

**Vilniaus universitetas
Fizikos fakultetas
Cheminės fizikos institutas**

Edgar Kijevič

Stabilių anglies izotopų santykio matavimai pieno riebalų rūgštyse

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Aplinkos ir cheminės fizikos
studijų programa

Studentas

Edgar Kijevič

Leista ginti

2018-05-25

Darbo vadovas

Dr. Andrius Garbaras

Instituto direktorius

Prof., Dr. Valdas Šablinskas

Vilnius 2018

Turinys

Įvadas	3
2. Literatūros apžvalga	5
2.1. Bendras riebalų apibrėžimas	5
2.2. Stabilių izotopų principas.....	8
2.3. Delta vertė δ	9
2.4. Stabilių izotopų matavimų taikymas	10
2.5. Izotopų cirkuliacija biosferoje.....	11
2.6. Anglies ciklas	14
3. Metodinė dalis	15
3.1. Dujų izotopų masės santykio spektrometrija.....	15
3.2. Jonizacija.....	16
3.3. Masių atskyrimas	17
3.4. GC/IRMS	17
3.5. Techninė dalis	17
3.6. Pieno riebalų rūgščių (FAME-fatty acids methyl esters) paruošimas	18
4. Rezultatai ir jų aptarimas.....	19
4.1. Bandinių derivatizacija.....	19
4.2. Matavimai su spektrometru	20
4.3. Riebalų rūgščių atpažinimas.....	22
4.4. Pieno riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertės.....	24
4.5. Anglies izotopų santykio matavimai ekologiškame piene	25
4.6. Anglies izotopų santykio matavimai pirktiniame piene	28
4.7. Ekologinio ir įprasto pieno atskyrimas.....	30
Išvados.....	32
Literatūros sąrašas	34

Ivadas

Pastaruoju metu didėja ekologiško pieno paklausa rinkoje. Todėl kyla pavojus, kad bus neteisingai ženklinti produktai, ypač dėl to, kad ekologiško pieno kaina yra daug didesnė už įprasto pieno kainą. Didėjantys ekologinio pieno pardavimai sąlygoja didesnę poreikį pieno autentiškumo nustatymui. Norint apsaugoti vartotojus nuo neteisingo pakuočių žymėjimo, reikalingas analitinis metodas ekologiškam pienui identifikuoti ir taip atskirti jį nuo įprasto pieno. Kadangi pieno sudėtis iš esmės priklauso nuo karvių šėrimo, tai riebiųjų rūgščių analizė gali padėti atskirti ekologinį pieną nuo paprasto.

Net išsamus dokumentavimas, skirtas užtikrinti kelią nuo gamintojo iki vartotojo ne visada gali padėti išvengti klaidų. Siekiant apsaugoti vartotoją nuo netinkamai paženklintų pieno produktų, produktų stebėsenos institucijoms gali būti naudingas produktų sudėties analizės metodas.

Visi ekologinės žemdirbystės standartai ir taisyklės nurodo panašias pieno gamybos taisykles, ypač galvijų šėrimo normas. Taigi visi pašarai turi būti gauti naudojant ekologinį ūkininkavimą be dirbtinių trąšų ar pesticidų, dažniausiai tame pačiame ūkyje. Koncentratų naudojimas yra ribotas, o pašaruose turi būti naudojamas didelis grūdų kiekis. Vasara pagrindinis pašaras turi būti šviežia žolė. Žiemą pašaras turi būti sudarytas iš didesnės dalies šieno, šiaudų ir grūdų kiekio. Šviežios žolės sunaudojimai tikėtinai turėtų būti didesni ekologinio pieno gamyboje lyginant su paprasto pieno gamyba kiekviename metu sezone.

Pieno riebalai yra lengvai išgaunama pieno sudedamoji dalis ir gali būti naudojama tyrimams atlikti. Pieno riebalų sudėtis dažniausiai priklauso nuo karvių pašaro. Didesnioji C18:3 rūgšties dalis (daugiau nei 60%), esanti žolės lipiduose, paverčiama kitomis C18 riebiosiomis rūgštimis karvės skrandyje. Taigi, C54 trigliceridų kiekis, turintis tris C18 riebalų rūgštis, yra didesnis pieno riebaluose iš karvių besiganančių laukuose negu iš karvių kurios yra šeriamos tvartuose. Dėl to yra skirtumas tarp riebiųjų rūgščių sudėties pieno riebaluose karvėse besiganančiose pievoje ir laikomų tvartuose. Tačiau priklausomai nuo pašaro, šis skirtumas gali būti mažesnis ten, kur karvės laikomos uždaroje patalpose ištisus metus.

Perspektyvus būdas stebėti šėrimo ypatumus yra stabilių izotopų santykio masių spektrometrija (IRMS). Gyvūnuose izotopų santykis visų pirma priklauso nuo suvartojamo maisto [1,2], nors dėl metabolizmo gali vykti ir praturtėjimas sunkesniais izotopais [3]. Anglies izotopų santykio vertę dažniausiai lemia C3 ir C4 augalų vartojimas, nes C4 augalai, tokie kaip kukurūzai ar cukranendrės, turi didesnę santykinę ^{13}C kiekį [4]. Kadangi ganyklose karvės maitinasi daugiausiai C3 augalais, pašaruose gali pasireikšti skirtingi $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykiai (išreikšti kaip $\delta^{13}\text{C}$). Todėl pienas gali parodyti staigius pokyčius anglies izotopu santykyje dėl pakitusio pašaro.

Darbo tikslas ir uždaviniai:

Darbo tikslas:

- Šio tyrimo tikslas - pritaikyti izotopų santykio masių spektrometrijos metodą atskiriant ekologišką pieną nuo įprastinio. Darbo tikslui pasiekti buvo analizuojama $\delta^{13}\text{C}$ santykių kaita individualiose pieno riebalų rūgštyse.

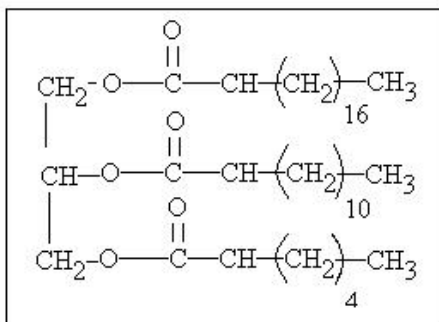
Darbo uždaviniai:

- Surinkti lietuviškos produkcijos pieno bandinius.
- Paruošti bandinius dujų chromatografijos – izotopų santykio masių spektrometrijos (GC/C/IRMS) tyrimams ir išmatuoti $\delta^{13}\text{C}$ santykių kaitą pieno riebalų rūgštyse.
- Identifikuoti pieno riebalų rūgštis išmatuotuose spektruose.

2. Literatūros apžvalga

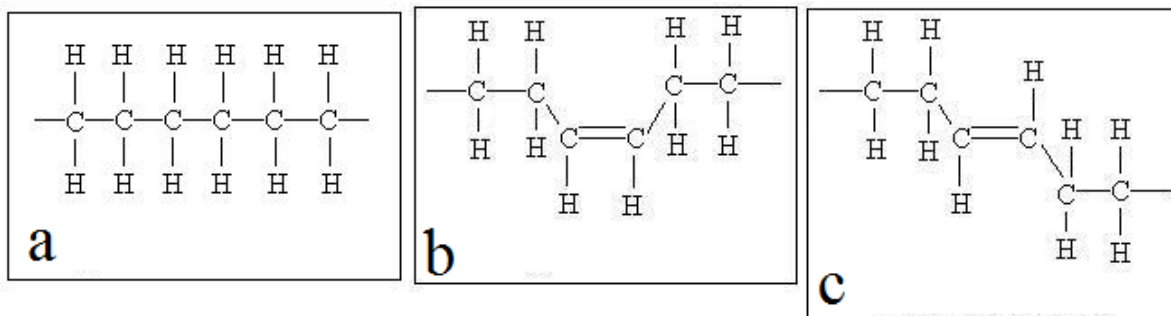
2.1. Bendras riebalų apibrėžimas

Riebalai yra sudaryti iš atskirų riebiųjų rūgščių molekulių prisikabinusių prie glicerolio 3-anglies pagrindo. Dažniausiai pasitaikantis riebalų tipas vadinamas trigliceridu arba triacilglicerinu, kuriame yra 3 riebiosios rūgštys pritvirtintos prie pagrindo [5].



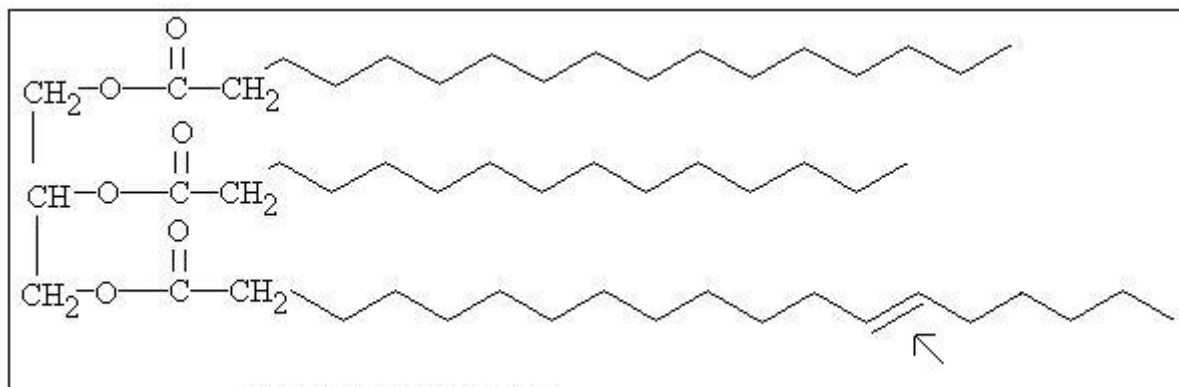
1 pav. Triglicerido pavyzdys, kuriame trys riebiosios rūgštys prisitvirtinusios prie glicerolio pagrindo[5].

Kadangi yra daug skirtingų riebiųjų rūgščių kurios gali būti pritvirtinamos prie pagrindo, yra daug įvairių rūšių trigliceridų ir riebalų. Riebalai taip pat gali būti digliceridai, kurių sudėtyje yra 2 riebalų rūgštys arba monogliceridai, kurių glicerolio pagrinde yra 1 riebalų rūgštis. Individualios riebalų rūgštys gali turėti nuo 4 iki 22 anglies atomų, gali būti tiesios arba šakotos grandinės. Riebiosios rūgštys gali būti prisotintos, tai reiškia, kad kiekviena anglis sujungta su kitu anglies atomu pavieniu ryšiu ir dar 2 vandenilio atomais, arba riebalų rūgštys gali būti nesočiosios, tai reiškia, kad anglis turi dvigubą ryšį su gretimą anglies atomu ir pavienį ryšį su kitu anglies atomu ir vandenilio atomu. Mononesotieji riebalai (ang. Monounsaturated) turi 1 dvigubą ryšį, o polinesotieji (ang. Polyunsaturated) riebalai turi 2 arba daugiau dvigubų ryšių anglies grandinėje. Ryšiai nesočiosios riebalų rūgštyse gali būti cis arba trans, priklausomai nuo anglies grandinės krypties iš abiejų dvigubos jungties pusių. "Cis" ryšis reiškia, kad riebalų rūgšties grandinė tęsiasi taip pat iš abiejų dvigubo ryšio pusių, formuojant "U" forma, o "trans" ryšis reiškia, kad riebalų rūgšties grandinė tęsiasi priešingoje ryšių pusėje, formuojant "Z" forma [5].



2 pav. Galimų triglicerido ryšių pavyzdžiai: a) sotusis ryšys, b) "Cis" ryšys, c) "Trans" ryšys [5].

Riebiosios rūgštys užrašomos tokiu trumpiniu: anglies atomų skaičius, dvitaškis ir dvigubų jungčių skaičius. Pavyzdžiui, C4:0 yra 4 anglies atomų grandinė neturinti dvigubų ryšių, o C18:1 yra 18 anglies atomų grandinė su 1 dvigubu ryšiu. Nesočiosioms rūgštims žymėjimas “c” naudojamas cis ryšiams, o “t” trans ryšiams. Pavyzdžiui C18:2 c,c yra 18 anglies atomų grandinė su 2 dvigubais ryšiais kur abu yra cis. Terminai omega-3 ir omega-6 parodo trečia arba šešta anglies atomą kur pirmas dvigubas ryšis pasirodo pradėdamas nuo grandinės galo, kuris nėra pritvirtintas prie glicerolio pagrindo. Graikiška raide omega Ω naudojama parodyti omega pozicijai [5].



3 pav. Triglicerido pavyzdys su Omega-6 ryšiu, rodyklė parodo Omega-6 ryšio vietą [5].

Pieno riebalai

Pieną sudaro maždaug 3,4% riebalų. Pieno riebalai daugiausiai susideda iš trigliceridų (98%), o kiti pieno lipidai yra diacylglycerolis (~2%), cholesterolis (mažiau 0,5%), fosfolipidai (apie 1%) ir laisvosios riebalų rūgštys (apie 0,1%) [6]. Pieno riebalai turi sudėtingiausia riebiųjų rūgščių sudėtį iš visu valgomųjų riebalų. Daugiau kaip 400 atskirų riebalų riebiųjų rūgščių buvo identifikuoti pieno riebaluose. Tačiau 90% pieno riebalų sudaryti maždaug iš 15-20 riebiųjų rūgščių. Pagrindinės riebiosios rūgštys pieno riebaluose yra sočiosios turinčios 4-18 anglies atomus (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0), mononesočiosios riebiosios rūgštys (C16:1, C18:1), ir poli nesočiosios riebiosios rūgštys (C18:2, C18:3). Kai kurios rūgštys randamos labai mažuose kiekiuose, bet prisideda prie unikalaus ir pageidaujamo pieno riebalų ir sviesto skonio. Riebiųjų rūgščių sudėtis pieno riebaluose per visa karves žindymosi ciklą nėra pastovi. Riebiosios rūgštys, kurių ilgis yra nuo 4 iki 14 anglies atomų, yra gaminamos gyvūno pieno liaukose. Kai kurios iš 16 anglies atomų rūgštys yra fermentuojamos gyvūno organizme, o kai kurios gaunamos iš gyvūno mitybos. Visos 18 anglies atomų riebiosios rūgštys gaunamos iš gyvūno mitybos. Pieno riebalų sudėties pokyčiai atsiranda dėl žindymo stadijos ir gyvūno energijos poreikių. Ankstyvoje žindymo stadijoje gyvūlio energijos poreikiams naudojamos kūno atsargos, ir turimas ribotas riebiųjų rūgščių kiekis riebalų sintezei, todėl riebiosios rūgštys naudojamos pieno riebalų gamybai gaunamos iš mitybos ir dažniausiai yra ilgosios grandinės C16:0, C18:0, C16:1 ir C18:2 riebiosios rūgštys. Tolimesnėje žindymo stadijoje daugiau riebiųjų rūgščių susidaro pieno liaukoje, todėl padidėja trumpųjų riebiųjų rūgščių grandinių (C4:0, C6:0) koncentracija lyginant su ankstyvaisiais žindymosi laikotarpiais [6].

