

Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Cheminės fizikos institutas

Aivaras Ginaučius

Vaisių sulčių tyrimas izotopiniais metodais

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Aplinkos ir cheminės fizikos
studijų programa

Studentas

Aivaras Ginaučius

Leista ginti

2018 05 25

Darbo vadovas

dr. Andrius Garbaras

Instituto direktorius

prof., dr. Valdas Šablinskas

Vilnius 2018

Turinys

Įvadas	3
Tikslas	4
Uždaviniai	4
1. Literatūros apžvalga	5
1.1. Izotopų santykio kaita gamtoje	5
1.2. Izotopų santykio kaita augaluose	8
1.3. Vaisių sulčių izotopų santykis cukruje ir pulpe	11
1.4. Specifinės grupės natūralaus gamtinio pasiskirstymo branduolių magnetinis rezonansas.....	12
1.5. Fermentacija.....	13
1.6. Distiliacija	15
1.7. Branduolių magnetinis rezonansas.....	17
1.8. Cheminis poslinkis	19
1.9. Branduolių sukinių sąveika.	20
2. Metodinė dalis	21
2.1. Vaisių sulčių paruošimas izotopų santykio matavimui	21
2.2. Izotopų santykio masių spektrometro veikimo principas.....	23
2.3. Mėginių paruošimas matavimams SNIF-NMR metodu.....	25
2.4. BMR spektrometro veikimo principas	26
3. Rezultatai.....	27
Išvados.....	33
Summary	34
Literatūros sąrašas	35

Ivadas

Vietovės, iš kurios yra kilę maisto produktai, nustatymas yra labai svarbus, stengiantis apsaugoti produktų gamintojus nuo produkcijos klastojimo bei norint užtikrinti produktų saugos reikalavimus. Sultys yra maisto produktas, kurio kilmę yra labai sunku kontroliuoti, nes jos, gamybos metu, yra koncentruojamos – sukuriant sulčių koncentratų, o po to sultys gali būti atgamintos vėl jas atskiedžiant.

Kiekvienos sultys yra skirtingo saldumo, tai yra jose esančio cukraus koncentracija gali būti skirtinga, nevienoda. Dėl šios aplinkybės į kai kurias vaisių sultis gali būti pridėdama papildomo cukraus, jos yra „pasaldinamos“. Tai yra daroma siekiant sultis padaryti saldesnėmis, kad jas galima būtų sėkmingiau parduoti. Kiekvieną sulčių pasaldinimą yra labai sunku identifikuoti dėl jau minėto skirtingo natūralaus sulčių saldumo.

Panaudojant branduolinių tyrimų metodikas galima nustatyti maisto produktų kilmę. Šių metodikų pritaikymas vaisių sulčių autentiškumo nustatymo srityje atvėrė naujas galimybes, kurios leido įvertinti ar į vaisių sultis yra pridėdama papildomo cukraus bei nustatyti jo kiekius.

Sulčių autentiškumo tyrimas izotopų santykio metodu remiasi tuo, jog yra matuojamos anglies izotopų santykio vertės natūralių sulčių cukruje ir izotopų santykio vertės sulčių nuosėdose (pulpoje). Jei sultys yra nesuklastotos šios vertės turėtų beveik nesiskirti. Pažymėtina, kad skirtingų rūšių augalams yra būdingas skirtingas anglies izotopų santykis. Norint identifikuoti cukrų tų augalų, kurių anglies izotopų santykio vertės panašios, naudojamas branduolių magnetinio metodas. Apjungiant izotopų santykio masių spektrometrinius ir branduolinio rezonanso metodus, galima identifikuoti vaisių sulčių klastojimą.

Tikslas

Ištirti Lietuvoje augančių obuolių ir Lietuvoje pagamintų (parduodamų) obuolių sulčių, taip pat rinkoje esančių įvairių sulčių $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykį naudojant stabilių izotopų masių spektrometrijos ir branduolių magnetinio rezonanso metodus ir šių metodų pagalba įvertinti galimą sulčių klastojimą.

Uždaviniai

1. Surinkti įvairių vaisių sulčių ir Lietuvoje augančių obuolių mėginius.
2. Išskirti pulpą ir cukrų surinktuose mėginiuose, taip pat mėginiuose pirktuose parduotuvėje.
3. Išmatuoti pulpos ir cukraus stabilių anglies izotopų santykio vertes ir įvertinti galimą sulčių klastojimą.
4. Išmatuoti etanolio, susidariusio fermentacijos metu iš vaisių sulčių, metilo ir metileno ^{13}C santykį ir įvertinti galimą sulčių klastojimą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Izotopų santykio kaita gamtoje

Kiekviena medžiaga esanti gamtoje savo molekulės sudėtyje turi ne tik jas sudarančius cheminius elementus, bet kartu turi ir jų izotopus. Izotopas – tai yra cheminis elementas savo branduolyje turintis skirtingus neutronų skaičius, pavyzdžiui, ^1H (vandenilis), ^2H (Deuteris) ir ^3H (Tritis) yra izotopai. Stabilių izotopų (stabilūs izotopai tai tokie izotopai, kurie nėra radioaktyvūs) kiekiai gamtoje yra pastovūs todėl, kad jų santykius globaliai nulėmė žemės formavimosi metu susikaupę santykiai. Gamtoje izotopai nėra pasiskirstę vienodai. Taip yra dėl to, kad gamtoje vyksta fizikiniai ir cheminiai procesai, kurie priverčia sunkesnius elementų izotopus atsiskirti nuo lengvesnių. Tai būtų tokie procesai kaip garavimas, kondensacija, difuzija, disociacija ir didžioji dalis biologinių reakcijų. Tai yra pagrindiniai veiksniai, kurie palieka izotopinę žymę, kurią yra galima išmatuoti ir įvertinti.

Molekulių, turinčių didesnę izotopinę masę fizikinės savybės (pusiausvyra ar šiluminis frakcionavimasis) šiek tiek skiriasi nuo lengvesnių izotopų. Cheminė pusiausvyra yra stebima vykstant cheminėms reakcijoms.

Temperatūra yra pagrindinis veiksnys lemiantis deguonies ir vandenilio izotopų atsiskyrimą. Didėjant temperatūrai didėja ir tikimybė vandens molekulei išgaruoti. Dėl to molekulėms turinčioms didesnę izotopinę masę yra sudėtingiau išgaruoti, nei molekulėms turinčioms mažesnę izotopinę masę. Taip yra todėl, kad sunkesnėms molekulėms reikia suteikti daugiau energijos norint jas išgarinti [1].

Kiekviena hidraulinė sistema gamtoje (tai tokia sistema, kurios vienas iš sudedamųjų elementų yra vanduo, pavyzdžiui, upių tinklas, ežeras ir kita) turi specifinę izotopinę sudėtį. Todėl augalų ir gyvūnų izotopinis praturtinimas vandeniliu ir deguonimi yra siejamas su vietiniais krituliais.

1 lentelė. Pagrindinių izotopų kiekiai aplinkoje [2].

Elementas	Lengvų stabilių izotopų kiekiai		Masių skirtumas (santykinis)	δ vertės ribos (‰)
	Mažos masės (%)	Didelės masės (%)		
Vandenilis	¹ H 99,984	² H 0,016	2,00	700
Anglis	¹² C 98,89	¹³ C 1,11	1,08	110
Azotas	¹⁴ N 99,64	¹⁵ N 0,36	1,07	90
Deguoonis	¹⁶ O 99,76	¹⁸ O 0,2	1,15	100
Siera	³² S 95,02	³⁴ S 4,21	1,06	150

Izotopinis praturtinimas yra išreiškiamas delta verte ir žymimas δ, kaip pateikta (1) lygtyje imant anglies pavyzdį [3]:

$$\delta = \left(\frac{R_{m\acute{e}g}}{R_{std}} - 1 \right) * 1000 \quad (1),$$

$$R(\text{santykis}) = \frac{\text{sunkesnio izotopo kiekis}}{\text{lengvesnio izotopo kiekis}} \quad (2),$$

čia $R_{m\acute{e}g}$ – matuojamo mėginio izotopų santykis, R_{std} – tarptautinio standarto izotopų santykis.

Dažniausiai praktikoje δ vertė yra padauginama iš 1000 ir pristatoma promilėmis (‰ arba tūkstantosiomis dalimis), taip pat gali būti padauginama iš 1000000 ir reprezentuojama kaip milijoninė dalis (ppm).

Tarptautinius stabilių izotopų standartus parenka Tarptautinė atominės energetikos agentūra (TATENA). Matuojant stabilių anglies izotopų santykį kaip atskaitos standartas yra imama Pee-Dee belemnito (PDB) kriauklelė. Šio standarto absoliutinę ¹³C/¹²C izotopų vertė yra 0,0112372 [4]. Laikoma, kad organinių medžiagų, turinčių didesnę ¹³C/¹²C izotopų santykį nei PDB, δ vertė yra teigiama, o turinčių mažesnę ¹³C/¹²C izotopų santykį nei PDB – neigiama.

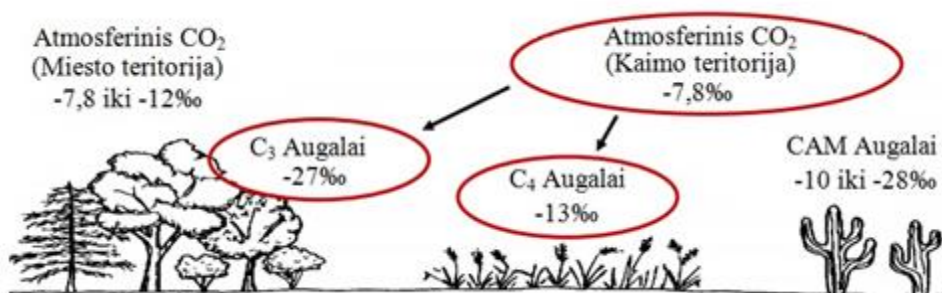
Kadangi gamtoje egzistuojančiose medžiagose izotopų pasiskirstymas yra gana platus ir kiekvienoje medžiagoje izotopinis santykis yra unikalus priklausomai nuo to iš kurio regiono ta medžiaga yra kilus ir kokia buvo jos istorija. Dėl to šis izotopų masių spektrometrijos tyrimo metodas turi platų pritaikymo sričių spektrą, pavyzdžiui:

- Teisėsauga:
 - nustatoma ar tiriami mėginiai yra panašios cheminės sudėties kaip kitos žinomos medžiagos, pavyzdžiui, narkotinės medžiagos, sprogmenys, dažai, rašalas ir t.t.;
 - suklastotų medžiagų atskyrimui nuo tikrų (pvz., vaistai);
 - tiriamų reagentų palyginimui su kontrabandinėmis medžiagomis;
 - aplinkos ekspertizė ir stebėseną:
 - taršos šaltinių identifikavimas, tokių kaip naftos išsipyrimai;
 - atmosferos dujų stebėseną atskiriant antropogeninius šaltinius nuo natūralių;
 - klimato tyrimai;
 - vandens ciklo tyrimai;
 - maisto autentiškumas ir kilmės nustatymas:
 - nustatyti geografiškai autentiškus produktus;
 - maisto klastojimo pigesniais ingredientais tyrimai;
 - laukinės gamtos ekspertizė:
 - archeologija ir geologijos mokslai;
 - geochemija ir geologija:
 - nustatyti vandens šaltinių kilmę;
 - nustatyti uolienu temperatūra ir jų pokyčius;
 - paleoklimatologija;
 - paleoekologija.
- Biologijos mokslai:
 - Ekologija:
 - fotosintezės kelias;
 - maisto grandinė;
 - ekohidrologija;
 - maistingieji ciklai;
 - Žmogaus ir augalo fiziologija;
 - Žmogaus provenancija;
 - Medžiagų apykaitos mokslai;
 - Sporto medicina;
 - Toksikologija:
 - atskirti endogenines chemines medžiagas nuo eksogeninių [5].

