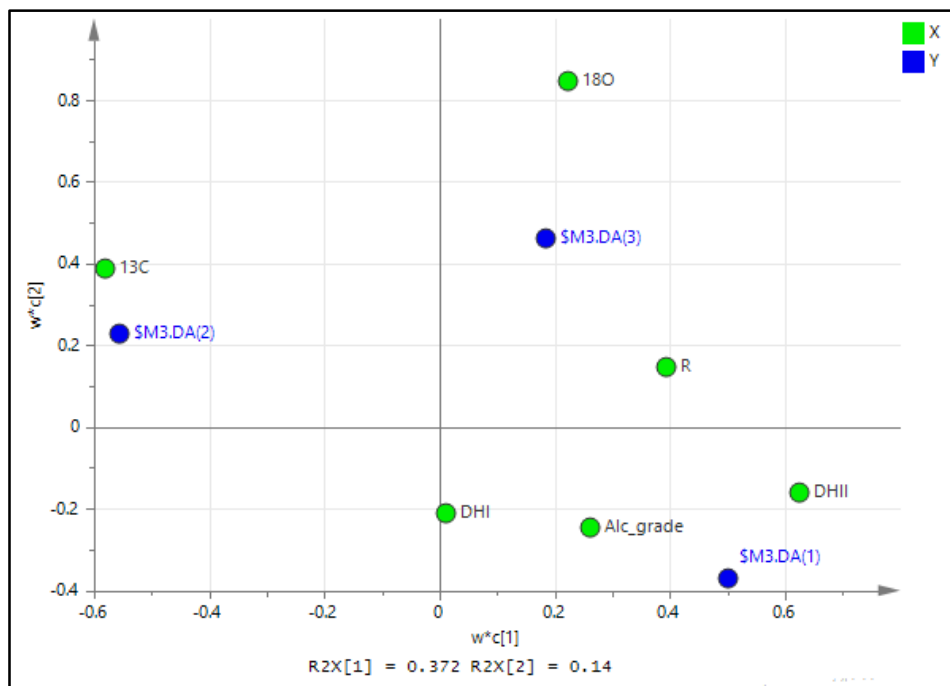
Τάξη/Ομάδα	Αριθμός δειγμάτων	Ορθή ταξινόμηση	1	3	2
1	19	100%	19	0	0
3	1	0%	1	0	0
2	22	90.91%	2	0	20
Καμία τάξη	0		0	0	0
Σύνολο	42	92.86%	22	0	20
Πιθανότητα Fisher	5.3e-007				

Από την 1^η ομάδα, όλα τα τσίπουρα κατατάχθηκαν ορθά, ενώ η τσικουδιά εμφανίστηκε στην ομάδα 1 αντί στη 2^η. Αυτό δικαιολογείται από την κοινή βοτανική προέλευση τσίπουρου με τσικουδιά (σταφύλι). Από τα 22 ούζα, τα 20 κατατάχθηκαν στην ομάδα 3, ενώ 2 από αυτά παρουσιάστηκαν στην ομάδα των τσίπουρων (ποσοστό επιτυχίας 90.91%). Η συνολική επιτυχία κατάταξης ήταν 92.86%.

Σε ό,τι αφορά τους συντελεστές του μοντέλου παλινδρόμησης, καθώς και τη διακύμανση για κάθε μεταβλητή (βλέπε σχήμα 5.2.3.1.), πιο σημαντική συνεισφορά (διάγραμμα VIP δεξιά) ελήφθη από τα (D/H)_{II} και δ ¹³C, που παρουσίασαν και τις μεγαλύτερες τιμές διακύμανσης, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα φορτίων για κάθε συνιστώσα (βλέπε σχήμα 5.2.3.2.). Σε σχέση με το διάγραμμα φορτίων επίσης, φαίνεται ότι ο ¹³C είναι που χαρακτηρίζει κυρίως την υποομάδα των ούζων (ομάδα 2), ίσως λόγω διαφορετικής πρώτης ύλης στην παραγωγή της αιθανόλης

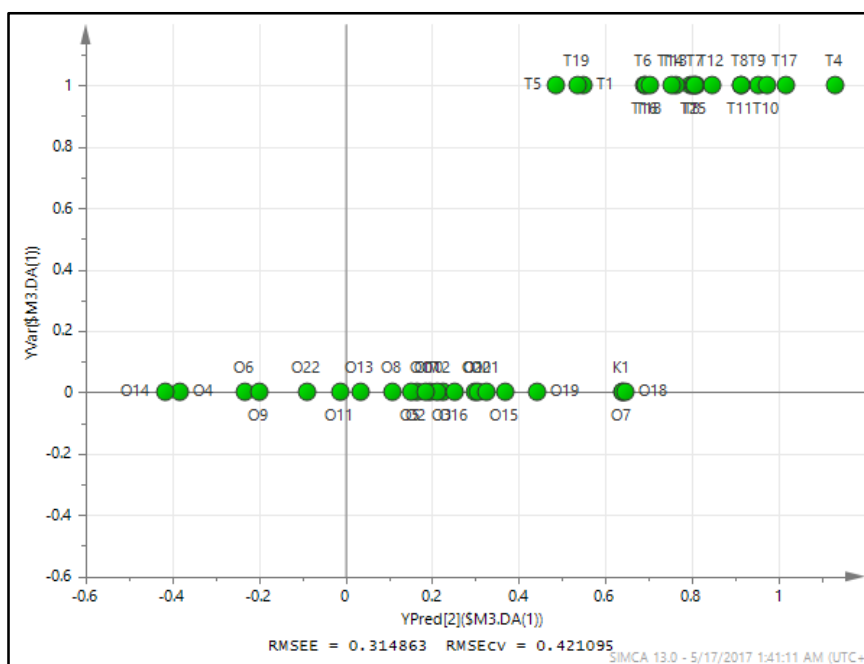


Σχήμα 5.2.3.1.: Οι διακυμάνσεις των συντελεστών του μοντέλου παλινδρόμησης κάθε μεταβλητής και η σχετική σημασία τους (VIP) στη δόμηση

