ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΣΕ ΜΕΛΙ ΖΑΧΑΡΗ ΚΑΙ ΡΟΥΜΙ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΛΟΓΟΥ ΙΣΟΤΟΠΩΝ (IRMS)

ΒΟΓΙΑΤΖΗΔΑΚΗ Ζ.[1,2], ΖΟΥΛΗΣ Ν.[2], ΜΠΟΛΚΑΣ Σ.[2], ΘΩΜΑΪΔΗΣ Ν.[1]
[1] Ε.Κ.Π.Α., ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥΠΟΛΗ ΖΩΓΡΑΦΟΥ, 15771 ΑΘΗΝΑ
[2]Γ.Χ.Κ., Δ΄ Χ. Υ. ΑΘΗΝΩΝ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΛΚΟΛΟΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ, ΖΑΧΑΡΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΙΟΥ, ΑΝ. ΤΣΟΧΑ 16 , ΑΘΗΝΑ
e-mail:ntho@chem.uoa.gr

Περίληψη
Στα πλαίσια της αξιολόγησης των μεθόδων ανίχνευσης νοθείας σε μέλι, ζάχαρη και αλκοολούχα ποτά (ρούμι) με φασματομετρία μαζών λόγου ισοτόπων (IRMS) πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αβεβαιότητας του τελικού αποτελέσματος. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα ($U_{\sigma\chi}$) λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα στατιστικά δεδομένα από τη διαδικασία επικύρωσης των μεθόδων όσο και πιθανές πηγές αβεβαιότητας τύπου Β και αξιολογήθηκαν οι σχετικές συνεισφορές των πηγών για κάθε μέθοδο.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας σε δείγματα ζάχαρης χρησιμοποιήθηκαν τρία επίπεδα τιμών $\delta^{13}C$ (‰): -26,03 (ζάχαρη από ζαχαρότευτλα), -11,64 (ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο) και -18,84 (μίγμα ζάχαρης). Σε κάθε επίπεδο τιμών η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα είναι αντίστοιχα: 1,85%, 2,34% και 1,58%. Η επικύρωση της μεθόδου ανίχνευσης της νοθείας σε αλκοολούχα ποτά πραγματοποιήθηκε σε τιμές $\delta^{13}C$ (‰): -26,91 και -10,76. Στην πρώτη περίπτωση η $U_{\sigma\chi}$ είναι 3,63 % ενώ στη δεύτερη 4,98%. Για την αξιολόγηση της μεθόδου ανίχνευσης νοθείας σε δείγματα μελιού τα οποία θεωρούνται ότι δεν έχουν νοθευτεί με ισογλυκόζη, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο υλικό αναφοράς με $\delta^{13}C$: -26,91‰. Η $U_{\sigma\chi}$ είναι 1,43%. Αντίστοιχα, σε νοθευμένα δείγματα μελιού, όπου απαιτείται απομόνωση των πρωτεϊνών αυτού και χρήση της μεθόδου εσωτερικού προτύπου, η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα είναι 4,4%.

Λέξεις-Κλειδιά: αβεβαιότητα, IRMS, ισοτοπική ανάλυση, $^{13}C/^{12}$, τρόφιμα, νοθεία

1. Εισαγωγή

Η μέτρηση της φυσικής αφθονίας των ισοτόπων χρησιμοποιείται στον τομέα του ελέγχου της νοθείας και της προστασίας του καταναλωτή, αφού η μέτρηση των ισοτοπικών λόγων ενός προϊόντος συχνά οδηγεί στο χαρακτηρισμό της προέλευσης του αρχικού υλικού. Η ισοτοπική κλασμάτωση των στοιχείων του περιβάλλοντος ακολουθεί πολύπλοκες διεργασίες οι οποίες επιτρέπουν το συσχετισμό μεταξύ τελικού προϊόντος (π.χ. μέλι) και πρώτων υλών (H_2O και CO_2) από τις οποίες έχει συντεθεί.

Κατά τη φωτοσύνθεση, η αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα από τα φυτά γίνεται σύμφωνα με δύο βασικούς τύπους μεταβολισμού που είναι οι μεταβολισμοί C-3 (κύκλος Calvin) και C-4 (Hatch και Slack). Οι δύο αυτοί μηχανισμοί φωτοσύνθεσης παρουσιάζουν διαφορετική ισοτοπική κλασμάτωση. Έτσι, τα προϊόντα που προέρχονται από φυτά C-4 παρουσιάζουν περιεκτικότητες σε ^{13}C υψηλότερες από εκείνες των ομολόγων τους που προέρχονται από φυτά C-3. Τα περισσότερα φυτά, μεταξύ αυτών το αμπέλι και τα ζαχαρότευτλα, ανήκουν στην ομάδα C-3. Το ζαχαροκάλαμο και ο αραβόσιτος ανήκουν στην ομάδα C-4.