Pieno riebalai sudaryti iš 65% sočiųjų, 30% mononesočiųjų ir 5% polinesočiųjų riebiųjų rūgščių. Riebiosios rūgštys išsidėsto triglicerido molekulėje specifiniu būdu. Dauguma trumpųjų grandinių riebiosios rūgštys yra apatinėje pozicijoje, o ilgesnes riebiosios rūgštys linkusios būti vidurinėje ir viršutinėje pozicijoje. Kadangi pieno riebaluose yra apie 400 riebiųjų rūgščių, teoriškai pieno riebalai gali turėti savyje daugeli tūkstančių triacilglicerolių. Net jei atsižvelgti tik į 15 riebiųjų rūgščių kurių koncentracija yra virš 1%, ir ignoruojant jų išsidėstymą specifinėse pozicijose triacilglicerolio molekulėje, vis tiek būtų 680 skirtingų kompozicinių triacilglicerolių. Pavyzdžiui triacilglicerolis su anglies numeriu C38 gali turėti tokius skirtingus išsidėstymus (C4:0, C16:0, C18:0; C4:0, C16:0, C18:1; C6:0, C14:0, C18:1). Riebiųjų rūgščių išsidėstymas triglicerolio pagrindu įtakoja pieno riebalu skoni, fizikines ir maistines savybes [6].

Ekologiškas pienas ir pieno produktai

Ekologiškas pienas ir pieno produktai gaunami iš gyvulių, išaugintų ekologinės gyvulininkystės ūkiuose. Jie apdorojami, gaminami, pakuojami, ženklinami, laikomi, gabenami ir realizuojami, laikantis ekologiniam ūkininkavimui ir gamybai nustatytų reikalavimų. Ekologiškas pienas ir pieno produktai pasižymi maistingumu, geru skoniu, juos gaminant nenaudojamos sintetinės cheminės medžiagos [7].

Ekologinės gyvulininkystės ūkyje laikomasi gyvulių laikymo reikalavimų ir sąlygų, užtikrinančių gyvulių gerovę:

- Gyvulių laikymui skirtose patalpose kiekvienam gyvuliui, atsižvelgiant į jo fiziologiją, elgesį, paveldimus poreikius, skiriama pakankamai erdvės, palaikoma reikiama temperatūra, drėgmė, oro cirkuliacija.
- Gyvuliai šeriami žole, pašariniais augalais, išaugintais ekologinės gamybos ūkiuose, ir kitais pašarais bei priedais, kurie leidžiami naudoti ekologinės gyvulininkystės ūkiuose. Ruošiant pašarus nenaudojamos sintetinės cheminės medžiagos.
- Laukai, kuriuose ganosi gyvuliai, negali būti šalia kelių. Atstumas priklausomai nuo transporto judėjimo intensyvumo svyruoja nuo 20 iki 150 metrų.
- Gyvulių negalima šerti: genetiškai modifikuotais pašarais bei jų priedais, gyvulinės kilmės produktais, augimą skatinančiais ar lėtinančiais preparatais, hormonais, sintetiniais apetitą ar produktyvumą skatinančiais preparatais, karbamiidu ir kitomis sintetinėmis azotinėmis medžiagomis, sintetinėmis amino rūgštimis.
- Gyvulių sveikatingumas ekologinės gamybos ūkyje pasiekiamas užtikrinant geras laikymo ir priežiūros sąlygas, aprūpinant subalansuotais ir geros kokybės pašarais, tinkama veterinarine priežiūra. Sintetinius medikamentus (ypač antibiotikus) išimtiniais atvejais gali skirti tik veterinarijos gydytojas. Po tokio gydymo pieną galima tiekti tik išlaukus nustatytą terminą.

Ekologiškos žaliavos pieno produktuose turi sudaryti ne mažiau kaip 95 proc. Gali būti iki 5 proc. neekologiškų žemės ūkio kilmės sudėtinių dalių, maisto priedų bei pagalbinių medžiagų, kurie

leidžiami naudoti ekologinėje gamyboje. Draudžiama naudoti sintetinius maisto priedus ir pagalbines medžiagas.

Ekologiškiems produktams perdirbti leidžiama naudoti mechaninius, fizinius ir biocheminius procesus. Draudžiama ekologiškus produktus apdoroti jonizuojančiais spinduliais, aukšto dažnio srovėmis ir naudoti cheminius apdorojimo būdus.

Prekyboje ekologišką pieną ir pieno produktus galima atpažinti pagal jų ženklinimą. Ekologiško pieno ir pieno produktų etiketėje turi būti:

- užrašas "Ekologiškas...";
- sertifikavimo įstaigos pavadinimas, adresas ir jos logotipas.

Etiketėje gali būti:

- specialus Europos Sąjungos logotipas su užrašu lietuvių ar kitos šalies narės kalba „Ekologinis žemės ūkis“;
- lietuviškas ekologinio žemės ūkio ženklas.

2.2. Stabilių izotopų principas

Izotopas - tai branduolys turintis tą patį protonų skaičių, bet skirtingą neutronų skaičių. Izotopai skirstomi į dvi rūšis - stabilus ir nestabilus. Nestabilūs izotopai vadinami radioaktyviaisiais izotopais. Yra žinoma apie 300 natūraliai atsirandančių izotopų. Izotopinio santykio matavimuose sutelkiamas dėmesys į šių lengvųjų elementų izotopus: vandenilio, anglies, azoto, deguonies, sieros. Dauguma lengvųjų elementų turi skirtingus izotopų santykius. Įprastai vieno izotopo yra gausiau negu kito. Pavyzdžiui ^{12}C gamtoje yra 98,89%, o ^{13}C tik 1,11%. 1 lentelėje pateikiama vidutinė izotopų, dažniausiai naudojamų stabilų izotopų matavimuose, gausa gamtoje [8].

1 lentelė. Lengvųjų stabilų izotopų pasiskirstymas gamtoje [8].

Vandenilis	Anglis	Azotas	Deguonis
^1H - 99.984%	^{12}C - 98.89%	^{14}N - 99.64%	^{16}O - 99.763%
^2D - 0.0156%	^{13}C - 1.11%	^{15}N - 0.36%	^{17}O - 0.0375%
-	-	-	^{18}O - 0.1995%

Sunkieji izotopai dalyvauja tose pačiose cheminėse reakcijose kaip ir lengvieji izotopai, bet dėl to, kad jie yra sunkesni, cheminės reakcijos vyksta lėčiau. Dėl šių mažų reakcijų greičių skirtumų, reakcijos produktai turės kitokią izotopų santykį lyginant su pradinėmis medžiagomis. Žinant tikslų izotopų santykį augalų ir gyvūnų audiniuose mes galime sužinoti apie procesus, kurie lemia audinių susidarymą. Iš šito mes galime sužinoti ar augalo šaknis ima vandenį iš lietaus ar iš gilaus požeminio vandens šaltinio, vandens panaudojimo efektyvumą miške, kuo gyvūnas maitinuos savo gyvenime ir kur jis randasi maisto grandinėje, ir pasaulinius anglies dioksido šaltinius atmosferoje. Istorines medžiagos, kurios gali būti keletu tūkstančių metų senumo, gali būti analizuojamos tuo pačiu būdu, leidžiant palyginti dabartinę ir senovės aplinkas [8].

Bet prieš pradėdant analizę yra svarbu suprasti kaip specifiniai bandiniai gali būti paveikti įvairiais procesais, pavyzdžiui izotopų frakcionavimu. Izotopų frakcionavimas sukelia stabilių izotopų gausos variacijas. Frakcionavimas yra sukeltas dėl cheminių ir fizikinių savybių skirtumų tam tikroms atominėms masėms ir susijęs su izotopų mainų ir kinetinių procesų reakcijų greičiais. Vienas iš pavyzdžių izotopų mainų procesų, sukeliančių frakcionavimą yra temperatūros pokyčiai. Todėl temperatūros stabilumas yra svarbus matavimo įrangoje. Dujų slėgis irgi gali turėti reikšmingą vaidmenį nustatant frakcionavimo dydį. Keli pavyzdžiai kinetinio izotopų efekto būtų garavimas ir kondensavimas, difuzija ir atsiskyrimo reakcijos.

Suprasti procesus, kurie gali paveikti izotopu santykius specifiniuose bandiniuose, yra svarbus žingsnis siekiant suprasti, kaip apskaičiuojamos izotopų delta vertės (δ).

2.3. Delta vertė δ

Rutiniais masių spektrometrais nėra lengva išmatuoti absoliutų izotopų santykį ar paplitimą. Tam reikalingi labai sudėtingi masių spektrometrai. Tyrinėtojus daugiausia domina stabilių izotopų koncentracijų kaitos palyginimas, o ne tik jų absoliutus paplitimas. Todėl taikomas supaprastinimas, matuojamas ne tikras izotopų santykis, o tariamas (angl. apparent) izotopų santykis, kurį galima lengvai nustatyti dujų šaltinio masių spektrometrijos metodais. Tariamas santykis skiriasi nuo tikro santykio dėl matavimo sistemos, prietaisų tikslumo ir daugelyje laboratorijų būtų skirtingas. Tačiau matuojant tuo pačiu prietaisu ir tuo pačiu laiku žinomą etaloną (angl. reference) ir tiriamą mėginį, galima mėginį palyginti su etalonu. Taigi, izotopinę koncentraciją išreiškia išmatuoto izotopų santykio bandinyje ir išmatuoto izotopų santykio standarte skirtumas. Šis skirtumas žymimas delta simboliu. Kadangi frakcionavimo procesai nelemia izotopų koncentracijų žymių kaitų, tai δ reikšmės išreiškiamos tūkstantosiomis dalimis arba promilėmis (‰), palyginus su standartu [9]:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{bandinys}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standartas}}} - 1 \right) 1000\text{‰} \quad (1)$$

Jei δ -reikšmė yra teigiama, sakykime +10‰, tai mėginyje yra 10 promilių daugiau ^{13}C nei standarte, arba sakoma, jog bandinys yra praturtintas ^{13}C (arba “sunkesnis”) 10‰, palyginus su standartu. Panašiai, jei bandinys yra nuskurdintas ^{13}C (arba “lengvesnis”) 10‰, palyginus su standartu, tai yra išreiškiamas $\delta^{13}\text{C}$ bandinio = -10‰ V-PDB [9].

2 lentelė. Tarptautinių standartų absoliutinės izotopų santykio vertės [8].

Standartas	R_{standarto}	Atomas
V-SMOW	0.0001557	²H
V-PDB	0.011056	¹³C
V-SMOW	0.0020004	¹⁸O
N AIR	0.003663	¹⁵N

Pagrindines atraminės medžiagos, naudojamos izotopų santykio masių spektrometrijoje, yra šios:

V-SMOW (Standard Mean Ocean Water) - naudojamas $\delta^2\text{H}$ ir $\delta^{18}\text{O}$ izotopų matavimams. Šis standartas yra iš viso pasaulio skirtingų vandenynų bandinių vidurkis.

V-PDB (Pee Dee Belemnite) - naudojamas $\delta^{13}\text{C}$ matavimams. Šis standartas tai CaCO_3 iš belemnito karbonato, randamas pietų Karolinoje.

Atmosferinis azotas - naudojamas $\delta^{15}\text{N}$ matavimams. Oras turi labai homogenišką izotopų kompoziciją ir dėl to jis pasirinktas kaip geras etalonas.

Laboratoriniai standartai yra patikrinami dėl tikslumo palyginus su tarptautiniu mastu žinomomis etaloninėmis medžiagomis, kurių vertes nustato Tarptautinės atominės energijos asociacija (TATENA) Vienoje, Austrija. Šie, savo ruožtu, kalibruojami lyginant su pirmąja atramine skale konkrečiam izotopui [8].

2.4. Stabilių izotopų matavimų taikymas

Stabilių izotopų matavimus galima naudoti pagrindiniams ekologiniams procesams užregistruoti, apibrėžti, atsekti. Šis analitinis metodas yra vienas populiariausių ekologijoje dėl to, kad galima pateikti rezultatus natūralios gausos lygiais [10]. Izotopų santykiai augalų ir gyvūnų audiniuose taip pat ir organiniai ir neorganiniai junginiai dirvožemyje parodo laikiną susijungimą fiziologinių ir ekologinių procesų vietovėje. Jų susijungimo laikotarpiai priklauso nuo nagrinėjimo audinio arba elementų kaitos lygio. Be to, gerai susimaišiusių izotopų santykių gamtiniai rezervuarai tokie kaip atmosfera, upeliai ir vandeningieji sluoksniai, parodo, kad šaltinio sąnaudos prisijungia į sistemą, apimančios didelius erdvinius mastus.

Izotopai rodo pagrindinių ekologinių procesų būvį ir dydį. Daugelis ekologinių procesų sukuria išskirtinę izotopų žymę. Tokių procesų buvimas arba nebuvimas ir net jų dydis, palyginus su kitais procesais, yra parodomas stabilų izotopų santykio reikšme, palyginus su žinomomis vertėmis.

Izotopai įrašo biologinius pokyčius į besikeičiančią aplinkos būklę. Tais atvejais, kai medžiagos ar likučiai kaupiasi laipsniškai, pvz., medžio žieduose, gyvūnų plaukuose ir ledo šerdyse, izotopų santykis gali būti naudojamas kaip sistemos atsakas į kintančias aplinkos sąlygas arba kaip aplinkos pokyčių registras.

Izotopai parodo pagrindinių elementų ir medžiagų kilmę ir judėjimą. Dėl izotopų frakcionavimo, susijusio su fizinėmis ir biologinėmis reakcijomis, maistingų medžiagų ir elementų ištekliai vidaus ekosistemose tarp jų dažnai skiriasi izotopiškai. Dėl to esminių elementų kilmė ir

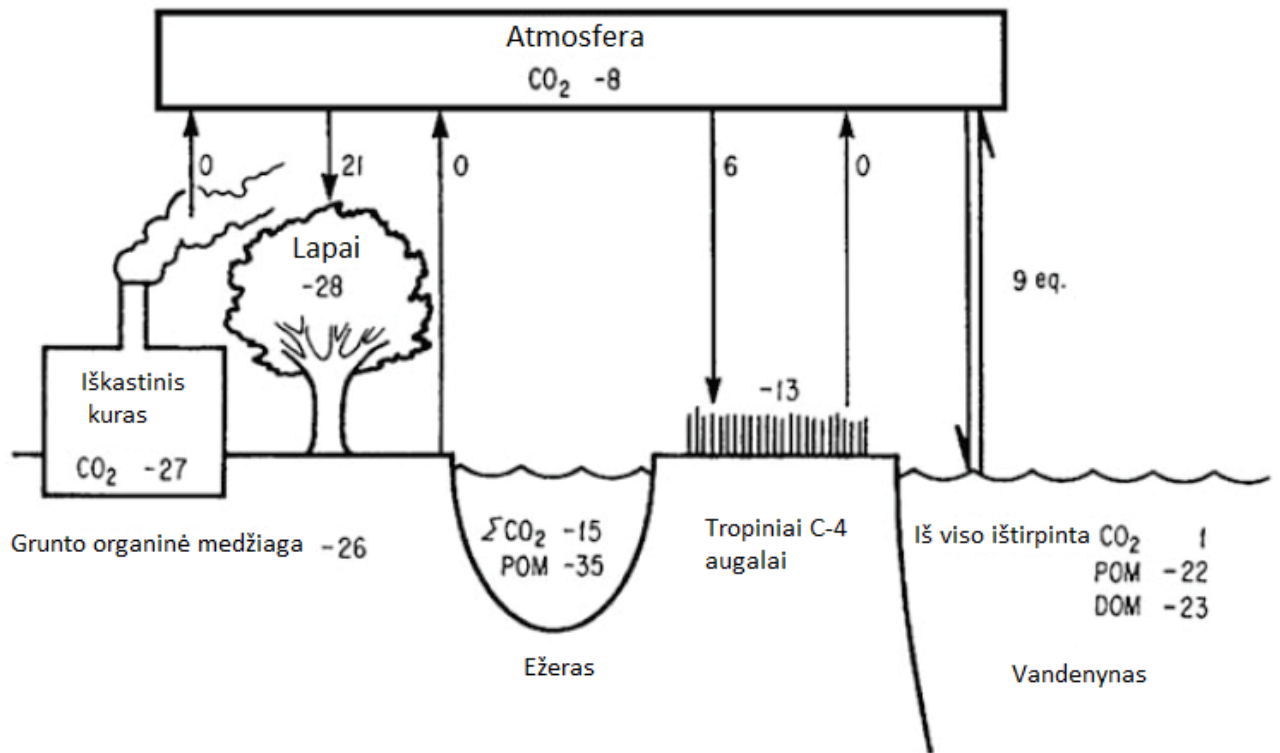
organizmo įgytų resursų kilmė lengvai atsekama naudojant izotopų santykius. Stiprūs geografiniai modeliai, susiję su izotopų žymės svyravimu, suteikia galimybę atsekti medžiagos ar komponento judėjimą arba kilmę kontinentiniame mastelyje.

