

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**DAŽĀDU ĀBOLU ŠĶIRŅU IZCELSMES
PĒTĪJUMI**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Rita Kravceviča**

Studenta apliecības Nr.: rk18032

Darba vadītājs: prof., Dr. chem. Arturs Vīksna

Konsultants: MSc. Jānis Ruško

Konsultants: MSc. Lauma Buša

RĪGA

2020

ANOTĀCIJA

Dažādu ābolu šķirņu izcelsmes pētījumi. Kravceviča R., zinātniskais vadītājs Dr.Chem., prof. Vīksna A. Maģistra darbs, 53 lappuses, 35 attēli, 12 tabulas, 46 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Darbā tika veikta literatūras izpēte par izotopu attiecības un aminoskābju noteikšanu pārtikas produktos. Eksperimentālajā daļā tika pētītas Latvijā audzētu ābolu sēklas. Kopā tika pētītas piecas ābolu šķirnes ar dažādiem apsaimniekošanas veidiem. Paraugiem tika noteikta oglekļa un slāpekļa izotopu attiecība, un aminoskābes. Iegūtie rezultāti tika salīdzināti savā starpā.

PĀRTIKAS IZSEKOJAMĪBA, PĀRTIKAS IZCELSME, IZOTOPU ATTIECĪBA, AMINOSKĀBES, ĀBOLI

ABSTRACT

Studies on the origin of different apple cultivars. Kravceviča R., supervisor Doc.Chem., prof. Vīksna A. Master's thesis, 53 pages, 35 figures, 12 tables, 46 attachments, literature references. In Latvian.

A literature analysis was performed about isotope ratio and amino acids determination in food. In the experimental part were studied apple seeds grown in Latvia. Total was studied five apple cultivars with different management methods. For the samples was determined carbon and nitrogen isotope ratio and amino acids. Obtained results were compared with each other.

FOOD TRACEABILITY, FOOD ORIGIN, ISOTOPE RATIO, AMINO ACIDS, APPLE

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	4
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	6
1.1. Pārtikas autentifikācija.....	6
1.2. Stabīlie izotopi	7
1.2.1. Stabīlo izotopu izmantošana pārtikas pētniecībā	8
1.2.2. Izotopu attiecības masspektrometrija	13
1.3. Aminoskābes.....	16
1.3.1. Aminoskābju izmantošana pārtikas pētniecībā	17
1.3.2. Aminoskābju noteikšanas metodes	22
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	25
2.1. Izmantotās vielas.....	25
2.2. Izmantotā aparatūra un piederumi	25
2.3. Analizējamo paraugu apraksts	26
2.4. Izotopu attiecības noteikšana paraugos.....	26
2.5. Aminoskābju noteikšana paraugos	28
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	30
3.1. Izotopu attiecība analizējamajos paraugos.....	30
3.2. Aminoskābes analizējamajos paraugos.....	43
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	48
PATEICĪBAS	52

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

IRMS	Izotopu attiecības masspektrometrija
GC	Gāzu hromatogrāfija
HPLC	Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija
CE	Kapilārā elektroforēze
FID	Liesmas jonizācijas detektors
SPE	Cietfāzes ekstrakcija
C3	Klasiskais fotosintēzes ceļš, kur CO ₂ fiksācijas rezultātā veidojas savienojums ar trim oglekļa atomiem - fosfoglicerīnskābe
PDB	Standarts, pret kuru tiek noteikts oglekļa izotopu daudzums

IEVADS

Pasaules pārtikas tirgus globalizācija ir izraisījusi to, ka patērētāji arvien vairāk uztraucas par pārtikas autentiskumu. Pārtikas autentifikācija ietver: izcelsmes, audzēšanas, apstrādāšanas metodes noteikšanu. Autentifikācija ir īpaši svarīga bioloģiski audzētiem pārtikas produktiem, tā kā to audzēšanai nedrīkst izmantot pesticīdus, sintētiskos mēslošanas līdzekļus, hormonus, to nosaka Padomes regula (EK) Nr. 834/2007, bet ne visi ražotāji to ievēro. Tādējādi tiek maldināts patērētājs [1].

Āboli ir viens no ekonomiski izdevīgākajiem augļiem pasaulē. Tos audzē visās mērenajās joslās un bieži vien, to audzēšanā netiek ievēroti visi paredzētie noteikumi. Uz tiem attiecas ES tiesību akti (EK Regula 1182/2007 un tās grozījumi ES Regulā 543/2011), kas pieprasa norādīt izcelsmes valsti un vajadzības gadījumā arī šķirni, mazinot patērētāju maldināšanu [2].

Izotopu attiecība un aminoskābes pārtikas produktos tiek pētītas divu iemeslu dēļ: pirmkārt, ģeogrāfiskās izcelsmes noteikšanai, otrkārt, apsaimniekošanas veida dēļ. Abi šie faktori ir būtiski patērētājiem, tā kā pēdējo gadu laikā, paaugstinoties pārtikas pieprasījumam, palielinās patērētāju maldināšana.

Izmantojot izotopu attiecības masspektrometriju var noteikt izotopu attiecību lielākā daļā pārtikas produktos un iegūt informāciju par to izcelsmi, un audzēšanas apstākļiem. Tā, piemēram, informācija, ko var uzzināt no oglekļa izotopu attiecības ir audzēšanas klimats. Slāpekļa izotopu attiecība sniedz informāciju par cilvēcisko darbību, piemēram, mēslošanu.

Aminoskābes ir dabīgu pārtikas produktu sastāvdaļa, kuru potenciālo daudzumu ietekmē vairāki faktori, kā piemēram, augļu nogatavināšanās stadija, minerālvielu daudzums, ūdens daudzums, klimatiskie apstākļi, cilvēciskā darbība. Līdz ar to, aminoskābju pētīšanu var izmantot, pārtikas produktu izcelsmes noteikšanā.

Darba mērķis: Izpētīt slāpekļa, oglekļa izotopu attiecības un aminoskābes dažādu šķirņu Latvijā audzētiem āboliem.

Uzdevumi:

1. Veikt literatūras analīzi par izotopu attiecību un aminoskābēm, to noteikšanas metodēm.
2. Eksperimentāli noteikt oglekļa, slāpekļa izotopu attiecības un aminoskābju kompozīciju Latvijā audzētu ābolu sēklām.
3. Izvērtēt un savā starpā salīdzināt iegūtos rezultātus.

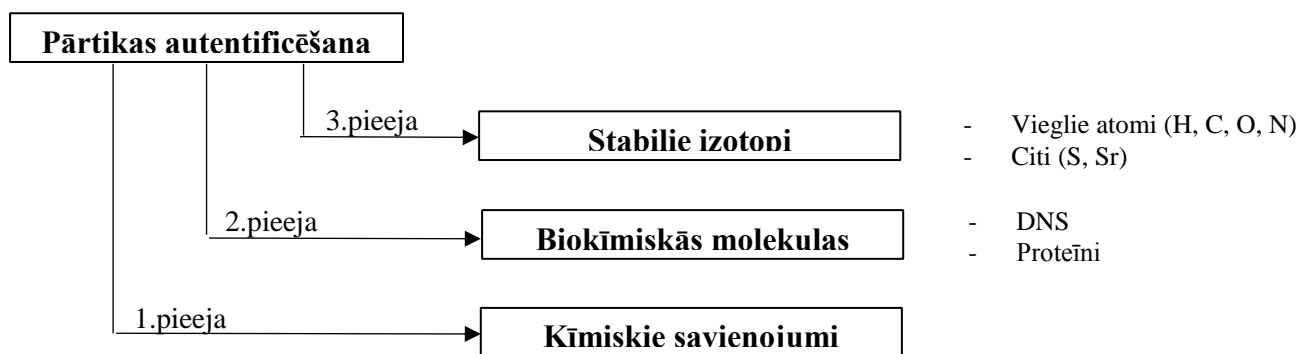
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Pārtikas autentifikācija

Pārtikas autentifikācija ir process, kurā tiek pārbaudīts vai pārtikas produkts atbilst tā etiķetes aprakstam. Pārtikas autentifikācija ietver izcelsmes, audzēšanas, apstrādāšanas metodes noteikšanu. Īpaša uzmanība tiek pievērsta augstvērtīgiem produktiem, tā kā tie parasti tiek pakļauti krāpnieciskai marķēšanai. Izcelsmes noteikšana ir svarīga pārtikas nekaitīgumam, pārtikas kvalitātei un patērētāju aizsardzībai, kā arī atbilstībai valsts tiesību aktiem, starptautiskajiem standartiem un vadlīnijām. Sakarā ar pārtikas tirgus globalizāciju un pieejamības palielināšanos, patērētāji arvien vairāk ir ieinteresēti zināt ģeogrāfisko izcelsmi. Pārtikas produktu autentifikācijai un kvalitātes nodrošināšanai ir liela interese gan no komerciālā, gan no juridiskā viedokļa [3]. No komerciālā viedokļa tas ir svarīgi ražotājiem piešķirot vērtību produktiem, bet no juridiskā aspekta tas ir nepieciešams, tā kā pārtika ir pakļauta vairākiem normatīvajiem aktiem.