Η περιεκτικότητα σε ^{13}C προσδιορίζεται από το διοξείδιο του άνθρακα που προκύπτει από την πλήρη καύση του δείγματος. Οι συγκεντρώσεις των κύριων ισοτοπομερών με μάζες 44 ($^{12}C^{16}O_2$), 45 ($^{13}C^{16}O_2$ και $^{12}C^{17}O^{16}O$) και 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$), που προκύπτουν από τους διάφορους δυνατούς συνδυασμούς των ισοτόπων ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O, ^{13}C και ^{12}C, προσδιορίζονται από τα ιονικά ρεύματα που μετρώνται σε τρεις διαφορετικούς συλλεκτήρες φασματομέτρου ισοτοπικής μάζας [1-3].

2. Μεθοδολογία

2.1 Πορεία προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα ζάχαρης

Η μέθοδος ανίχνευσης της νοθείας σε ζάχαρη με φασματομετρία μαζών λόγου ισοτόπων, βασίζεται στο γεγονός ότι οι δύο κύριες πηγές σακχαρόζης ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες φυτών. Συγκεκριμένα, τα ζαχαρότευτλα ανήκουν στην ομάδα των C-3 φυτών, συνεπώς η παραγόμενη ζάχαρη θα έχει τιμή $\delta^{13}C$ κοντά στο -24 ‰. Αντίστοιχα, το ζαχαροκάλαμο ανήκει στην ομάδα των C-4 φυτών και η ζάχαρη που παράγεται από αυτό εμφανίζει τιμή $\delta^{13}C$ κοντά στο -10‰.

Λαμβάνεται ποσότητα δείγματος από 0,370 έως 0,430 mg, ώστε το παραγόμενο ρεύμα στο IRMS να είναι 6-8 nA, στο μέσο της περιοχής καλής λειτουργίας του οργάνου. Κάθε δείγμα αναλύεται εις τριπλούν.

Από την ανάλυση των δειγμάτων λαμβάνεται η τιμή $\delta^{13}C$ (‰) αυτών η οποία μας επιτρέπει να διακρίνουμε τη ζάχαρη από ζαχαρότευτλα και τη ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο. Ωστόσο, υπάρχει το ενδεχόμενο, η τιμή $\delta^{13}C$ να είναι ενδιάμεση των τιμών -10‰ και -24‰. Σ' αυτήν την περίπτωση κρίνεται απαραίτητη η χρήση καμπύλης αναφοράς, για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιούνται ανακρυσταλλωμένα μίγματα ζάχαρης.

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς για τη ζάχαρη

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα υλικά αναφοράς R005 και R006. Το R005 είναι ζάχαρη από τεύτλα (τύπος C-3) με πιστοποιημένη τιμή αναφοράς (-26,03±0,11)‰ ενώ το R006 είναι ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο (τύπος C-4) με πιστοποιημένη τιμή αναφοράς (-11,64±0,03)‰. Από τα παραπάνω πρότυπα υλικά αναφοράς παρασκευάστηκαν πέντε μίγματα ζάχαρης στα οποία η αναλογία ζάχαρης από τεύτλα και ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο ήταν 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 και 100/0, αντίστοιχα. Σε κάθε μίγμα προστέθηκαν 2-3 ml αποσταγμένο νερό, ώστε να διαλυτοποιηθεί η ζάχαρη και να εξασφαλιστεί ομοιογένεια του μίγματος. Τα μίγματα εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 65°C υπό κενό για 2 ώρες, ώστε να εξατμιστεί η περιεχόμενη ποσότητα νερού. Τα παραχθέντα ανακρυσταλλωμένα μίγματα ζάχαρης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν δείγματα με τρία διαφορετικά επίπεδα τιμών $\delta^{13}C$. Τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε επίπεδο είναι τα εξής:

- R005 με πιστοποιημένη τιμή αναφοράς (-26,03±0,11)‰ από την Iso Analytical
- R006 με πιστοποιημένη τιμή αναφοράς (-11,64±0,03)‰ από την Iso Analytical
- Ανακρυσταλλωμένο μίγμα ζάχαρης που παρασκευάστηκε με ανάμιξη των R005, και R006 σε αναλογία 1:1. Η τιμή αναφοράς για το μίγμα είναι (-18,835±0,082)‰.