1.2. Izotopų santykio kaita augaluose

$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ santykis biologiniuose organizmuose beveik be išimties priklauso nuo fotosintezės metu vykstančių „tamsiųjų“ reakcijų. Tamsiosios reakcijos gali vykti ir šviesiu, ir tamsiu paros metu. Jos vadinamos „tamsiosiomis“ dėl to, kad jos naudoja šviesiųjų reakcijų, kurios vyksta tik tada, kai yra augalas yra apšviestas saulės šviesos, metu sukurtus produktus ir aplinkoje esantį anglies dioksidą, kad galėtų pagaminti gliukozę.

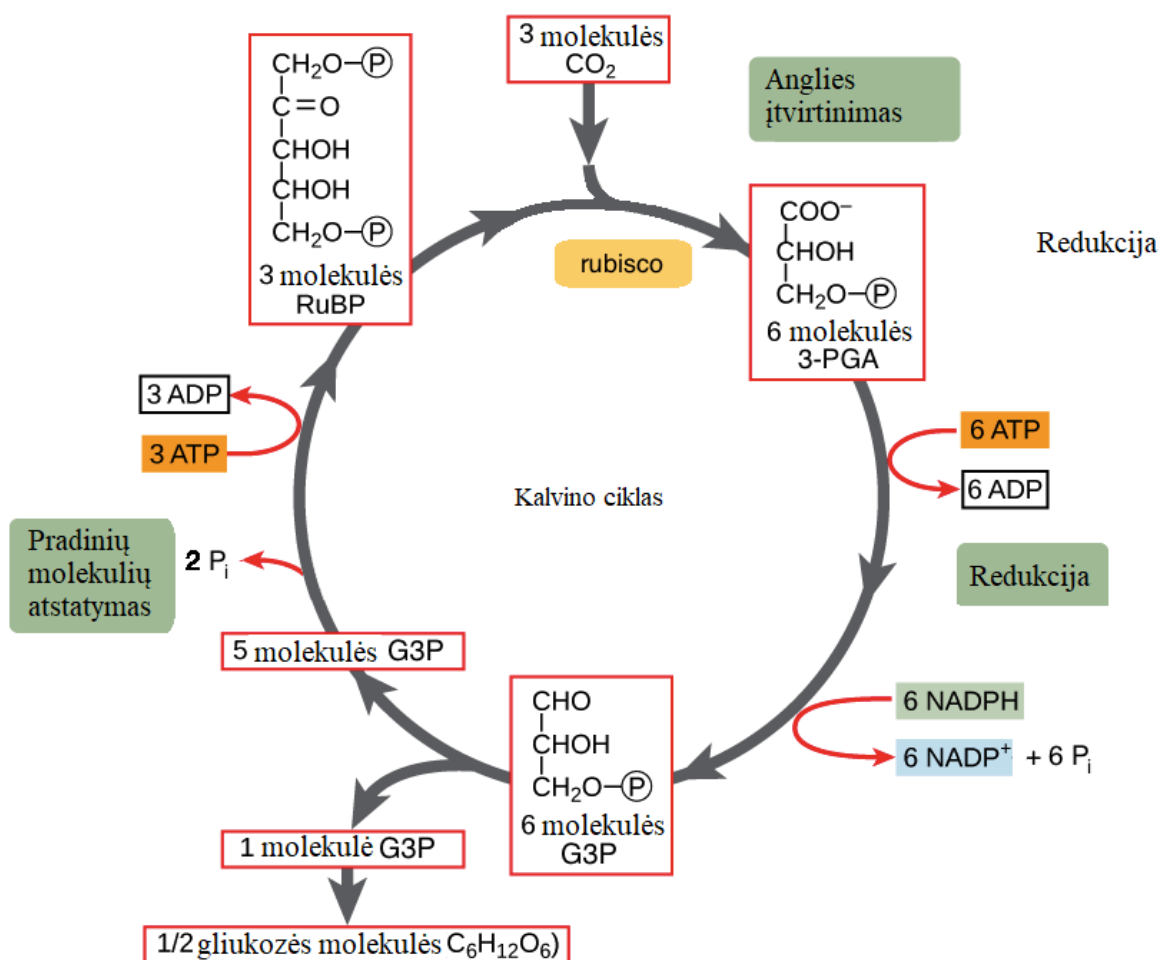
Augalai „tamsiųjų“ reakcijų metu gali naudoti C_3 metabolizmą, Kalvino (*Calvin*) ciklą, kuriose anglies izotopų santykio $\delta^{13}\text{C}$ vertės kinta nuo -26 iki -28‰. C_3 tipo metabolizmą naudoja 85% kraujagyslinių augalų. Taip pat gamtoje egzistuoja ir augalai, kurie savo „tamsiųjų“ reakcijų metu naudoja C_4 metabolizmą (*Hatch–Slack* ciklą), kuriuose anglies izotopų santykio $\delta^{13}\text{C}$ vertės gali kisti nuo -12 iki -14‰. C_4 metabolizmą dažniausiai naudoja augalai augantys tropiniuose regionuose. O kai kurie augalai augantys sausuose regionuose „tamsiųjų“ reakcijų metu naudoja „*crassulacean acid metabolism*“ (CAM) metabolizmą, kuris yra labai panašus į C_4 metabolizmą, o



augalai jį naudojantys yra vadinamai CAM augalais [6].

1 pav. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykis C_3 C_4 ir CAM augaluose.

C₃ tipo augalai (pvz., kviečiai, ryžiai, miežiai, rugiai, sojų pupelės, riešutai, cukriniai runkeliai, bulvės, tabakas, ir kiti ilgai žaliuojantys tropinių, subtropinių ir vidutinių platumų kraštuose augantys augalai) ima iš aplinkos CO₂ molekules ir vykdo „tamsiąją“ reakciją. Jos metu į mezofilo ląsteles patekęs CO₂ reaguoja su adenozin trifosfatu (ATP) ir nikotinamido adenin dinukleotid ofosfatu (NADPH) sudarydami gliceraldehid 3-fosfatą (PGAL) (dėl kurio šis Kalvino ciklas ir vadinamas C₃ fotosintezės ciklu, nes PGAL turi tris anglies atomus savo molekulėje), kuris vėliau reaguodamas su ribuliozės bifosfatu (RuBP) bei CO₂ sudaro cukrų ir PGAL. Nepanaudotas PGAL, (reakcijos su (ATP) metu jo susidaro daugiau nei yra reikalinga cukraus gavimo reakcijai) dar yra panaudojamas RuBP sukūrimui ir ciklas vėl viskas kartojasi [6].

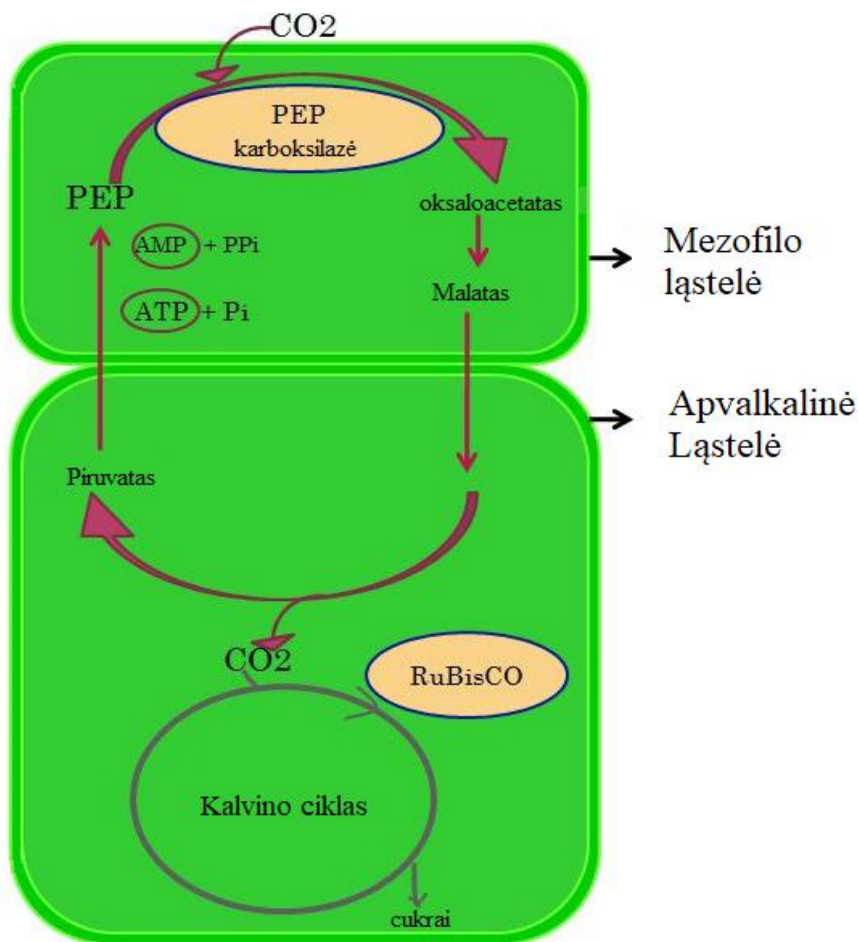


2 pav. C₃ metabolizmo (Kalvino ciklo) schema.

Cheminės reakcijos metu tiksliai žinoti yra neįmanoma, kuris anglies izotopas iš CO₂ molekulės bus panaudotas cukrui pagaminti, nes tai – tikimybinis procesas. Tačiau žinant, kad ¹³C anglies dioksido molekulėje yra sunkesnis elementas, nei ¹²C dėl to tikimybė, kad jis sudalyvaus fotosintezėje yra mažesnė, nes norint, kad įvyktų reakcija su ¹³C reikia daugiau energijos nei su ¹²C

ir augalui yra paprasčiau jį įsisavinti. O kadangi C_3 augalo žiotelės dažniausiai būna atidarytos tai lapo viduje visada būna šviežio $^{12}CO_2$, kurį augalai yra linkę labiau įsisavinti.

C_4 tipo augaluose (pvz., kukurūzai, cukranendrė, sora, pirštuotė, soragas) fotosintezės procesas vyksta truputį kitaip nei C_3 augaluose. Mezofilo ląstelėse CO_2 reaguoja su fosfenol piruvatu (PEP) ir sudaro oksalo rūgštį, kuri vėliau tampa malatu (hidroksi dioatu), kuris turi 4 anglies atomus, dėl šios medžiagos C_4 metabolizmas ir yra vadinamas C_4 metabolizmu. Toliau malatas skyla į CO_2 ir PEP, kuris vėl grįžta į ciklą ir vėl reaguoja su šviežiai į lapą patekusių CO_2 . Gali atrodyti, kad CO_2 suvartojimas tam, kad vėliau jis vėl pasigamintu yra nereikalingas dalykas, suvartoti CO_2 ir papildomas medžiagas tam, kad būtų gautas vėl CO_2 . Tačiau augalas vykdydamas šį procesą apsaugo nuo to, kad nevykdytų kvėpavimo reakcijos su deguonimi, kuri yra augalui energetiškai nenaudinga, nes jos metu yra suvartojama daugiau medžiagų nei yra pagaminama. Tada mezofilo ląstelėje naujai gautas CO_2 , keliauja į apvaskalinę ląstelę (*bundle – sheath cell*), kuri yra gilesniame augalo audinio sluoksnyje. Tada apvaskalinėje ląstelėje CO_2 yra panaudojamas Kalvino cikle taip kaip ir C_3 augaluose [7].



3 pav. C_4 metabolizmo schema.

Taip pat yra ir CAM (*crassulacean acid metabolism*) (pavyzdžiui, kaktusai) tipo augalai, kurie „tamsiąsias“ reakcijas vykdo taip pat kaip ir C₄ tipo augalai. Šie augalai turi galimybę kaupti malatą naktį, kai nėra saulės šviesos ir nėra labai karšta bei panaudoti ją diena. CAM augalai tai daro kontroliuodami savo žioteles (jas atidarydami arba uždarydami) pro kurias patenka CO₂ ir O₂ dujos [8].