Pārtikas autentiskumu var noteikt izmantojot trīs analītiskās pieejas, atkarībā no mērķa informācijas iegūšanas (skatīt 1.1. att.):

1. pieeja – informācija tiek iegūta no pārtikas ķīmiskā sastāva;
2. pieeja – informācija tiek iegūta biomolekulārā līmenī, galvenokārt no DNS vai olbaltumvielām;
3. pieeja – informācija tiek iegūta no stabilo izotopu attiecības [4].



1.1. att. Pieejas pārtikas autentifikācijai [4]

Ķīmiskajai pieejai ir trīs atsevišķi virzieni, no kuriem izriet trīs dažādas metodoloģijas:

- a) Dažādi ķīmiskie savienojumi, kas identificēti, izmantojot dažādas analītiskās metodes. Šajā metodoloģijā tiek izmantoti ķīmiskie marķieri, kas ir definēti kā īpaši komponenti, kas raksturo kvalitātes īpašības, kas ir saistītas ar pārtikas autentiskumu;

b) Komponentu profils, kas raksturo saistīto sastāvdaļu saturu, kam ir dažādas fizikālas vai ķīmiskas īpašības. Komponentu profilu parasti iegūst, izmantojot vienu analītisko metodi;

c) Instrumentālie pirkstu nospiedumi, kas atspoguļo analizējamā parauga sastāvu un, ko var saistīt ar tā autentiskumu [4].

Šīs metodiskās pieejas var izmantot diviem mērķiem: pārbaudīt pārtikas produktu viltošanu un autentiskumu. Metodoloģiskās pieejas a) un b) galvenokārt ir vērstas uz autentificēšanu, tām ir nepieciešamas selektīvas analītiskās pieejas, lai identificētu un kvantitatīvi noteiktu savienojumu. Tāpēc ir svarīgi, lai katram savienojumam, to identificējot, ir izmantots piemērots standarts [4].

1.2. Stablie izotopi

Izotopus iedala trīs veidos, pamatojoties uz to stabilitāti un izcelsmi:

- radioaktīvie izotopi;
- radiogēniski stablie izotopi;
- stablie izotopi.

Radioaktīvie izotopi ir tie, kas spontāni sadalās. Stablie izotopi – var veidoties kā radioaktīvās sabrukšanas produkti (t.i. radiogēniski stablie izotopi). Stablie izotopi ir visnoderīgākie ekoloģiskos pētījumos un jo īpaši vieglo elementu: H, C, N, O, un S, kas ir organisko materiālu galvenās sastāvdaļas [5].

Var nosaukt divus iemeslus, kāpēc tiek pētīta izotopu attiecība pārtikas produktos, pirmkārt, tas ir apsaimniekošanas veida, otrkārt, pārtikas produktu ģeogrāfiskās izcelsmes noteikšana [6].

Stablie izotopi piedāvā trīs iespējamās priekšrocības pārtikas analīzē, pirmkārt, dzīvnieku audu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecības atspoguļo oglekļa un slāpekļa migrāciju ilgā laika posmā. Otrkārt, tie balstās uz organisko vielu asimilāciju un, treškārt, var noteikt, izmantojot salīdzinoši mazus parauga daudzumus [6].

Oglekļa izotopu attiecība ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) ir saistīta ar klimatiskajiem apstākļiem, augu tipu un apsaimniekošanas veidu, kā arī ar ģeogrāfisko izcelsmi [7, 8]. Pētījumi liecina, ka augi mēdz bagātināties ar vieglo oglekļa izotopu (^{12}C) organiskās sintēzes ceļā. Temperatūrai un $\delta^{13}\text{C}$ ir negatīva korelācija, tas būtu, samazinoties temperatūrai palielinās $\delta^{13}\text{C}$ [9].

Slāpekļa izotopu attiecību ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ietekmē ģeogrāfiskā apgabala raksturlielumi. Dažādi stresa faktori, piemēram, zema temperatūra vai ūdens trūkums, var paaugstināt izotopu vērtību [8]. Galvenais cilvēciskās darbības rezultāts, kas ietekmē augos esošā $\delta^{15}\text{N}$ daudzumu, ir augu mēslošana, tādējādi augu $\delta^{15}\text{N}$ atspoguļo lauksaimniecisko darbību. Pētījumi liecina, ka

dažādiem ķīmiskajiem mēslošanas līdzekļiem ir līdzīgs $\delta^{15}\text{N}$ rādītājs. To var izskaidrot ar to, ka slāpeklis nāk no viena avota, bez jebkādiem slāpekļa izotopu frakcionēšanas procesiem. Tomēr dažos organiskajos mēslošanas līdzekļos var atšķirties $\delta^{15}\text{N}$ attiecība. Piemēram, mājputnu kūtsmēslos $\delta^{15}\text{N}$ ir 2,7 ‰, piena govju kūtsmēslos – 4,5‰, bet cūku kūtsmēslos – 11,6‰ [9].

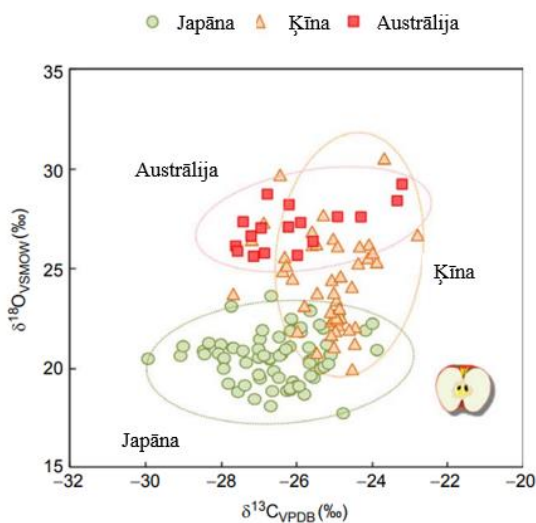
Slāpekļa izotopu korelācija ar temperatūru ir pretēja salīdzinājumā ar oglekļa izotopiem. Augu $\delta^{15}\text{N}$ un temperatūras korelācija ir pozitīva, tā kā temperatūra ietekmē augsnē esošo mikroorganismu darbību. Kad temperatūra paaugstinās, augsnē esošās baktērijas aktivizējas, izraisot ātrāku augsnes mineralizāciju un nitrifikāciju. Tādā veidā ātrāk tiek patērēts ^{14}N , kas ir vairāk reaģētspējīgs un ^{15}N bagātināts augsnē [9].

Nokrišņi ir svarīgs faktors, kas var ietekmēt $\delta^{15}\text{N}$. Daudzos apgabalos augos palielinās $\delta^{15}\text{N}$, samazinoties nokrišņu daudzumam, kas nozīmē, ka $\delta^{15}\text{N}$ attiecība sausajos apgabalos ir augstāka, salīdzinājumā ar mitrākiem apgabaliem [9].

1.2.1. Stabilo izotopu izmantošana pārtikas pētniecībā

Lai aizsargātu patērētāju intereses, tiek veikti pētījumi, lai izstrādātu kvalitātes kontroles metodes, kas ļauj atklāt patērētāju krāpšanu, piemēram, uz etiķetēm sniegto informāciju, kas maldina patērētājus par pārtikas raksturu, izcelsmi. Jo īpaši attiecībā uz āboliem, ES tiesību akti (EK Regula 1182/2007 un tās grozījumi ES Regulā 543/2011) pieprasa norādīt izcelsmes valsti un vajadzības gadījumā arī šķirni, tādējādi izvairoties no patērētāju maldināšanas [2].

Lai noteiktu ābolu sulu izcelsmi, tām tika noteiktas oglekļa un skābekļa izotopu attiecības. Pētot sulu paraugus no Austrālijas, Ķīnas, Japānas un Dienvidāfrikas. Japānas ābolu sulas paraugam bija raksturīgas zemākas $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{18}\text{O}$ vērtības salīdzinājumā ar citu valstu sulu paraugiem. Paralēli tika pētīti arī Japānā un Ķīnā audzētie āboli. Iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{18}\text{O}$ vērtības āboliem un ābolu sulām bija salīdzināmas (skat. 1.2.att.) [10].



1.2. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{18}\text{O}$ vērtības Austrālijas, Ķīnas un Japānas ābolos [10]

Tādējādi $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{18}\text{O}$ vērtības ir noderīgas, nosakot gan ābolu, gan to sulas ģeogrāfisko izcelsmi starp Japānu un Ķīnu. Augu $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir saistītas ar nokrišņu daudzumu, kā arī ar CO_2 fracionēšanu. Balstoties uz Japānas meteoroloģiskās aģentūras klimata statistiku, nokrišņu daudzums Japānā bija diapazonā no 800 līdz 1300 mm/gadā, bet Ķīnā – no 100 līdz 800 mm/gadā. Šie dati liecina, ka mazāks nokrišņu daudzums Ķīnā var atspoguļot ābolu augstākas $\delta^{13}\text{C}$ vērtības [10].