2.5. Izotopų cirkuliacija biosferoje

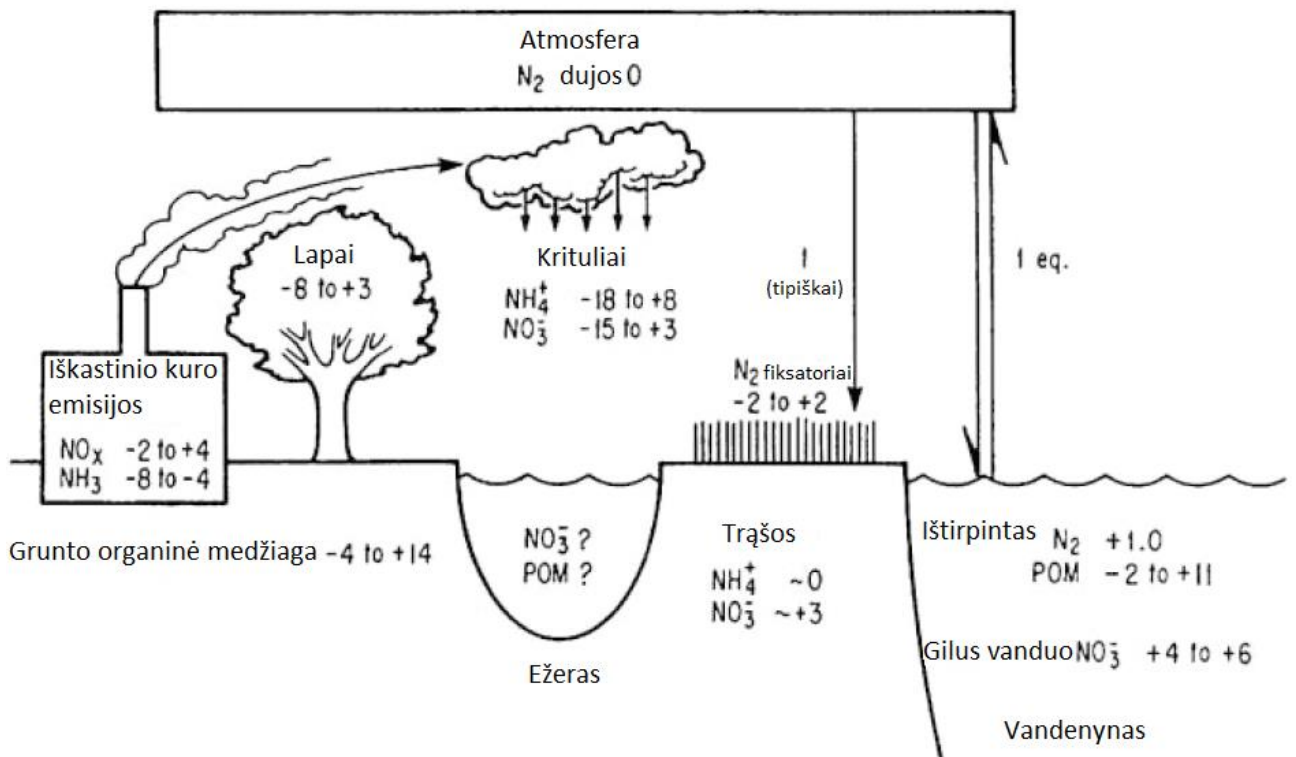
Izotopai cirkuliuoja biosferoje, frakcionavimas ir maišymasis sukuria reguliarią izotopų charakteristiką Žemėje. Elementų ir izotopų kiekiai, įeinantys į cirkuliaciją yra svarbus, su dideliais izotopų telkiniais užtikrinančiais stabilumo taškus ir išreiškia bendrą izotopų apykaitą. Keletas iš šitų didelių stabilių izotopų telkinių yra vandenynuose, įskaitant vandenyno vandenį vandenilio ir deguonies izotopams, neorganines anglies telkiniai vandenynuose anglies izotopams, ir siera iš jūros sieros izotopams. Atmosferinis N_2 rezervuaras sutelkia dideli telkinį N ciklui. Visi šie biosferos telkiniai yra dalis dar didesnių geocheminių rezervuarų, cirkuliuojančių planetoje [11].

Šiems lėtai kintantiems elementų ir izotopų telkiniams frakcionavimas yra pokyčių parametras. Kai augalai ir mikrobai įsisavina maistines medžiagas ir CO_2 , frakcionavimas dažniausiai parodo stipriausius C, N, S izotopų signalus biosferoje. H ir, O izotopams, frakcionavimas per reakcijas su vandeniu yra svarbios kontrolės parametras. Šios frakcionavimo reakcijos visiems penkiems elementams pažymi substancijas, kurios maišosi ir rekombinuoja, kompensuojant ir panaikinant frakcionavimo efektus. Tai yra bendra cirkuliacija, procesas sukuriantis izotopų signalus iš didelių rezervuarų frakcionavimo metu, tada panaikinant signalus maišymosi metu.

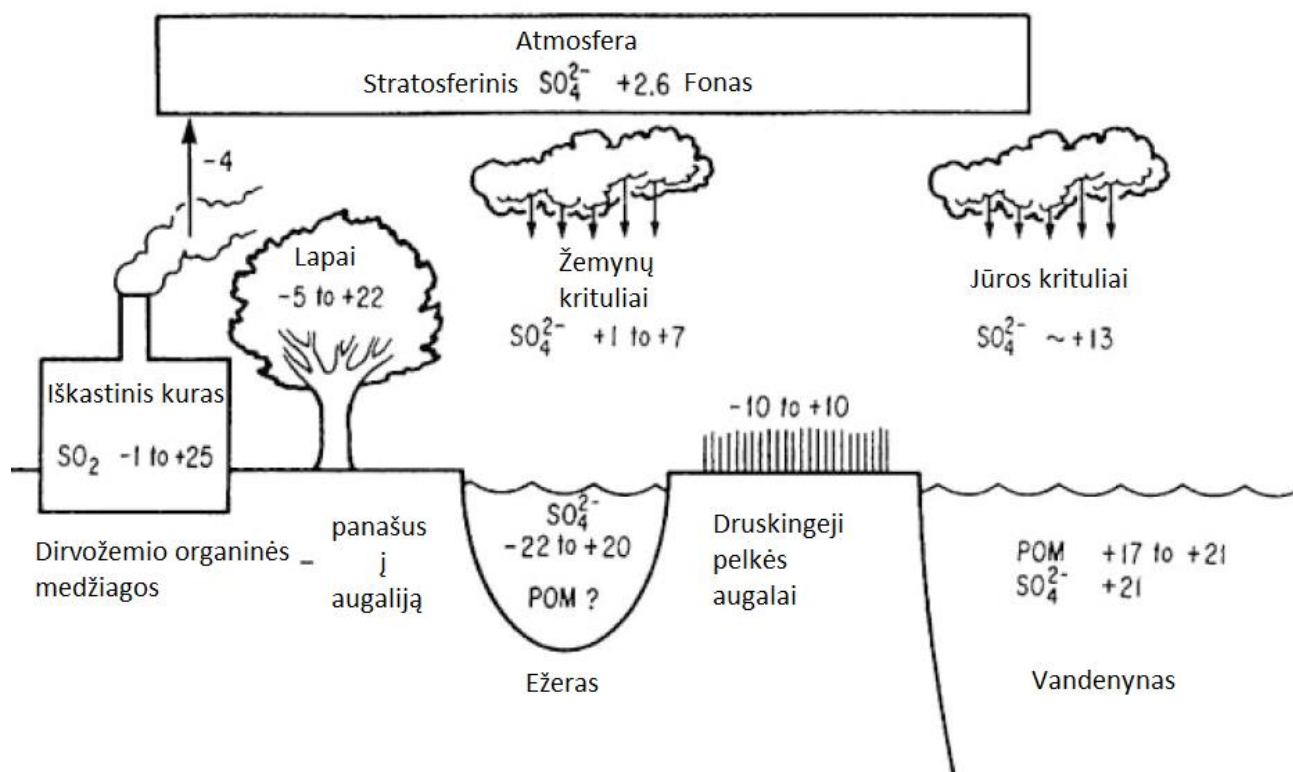
Biosferoje egzistuoja charakteringų izotopų verčių modeliai. C, N, S izotopams charakteringi izotopų modeliai gaunami iš keleto faktorių, įskaitant didelius rezervuarus, keletas pagrindinių fermentų, įeinančių į resursų įsisavinimą, ir įprastos stoichiometrijos, kurios apjungia organines materijos ciklus. Hidrologiniai garavimo ir kondensacijos procesai yra svarbūs H ir, O izotopų verčių struktūrai biosferoje.



4 pav. $\delta^{13}\text{C}$ pasiskirstymas ekosistemoje. Paviinės rodyklės nurodo CO_2 srautus. Dviguba rodyklė nurodo pusiausvyrą izotopų frakcionavimę. Skaičiai rezervuaruose parodo $\delta^{13}\text{C}$ vertes (‰), o skaičiai prie rodyklių parodo frakcionavimą (Δ , ‰) pernašos metu. Neigiamos $\delta^{13}\text{C}$ vertės parodo, kad yra mažiau sunkiųjų izotopų palyginus su standartu [11].



5 pav. $\delta^{15}\text{N}$ pasiskirstymas ekosistemoje [11].



6 pav. $\delta^{34}\text{S}$ pasiskirstymas ekosistemoje [11].

Fotosintezė yra viena iš svarbių reakcijų valdančių anglies cirkuliaciją biosferoje. Anglies izotopų kitimai fotosintezės metu yra gerai išstudijuoti, ir fermentas „ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase“ (Rubisco) katalizuoja CO_2 fiksaciją į augalų cukrus. Frakcionavimas mažina izotopų vertes nuo -8‰ atmosferiniam CO_2 iki -28‰ cukrams esantiems medžių lapuose. Frakcionavimas taip pat vyksta kitų elementų paėmimo H, N, O, S žymint augančius augalus ir mikrobus izotopiniu būdu. Ekologai naudoja izotopinį žymėjimą norint pamatyti sąveikas tarp įvairių įsisavinimo procesų, ir taip darant, randa cheminius įrodymus pabrėžti mažus skirtumus tarp skirtingų rūšių augalų ir gyvūnų. Frakcionavimas yra naudingas norint suprasti kaip augalai ir mikrobai funkcionuoja biosferoje. Kai ryšiai yra sukuriami ir panaikinti atominiame lygmenyje, tai yra vieta kurioje pasireiškia frakcionavimas ir žymių įvedimas.

Maišymasis taip pat atsiranda izotopų cirkuliacijos metu. Kai didesnės molekulės tiesiog paimtos kartu be pokyčių tarp jų sąryšių, tada reikia atkreipti dėmesį į maišymąsi. Kaip pavyzdys, augalų anglis iš skirtingų šaltinių maišosi dirvožemyje, grobuonis maišo aukos organines medžiagas savo mityboje, mikrobai naudoja substratų mišinį.

Po maišymosi ir pakartotinio persimaišymo, beveik visa organinė materija yra suskaldyta į paprastas molekules kurios kaupiasi dideliuose rezervuaruose, vėl ruošiantis sintezės ir frakcionavimo etapui. Per šitą ciklą, buvo laiko atsirasti žymėms per visą biosferą, einant prie charakteringų izotopų modelių. Bet yra tiek daug impulsinių įvykių kaip audros, sezonai, vandens pakilimai, taršos įvedimas, kurie įveda trikdžius izotopų modeliuose.

2.6. Anglies ciklas

Anglies ciklas apima atmosferinius CO₂ mainus tarp antžeminės ekosistemos ir vandenyno paviršiaus. Atmosferinio δ¹³C vertės mažėja kaip atsakas į įnešimą ¹³C iš išeikvoto CO₂ iš iškasenų kuro ir biomasės deginimo ir puvimo. Per pastaruosius 100 metų sumažėjimas galėjo būti beveik 1‰, nuo -7‰ iki -8‰. Anglies įsisavinimas dominuojančiuose žemėje C3 augaluose apima apie 20‰ tarp atmosferinio CO₂ ir augalo biomasės (-28‰). Anglies įsisavinimas C4 augaluose, pagrinde tropinės ir druskingosios žolės, apima maža frakcija apie 5‰. Dirvožemio organinė materija globaliai savyje turi daugiau anglies negu atmosfera arba gyvųjų augalų biomasė ir yra truputį praturtinta ¹³C lyginant su dominuojančiąja augmenija [11].

CO₂ mainai tarp atmosferos ir vandenyno paviršiaus susiję su cheminio frakcionavimo pusiausvyra tarp atmosferinio CO₂(-8‰) ir viso CO₂ (ΣCO₂, daugiausia biokarbonatai) vandenyno paviršiaus vandenyje (apie 1‰). Anglies pašalinimas iš karbonatų apima mažą izotopų frakcionavimo dalį, tuo tarpu įsisavinimas neorganinės anglies planktono fotosintezėje apima didesnę kinetinę frakciją negu rezultatai dumblių vertėse apie -19‰ iki -24‰.

¹³C komponenčių turinys anglies cikle gėlame vandenyje plačiai skiriasi priklausomai nuo ištirpusio CO₂ šaltinio vandenyje. Į šiuos šaltinius įeina oro poveikis į karbonato akmenį, mineraliniai šaltiniai, atmosferinis CO₂, ir organinės materijos kvėpavimas. Kur kvėpavimo indėliai dideli, δ¹³C vertės ištirpusiai neorganinei angliai gali siekti -20‰, ir dumbliams kurie toliau frakcionuoja anglies įsisavinimo metu gali išmatuoti iki -45‰.