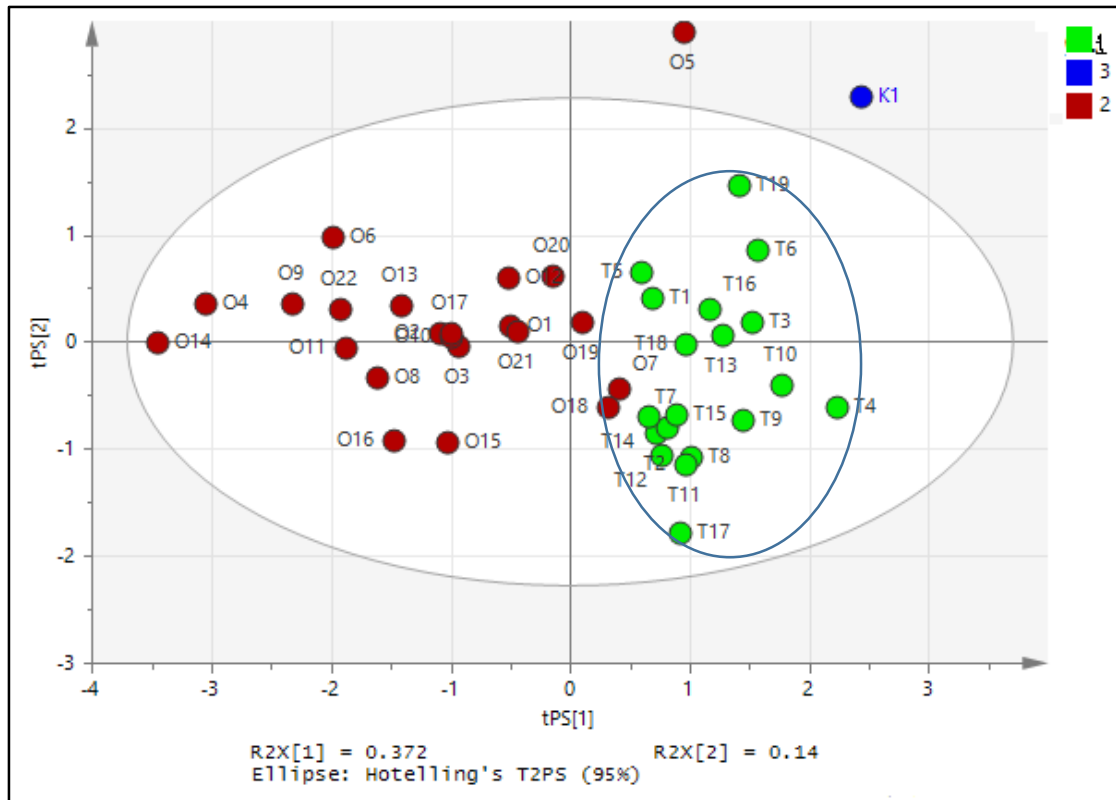


Σχήμα 5.2.3.2.: Διάγραμμα φορτίων για τη σημασία-των μεταβλητών

Τέλος, το διάγραμμα προβλέψεων-παρατηρήσεων (βλέπε σχήμα 5.2.3.3.) των δειγμάτων επιδεικνύει κατά πόσο προσαρμόζονται τα δείγματα της κάθε ομάδας στο προτεινόμενο μοντέλο, με εμφανή την τάση κάποιων δειγμάτων ούζου να κατατάσσονται στην ομάδα των τσίπουρων. Αιτία αυτής της τάσης, ίσως αποτελεί η οινική προέλευση της αλκοόλης (σταφύλι) κάποιων ούζων. Το τελικό διάγραμμα σκέδασης (σχήμα 5.2.3.4), επαληθεύει τη διαπίστωση αυτή. Αξιοσημείωτη είναι η τοποθέτηση της κρητικής τσικουδιάς εκτός έλλειψης, όπως και το δείγμα ούζου με κωδικό O5, η αυθεντικότητα του οποίου ίσως χρήζει διερεύνησης.



Σχήμα 5.2.3.3: Διάγραμμα προβλέψεων-παρατηρήσεων για έλεγχο προσαρμογής των δειγμάτων των τάξεων στο μοντέλο



Σχήμα 5.2.3.4.: Διάγραμμα σκέδασης PLS-DA για διάκριση τσίπουρου (1) από τσικουδιά (3) και ούζο (2)