Botteon pētījumā noteica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ un $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ izotopu attiecību augļos, kā analizējamo paraugu izmantojot mušas (*Anastrepha fraterculus*). Mušas tika pakļautas mākslīgai diētai, kur tās tika barotas ar pētāmo augli. Izotopu attiecības tika izteiktas delta vienībās (tūkstošos, δ ‰), un tika salīdzinātas ar starptautiskajiem standartiem (VPDB) un atmosfēras slāpekli (N_2), attiecīgi ogleklim un slāpeklim [11].

Kopumā tika pētītas 59 mušas, kas tika ievāktas no trim dažādiem ābolu dārziem. Interesanti ir tas, ka izotopu attiecības atšķīrās starp dzimumiem (skat. 1.1. tabulu), aprēķinos tika ņemtas vidējās vērtības. Vidējā $\delta^{13}\text{C}$ vērtība bija $-25,7 \pm 0,2\text{‰}$, kas skaidri norāda uz C3 sintēzes ceļu un saimniecisko darbību, savukārt, vidējā $\delta^{15}\text{N}$ vērtība bija $5,4 \pm 0,6\text{‰}$ [11].

1.1. tabula

Savvaļas mušu izotopiskais sastāvs no trim ābeļdārziem [11]

Ābeļdārzs	Dzimums	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^{15}\text{N}$ ‰
A	Vīrišķais	$-25,5 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,6$
	Sievišķais	$-25,1 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,3$
B	Vīrišķais	$-25,8 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,6$
	Sievišķais	$-25,6 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,7$
C	Vīrišķais	$-26,0 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,7$
	Sievišķais	$-26,2 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,6$

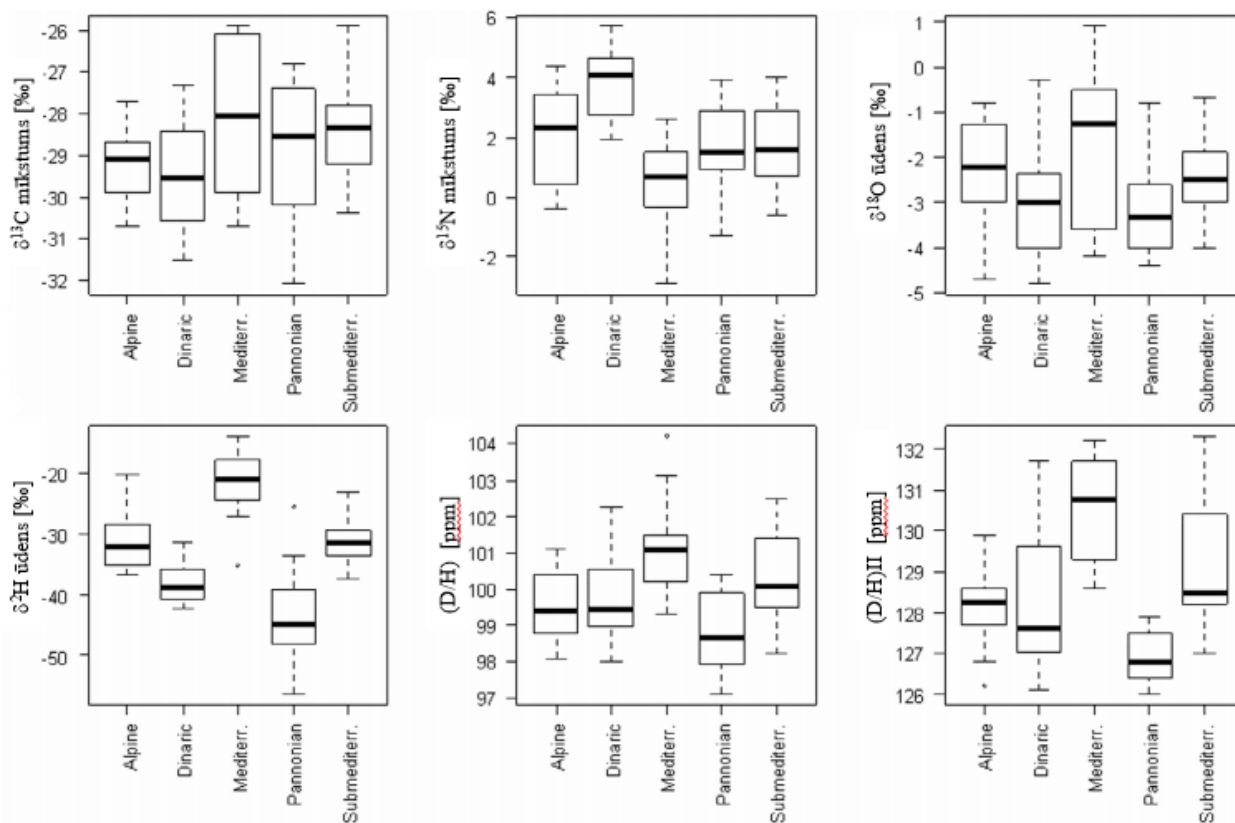
Lai izpētītu, kā izotopu attiecību ietekmē augļu ģeogrāfiskā izcelsme, Slovēnijā tika ievāktas trīs ābolu šķirnes (*Idared*, *Golden Delicious* un *Topaz*) no pieciem dažādiem Slovēnijas ģeogrāfiskajiem reģioniem. Tādējādi tika veikti pētījumi, kas sniedza informāciju par izotopu attiecību atkarībā no reģiona un šķirnes [12].

Iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ vērtības cukuriem bija no $-28,4$ līdz $-22,9\text{‰}$, ābolu mīkstumā – no $-32,1$ līdz $-25,9$ ‰ un etanolā – no $-29,1$ līdz $-22,9\text{‰}$. Augstākas vērtības parasti tiek novērotas cukuros,

savukārt, zemākas mīkstumos. Šajā pētījumā izmantojot $\delta^{13}\text{C}$ vērtības nevar noteikt ābolu izcelsmes reģionu [12].

Sulas mīkstumā $\delta^{15}\text{N}$ vērtības bija atšķirīgas starp reģioniem. Iegūtās vērtības bija sekojošas, augstākās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības bija iegūtas no Dinārijas reģiona paraugiem (3,3 – 4,3 ‰), zemākās vērtības tika iegūtas Vidusjūras paraugiem (1,0 – 1,7 ‰). Balstoties uz šo var apstiprināt to, ka, pamatojoties uz $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām, var noteikt sulas izcelsmes reģionu. Tas ir pretrunā ar citiem pētījumiem, kur apgalvo, ka izcelsmes reģionu var noteikt tikai balstoties uz $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām. Tomēr šo vērtību apvienojums rada atšķirīgas kopas ar daļēju pārklāšanos [12].

1.3. attēlā tiek atspoguļotas izotopu vērtības atkarībā no izcelsmes reģiona. Augstākās $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ābolu mīkstumā ir paraugiem no Vidusjūras reģiona, tas ir saistīts ar klimatiskajiem apstākļiem reģionā. Jāuzsver, ka Vidusjūras reģionā ir maigāks klimats [12].



1.3. att. Ģeogrāfiskās izcelsmes (Alpu, Dinārijas, Vidusjūras, Pannonijas un Vidusjūras piekraste) ietekme uz stabilo izotopu vērtībām, Slovēnijas ābolu sulas paraugos [12]

Pētot augļu, šajā gadījumā ābolu, izcelsmi, ir svarīgi zināt, kas tieši sniegs labākus rezultātus, kādu analītu labāk izmantot. Pētnieki no Itālijas atlasīja četras ābolu šķirnes (*Cripps*

Pink, Gala, Golden Delicious, Granny Smith) no četriem dažādiem Itālijas ziemeļdaļas reģioniem. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vērtības noteica ābolu mizā, mīkstumā un sēklās [2].

Mizā $\delta^{13}\text{C}$ vērtības statistiski ļoti atšķīrās no $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām mīkstumā un sēklās. Mizā vienmēr ir mazāks smagāka oglekļa izotopa daudzums, salīdzinājumā ar pārējām frakcijām, kā rezultātā $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir negatīvākas, apmēram 2 ‰ zemākas salīdzinājumā ar tā vērtībām sēklās un mīkstumā. Mīkstumā un sēklās $\delta^{13}\text{C}$ vērtības bija līdzīgas. $\delta^{13}\text{C}_{\text{auglis}} / \delta^{13}\text{C}_{\text{mīkstums}}$ un $\delta^{13}\text{C}_{\text{auglis}} / \delta^{13}\text{C}_{\text{sēklas}}$ attiecība vienmēr sanāca tuvu 1,0. Triju ābolu frakciju $\delta^{15}\text{N}$ vērtības bija diapazonā no 1,5 līdz 2,6 ‰. Mīkstuma izotopu vērtība bija tuvāka vesela augļa vērtībai $\delta^{15}\text{N}_{\text{auglis}} / \delta^{15}\text{N}_{\text{mīkstums}} = 0,98$. Mizas $\delta^{15}\text{N}$ vērtība tāpat kā $\delta^{13}\text{C}$ vērtība bija zemāka salīdzinājumā ar augļa izotopu vērtībām. Iegūtie rezultāti atkarībā no reģiona, šķirnes un augļa frakcijas attēlotas 1.2.tabulā [2].