Augalų CO₂ ciklo įtaka į δ¹³C

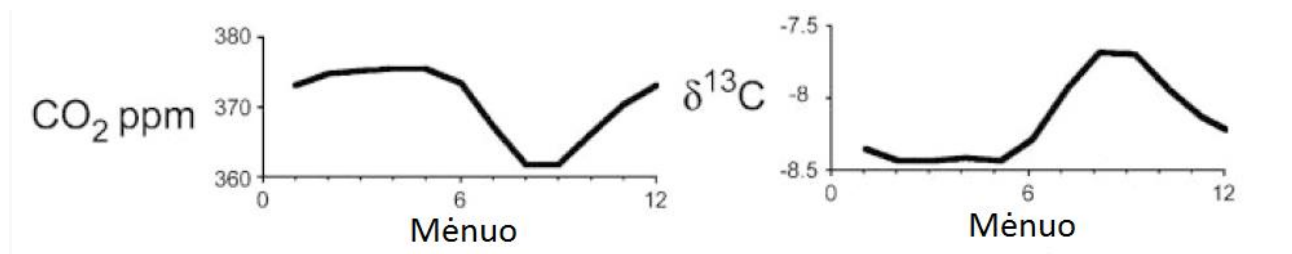
Augalai ir mikrobai yra svarbūs norint suprasti elementų ir izotopų cirkuliaciją biosferoje, nes daugelis izotopinių santykių, kurie maišosi biosferoje, yra sugeneruojami frakcionavimo metu, kai augalai ir mikrobai įsisavina maistines medžiagas ir CO₂ [11].

C3 augalai, tokie kaip medžiai, krūmai ir daugybė žolių, turi mažesnę δ¹³C vertę negu vidurkis apie -28‰, o C4 augalai tokie kaip kukurūzai, cukranendrės ir sausųjų vietovių žolės turi didesnę vertę negu vidurkis -13‰. Šie izotopų skirtumai kyla fotosintezės metu, kai anglies atomai yra įtraukiami į 3-anglies (C3) arba 4-anglies (C4) cukrus formuojantis naujiems cheminiams ryšiams.

Augalų fotosintezės efektai yra toli siekiantys mūsų biosferoje, ir plečiasi iki atmosferinių CO₂ šaltinių, kuriuos augalai naudoja fotosintezėje. CO₂ koncentracijos atmosferoje apskritai didėja dėl iškastinio kuro sunaudojimo, dėl to augalų ir mikrobus yra sezoninės variacijos. CO₂ lygiai krenta vasara augimo sezone kai augalų fotosintezė yra aktyvi. Augalai įsisavina anglį vasara išeikvodami atmosferinio CO₂ šaltinius. Vėliau metuose, kai ateina ruduo ir žiema, augalų fotosintezė silpnėja, o kvėpavimas tampa dominuojančiu, CO₂ vertės atmosferoje atsistato.

Sezoninės CO₂ dinamikos koncentracijos turi sąryšį su izotopų dinamika. Anglies izotopai parodo atvirkščią modelį, su didesnėmis δ¹³C vertėmis vasara ir mažesnėmis žiemą. Šis atvirkštinis santykis parodo izotopų frakcionavimą, su vasaros fotosintezė paimant anglį su mažomis δ¹³C vertėmis apie -28‰, dėl to likęs atmosferinis šaltinis patiria izotopu praturtinimą ir įgauna pastebimai didesnes δ¹³C vertes. Atmosferinis frakcionavimas dalija savo efektus tarp

augalų ir atmosferos, sukuriant izotopiškai lengvesnį produktą (augalus) ir paliekant sunkų substratą (atmosferinį CO₂). Padarant išvadą, rudens ir žiemos sąlygos atšaukia šį procesą ir augalų ir dirvožemio anglies atsistatymas per kvėpavimą grąžina mažas $\delta^{13}\text{C}$ anglies vertes į atmosferos CO₂ rezervą, ir atmosferos $\delta^{13}\text{C}$ vertės mažėja rudenį ir žiemą. Kvėpavimas yra daugiausiai dėl dirvožemio mikrobu.



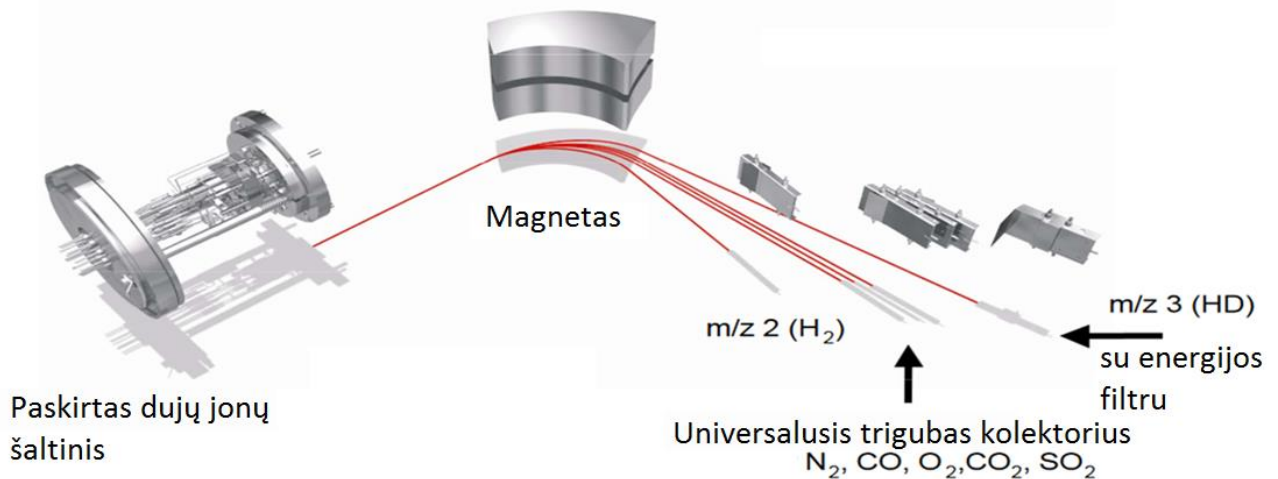
7 pav. Atmosferinio CO₂ vertės. CO₂ koncentracijos mažėja vasara augimo sezone (kairysis grafikas), izotopų fracionavimas fotosintezės CO₂ pašalinimo laiku palieka atmosferą praturtinta ¹³C su didesnėmis $\delta^{13}\text{C}$ vertėmis (dešinysis grafikas) [11].

3. Metodinė dalis

3.1. Dujų izotopų masės santykio spektrometrija

Paprastai lengvų elementų izotopai yra matuojami su dujų izotopų masės santykio spektrometru (ang. IRMS- isotope ratio mass spectrometer). Masių spektrometras sudarytas iš jonų šaltinio, kuris naudojamas dujų jonizavimui ir jų pagreitinimui, skrydžio vamzdeliai su magnetu naudojami jonų atskyrimui ir detektoriaus sistema su Faradejaus kolektoriais skrydžio vamzdeliu pabaigoje naudojama registruoti izotopus [12].

Visi dominantys elementai turi būti paversti į dujinę formą, kad būtų galima išanalizuoti jų izotopų santykius masių spektrometru. Yra daugybė būdų bandinio pavertimui į norimą formą, tokie kaip deginimas, cheminė oksidacija, pirolizė ir pusiausvyros nusistovėjimas. Analitės dujos, CO₂, N₂, CO, H₂ ir SO₂ yra jonizuojamos jonų pluošteliu. Jonai yra išskiriami pagal jų masės ir krūvio santykį magnetinio sektoriaus analizatoriuje ir detektojami su dideliu tikslumu izotopų nustatymui milijoninių dalių diapazone (ppm). Jonų šaltiniai šiuolaikiniuose izotopų masės santykio spektrometruose turi optimalų būdą šių lengvųjų dujų jonizavimui.



8 pav. Stabilių izotopų santykio masės spektrometras su jonų šaltiniu, magnetu ir Faradėjaus lęšių masyvu vienalaikiam izotopu detektavimui [12].

3.2. Jonizacija

Jonų šaltinis naudojamas izotopų masės santykio spektrometrijoje (IRMS). Jis sudarytas iš jonizacinės kameros, gijos (angl. filament), gaudyklės, nuolatinio magneto ir iš Faradėjaus detektorių. Didžioji dalis molekulinė jonų susidariusių jonų šaltinyje pereina pro plyšį į magnetinį sektorių masių analizatoriuje [12].

Molekuliniai jonai susidaro susidūrus su elektronais, kurie išsiskiria iš karštos gijos (katodo) padarytos iš volframo, renio arba iridžio padengtu toriu. Optimaliai molekulių išėgait elektronai turi kinetinę energiją 70-150 eV.

Teigiamai įkrauti jonai tokie kaip CO_2^+ , N_2^+ , ir CO^+ yra ištraukiami iš jonų kameros su lauku sukurtu ištraukimo lęšiu. Po ištraukimo iš šaltinio, jonai yra pagreitinami su didelio potencialo įtampa nuo 2 iki 10 kV, sufokusuojami ir injektuojami į masių analizatorių.

Detektoriaus plote pavieniai surinkėjai (Faradėjaus kolektoriai) pastatyti židinio plokštumoje, norint vienu metu aptikti visas atitinkamas jonų sijas, skirtas izotopų santykiui nustatyti. Dauguma IRMS prietaisų turi paprastą surinkimo sistemą sudarytą iš dviejų plačių Faradėjaus kolektorių kraštuose ir siauro Faradėjaus kolektorio per vidurį (universalus trigubas surinkėjas). Ši kombinacija leidžia matuoti CO_2 , N_2 , CO ir SO_2 izotopų santykius [12].

Du Faradėjaus kolektoriai yra pridedami norint matuoti HD/H_2 santykį. Kai kuriuose sistemose panašus magnetinio lauko stipris yra naudojamas H_2 taip pat kaip ir CO ir N_2 . Šiuo atveju Faradėjaus lęšiai matuojant H_2 yra atskiroje židinio plokštumoje nedideliu spinduliu. Jeigu yra panaudojamas daug mažesnis magnetinis laukas stipris, HD surinkėjai yra toje pačioje židinio plokštumoje kaip ir universalus trigubas surinkėjas.

Šiuolaikinėje masių spektrometrijoje izotopų vertės ir delta vertės yra automatiškai apskaičiuojamos ir įrašomos.

3.3. Masių atskyrimas

Magnetinis laukas, kuriame jonai nukreipiami, generuojamas elektromagnetu. Kai jonas su masė „m“ ir krūviu „e“ yra pagreitinamas elektriniame lauke dėl potencialų skirtumo „V“ ir nukreiptas magnetinio lauko stiprių „B“, jis turi trajektorijos spindulį „r“ [12]:

$$r = \frac{143.95}{B} \sqrt{\frac{2mV}{e}} \quad (2)$$

Jeigu B ir V yra pastovūs ir jonai turi viena krūvį tada:

$$r \sim \sqrt{m} \quad (3)$$

Todėl mažesnės masės jonas brėžia mažesnę spindulį negu didesnės masės jonas. Dabartinės priemonės apima masių dydžių iki 130 m/z su gretimu masių atskyrimu. Elektromagnetai naudojami komerciniuose izotopų masės santykio spektrometruose ir turi maksimalų lauko stiprį apie 0.75 T su galimybe greitai kaitalioti magnetinį lauką nuo H₂ iki CO ir N₂ iki CO₂ masių.

3.4. GC/IRMS

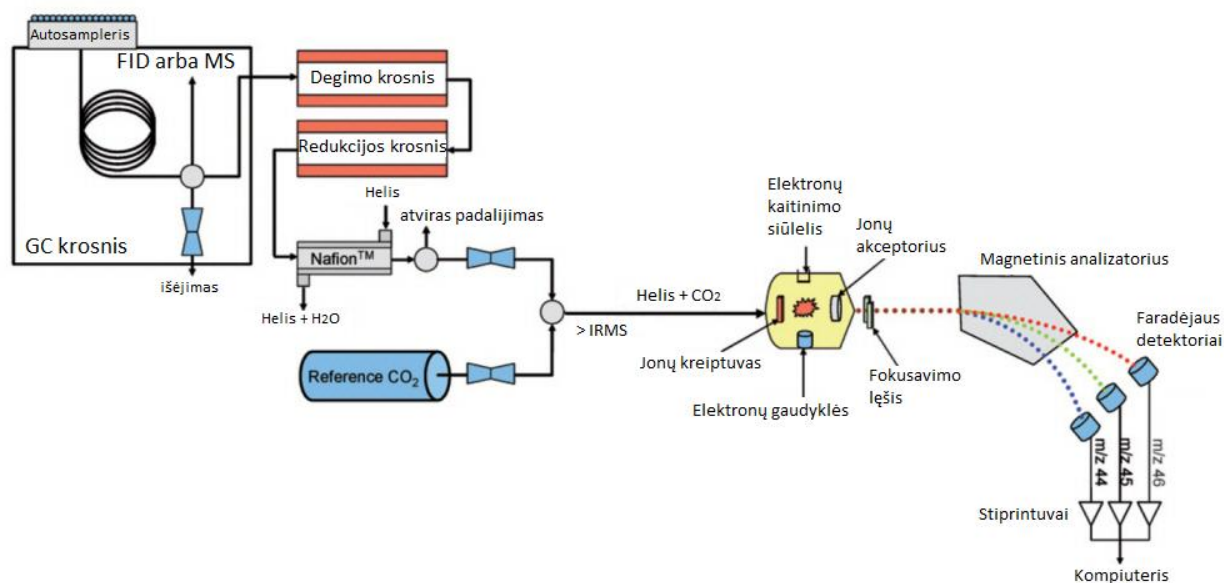
Dujų chromatografija (GS) yra naudojama kartu su izotopų santykio masės spektrometrija (IRMS) analizuoti atskiru junginiu izotopinę sudėtį bandinyje. Izotopinė informacija kiekvieno komponento mišinyje gali būti naudojama nustatyti kilmės šalį, pasiskirstymą ir organinės medžiagos degradaciją. Visi junginiai, išeinantys iš dujų chromatografinės kolonėlės yra oksiduojami kapiliariniame degimo reaktoriuje iki CO₂, N₂ ir H₂O esant 1000°C temperatūrai arba konvertuojami i CO ir H₂ kapiliariniame pirolizės reaktoriuje esant 1450°C. NO_x pagaminti oksidacijos proceso metu gali būti redukuojami iki N₂ antriniame kapiliariniame reaktoriuje esant 650°C. Naujesnės dujų chromatografinės deginimo technologijos leidžia panaikinti redukcijos reaktoriaus poreikį. Nauji reaktoriai užtikrina NO_x trūkumą junginyje su pilnutiniu sudeginimu esant 1000°C temperatūrai. Po sudeginimo, vanduo susiformavęs reakcijos metu yra pašalinamas vandens pašalinimo sistema [12].

3.5. Techninė dalis

Dujų chromatografijos sudeginimo izotopų santykio masių spektrometrija (GC/C/IRMS) yra specializuota technika nustatyti santykinį santykį tokiu stabiliu izotopu: anglies (¹³C/¹²C), vandenilio (²H/¹H), azoto (¹⁵N/¹⁴N) ir deguonies (¹⁸O/¹⁶O) atskiruosiuose junginiuose atskirtose nuo sudėtingu mišiniu. Pirminė sąlyga GC/C/IRMS yra ta, kad junginys turi būti tinkamas naudojimui dujų chromatografijoje (GC), t.y. jie turi būti lakūs ir termiškai stabilūs. Poliniai junginiai gali reikalauti tolimesnio cheminio apdorojimo (devaritizacijos) ir tokiu atveju turi būti nustatytas stabiliu izotopu santykis devaritizacijos medžiagos [13].

