



Δράση: ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ

T1ΕΔΚ-04028

Τίτλος Παραδοτέου:
Πρωτόκολλα Πιστοποίησης Γεωγραφικής
Πρόέλευσης Μεταποιημένων Αγροτικών
& Αλιευτικών Προϊόντων

Υπεύθυνος Φορέας : ΔΕΑΠΤ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Στοιχεία Προγράμματος:

ΑΚΡΩΝΥΜΙΟ:	Trust Trace		
ΤΙΤΛΟΣ:	Σχεδιασμός και ανάπτυξη συστήματος πλήρους και τεκμηριωμένης ιχνηλασιμότητας και ελέγχου ποιότητας για μεταποιημένα αγροτικά προϊόντα και προϊόντα αλυσίδας με εστίαση στον καταναλωτή		
ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΡΓΟΥ :	Τ1ΕΔΚ-04028		
ΔΡΑΣΗ	ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ		
ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	ΣΥΜΠΡΑΞΕΙΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΜΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ		
ΤΟΜΕΑΣ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ	ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ		
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ		
Start date:	01/11/2018	ΔΙΑΡΚΕΙΑ:	36 Μηνες
Website:	https://trust-trace.gr/		
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ ΕΡΓΟΥ :	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ		

Πληροφορίες Εγγράφου

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ	2.3 & 2.4 (ΕΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ)		
ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	2η ΕΝΟΤΗΤΑ		
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΚΔΟΣΗΣ:		ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΔΟΣΗΣ:	
ΕΙΔΟΣ ΕΓΓΡΑΦΟΥ:	Περιορισμένο		
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΦΟΡΕΑΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:	ΔΕΑΠΤ ΠΠ		
ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ :	ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΥ Κ., ΨΑΡΡΑ Ε., ΚΑΡΑΜΠΑΓΙΑΣ Ι.		
ΑΝΑΘΕΩΡΗΤΕΣ:	ΚΟΝΤΟΓΕΩΡΓΟΣ Α., ΛΑΝΤΑΒΟΣ Α., ΠΑΤΑΚΑΣ Α		
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:			



Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	3
1. Εισαγωγή	4
2. Αρχή λειτουργίας φασματοσκοπίας μαζών του λόγου ισοτόπων (Isotope ratio Mass Spectrometry-IRMS)	4
2.1 Επεξεργασία δειγμάτων και προετοιμασία οργάνου μέτρησης (IRMS)	7
3. Κατασκευή και χρήση ισοτοπικών βάσεων δεδομένων για τον έλεγχο της αυθεντικότητας των τροφίμων	13
4 Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης	18
4.1 Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης μεταποιημένων αγροτικών προϊόντων	18
4.1.1 Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων ελιάς	18
4.1.2. Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων σταφίδας	22
4.2. Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης μεταποιημένων αλιευτικών προϊόντων	24
4.2.1 Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων αυγοτάραχου	24
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	26
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	28
Παράρτημα 1: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Ελιάς	29
Παράρτημα 2: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Σταφίδας	30
Παράρτημα 3: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Αυγοτάραχου	32
 ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	
Σχήμα 1. Αρχή λειτουργίας του IRMS	7
Σχήμα 2. Ισοτοπικός λόγος $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ και $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ γλυκιάς πιπεριάς από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές	9
Σχήμα 3.1. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων ελιάς	13
Σχήμα 3.2. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων αυγοτάραχου	15
Σχήμα 3.3. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων αυγοτάραχου	17



1. Εισαγωγή

Στο πλαίσιο του Έργου «Ανάπτυξη ολοκληρωμένης μεθοδολογίας πλήρους και τεκμηριωμένης ιχνηλασιμότητας και ελέγχου ποιότητας ολοκληρωμένης μεθοδολογίας πλήρους και τεκμηριωμένης ιχνηλασιμότητας και ελέγχου ποιότητας μεταποιημένων αγροτικών προϊόντων και αλιευτικών προϊόντων» με εστίαση στον καταναλωτή», αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης μεταποιημένων αγροτικών προϊόντων, μέσω προσδιορισμού λόγου σταθερών ισοτόπων των στοιχείων : C, N και S.

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι σταφίδας, ελιάς και αυγοτάραχου, ενώ η μέθοδος ανάλυσης είναι η φασματοσκοπία μαζών του λόγου ισοτόπων (IRMS).

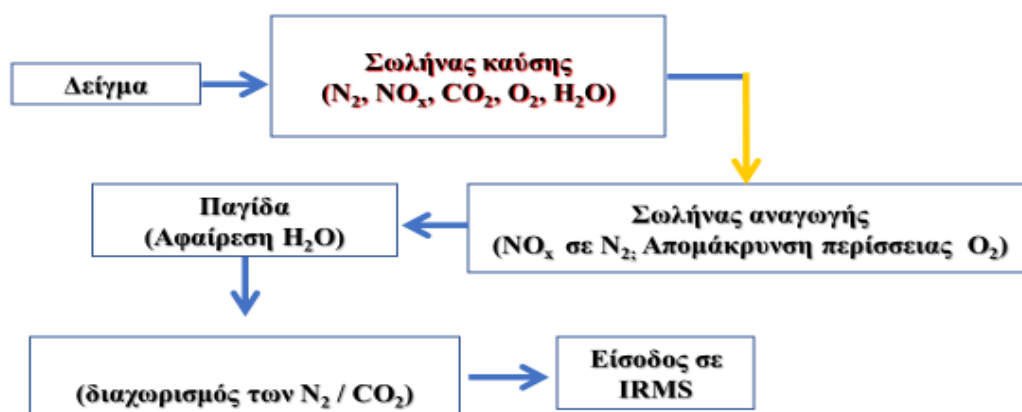
Τα πρωτόκολλα ακολούθησαν επίσημες μεθόδους με μικρές τροποποιήσεις. Για τα δείγματα σταφίδας χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι ENV 13070 (1998) (προσδιορισμός του λόγου ισοτόπων άνθρακα ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) σε πούλπα χυμών φρούτων) και DD ENV 12140 (1996) (προσδιορισμός του λόγου ισοτόπων άνθρακα ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) σακχάρων σε χυμούς φρούτων), οι οποίες χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία (Camin et al., 2011; Kolesnov and Agafonova, 2016; Longobardi et al., 2017; Perini et al., 2018). Για τα δείγματα αυγοτάραχου και ελιάς ακολουθήθηκε η μέθοδος των Kim et al. (2015) με τροποποιήσεις. Τα πρωτοκόλλα πιστοποίησης αναφέρονται στην προετοιμασία των δειγμάτων και στην ανάλυση με IRMS.

2. Αρχή λειτουργίας φασματοσκοπίας μαζών του λόγου ισοτόπων (Isotope ratio Mass Spectrometry-IRMS)

Κάθε δείγμα επεξεργάζεται κατάλληλα, πριν από την ανάλυση με φασματοσκοπία μαζών του λόγου ισοτόπων, έτσι ώστε να αναλυθεί μόνο ένα χημικό είδος (καθαρό) κάθε φορά. Τα δείγματα καίγονται, ανάγονται ή πυρολύονται σε στοιχειακό αναλυτή και το επιθυμητό είδος αερίου, συνήθως υδρογόνο (H_2), άζωτο (N_2), διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) ή διοξείδιο του θείου (SO_2) καθαρίζεται με χημικές παγίδες και με τη βοήθεια του φέροντος αερίου διαβιβάζεται σε στήλες με κατάλληλο πληρωτικό υλικό και το κάθε αέριο διαδοχικά εισέρχεται στη συνέχεια



σε σύστημα IRMS, όπου αρχικά ιονίζεται και στη συνέχεια τα ιόντα του, μέσω της διέλευσης από το μαγνητικό πεδίο του φασματογράφου μαζών, ταυτοποιούνται / καταγράφονται ως ιοντικές μάζες (m/z) (Σχήμα 1). Τέλος, το αποτέλεσμα εκφράζεται ως τιμή διαφορικού λόγου δ (‰) για κάθε στοιχείο, που δηλώνει το λόγο σταθερών ισοτόπων του συγκεκριμένου στοιχείου του προς εξέταση δείγματος σε σχέση με το λόγο ισοτόπων του ίδιου στοιχείου σε καταλλήλως επιλεγμένα δείγματα αναφοράς (Εξίσωση 1).



Σχήμα 1. Αρχή λειτουργίας του IRMS.

$$\delta \text{‰}X = \left(\frac{R_{\text{δείγματος}}}{R_{\text{υλικού αναφοράς}}} - 1 \right) * 1000 \text{ [Εξίσωση 1] (Brand and Coplen, 2012).}$$

όπου X το ισότοπο που μελετάται (π.χ. ^{13}C , ^{15}N , ^{34}S), $R_{\text{δείγματος}}$ ($R_{\text{δείγματος}} = \frac{H_X}{L_X}$) ο ισοτοπικός λόγος του μετρούμενου ισοτόπου στην φυσική του μορφή (π.χ. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) στο δείγμα και $R_{\text{υλικού αναφοράς}}$ ο ισοτοπικός λόγος του υλικού αναφοράς.