C₄ ir CAM augalai gali gaminti cukrų ir su uždarytomis žiotelėmis, nes taip jie apsisaugo nuo vandens išgaravimo, nes šių tipų augalai dažniausiai auga sausuose ir karštuose regionuose, tokiuose kaip tropiniai ir subtropiniai klimato zonos. Kai žiotelės būna uždarytos tada tampa ribotas CO₂ kiekis pačiame augale ir dėl to augalas suvartoja ir CO₂ su ¹³C, nes tiesiog nebebūna daugiau ¹²C su kuriuo fotosintezės reakcijos tikimybė yra didesnė.

1.3. Vaisių sulčių izotopų santykis cukruje ir pulpoje

Nepriklausomai nuo to kokio tipo metabolizmą augalai naudoja, vis tiek anglies izotopų santykis ¹³C/¹²C turi išlikti vienodas to augalo cukruje ir jo kitoje organinėje medžiagoje. Tai reiškia, kad paėmus vaisių sultis ir pamatavus jų ¹³C/¹²C izotopų santykį sulčių cukruje ir pulpoje, jis turi būti beveik vienodas. Jeigu izotopų santykis sulčių cukruje yra didesnis nei pulpoje, tai iš čia galima daryti išvadą, kad į sultis buvo pridėta cukraus iš cukranendrių arba kito augalo.

M. Antolovich su savo kolegomis publikacijoje, paskelbtoje 2001 m. aprašė, kaip matavo anglies izotopų santykį Australijos apelsinų sultyse [9]. Matavimams atlikti buvo parinktos dviejų apelsinų rūšių Navel ir Valencia sultys. Navel apelsinų sulčių buvo matuoti 8 bandiniai, o Valencia – 35 bandiniai. Publikacijoje yra nurodyta, kad Valencia apelsinų sultyse δ¹³C vertės svyruoja nuo -23,8 iki -24,7‰, o Navel apelsinų sultyse – nuo -24,1 iki -24,5‰. Iš šių rezultatų buvo padaryta išvada, kad apelsinų sultyse galima tikėtis δ¹³C verčių nuo -23,8 iki -24,5‰. Taip pat buvo nustatyta, kad papildomo C₄ augalų cukraus buvo pridėta į du mėginius, kuriuos izotopų ¹³C/¹²C santykis buvo gerokai mažesnis nei kitų [9].

D. A. Magdas ir jos kolegos publikacijoje [10] 2013 m. tyrė įvairių Rumunijos sulčių klastojimą. Ji su savo komanda ėmė 12 mėginių iš įvairių, komercijoje parduodamų, vaisių sulčių. Publikacijoje yra pateikiamos tokios išmatuotos vaisių sulčių pulpoje: obuolių – -25,6‰, abrikosų – -25,2‰, kriaušių – -26,7‰, pomidorų – -28,3‰, apelsinų – -26,1‰. O δ¹³C vertės sulčių cukruje yra tokios: abrikosų – -24,9‰, apelsinų – -26,1‰, kituose mėginiuose buvo nustatyta, jog jos buvo suklastotos [10].

R. Figueira ir jo kolegų publikacijoje [11] paskelbtoje 2011 m. buvo tiriama anglies izotopų $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykių kaita, Brazilijos obuolių sultyse, jų cukruje ir pulpoje, kai yra kintanti C_4 cukraus koncentracija sultyse. Buvo matuota kai C_4 cukraus koncentracija siekė 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5% 20% visos sulčių masės. Buvo gauta rezultatai, kad izotopinis santykis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pulpoje beveik nekinta, kurio verte vidutiniškai siekė -27,38‰. O cukruje ši vertė augo nuo -27,53‰ iki -17,72‰. Šio tyrimo rezultatai parodo, kad matuojant anglies izotopų santykį vaisių sulčių cukruje ir pulpoje galima identifikuoti klastojimo atvejus bei įvertinti, kokie yra pridėtinio cukraus kiekiai suklastotose sultyse.

1.4. Specifinės grupės natūralaus gamtinio pasiskirstymo branduolių magnetinis rezonansas

Natūralus Izotopinis atsiskyrimas yra pagrindinis dalykas, kuriuo remiasi Specifinės grupės natūralaus gamtinio pasiskirstymo branduolių magnetinis rezonansas (ang. Site-specific natural isotope fractionation nuclear magnetic resonance – SNIF–NMR). Paprastai tiriant maisto klastojimo atvejus gali būti naudojami du tyrimo metodai. ^2H - SNIF – NMR metodikoje pagrindinis tyrimo parametras yra vandenilio izotopų (^2H ir ^1H) santykis. Kitas tyrimo metodas yra ^{13}C – SNIF – NMR, kurio pagalba galima nustatyti konkrečiai vietai būdingus duomenis. Ir tai galima padaryti be papildomo cheminio ardymo [16].

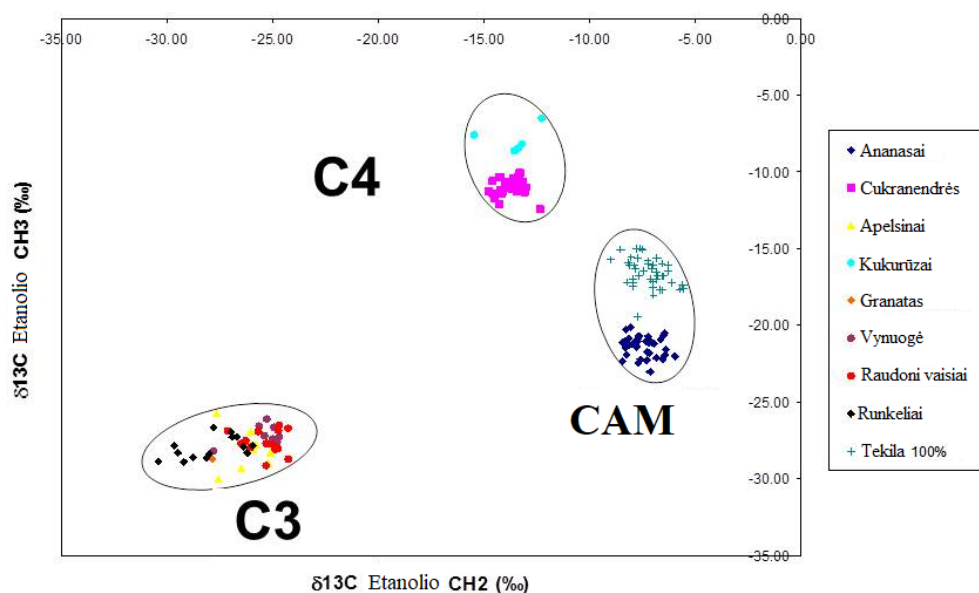
SNIF – NMR metodas yra unikalus tuo, kad tai pirmasis metodas galintis tiksliai nustatyti skirtumą tarp C_4 metabolizmą turinčių augalų ir CAM (ang. *carassulacean acid metabolism*) metabolizmą vykdančių augalų, tokių, kaip ananasai.

Šis maisto klastojimo tyrimo metodas remiasi tuo, kad yra matuojama etanolio molekulė ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) su branduolių magnetinio rezonanso (BMR) prietaisu. Šiuo prietaisu yra matuojami anglies tik ^{13}C izotopo etanolio molekulės BMR spektro intensyvumai CH_2 ir CH_3 frakcijose, nes ^{12}C branduolių BMR negali užfiksuoti dėl to, kad ^{12}C branduolys turi sukininio judesio kiekio momento (sukinio) kvantinį skaičių m_s lygų nuliui. Pagal BMR spektro smailių intensyvumus galima nustatyti koks yra ^{13}C anglies santykis CH_2 ir CH_3 frakcijose, vienas kito atžvilgiu. Tada palyginus su standartu arba kitais tyrimo metodais, išmatavus ir įvertinus koks yra bendras anglies izotopų $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykis ($\delta^{13}\text{C}$) mėginyje, (pavyzdžiui, izotopų santykio masių spektrometrija) galima nesunkiai apskaičiuoti, kokios yra delta $\delta^{13}\text{C}$ vertės CH_2 bei CH_3 frakcijose. Tai galima padaryti pritaikius paprastą vidurkio formulę:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_2} + \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3}}{2} \quad (3)$$

ir panaudojus iš BMR matavimo žinomą anglies $^{13}\text{C}_{\text{CH}_2}/^{13}\text{C}_{\text{CH}_3}$ izotopų santykį.

Nustaćius, kokios yra $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_2)$ ir $\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3)$ vertės galima pavaizduoti grafike.



4 pav. Įvairių vaisių, fermentuoto etanolio frakcijų, dvimatis $\delta^{13}\text{C}$ santykio pasiskirstymas.

Iš (4 pav.) matoma, kaip C3, C4 ir CAM metabolizmą vykdančių augalų. Taip pat gali būti matomas ir skirtingų vaisių, vykdančių tos pačios rūšies metabolizmą atsiskyrimas. Tai ir yra pagrindinis ^{13}C SNIF - NMR tyrimo metodo privalumas, leidžiantis tiksliai nustatyti maisto klastojimo atvejus.

1.5. Fermentacija

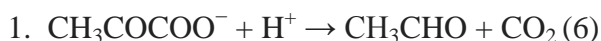
Angliavandenių fermentavimasis atrodo labai nesudėtingas dalykas, gliukozės molekulei ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) teriaikia pritaikyti tam tikras sąlygas ir yra gaunama tokia cheminė reakcija:



Tačiau tai yra sudėtingesnis procesas nei atrodo iš pirmo žvilgsnio. Pirmiausia sacharozė ($C_{12}H_{22}O_{11}$) yra suskaidoma į fruktozę ($C_6H_{12}O_6$) ir gliukozę naudojant invertazės fermentą, kuris nutraukia glikozidinę jungtį. Toliau Gliukozės molekulė ilgos cheminės reakcijos grandinės metu yra suskaldoma į dvi piruvato molekules, šis cheminių reakcijų rinkinys yra vadinamas glikolize ir sutrumpinta jos versija atrodo taip [18]:



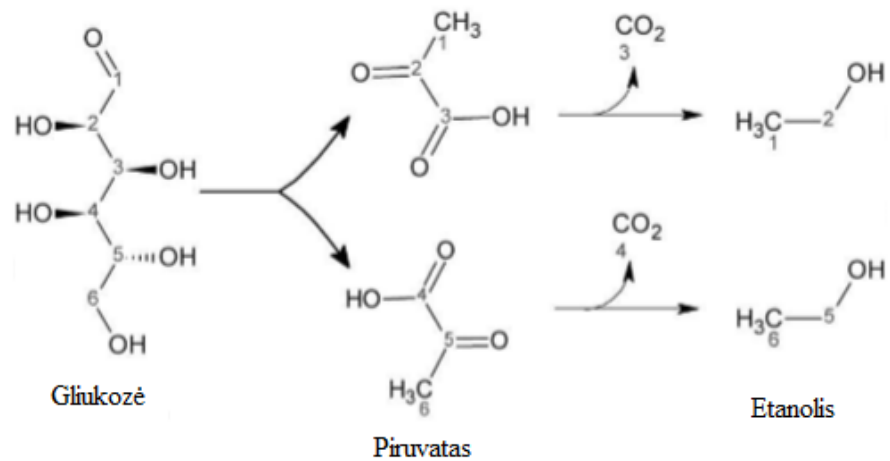
Čia, CH_3COCOO^- yra piruvatas, Pi yra neorganinis fosfatas. NAD^+ ir $NADH$ (Nikotinamido adenino dinukleotidas), jie yra kofermentai, kurie aktyvina arba slopina fermentus, tai daro prisijungdami arba atiduodami vandenilio joną. ADP (adenozin difosfatas) tai nukleotidas, kuris dalyvauja daugybėje signalizavimo ir reguliavimo procesų ląstelėse, paprastai atlieka slopinimo funkciją. ATP (adenozin trifosfatas) tai universalus visų ląstelių energijos šaltinis. Galiausiai piruvatas (CH_3COCOO^-) yra paverčiamas į etanolį ir CO_2 dujas per dvi pakopas atstatant oksiduotą NAD^+ kofermentą, kuris reikalingas glikolizės reakcijai:



Kaip matoma iš reakcijų lygties glikolizė lemia, molekulių NAD^+ redukciją į $NADH$. Taip pat ADP molekulės yra paverčiamos į ATP.