Ο ισοτοπικός λόγος του άνθρακα για το μίγμα ($\delta^{13}C$‰), προκύπτει από το ημιάθροισμα των τιμών για τα R005 και R006 και είναι $\delta^{13}C$: -18,835‰.

2.2 Πορεία προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα αλκοολούχων ποτών

Ο ισοτοπικός λόγος του άνθρακα για τα αλκοολούχα ποτά εξαρτάται από την πρώτη ύλη παρασκευής τους και τη φωτοσυνθετική οδό που αυτή ακολουθεί. Τα αλκοολούχα ποτά που προέρχονται από C-3 φυτά παρουσιάζουν τιμές $\delta^{13}C$ από -24‰ έως -27‰. Αντίστοιχα, σε ποτά όπως το ρούμι, που προέρχονται από C-4 φυτά, η τιμή $\delta^{13}C$ είναι μεταξύ -10‰ και -13‰. Από την ανάλυση των δειγμάτων λαμβάνεται η τιμή $\delta^{13}C$ (‰) αυτών, η οποία μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε ένα ποτό ως προς την προέλευσή του. Επίσης, ο προσδιορισμός λοιπόν του ισοτοπικού λόγου του άνθρακα σε ένα δείγμα ποτού επιτρέπει την ανίχνευση προσθήκης σακχάρων τα οποία δεν ορίζονται από τους αντίστοιχους Κανονισμούς.

Το προς ανάλυση δείγμα λαμβάνεται με τη βοήθεια σύριγγας και τοποθετείται σε καψίδιο, στο οποίο έχει επιστρωθεί Chromosorb W ώστε να αποφευχθεί εξάτμιση αυτού. Η ποσότητα που λαμβάνεται εξαρτάται από τον αλκοολικό βαθμό του δείγματος. Για αλκοόλη 96 % κ.ό λαμβάνονται με σύριγγα 0,5-1 μl, ενώ για ρούμι και άλλα ποτά με περιεκτικότητα 40 % κ.ό σε αλκοόλη λαμβάνονται 2-3 μl, ώστε το παραγόμενο ρεύμα στο IRMS να κυμαίνεται μεταξύ 6-8 nA. Κάθε δείγμα αναλύεται εις τριπλούν.

Στην περίπτωση που η τιμή $\delta^{13}C$ του δείγματος είναι ενδιάμεση των προαναφερόμενων τιμών, απαιτείται η χρήση πρότυπης καμπύλης.

Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν δείγματα με δύο διαφορετικά επίπεδα τιμών $\delta^{13}C$. Τα πρότυπα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε επίπεδο είναι τα εξής:

- BCR 657 (γλυκόζη) με πιστοποιημένη τιμή $\delta^{13}C$: (-10,76 ± 0,04)‰ από το IRMM
- BCR 656 (αιθανόλη 96%) με πιστοποιημένη τιμή $\delta^{13}C$: (-26,91 ± 0,07)‰ από το IRMM

2.3 Πορεία προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα μελιών

Η ανίχνευση της προσθήκης σακχάρων στο μέλι, προερχόμενα από C-4 φυτά, βασίζεται στη διαφορά του ισοτοπικού λόγου των σακχάρων των φυτών C-3 και C-4. Τα περισσότερα μελισσοκομικά φυτά είναι τύπου C-3 με $\delta^{13}C$ από -30 έως -24‰ ενώ η ισογλυκόζη προέρχεται από καλαμπόκι και εμφανίζει $\delta^{13}C$ κοντά στο -10‰. Η νοθεία του μελιού με την προσθήκη ισογλυκόζης συντελεί στην αύξηση των τιμών $\delta^{13}C$ και μπορεί να ανιχνευτεί με IRMS [4-7].

Τα δείγματα μελιού, λόγω του πολύ μικρού βάρους τους, τοποθετούνται στο καψίδιο με τη βοήθεια κεφαλιού καρφίτσας και ζυγίζονται. Το βάρος των δειγμάτων κυμαίνεται από 0,370 έως 0,430 mg. Ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων και λαμβάνεται η τιμή $\delta^{13}C$. Όταν η τιμή αυτή είναι μικρότερη από -24 ‰ θεωρείται ότι το δείγμα δεν έχει νοθευτεί με ισογλυκόζη. Όταν είναι μεγαλύτερη απαιτείται διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών του μελιού (μέθοδος εσωτερικού προτύπου) και σύγκριση της ευρεθείσας τιμής του $\delta^{13}C$ του μελιού με αυτής του $\delta^{13}C$ των πρωτεϊνών του για εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την ύπαρξη νοθείας καθώς και για το ποσοστό αυτής.

Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με το πρότυπο υλικό αναφοράς BCR 656 (αιθανόλη 96%) με πιστοποιημένη τιμή $\delta^{13}C$: (-26,91 ± 0,07)‰.

2.4 Πορεία προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα μελιών με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου

Η χρησιμοποίηση της διαφοράς του ισοτοπικού λόγου του άνθρακα του μελιού και του πρωτεϊνικού κλάσματος αυτού, επιτρέπει την αντικειμενική αξιολόγηση πιθανής νοθείας του μελιού με μικρά (7-20%) καθώς και μεγαλύτερα ποσά ζαχαροκάλαμου. Διαφορά της τάξης του -1‰ ή μικρότερη (κατ' απόλυτη τιμή, μεγαλύτερη) ανάμεσα στο μέλι και τις πρωτεΐνες αυτού αποτελεί ένδειξη νοθείας.

Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα προερχόμενα από C-4 φυτά υπολογίζεται με βάση τον εξής τύπο:

$$\% \text{ C-4 σάκχαρα} = \frac{\delta^{13}C_P - \delta^{13}C_H}{\delta^{13}C_P - \delta^{13}C_{isog}} \times 100 \qquad (1)$$

όπου $\delta^{13}C_p$, $\delta^{13}C_{isog}$ και $\delta^{13}C_H$ είναι οι τιμές του $\delta^{13}C$ (‰) για τις πρωτεΐνες, την ισογλυκόζη και το μέλι, αντίστοιχα.

Για τη διαδικασία απομόνωσης και καταβύθισης των πρωτεϊνών του μελιού εφαρμόζεται η παρακάτω διαδικασία:

Ζυγίζονται 11±1 g μελιού σε σωλήνα φυγοκέντρισης, προστίθενται 4±0,5 ml νερό με κύλινδρο, διαλυτοποιείται το μέλι και το διάλυμα τοποθετείται για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80±2 °C. Στη συνέχεια προστίθενται με σιφώνιο 2 ml διαλύματος H_2SO_4 και 2 ml διαλύματος Na_2WO_4 σε δοκιμαστικό σωλήνα, το διάλυμα αναμιγνύεται καλά και προστίθεται αμέσως στο διάλυμα του μελιού. Ο σωλήνας φυγοκέντρισης τοποθετείται στο υδατόλουτρο και κατά διαστήματα ανακινείται ελαφρά μέχρι να σχηματιστούν ορατά ιζήματα. Προστίθενται ακόμη 2 ml H_2SO_4 και συνεχίζεται η θέρμανση για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται νερό στο σωλήνα φυγοκέντρισης μέχρι τα 40 ml και ακολουθεί φυγοκέντριση για 5±1min στις 1500 στροφές/min. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθεται νερό (40 ml) και το διάλυμα φυγοκεντρείται ξανά. Συνολικά γίνονται 5 αποχύσεις-φυγοκεντρίσεις. Μετά την τελευταία απόχυση συλλέγεται το ίζημα με σταγονόμετρο και αφού τοποθετηθεί σε γυάλινη κάψα εισάγεται σε φούρνο θερμοκρασίας 60 ± 2°C για 50 min ή όσο απαιτείται περαιτέρω για να εξατμιστεί όλο το περιεχόμενο νερό [8,9].

Σχεδιασμός επικύρωσης μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με δοκιμή ανάκτησης σε εμβολιασμένα δείγματα μελιού. Για τον υπολογισμό της ανάκτησης προετοιμάστηκαν και εκτελέστηκαν πειράματα κατά τα οποία σε δείγματα μελιού χαμηλής και ενδιάμεσης περιεκτικότητας σε C-4 σάκχαρα, εφαρμόστηκε ολόκληρη η προετοιμασία του δείγματος και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την «αληθή» περιεκτικότητα. Συγκεκριμένα, σε δείγμα μελιού με $\delta^{13}C$ -24,46‰, προστέθηκε 9% κ.β και 25% κ.β ισογλυκόζη. Τα παραπάνω δείγματα αναλύθηκαν ως προς τον περιεχόμενο άνθρακα και υπολογίστηκε η % περιεκτικότητα σε C-4 σάκχαρα.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αβεβαιότητα προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα ζάχαρης