1.2. tabula

Ābolu un ābolu frakciju $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ vērtības pēc to ģeogrāfiskās izcelsmes un šķirnes [2]

Ģeogrāfiskā izcelsme				
	Bolcāno	Ferrāra	Udīne	Verona
$\delta^{13}\text{C}_{\text{auglis}}$	-24,96 ± 0,19	-26,07 ± 0,18	-25,43 ± 0,16	-24,39 ± 0,05
$\delta^{13}\text{C}_{\text{mīkstums}}$	-24,54 ± 0,23	-25,68 ± 0,18	-25,21 ± 0,15	-24,20 ± 0,07
$\delta^{13}\text{C}_{\text{miza}}$	-27,55 ± 0,10	-29,10 ± 0,10	-26,64 ± 0,08	-25,57 ± 0,08
$\delta^{13}\text{C}_{\text{sēkla}}$	-25,75 ± 0,08	-26,07 ± 0,07	-25,23 ± 0,05	-23,75 ± 0,09
$\delta^{15}\text{N}_{\text{auglis}}$	1,96 ± 0,02	2,63 ± 0,07	1,21 ± 0,04	1,75 ± 0,06
$\delta^{15}\text{N}_{\text{mīkstums}}$	1,98 ± 0,05	2,68 ± 0,08	1,28 ± 0,05	1,73 ± 0,07
$\delta^{15}\text{N}_{\text{miza}}$	1,50 ± 0,07	1,87 ± 0,01	0,74 ± 0,05	1,73 ± 0,05
$\delta^{15}\text{N}_{\text{sēkla}}$	2,94 ± 0,08	3,07 ± 0,05	1,83 ± 0,06	2,63 ± 0,06
Šķirne				
	Gala	Golden	Granny	Pink
$\delta^{13}\text{C}_{\text{auglis}}$	-24,82 ± 0,19	-25,41 ± 0,19	-25,00 ± 0,18	-25,62 ± 0,19
$\delta^{13}\text{C}_{\text{mīkstums}}$	-24,60 ± 0,19	-25,11 ± 0,20	-24,55 ± 0,18	-25,11 ± 0,21

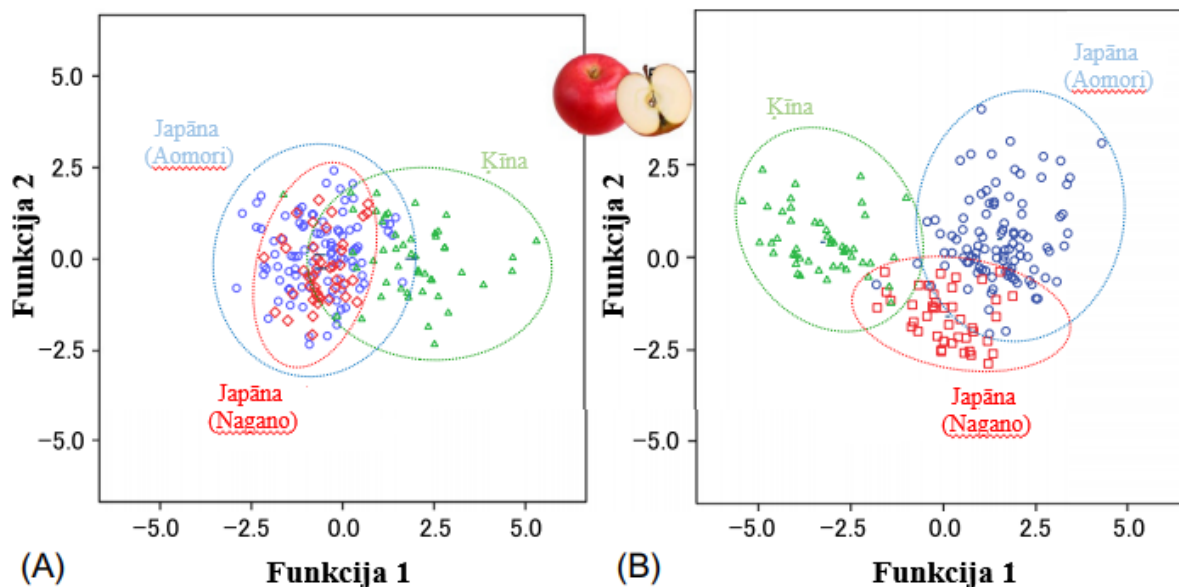
1.2. tabulas turpinājums

$\delta^{13}\text{C}_{\text{miza}}$	$-26,54 \pm 0,25$	$-27,48 \pm 0,26$	$-27,42 \pm 0,27$	$-27,53 \pm 0,22$
$\delta^{13}\text{C}_{\text{sēkla}}$	$-24,82 \pm 0,12$	$-25,13 \pm 0,18$	$-25,25 \pm 0,18$	$-25,59 \pm 0,11$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{auglis}}$	$2,02 \pm 0,11$	$1,80 \pm 0,10$	$1,92 \pm 0,06$	$1,80 \pm 0,11$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{mikstums}}$	$2,03 \pm 0,10$	$1,83 \pm 0,08$	$2,03 \pm 0,09$	$1,74 \pm 0,12$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{miza}}$	$1,55 \pm 0,08$	$1,35 \pm 0,10$	$1,21 \pm 0,10$	$1,71 \pm 0,09$
$\delta^{15}\text{N}_{\text{sēkla}}$	$2,72 \pm 0,05$	$2,51 \pm 0,09$	$2,54 \pm 0,09$	$2,68 \pm 0,05$

Katrai analītiskai metodei ir savas priekšrocības un trūkumi (vai arī ierobežojumi). Pārtikas un dzērienu izcelsmes noteikšanai parasti nav pietiekami precīzi rezultāti, ja tiek izmantota tikai viena analītiska metode. Lai mazinātu šādus trūkumus vai ierobežojumus, pārtikas produktu izcelsmes noteikšanai tiek piedāvāts izmantot vairāku metožu kombināciju. Kopš 2000. gada stabilie izotopi un mikroelementi tiek izmantoti pārtikas produktu ģeogrāfiskās izcelsmes noteikšanai, piemēram, labībai, medum, eļļām, tējām, ikdienā lietotajai pārtikai un gaļai [13].

Iepriekš minēto metožu kombinācija sniedz iespēju noteikt ģeogrāfisko izcelsmi dažādiem dzērieniem, tostarp vīniem, ābolu sulām, apelsīnu sulām, citronu sulām, sidriem. Vienā no pētījumiem tika noteikta ābolu izcelsme no pieciem Slovēnijas reģioniem. Precizitāte, kas tika iegūta, balstoties tikai uz stabilo izotopu attiecību (t.i. oglekļa, slāpekļa, skābekļa un ūdeņraža) ir vidēji 66,7%, bet izmantojot mikroelementu analīzi (S, Cl, Fe, Cu, Zn un Sr) – 78,6%. Apvienojot šīs metodes, tiek iegūta precizitāte vidēji 92,9% [13].

Tika veikti ābolu pētījumi, kas ir nopērkami Japānas komerciālajā tirgū. Āboli galvenokārt tiek piegādāti no diviem reģioniem: Aomori un Nagano, kā arī importēti no Ķīnas. Tika pētīti 188 ābolu paraugi, kas tika piegādāti no Ķīnas un Japānas. Ķīnas ābolos oglekļa izotopu sastāvs ($\delta^{13}\text{C} = -25,2 \pm 1,3\text{‰}$) ir nedaudz augstāks salīdzinājumā ar Japānas āboliem ($\delta^{13}\text{C} = -26,4 \pm 1,4\text{‰}$ Aomori $\delta^{13}\text{C} = -26,8 \pm 1,3\text{‰}$ Nagano). Ķīnas ābolu skābekļa izotopu sastāvs ($\delta^{18}\text{O} = +25,4 \pm 2,1\text{‰}$) ir ievērojami augstāks salīdzinājumā ar Japānas āboliem ($\delta^{18}\text{O} = +21,5 \pm 1,5\text{‰}$ Aomori un $\delta^{18}\text{O} = +21,8 \pm 1,0\text{‰}$ Nagano). Tāpat šiem paraugiem tika veikta mikroelementu analīze. Galu galā tika secināts, ka stabilo izotopu un vairāku mikroelementu analīžu kombinācija ir lietderīga pārtikas produktu ģeogrāfiskās izcelsmes noteikšanai (skat. 1.4.att.) [13].



1.4. att. (A) ābolu analīzes rezultāti balstoties uz $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{18}\text{O}$ vērtībām un (B) analīžu rezultāti balstoties uz $\delta^{18}\text{O}$ tandēmā ar deviņu mikroelementu (Mg, Mn, Zn, Fe, Cu, Mo, As, Cd, Ti) analīzi [13]

Stabilo izotopu attiecība sniedz informāciju par analīta izcelsmi un apsaimniekošanas veidu. Ābolu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecības atšķiras starp šķirnēm, līdz ar to, tas sniedz informāciju par parauga autentifikāciju.