5.2.4.: Συμπεράσματα

1. Οι τιμές των λόγων των ισοτόπων του δευτερίου (D/H)_I, (D/H)_{II} και η αναλογία R, καθώς επίσης του άνθρακα ¹³C/¹²C και του οξυγόνου ¹⁸O/¹⁶O, κατέδειξαν σημαντική ικανότητα ταξινόμησης και διάκρισης των δειγμάτων τσίπουρου, τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με το ούζο και με άλλα αλκοολούχα ποτά.
2. Η χημειομετρική ανάλυση των δειγμάτων τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισων, με τις τεχνικές ανάλυσης κύριας συνιστώσας (PCA) και των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), έδωσε 100% ορθή διάκριση μεταξύ τσίπουρων με και χωρίς γλυκάνισο.
3. Όλοι οι λόγοι των σταθερών ισοτόπων αποδείχθηκαν σημαντικές στη διάκριση των δειγμάτων, ενώ μια μελλοντική μελέτη με αναλυτικές τεχνικές ίσως αιτιολογούσε τη διάκριση των 2 κατηγοριών τσίπουρου.
4. Από την εφαρμογή των ίδιων τεχνικών χημειομετρίας σε ούζα, τσίπουρα και τσικουδιά, όλα τα τσίπουρα κατατάχθηκαν ορθά στην προτεινόμενη ομάδα τους, ενώ το ένα δείγμα τσικουδιάς απέτυχε να ξεχωρίσει από τα τσίπουρα. Τα ούζα αποτέλεσαν ξεχωριστή ομάδα με επιτυχία ορθής κατάταξης κατά 90.91%, ενώ η συνολική επιτυχία κατάταξης των 42 δειγμάτων ήταν 92.86%.
5. Η χημειομετρική ανάλυση των δειγμάτων τσίπουρου, τσικουδιάς και ούζου μαζί με 6 άλλα αλκοολούχα ποτά, κατέδειξε όλα τα τσίπουρα να είναι απόλυτα συγκεντρωμένα στο διάγραμμα σκέδασης. Αντίθετα, τα 6 άλλα αλκοολούχα ποτά, έχουν εμφανή απόσταση από την ομάδα των τσίπουρων, ενώ η τσικουδιά προσεγγίζει αρκετά την έλλειψη των τσίπουρων.
6. Από τα πιο πάνω, αποδεικνύεται ότι η εφαρμογή των τεχνικών SNIF-NMR και IR-MS, αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη μελέτη της αυθεντικότητας του τσίπουρου, καθώς και στη διάκριση του τσίπουρου με και χωρίς γλυκάνισο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σουφλερός Ευάγγελος και Ροδοβίτης Βασίλης (2004), Το τσίπουρο και η τσικουδιά – το ελληνικό απόσταγμα στεμφύλων, Θεσσαλονίκη
2. Αργύρης Τσακίρης, (2000), Ποτογραφία, Σελ. 217-226, 227-233, Εκδόσεις Ψύχαλου
3. Ν.Κ Ανδρικόπουλος, (2015) , Τροφογνωσία [Ηλεκτρονικό βιβλίο], Κεφ. 26, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών
4. Αργύρης Τσακίρης, (2006), Κάνω το δικό μου τσίπουρο, Εκδόσεις Ψύχαλου
5. Μανούδης Νίκος,(2011), Τσίπουρο και Τσικουδιά, Εκδόσεις Ψύχαλου
6. Ευρωπαϊκή Ένωση (2008) «Κανονισμός (ΕΚ) αριθ 110/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15ης Ιανουαρίου 2008 σχετικά με την ορισμό, την περιγραφή, την παρουσίαση, την επισήμανση και την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων των αλκοολούχων ποτών
7. Σουφλερός Ευάγγελος, (2012), Οινολογία, Θεσσαλονίκη
8. Λιούνη Μαρία (2006), Σημειώσεις χημείας και τεχνολογίας οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών
9. Tom Standage (2006), Η ιστορία του κόσμου σε 6 ποτήρια , Σελ 102-108, Εκδόσεις Κέδρος
10. George Vlontzos et. al., (2014), Introduction on the Market of Tsipouro, a Greek Traditional Liquor, Precursor of Ouzo, International Journal of Euro-Mediterranean Studies, Volume 7(2):175-188
11. Νόμος 1802/1988 «Τροποποίηση του κώδικα περί φορολογίας οινοπνεύματος» (ΦΕΚ 172/Α/88)
12. Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1576/89 «Περί θέσπισης ορισμών στα αποστάγματα»
13. A.I. Flouros et. al, (2003), Note: Influence of the Packaging Material on the Major Volatile Compounds of Tsipouro, A Traditional Greek Distillate, Food Science and Technology International 9(5):371-378
14. Soufleros, E. (1991), La production artisanale du Tsipouro a Naouss (Grece). In Les Eaux-de-vie Traditionnelles d'Origine Viticole. Bertrand (Ed) Lavoisier, Paris, pp 19-27

15. Da Porto Carla, (1998), Grappa and Grape - spirit production .Critical Reviews in Biotechnology, 18 (1) : 13-24
16. A.A. Apostolopoulou, A.I. Flouros, P.G. Demertzis, K. Akrida-Demertzi, (2005), Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates, Laboratory of Food Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, pp 154-167
17. Pappas C., Bakaselou M. et. al., (2016), Evaluation of a Raman spectroscopic method for the determination of alcohol content in Greek spirit Tsipouro, Current research in Nutrition and Food Science, Vol 4(SI 2.), 01-09
18. Mygdalia A., Soufleros E. et. al, (2005), Discrimination and risk assessment due to the volatile compounds and the inorganic elements present in the Greek marc distillates Tsipouro and Tsikoudia,
19. Da Porto, C. and Longo, M. (1997), Evaluation of reflux process on the partitioning of some volatile compounds in grappa obtained by a batch still. Wein-Wissenschaft, 52(1): 6-9
20. Shuo Geng et.al., (2016), Indirect detection of alcoholic strength in spirits by fluorescence method using the polyethyleneimine capped ZnO QDs, Sensors and Actuators B 236 (2016) 591–596
21. Silva, M. L., Malcata, F. X., (2000) Effects of time of grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grape marcs. Food Research and Technology, v.208(2) pp 134-143, 15ref
22. Berry, D.R., (2000), Alcoholic beverage fermentations. In: Fermented beverage production, pp. 32-44
23. M. Geroyiannaki, M.E. Komaitis, D.E. Stavarakas, M. Polysiou, P.E. Athanasopoulos, M. Spanos, (2007), Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.)
24. Peinado, R.A., Moreno, J.A., Munoz, D., Medina, M., and J. Moreno, (2004), Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6389-6393