9 pav. vaizduojama GC/C/IRMS prietaiso schema. Mėginio tirpalas įpurškiamas į GC įleidimo angą (ang. Inlet), kur jis išgarinamas ir nešiklio dujomis (įprastai heliu) perkeliamas į chromatografinę kolonėlę. Mėginys keliauja per kolonėlę, o junginiai esantys turimame mišinyje atsiskiria dėl jų santykinės sąveikos su kolonėlės danga (stacionarioji fazė) ir nešančiosiomis

dujomis (judančioji fazė). Anglies ir azoto detektavimo atveju junginiai išeinantys iš chromatografinės kolonėlės pereina pro degimo reaktorių (aliuminio oksido vamzdis, kuriame yra Cu, Ni, Pt laidu palaikomu 940°C temperatūroje), kur jie oksiduojami. Toliau eina redukcinis reaktorius (aliuminio oksido vamzdis, kuriame yra trys Cu laidai palaikomi 600°C temperatūroje), kad redukuoti, bet kokius azoto oksidus iki azoto. Vandenilio ir deguonies nustatymui reikalingas aukštos temperatūros terminės konversijos reaktorius. Vanduo pašalinamas vandens separatoriuje praeinančiu dujų srautu per vamzdi pagaminta iš vandeniui pralaidžios nafiono membranos. Tada mėginys įvedamas į MS jonų šaltinį per atviro plyšio sąsają. Analizuojamu dujų (CO₂, H₂, N₂ ir CO) jonizavimas gali būti pasiektas naudojant elektronų jonizaciją (EI). Jonizuotos dujos atskiriamos vienu magnetinio sektoriaus analizatoriumi dėl jų pagreičiai ir yra aptinkamos Faradėjaus lęšiu masyvu, iš kuriu gauname signalą kuris naudojamas apskaičiuoti galutini stabiliu izotopu santyki.



9 pav. GC-IRMS schema anglies izotopų santykio nustatymui, kuomet bandinys paverčiamas CO₂ dujomis (registruojami m/z santykiai 44, 45, 46) [14].

3.6. Pieno riebalų rūgščių (FAME-fatty acids methyl esters) paruošimas

Norint paruošti mėginį izotopų santykio masių spektrometriniam matavimui, taikomi sekantys žingsniai:

Užšaldytas bandinys atšildomas karštame vandenyje [15].

450 µl pieno mėginio supilama į tūbą (12 ml talpos).

Pridedama 300 µl CH₂Cl₂ ir 3 ml 0,5N normalinės koncentracijos NaOH ištirpinto metanolyje, prapučiama su N₂ dujomis.

Tūba uždaroma.

Šildoma krosnelėje esant 90°C temperatūroje 10 minučių laikotarpyje.

Tūba patalpinama į šaltą vandenį norint greitai ataušinti.
Pridedama 3 ml BF₃ ištirpinto metanolyje, prapučiami su N₂ dujomis.
Tūba uždaroma.
Šildoma krosnelėje esant 90°C temperatūroje 10 minučių laikotarpyje.
Pridedama 3ml distiliuoto vandens ir 1,5 ml heksano.
Tūba uždaroma.
Tūba kratoma 1 minute.
Atliekamas centrifugavimas 10 minučių laikotarpyje esant 2000 rpm (apsisukimu skaičius per minute).
Riebalai ištirpinti heksane esantys viršutiniame sluoksnyje perpilami į atskirą buteliuką.
Laikomi šaldiklyje iki jų chromatografinės analizės.

4. Rezultatai ir jų aptarimas

4.1. Bandinių derivatizacija

Karvės pieno mėginiai buvo paruošti GC-IRMS analizei pagal derivatizacijos metodą aprašyta prieš tai. Užšaldytą pieną paėmiau iš šaldiklio. Ėmiau 1-1,5 ml pieno ir patalpinau į plastikinį buteliuką, kurį palaikiau stiklinėje su šiltu vandeniu, kad užšalęs pienas atitirptų. Su pipete, kuri gali paimti 100-1000 μl skysčio, paėmiau 450 μl pieno ir supyliau į 12 ml talpos plastmasinį buteliuką. Buvo paruoštas 0,5N normalinės koncentracijos natrio šarmas ištirpintas metanolyje. Norint paruošti tirpalą, pasvėriau 2 g NaOH tablečių, kurias sumaliau miltelių pavidalų, miltelius subėriau į svarų indą ir užpyliau 100ml metanolio. Uždarytą indą purčiau, kol milteliai pilnai ištirpo metanolyje. Į buteliuką su pienu įpyliau 3 ml natrio šarmo ištirpinto metanolyje ir 300 μl dichlormetano (CH₂Cl₂). Dichlormetana ėmiau iš butelio su švirkštu, viskas tai buvo atliekama traukos spintoje. Dichlormetanas yra tirpiklis, o natrio šarmas ištirpintas metanolyje bazė (protonų akceptorius). Prieš uždarant buteliuką, viduje prapūčiau azoto dujų srautu, pašalinant orą iš buteliuko norint išvengti nepageidaujamų reakcijų tolimesniuose etapuose. Prapūtus azotu, užsukau buteliuką. Paruošiau šildymo krosnelę nustačius kaitinimą iki 90°C temperatūros. Pasiekus norimą temperatūrą, buteliuką patalpinau į krosnelę, kur jis buvo šildomas 10 minučių esant pastoviai 90°C temperatūrai. Pašildytą buteliuką išėmiau iš krosnelės ir patalpinau į stiklinę su šaltu vandeniu tam, kad greitai ataušinti mėginį. Su pipete paėmiau 3 ml borotriflorido BF₃, ir įpyliau į buteliuką. Borotrifloridas yra „Lewio rūgštis“, kurios savybė ta, kad ji turi laisvą orbitalę ir gali priimti elektrono porą. Prieš uždarant buteliuką vėl prapūčiau azoto dujomis. Uždarius buteliuką patalpinau į pašildytą krosnelę, kur buteliukas buvo šildomas esant pastoviai 90°C temperatūrai 10 minučių laikotarpyje. Pašildžius buteliuką ištraukiau iš krosnelės, su pipete paėmiau 3 ml distiliuoto vandens ir supyliau į buteliuką, tada su pipete paėmiau 1,5 ml heksano C₆H₁₄ ir įpyliau į buteliuką ir užsukau jį. Heksanas naudojamas kaip nepolinis tirpiklis. Buteliuką purčiau norint išmaišyt turimą tirpalą. Buteliuką patalpinau į centrifugą, kur jis buvo centrifuguojamas 10 minučių laikotarpyje esant 2000 rpm (apsisukimu skaičius per minute). Po centrifugavimo buteliuke skystis buvo pasiskirstęs į dvi dalis, viršutiniame sluoksnyje buvo skaidrus skystis, kurį sudarė heksanas ir jame ištirpusios riebalų rūgštys ir apatinio skysčio, kur buvo kiti chemikalai naudoti derivatizacijoje. Kadangi heksanas yra nepolinis, ir jis aiškiai atsiskiria nuo polinio tirpalo esančio buteliuko apatinėje dalyje. Su pipete

paėmiau viršutinį skaidrųjį sluoksnį ir supyliau į stiklinį 2 ml talpos buteliuką. Buteliukas buvo laikomas šaldiklyje iki matavimo. Naudojantis pipete po kiekvieno chemikalo paėmimo pakeičiau nešvarųjį antgalį į švarų antgalį prieš imant kiekvieną mėginį.

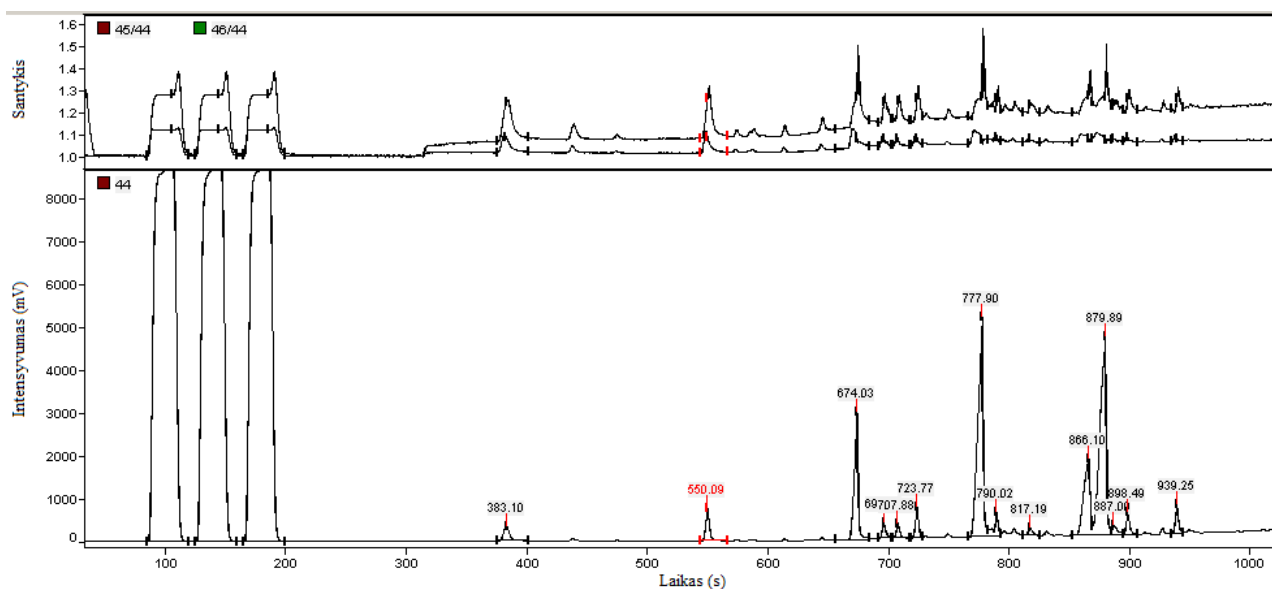
4.2. Matavimai su spektrometru

Visi matavimai, išskyrus pirmąjį, buvo atlikti esant tokiems parametrams:

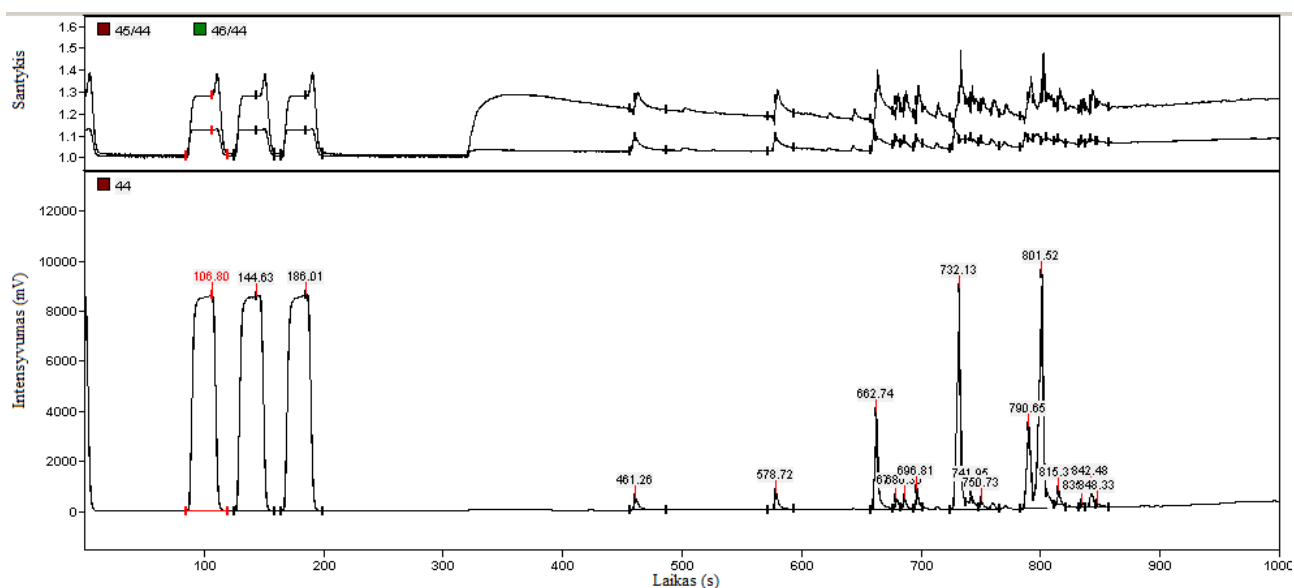
Bandinio įvedimo į sistema angos (angl. inlet) temperatūra buvo palaikoma 250°C. Vienas matavimas truko 20 minučių, chromatografinėje kolonėlėje pradinė temperatūra buvo 80 °C ir buvo palaikoma 2 minutes, tuomet buvo nustatyta pirmoji rampa kurios metu temperatūra kilo 5°C/min greičiu iki 100°C temperatūros, pirmosios rampos trukmė 4 minutės, antrosios rampos metu temperatūra kilo 15°C/min greičiu iki 250°C temperatūros, antrosios rampos trukme 10 minučių. Pasiekus nustatytąją temperatūrą, ji dar buvo palaikoma 4 minutes iki matavimo pabaigos.

Prieš matavimą spektrometre buvo nustatyta matavimo trukmė, temperatūros kaitos laikotarpiai. Pirmam matavimui laikotarpis buvo nustatytas 30 minučių. Bandinys buvo įvedamas į spektrometrą su mikrolitiniu švirkštu (1-10 µl ribos), iš buteliuko su bandiniu paėmiau 1µl, pritraukiant bandinį su švirkštu reikia staigiai pritraukti norint išvengti oro burbulų. Kai spektrometras paruoštas matavimui, per maža angą, esančia viršutinėje sienelėje (angl. inlet) staigiai išpurškiau bandinį iš švirkšto. Po bandinio įvedimo į spektrometrą mikrolitrinį švirkštą praploviau heksano tirpalu, kad jisai neužsiterštų. Bandinys, patekęs į spektrometrą, iškart išgaravo, nes toje vietoje, kur jisai yra įpurškiamas, yra aukštą 250°C temperatūrą. Išgaravęs bandinys judėjo chromatografinėje kolonėlėje. Medžiagos buvo išskiriamos laike – lengvesnės molekulės išeidavo iš chromatografinės kolonėlės greičiau negu sunkesnės. Gavus pirmo matavimo rezultatus norint pagerinti skiriamąją gebą sumažinau tolimesnių matavimų trukmę iki 20 minučių. Sumažinus matavimo trukmę junginių išsiskyrimo laikas sutrumpėja, dėl ko gaunamos smailes bus siauresnės.

Matavimui pasibaigus gautieji rezultatai pateikiami spektro pavidalu kuris parodo užlaikymo laiką kurio metu buvo užfiksuota smailė ir tos smailės amplitudė (mV) ir atitinkamai kiekvienai smailei $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ santykis lyginamas su standartu (VPDB).



10 pav. Karvės pieno rūgščių spektras gautas išmatavus GC/IRMS sistema pirmąjį kartą. Matavimo trukmė 30 min.



11 pav. Karvės pieno rūgščių spektras gautas išmatavus GC/IRMS sistema antrąjį ir vėlesniais kartais. Matavimo trukmė 20 min.