Fermentacijos procesui deguonis yra nereikalingas. Jeigu fermentuojant alkoholį yra gaunama deguonies, tai kai kurios mielių rūšys suoksiduoja piruvatą visiškai, tai yra suoksiduoja iki H_2O ir CO_2 . Šis procesas dar yra vadinamas kvėpavimu. Taigi šios mielių rūšių gali pagaminti etanolį tik anaerobinėmis sąlygomis.

Įdomu yra tai, kad fermentuojantis cukrui anglies atomai esantys etanolyje visada yra iš tų pačių padėčių, kur jie yra gliukozės molekulėje. Pavyzdžiui, 5pav. numeriais pažymėti 1, 2 ir 5, 6 anglies branduoliai visada sudaro etanolio molekules, o 3 ir 4 numeriais pažymėti anglies branduoliai visada pereina į anglies dioksido molekules, kurios palieka mėginį.



5 pav. Supaprastinta gliukozės metabolizmo schema, parodanti kokie anglies atomai iš gliukozės buvo naudojami susidaryti etanolui, alkoholio fermentacijos metu.

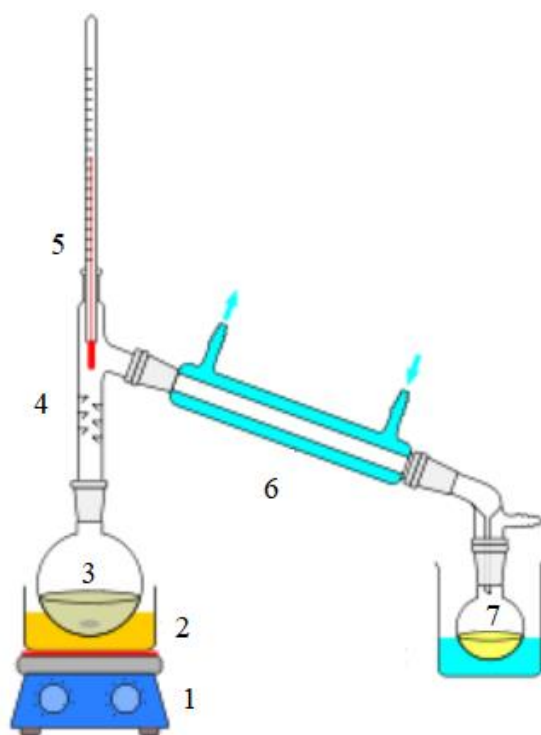
Kadangi gliukozės fermentacijos proceso (glikolizės) metu iš gliukolizės molekulės CO_2 pavidalu pasišalina anglies branduoliai esantys fiksuotose pozicijose, tai reiškia, kad statistiškai $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykis etanolyje yra toks pats kaip ir gliukozės molekulėje [17].

1.6. Distiliacija

Distiliavimas tai toks procesas, kai yra atskiriami tam tikri, norimi komponentai, naudojant virimo ir kondensacijos procesus. Distiliacijos būdu galima pasiekti labai aukštas norimos medžiagos koncentracijas. Galima gauti absoliučiai gryną, arba labai artimą visiško grynumo medžiagą. Taip pat distiliacija gali būti naudojama norint padidinti norimos medžiagos koncentraciją tirpale.

Distiliacijos prietaisų įvairovė yra labai plati, jie gali būti labai sudėtingi, susidedantys iš daugybės pakopų, tokie, pagrinde, būna naudojami pramoniniais tikslais. Taip pat šie prietaisai gali būti labai paprasti, primityvūs, naudojami smulkiose laboratorijose.

Distiliatorius susideda iš kelių pagrindinių komponentų, kurie yra atvaizduoti 6 pav.



6 pav. Principinė distiliatoiaus schema.

6 paveikslėlyje nr. 1 – yra pažymėtas kaitinimo elementas, jis yra skirtas tam, kad būtų galima užvirti tirpalą iš kuriuo norime išskirti medžiagą (žr. 6 pav. nr.3). Nr 2 yra smėlio, aliejaus ar kaitinimo vamzdeliai vonelė, ji yra reikalinga tam, kad tirpalas, iš kuriuo bus išskirinėjama distiliuojama medžiaga, būtų kaitinamas tolygiai, tam, kad nepradėtų skilinėti kolba. 4 – yra deflegmatorius, jis yra skirtas tam, kad būtų pagerintas distiliavimo efektyvumas, tai yra, kad reikiama frakcijos pradėtų kondensuotis vėliau. Nr 5 yra termometras, juo yra sekama garų temperatūra. Temperatūra turi būti tokia, kokia yra distiliuojamojo tirpalo virimo temperatūra. 6 – kondensatorius, jo paskirtis yra ta, kad ant vidinio vamzdelio vidinių sienelių susikondensuotų distiliuojama medžiaga ir sutekėtų į indą. Kondensatoriaus išoriniame vamzdelyje yra paleistas cirkuliuoti vanduo, kuris nusineša šilumą, kurią atiduoda besikondensuojantys garai. 7 – indas, į kurį patenka išdistiliuotas tirpalas. Šis indas gali būti patalpintas į aušinimo vonelę [19].

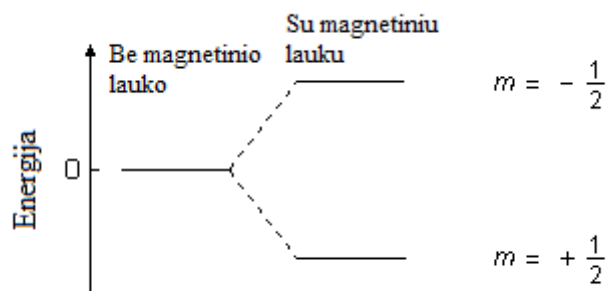
1.7. Branduolių magnetinis rezonansas

Branduolių magnetinis rezonansas tai yra toks reiškinys, kai atomo branduolys sugeria arba atlaisvina tam tikros energijos elektromagnetines bangas. Šių bangų energijos dydis priklauso nuo to kokio dydžio yra išorinis magnetinis laukas ir nuo branduolio magnetinių savybių [20].

Dalelės (elektronai, protonai ir neutronai) gali būti įsivaizduojami kaip besisukančios, turinčios savo sukinių (sukininį judesio kiekio momentą) dalelės. Daugumoje atomų (tokių kaip ^{12}C) tokie sukinių yra supriešinti vieni su kitais ir tokiu atveju atomas neturi absoliutaus sukinių. Tačiau egzistuoja ir atomai, kurie turi absoliutų sukinių tokie kaip ^1H ar ^{13}C . Sukinys yra nustatomas pagal tokias taisykles:

1. Jei branduolys turi vienodą protonų ir neutronų skaičių, tada jis neturi sukinių.
2. Jei neutronų ir protonų skaičių suma yra nelyginis skaičius tada branduolys turi pusinį sukinių (pvz. $1/2$, $3/2$, $5/3$)
3. Jei branduolys turi nelyginius neutronų ir protonų skaičius tada jis turi sveiką sukinių (pvz 1, 2, 3)

Iš kvantinės mechanikos žinoma, kad branduolys turintis sukinių, I , turi $2I+1$ energijos lygmenų. Tai reiškia, kad branduolys su sukiniu $1/2$ turės dvi galimas energijos būsenas. Be išorinio magnetinio lauko sukinių energijos būsenos sutampa, bet įjungus išorinį magnetinį lauką šios būsenos pradeda dalintis ir pasidalina į atskirus energijos lygmenis. Ir kiekvienas lygmuo nusakomas magnetiniu kvantiniu skaičiumi m .



7 pav. $1/2$ sukinių turinčio branduolio energijos būsenos.

Magnetiniame lauke esančių nukleonų pasiskirstymą lygmenyse nulemia Bolcmano pasiskirstymas. Tai reiškia, kad nukleonų esančių aukštesniame energijos būsenoje bus truputį mažiau negu žemesnėje energijos būsenoje. Nukleonus galima perkelti į aukštesnį energijos

lygmenį (sužadinti) suteikiant papildomą elektromagnetinės spinduliuotės kiekį. Šios spinduliuotės energija turi būti lygi skirtumui tarp energijos lygmenų.

Kadangi atomo branduolys turi teigiamą krūvį ir jis gali sukurti tada besisukantis krūvininkas kuria magnetinį lauką. Tai reiškia, kad savyje turi ir magnetinį momentą, μ , kuris yra proporcingas sukiniui

$$\mu = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} \quad (8)$$

γ yra giromagnetinis santykis, jis yra konstanta, kuri kiekvienam branduoliui yra skirtinga. \hbar yra Planko konstanta. Kiekvienos energijos būseną yra aprašoma taip:

$$E = -\frac{\gamma \hbar}{2\pi} mB \quad (9)$$

B – yra magnetinė indukcija. Tokiu atveju skirtumas tarp dviejų energijos lygmenų būtų toks:

$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar B}{2\pi} \quad (10)$$

Tai reiškia, kad didinant magnetinį lauką didėja ir energijos skirtumas tarp lygmenų, taip pat verta pažymėti, kad, jei turime branduolį su didesniu giromagnetiniu santykiu, tai tarpas tarp energijos lygmenų bus didesnis.

Išsivaizduokime branduolį turinti 1/2 sukinių magnetiniame lauke. Šis branduolys yra žemesnės energijos būsenoje, jeigu branduolio magnetinis momentas nesipriešina išoriniam magnetiniam laukui ir branduolys sukasi aplink savo sukimosi ašį. Jeigu magnetinio lauko kryptis nesutampa su branduolio sukimosi ašimi, tada branduolys pradeda precesuoti aplink išorinį magnetinį lauką. Dažnis, kuriuo precesuoja branduolys yra lygus dažniui energijos, kuri yra reikalinga pereiti į energijos lygmenį ir šis dažnis yra vadinamas Larmoro dažniu. Precesuojančio branduolio potencinė energija yra lygi:

$$E = -\mu B \cos \theta, \quad (11)$$

čia θ yra kampas tarp išorinio magnetinio lauko krypties ir branduolio sukimosi ašies.

Jeigu branduolys sugeria fotoną, tada kampas θ pasikeičia. Pavyzdžiui, branduolys su 1/2 sukiniu sugėręs fotoną apsivers (taps sužadintas), tai yra jo magnetinis dipolinio momento vektorius pakeis kryptį ir priešinsis išoriniam magnetiniam laukui.

Suteikti sukiniams papildomos energijos ir perkelti juos į aukštesniąją energijos būseną galima tik tol kol sukinių ansamblis įsisotins, tai reiškia tol kol sukinių aukštos ir žemos energijos lygmenyse bus po vienodą sukinių skaičių. Vėliau po tam tikro laiko tarpo sužadinti sukiniai, grįš į žemesnės energijos būseną, išmesdami energijos kvantą [21].

1.8. Cheminis poslinkis

Magnetinis laukas aplink branduolį nėra lygus išoriniam magnetiniam laukui. Elektronai supantys brandulį kuria savo magnetinį lauką taip apsaugodami branduolį nuo išorinio magnetinio lauko. Todėl branduolį veikia vietinis magnetinis laukas, kurio indukcija B_v aprašoma taip:

$$B_v = B_0(1 - \sigma), \quad (12)$$

čia B_0 – išorinio magnetinio lauko indukcija, o σ – branduolių ekranavimo konstanta. Jos ženklas priklauso nuo elektronų kuriamo magnetinio lauko krypties. Ekranavimas gali būti dviejų rūšių diamagnetinis arba paramagnetinis. Diamagnetizmą paprastai nuliamia s orbitalėje esantys elektronai, dėl to BMR spektre galima tikėtis teigiamo cheminio poslinkio, šiuo atveju elektronai ekranuoja magnetinį lauką. O paramagnetizmą lemia p orbitalėje esantys elektronai, o tai reiškia, kad galima tikėtis neigiamo cheminio poslinkio spektre, tokiu atveju elektronai de-ekranuoja magnetinį lauką.