25. J. Carvallo, M. Labbe, J.R. Pérez-Correa, C. Zaror , J. Wisniak, (2011), Modelling methanol recovery in wine distillation stills with packing columns
26. M. Mustafa Arslan et.al, (2015), Analysis of Methanol and Its Derivatives in Illegally Produced Alcoholic Beverages, Journal of Forensic and Legal Medicine
27. Alper Gueven, (2013), Chemical fingerprints of Raki: a traditional distilled alcoholic beverage, Published online in Wiley Online Library: 30 August 2013
28. Jiri Stribny, et.al.,(2015), *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors, International Journal of Food Microbiology 205 (2015) 41–46
29. Rogerson F.S.S. and Freitas (de) V.A.P., (2001). Quantitative analysis of volatiles present in wine spirits used for port production, *ASEV 52nd Annual meeting*, San Diego, California
30. Cortes S.M., Gil M.L. and Fernantez E., (2002), The influence of redistillation in the distribution of volatile components of marc spirit (Aguardiente) and its repercussion on the aromatic quality. *Sciences des Aliments*, **22**, 265-275
31. Dirk W. Lachenmeier , Eva-Maria Sohnius, (2008), The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: Evidence from a large chemical survey, Food and Chemical Toxicology 46, 2903–2911
32. Cristina López-Vázquez et.al.,(2012), Determination of aldehydes as pentafluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME-GC/MS, Food Chemistry 130 (2012) 1127–1133
33. Madrera, R.R., Gomis, D.B., and J.M. Alonso (2003). Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 5709-5714
34. Marina Cocchi, Giorgia Ferrari et.al., (2007), Study of the monosaccharides and furfurals evolution during the preparation of

- cooked grape musts for Aceto Balsamico Tradizionale production, *Journal of Food Engineering* 79 (2007) 1438–1444
35. Maroussa Tsachaki, Archontia P. Arnaoutopoulou, Lila Margomenou, Stylianos C. Roubedakis and Ioannis Zabetakis, (2010), Development of a suitable lexicon for sensory studies of the anise-flavoured spirits ouzo and tsipouro, *Flavour Fragr. J.* 2010, 25, 468–474
36. M. Özgüven, (2012), Handbook of herbs and spices, Chapter 7 (Aniseed), Woodhead Publishing Limited
37. Ankit Bansal, VikasChhabra, RavindraK.Rawal, SimantSharma, (2014), Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(4), 223–233
38. Ρ. Κοκκινόφτα Διογένους, (2003), «Αυθεντικότητα του Παραδοσιακού Κυπριακού Ποτού Ζιβανία», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λευκωσία
39. Πουλλή Ι. Κωνσταντίνα, (2009), «Ανάπτυξη νέων μεθόδων ποιοτικού ελέγχου βρώσιμων ελαίων με φθορισμομετρία σύγχρονης σάρωσης και σύγκριση με κλασσικές μεθόδους», Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
40. Έλενα Ιωάννου Παπαγιάννη, (2012), Χημειομετρική διάκριση του κυπριακού παραδοσιακού κρασιού Κουμανδαρία, Διδακτορική διατριβή Πανεπιστημίου Κύπρου, Λευκωσία
41. Miller, J. N., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th edition, Prentice Hall, New York. 2000*
42. Μ.Α.Κωνσταντίνου, «Εφαρμογή Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) στην Αναγνώριση Προτύπων σε Βιολογικά Υγρά», Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2003
43. Αικατερίνη Ι. Μικέδη, (2004), «Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων σε αναλυτικές συνδυασμένες τεχνικές», Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα
44. Ewa Szymańska et.al, (2015), Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship, *Trends in Analytical Chemistry*

45. Κώπτη Μελίνα,(2005), «Μελέτη χαρακτηρισμού ρυπαντικού φορτίου υγρών αποβλήτων με τεχνικές χρωματογραφίας και χημειομετρίας», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
46. Brereton, R. G., *Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical Plant, Wiley, West Sussex. 2003*
47. Li Vigni, M., Durante, C., Foca, G., Marchetti, A., Ulrici, A. and Cocchi, M., (2009), Near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods for monitoring flour performance in an industrial bread - making process. *Analytica Chimica Acta*,642, 69-76.
48. U. Römisch, H. Jäger, X. Capron, S. Lanteri, M. Forina, (2009), Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part III: multivariate discrimination and classification methods, *European Food Research Technology*, 230, 31-45
49. Marina Cocchi, Mario Li Vigni and Caterina Durante, (2017), Food Authentication: Management, Analysis and Regulation *Chemometrics – Bioinformatics*, John Wiley & Sons Ltd, 17, 481-512
50. Πετρίδης Δημήτριος, (2015), Ανάλυση Πολυμεταβλητων Τεχνικών, Εφαρμογές Περιπτώσεων, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα
51. D. Cozzolino et.al., (2011), Can spectroscopy geographically classify Sauvignon blanc wines from Australia and New Zealand?, *Food Chemistry* 126, 673–678
52. Veronika Urickova, Jana Sadecka, (2015), Determination of geographical origin of alcoholic beverages using ultraviolet, visible and infrared spectroscopy: A review, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 148, 131-137
53. Κανονισμός Ε.Κ. 510/2006
54. Κανονισμός Ε.Ε. 1898/2006
55. Κανονισμός Ε.Ε. 509/2006
56. <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-citizen-2/pop-pge>
57. Ματίνα Φουρναράκου, “Το θεσμικό πλαίσιο για τα προϊόντα Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε. και Ε.Π.Ι.Π.”, Ηλεκτρονική παρουσίαση