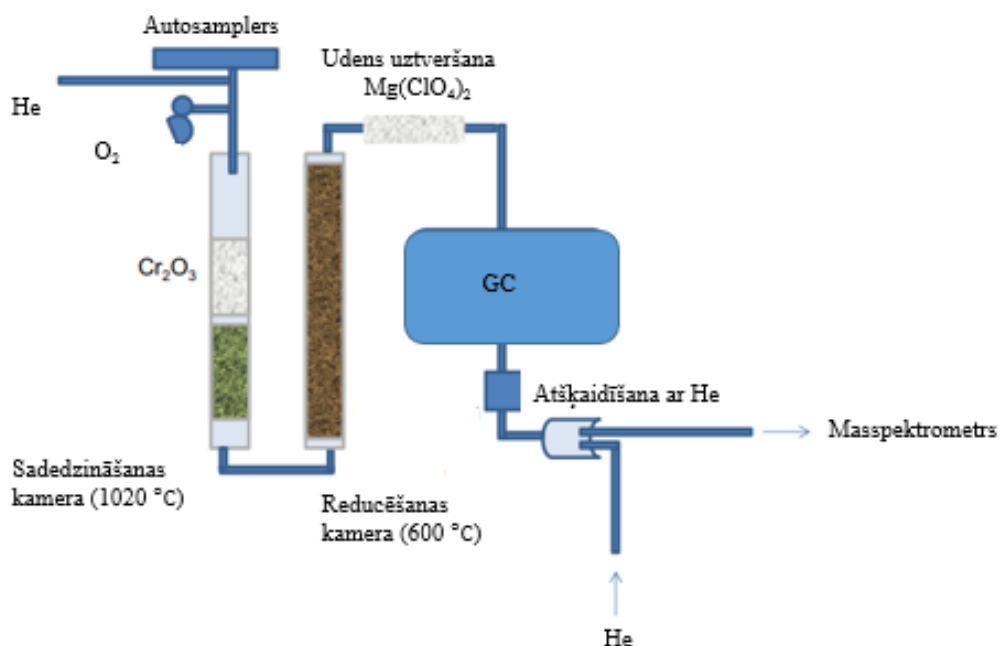
1.2.2. Izotopu attiecības masspektrometrija

Izotopu attiecības masspektrometrija (IRMS) ir metode, ko plaši izmanto tādās nozarēs, kā arheoloģija, medicīna, ģeoloģija, bioloģija, pārtikas autentifikācija un kriminālistika [14]. IRMS instrumenti ir izstrādāti, lai precīzi izmērītu izotopu, piemēram, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ un $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ atšķirības [15].

Pirms analīzes, ar IRMS palīdzību, paraugus pārvērš vienkāršās gāzēs, piemēram, H_2 , CO_2 , N_2 un CO atkarībā no materiāla sastāva un interesējošajiem izotopiem. IRMS mēra jonu attiecību, kas atbilst šīm gāzēm. Piemēram, analizējot oglekļa izotopu attiecību, tiek analizēti joni ar masas un lādiņa attiecību (m/z) 44, 45 un 46, kas atbilst joniem, kas veidojas no CO_2 molekulām, kas satur ^{12}C , ^{13}C , ^{16}O , ^{17}O un ^{18}O dažādās kombinācijas [15].

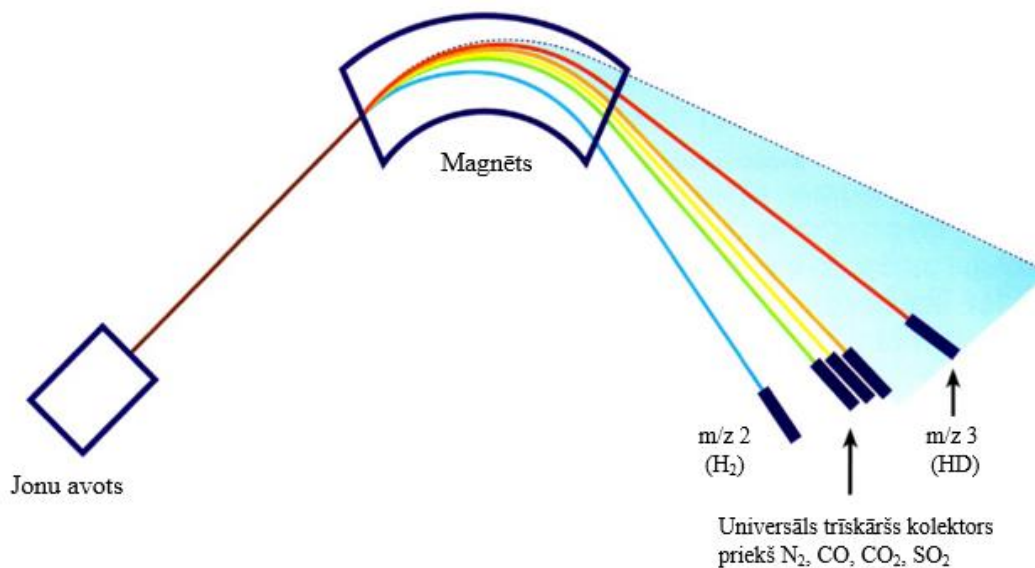
Izotopu attiecību nosaka attiecībā pret starptautiskajiem standartiem, kas nosaka noteiktu izotopu mērīšanas skalu. Lai rezultāti būtu izsekojami atbilstoši starptautiskajiem standartiem, priekšnoteikums ir izmantot labi raksturotus standartus, kuru izotopu attiecības ir noteiktas attiecībā pret primārajiem references materiāliem [15].

1.5. attēlā ir attēlota IRMS iekārtas principiālā shēma oglekļa un slāpekļa izotopu noteikšanai.



1.5. att. Oglekļa un slāpekļa izotopu noteikšanas IRMS iekārtas principiālā shēma [16]

Paraugs alvas kapsulā tiek sadedzināts pirmajā kolonnā pie 1020 °C temperatūras O₂ klātbūtnē. Iegūtās NO_x gāzes tiek reducētas līdz elementāram slāpeklim (N₂), šis process notiek reducēšanas kamerā, kā reducētājs tiek izmantots varš, temperatūra kamerā ir 600 °C. Tam seko ūdens uztveršana ar magnija perhlorātu. Ūdens atdalīšana ir ļoti būtiska, tā kā ūdens izraisa CO₂ protonēšanu, veidojot HCO₂⁺, kas, savukārt, traucē ¹³CO₂ analīzi (izobārie traucējumi). Gāzes (CO₂ un N₂), kas iegūtas sadedzinot paraugu, tiek pārnestas ar hēliju, kā nesējgāzi uz gāzu hromatogrāfijas kolonnu (GC). Pēc GC gāzes tiek ievadītas IRMS (skatīt 1.6.att.), un slāpekļa un oglekļa izotopu analīzes gadījumā no viena un tā paša parauga var iegūt gan δ¹³C, gan δ¹⁵N vērtības. Lai pārbaudītu precizitāti ir ieteikts pēc katriem pieciem paraugiem analizēt laboratorijas standartu un ideālā gadījumā standartam vajadzētu būt pēc sastāva līdzīgam analizējamajam paraugam. IRMS mērījumi sniedz informāciju par analizējamās gāzes izotopu attiecību pret standarta gāzes izotopu attiecību. Laboratorijas standarti tiek izmantoti, jo tie atspoguļo visus iespējamās frakcionēšanās avotus [16].



1.6. att. Izotopu attiecības masspektrometra shēma [17]

Paraugu sagatavošana

IRMS paraugu sagatavošanā izšķir trīs galvenos posmus:

1. Žāvēšana. Paraugus žāvē izmantojot liofilizāciju vai arī žāvskapī, lai no paraugiem izdalītu mitrumu. Rūpīgi izžāvēti paraugi sniedz precīzu iesvaru [18]. Paraugiem jābūt izžāvētiem pirms smalcināšanas, kā arī tie ir jāizžāvē apmēram stundas garumā pirms paraugu svēršanas [19].

2. Smalcināšana. Analizējamajam paraugam ir svarīgi būt homogēnam. Paraugu var sasmalcināt ar piestu un piestalu, bet gadījumā, ja paraugs ir grūti sasmalcināms, var izmantot, piemēram, lodīšu dzirnavas [18].

3. Svēršana. Paraugi visbiežāk tiek iesvērti alvas kapsulās, retāk sudraba kapsulās ar izmēru 8x5 mm, izmantojot analītiskos mikro svarus ($\pm 0,00001$ g) un pinceti. Kapsulām ar iesvērto paraugu ir jāizskatās pēc mazām, apaļām bumbiņām. Formai ir būtiska loma, lai iegūtu labu starojumu. Turklāt plakanas vai nepareizas formas bumbiņas var nenokļūt automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē. Bumbiņas var veidot ar pinceti, bet arī ir pieļaujams tās veidot ar rokām, obligāti izmantojot cimdus. Tāpat svarīgi svēršanas laikā izmantot tīrus instrumentus un svērt putekļus nesaturošā vidē, lai izvairītos no piemaisījumiem. Pētot jaunu parauga veidu ir ieteicams veikt priekšanalīzi, lai noteiktu piemērotāko iesvara daudzumu. Parauga iesvars ir atkarīgs no parauga veida:

- 1 mg priekš dzīvnieku izcelsmes parauga;
- 3 mg – augu augšējā parauga (piemēram, lapas);
- 10 mg – sakņu paraugam;

-5 – 40 mg – augsnes un nogulumu paraugiem (atkarībā no izcelsmes veida, minerāla vai organiskas izcelsmes);

-Paraugi, kuri ir smagāki par 50 mg var radīt problēmas sadegšanas procesā, tiem nevienmērīgi sadegot [19].