Η χρησιμοποίηση της τιμής διαφορικού λόγου $\delta\text{‰}$ παρέχει υψηλότερη ακρίβεια και ευαισθησία στην ανάλυση διότι τα αποτελέσματα απόλυτων τιμών λόγου ισοτόπων διαφορίζονται με αντίστοιχες τιμές λόγου ισοτόπων υλικών αναφοράς (πρότυπες ενώσεις). Η ισοτοπική σύσταση συγκεκριμένων φυτικών ή ζωικών οργανισμών, οι οποίοι αναπτύσσονται

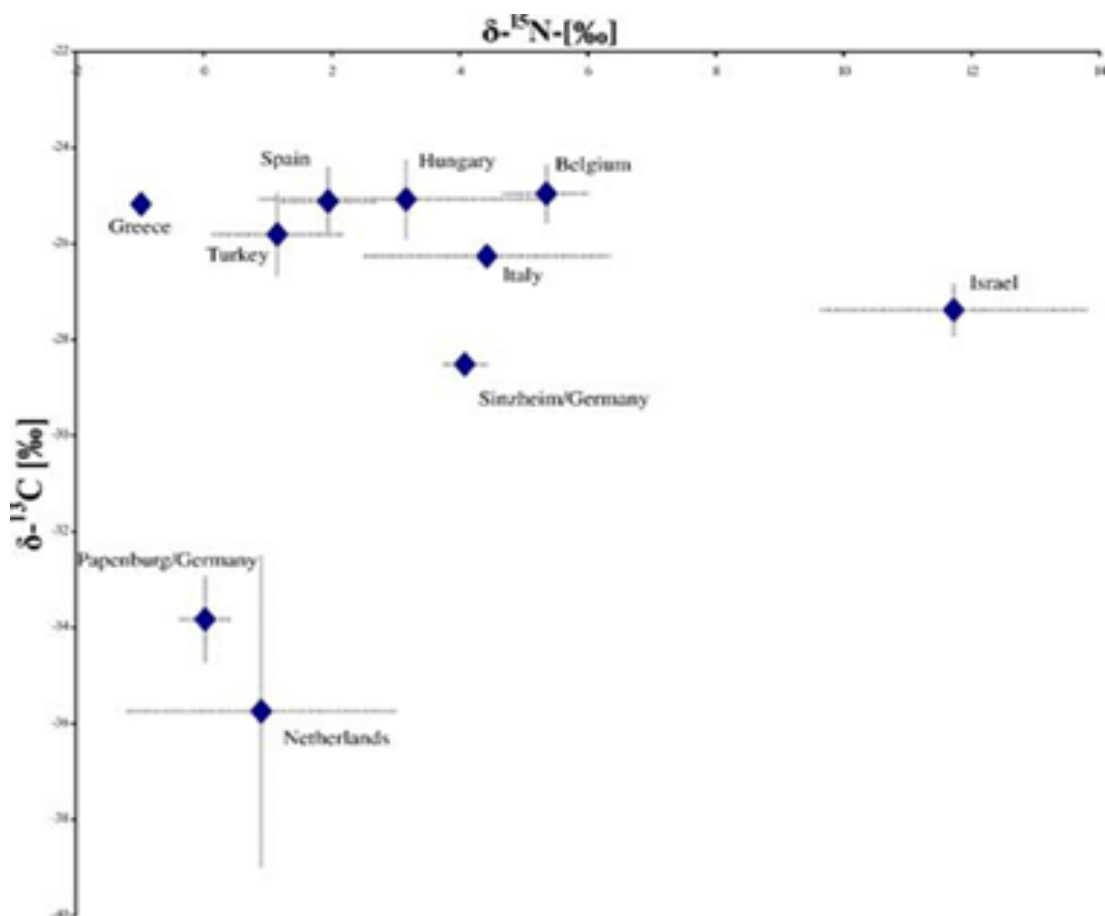


σε συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή υπό συγκεκριμένες συνθήκες, παρουσιάζει μικρή διακύμανση και μπορεί να θεωρηθεί πρακτικά σταθερή και έτσι να χαρακτηριστεί ως ένα ισοτοπικό αποτύπωμα “isotopic fingerprint”.

Για παράδειγμα, ο λόγος $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ εξαρτάται κυρίως από τον βιοχημικό τύπο του φυτού.

Οι λόγοι $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ και $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ αντανakλούν την τοπική εδαφολογική σύσταση. Για το άζωτο μια μετατόπιση κατά 3‰ παρατηρείται για κάθε διαδοχικό στάδιο της τροφικής αλυσίδας. Οι λόγοι $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ αντανakλούν την εγγύτητα σε παράκτιες περιοχές, εξαιτίας της απευθείας εναπόθεσης θειικών θαλάσσιων σταγονιδίων, τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε S-34 (Manca et. al., 2006). Ανάλογα με την προέλευση και την εξέλιξη πριν και μετά την ενσωμάτωση αυτά τα στοιχεία εμφανίζουν διαφοροποίηση του ισοτοπικού λόγου (λόγος συγκεντρώσεων βαρέως προς ελαφρού ισοτόπου). Αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται με κινητικούς ή θερμοδυναμικούς παράγοντες, οι οποίοι αντανakλούν στις συνθήκες υπό τις οποίες (φυσικές ή (βιο-)χημικές διεργασίες) έλαβαν χώρα. Ο ισοτοπικός λόγος των ανωτέρω στοιχείων σχετίζεται με το κλίμα, την απόσταση από τη θάλασσα, τις γεωγραφικές συντεταγμένες και τις καλλιεργητικές πρακτικές (Horn et al., 1993).

Για παράδειγμα πιπεριές (*Capsicum spp.*) Ισπανίας μπορούν να διαχωριστούν από Ολλανδικές με χρήση του λόγου $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Ο χαμηλότερος λόγος $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ στις πιπεριές Ολλανδίας οφείλεται στην προσθήκη σε θερμοκήπια, διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από πηγές θέρμανσης. Το φυσικό αέριο που χρησιμοποιείται ως καύσιμο έχει χαμηλό λόγο $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση του λόγου $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ οφείλεται στη διαφορετική λίπανση. Λόγος $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ κοντά στο μηδέν οφείλεται στη χρήση ορυκτών λιπασμάτων ενώ υψηλότερος λόγος $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ οφείλεται σε οργανική λίπανση. Πιπεριές από το Ισραήλ είναι άμεσα αναγνωρίσιμες εξαιτίας του υψηλού λόγου $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Τα ανωτέρω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η ταυτόχρονη ανάλυση περισσότερων στοιχείων οδηγούν σε πιο αξιόπιστο συμπέρασμα. Η επικάλυψη των τιμών για δείγματα από Ουγγαρία, Ισπανία και Βέλγιο, αποδεικνύει ότι η φυσική διακύμανση λόγω των διαφορετικών φυσικών (καιρικές συνθήκες) και χημικών συνθηκών (λίπανση, έδαφος) πρέπει να ληφθεί υπόψη.



Σχήμα 2. Ισοτοπικός λόγος $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ και $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ γλυκιάς πιπεριάς από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Mahne Oratić et al., 2017).

Σημ. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των μετρήσεων

2.1 Επεξεργασία δειγμάτων και προετοιμασία οργάνου μέτρησης (IRMS)

Τα δείγματα παραλαμβάνονται και σημαίνονται κατάλληλα. Τα δείγματα του αυγοτάραχου τοποθετούνται σε κατάψυξη, ενώ τα δείγματα σταφίδας και ελιάς σε σκιερό μέρος.

Τα δείγματα σταφίδας υφίστανται κρυοξήρανση και στη συνέχεια ομογενοποιούνται με γουδί, ενώ τα δείγματα ελιάς και αυγοτάραχου ομογενοποιούνται με μύλο Pulverisette 11 (Fritsch, με ή και χωρίς χρήση υγρού αζώτου).



Ένα μέρος των ομογενοποιημένων δειγμάτων ξηραίνεται σε πυριαντήριο για τον προσδιορισμό C ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) (Βλέπε Πίνακες 1-3) ενώ το υπόλοιπο επεξεργάζεται για τον προσδιορισμό N ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), S ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) κατάλληλα (απομάκρυνση σακχάρων και απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος σε δείγματα σταφίδας, και απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος στα δείγματα ελιάς και αυγοτάραχου για τον προσδιορισμό των ισοτοπικών λόγων αζώτου και θείου.

Το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιείται είναι ένα σύστημα EA-IRMS συνεχούς ροής (CF) της εταιρείας 'ELEMENTAR' το οποίο επιπρόσθετα είναι εφοδιασμένο με έναν στοιχειακό αναλυτή VARIO Cube Elementar Analyzer (EA) και ένα φασματογράφο μαζών ISOPRIME 100 (IRMS).