58. P.J. Hore, (2017), *Nmr Principles*, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Pages 187–194, Third edition
59. D.A.Skoog, F.J. Holler, T.A.Nieman, (2005), Principles of Instrumental Analysis, Εκδόσεις Κωσταράκης
60. K.H. Laursenet. al., (2016),Advances in Isotopic Analysis for Food Authenticity Testing, Chapter 9, 227-230
61. Andrea Versari, (2014), Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches, Food research international, 60, 2-18
62. Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) 2676/90
63. Drivelos and Georgiou, (2012),Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union,TrAC Trends in Analytical Chemistry, volume 40, 38-51
64. Francesco Longobardi, Daniela Sacco, GraziaCasiello, Andrea Ventrella, Antonio Sacco, (2015), Characterization of the Geographical and Varietal Origin of Wheat and Bread by Means of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) Methods and Chemometrics: A Review, Agricultural Sciences, 2015, 6, 126-136
65. Elisabet Alrina Geana et.al, (2016),Verifying the red wines adulteration through isotopic and chromatographic investigations coupled with multivariate statistic interpretation of the data, Food Control 62 (2016) 1–9
66. Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) 822/97
67. <http://www.oiv.int/public/medias/1099/oiv-oeno-381-2009-en.pdf>
68. Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) 440/03
69. <http://www.oiv.int/public/medias/1090/oiv-oeno-353-2009-en.pdf>
70. Elisangela Fabiana Boffo et.al., (2010), SNIF-NMR and Chemometric methods applied to ¹H NMR in the study of brazilian brandy authenticity, on-line article at www.researchgate.net/publication/285969697
71. Cheng-Hung Lai, Chang-Wei Hsieh, Wen-Ching Ko, (2014), Detection limit of molasses spirits mixed in rice spirits using the SNIF-NMR method, Journal of food and drug analysis, 22, 197-201
72. Iztok Jože Košir, Mitja Kocjan, Nives Ogrinc, Jurkica Kidric, (2001), Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for

- the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines), *Analytica Chimica Acta* 429, 195–206
73. John Mc Murry, (2010), *Οργανική Χημεία Τόμος 1*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
74. G. Currell, *Analytical Instrumentation - Performance, Characteristics and Quality*. John Wiley & sons Ltd, England, 2007
75. Elena Ioannou-Papayianni et.al.,(2011), Authenticity of Cypriot Sweet Wine Commandaria Using FT-IR and Chemometrics, *Journal of Food Science*, Vol. 76, Nr. 3
76. Roxana BANC et.al., (2014),Romanian Wines Quality and Authenticity Using FT-MIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Data Analysis,*Not Bot HortiAgrobo*, 42(2), 556-564
77. Christopher J. Bevin et.al., (2008), Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis,*analyticachimicaacta*, 621, 19–23
78. Marianthi Basalekou et.al., (2016), Authenticity Determination of Greek-Cretan Mono-Varietal White and Red Wines Based on their Phenolic Content using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics,*Current Research in Nutrition and Food Science*, Vol. 4(Sl. 2), 54-62 (2016)
79. J. Shanthi and S. R. Vijayalakshmi, (2014), Microcontroller Based Rotary Evaporator for Solution Growth, *Asian J. of Adv. Basic Sci.:* 3(1), 2014, 89-93
80. Α. Κουμπής, Ι. Λυκάκης, Δ. Ρήγας, (2012), Εργαστηριακές ασκήσεις Οργανικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας, Εκδόσεις Α.Π.Θ.
81. Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, (2011), Εργαστηριακές ασκήσεις Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών
82. Κοϊνης Σπύρος, (2011), Εργαστηριακές ασκήσεις Ανόργανου Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών
83. Dila Yucesoy, Banu Ozen, (2013), Authentication of a Turkish traditional aniseed flavoured distilled spirit raki, *Food Chemistry* 141 (2013) 1461 - 1465

84. Evgeny Polshin et.al., (2011), Beer quality screening by FT-IR spectrometry: Impact of measurement strategies, data pre-processings and variable selection algorithms, *Journal of Food Engineering* 106 (2011) 188-198
85. Hélène H Nieuwoudt et.al., (2008), FTIR Spectroscopy for Grape and Wine Analysis, **Article** in *Analytical Chemistry* · April 2008
86. Daniel Cozzolino et.al., (2005), Relationship between sensory analysis and near infrared spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wines, *Analytica Chimica Acta* 539, 341–348
87. Fernando A. Inon, (2006), Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers, *Analytica Chimica Acta* 571, 167–174
88. <http://www.oiv.int/public/medias/2683/oiv-ma-bs-23.pdf>

Βιβλιογραφία εικόνων

Εικόνα 1.2.1.1.: <http://www.cafleurebon.com/>

Εικόνα 1.2.1.2.: <http://www.bankwars.gr>

Εικόνα 3.1.1.: <http://www.sedik.gr/neo/el>

Εικόνα 3.2.1.1.: <http://rmni.iqfr.csic.es/guide/eNMR/NMRnotes/food.html>

Εικόνα 3.2.1.1.1. <http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/NMRnotes/food.html>

Εικόνα 3.2.2.1.: https://en.wikipedia.org/wiki/Isotope_ratio_mass_spectrometry

Εικόνα 3.2.3.3: <https://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/irinstrs.htm>

Εικόνα 3.3.2.1.: <http://www.specac.com/products/ft-ir-sampling-kits/advanced-solid-pack/714>

Εικόνα 4.2.1.: <http://www.itim-cj.ro/images/departamente/dep3/echipamente/>

Εικόνας 4.2.2.: <http://www.piketech.com/atr-hatr.html>

Εικόνα 4.3.1.: <http://hamiltoninstrument.com/index>

Εικόνα 4.4.1.:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Infraredspectroscopy_-_transmission_with_Kbr_pellets.jpg

Εικόνα 4.7.1.: <http://www.sun.ac.za/english/faculty/agri/soil-science/about-us/facilities>

Εικόνα 4.8.1.: <https://www.dotmed.com/listing/nmr-unit/bruker/ultrashield-400-mhz/785904>

Εικόνα 4.8.2.: <http://www.directindustry.com/prod/mettler-toledo-analytical-instruments/product-98369-891713.html>

Βιβλιογραφία σχημάτων

Σχήμα 1.3.1.: Μεταπτυχιακή διατριβή της φοιτήτριας Γούσιου Σπ. Κυριακής, «Ανάπτυξη συστήματος διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων σε επιχείρηση παραγωγής αλκοολούχων ποτών», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

Σχήμα 1.4.1.: <https://eclass.duth.gr/modules/document/file.php>

Σχήμα 1.4.2.: Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York (1995)

Σχήμα 1.4.6.: <https://www.toppr.com/learn/iit-jee/2017/chemistry/aldehydes-ketones-and-carboxylic-acids/concepts/>