Στην περίπτωση ανάλυσης δειγμάτων ζάχαρης, οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος είναι:

- το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου που εκτιμάται από την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (RSD_R)
- η αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου (u_{bias})
- η αβεβαιότητα από τη χρησιμοποιούμενη καμπύλη αναφοράς (u_{co}), όταν η χρήση της κρίνεται απαραίτητη και
- η αβεβαιότητα της μάζας που οφείλεται στο χρησιμοποιούμενο ζυγό (u_m)

Έτσι, για τιμές $\delta^{13}C$ ενδιάμεσες των τιμών -10‰ και -24‰, όπου απαιτείται η χρήση καμπύλης αναφοράς, η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{u_c}{\delta^{13}C_{CRM}} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13}C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_{co}}{c_o}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \qquad (2)$$

Με αντικατάσταση των τιμών του Πίνακα 1 στην εξίσωση 2 προκύπτει ότι η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα u_c είναι 0,149‰.

Πίνακας 1. Παράμετροι υπολογισμού αβεβαιότητας για δείγματα ζάχαρης με $\delta^{13}C$:-18,84‰.

ΠΗΓΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	***Ux/x***
Αβεβαιότητα από τα τυχαία σφάλματα της μεθόδου	0,0059
Αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου	0,0018
Αβεβαιότητα από τη χρησιμοποιούμενη καμπύλη αναφοράς	0,0029
Αβεβαιότητα από τη μέτρηση της μάζας	0,004

Η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα U προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση και είναι:

$$U = k \times u_c \qquad (3)$$

όπου k ο συντελεστής κάλυψης.

Σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ο συντελεστής κάλυψης είναι περίπου ίσος με 2 και η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα U είναι ίση με 0,298‰. Συνεπώς η τιμή $\delta^{13}C$ του δείγματος είναι: (-18,84 ± 0,30)‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα δίνεται από τη σχέση 4 και για $\delta^{13}C$: -18,84‰ είναι **1,58%**.

$$U_{\sigma\chi} = \frac{U}{\delta^{13}C} \times 100 \qquad (4)$$

Για δείγματα ζάχαρης με $\delta^{13}C$: -10‰ και $\delta^{13}C$: -24‰, στα οποία δε γίνεται εφαρμογή της καμπύλης αναφοράς, η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα δίνεται από τη σχέση 5:

$$\frac{u_c}{\delta^{13}C_{CRM}} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13}C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \qquad (5)$$

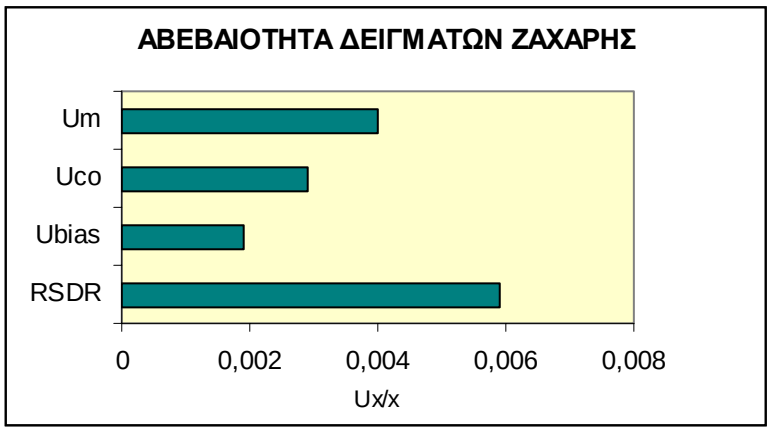
Η παραπάνω σχέση εφαρμόζεται και στα δύο επίπεδα τιμών $\delta^{13}C$. Οι παράμετροι υπολογισμού της συνδυασμένης σχετικής τυπικής αβεβαιότητας για κάθε επίπεδο δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Παράμετροι υπολογισμού αβεβαιότητας για δείγματα ζάχαρης με $\delta^{13}C$:-11,64‰ και -26,03‰ αντίστοιχα.

ΠΗΓΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	***Ux/x***	
Αβεβαιότητα από τα τυχαία σφάλματα της μεθόδου	0,0107	0,0076
Αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου για	0,0025	0,0034
Αβεβαιότητα από τη μέτρηση της μάζας	0,004	

Για δ^{13}C:-11,64‰ η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι 0,136‰ ενώ η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα U είναι ίση με 0,272‰. Συνεπώς η τιμή δ^{13}C του δείγματος είναι: (-11,64 ± 0,27)‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα για δ^{13}C:-11,64‰ είναι **2,34%**. Αντίστοιχα, για δ^{13}C:-26,03‰ η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι 0,24 ‰ ενώ η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα είναι ίση με 0,48‰. Συνεπώς η τιμή δ^{13}C του δείγματος είναι: (-26,03 ± 0,48)‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα για δ^{13}C:-26,03‰ είναι **1,85%**.