Norint užregistruoti cheminį poslinkį reikia molekulėje turėti elektroneigiamesnę elementą (pvz, halogeną), jis prie savęs pritraukia elektronus. Kuo atstumas tarp elektrono ir elektroneigiamo atomo yra mažesnis, to elektronai labiau yra pritraukiami prie elektroneigiamiausio atomo. Kai elektronai yra pritraukiami prie elektroneigiamo atomo, tada jie nebeekranuoja branduolio, nuo, kurio jie buvo nutraukti, ir dėl to branduoliui reikia mažesnio išorinio magnetinio lauko, norint perkelti branduolių sukinius į aukštesnės energijos būseną.

Cheminis poslinkis δ yra išreiškiamas milijoninėmis dažnio dalimis (ppm), nes jis yra išskaičiuojamas iš formulės:

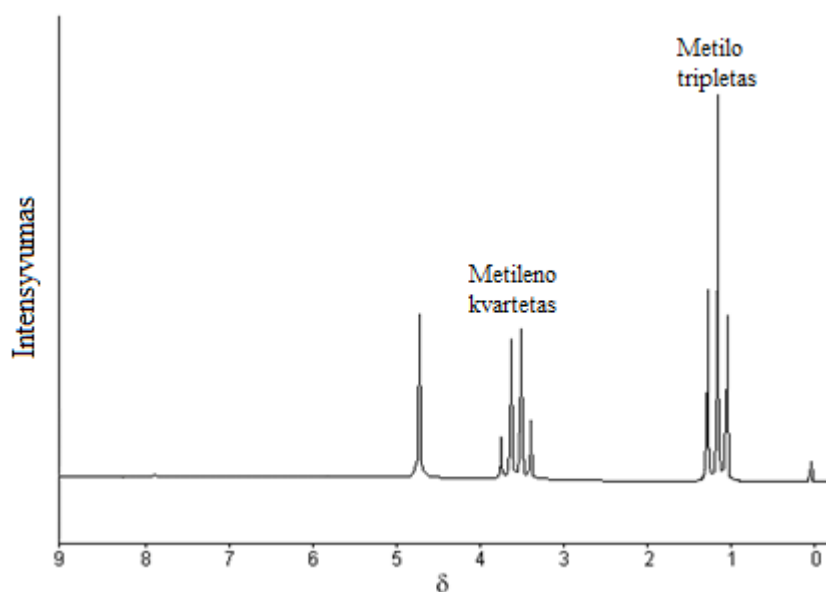
$$\delta = \frac{\nu_{band} - \nu_{stand}}{\nu_{stand}}, \quad (13)$$

čia ν_{band} – bandinio rezonansinis dažnis, o ν_{stand} – standarto rezonansinis dažnis, esant tam pačiam išoriniam magnetiniam laukui B_0 . Kadangi dažnis yra žymimas hercais (Hz), o skleidžiamas dažnis dažniausiai būna MHz dydžio eilės, tai dėl paprastumo δ yra išreiškiama ppm.

Dažniausiai BMR spektrometrijoje, standartu yra laikomas TMS (tetrametilsilanas), kuris, pagal susitarimą, turi nulinę cheminio poslinkio vertę. TMS rezonansinis dažnis yra lygus 300MHz [22].

1.9. Branduolių sukinių sąveika.

Jeigu branduoliai nesąveikautu tarpusavyje, būtų galima tikėtis tik kelių smailių spektre, kurios atitinka cheminio poslinkio vertes. Bet realiai išmatuotame spektre dažniausiai matomos kelios papildomos smailės aplink smailes, kurias nulemia cheminis poslinkis.



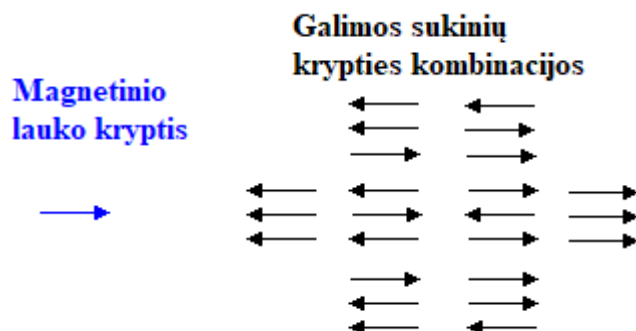
8 pav. Etanolio ¹H BMR spektras.

Pavyzdžiui, etanolio spektre, metilo grupės smailė yra suskilusi į tris smailes (tripletą), o metileno smailė – į keturias smailes (kvartetą). Taip yra todėl, kad branduolio sukiniai gali būti skirtingų krypčių tai jie daro įtaką magnetiniam laukui, kurį jaučia šalia esantis branduolys. Norint paaiškinti kodėl metilo smailė yra suskilusi į tripletą reikia atkreipti dėmesį į metileno protonus. Ten yra du protonai ir kiekvienas iš jų gali turėti dvi galimas sukinių kryptis (sutampančias arba nesutampančias su išorinio magnetinio lauko kryptimi). Tai iš viso galime turėti keturias variacijas:

1. Kai abu sukiniai nukreipti išorinio magnetinio lauko kryptimi.
2. Kai abu sukiniai nukreipti prieš magnetinio lauko kryptį.
3. Kai vieno protono sukinyje nukreiptas prieš, o kito protono sukinyje nukreiptas pagal išorinio magnetinio lauko kryptį, bet tokių turėsime du, nes gali būti ir atvirkščiai.

Tada gauname, kad metilo smailė suskyla į tris smailes, kur vidurinioji turi didesnę intensyvumą nei kitos dvi (1:2:1).

Tas pats principas galioja ir metileno smailei, tik jai jau įtaką daro ne du sukiniai, o trys, tada yra ne keturios, o aštuonios skirtingos sukinių išsidėstymo variantai, kurie atrodo taip:



9 pav. Trijų sukinių galimos skirtingos orientacijos [21].

Šiuo atveju intensyvumai pasiskirsto (1:3:3:1) ir spektre gauname kvartetą. Pagrindinė taisyklė į kiek smailių bus suskilusi smailė yra tokia: $n + 1$, čia n – yra artimų skirtingų protonų skaičius. Toje pačioje aplinkoje esantys branduoliai nedaro įtakos vienas kito smailės išskyrimui [24].

2. Metodinė dalis

2.1. Vaisių sulčių paruošimas izotopų santykio matavimui

Mėginių ruošimo metodika sulčių cukrui išskirti:

1. Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilama apie 50 ml natūralių arba atgamintų sulčių.
2. Centrifuguojama 10 min.

Sulčių pulpa turi atsiskirti nuo vandeninės sulčių dalies ir iškristi į nuosėdas. Jei po 10 min. centrifugavimo nuosėdos nespėja iškristi – centrifugavimo pakopa gali būti kartojama.

3. Viršutinis skystis nupilamas į mėgintuvėlį.
4. Į nupiltą skystį pridedama 2 g kalcio hidroksido miltelių.
5. Viskas gerai sumaišoma magnetinėje maišyklėje 3 min šildant 90 °C temperatūros vandens vonelėje.
6. Centrifuguojama 3 min.

7. Skaidrus viršutinis sluoksnis nupilamas (dekantuojamas).
8. Tirpalas parūgštinamas 0,1 mol/l sieros rūgštimi kol pasiekama maždaug 5 pH, o tirpalo spalva pasikeičia.
9. Tirpalas paliekamas nakčiai (maždaug 15 val.) šaldytuve esant maždaug 4 °C temperatūrai.
10. Skaidrus viršutinis sluoksnis nupilamas (dekantuojamas).
11. Skystis išdžiovinamas sublimuojant.
12. Gautas liofilizatas homogenizuojamas grūstuvėje ir patalpinamas į stiklinį buteliuką su oro nepraleidžiančiu plastikiniu gaubtuku.

Mėginių ruošimo metodika sulčių pulpai išskirti:

1. Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilama apie 50 ml natūralių arba atgamintų sulčių.
2. Centrifuguojama 10 min.
3. Viršutinis skystis nupilamas į mėgintuvėlį.
4. Į nupiltas kietas daleles suspenduojama 40 ml vandens.
5. Maišoma 5 min.
6. Suspensija centrifuguojama 10 min vanduo po centrifugavimo nupilamas.
7. 4, 5 ir 6 žingsniai kartojami dar du kartus.
8. Į nupiltas kietas daleles suspenduojama 40 ml acetono.
9. Maišoma 5 min.
10. Suspensija centrifuguojama 10 min, acetonas po centrifugavimo nupilamas.
11. 8, 9 ir 10 žingsniai kartojami dar du kartus.
12. Kieta medžiaga išdžiovinama sublimuojant.

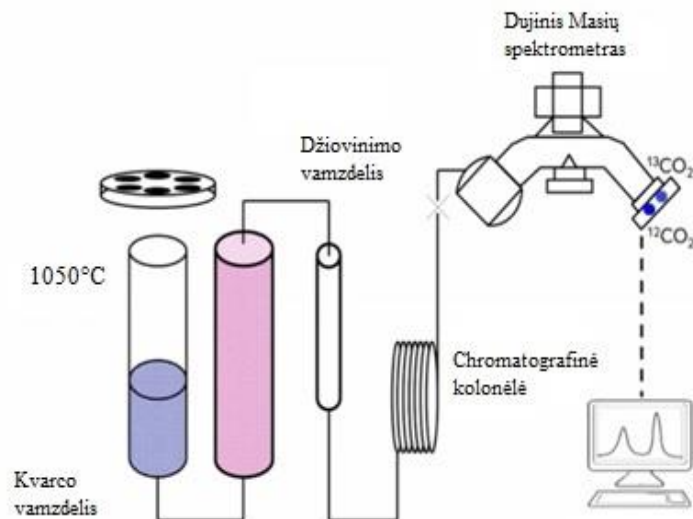
Prieš stabilųjų izotopų matavimą, reikiama bandinio masės dalis pasverinama, sudedama į alavo kapsulę ir yra paruošta matavimui.

Anglies izotopų santykis mėginyje matuojamas elementiniu analizatoriumi susietu su izotopų santykio masių spektrometru.

2.2. Izotopų santykio masių spektrometro veikimo principas

Norint nustatyti izotopų santykį yra reikalingas izotopų santykio masių spektrometras, toks kaip ThermoFisher EA-IRMS, prijungtas prie elementinio analizatoriaus [5]. Pirmiausia paimas mažas kiekis tiriamo mėginio (apie 1mg). Jis yra įdedamas į mažą alavinę kapsulę ir pasveriamas. Alavinę kapsulę reikia kruopščiai ir steriliai užlankstyti tam, kad į analizę neprikristų pašalinių organinių junginių, kurie galėtų daryti įtaką matavimo rezultatams. Tam, kad sterilumo sąlyga būtų patenkinta yra naudojami pincetai alavinės kapsulės sulankstymui ir yra naudojamas etanolis nuvalant pincetus po kiekvienos analizės pasvėrimo. Tada mūsų turimą bandinį reikia įdėti į automatinį mėginių paleidimo įrenginį, kurio pagalba mėginiai vienas po kito yra įleidžiami į masių spektrometrą taip, kad prieš tai matuotas mėginys neturėtų įtakos kitam matuojamam mėginiui.