10 pav. ir 11 pav. yra gautieji spektrai ant kurių abscisių ašies atidėtas laikas sekundėmis, o ant ordinačių ašies atidėtas intensyvumas (mV). Pirmosios trys smailės yra atraminės smailės nepriklausančios bandiniui, likusios smailės atitinka riebalų rūgštis matuojamajame bandinyje. Jų išsiskyrimas laike yra pagal masę todėl žiūrint iš kairės į dešinę jos yra pasiskirsčiusios nuo lengviausios iki sunkiausios rūgštis.

3 lentelė. Karvės pieno riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ matavimo rezultatai gauti išmatavus GC/IRMS sistema. Pateikiama kiekvienos smailės užlaikymo trukmė, amplitudė ir tai smailei atitinkančios rūgštis $\delta^{13}\text{C}$ santykis.

Nr.	Užlaikymas (s)	Intensyvumas (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	383.1	349	-17.65
2	550.1	756	-20.04
3	674	2992	-22.27
4	696.2	387	-22.16
5	707.9	342	-30.17
6	723.8	722	-26.99
7	777.9	5133	-27.78
8	790	575	-23.97
9	817.2	164	-27.14
10	866.1	1789	-28.78
11	879.9	4835	-31.39
12	887	234	-31.19
13	898.5	553	-30.116

14	939.2	691	-29.21
15	1290.6	441	-19.31

4.3. Riebalų rūgščių atpažinimas

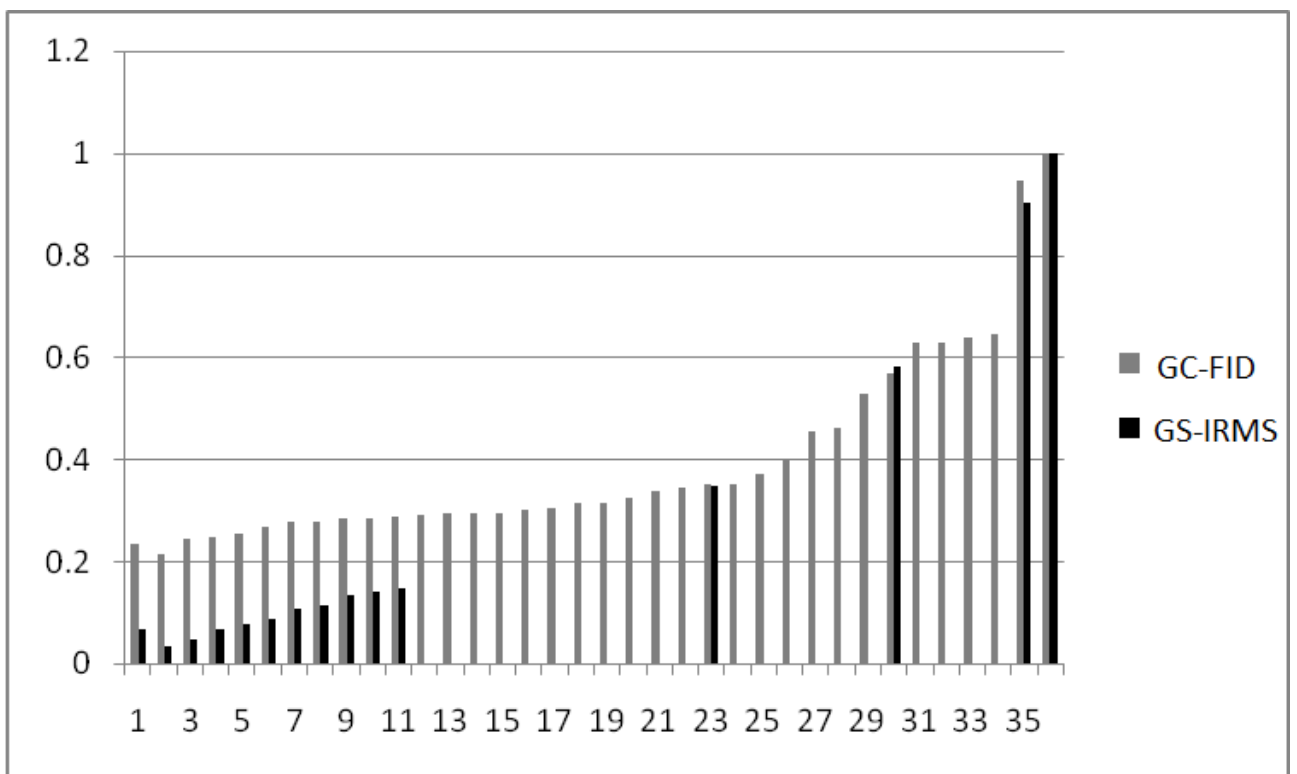
Išmatavus bandinius GC-IRMS sistema, gautuose rezultatuose kiekvienam bandiniui turėjome iki 15 smailių. Kiekviena smailė atitinka vieną iš riebalų rūgščių nuo C4:0 iki C24:1n9 riebalų rūgšties numerio. Kadangi GC-IRMS metodas nėra pakankamai jautrus, norint užfiksuoti visas rūgštis, matome tik dalį jų. Norint identifikuoti rūgštis, pasinaudojau GC-FID (dujų chromatografinis-liepsnos jonizacijos detektorius) sistema matuotais duomenimis [16]. GC-FID sistema yra labai jautri anglies matavimuose todėl šiuo metodu aptinkamos visos rūgštys.

4 lentelė. Karvės pieno riebalų rūgščių išėjimo laikai ir santykinis intensyvumas matuojant GC-FID sistema [16].

Riebalų rūgštys	Laikas	Plotas	% nuo viso ploto
C4:0	3.6751	346.0703	2
C6:0	7.5617	546.2982	3
C8:0	13.3328	680.2452	3
C10:0	19.3339	775.9161	4
C11:0	22.1823	583.5442	3
C12:0	24.9413	836.5029	4
C13:0	27.5464	427.4289	2
C14:0	30.0883	938.7607	4
C14:1	30.9409	420.1657	2
C15:0	32.4768	441.1780	2
C15:1	33.3255	446.2106	2
C16:0	34.8425	1392.3981	7
C16:1	35.3568	433.2511	2
C17:0	37.0186	423.4977	2
C17:1	37.5571	475.5128	2
C18:0	39.1968	925.0052	4
C18:1n9c/9t	39.5928	1470.4976	7
C18:2n6c	40.5024	409.9875	2
C18:2n6t	40.5935	516.7216	2
C18:3n6	41.1265	431.3552	2
C18:3n3	41.8148	418.0072	2
C20:0	43.2294	948.4692	5
C20:1n9	43.5767	514.5960	2
C20:2	44.4909	459.6371	2
C20:3n6	45.0236	373.3903	2
C21:0	45.1405	497.4289	2
C20:3n3	45.4960	365.1494	2
C20:4n6	45.8366	395.0632	2

C20:5n3	46.9962	356.8506	2
C22:0	47.4154	923.0383	4
C22:1n9	47.9114	508.3601	2
C22:2	49.2619	430.7845	2
C23:0	50.1635	407.6153	2
C24:0	53.7698	669.8167	3
C22:6n3	54.5082	313.6678	1
C24:1n9	54.6342	463.0820	2

Norint identifikuoti mūsų gautąsias smailes, kurios atitinka kiekvieną rūgštį, palyginau riebalų rūgščių santykinius intensyvumus tarp GC-IRMS sistemos išmatuotais rezultatais ir GC-FID sistemos rezultatais (12 pav.).

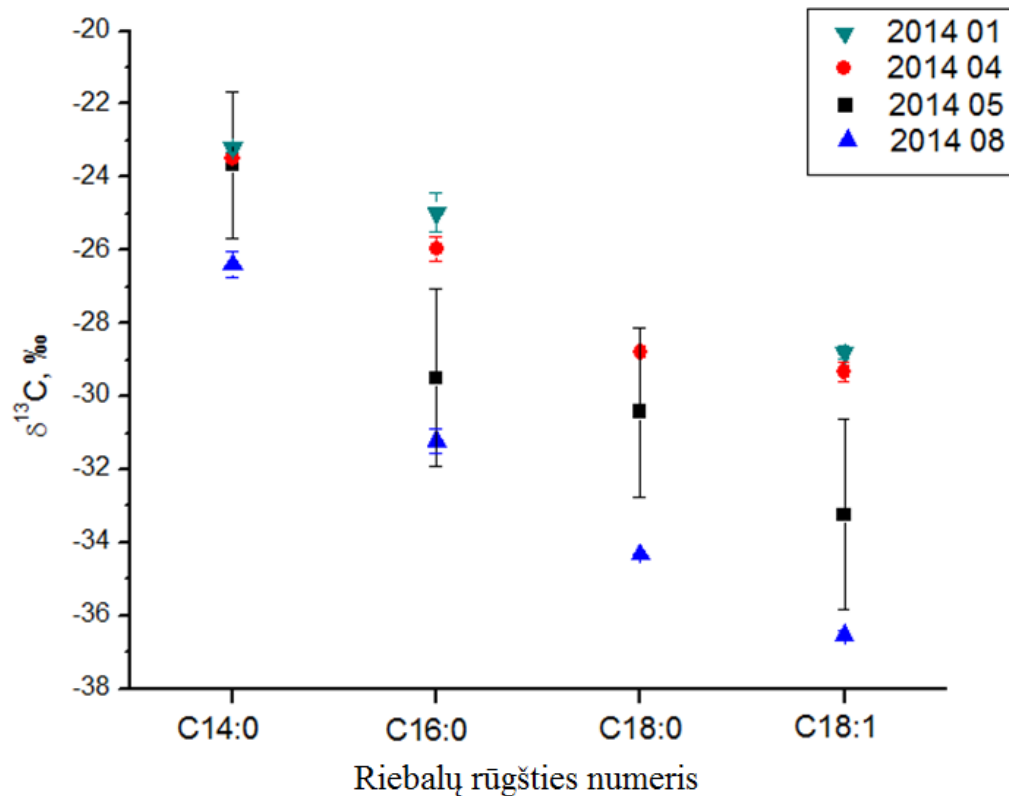


12 pav. Riebalų rūgščių santykinų intensyvumų palyginimas, kuomet matuota GC-FID (vaizduojama pilkai) ir GC-IRMS sistemomis (vaizduojama juodai).

12 pav. gautas paskaičiuotus santyki tarp kiekvienos smailes intensyvumo ir intensyviausios smailes duotajam metodui. Tada palyginame santykinius intensyvumus tarp GS-IRMS ir GS-FID. Smailes kurioms santykiniai intensyvumai tarp dviejų metodu yra panašūs atitiks tas pačias riebiąsias rūgštys.

Palyginus riebalų rūgščių santykinius intensyvumus tarp dviejų matavimo sistemų ir įvertinus tai kad junginiai išsiskiria pagal masę išeidami nuo lengviausio iki sunkiausio galima identifikuoti 4 intensyviausias smailės išmatuotas GC-IRMS sistema. Gauname tokias riebalų rūgštis pradedant nuo intensyviausios smailės: C16:0, C18:1n9, C14:0, C18:0.

4.4. Pieno riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertės



13 pav. Karvės piene esančių riebalų rūgščių anglies izotopų santykio vertės skirtinguose bandiniuose.

Matuotieji pieno bandiniai buvo surinkti Glitiškių kaime laikomos karvės skirtingais metų laikotarpiais (5 lentelė).

5 lentelė. Pieno bandinių rinkimo laikotarpiai.

Bandinio Nr.	Paėmimo data
1	2014-08-03
2	2014-04-23
3	2014-05-20
4	2014-01-18

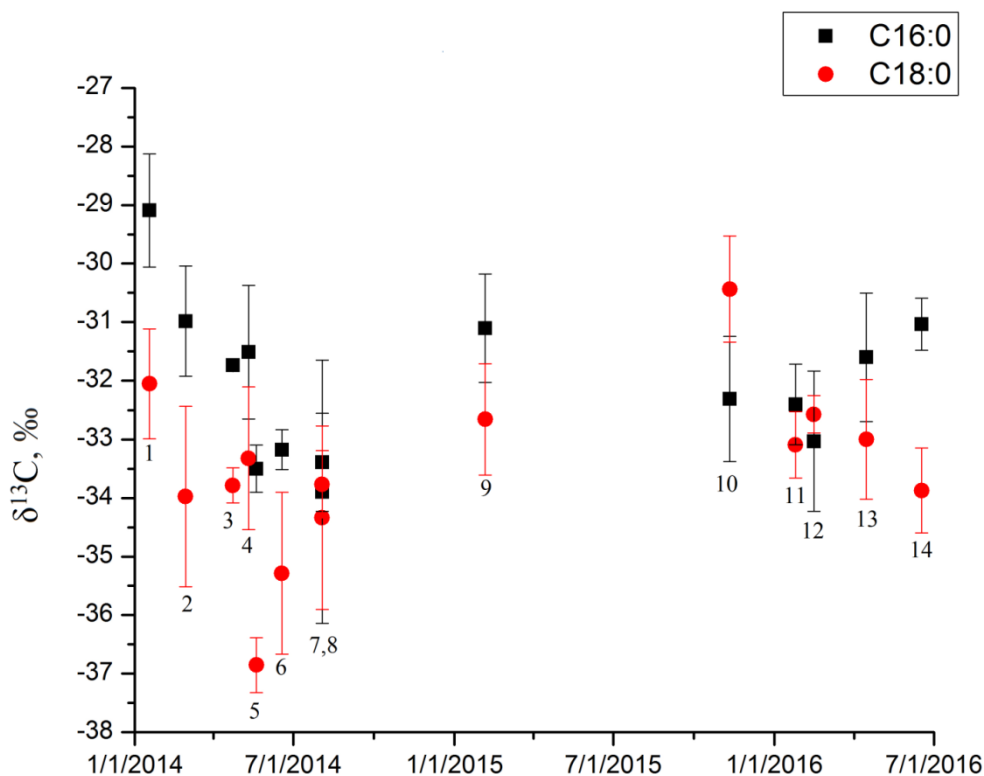
Pastebimas $\delta^{13}\text{C}$ izotopų santykio kitimas laike, kai $\delta^{13}\text{C}$ vertės mažėja pereinant nuo žiemos laikotarpio iki vasaros laikotarpio. Tai atitinka su literatūroje aptinkamu riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ sezoniniu kitimu, kuomet žiemos $\delta^{13}\text{C}$ vertės yra didesnės negu vasaros $\delta^{13}\text{C}$ vertės [17]. Didesnes $\delta^{13}\text{C}$ vertes žiema lemia tai kad nėra šviežios žolės ir karvė yra maitinama kitokiu pašaru.

Palyginus gautas riebalų rūgščių vertes su Slovėnijoje karvių piene išmatuotomis, gauname tokius rezultatus: C16:0 atveju vidutinės $\delta^{13}\text{C}$ vertės yra $-29,6\text{‰}$, o C18:0 atveju vidutinės vertės yra $-34,6\text{‰}$ [18]. Mūsų atveju išmatuotų rūgščių vertės patenka į šias ribas.

Remiantis literatūra, C18:1 riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertės lyginant su C18:0 rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertėmis turėtų būti praturtintos ^{13}C [19], tuo tarpu išmatuotosios $\delta^{13}\text{C}$ vertės tarp šitų rūgščių nesutampa. Gauname, kad C18:1 riebalų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertės lyginant su C18:0 rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertėmis yra nuskurdintos ^{13}C atžvilgiu.