1.3. Aminokābes

Aminokābes ir svarīgu biomolekulu klase, kas satur gan amino grupu ($-\text{NH}_3^+$), gan karboksilgrupu ($-\text{COOH}$). Vairumā gadījumā par aminokābēm tiek dēvētas α -aminokābes, tā kā gan amino grupa, gan karboksilgrupa ir piesaistīta pie α -oglekļa. Tomēr dabā ir sastopami arī citi aminokābju veidi, piemēram, β -aminokābes, kur amino grupa un karboksilgrupa ir piesaistītas pie dažādiem oglekļiem [20].

Aminokābes ir viens no vissvarīgākajiem dabiskiem savienojumiem, tā kā tās piedalās daudzos fizioloģiskos procesos. Viens no tiem ir peptīdu un olbaltumvielu veidošana, kuru veidošanā piedalās 20 aminokābes. Brīvās aminokābes sastopamas bioloģiskos audos, ķermeņa šķidrums, pārtikā un medikamentos [21].

Cilvēka metabolismam nepieciešamās aminokābes tiek uzņemtas ar pārtiku. Augļi, dārzeņi un dzīvnieku izcelsmes produkti ir bagāti ar aminokābēm. Kā jau iepriekš tika minēts, aminokābēm ir svarīga bioloģiskā loma cilvēka organismā. Piemēram, triptofāns (Trp) regulē cilvēka diennakts ritmu, glicīns (Gly) regulē nervu sistēmu, leicīns (Leu), izoleicīns (Ile) veicina fizisko aktivitāti [22].

Aminokābēm ir vairākas svarīgas lomas augļu uzturvērtībā un organoleptiskās īpašībās [23]. Dažas brīvās aminokābes augļos darbojas kā garšas noteicēji, piemēram, glutamīnskābei (Glu) piemīt umami garša, kas ir viena no piecām cilvēka pamatgaršām un tiek aprakstīta kā garda, sātīga garša - ar to ir bagāti tomāti un siers, alanīns (Ala) un prolīns (Pro) nodrošina saldu garšu, leicīns (Leu), izoleicīns (Ile) un valīns (Val) - rūgtu garšu [22]. Neapstrādāti augļi un to tiešie produkti, piemēram, sulas, galvenokārt satur endogēnās aminokābes, ko ražo pats auglis un mikroorganismi tajos. Savukārt, apstrādātos produktos, piemēram, vīnā, ievārījumos, alkoholiskos dzērienos jau ir sarežģītāks aminokābju profils [24].

Augļu nogatavošanās stadija, minerālvielu daudzums, ūdens daudzums, klimatiskie apstākļi, cilvēciskā darbība - visi šie faktori ietekmē potenciālo aminokābju daudzumu augļos. Līdz ar to vairāki pētnieki pēta brīvo aminokābju saturu, lai noteiktu produktu ģeogrāfisko izcelsmi [25].

1.3.1. Aminoskābju izmantošana pārtikas pētniecībā

Aminoskābju profils augļu paraugos atšķiras atkarībā no šķirnes, apsaimniekošanas veida, ģeogrāfiskās izcelsmes, līdz ar to aminoskābju sastāvs tiek izmantotas kvalitātes un izcelsmes noteikšanā [26].

Ņemot vērā aminoskābju uzturvērtību, dažādu aminoskābju koncentrācija augļos, jo īpaši ābolos, ievērojami mainās nogatavošanās laikā. Tieši to var izmantot, kā rādītāju, nosakot ražas novākšanas laiku, kā alternatīvu pašreiz izmantojamiem kritērijiem, tādiem kā etilēna koncentrācijai, cukuru / organisko skābju attiecībai u.t.t.. Papildu interese par aminoskābēm ir tam faktam, ka aminoskābju profils atšķiras ne tikai starp dažādiem augļiem, bet arī starp dažādas izcelsmes augļiem, kas ļauj no brīvo aminoskābju koncentrācijas noteikt augļu sulas un to rūpniecisko atvasinājumu sajaukšanu un viltošanas noteikšanu. Turklāt aminoskābēm ir liela nozīme mikroorganismu uzturā, kas atrodas ābolu sulā. Fermentācijas laikā aminoskābju koncentrācija mainās [27].

Aminoskābju profils ābolos mainās atkarībā no augļu nogatavošanās stadijas. Tā vienā no pētījumiem tika apskatīts, kā mainās aminoskābju koncentrācija atkarībā no augļa nogatavošanās stadijas. Pirmajās nedēļās, līdz 10 nedēļai, aminoskābju koncentrācija krasi kritās, bet tad to koncentrācija kļuva nemainīga. Viens no iespējamajiem skaidrojumiem ir saistīts ar olbaltumvielu sintēzes un noārdīšanās procesiem, augļa nogatavošanās laikā. Asparģīns veido 70% no aminoskābju satura, kam seko glutamīns, serīns, glicīns un fenilalanīns. 1.3. tabulā ir sniegti dati par aminoskābju saturu atkarībā no nogatavošanās stadijas [28].

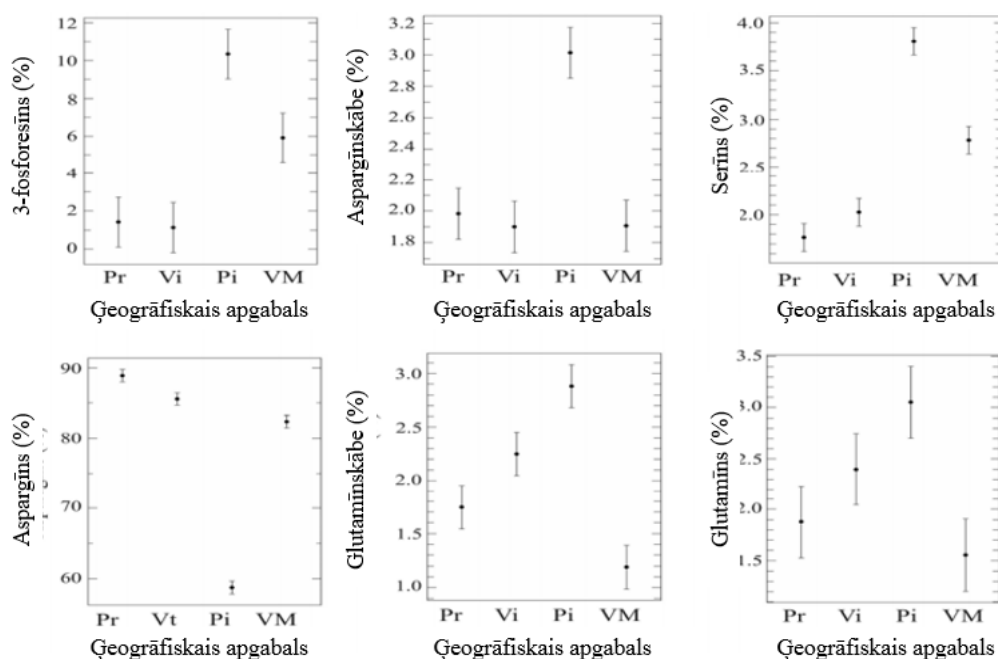
1.3. tabula

Etanolā šķīstošu aminoskābju saturs nenogatavojošos un nogatavojušos ābolos [28]

Aminoskābe	0 nedēļa (mg/ 100g svaiga svara)	24 nedēļa (mg/ 100g svaiga svara)
Asparģīns	31,135	3,066
Treonīns	0,365	<0,001
Serīns	1,279	0,193
Glutamīns	4,649	0,804
Prolīns	<0,001	<0,001
Glicīns	0,569	0,123

Alanīns	0,693	0,069
Cisteīns	<0,001	<0,001
Valīns	0,336	0,078
Metionīns	0,057	<0,001
Izoleicīns	0,217	0,062
Leicīns	0,349	0,062
Tirozīns	<0,001	<0,001
Fenilalanīns	0,927	0,033
Lizīns	0,229	0,053
Histidīns	0,115	0,025
Arginīns	0,131	0,021

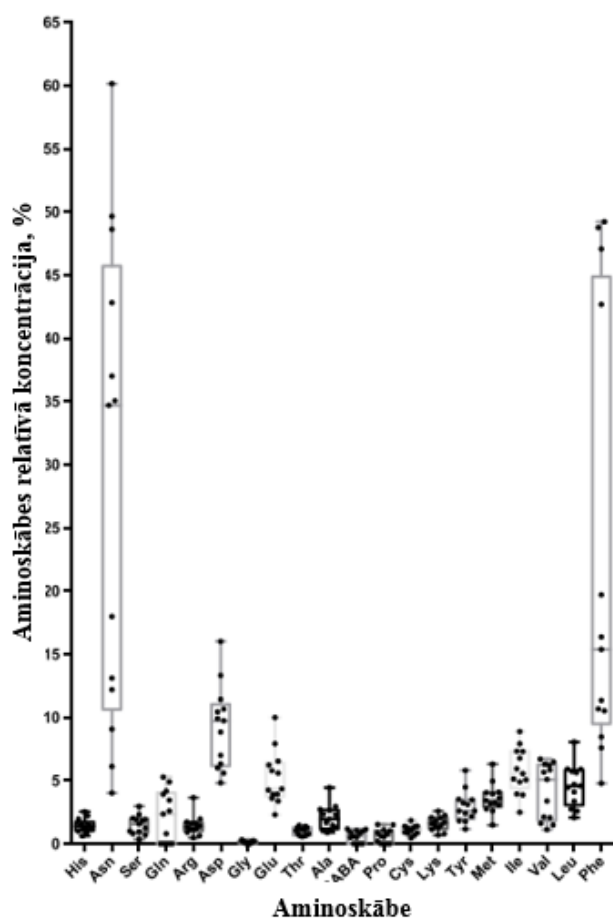
Ābolos izplatītākās aminoskābes ir asparģīns (Asn), glutamīns (Gln), serīns (Ser), to procentuālais sastāvs būtiski atšķiras starp audzēšanas reģioniem, skatīt 1.7. attēlu. Vērts minēt, ka šajā pētījumā tika ņemta viena ābolu šķirne no 4 dažādiem audzēšanas reģioniem [25].