Toliau mėginys yra įleidžiamas į aukštos temperatūros kamerą. Deginimas vyksta deguonies atmosferoje, kvarcinėje degimo kameroje, kad degimo produktai gautųsi CO_2 , H_2O ir NO_x , (šis prietaisas gali būti naudojamas ir azoto izotopų santykio matavimui). Degimo kameroje taip pat būna dar patalpinti Cr_2O_3 ir $\text{Co}_3\text{O}_4+\text{Ag}$ junginiai (jie yra skirti tam, kad būtų sugaudomi sulfatai ir halogenai) bei gali būti dar ir kitokių priedų priklausomai nuo tyrimo specifinių reikalavimų. Reaktoriaus temperatūra yra palaikoma $900 - 1050^\circ\text{C}$, bet alavinėse kapsulėse temperatūra gali siekti ir 1800°C (tokia temperatūra reikalinga tam, kad mėginys visiškai būtų oksiduotas, tai yra visiškai sudegtu). Tokioje temperatūroje yra nutraukiami visi cheminiai ryšiai jungiantys organiniuose junginiuose esančius atomus ir dėl to visi mėginyje esantys anglies atomai gali prie savęs prisijungti deguonies atomus. Kad kvarcinis reaktorius neužsiterštų kitais degimo metu susidariusiais pašaliniais produktais, yra rekomenduojama naudoti keičiamą kvarcinį vamzdelį, kuris priklausomai nuo jo tipo galėtų būti keičiamas kas 50 – 150 matavimų.



10 pav. Izotopų santykio spektrometro principinė schema

Sudegintas ir paverstas į anglies dioksido dujas tiriamasis mėginys yra nukreipiamas į džiovinimo vamzdelį. Ten jis patenka nešančiųjų dujų (He dujų) srauto dėka, kurio pagrindinė funkcija yra pernešti visą tiriamąjį mėginį pro tolimesnes prietaiso dalis iki masių spektrometro. Džiovinimo vamzdelyje yra pašalinamas vanduo, kuris susidaro degimo metu. Kaip yra žinoma, degant organiniams junginiams pagrindiniai cheminės reakcijos produktai yra anglies dioksidas ir vanduo. Džiovinimui yra naudojamas magnio perchloratas $Mg(ClO_4)_2$, dar žinomas kaip anhidronas. Jis ypatingas tuo, kad labai gerai reaguoja su vandeniu.

Toliau CO_2 yra gabenamas į dujų chromatografinę kolonėlę. Chromatografinė kolonėlė yra labai plona ir ilgas vamzdelis, kurio viduje yra sorbentas (jis gali būti tiek skystas, tiek kietas, dažniausiai naudojama medžiaga yra medžio anglis). Dujos tekėdamos chromatografinė kolonėlė yra lėtinamos atitinkamai pagal jų masę ir chemines savybes. Tai yra svarbu, nes tokiu būdu yra atskiriamos dujos vienos nuo kitų laike, tai yra dujos pro kolonėlę išeina skirtingais laiko tarpais. Taigi tokiu būdu CO_2 dujos yra atskiriamos nuo kitų, pašalinių, dujų, ir tada patenka į masių spektrometrą.

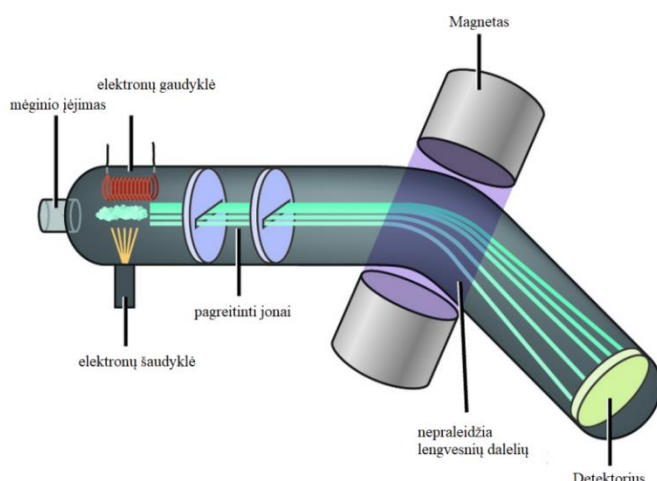
Masių spektrometre CO_2 yra jonizuojamos panaudojant elektronų jonizacijos metodą, kai dujų sraute tekančios dujos yra apšaudomos elektronais. Tokiu būdu yra išmušami elektronai iš CO_2 dujų. Tada, jau jonizuotos, CO_2 dujos yra pagreitinamos ir fokusuojamos, nustatant reikiamą magnetinį lauką ir įtampos. Magnetiniame lauke dalelės dėl Lorencio jėgos pakeičia savo judėjimo trajektoriją, atsilenkdamos tam tikru kampu [5].

$$\vec{F}_L = q(\vec{v} \times \vec{B}), \quad (14)$$

čia \vec{F}_L – Lorencio jėga, q – dalelės krūvis, \vec{v} – dalelės greitis, \vec{B} – magnetinė indukcija.

Kaip matoma iš (14) formulės, dalelės greitis yra vektoriškai sudaugintas su magnetinio lauko indukcijos vektoriumi. Tai reiškia, kad dalelė pakeis savo kryptį pagal dešiniojo sraigto taisyklę. O dėl pirmojo Niutono dėsnio (inercijos dėsnio) dvi chemiškai vienodos dalelės, bet turinčios skirtingas mases (šiuo atveju $^{13}\text{CO}_2$ ir $^{12}\text{CO}_2$) atsilenks skirtingais kampais. Lengvesnės dalelės atsilenkia didesniu kampu, nei sunkesnės. Keičiant magnetinio lauko stiprį ir jonų pagreitinimo įtampą galima valdyti dalelių trajektorijas ir nukreipti jas į detektorių (Faradėjaus puodelis), kur yra detekuojama elektringoji dalelė ir užregistruojamas elektrinis impulsas. Taip yra tiksliai išmatuojamas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykis [5].

Šį metodą gal riboti tai, kad pridėtinis cukrus, dėl tam tikrų priežasčių, gali savyje turėti tokį patį arba panašų $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykį, kaip ir tiriamas objektas. Dėl to spektre vaisių sulčių cukraus izotopinis pokytis nebus matomas, nors ir sultyse būtų ištirpinta papildomo cukraus, nes tiesiog jis yra toks pats kaip ir cukruje.



11 pav. Izotopų santykio masių spektrometro principinė schema.

2.3. Mėginių paruošimas matavimams SNIF-NMR metodu.

Atliekant eksperimentą sultys buvo tiriamasis mėginys. Tiriama, kad į jas nebuvo pridėta papildomo cukraus (t.y ant pakuotės buvo parašyta, kad sultys yra 100% natūralios) [16]. Cukrui paversti etanoliu, ir vėliau etanoliumi išdistiliuoti buvo naudojama sekanti metodika:

Vienas litras kiekvienų sulčių buvo supiltas į dviejų litrų talpos butelius.

Į kiekvieną iš butelių buvo suberta po 10g sausų mielių.

Į butelius pripūsta azoto dujų, kad būtų sumažinta deguonies koncentracija esanti inde.

Buteliai yra kruopščiai užsandarinami ir išvedamas vamzdelis į stiklinę su vandeniu. Tai yra reikalinga, kad reakcijos metu susidariusios CO₂ dujos galėtų išeiti iš indo. Taip yra sukuriama bedegūoninė aplinka inde. Ji yra sukuriama tam, kad glikolizės metu susidaręs piruvatas nesuoksiduotų ir prisijungęs vandenilio jonus galėtų susifermentuoti iki etanolio.

Taip paruošti mėginiai buvo paliekami trim parom, kad susifermentuotų visas sultyse esantis cukrus. Norint sužinoti, kada susifermentavo visas cukrus, indikatoriumi galima laikyti CO₂ dujų susidarymą, tai yra, jeigu pro vamzdelį teka dujos ir vanduo burbuliuoja, vadinasi, dar vyksta glikolizės reakcija ir dar ne visas cukrus yra susifermentavęs. O kai CO₂ dujos jau nebesiskiria tada galima sakyti, kad pasigamino visas etanolis, kiek tik jo galėjo susidaryti.

Praėjus trimis dienoms mėginiai yra prakošiami naudojant filtrą ir supilami į kolbą.

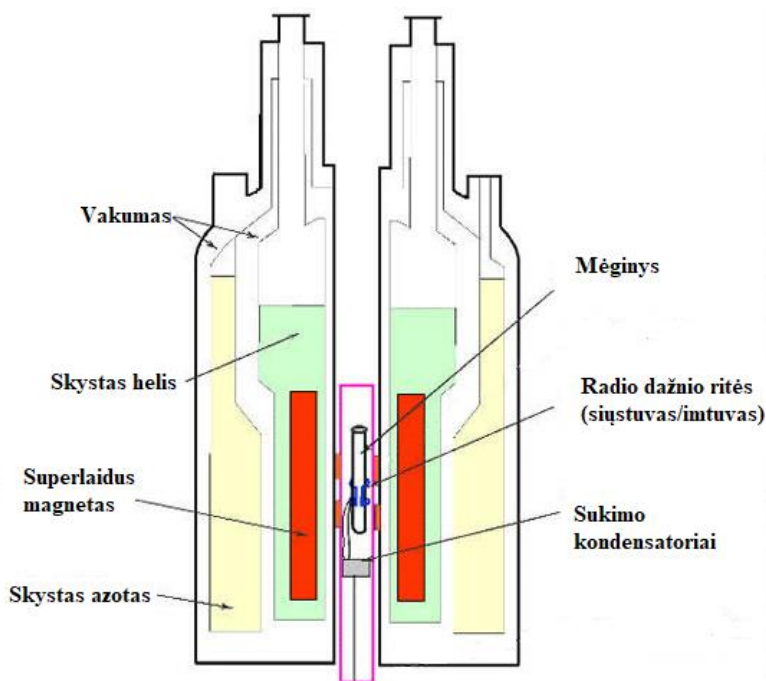
Tada mėginys yra įstatomas į distiliatorių ir pakaitinamas iki 79°C, Tai yra daroma tam, kad mėginyje esantis alkoholis pradėtų virti ir taip jį būtų galima atskirti nuo kitų priemaišų. (etanolio virimo temperatūra yra 78,37°C).

Tada išdistiliuotas etanolis yra patalpinamas į Branduolių magnetinio rezonanso spektrometrą ir išmatuojamas etanolio branduolių magnetinio rezonanso spektras. Iš spektro smailių intensyvumo yra nustatomas anglies ¹³C izotopų santykis tarp CH₃ ir CH₂ fragmentų etanolio molekulėje.

2.4. BMR spektrometro veikimo principas

Pagrindinis BMR spektrometro elementas yra galingas magnetas. Jo viduje yra ritės ir tarp kurių statomas paruoštas matavimams mėginys. Mėginys turi būti įstatytas į specialų laikiklį. Laikiklis yra sukamas, kad visas bandinys patirtų tolygų magnetinį lauką. Eksperimento metu viena iš ričių esanti tarp magnetų skleidžia vienodo dažnio elektromagnetines bangas, o tuo pat metu magnetinis lauko indukcija yra didinama, dėl to sužadavimo energijos lygmenys bandinyje plečiasi. Galiausiai energijos lygmenų skirtumas pasiekia tokią vertę, kuri yra lygi radijo bangų siūstovo skleidžiamų bangu dažniui. Tada branduolio sukinių būna sužadinti ir įvyksta rezonanso efektas.

Po kurio laiko sukiniai pradeda relaksuoti išspinduliuodami energijos kvantą, kuris yra fiksuojamas kitomis ritėmis, esančiomis tarp magnetų. Jos sukuria impulsą, kuris yra užregistruojamas ir taip yra užrašomas branduolių magnetinio rezonanso spektras.



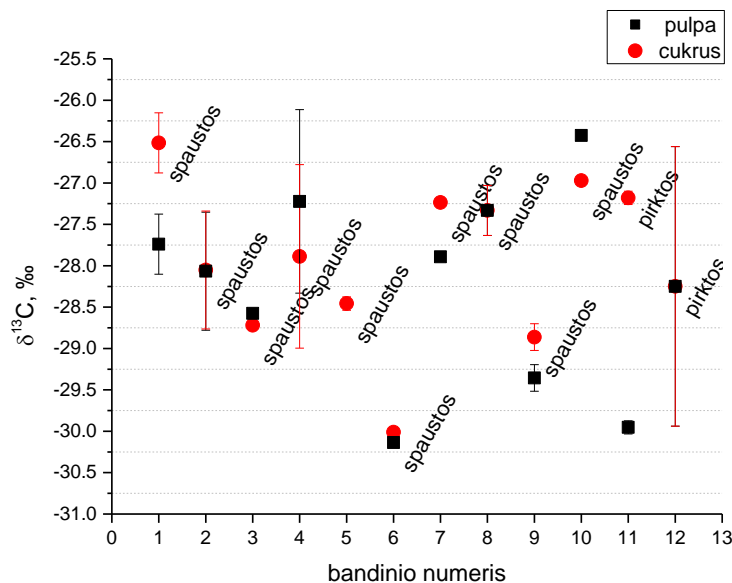
12 pav. BMR spektrometro principinė schema.