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων απαιτείται η βαθμονόμηση του οργάνου IRMS. Η βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με χρήση υλικών αναφοράς γνωστής σύστασης (πρότυπες ουσίες). Ανάλογα με το ισότοπο που θέλουμε να προσδιορίσουμε (H, C, N, S, O, κτλ.) επιλέγουμε την κατάλληλη πρότυπη ουσία (Πίνακες 1 έως 4). Το υλικό αναφοράς επιλέγεται επίσης με βάση τα θερμοδυναμικά του χαρακτηριστικά, δηλαδή θα πρέπει να έχει παρόμοια θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά με τους υπό εξέταση λόγους ισοτόπων αλλά και να πλησιάζει την σύσταση του υπό εξέταση δείγματος.

Το κρίσιμο σημείο για την επιλογή μιας μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των λόγων ισοτόπων σε διαφορετικά δείγματα τροφίμων είναι η σύσταση κάθε τροφίμου. Με ελάχιστες εξαιρέσεις (π.χ. $\delta^{18}\text{O}$ πόσιμου νερού και $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ και $\delta^2\text{H}$ ελαιόλαδου) η επεξεργασία του δείγματος είναι υποχρεωτική, διότι επιτρέπει την απομόνωση των συστατικών που καταγράφουν το γεωγραφικό αποτύπωμα καλύτερα από το μη επεξεργασμένο δείγμα και με λιγότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών (π.χ. οι λιπαρές ύλες έχουν διαφορετικές ισοτοπικές τιμές από τις πρωτεΐνες (DeNiro & Epstein, 1978).

Σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους (Πίνακας 3) τα φυτικά προϊόντα που περιέχουν σάκχαρα (π.χ. γλεύκος σταφυλιών και χυμοί φρούτων) συχνά υποβάλλονται σε ζύμωση και υποβάλλονται σε απόσταξη για την ανάκτηση της αιθανόλης η οποία στη συνέχεια αναλύεται. Αυτό συμβαίνει



επειδή η αιθανόλη αντανακλά την ισοτοπική σύσταση του μητρικού σακχάρου και είναι πολύ πιο επιδεκτική σε ισοτοπική ανάλυση τόσο με φασματοσκοπία μαζών του λόγου ισοτόπων, όσο και ποσοτικό πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό δευτερίου. Τα αλκοολούχα σκευάσματα που έχουν ήδη υποστεί ζύμωση (π.χ. κρασί) πρέπει μόνο να αποσταχθούν πριν από την ισοτοπική ανάλυση. Από το χυμό φρούτων, ο πολτός (πούλπα) διαχωρίζεται μέσω φυγοκέντρησης του χυμού και πλύσης του στερεού υπολείμματος με νερό και στη συνέχεια με ακετόνη για την απομάκρυνση των σακχάρων και τη μείωση του ποσοστού των λιπιδίων και των χρωστικών, όπως περιγράφεται στη μέθοδο ENV 13070.

Τα δείγματα που περιέχουν λιπαρές ύλες (π.χ. κρέας, γάλα και τυρί) υποβάλλονται σε απομάκρυνση του λίπους επειδή το λίπος έχει διαφορετική σύσταση C και H από τα άλλα συστατικά των τροφίμων και συνεπώς η μεταβλητή του ποσότητα μπορεί να επηρεάσει τις συνολικές ισοτοπικές τιμές. Για την απομάκρυνση του λίπους του δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε διαλύτης ή μέθοδος εκχύλισης που εξασφαλίζει πλήρη απομάκρυνση του λιπαρού συστατικού (π.χ. με μείγμα πετρελαϊκού αιθέρα: διαιθυλαιθέρα 2: 1 ή νερό/διχλωρομεθάνιο (2:1), ακετόνη ή εξάνιο χρησιμοποιώντας συσκευή ομογενοποίησης ή διάταξη Soxhlet). Οι λιπαρές ύλες μπορούν επίσης να ανακτηθούν για ισοτοπική ανάλυση, επειδή η ανάλυση των ισοτοπικών αναλογιών σε διαφορετικά κλάσματα τροφίμου π.χ. το λίπος και οι πρωτεΐνες στο κρέας (Perini et al., 2013) μπορούν ενδεχομένως να δώσουν καλύτερη διάκριση ως προς τη γεωγραφική προέλευση του τροφίμου. Πριν από την ανάλυση, τα κλάσματα ξηραίνονται με κατάψυξη και αποθηκεύονται (Camin et al., 2017).

Για τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πρότυπα πιστοποιημένα από τον διεθνή οργανισμό IAEA : Caffeine (IAEA-600) για τα ισότοπα C, νιτρικό κάλιο (IAEA-NO-3), θειικό αμμώνιο (IAEA-N-1), θειικό αμμώνιο (IAEA-N-2) για το N και θειούχος άργυρος (IAEA-S-1), θείο (IAEA-S-4) για το S.



Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα πλέον χρησιμοποιούμενα υλικά αναφοράς γνωστής σύστασης (πρότυπες ουσίες)

Πίνακας 1: Υλικά αναφοράς για τον Άνθρακα

Name	Material	$\delta^{13}\text{C}$	Standard deviation
IAEA-603	CaCO_3	2.46‰	0.01‰
NBS-18	CaCO_3	-5.014‰	0.035‰
NBS-19	CaCO_3	1.95‰	-
LSVEC	Li_2CO_3	-46.6‰	0.2‰
IAEA-CO-1	Carrara marble	+2.492‰	0.030‰
IAEA-CO-8	CaCO_3	-5.764‰	0.032‰
IAEA-CO-9	BaCO_3	-47.321‰	0.057‰
NBS 22	Oil	-30.031‰	0.043‰

Πίνακας 2: Υλικά αναφοράς για το Άζωτο

Name	Material	$\delta^{15}\text{N}$	Standard deviation	Source / Derivation of material
IAEA-N-1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.4‰	0.2‰	
IAEA-N-2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20.3‰	0.2‰	
IAEA-NO-3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.7‰	0.2‰	
USGS32	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	180‰	1‰	
USGS34	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-1.8‰	0.2‰	from nitric acid
USGS35	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.7‰	0.2‰	purified from natural ores
USGS25	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	-30.4‰	0.4‰	
USGS26	KNO_3	53.7‰	0.4‰	
NSVEC	KNO_3	-2.8‰	0.2‰	
IAEA-305	KNO_3	39.8‰ 375.3‰	39.3 - 40.3‰ 373.0 - 377.6‰	derived from ammonium sulfate SD given as 95% confidence interval
IAEA-310	N_2 gas	47.2‰ 244.6‰	46.0 - 48.5‰ 243.9 - 245.4‰	derived from urea SD given as 95% confidence interval
IAEA-311	NaNO_3	2.05 ‰	2.03 - 2.06‰	SD given as 95% confidence interval

**Πίνακας 3: Υλικά αναφοράς για το Θείο**

Name	Material	$\delta^{34}\text{S}$	Standard deviation	Source/derivation of material
IAEA-S-1	Ag_2S	-0.30‰	-	from sphalerite (ZnS)
IAEA-S-2	Ag_2S	22.7‰	0.2‰	from gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
IAEA-S-3	Ag_2S	-32.3‰	0.2‰	from sphalerite (ZnS)
IAEA-S-4	S	16.9‰	0.2‰	from natural gas
IAEA - SO-5:	BaSO_4	0.5‰	0.2‰	from aqueous sulfate (SO_4)
IAEA - SO-6	BaSO_4	-34.1‰	0.2‰	from aqueous sulfate (SO_4)
NBS - 127	BaSO_4	20.3‰	0.4‰	from sulfate (SO_4) from Monterey Bay

Πίνακας 4: Πρότυπες Ουσίες αναφοράς

Name	Chemical	$\delta\text{H}_{\text{VSMOW-SLAP}} (\text{‰})$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB-LSVEC}} (\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$
USGS61	caffeine	96.9 ± 0.9	-35.05 ± 0.04	-2.87 ± 0.04
USGS62	caffeine	-156.1 ± 2.1	-14.79 ± 0.04	20.17 ± 0.06
USGS63	caffeine	174.5 ± 0.9	-1.17 ± 0.04	37.83 ± 0.06
IAEA-600	caffeine	-156.1 ± 1.3	-27.73 ± 0.04	1.02 ± 0.05
USGS64	glycine	-	-40.81 ± 0.04	1.76 ± 0.06
USGS65	glycine	-	-20.29 ± 0.04	20.68 ± 0.06
USGS66	glycine	-	-0.67 ± 0.04	40.83 ± 0.06
USGS67	n-hexadecane	-166.2 ± 1.0	-34.5 ± 0.05	-
USGS68	n-hexadecane	-10.2 ± 0.9	-10.55 ± 0.04	-
USGS69	n-hexadecane	381.4 ± 3.5	-0.57 ± 0.04	-
USGS70	icosanoic acid methyl ester	-183.9 ± 1.4	-30.53 ± 0.04	-
USGS71	icosanoic acid methyl ester	-4.9 ± 1.0	-10.5 ± 0.03	-
USGS72	icosanoic acid methyl ester	348.3 ± 1.5	-1.54 ± 0.03	-
USGS73	L-valine	-	-24.03 ± 0.04	-5.21 ± 0.05
USGS74	L-valine	-	-9.3 ± 0.04	30.19 ± 0.07
USGS75	L-valine	-	0.49 ± 0.07	61.53 ± 0.14
USGS76	methylheptadecanoate	-210.8 ± 0.9	-31.36 ± 0.04	-
IAEA-CH-7	polyethylene foil	-99.2 ± 1.2	-32.14 ± 0.05	-