Σχήμα 3.2.3.3.: <https://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch361-464/ch362/irinstrs.htm>

Πίνακας ορολογίας

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
SNIF-NMR	Φυσικός ισοτοπικός διαχωρισμός ειδικής θέσης μελετημένος με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό ή Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός δευτερίου (^2H)
FTIR	Υπέρυθρη φασματοσκοπία Μετασχηματισμών Fourier
IR-MS	Φασματοσκοπία Μαζών Ισοτοπικών λόγων
GC	Αέρια Χρωματογραφία
SPME	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
GC- MS	Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας
GC- FID	Αέρια Χρωματογραφία-Ανιχνευτή Ιοντισμού Φλόγας
HS- SPME	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης-Υπερκείμενου χώρου
PCA	Ανάλυση κύριων συνιστωσών
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
CA	Ανάλυση κατά συστάδες
LDA	Γραμμική διαχωριστική ανάλυση
SLR	Απλή γραμμική παλινδρόμηση

PLS	Μερικών ελαχίστων τετραγώνων
HCA	Ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
QDA	Τετραγωνική διακριτική ανάλυση
PC	Κύρια Συνιστώσα
DA	Διακριτική Ανάλυση
HCA	Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες
CART	Δέντρα Ταξινόμησης και Παλινδρόμησης
NIR	Εγγύς υπέρυθρο
MIR	Μέσο υπέρυθρο
FIR	Άπω υπέρυθρο
ATR	Αποσβένουσα ολική ανάκλαση
RDA	Ομαλοποιημένη ανάλυση διακρίτοτητας
TMU	N,N-τετραμεθυλουρία
VIP	Διάγραμμα σημασίας μεταβλητών

Παράρτημα

Πίνακας 1: Δείγματα διάκρισης τσίπουρου από άλλα αποστάγματα

α/α	Εμπορικό όνομα	Είδος	Προέλευση
1	ΓΑΤΣΙΟΥ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΡΤΑ
2	ΒΡΥΣΣΑ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ
3	ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ
4	ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ
5	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
6	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
7	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΣΠΕΣΙΑΛ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
8	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ
9	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ
10	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΕΔΡΟΣ-ΚΑΡΔΙΤΣΑ
11	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΕΔΡΟΣ-ΚΑΡΔΙΤΣΑ
12	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΡΑΞΑ-ΤΡΙΚΑΛΑ
13	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΡΑΞΑ-ΤΡΙΚΑΛΑ
14	ΟΙΚ. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΡΙΚΙΟ-ΘΕΣΣΑΛΙΑ
15	ΟΙΚ. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΡΙΚΙΟ-ΘΕΣΣΑΛΙΑ
16	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ
17	ΔΕΚΑΡΑΚΙ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ
18	ΤΣΑΝΤΑΛΗ ΜΑΚΕΔΙΝΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ
19	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΓΑΛΑΞΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΑΡΤΑ
20	ΑΘΗΝΕΕ ΤΣΙΠΟΥΡΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΘΗΝΑ
21	ΚΡΕΤΑ ΡΑΚΙ	ΤΣΙΚΟΥΔΙΑ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ-ΚΡΗΤΗ
22	ΟΥΖΟ ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ
23	ΟΥΖΟ ΚΕΟ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ
24	ΓΑΛΑΞΙΑΣ ΟΥΖΟ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	ΟΥΖΟ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ-ΛΕΣΒΟΣ
25	GALAXIAS ΟΥΖΟ	ΟΥΖΟ	ΑΡΤΑ
26	ΟΥΖΟ ΑΒ	ΟΥΖΟ	ΚΑΡΛΟΒΑΣΙ-ΣΑΜΟΣ
27	ΟΥΖΟ ECONOMY	ΟΥΖΟ	ΣΑΜΟΣ
28	ΠΙΤΣΙΛΑΔΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΠΛΩΜΑΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ
29	ΚΑΡΔΑΣΗ	ΟΥΖΟ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ
30	ΟΥΖΟ MINI	ΟΥΖΟ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ-ΛΕΣΒΟΣ
31	ΟΥΖΟ ΜΑΤΑΡΕΛΛΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΛΙΣΒΟΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ
32	ΚΟΥΡΥΦΑΙΟΣ	ΟΥΖΟ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ
33	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΟΥΖΟ	ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ
34	ΚΑΖΑΝΙΣΤΟ ΣΤΟΥΠΑΚΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΧΙΟΣ
35	ΤΣΑΝΤΑΛΗ	ΟΥΖΟ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ
36	ΗΔΩΝΙΚΟ	ΟΥΖΟ-100%	ΑΔΡΙΑΝΗ-ΑΡΤΑ
37	ΠΟΥΖΟ 12	ΟΥΖΟ	ΒΟΛΟΣ
38	ΟΥΖΟ ΠΛΩΜΑΡΙ	ΟΥΖΟ-100%	ΠΛΩΜΑΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ
39	ΟΥΖΟ ΤΖΙΒΑΕΡΙ	ΟΥΖΟ-100%	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ
40	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΙΚΟ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
41	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
42	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΣΠΕΣΙΑΛ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ
43	ΟΥΖΟ ΓΝΗΣΙΟΝ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ
44	LOMTSKA	ΡΑΚΙΑ	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ
45	GANTOUS&ΑΒΟΥ RAAD	ΑΡΑΚ	ΛΙΒΑΝΟΣ
46	BORGHİ PINOT GRIGIO	ΓΚΡΑΠΑ	ΙΤΑΛΙΑ
47	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ	ΧΑΡΟΥΠΟΡΑΚΟ	ΚΥΠΡΟΣ
48	ΖΙΒΑΝΙΑ ΣΟΔΑΠ	ΖΙΒΑΝΙΑ	ΚΥΠΡΟΣ
49	AL BUSTAN	ΑΡΑΚ	ΙΟΡΔΑΝΙΑ