Η σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα αποδίδεται διαγραμματικά στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα.

Από την εκτίμηση της σχετικής διευρυμένης αβεβαιότητας για τα δείγματα ζάχαρης, σε κάθε επίπεδο τιμών, είναι φανερό ότι αυτή κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ο συνυπολογισμός της αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα, επιτρέπει το χαρακτηρισμό ενός δείγματος χωρίς ιδιαίτερη αμφιβολία. Ακόμη και στην περίπτωση που η τιμή ενός δείγματος δεν επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ ζαχαροκάλαμου ή ζαχαρότευτλου και μίγματος αυτών, εφαρμόζεται καμπύλη αναφοράς και προσδιορίζεται η εκατοστιαία σύστασή του.

3.2 Αβεβαιότητα προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα αλκοολούχων ποτών

Όσον αφορά στα δείγματα αλκοολούχων ποτών, η αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος υπολογίζεται σε δύο επίπεδα τιμών. Σ' αυτήν συνεισφέρουν:

- το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου που εκτιμάται από την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (RSD_R)
- η αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου (u_{bias})
- η αβεβαιότητα από τη μέτρηση του όγκου με τη σύριγγα (u_v)

Συνεπώς η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα για κάθε επίπεδο τιμών δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{u_c}{\delta^{13}C_{CRM}} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13}C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_v}{V}\right)^2} \qquad (6)$$

Στον Πίνακα 3 περιέχονται όλες οι παράμετροι υπολογισμού της συνδυασμένης αβεβαιότητας και για τα δύο επίπεδα τιμών.

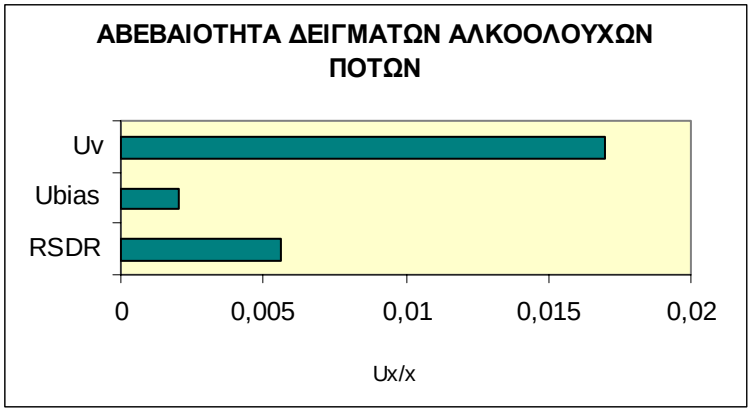
Πίνακας 3. Παράμετροι υπολογισμού αβεβαιότητας για δείγματα αλκοολούχων ποτών σε δύο επίπεδα ($\delta^{13}C$:-10,76‰ και -26,91‰).

ΠΗΓΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	***Ux/x***	
Αβεβαιότητα από τα τυχαία σφάλματα της μεθόδου	0,0177	0,0056
Αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου για	0,0037	0,0002
Αβεβαιότητα από τη μέτρηση της μάζας	0,017	

Με αντικατάσταση των τιμών του Πίνακα 3 στην εξίσωση 6 προκύπτει ότι η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα για $\delta^{13}C$:-10,76‰ είναι 0,268‰ και η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα είναι ίση με 0,536‰. Συνεπώς η τιμή $\delta^{13}C$ του δείγματος είναι: (-10,76 ±0,54) ‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα για $\delta^{13}C$:-10,76‰ είναι **4,98%**.

Για δείγματα αλκοολούχων ποτών με $\delta^{13}C$:-26,91‰ η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι 0,488 ‰ ενώ η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα είναι ίση με 0,977 ‰. Άρα για το εν λόγω δείγμα το τελικό αποτέλεσμα της μέτρησης είναι: (-26,91 ± 0,98) ‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα για $\delta^{13}C$:-26,91‰ είναι **3,63%**.