Name	Chemical	$\delta H_{VSMOW-SLAP} (\text{‰})$	$\delta^{13}C_{VPDB-LSVEC} (\text{‰})$	$\delta^{15}N_{AIR} (\text{‰})$
USGS77	polyethylene power	-75.9 ± 0.6	-30.71 ± 0.04	-
NBS 22	oil	-117.2 ± 0.6	-30.02 ± 0.04	-
NBS 22a	vacuum oil	-120.4 ± 1.0	-29.72 ± 0.04	-
USGS78	2H-enriched vacuum oil	397.0 ± 2.2	-29.72 ± 0.04	-

Πηγή: Schimmelman et al. (2016).



3. Κατασκευή και χρήση ισοτοπικών βάσεων δεδομένων για τον έλεγχο της αυθεντικότητας των τροφίμων

Προκειμένου να δημιουργηθεί μια αξιόπιστη τράπεζα δεδομένων ισοτοπικών αναλύσεων που θα γίνει αποδεκτή από έναν οργανισμό και που να μπορεί να εγγυηθεί την αξιόπιστη ερμηνεία των δεδομένων, πρέπει να προσδιοριστεί, ουσιαστικά, τι σημαίνει «αυθεντικό δείγμα» και ποιοι είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την μεταβλητότητα των υπό εξέταση ισοτόπων σε σχέση με το τρόφιμο. Η αυθεντικότητα των δειγμάτων πρέπει να είναι εγγυημένη όσο το δυνατόν περισσότερο (Camin et al., 2017).

Στην περίπτωση του κρασιού, για παράδειγμα, τα σταφύλια συλλέγονται, αντί του τελικού προϊόντος (κρασί) και οι ερευνητές πρέπει να λάβουν υπόψη ότι οι σταθερές αναλογίες ισότοπων αλλάζουν με τη γεωγραφική προέλευση, τις κλιματολογικές συνθήκες, την σύσταση του εδάφους και τη γεωλογία της τοποθεσίας (Camin et al., 2017).

Για τα ζωικά προϊόντα, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο τύπος και η προέλευση της διατροφής και πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη τυχόν πιθανές επιπτώσεις της τεχνολογίας επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός δειγματοληψίας πρέπει να αποδεικνύει ότι τα δείγματα που λαμβάνονται είναι επαρκώς αντιπροσωπευτικά και καλύπτουν τη γεωγραφική περιοχή παραγωγής, την περίοδο συγκομιδής για τα φυτικά προϊόντα, τον τύπο διατροφής για ζωικά προϊόντα, τους τύπους τεχνολογιών για τα μεταποιημένα τρόφιμα. Περαιτέρω, για τρόφιμα ζωικής προέλευσης, πρέπει να τονιστεί ότι, εκτός από τα ζώα που βόσκουν, οι ζωοτροφές γενικά δεν είναι τοπικής προέλευσης. Ωστόσο, η σύσταση των ζωοτροφών που απαιτείται από ορισμένες προδιαγραφές, όπως η Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) που μπορεί να υπάρχει, μερικές φορές επιτρέπει έναν πιο ειδικό ισοτοπικό χαρακτηρισμό του τελικού προϊόντος. Σε συνδυασμό με αναλυτικά δεδομένα, τα μεταδεδομένα που περιγράφουν το ιστορικό του δείγματος είναι ζωτικής σημασίας. Η πιο αποτελεσματική διαδικασία είναι η δημιουργία ετήσιων βάσεων δεδομένων ειδικά για προϊόντα λαχανικών και φρούτων που δείχνουν πιο σημαντική μεταβλητότητα σε σχέση με το έτος συγκομιδής / παραγωγής (Camin et al., 2017).



Ο προσδιορισμός της γεωγραφικής προέλευσης των προϊόντων διατροφής απαιτεί συχνά αναλύσεις σταθερών ισότοπων σε συνδυασμό με άλλους αναλυτικούς προσδιορισμούς, π.χ. το προφίλ ιχνοστοιχείων σε περαιτέρω συνδυασμό με χημειομετρία (αξιολόγηση πολλαπλών δεδομένων). Οι απαιτήσεις για τα επίπεδα εμπιστοσύνης, που είναι απαραίτητα και για τις καταλληλότερες διαδικασίες αξιολόγησης, δεν έχουν ακόμη καθοριστεί επίσημα για εφαρμογή σε κάποιο νομικό πλαίσιο. Στην επιστημονική βιβλιογραφία περιγράφονται πολλά παραδείγματα εφαρμογής πολυπαραγοντικών αναλύσεων, ιδιαίτερα όταν συνδυάζονται διαφορετικές τεχνικές (συγχώνευση δεδομένων). Μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις, ωστόσο, πολύ συχνά σε σχέση με μελέτες με περιορισμένο εύρος και αυθεντικούς αριθμούς δειγμάτων.

Επί του παρόντος, δεν υπάρχει εναρμόνιση και συμφωνία για την αξιολόγηση και την επικύρωση των αποτελεσμάτων μιας τέτοιας πολυπαραμετρικής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας διαδικασίες στατιστικής ανάλυσης. Παρ' όλα αυτά, η αξιολόγηση δεδομένων πολλαπλών μεταβλητών θεωρείται επί του παρόντος ένα πολύτιμο εργαλείο κατάταξης (π.χ. όταν εξετάζουμε την ισοτοπική ανάλυση μαζί με το προφίλ ιχνοστοιχείων ή οργανικών μεταβολιτών). Ωστόσο, η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής ως επίσημο πρωτόκολλο για έλεγχο της αυθεντικότητας εξακολουθεί να είναι περιορισμένη λόγω της πιθανής χαμηλής αποδοχής σε νομικό επίπεδο του αξιόπιστου προσδιορισμού της αβεβαιότητας κατά την ανάλυση μεγάλου αριθμού μεταβλητών/παραμέτρων. Φαίνεται λοιπόν να απαιτείται περαιτέρω έρευνα, υπό την έννοια ότι πρέπει να καθοριστούν δείκτες εναρμόνισης και ποιότητας σε αυτό το πεδίο της επιστήμης (Camin et al., 2017).

Όταν η ανάλυση του λόγου ισότοπων εφαρμόζεται για σκοπούς ελέγχου της ταυτότητας των προϊόντων, π.χ. έλεγχος της γεωγραφικής προέλευσης των γεωργικών προϊόντων, απαιτείται σύγκριση με ένα σύνολο δεδομένων αναφοράς. Για το σκοπό αυτό, οι τράπεζες/βάσεις δεδομένων έχουν τεράστια σημασία για την ερμηνεία των αναλυτικών δεδομένων. Επομένως, η αυθεντικότητα και η αντιπροσωπευτικότητα των δειγμάτων αναφοράς είναι κρίσιμης σημασίας για την επιτυχή υλοποίηση μιας τέτοιας διαδικασίας.



Οι υπάρχουσες ισοτοπικές τράπεζες δεδομένων και οι σχετικές νομικές διαδικασίες που πρέπει να ακολουθηθούν μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες. Η πρώτη ομάδα βασίζεται σε ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί εδώ και πολλά χρόνια και ενημερώνονται κάθε χρόνο. Αυτό ισχύει για τις επίσημες βάσεις δεδομένων που βασίζονται σε κανονισμούς (π.χ. τράπεζα βάσεων δεδομένων οίνου από την ΕΕ) ή τράπεζα δεδομένων που δημιουργήθηκε από ένωση ή κοινοπραξία για συγκεκριμένα προϊόντα (π.χ. από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τους χυμούς φρούτων-AJN, τυρί ΠΟΠ Ιταλίας Grana Padano, κτλ.). Αυτές οι τράπεζες δεδομένων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαλήθευση της γνησιότητας των εμπορικών προϊόντων, εάν απαιτείται. Ωστόσο, δεν είναι ελεύθερα προσβάσιμες. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων, οι οποίες δημιουργούνται στο πλαίσιο ενός έργου (π.χ. τα έργα της ΕΕ PURE JUICE και TRACE), ή κατ' απαίτηση, για τον εντοπισμό συγκεκριμένων περιπτώσεων απάτης (π.χ. εμπόριο βουτύρου ή χαβιάρι) (Camin et al., 2017). Για παράδειγμα, στο έργο «TRACE» (www.trace.eu.org) της ΕΕ συλλέχθηκαν δεδομένα σταθερών ισότοπων για μια ποικιλία προϊόντων διατροφής, όπως μέλι, δημητριακά, αρνί, βόειο κρέας, ελαιόλαδο και μεταλλικό νερό (Rossmann, 2007).