Superlaidžiam magnetui, kad jis atliktų savo funkciją, reikia palaikyti kaip įmanomą mažesnę temperatūrą. Tam yra naudojamas skystas helis, nes jo virimo temperatūra yra 4,6 °K. O tam, kad būtų taupomos skysto helio atsargos ir jis neišgaruotų greitai, yra naudojamas dar ir skystas azotas, o jo virimo temperatūra yra 77 °K [24].

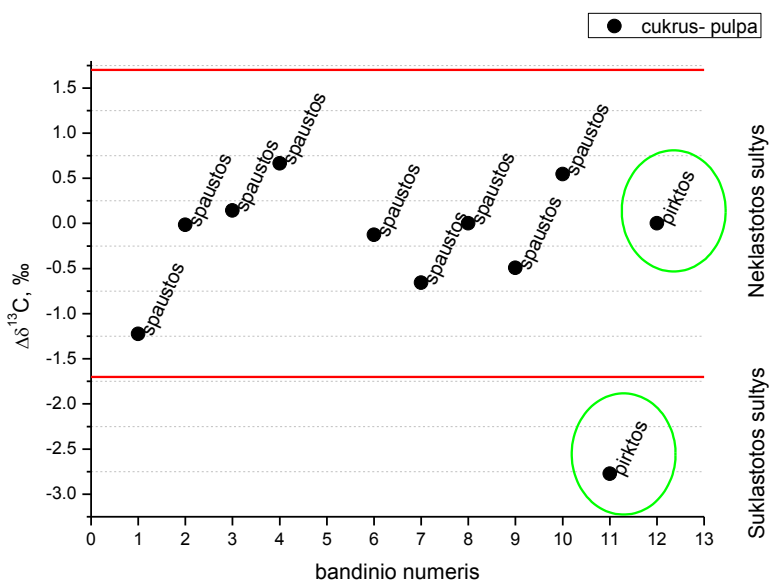
3. Rezultatai

Eksperimento metu buvo matuojami $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykiai. Matavimui buvo naudojami tokie mėginiai: dvi komercinėse parduotuvėse pirktos lietuviškos obuolių sultys (bandinio numeriai 11, 12) ir dešimt šviežiai laboratorijoje spaustų, Lietuvoje augintų, obuolių sulčių (bandinio numeris 1 – 10). Obuoliai buvo nulupami ir sutarkuojami su maistine plienine tarka, gauta tyrė buvo dedama į marlę ir prakošiama. Taip buvo daroma dėl to, kad neprakošta tyrė buvo per daug tiršta, jog įdėjus ją į centrifugą būtų galima atskirti nuosėdas nuo sulčių. Prakošus sultys buvo pilamos į vieną mėgintuvėlį, o marlėje likusios nuosėdos buvo atskiedžiamos vandeniu ir abu mėgintuvėliai toliau

buvo ruošiami pagal sulčių mėginių ruošimo schemą, kuri yra aprašyta 2.1 skyriuje. Kiekvienas bandinys buvo sveriamas du kartus ir taip pat matuojamas du kartus ir po to gauti rezultatai buvo suvidurkinti ir pateikti grafike(13,14pav).



13 pav. Obuolių sulčių cukraus ir pulpos anglies izotopų santykių vertės.



14 pav. Obuolių sulčių cukraus ir pulpos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykių skirtumas.

Iš 13,14 pav. aiškiai matosi, kad net trijuose mėginiuose Nr. 2, 8 ir 12 izotopų cukruje esantis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykis idealiai atitinka pulpos izotopų santykį, tai reiškia, kad juose visiškai nebuvo pridėta papildomų cukrų. Mėginių Nr. 1, 3, 4, 7, 9, 10 rezultatai nėra tokie puikūs kaip Nr. 2, 8, 12, tačiau tiriant pagal šią metodiką buvo gauta, kad į juos taip pat nebuvo pridėta cukraus, nes

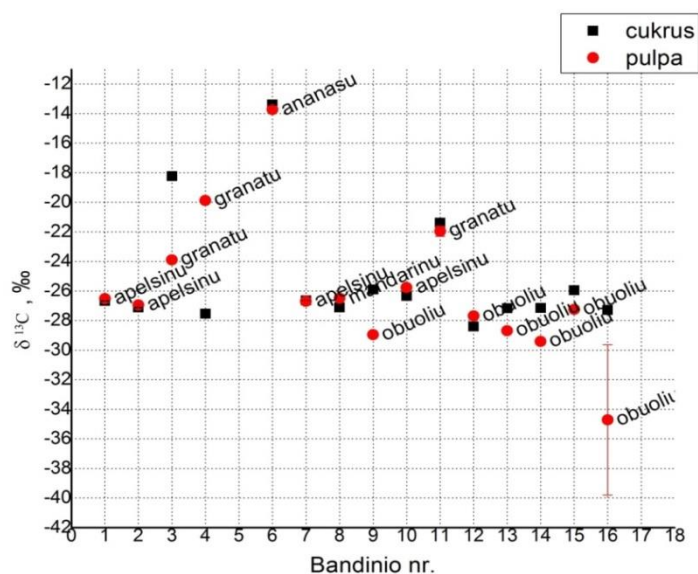
jie yra patikimumo rėžių ribose (14 pav., raudona linija). Tokio rezultato ir reikėjo tikėtis, nes spaudžiant sultis nebuvo dedama papildomų saldinimo priemonių. Tačiau mėginio Nr. 11, rezultatai parodė, kad jo izotopų $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, santykis cukruje skiriasi nuo $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykio pulpoje net 2,8‰ ir 1,1‰ viršija leistiną patikimumo ribą, ties kuria dar galima sakyti, kad sultyse nėra papildomo cukraus.

Stabilių izotopų santykis Lietuvos obuoliuose svyruoja nuo $\delta^{13}\text{C} = -26,5$ iki -30‰ (6 pav.), tai ne visai atitinka $\delta^{13}\text{C} = -25,6\text{‰}$ vidutinę santykio vertę, kurią gavo D. A. Magdas, publikuodama savo darbą, tačiau tai nereiškia, kad mūsų matavimas buvo klaidingas, nes D. A. Magdas tyrė Rumunijos obuolių sulčių izotopų santykį [10]. Tai yra logiška, kad šie santykiai skiriasi, nes Lietuvoje ir Rumunijoje yra kitokios klimato sąlygos, kurios ir nulemia šių santykių skirtumą.

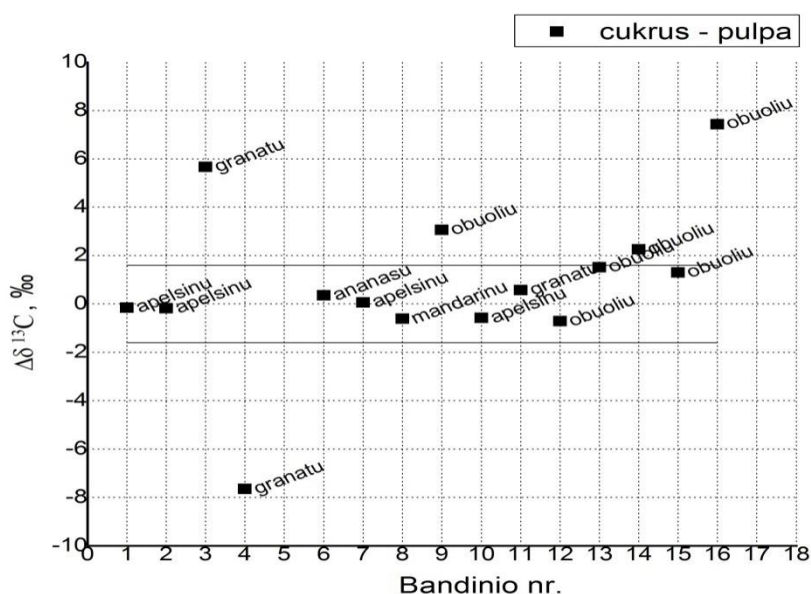
Brazilijoje augančių obuolių izotopų santykio vidutinė vertė δ siekė $-27,38\text{‰}$. Juos matavo R. Figueira savo publikacijoje [12]. O tai patenka į mūsų darbo gautų verčių intervalą ir tai rodo, kad Lietuvoje augančių obuolių izotopų santykis yra panašus į Brazilijoje augančių obuolių izotopų santykį.

Taip pat ir Karmen Bizjak Bat matavo anglies izotopų santykį obuolių sultyse, kurios buvo spaustos Slovėnijoje [13]. Mokslininkės gauti rezultatai rodo, kad $\delta^{13}\text{C}$ vertė svyruoja nuo -28 iki -30‰ . Šie rezultatai taip pat yra panašūs į Lietuvoje augančių obuolių anglies izotopų santykio rezultatus.

Dar buvo išmatuoti 16 sulčių mėginiai, naudojant stabilų izotopų metodą, siekiant išanalizuoti ar į tam tikras sultis buvo pridėta papildomo cukraus ar ne, ir taip nustatyti sulčių klastojimo atvejus. Šių sulčių mėginiai buvo imami iš Lietuvos rinkoje parduodamų sulčių. Šioje analizėje tai išsiaiškinti taip pat buvo naudojamas stabilų anglies izotopų santykių metodas, kurio metu buvo nustatomos $\delta^{13}\text{C}$ vertės sulčių cukruje ir pulpoje. Kaip matoma iš 15 pav. – skirtingų sulčių izotopų santykiai yra skirtingi.



15 pav. Sulčių cukraus ir pulpos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykio vertės PDB skalėje.

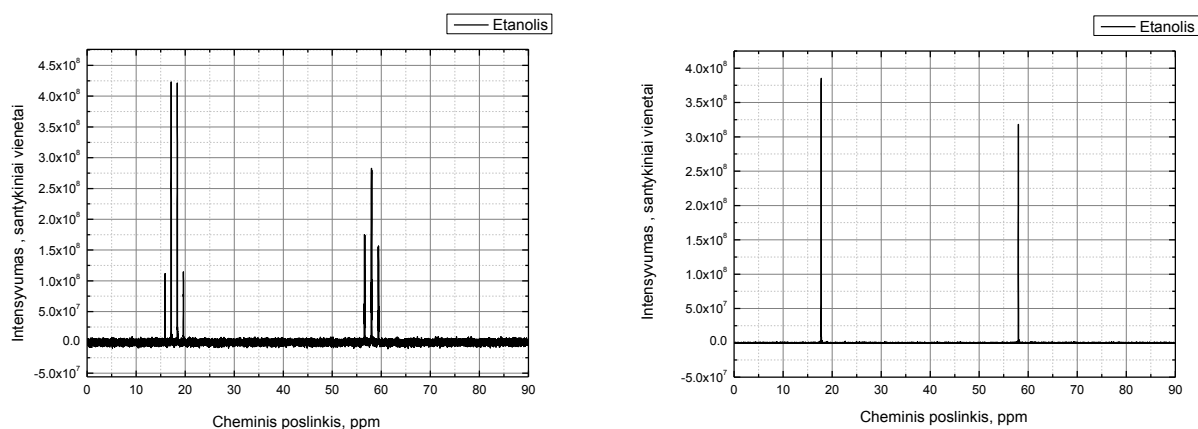


16 pav. Sulčių cukraus ir pulpos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykių skirtumas

Iš 15,16 pav. matoma, kad mėginiuose Nr. 3,4, 9, 14, 16. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykis pulpoje yra kitoks, nei jų cukruje, dėl to galima daryti išvadą, kad į šiuos mėginius buvo pridėta papildomo C_4 cukraus, kas ir parodo, kad šie produktai jau nebėra autentiški. Bandiniuose Nr. 13 ir 15 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykis pulpoje skiriasi nuo santykio cukruje, bet tas santykio skirtumas nėra toks didelis, kad būtų galima laikyti, jog į šiuos mėginius buvo pridėta papildomo cukraus, bet taip pat negalima ir visiškai pripažinti, kad ten jo nėra, nes šių mėginių $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykis vos patenka į patikimumo režių ribas 1,6‰. Mėginiai Nr. 1, 2, 6, 7, 8, 10, 11, 12 patenka į patikimumo ribas, dėl to, kad

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopų santykio cukruje ir pulpoje skirtumas yra pakankamai mažas. Dėl to galima laikyti, kad į šiuos bandinius nebuvo pridėta papildomo C_4 augalų cukraus. Bandinyje Nr. 4 dėl neaiškių priešasčių cukraus ir pulpos santykių skirtumas buvo išmatuotas neigiamas, ko nebuvo galima tikėtis, nes tai reikštų, jog į šį mėginį buvo pridėta cukraus su mažesniu nei -20% , kas reikštų, jog į šias sultis buvo pridėta cukraus ne iš cukranendrių, kurios užima 80% pasaulinės cukraus rinkos [15].