1.7. att. Sešu aminoskābju sadalījums atkarībā no izcelsmes reģiona [25]

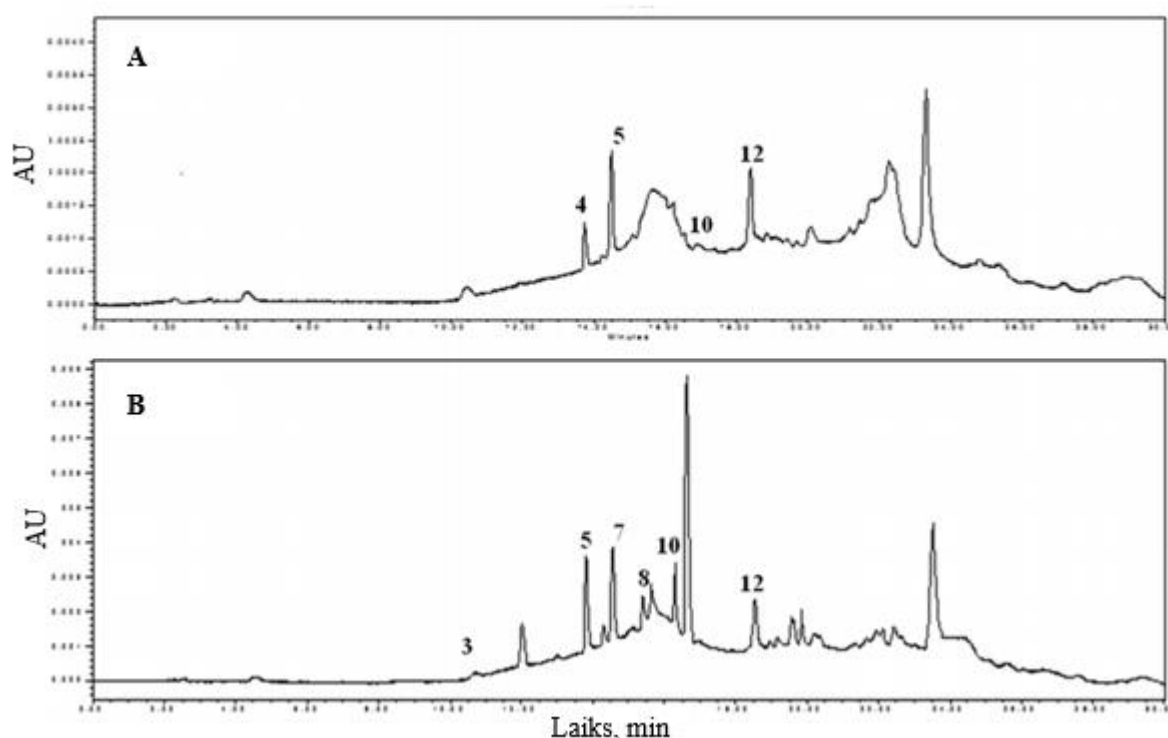
Lai pārbaudītu rezultātu pareizību, iegūtie dati tika salīdzināti ar citu augļu un dārzeņu rezultātiem (viens izcelsmes reģions). Tika noskaidrots, ka tie saturēja lielu daudzumu asparagīna, glutamīnskābes un glutamīna, tāpat, kā konkrēto reģionu āboli. Atšķirības to koncentrācijās, protams, bija novērojamas, tā kā aminoskābju koncentrācija ir atkarīga no sugas, pārtikas produkta uzturvērtības un audzēšanas apstākļiem [25].

Jau iepriekš tika minēts, ka aminoskābju daudzums var atšķirties starp šķirnēm. Vienā no pētījumiem tika pētītas 13 ābolu šķirnes, kas audzētas viena reģiona ietvaros. Tika analizētas un kvantitatīvi noteiktas divdesmit aminoskābes 13 ābolu šķirņu sulu paraugos. Asparagīns (Asn) visās šķirnēs bija pārsvarā, vidēji tā daudzums bija $49,7 \pm 0,6$ % no kopējā aminoskābju daudzuma. Fenilalanīns (Phe) sekoja pēc asparagīna, tā vidējais daudzums bija $49,2 \pm 1,0$ % no visām aminoskābēm. Asparagīnskābe (Asp) šajā pētījumā arī tika noteikta kā viena no galvenajām aminoskābēm, tā relatīvā koncentrācija bija $16,01 \pm 0,04$ % no kopējā aminoskābju daudzuma. 1.8. attēlā attēlotas aminoskābju koncentrācijas. Kaut arī aminoskābju daudzums ir noteikts atkarībā no šķirnes, to daudzumu tāpat var ietekmēt arī sekojoši faktori: augšanas sezona, ražas slodze, ģeogrāfiskā izcelsme, iegūtie dati sniedz informāciju par to kādu aminoskābju īpatsvaru var sagaidīt ābolu sulā [29].



1.8. att. Aminoskābju relatīvās koncentrācijas ābolu sulā [29]

Nosakot aminoskābes ābolos, ir svarīgi zināt, kura tā daļa sniegs labākus rezultātus. Lai to noskaidrotu, tika noteiktas aminoskābes gan ābolu mīkstumā, gan ābolu sēklās. Aminoskābju daudzumu ābolu mīkstumā un sēklā noteica izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju (HPLC). 1.9. attēlā ir attēlotas A sēklu, B mīkstuma ekstraktu aminoskābju satura hromatogrammas. Salīdzinot ābolu mīkstumā un sēklā datus tika novērotas gan kvalitatīvas, gan kvantitatīvas atšķirības. Mīkstumā ekstraktā tika noteikts serīns, alanīns, tirozīns un cisteīns, savukārt, sēklās tikai histidīns, kas cilvēkam ir būtiska aminoskābe [30].



1.9. att. Ābolu sēklu (A) un ābolu mīkstuma (B) hromatogrammas (3-Ser, 4-Gly, 5-His, 7-Thr, 8-Ala, 10-Tyr, 12-Cys) [30]

Iepriekš tika aprakstīts, kā mainās aminoskābju profils atkarībā no augļa daļas un tika noteikts tikai tas, ka ir novērojama aminoskābju koncentrācijas atšķirības atkarībā no augļa daļas. Lai noteiktu cik liela ir aminoskābju koncentrācijas atšķirība starp augu daļām, tika pētītas trīs ķirbja daļas: mīkstumā, mizā un sēklās. Visām daļām tika noteiktas 17 aminoskābes, tai skaitā deviņas neaizvietojamās (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp un Val) un astoņas nebūtiskas aminoskābes (Ala, Asp, Cys, Gly, Glu, Pro, Ser un Tyr). Neaizvietojamo brīvo aminoskābju koncentrācija mīkstumā, sēklās un mizā attiecīgi bija no 0,6 līdz 9,2, 2,0 – 11,0 un 0,7 – 17,2 mg/ 100g (skatīt 1.4. tabula). Brīvo aminoskābju koncentrācija ķirbja mīkstumā, ko parasti lieto uzturā, bija šādā secībā: Cys < Pro < Met < Trp < Ala < Gly < His < Tyr < Thr < Ser <

Phe< Ile< Val< Lys< Leu< Asp< Glu. No šiem rezultātiem var secināt, ka ķirbju mīkstums ir labs neaizstājamo aminoskābju avots, tomēr sēklas, kuras parasti netiek izmantotas pārtikā, ir bagātīgākas ar neaizstājamām aminoskābēm. Līdz ar to var secināt, ka augļu sēklas ir vērtīgāk izmantot, nosakot augu kvalitāti un izcelsmi salīdzinājumā ar pārējām augļu daļām [31].