Συνιστάται ιδιαίτερα τα εργαστήρια να είναι διαπιστευμένα κατά ISO 17025 ή να αποδεικνύουν ότι διαθέτουν ισοδύναμα συστήματα ελέγχου της ποιότητας των αναλύσεων. Αυτό είναι υποχρεωτικό για εργαστήρια που σκοπεύουν να δημιουργήσουν τράπεζες δεδομένων για την επαλήθευση της γνησιότητας των εμπορικών προϊόντων για σκοπούς ελέγχου των τροφίμων και για εργαστήρια που καλύπτονται από κάποιο νομικό πλαίσιο σε αυτή την κατεύθυνση. Ειδικότερα, η τράπεζα ισοτοπικών δεδομένων οίνων της ΕΕ απαιτεί να παρέχεται κατάλογος των επίσημα καθορισμένων εργαστηρίων από την αρμόδια αρχή σε κάθε κράτος μέλος. Μια περαιτέρω απαίτηση διαπίστευσης είναι ότι το εργαστήριο πρέπει να συμμετέχει σε δοκιμές επάρκειας που συμμορφώνονται με το διεθνές εναρμονισμένο πρωτόκολλο ISO/IUPAC/AOAC για την απόδειξη της ικανότητας των αναλυτικών εργαστηρίων (Camin et al., 2017)..

Η ερμηνεία των ισοτοπικών δεδομένων απαιτεί, παρόλα αυτά, λεπτομερή γνώση του υπό εξέταση προϊόντος και ύπαρξη επαρκών αυθεντικών δεδομένων αναφοράς, απαιτεί αφενός τη δημιουργία μιας αξιόπιστης βάση δεδομένων και αφετέρου τη προσβασιμότητα στα δεδομένα



αυτά. Όταν υπάρχει μια τράπεζα δεδομένων σταθερών ισοτόπων, ένα σημαντικό ζήτημα είναι εάν η τράπεζα δεδομένων είναι διαθέσιμη για επίσημα εργαστήρια ελέγχου ή /και ιδιωτικά εργαστήρια, έτσι ώστε οι εμπλεκόμενοι φορείς να έχουν πρόσβαση σε συγκρίσιμα δεδομένα αναφοράς. Το κόστος πρόσβασης σε ιδιωτικές τράπεζες δεδομένων είναι ένα άλλο σημαντικό ζήτημα. Όταν προκύψουν συγκεκριμένες περιπτώσεις απάτης και δεν υπάρχει τράπεζα δεδομένων, μπορούν επίσης να δημιουργηθούν και να χρησιμοποιηθούν λιγότερο διευρυμένες αλλά πιο ακριβείς και επιλεκτικές βάσεις δεδομένων. Ωστόσο, σε ορισμένες χώρες μια τέτοια προσέγγιση δεν είναι αποδεκτή λόγω της έλλειψης νομικής επικύρωσης και επίσημης αναγνώρισης (Camin et al., 2017).

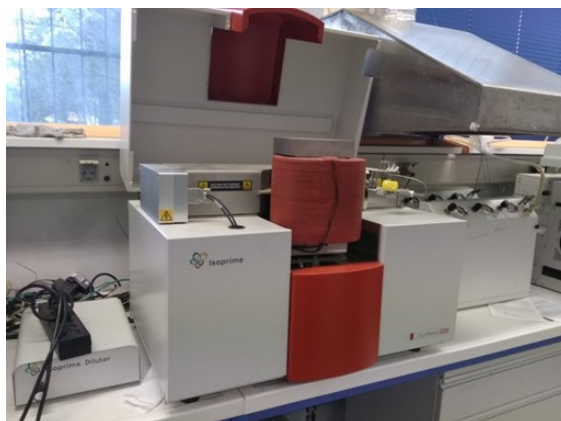
Πίνακας 5: Βάσεις Δεδομένων Σταθερών Ισοτόπων για Προϊόντα Διατροφής

Foodstuff	Detection of	Isotope ratio	Country/Year ² /Bodies ³
Fruit juice	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (sugars)	EU-CEN 1995
Fruit juice	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (sugars)	USA-AOAC 1981
Fruit juice	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (sugars and pulp)	EU-CEN 1998
Fruit juice	S	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (water)	USA-AOAC 1992
(concentrate)			
Fruit juice	S	$^2\text{H}/^1\text{H}$ (ethanol) ¹	EU, USA, CEN/AOAC 1996
Fruit juice	W	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (water)- $^2\text{H}/^1\text{H}$ (water)	EU-CEN 1995
Honey	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (honey)	USA-AOAC 1978
Honey	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (honey+protein)	USA-AOAC 1991
Wine	S	$^2\text{H}/^1\text{H}$ (ethanol) ¹	EU 1990
Wine	W	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (water)	EU 1997
Wine	S	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (ethanol)	EU 2003
Maple syrup	S	$^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (ethanol) ¹	USA-AOAC 2001

Source: Rossmann, 2001

Officially acknowledged methods for food quality control based on stable isotope ratio analysis by isotope ratio mass spectrometry = IRMS or ^2H nuclear magnetic resonance spectroscopy = ^2H -NMR. 1 = ^2H -NMR; 2 = year of official acknowledgement. S = sugar-; W = water-addition, 3=CEN = European Commission for Normalization, AOAC = Association of Official Analytical Chemists (USA).

Εικόνα 1: Το σύστημα μέτρησης EA-IRMS του εργαστήριου φυτικής Παραγωγής





4 Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα πρωτόκολλα πιστοποίησης της γεωγραφικής προέλευσης των εξεταζόμενων προϊόντων.

Στην πρώτη υπό ενότητα παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα για τα μεταποιημένα προϊόντα φυτικής προέλευσης και στην δεύτερη για μεταποιημένα προϊόντα αλιευτικής προέλευσης

4.1 Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης μεταποιημένων αγροτικών προϊόντων

Σε αυτή την υπό ενότητα παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα για τα μεταποιημένα προϊόντα φυτικής προέλευσης που συμμετείχαν στο πρόγραμμα δηλαδή την ελιά και τη σταφίδα.

4.1.1 Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων ελιάς

A) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου άνθρακα $\delta^{13}\text{C}$

Στα δείγματα ελιάς, αρχικά απομακρύνεται το κουκούτσι, κατόπιν αλέθεται με μύλο (Pulverisette 11 του οίκου Fritsch) μαζί με υγρό άζωτο στον ειδικό κάδο.

Εικόνα 2: Ο μύλος Pulverisette 11 του οίκου Fritsch





Η άλεση γίνεται με τη βοήθεια υγρού αζώτου για την παραλαβή όσο δυνατόν πιο ομοιογενούς δείγματος. 5 g του ομογενοποιημένου δείγματος τοποθετούνται σε πυριαντήριο στους 50 °C για 2 h. Το ξηρό δείγμα κονιοποιείται με γουδί και διατηρείται στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων ισοτοπικού λόγου άνθρακα ($\delta^{13}\text{C}$). (Βλέπε Παράρτημα 1).