Toliau buvo išmatuoti tokie bandiniai: vienos karvės augintos ekologiniame ūkyje pieno mėginiai rinkti tarp 2014 ir 2016 metų, šitie pieno bandiniai buvo laikomi užšaldyti šaldiklyje iki jų paruošimo matavimams, lietuviškas pienas parduodamas parduotuvėse iš skirtingu gamintoju pirktu žiemos sezonu, lenkiškas pienas parduodamas Lietuvoje ir pienas parduodamas turguje. Šiose matavimuose buvo nagrinėjamos tik C16:0 ir C18:0 riebiosios rūgštys, nes jos yra intensyviausios ir jų $\delta^{13}\text{C}$ vertės priklauso nuo karvės suvartojama maisto. Šiose matavimuose bandoma atskirti ekologišką pieną nuo įprastinio pagal C16:0 ir C18:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertes.

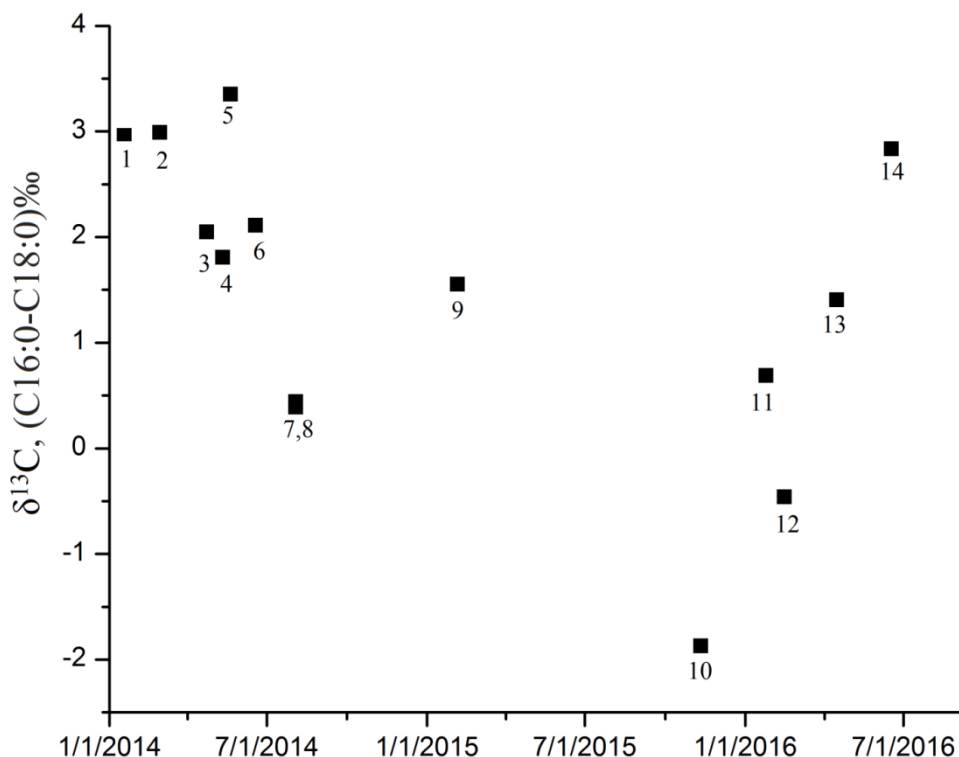
4.5. Anglies izotopų santykio matavimai ekologiškame piene



14 pav. Riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ vertės karvės piene iš ekologiško ūkio surinktu 2014 ir 2016 metais. Taškai pažymėti kvadratais parodo C16:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ vertes, o apskritimai parodo C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ vertes. Taškai pažymėti numeriais 7 ir 8 parodo bandinius paimtus artimu laiku.

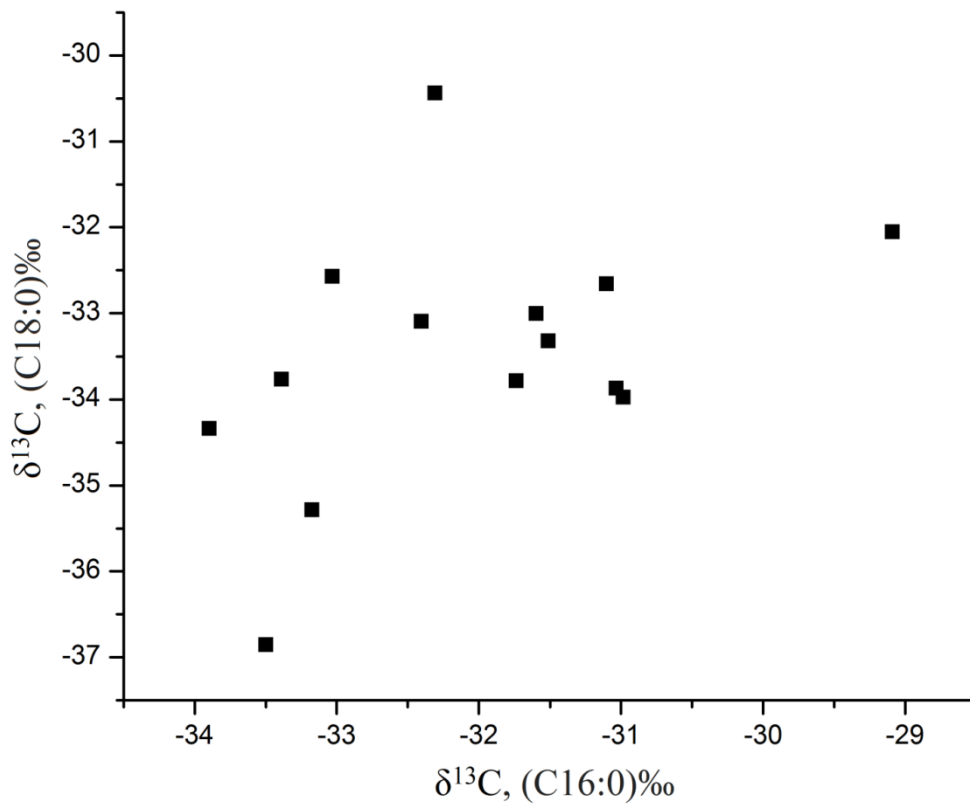
Iš 14 pav. pastebima, kad C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ vertės visada yra mažesnės už C16:0, išskyrus du taškus kur C16:0 rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ vertes buvo žemesnės (taškai pažymėti numeriais 10 ir 12) bet kadangi šie taškai turi ganėtinai nemažas paklaidas ir abiejų rūgščių verčių paklaidos

persikloja galima teigti, kad tikrosios vertės turėtų būti tokios kur C18:0 rūgštis vertės yra žemesnės. Taip pat iš grafiko 14 pav. pastebima tendencija kuri parodo riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ verčių mažėjimą pereinant nuo žiemos sezono prie vasaros sezono 2014 metais (taškai pažymėti numeriais nuo 1 iki 5), toks pat pokytis pastebimas ir 2016 metais (taškai pažymėti numeriais nuo 10 iki 14). Toki kitimą galima paaiškinti dėl šviežios žolės įvedimo į karves mitybą. Nes šviežia žolė yra labiau nuskurdinta $\delta^{13}\text{C}$, o abiejų riebiųjų rūgščių vertės priklauso nuo gyvūno mitybos kas ir lemia abiejų rūgščių kitimą mažėjimo linkme pereinant nuo žiemos iki vasaros sezono. Bet C16:0 riebiųjų rūgščių vertės 2016 metu laikotarpyje (taškai pažymėti numeriais nuo 12 iki 14) kito ne mažėjimo linkme, bet didėjimo. Toks kitimas galėjo atsirasti dėl to, kad C16:0 rūgštis taip pat gali būti fermentuojama gyvulio organizme kas ir lėmė verčių padidėjimą.



15 pav. Riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas karvės piene iš ekologinio ūkio. Bandiniai rinkti 2014 - 2016 metais.

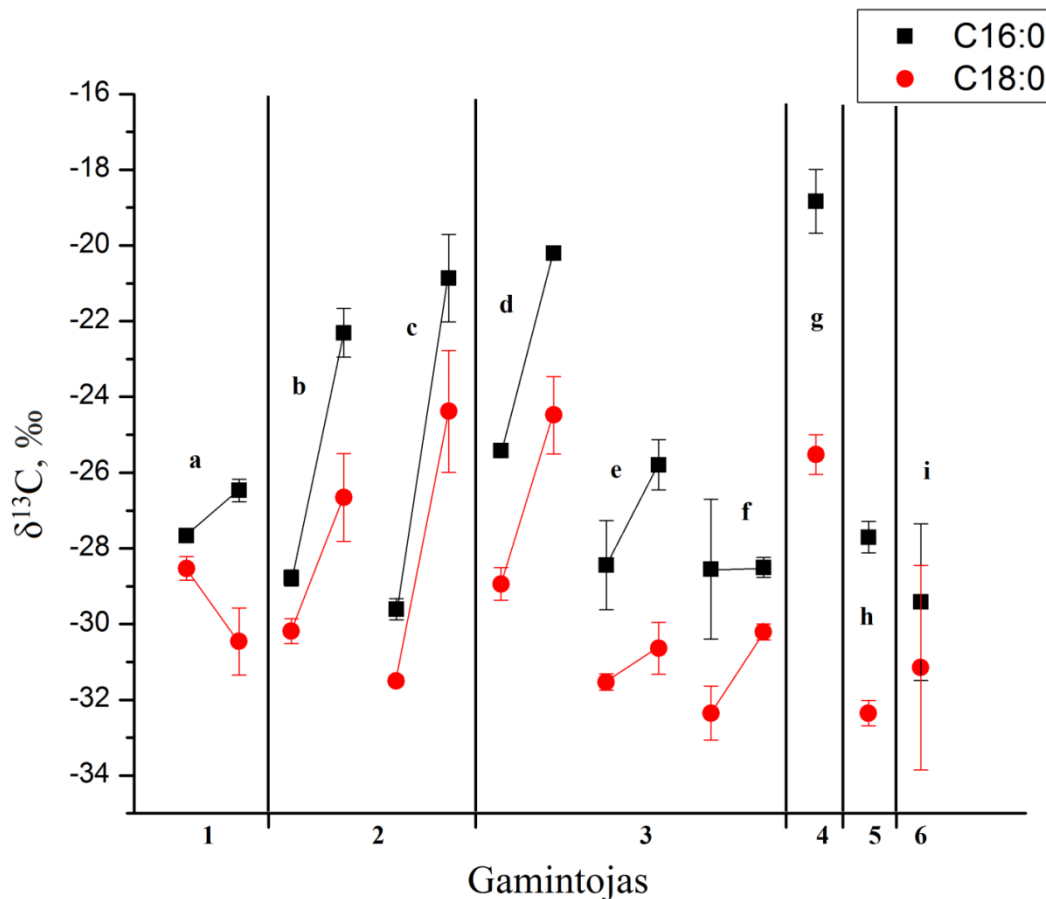
Iš 15 pav. žiūrint į 2014 metu laikotarpį pereinant nuo žiemos sezono prie vasaros sezono (taškai pažymėti numeriais nuo 1 iki 8) matomas C16:0 ir C18:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ skirtumo mažėjimas, bet žiūrint į 2016 metu laikotarpį pereinant nuo žiemos sezono prie vasaros sezono (taškai pažymėti numeriais nuo 10 iki 14) matome C16:0 ir C18:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ skirtumo didėjimą. Abejose laikotarpiuose 2014 ir 2016 metais matome skirtingą pokytį tarp riebiųjų rūgščių skirtumo. Galima teigti, kad C16:0 ir C18:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ skirtumas nėra atsikartojantis sezonškai.



16 pav. C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių priklausomybe nuo C16:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių. Pieno bandiniai rinkti ekologiniame ūkyje 2014 - 2016 metais.

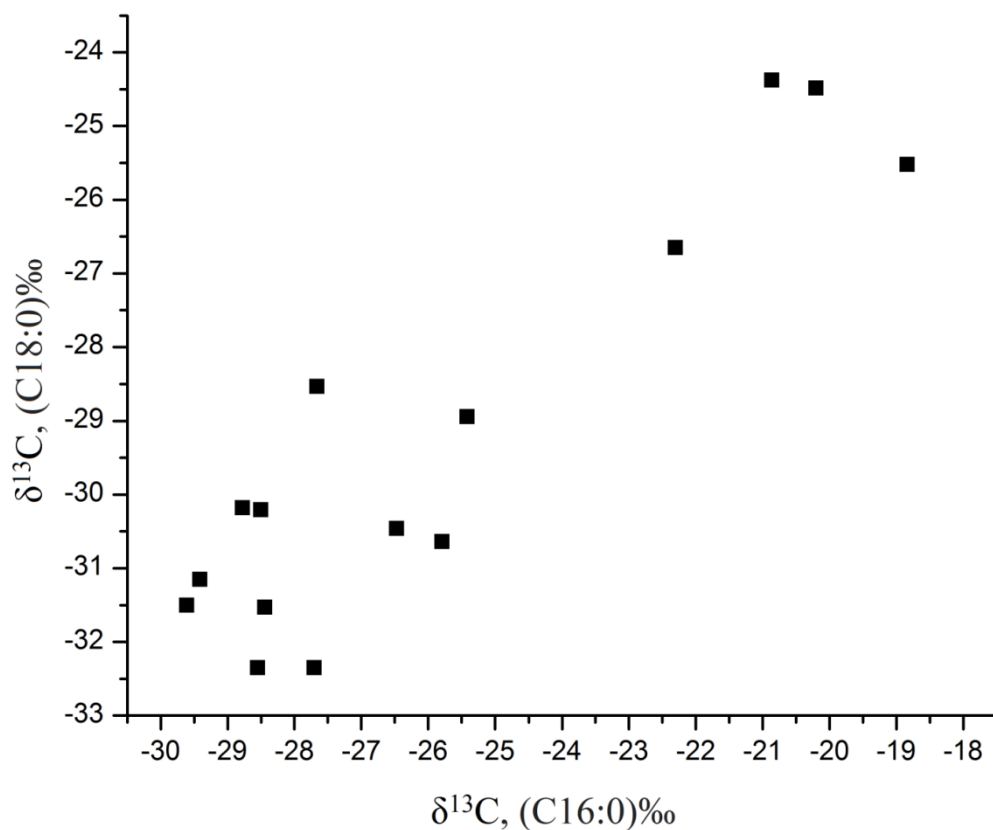
Iš 16 pav. galime matyti riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ verčių kitimą riebiosiose rūgštyse C18:0 ir C16:0 piene iš ekologiško ūkio tarp 2014 ir 2016 metais. C18:0 riebiajai rūgščiai didžiausia $\delta^{13}\text{C}$ verte buvo -30,44‰, o mažiausia -36,86‰. C16:0 riebiajai rūgščiai didžiausia $\delta^{13}\text{C}$ verte buvo -29,09‰, o mažiausia -33,91‰.

4.6. Anglies izotopų santykio matavimai pirktiniame piene



17 pav. Parduotuvėse pirktu pienu žiemos sezono metu $\delta^{13}\text{C}$ vertės C16:0 ir C18:0 riebiosiems rūgštims. 6 skirtingų gamintojų, raidėmis (a-i) žymėjimai nurodo skirtingus produkto pavadinimus, taškai sujungti linijomis parodo verčių pokytį tam pačiam produktui piktam skirtingu laiku žiemos sezone. Taškai "a-f" Lietuviškas pienas parduodamas parduotuvėse be ekologinio produkto žymėjimo. Taškas "g" yra lenkiškas pienas parduodamas Lietuvoje, taškas "h" pienas su ekologiško produkto etikete, taškas "i" naminis pienas parduodamas turguje.