50	BACARDI	ΡΟΥΜΙ	ΚΟΥΒΑ
51	FINLANDIA	ΒΟΤΚΑ	ΦΙΛΑΝΔΙΑ
52	MASUMI	ΣΑΚΕ	ΙΑΠΩΝΙΑ
53	GRANT'S	ΟΥΙΣΚΙ	ΣΚΩΤΙΑ

Πίνακας 2: Διάκριση τριών τσίπουρων από άλλα αποστάγματα (NIR)

Αριθμός δείγματος	Τύπος δείγματος	Χώρα προέλευσης
1	ΤΣΙΠΟΥΡΟ	Ελλάδα
2	ΤΣΙΠΟΥΡΟ	Ελλάδα
3	ΤΣΙΠΟΥΡΟ	Ελλάδα
4	ΟΥΖΟ	Ελλάδα
5	ΟΥΖΟ	Ελλάδα
6	ΟΥΖΟ	Κύπρος
7	ZIBANIA	Κύπρος
8	ZIBANIA	Κύπρος
9	ΑΡΑΚ	Ιορδανία
10	ΣΑΜΠΟΥΚΑ	Ιταλία
11	BARACK	Ουγγαρία
12	ΒΟΤΚΑ	Φιλανδία
13	ΟΥΙΣΚΙ	Σκωτία
14	BRENNIVIN	Ισλανδία
15	ΜΠΡΑΝΤΥ	Πορτογαλία
16	ΤΖΙΝ	Ηνωμένο Βασίλειο
17	ΡΟΥΜΙ	Κούβα
18	ΣΑΚΕ	Ιαπωνία

Πίνακας 3: Δείγματα προς διάκριση τσίπουρου από ούζο

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
1	ΟΥΖΟ ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ	ΟΥΖΟ
2	ΟΥΖΟ ΚΕΟ	ΟΥΖΟ
3	ΓΑΛΛΕΙΑΣ ΟΟΥΖΟ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	ΟΥΖΟ
4	ΓΑΛΛΕΙΑΣ ΟΟΥΖΟ	ΟΥΖΟ
5	ΟΥΖΟ ΑΒ	ΟΥΖΟ
6	ΟΥΖΟ ECONOMY	ΟΥΖΟ
7	ΠΙΤΣΙΛΑΔΗ	ΟΥΖΟ-100%
8	ΚΑΡΝΤΑΣΙ	ΟΥΖΟ
9	ΟΥΖΟ MINI	ΟΥΖΟ
10	ΟΥΖΟ ΜΑΤΑΡΕΛΛΗ	ΟΥΖΟ-100%
11	ΚΟΡΥΦΑΙΟΣ	ΟΥΖΟ
12	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΟΥΖΟ
13	ΚΑΖΑΝΙΣΤΟ ΣΤΟΥΠΑΚΗ	ΟΥΖΟ-100%
14	ΤΣΑΝΤΑΛΗ	ΟΥΖΟ
15	ΗΔΩΝΙΚΟ	ΟΥΖΟ-100%
16	ΟΥΖΟ 12	ΟΥΖΟ
17	ΟΥΖΟ ΠΛΩΜΑΡΙ	ΟΥΖΟ-100%
18	ΤΖΙΒΑΕΡΙ ΟΟΥΖΟ	ΟΥΖΟ-100%
19	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΣΙΚΟ	ΟΥΖΟ
20	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ	ΟΥΖΟ
21	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ SPECIAL	ΟΥΖΟ
22	ΟΥΖΟ ΓΝΗΣΙΟΝ	ΟΥΖΟ
23	ΓΑΤΣΙΟΥ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
24	ΒΡΥΣΣΑ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
25	Ο ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
26	Ο ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
27	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΣΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
28	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
29	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ SPECIAL	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
30	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
31	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
32	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
33	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
34	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
35	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
36	ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
37	ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
38	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ

39	ΔΕΚΑΡΑΚΙ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
40	ΤΣΑΝΤΑΛΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
41	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΓΑΛΑΞΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ
42	ΑΘΗΝΕΕ ΤΣΙΠΟΥΡΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ
43	ΚΡΕΤΑ ΡΑΚΙ	ΤΣΙΚΟΥΔΙΑ
44	ΖΙΒΑΝΙΑ ΛΟΕΛ	ΖΙΒΑΝΙΑ

Πίνακας 4: Δείγματα για διάκριση τσίπουρο-τσικουδιάς-ούζου-άλλων αποσταγμάτων μέσω ισοτοπικών λόγων