Εικόνα 3: Το πυριαντήριο του εργαστηρίου Plantlab



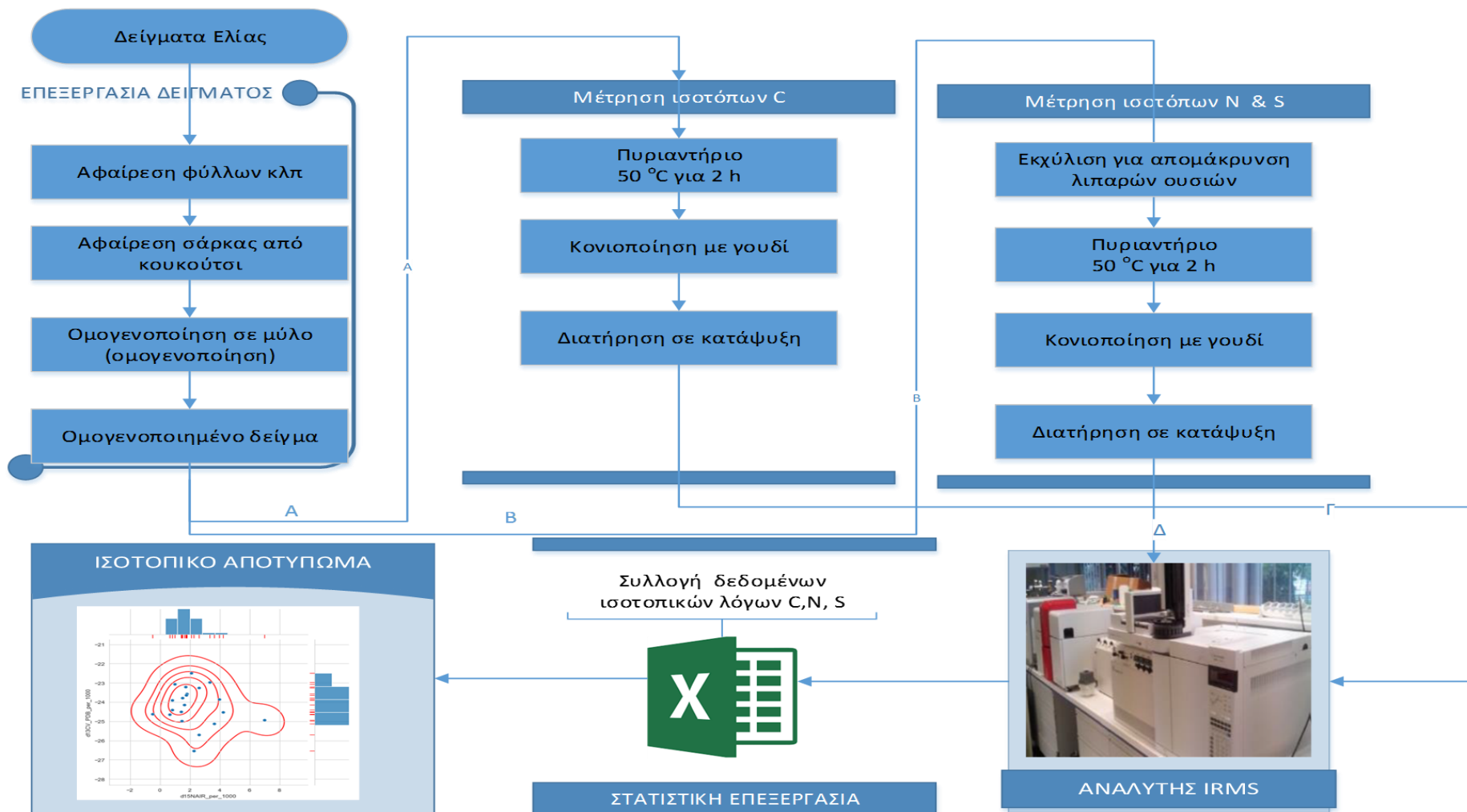
Β) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου αζώτου $\delta^{15}\text{N}$ και θείου $\delta^{32}\text{S}$

Από το αλεσμένο και ομογενοποιημένο δείγμα απομακρύνονται οι λιπαρές ουσίες με σκοπό την απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος για τον προσδιορισμό του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{32}\text{S}$) με την ακόλουθη διαδικασία.

3,5 g ομογενοποιημένου δείγματος ελιάς ζυγίζονται με χρήση ζυγού ακριβείας και φυγοκεντρούνται με την προσθήκη 25 ml χλωροφόρμιο (CHCl_3) για 15 λεπτά στις 7000 στροφές για την εκχύλιση και απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνεται το υπερκείμενο στερεό κλάσμα και τοποθετείται σε πυριαντήριο στους 50°C για 2 h. Τα ληφθέντα δείγματα διατηρούνται στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων προσδιορισμού του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{34}\text{S}$).

**Εικόνα 4:** Η συσκευή Φυγοκέντρησης

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυση IRMS και καταγράφονται τα δεδομένα των ισοτοπικών λόγων C,N,S για τα δείγματα ελιάς. Τα δείγματα ομαδοποιούνται ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση. Ακολούθως, γίνεται εκτίμηση και προσαρμογή (διαδικασία διαφόρισης) των τιμών των ισοτοπικών λόγων με βάση τις τιμές των ισοτοπικών λόγων των υλικών αναφοράς και τα τελικά αποτελέσματα συλλέγονται σε υπολογιστικά φύλλα Excel ή SPSS. Ακολουθεί η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων (πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης-MANOVA, διακριτική ανάλυση-LDA, βηματική διακριτική ανάλυση-SLDA) με σκοπό την ιχνηλάτηση της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων. Η πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης ελέγχει αρχικά εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ισοτοπικών λόγων των δειγμάτων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και στη συνέχεια η διακριτική ανάλυση/βηματική διακριτική ανάλυση κατατάσσει τα δείγματα αυτά στις ομάδες προέλευσης τους χρησιμοποιώντας τον γραμμικό συνδυασμό των ανωτέρω στατιστικά σημαντικών παραμέτρων, δημιουργώντας έτσι διαχωριστικές συναρτήσεις που ερμηνεύουν συγκεκριμένο ποσοστό (%) ορθής κατάταξης/πρόβλεψης (Miller and Miller, 2010)..



Σχήμα 3.2. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων Ελιάς.



4.1.2. Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων σταφίδας

A) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου άνθρακα $\delta^{13}\text{C}$

50g δείγματος σταφίδας μετά την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων μίσχων και άλλων ημιξυλώδων βλαστών, κρυοξηραίνονται σε θάλαμο κρυοξήρανσης (-50 βαθμοί Κελσίου) για 24 ώρες. Η κρυοξήρανση έχει ως αποτέλεσμα απώλεια υγρασίας $\approx 0,45 - 1 \%$.

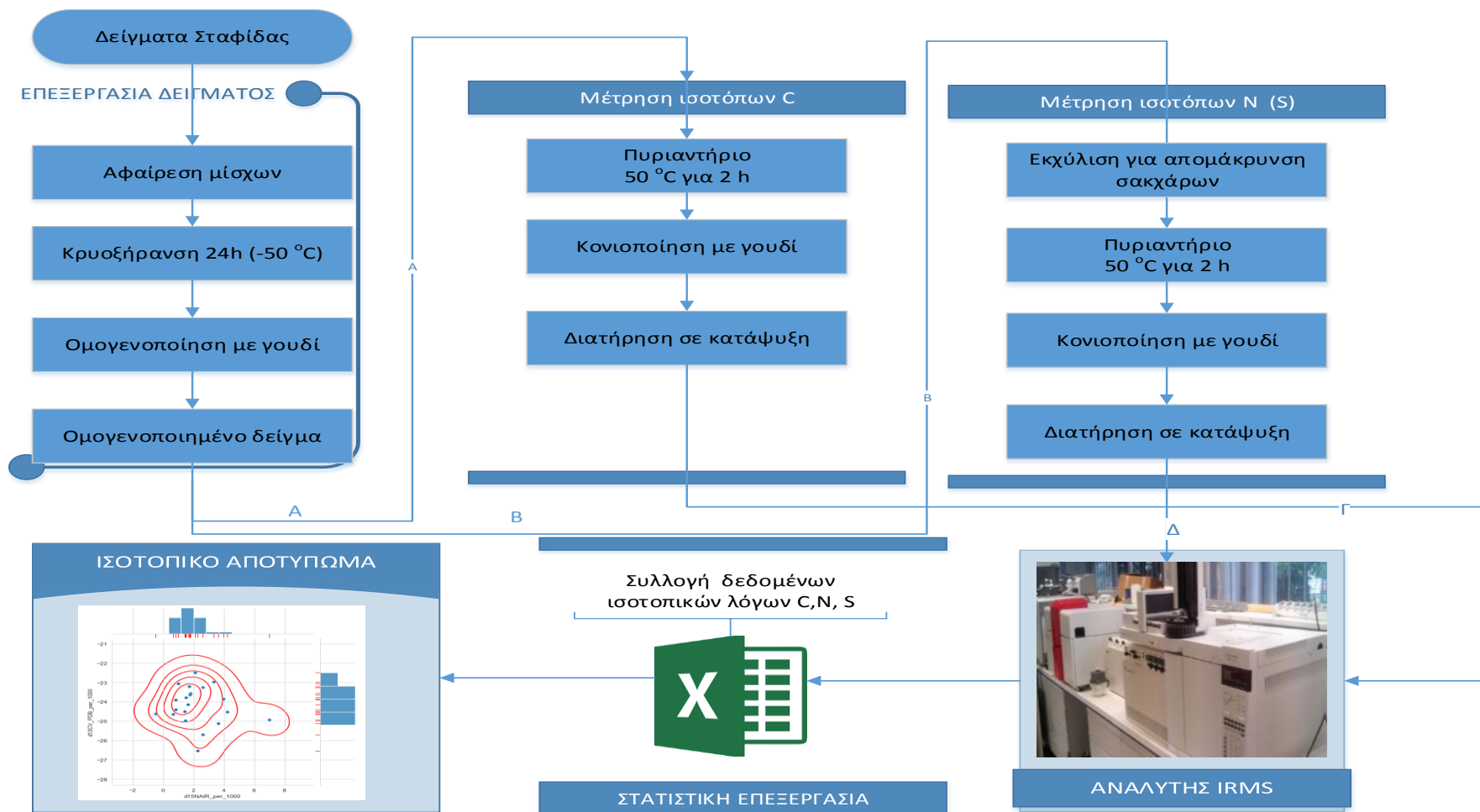
Το δείγμα στη συνέχεια ομογενοποιείται σε γουδί και τοποθετείται σε πυριαντήριο για 2 h στους 50°C (εκ νέου απώλεια υγρασίας 1 %). Το ξηρό δείγμα κονιοποιείται με γουδί και διατηρείται σε πλαστικά δοχεία Eppendorf στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων ισοτοπικού λόγου άνθρακα ($\delta^{13}\text{C}$). (Βλέπε Πίνακα 3).

B) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου αζώτου $\delta^{15}\text{N}$ και θείου $\delta^{32}\text{S}$

Από το αλεσμένο και ομογενοποιημένο δείγμα απομακρύνονται τα σάκχαρα με σκοπό την απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος για τον προσδιορισμό του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{34}\text{S}$) με την ακόλουθη διαδικασία.

3,2 g ξηρής σταφίδας ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Στο δείγμα προστίθενται 5 ml ακετόνη και 45 ml απεσταγμένο νερό και φυγοκεντρείται 15 λεπτά στις 7000 στροφές μαζί (αναλογία 6,4% w/v). Το υπερκείμενο κλάσμα (υγρό) απομακρύνεται και το στερεό υπόλειμμα τοποθετείται σε πυριαντήριο στους 50 °C για 2 ώρες. Τα δείγματα στη συνέχεια κονιοποιούνται εκ νέου με γουδί και διατηρούνται στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων προσδιορισμού του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{34}\text{S}$). (Βλέπε Παράρτημα 2).

Για την ιχνηλάτηση της γεωγραφικής προέλευσης της σταφίδας ακολουθείται παρόμοια πορεία που περιγράφεται ανωτέρω για τα δείγματα ελιάς.



Σχήμα 3.2. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων σταφίδας.



4.2. Πρωτόκολλα πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης μεταποιημένων αλιευτικών προϊόντων

4.2.1 Πρωτόκολλο πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων αυγοτάραχου

A) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου άνθρακα $\delta^{13}\text{C}$

Στο δείγμα αυγοτάραχου απομακρύνεται η εξωτερική μεμβράνη, το δείγμα αλέθεται μηχανικά με γουδί και τοποθετείται σε πυριαντήριο στους 50°C για 2h.

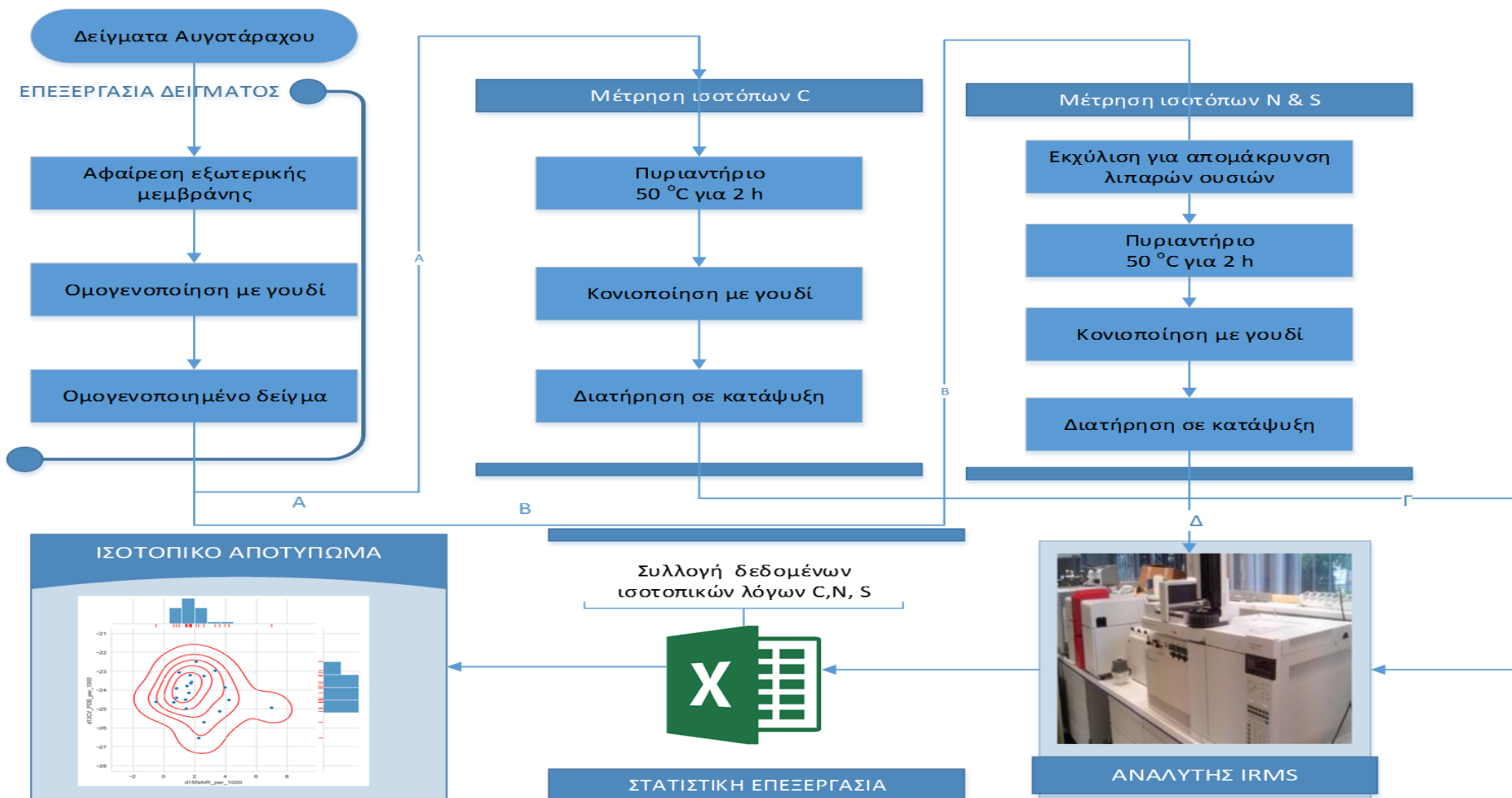
Το ξηρό δείγμα κονιοποιείται με γουδί και διατηρείται σε πλαστικά δοχεία Eppendorf στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων ισοτοπικού λόγου άνθρακα ($\delta^{13}\text{C}$). (Βλέπε Παράρτημα 3).

B) προσδιορισμός ισοτοπικού λόγου αζώτου $\delta^{15}\text{N}$ και θείου $\delta^{32}\text{S}$

Από το αλεσμένο και ομογενοποιημένο δείγμα απομακρύνονται οι λιπαρές ουσίες με σκοπό την απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος για τον προσδιορισμό του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{32}\text{S}$) με την ακόλουθη διαδικασία.

3,5 g ομογενοποιημένου δείγματος αυγοτάραχου ζυγίζονται με χρήση ζυγού ακριβείας και φυγοκεντρούνται με την προσθήκη 25 ml χλωροφόρμιο (CHCl_3) για 15 λεπτά στις 7000 στροφές για την εκχύλιση και απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνεται το υπερκείμενο στερεό κλάσμα και τοποθετείται σε πυριαντήριο στους 50°C για 2 ώρες. Τα ληφθέντα δείγματα διατηρούνται στην κατάψυξη μέχρι τη διενέργεια των μετρήσεων προσδιορισμού του ισοτοπικού λόγου αζώτου ($\delta^{15}\text{N}$) και θείου ($\delta^{32}\text{S}$).

Για την ιχνηλάτηση της γεωγραφικής προέλευσης του αυγοτάραχου ακολουθείται η πορεία που έχει ήδη περιγράψει και ανωτέρω για τα δείγματα ελιάς. Η όλη διαδικασία αποτυπώνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 3.3. Διάγραμμα ροής πρωτοκόλλου πιστοποίησης γεωγραφικής προέλευσης δειγμάτων αυγοτάραχου.



5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Brand, W. A., & Coplen, T. B. (2012). Stable isotope deltas: Tiny, yet robust signatures in nature. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 48(3), 393-409.

Camin F., M. Perini , L. Bontempo , S. Fabroni , W. Faedi , S. Magnani, G. Baruzzi , M. Bonoli ,M.R. Tabilio, S. Musmeci, A. Rossmann , S.D. Kelly, & P. Rapisarda (2011). Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry*, 125, 1072-1082.

Camin, F., Bertoldi, D., Santato, A., Bontempo, L., Perini, M., Ziller, L., Stroppa, A., & Larcher, R. (2015). Validation of methods for H, C, N and S stable isotopes and elemental analysis of cheese: Results of an international collaborative study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(5), 415-423.

Camin, F., Boner, M., Bontempo, L., Fauhl-Hassek, C., Kelly, S. D., Riedl, J., & Rossmann A. (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 176-187.