Η σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα εικονίζεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 2. Σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα για την εκτίμηση της αβεβαιότητας, προκύπτει ότι ένα δείγμα ποτού μπορεί να χαρακτηριστεί ως προς την προέλευση με μεγάλη ακρίβεια, εκτός από αυτά που εμφανίζουν τιμή $\delta^{13}C$ κοντά στο -13‰ και στο -24‰. Το τελικό αποτέλεσμα για ένα δείγμα με $\delta^{13}C$:-13‰ θα είναι (-13,00 ± 0,65)‰ με αποτέλεσμα η μέτρηση να μην εμπίπτει στο αποδεκτό εύρος τιμών για τα ποτά από ζαχαροκάλαμο (-10‰ έως -13‰). Αντίστοιχα, για $\delta^{13}C$:-24‰ το τελικό αποτέλεσμα θα είναι (-24,00 ± 0,87)‰, ενώ το εύρος τιμών για ποτά από ζαχαρότευτλα είναι -24‰ έως -27‰. Σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη περαιτέρω εξέταση του δείγματος και χρήση καμπύλης αναφοράς για τον ακριβή χαρακτηρισμό του.

3.3 Αβεβαιότητα προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα μελιού

Όσον αφορά στα δείγματα μελιού που εμφανίζουν τιμές $\delta^{13}C$ < -24‰, οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος είναι:
- το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου που εκτιμάται από την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (RSD_R)
- η αβεβαιότητα από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου (u_{bias})
- η αβεβαιότητα της μάζας που οφείλεται στο χρησιμοποιούμενο ζυγό (u_m)

Η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα δίνεται από την εξής σχέση:

$$\frac{u_c}{\delta^{13}C_{CRM}} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13}C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \qquad (7)$$

Από την εφαρμογή της σχέσης 7 σε επίπεδο τιμών δ^{13}C:-26,91‰ προκύπτει ότι η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι 0,193‰ και η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα 0,386‰. Συνεπώς για ένα δείγμα μελιού το οποίο δεν έχει νοθευτεί με ισογλυκόζη, το αποτέλεσμα της μέτρησης θα είναι τελικά (δ^{13}C ± 0, 386) ‰. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα για δ^{13}C:-26,91‰ είναι **1,43%**. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι στην περίπτωση που η τιμή δ^{13}C ενός δείγματος βρίσκεται στο όριο για τον χαρακτηρισμό αυτού ως μη νοθευμένο, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι (-24,00 ± 0,34)‰. Συνεπώς το εν λόγω δείγμα είναι «ύποπτο» για νοθεία και υποβάλλεται σε περαιτέρω ανάλυση με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου.

3.4 Αβεβαιότητα προσδιορισμού νοθείας σε δείγματα μελιού με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου

Η αβεβαιότητα του αποτελέσματος για την περιεκτικότητα σε C-4 σάκχαρα, που προκύπτει από την εφαρμογή της μεθόδου του εσωτερικού προτύπου, καθορίζεται από τους εξής παράγοντες:

- Αβεβαιότητα των αναλυθέντων δειγμάτων πρωτεϊνών μελιού
- Αβεβαιότητα των αναλυθέντων δειγμάτων μελιού και
- Αβεβαιότητα των αναλυθέντων δειγμάτων ισογλυκόζης

Με βάση το νόμο διάδοσης των σφαλμάτων, η τελική συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα του αποτελέσματος θα δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{u_{c-4}}{\%C_{-4}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\delta p}}{\delta^{13}C_p}\right)^2 + \left(\frac{u_{\delta H}}{\delta^{13}C_H}\right)^2 + \left(\frac{u_{\delta i}}{\delta^{13}C_i}\right)^2} \qquad (8)$$

όπου: $u_{\delta p}$, $u_{\delta H}$, $u_{\delta i}$ οι αβεβαιότητες για το αποτέλεσμα της μέτρησης του περιεχόμενου ^{13}C των πρωτεϊνών, του μελιού και της ισογλυκόζης, αντίστοιχα.

Η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα του αποτελέσματος για τα δείγματα μελιού υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 9, σε επίπεδο τιμών δ^{13}C:-18,835‰.

$$\frac{u_{\delta H}}{\delta^{13}C_H} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13}C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \qquad (9)$$

Αντίστοιχα, η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα του αποτελέσματος για τα δείγματα ισογλυκόζης υπολογίζεται από την εξίσωση 9, σε επίπεδο τιμών δ^{13}C:-10,76‰. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών του μελιού, οι οποίες έχουν απομονωθεί με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, στον υπολογισμό της συνδυασμένης σχετικής τυπικής αβεβαιότητας συμπεριλαμβάνεται και το συστηματικό σφάλμα που προκύπτει από τη δοκιμή ανάκτησης της μεθόδου (u_{rec}). Η αβεβαιότητα που οφείλεται στη δοκιμή ανάκτησης της μεθόδου, u_{rec}, υπολογίστηκε σε 0,0068.