Galiausiai dar trys vaisių sulčių mėginiai, buvo išmatuoti taikant SNIF – NMR metodiką. Šie mėginiai buvo paimti iš komercinių prekybos tinklų. Šie mėginiai buvo tokie: apelsinų sultys (žr. 18 pav., nr 1, 2) ir granatų sultys (žr. 18 pav., nr 3). Kaip metodikoje aprašyta, šie mėginiai buvo sufermentuoti ir išdistiliuoti, kad būtų galima gauti kaip įmanoma grynesnį alkoholį (žr. 2.3. skyrelį). Grynas etanolis buvo matuojamas su BMR spektrometru ir buvo gauti tokio tipo spektrai, kokie yra pavaizduoti 17pav.



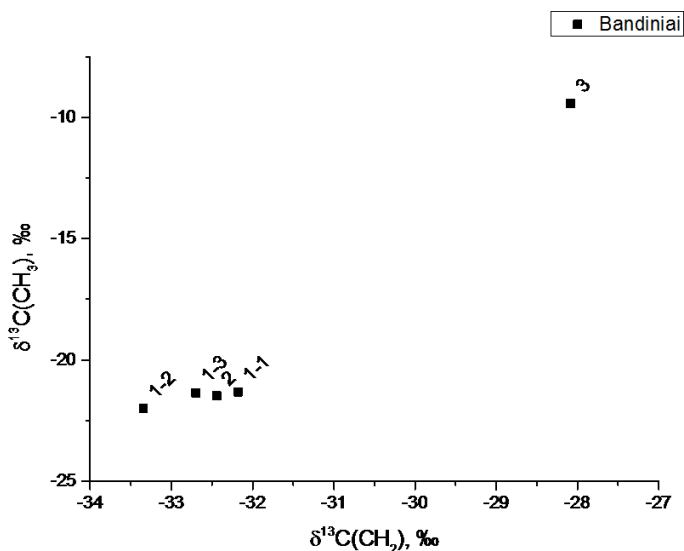
17 pav. BMR spektrai, su sukinių tarpusavio sąveika (kairėje) ir be jos (dešinėje).

Iš spektre esančių CH_3 ir CH_2 smailių intensyvumų buvo nustatyta, koks yra ^{13}C izotopo santykis tarp metileno ir metilo frakcijų etanolio molekulėse. Tuo tarpu su izotopų santykio masių spektrometru buvo išmatuotas $\delta^{13}\text{C}$ vertė etanolyje.

2 lentelė. Etanolio $\delta^{13}\text{C}$ vertė ir CH_3/CH_2 frakcijų santykis.

	Bandinio Nr.	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$	M/E(^{13}C)
apelsinai	1_1	-26.75	1.0111
apelsinai	1_2	-27.68	1.0116
apelsinai	1_3	-27.03	1.0116
apelsinai	2_2	-26.96	1.0112
granatos	3_2	-18.75	1.019

Galiausiai buvo apskaičiuotos $\delta^{13}\text{C}$ vertės CH_3 ir CH_2 frakcijoms ir atidėtos paveiksle (18 pav.)



18 pav. Dvimatis etanolio frakcijų $\delta^{13}\text{C}$ santykio pasiskirstymas.

18 pav, pirmas bandinys buvo matuojamas tris kartus, nes buvo norima įsitikinti, kad distiliavimo metu nebuvo patekę papildomų priemaišų ir ar jos gali daryti didelę įtaką izotopiniam santykiui. Tam atlikti buvo paaimami mėginiai skirtingais laiko tarpais nuo distiliavimo pradžios ir iš (18 pav.) matosi, kad esminių skirtumų nėra.

Apelsinų (nr 1,2) mėginiai gerai atitinka tipines apelsinams $\delta^{13}\text{C}$ vertes, patenka į sritį, kurioje turėtų būti C3 metabolizmą vykdančios augalai (žr. 18, 4 pav), tai reiškia, kad šios sultys nebuvo suklastotos. Tačiau bandinio nr 3 (granatų sultys) $\delta^{13}\text{C}$ vertės yra arti verčių, kurioms būdingas C4 metabolizmą vykdančioms augalams. Iš literatūros žinoma, kad granatų sulčių $\delta^{13}\text{C}$ vertė yra apie -26,4 ‰ [25] augalai. Tai reiškia, kad į šias sultis buvo pridėta papildomo cukraus (greičiausiai cukranendrių) ir jos yra suklastotos.

Išvados

Izotopų santykio masių spektrometrijos metodu nustatyta, kad Lietuvoje augančių obuolių stabiliųjų anglies izotopų $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykio vertės svyruoja nuo -26,5 iki -30 ‰. Šios vertės yra palyginamos su kitose šalyse augintų obuolių $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykio vertėmis.

Atlikus stabiliųjų anglies izotopų santykio matavimus cukruje ir pulpoje (12 mėginių) nustatyta, kad iš dviejų Lietuvoje pirktų lokaliai pagamintų sulčių į vienas buvo pridėta papildomo cukraus. Taip pat nustatyta, kad iš komerciškai pirktų sulčių (18 mėginių), buvo klastočių granatų ir obuolių sulčių atvejais. Tiriamuose mėginiuose, apelsinų, ananasų ir mandarinų sultys neturėjo pridėtinio cukraus.

Išmatavus padėties specifines ^{13}C vertes etanolyje (gautame sufermentavus vaisių sultis) branduolių magnetinio rezonanso metodu, nustatyta, kad į komerciškai pirktas granatų sultis buvo pridėta papildomo cukraus.

Summary

Aivaras Ginaučius

Investigation of fruit juices adulteration by isotopic analysis methods

The aim of this work was to investigate $\delta^{13}\text{C}$ ratios in apples (sugar and pulp) growing in Lithuania, in apple juice made in Lithuania and other fruit juices that are sold in the market. From the collected juice samples sugar and pulp were separated. Then $\delta^{13}\text{C}$ ratios were measured in pulp and sugar to check possible forgery of product. These measurements were made using isotope ratio mass spectrometry. Other investigation was made fermenting fruit juices to produce ethanol, from which $\delta^{13}\text{C}$ ratios were measured in methyl and methylene groups using nuclear magnetic resonance. We found that apple and pomegranate juices were mislabeled (additional sugar was added), while orange, mandarin and pineapple juices showed no traces of additional sugar.

Literatūros sąrašas

- [1] J. Mažeika. Izotopiniai metodai aplinkos tyrimuose. 2011 m.
- [2] B. Fry. Stable isotope ecology. 2008 m.
- [3] A. T. Lebedev. Comprehensive environmental mass spectrometry. 2012 m.
- [4] <http://www.uga.edu/sisbl/stable.html#calib> Overview of Stable Isotope Research – The Stable Isotope/Soil Biology Laboratory of the University of Georgia Institute of Ecology. (žiūrėta 2018.01.09)
- [5] J.F. Canter and V.J.Barwick (eds), Good practice guide for izotope raio mass speercoscopy, FIRMS ISBN 978-0-948926-31-0. 2011 m.
- [6] J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer, Chapter 20.1 The Calvin cycle synthesizes hexoses from carbon dioxide and water. Biochemistry (5th ed). 2002 m.
- [7] A.S. Holaday; G. Bowes. C₄ Acid Metabolism and Dark CO₂ Fixation in a Submersed Aquatic Macrophyte (*Hydrilla verticillata*). Plant Physiology 65(2) 331 – 335. 1980 m.
- [8] D. De, Crassulacean acid metabolism. Plant cell vacuoles: an introduction. 2000 m.
- [9] M. Antolovich, X. Li, K. Robards. Detection of adulteration in Australian orange juices by Stable Carbon Isotope Ratio Analysis (SCIRA) J. Agric. Food Chem., 2001, 49 (5), 2623–2626. 2001 m.
- [10] D. A. Magdas G. Cristea, R. Puscas, F. Tusa. The Use of Isotope Ratios in Commercial Fruit Juices Authentication. Chemical Papers- Slovak Academy of Sciences 66(2) 2013 m.
- [11] R.Figueira, W.G.V.Filho, C.Ducatti, A.M.P.Nogueira. Isotope Analysis ($\delta^{13}\text{C}$) of Pulpy whole Apple Juice. Food Science and Technology Vol. 31 (3) 2011 m.
- [12] O. Kracht, A. Hilker, Thermo Fisher Scientific EA-IRMS: Detection of honey adulteration. Application note. 2016 m.
- [13] K.B. Bat, K. Eler, D. Mazej, B. M. Vodopivec, I. Mulic, P. Kump, N. Ogrinc Isotopic and elemental characterisation of Slovenian apple juice according to geographical origin: Preliminary results. Food Chemistry, Vol. 203 (15) , 86-94. 2016 m.
- [14] B. Fry, A. Joern and P. L. Parker. Grasshopper Food Web Analysis: use of Carbon Isotope ratios to examine feeding relationships among terrestrial herbivores. Ecology, Vol. 59 (3). 2014 m.

- [15] <https://www.theice.com/article/eu-sugar-market-preps-for-end-to-production-quota>. (žiūrėta 2017.01.08)
- [16] F. Thomas, C. Randet, A. Gilbert. Improved characterization of the Botanical Origin of Sugar by Carbon- 13 SNIF-NMR Applied of Ethanol. 2010 m.
- [17] G. G. Martin, R. Wood, G. J. Martin. Detection Of Added Beet Sugar In Concentrated And Single Strength Fruit Juices By Deuterium Nuclear Magnetic Resonance (Snif-Nmrr Method): Collaborative Study. 1996 m.
- [18] S B Raj, S. Ramaswamy, and B V. Plapp. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. 2014 m.
- [19] L. M. Harwood, C. Moody. J. Experimental organic chemistry: Principles and Practice Illustrated ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publicationspp. 141–143. 1989 m.
- [20] V. Balevičius, L. Kimtys, G. A. Misiūnas. Magnetinio Rezonanso Spektrometrija. pp 10-46; 84-87; 106-115. 2000 m.
- [21] <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/nmr1.htm> Nuclear Magnetic Resonance Specroscopy Theoretical Principles (žiūrėta 2018.05.20)
- [22] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger. "NMR Nomenclature. Nuclear Spin Properties And Conventions For Chemical Shifts (IUPAC Recommendations 2001)". 2001 m.
- [23] J.A. Pople, H. J. Bernstein, W. G. Schneider, "The Analysis Of Nuclear Magnetic Resonance Spectra". 1957 m.
- [24] <https://chembam.com/techniques/nmr/> Nuclear Magnetic Resonance (žiūrėta 2018.05.20)
- [25] D. A. Krueger, Composition of Pomegranate Juice, Journal of AOAC international, 95 (1), pp 163-168. 2012 m.