Camin, F., Wehrens, R., Bertoldi, D., Bontempo, L., Ziller, L., Perini, M., Nicolini, G., Nocetti, M., & Larcher, R. (2012). H, C, N and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. *Analytica Chimica Acta*, 711, 54-59.

DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimimica and Cosmochimica Acta*, 42, 495-506.

European Prestandard ENV 12140 (1996). Fruit and vegetable juices- Determination of the stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of sugars from fruit juices-Method using isotope ratio mass spectrometry.

European Prestandard ENV 13070 (1998). Fruit and vegetable juices- Determination of the stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of sugars from fruit juices-Method using isotope ratio mass spectrometry.

Heejoong Kim , K. Suresh Kumar, & Kyung-Hoon Shin (2015) Applicability of stable C and N isotope analysis in inferring the geographical origin and authentication of commercial fish (Mackerel, Yellow Croaker and Pollock). *Food Chemistry*, 172, 523-527.

Horn, P., Schaaf, P., Holbach, B., Hölzl, S., & Eschnauer, H. (1993). $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ from rock and soil into vine and wine. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und- Forschung*, 196, 407–409.

Kolesnov Alexander and Natalya Agafonova (2016). Grapes from the geographical areas of the Black Sea: Agroclimatic growing conditions and evaluation of stable isotopes



compositions in scientific study. BIO Web of Conferences, 7, World Congress of Vine and Wine.

Longobardi Francesco, Grazia Casiello, Valentina Centonze, Lucia Catuccia, & Angela Agostiano (2017). Isotope ratio mass spectrometry in combination with chemometrics for characterization of geographical origin and agronomic practices of table grape. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3173–3180.

Mahne Opatić, A., Nečemer, M., Lojen, S.; & Vidrih, R. (2017). Stable isotope ratio and elemental composition parameters in combination with discriminant analysis classification model to assign country of origin to commercial vegetables—A preliminary study. *Food Control*, 80, 252–258.

Manca G, Franco MA, Versini G, Camin F, Rossmann A, & Tola A, (2006). Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cows' milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 831–839.

Miller JN, & Miller JC (2010) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th edition, Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, Harlow, Essex CM20 2JE, England.

Perini M., L. Giongo, M. Grisenti, L. Bontempo, & F. Camin (2018). Stable isotope ratio analysis of different European raspberries, blackberries, blueberries, currants and strawberries. *Food Chemistry*, 239, 48-55.

Rossmann, A. (2001). Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*, 17(3), 347-381.

Rossmann, A. (2007) Proceedings of the international workshop “Fingerprinting methods for the identification of timber origins”, October 8-9 2007, Bonn/Germany.

Schimmelmann, Arndt; Qi, Haiping; Coplen, Tyler B.; Brand, Willi A.; Fong, Jon; Meier-Augenstein, Wolfram; Kemp, Helen F.; Toman, Blaza; Ackermann, Annika (2016). "Organic Reference Materials for Hydrogen, Carbon, and Nitrogen Stable Isotope-Ratio Measurements: Caffeines, n-Alkanes, Fatty Acid Methyl Esters, Glycines, l-Valines, Polyethylenes, and Oils". *Analytical Chemistry*. 88 (8): 4294–4302. doi:10.1021/acs.analchem.5b04392. ISSN 0003-2700. PMID 26974360



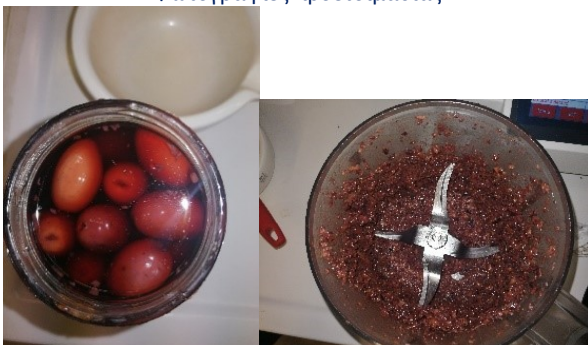
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ



Παράρτημα 1: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Ελιάς

Κωδικός	Είδος	Περιοχή	Επεξεργασία δείγματος
1	Ελιές	Παναιτώλιο Αιτωλ/νίας	Διαχωρισμός: Σάρκα από κουκούτσι Ομογενοποίηση (μύλος Pulverisette 11 του οίκου Fritsch), Εκχύλιση δείγματος με CHCl_3 , Φυγοκέντρηση Ξήρανση: 50 °C, 2 ώρες

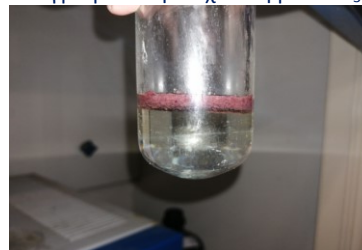
Φωτογραφίες προετοιμασίας



Δείγμα μετά την χρήση υγρού αζώτου και μύλου



Δείγμα μετά την εκχύλιση με CHCl_3





Παράρτημα 2: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Σταφίδας

Κωδικός δείγματος	Είδος	Περιοχή	Επεξεργασία δείγματος
3	Σταφίδες	Κορινθίας	Διαχωρισμός: καρπός-ημιξυλώδη βλαστοί Κρυοξήρανση, Ομογενοποίηση σε γουδί, Εκχύλιση δείγματος με μίγμα νερό-ακετόνη, Φυγοκέντρηση Ξήρανση: 50 °C, 2 ώρες

Φωτογραφίες προετοιμασίας

Διαχωρισμός σταφίδας από ημιξυλώδεις βλαστούς



Τελικό δείγμα κατά την εκχύλιση μετά τη
φυγοκέντρηση

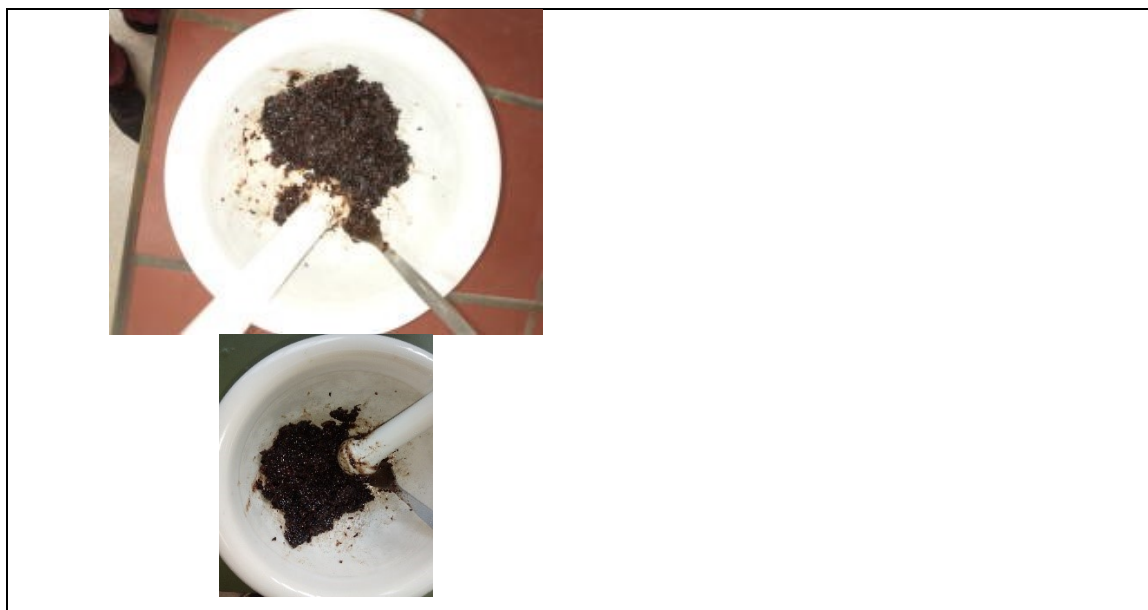
Ομογενοποίηση μετά το πέρας της κρυοξήρανσης





Trust Trace

Πρωτόκολλα Πιστοποίησης Γεωγραφικής Προέλευσης Μεταποιημένων Αγροτικών Προϊόντων





Παράρτημα 3: Περιγραφή προετοιμασίας δειγμάτων Αυγοτάραχου

Κωδικός
δείγματος

Είδος

Περιοχή

Επεξεργασία δείγματος

2

Αυγοτάραχο

Μεσολόγγι

Διαχωρισμός: Απομάκρυνση εξωτερικής μεμβράνης
Ομογενοποίηση (γουδί), Εκχύλιση δείγματος με CHCl_3 , Φυγοκέντρηση
Ξήρανση: 50°C , 2 ώρες

Φωτογραφίες προετοιμασίας

Απομάκρυνση εξωτερικής μεμβράνης

Ομογενοποίηση



Εκχύλιση δείγματος με CHCl_3 Τελικό δείγμα κονιοποιημένου αυγοτάραχου προς ανάλυση