Η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα για τα δείγματα πρωτεϊνών μελιού δίνεται τελικά από την εξίσωση 10 η οποία εφαρμόζεται σε επίπεδο δ^{13}C:-26,91‰.

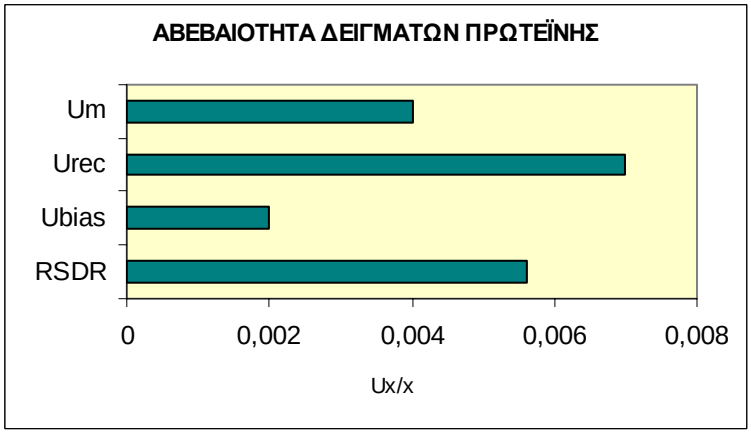
$$\frac{u_{\delta p}}{\delta^{13} C_p} = \sqrt{RSD_R^2 + \left(\frac{u_{bias}}{\delta^{13} C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{u_{rec}}{c_{rec}}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \qquad (10)$$

Με αντικατάσταση των σχετικών αβεβαιοτήτων του Πίνακα 4 στην εξίσωση 8 προκύπτει η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα του αποτελέσματος για την περιεκτικότητα σε C-4 σάκχαρα η οποία είναι 0,022. Για τον υπολογισμό της % περιεκτικότητας σε C-4 σάκχαρα και εν συνεχεία της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας, εφαρμόζεται η σχέση 1 θεωρώντας ότι: $\delta^{13}C_H$: -18,835‰, $\delta^{13}C_i$:-10,76‰ και δ^{13}Cp: -26,91‰. Από τα παραπάνω προκύπτει η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε C-4 σάκχαρα ίση με 50%. Έτσι, η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι 1,10% ενώ η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα είναι **2,2%**. Η τελική περιεκτικότητα λοιπόν του δείγματος θα είναι (50 ± 2,2)%.

Η σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα αποδίδεται διαγραμματικά στο σχήμα 3.

Πίνακας 4. Παράμετροι υπολογισμού αβεβαιότητας για νοθευμένα δείγματα μελιού.

ΠΗΓΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	***Ux/x***
Αβεβαιότητα από τα αναλυθέντα δείγματα πρωτεϊνών	0,0095
Αβεβαιότητα από τα αναλυθέντα δείγματα μελιού	0,0074
Αβεβαιότητα από τα αναλυθέντα δείγματα ισογλυκόζης	0,0185



Σχήμα 3. Σχετική συνεισφορά κάθε αβεβαιότητας στο τελικό αποτέλεσμα.

4. Βιβλιογραφία

1. Brazier, I.L., in Forensic Applications of Mass Spectrometry, Boca Raton, FLa, CRC Press Inc, 1995, ch. 7, pp.260-273.
2. Boutton, T.B., in Carbon Isotope Techniques, eds David C. Coleman, Brian Fry, Academic Press, Inc., USA, 1991, ch. 10, pp. 157-159.
3. C. Cuillou, F. Reniero, Isotopic methods for the control of food products and beverages, Commission of the European Communities, Joint Research Centre, ISPRA, Italy.
4. Doner, L., European Seminar on Authentication and Quality Assessment of Food Products, Martin, G., Ed., Nantes, 1991.

5. Krueger, H.W. and Reesman, R.H., Mass Spectrm. Rev. 1982,**1**, 205.
6. Brookes, S.T., Barrie, A., and Davies, J.E., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, **74**, 627-629.
7. White, J.W., and Doner, L.W., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1978, **61**, 746-750.
8. White, J.W., and Winters, K., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1989, **72**, 6, 907-911.
9. White, J.W., and Winters, K., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1998, **81**, 610-619.