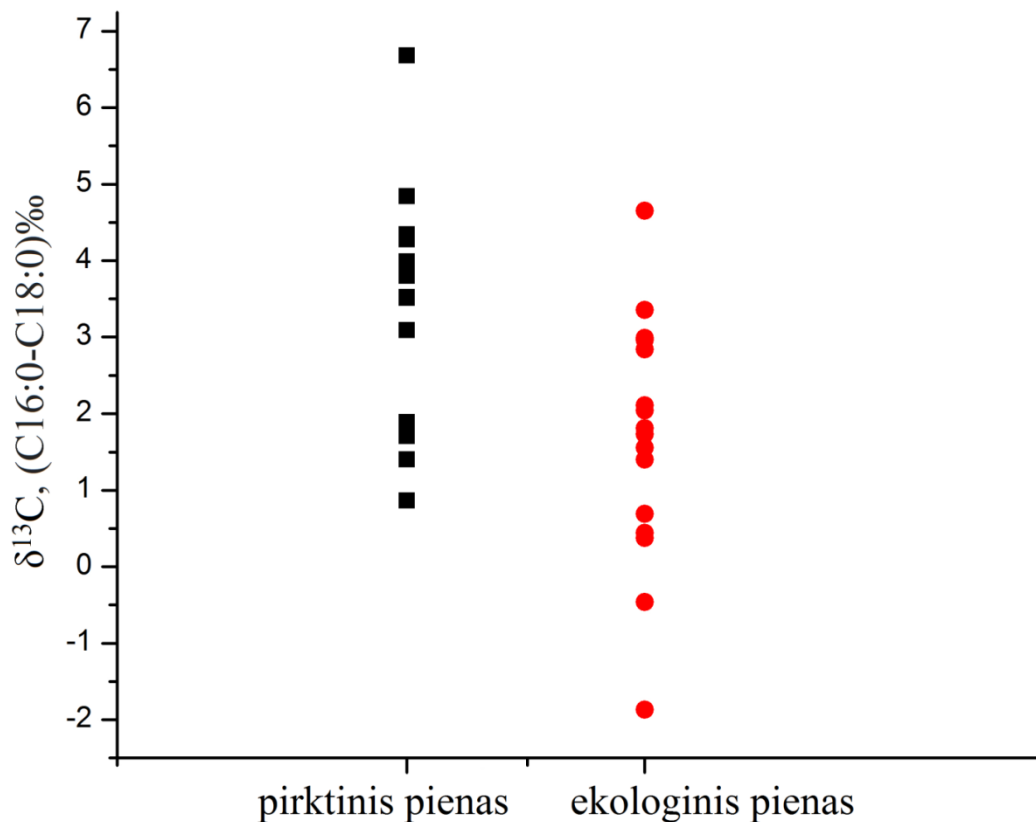
Iš 17 pav. galima matyti, kad pirktiniame piene C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ vertės yra mažesnes už C16:0 riebiosios rūgšties vertes kas atitinka pastebėjimą ekologiniame piene 17 pav. Taip pat pastebima, kad lietuviško pienu gamintojai naudoja skirtingą pašarą ir net tarp to pačio gamintojo pienu produktams su skirtingais pavadinimais (taškai "b" ir "c" antram gamintojui ir taškai "d", "e", "f" trečiam gamintojui) nes matomas skirtumas tarp $\delta^{13}\text{C}$ verčių riebiosiems rūgštims tarp gamintoju. Tarp apjungtų taškų (taškai nuo "a" iki "f") matomi $\delta^{13}\text{C}$ pokyčiai riebiosiems rūgštims kurie parodo pokyčius gyvulio mityboje kurie taip pat skiriasi net ir tarp to pačio gamintojo. Kiekvieno iš išmatuotų pienu produktu gamyboje naudojama kitokia gyvulių šėrimo strategija, kuri neatsikartoja net ir tarp to pačio gamintojo tarp jo produktu su skirtingais pavadinimais. Taškui "g" lenkiškam pienui $\delta^{13}\text{C}$ vertės C18:0 rūgščiai yra panašios kaip ir lietuviškam pienui, bet skiriasi C16:0 vertė - ji yra didesnė. Taške "h" ekologiškam pienui $\delta^{13}\text{C}$ vertės abiejoms rūgštims yra panašios į paprasto pienu vertes. Taškui "i" pienui nupirktam iš turgaus gautos labai didelės paklaidos kurios galėjo atsirasti bandinio paruošimo metu, bet ne dėl matavimo netikslumo.



18 pav. Lietuvoje pirktų žiemos sezono metu pieno bandinių C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių priklausomybė nuo C16:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių.

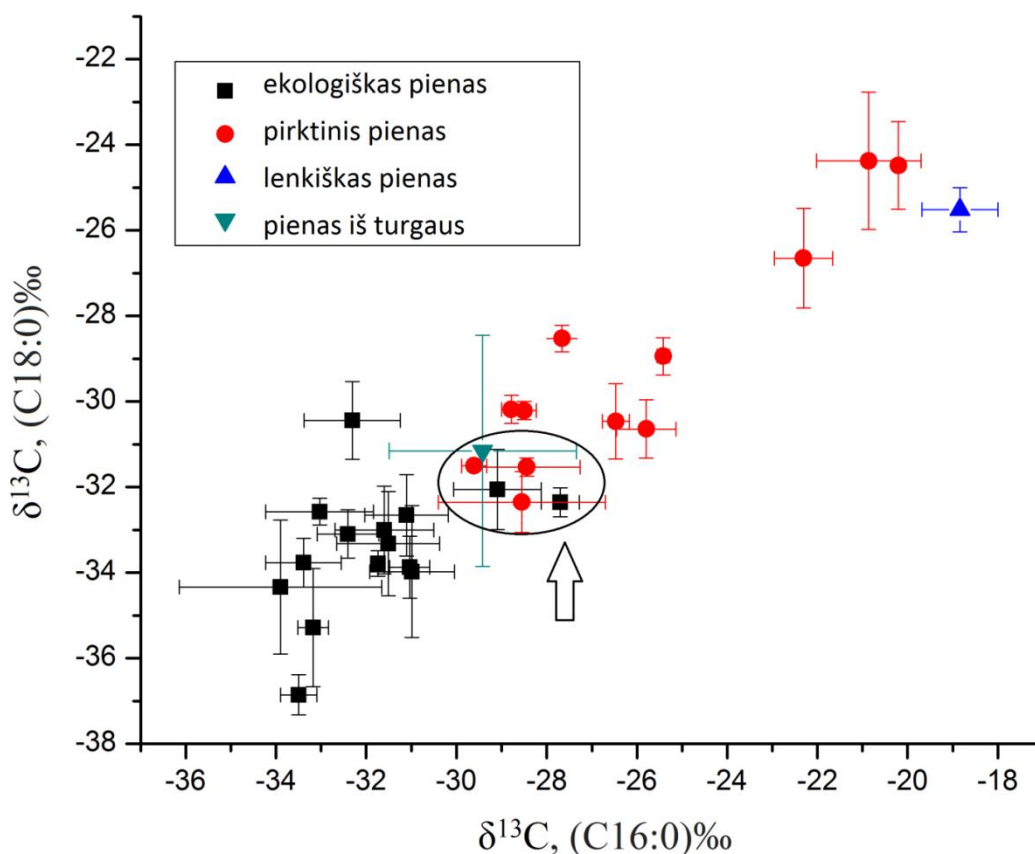
18 pav. matome riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ verčių kitimą riebiosiose rūgštyse C18:0 ir C16:0 piene pirktame iš parduotuvių žemos sezono. C18:0 riebiajai rūgščiai didžiausia $\delta^{13}\text{C}$ verte buvo -24,37‰, o mažiausia -32,35‰. C16:0 riebiajai rūgščiai didžiausia $\delta^{13}\text{C}$ verte buvo -18,83‰, o mažiausia -29,61‰.

4.7. Ekologinio ir įprasto pieno atskyrimas



19 pav. Riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas karvės piene iš ekologinio ūkio ir pirktinio pieno.

Iš 19 pav. matoma, kad C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas yra panašus ir ekologiniam pienui ir pirktiniam pienui. Vienintelis skirtumas, kad vienu atveju pirktiniame piene skirtumas įgavo didesnę vertę, o ekologiniame keletą kartų žemesnes vertes su neigiamu skirtumu tarp rūgščių. Iš šito galima teigti, kad $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas tarp C16:0 ir C18:0 riebiųjų rūgščių nėra tinkamas parametras atskirti ekologišką pieną nuo įprasto.



20 pav. C18:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių priklausomybe nuo C16:0 riebiosios rūgšties $\delta^{13}\text{C}$ verčių pasiskirstymas ekologiniame piene ir pirktiniame piene.

Iš grafiko 20 pav. galima atskirti ekologišką pieną nuo įprastinio pagal C18:0 ir C16:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertes. Ekologiškam pienui atitinka tokios $\delta^{13}\text{C}$ vertės C18:0 rūgščiai nuo -30,44‰ ir C16:0 rūgščiai nuo -31‰ ir einant mažėjimo linkme šių rūgščių vertėms. Pirktiniam įprastam pienui atitinka tokios vertės $\delta^{13}\text{C}$ vertės C18:0 rūgščiai nuo -30,3‰ ir C16:0 rūgščiai nuo -29‰ ir einant didėjimo linkme šių rūgščių vertėms. Taškai papuolantys tarp -30‰ ir -29‰ C16:0 rūgščiai ir tarp -33‰ ir -30,7‰ C18:0 rūgščiai (grafike apskritimu pažymėta vieta) reikalauja papildomo nagrinėjimo, kad tiksliau identifikuoti pieną. Grafike 20 pav. į apskritimą papuola 6 taškai. Trys taškai apskritime atitinka įprastą pirktinį pieną, kadangi žinoma, kad šitie taškai nėra ekologinio pieno taškai, taigi nagrinėjimo nereikia. Vienas taškas apskritime yra pienas iš turgaus, kadangi nežinoma ar tai ekologines ūkininkystes pienas ar ne, reikia turėti papildomu matavimu iš skirtingu laikotarpiu, kad matyti kuria linkme išsidėstys taškai, tada galima bus tiksliau pasakyti ar tai ekologinis pienas ar ne. Taip pat į apskritimą patenka du ekologinio pieno taškai. Kairysis taškas yra iš ekologinio ūkio karves ir turima daugiau tašku tam pienui, jie yra linkę prie žemesnių verčių kaip ir būdinga ekologiniam pienui, todėl kairysis taškas apskritime yra priskiriamas ekologiniam pienui. Paskutinis taškas apskritime nurodytas rodykle yra pirktinis pienas su ekologinio produkto etikete. Kadangi kaip ir pienui iš turgaus yra tik vienas taškas ir jis patenka į apskritimą sunku yra nustatyti autentiškumą produkto, todėl reikia papildomai išmatuoti pieno mėginių iš skirtingu laikotarpiu, kad galima būtų pasakyti ar čia tikrai yra ekologinis pienas. Jeigu taškai išsidėstys link žemesnių verčių pienas yra ekologiškas, o jeigu taškai eis link didesnių verčių tai parodys produkto klastojimą ir neteisingą produkto ženklimą.

Išvados

Pastebėta, kad C16:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertės yra visada didesnės už C18:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ vertes tiek ekologiško, tiek ir pirktinio pieno atvejais.

Pereinant iš žiemos sezono prie vasaros sezono riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 vertės mažėja ekologiškame piene ir tai atsikartoja skirtingais metais.

Riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas nėra pastovus dydis ir jis neatsikartoja skirtingais sezonais. Riebiųjų rūgščių C16:0 ir C18:0 $\delta^{13}\text{C}$ verčių skirtumas nėra tinkamas parametras norint atskirti ekologišką pieną nuo neekologiško.

Remiantis riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ kaita, galime teigti, kad Lietuvos pieno gamintojai naudoja skirtingas karvių šėrimo strategijas.

Ekologiško ir įprasto pieno atskyrimas galimas iš C18:0 ir C16:0 riebiųjų rūgščių $\delta^{13}\text{C}$ verčių pasiskirstymo.

Summary

Edgar Kijevič

Stable carbon isotope ratio measurements in milk fatty acids

The aim of this work was to apply isotope ratio mass spectrometry to differentiate organically and conventionally produced milk. For measurements milk samples were bought from supermarket and collected from organic farm. Measurements were done using GC/C/IRMS system. To achieve objective of this work $\delta^{13}\text{C}$ ratios were analyzed in individual fatty acids of the milk. Objective of this work was achieved when individual milk samples were compared between each other with their $\delta^{13}\text{C}$ ratios in C16:0 and C18:0 fatty acids.

Literatūros sąrašas

- [1] MJ. DeNiro, S. Epstein, "Geochim Cosmochim Acta", 42,495–506 (1978).
- [2] MJ. DeNiro, S. Epstein, "Geochim Cosmochim Acta", 45,341–351 (1981).
- [3] BJ. Peterson, B. Fry, "Annual Review Ecological System", 18,293–320 (1987).
- [4] MH. O'Leary, "Phytochemistry", 20,553–567 (1981).
- [5] Milk Facts
<http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Milk%20Composition%20Page.htm> [žiūrėta 2018/04/04].
- [6] P.F. Fox and P.L.H. McSweeney "Advanced Dairy Chemistry, Volume 2 Lipids", Third Edition, University College Cork, Ireland. 1–42 (2006).
- [7] Lietuvos vartotojų institutas <http://www.vartotojai.lt/index.php?id=1062> [žiūrėta 2018/03/14].
- [8] Department of Ecology and Evolutionary Biology at Cornell University
http://www.cobsil.com/iso_main_stable_principles.php [žiūrėta 2018/01/03].
- [9] J. Mažeika "Izotopiniai metodai aplinkos hidrogeologijoje", VU GMF, Vilnius (2011).
- [10] Stable isotope facility, university of Wyoming <http://www.uwyo.edu/sif/stable-isotopes/stable-isotope-measurement-applications.html> [žiūrėta 2018/01/03].
- [11] B. Fry, „Stable izotope ecology“, (2008).
- [12] A.T.Lebedev "Comprehensive Environmental Mass spectrometry", (2012).
- [13] Bristol University, NERC Life Sciences Mass Spectrometry Facility
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gccirms.html> [žiūrėta 2018/01/03].
- [14] Z.Muccio, P.Jackson "Isotope ratio mass spectrometry", Analyst, 134, 213-222 (2009).
- [15] Metodas pagal Park ir Goins, (1994).
- [16] Darbo vadovo A. Garbaro duomenys.
- [17] H.L. Månsson, "Fatty acids in bovine milk fat", Food & Nutrition Research Volume 52, Issue 1, (2008).
- [18] M.Budja, "Transition to farming – transition to milk culture": a case study from Mala Triglavca, Slovenia Documenta Praehistorica 40(1),97-117, (2013).
- [19] N.Ogrinc, "Lipids, pots and food processing at Hocevarica", Slovenia Documenta Praehistorica 40, (2014).