α/α	Εμπορικό όνομα	Είδος	Προέλευση	DHI	DHII	R	13C	18O
T1	ΓΑΤΣΙΟΥ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΡΤΑ	105,44	129,46	2,456	-26,20	-5,46
T2	ΒΡΥΣΣΑ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ	104,80	130,41	2,489	-27,21	-8,46
T3	ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	103,39	132,37	2,561	-27,18	-6,10
T4	ΤΑΥΡΩΠΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	104,12	133,00	2,555	-27,34	-6,37
T5	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	104,86	131,07	2,500	-25,13	-5,85
T6	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΣΠΕΣΙΑΛ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	102,40	130,85	2,556	-26,67	-4,40
T7	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ	103,70	130,27	2,512	-27,54	-8,49
T8	ΜΥΘΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ	103,47	131,26	2,537	-27,87	-9,11
T9	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΕΔΡΟΣ-ΚΑΡΔΙΤΣΑ	103,05	131,43	2,551	-26,75	-7,76
T10	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΕΔΡΟΣ-ΚΑΡΔΙΤΣΑ	103,65	132,88	2,564	-26,34	-6,87
T11	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΡΑΞΑ-ΤΡΙΚΑΛΑ	104,32	129,58	2,484	-27,75	-8,47
T12	ΤΣΙΛΙΛΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΡΑΞΑ-ΤΡΙΚΑΛΑ	104,35	129,56	2,483	-27,71	-8,62
T13	ΟΙΚ. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΚΡΙΚΙΟ-ΘΕΣΣΑΛΙΑ	103,92	129,21	2,487	-27,34	-5,46
T14	ΟΙΚ. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΚΡΙΚΙΟ-ΘΕΣΣΑΛΙΑ	104,25	129,45	2,484	-27,84	-8,11
T15	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ	102,53	130,33	2,542	-27,19	-8,45
T16	ΔΕΚΑΡΑΚΙ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ	105,09	130,69	2,487	-28,01	-5,42
T17	ΤΣΑΝΤΑΛΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΚΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	103,73	131,00	2,526	-25,83	-10,39
T18	ΤΣΙΠΟΥΡΟ ΓΑΛΛΕΙΑΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΜΕ	ΑΡΤΑ	104,10	130,71	2,511	-26,48	-6,67
T19	ΑΘΗΝΕΕ ΤΣΙΠΟΥΡΟ	ΤΣΙΠΟΥΡΟ-ΧΩΡΙΣ	ΑΘΗΝΑ	105,30	133,45	2,535	-22,59	-3,40
K1	ΚΡΕΤΑ ΡΑΚΙ	ΤΣΙΚΟΥΔΙΑ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ-ΚΡΗΤΗ	105,59	135,71	2,570	-25,14	-0,77
O1	ΟΥΖΟ ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ	112,69	130,96	2,324	-13,01	-5,95
O2	ΟΥΖΟ ΚΕΟ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ	108,96	124,54	2,286	-14,98	-5,93
O3	ΓΑΛΛΕΙΑΣ ΟΥΖΟ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	ΟΥΖΟ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ-ΛΕΣΒΟΣ	115,88	133,03	2,296	-15,67	-7,24
O4	ΓΑΛΛΕΙΑΣ ΟΥΖΟ	ΟΥΖΟ	ΑΡΤΑ	108,74	122,56	2,254	-13,38	-8,22
O5	ΟΥΖΟ ΑΒ	ΟΥΖΟ	ΚΑΡΛΟΒΑΣΙ-ΣΑΜΟΣ	97,28	125,43	2,579	-26,14	-0,97
O6	ΟΥΖΟ ECONOMY	ΟΥΖΟ	ΣΑΜΟΣ	106,62	125,51	2,354	-15,22	-6,82
O7	ΠΙΤΣΙΛΑΔΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΠΛΩΜΑΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ	100,75	127,94	2,540	-26,20	-8,43

O8	ΚΑΡΔΑΣΗ	ΟΥΖΟ	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ	105,84	126,00	2,381	-15,73	-9,13
O9	ΟΥΖΟ ΜΙΝΙ	ΟΥΖΟ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ-ΛΕΣΒΟΣ	105,61	121,60	2,303	-16,27	-7,57
O10	ΟΥΖΟ ΜΑΤΑΡΕΛΛΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΛΙΣΒΟΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ	96,07	120,72	2,513	-24,49	-8,62
O11	ΚΟΥΡΥΦΑΙΟΣ	ΟΥΖΟ	ΚΟΜΟΤΗΝΗ	108,12	125,97	2,330	-14,03	-8,36
O12	ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ	ΟΥΖΟ	ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ	96,28	122,56	2,546	-23,88	-7,26
O13	ΚΑΖΑΝΙΣΤΟ ΣΤΟΥΠΑΚΗ	ΟΥΖΟ-100%	ΧΙΟΣ	101,31	122,60	2,420	-19,86	-7,70
O14	ΤΣΑΝΤΑΛΗ	ΟΥΖΟ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	107,68	120,67	2,241	-13,86	-9,29
O15	ΗΔΩΝΙΚΟ	ΟΥΖΟ-100%	ΑΔΡΙΑΝΗ-ΑΡΤΑ	116,69	132,53	2,271	-14,79	-8,72
O16	ΟΥΖΟ 12	ΟΥΖΟ	ΒΟΛΟΣ	110,11	129,41	2,351	-13,88	-10,05
O17	ΟΥΖΟ ΠΛΩΜΑΡΙ	ΟΥΖΟ-100%	ΠΛΩΜΑΡΙ-ΛΕΣΒΟΣ	95,34	120,21	2,522	-24,90	-8,59
O18	ΟΥΖΟ ΤΖΙΒΑΕΡΙ	ΟΥΖΟ-100%	ΤΥΡΝΑΒΟΣ-ΛΑΡΙΣΑ	97,38	126,43	2,597	-26,63	-9,42
O19	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΚΛΑΣΙΚΟ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	93,42	123,35	2,641	-26,53	-8,33
O20	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	93,26	124,00	2,659	-26,47	-8,25
O21	ΟΥΖΟ ΚΩΣΤΕΑΣ ΣΠΕΣΙΑΛ	ΟΥΖΟ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	100,97	126,11	2,498	-25,73	-8,13
O22	ΟΥΖΟ ΓΝΗΣΙΟΝ	ΟΥΖΟ	ΚΥΠΡΟΣ	108,56	125,11	2,305	-14,71	-7,33
S1	LOMTSKA	ΡΑΚΕΑ	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	106,34	120,13	2,259	-15,07	-10,33
S2	GANTOUS&ABOU RAAD	ΑΡΑΚ	ΛΙΒΑΝΟΣ	105,00	136,96	2,609	-22,05	-3,50
S3	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ	ΧΑΡΟΥΠΟΡΑΚΟ	ΚΥΠΡΟΣ	103,60	131,90	2,546	-26,92	-11,33
S4	ZIVANIA SODAP	ZIVANIA	ΚΥΠΡΟΣ	104,00	134,240	2,58	-26,05	-1,100
S5	AL BUSTAN	ΑΡΑΚ	ΙΟΡΔΑΝΙΑ	119,15	129,770	2,18	-11,25	-10,930
S6	MASUMI	ΣΑΚΕ	ΙΑΠΩΝΙΑ	110,15	126,340	2,29	-13,11	-7,920