1.4. tabula

Aminoskābju koncentrācija ķirbja auga daļās [31]

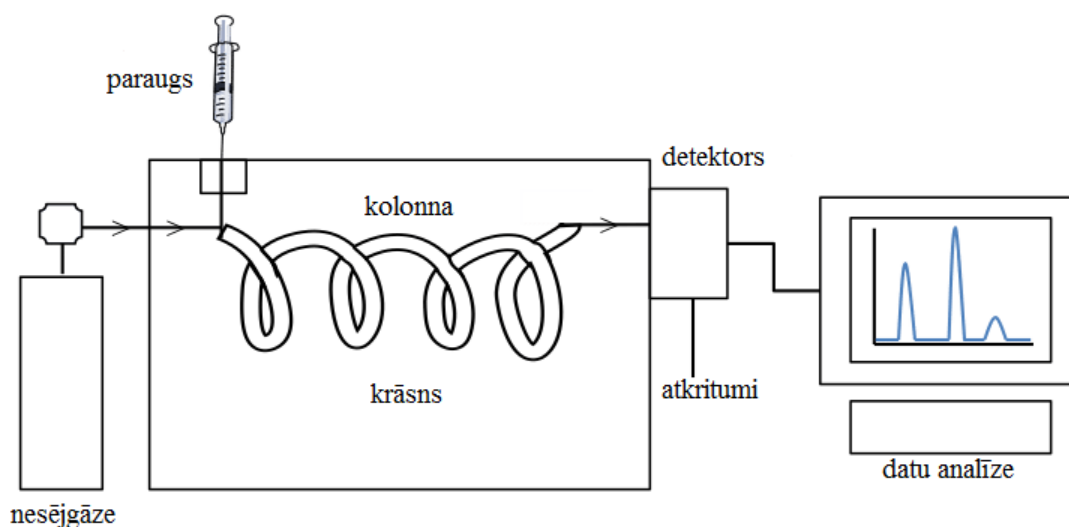
Aminoskābe	Aminoskābju koncentrācija ķirbja auga daļā, mg/ 100 g		
	Mīkstums	Sēklas	Miza
Met	0,8	1,9	0,6
Val	0,6	3,7	2,0
Phe	3,1	7,7	4,5
Lys	0,7	1,6	1,6
Tyr	0,7	1,7	0,7
Ile	2,2	9,7	6,3
Leu	0,9	3,7	1,9
His	0,9	1,8	2,7
Ser	7,7	9,4	2,3
Cys	0,8	3,4	1,6
Glu	20,4	9,1	47,1
Asp	9,1	130,5	11,8
Pro	<LOD	<LOD	<LOD
Thr	8,3	3,3	15,0
Gly	0,4	0,7	0,7
Ala	1,9	1,9	10,9
Trp	1,0	2,6	1,6

1.3.2. Aminoskābju noteikšanas metodes

Pēdējos gados ir ļoti attīstījušās instrumentālās analīzes metodes, kas ļauj kvantitatīvi un kvalitatīvi noteikt lielāku klāstu brīvo aminoskābju ar paaugstinātu jutību un precizitāti [32]. Aminoskābju noteikšanai pārsvarā tiek lietotas sekojošas metodes: gāzu hromatogrāfija (GC), augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija (HPLC) un kapilārā elektroforēze (CE) [31].

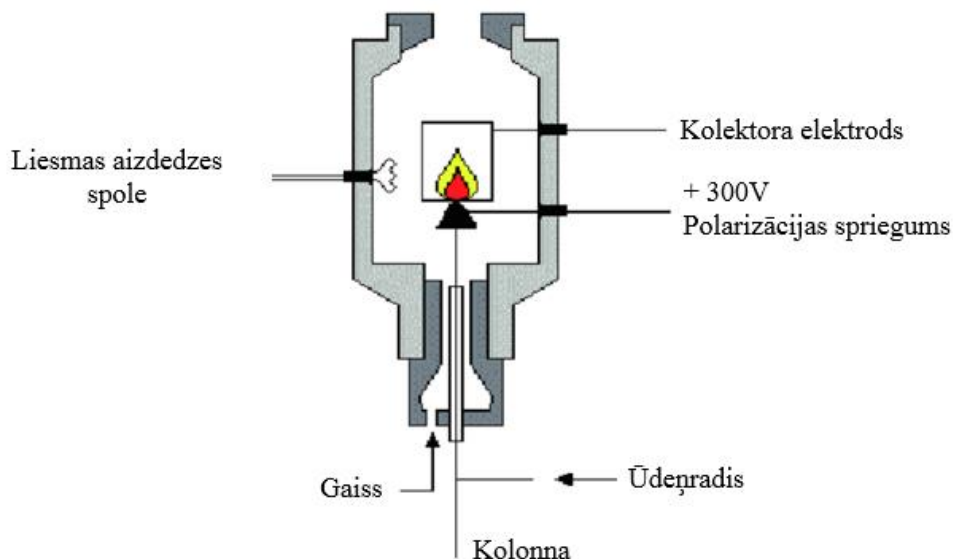
Gāzu hromatogrāfija

Gāzu hromatogrāfija (GC) - ierasta hromatogrāfijas tehnika, kuru izmanto analītiskajā ķīmijā, tādu savienojumu atdalīšanai un analizēšanā, kas iztvaiko bez sadalīšanās. Šis process ietver parauga injicēšanu inžektorā ar sekojošu tā iztvaicēšanu un pārnesi uz hromatogrāfijas kolonnas. Paraugu transportē caur kolonnā ar inertas, gāzveida mobilās fāzes palīdzību. Kolonna pati satur šķidru stacionāru fāzi, ko absorbē uz inertas cietvielas virsmas. Nepolārās GC kolonnas atdala savienojumus, galvenokārt, pēc to vārīšanās punkta, savukārt polārās kolonnas piedāvā papildu atdalīšanu atkarībā no savienojuma polaritātes [33]. GC iekārtas principiālā shēma attēlota 1.10. attēlā [34].



1.10. att. Gāzu hromatogrāfijas principiālā shēma [34]

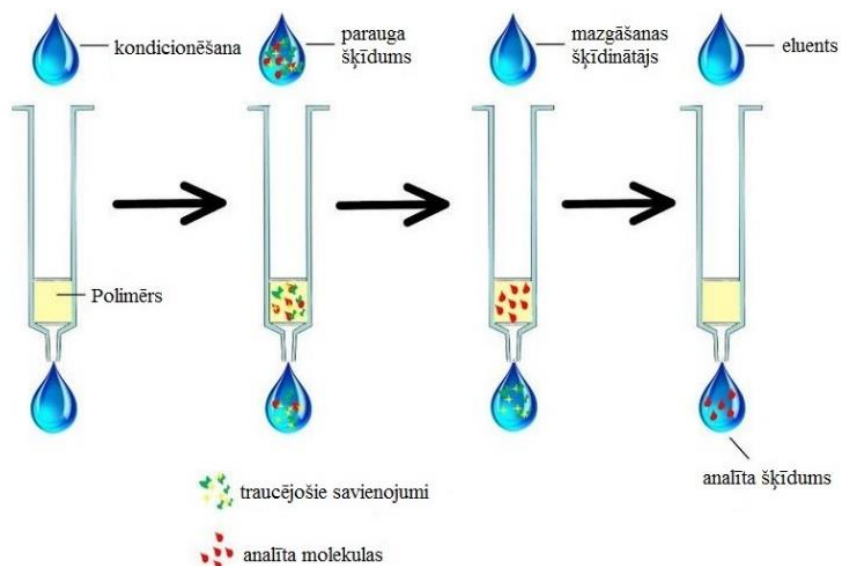
Liesmas jonizācijas detektors (FID) ir viens no plašāk izmantotākajiem GC. FID ir jutīgs pret molekulām, kas jonizētas ūdeņraža-gaisa liesmā, ieskaitot lielāko daļu oglekli saturošu savienojumu [35]. FID analizējamās vielas, tām iznākot no kolonnas, tiek ievadītas ūdeņraža liesmā, kurā, tām sadegot, veidojas lādētas daļiņas – pieaug liesmas elektrovadītspēja, kura tad arī tiek mērīta. FID ir sekojošas priekšrocības: augsta jutība, stabila bāzes līnija, to neietekmē temperatūras vai nesējgāzes plūsmas izmaiņas, linearitāte plašā koncentrācijas diapazonā [36]. FID uzbūves shēma attēlota 1.11. attēlā.



1.11. att. **FID** uzbūves shēma [37]

Paraugu sagatavošana

Cietfāzes ekstrakcija (SPE) ir izplatīta paraugu sagatavošanas metode hromatogrāfijai, kas balstās uz vielu fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. SPE sorbents tiek ievietots nelielā kolonnā (pipešu uzgaļi), kas parasti ir izgatavots no inerta materiāla, piemēram, polipropilēna vai stikla, un caur šo kolonnu tiek izvadīts šķīdums, kas satur analizējamo savienojumu. Sorbents tiek izvēlēts atkarībā no analizējamā savienojuma īpašībām. Sorbenta daudzums kolonnā var būt no 50 mg līdz 10 g, bet var arī izmantot gan mazāku, gan lielāku sorbenta daudzumu. Sorbents kolonnā tiek ievietots, tā, lai šķidrums varētu brīvi plūst cauri tam. Cietā fāze bieži tiek izmantota arī mikro ekstrakcijā, kad parauga daudzums ir relatīvi mazs jeb ierobežots. Papildus interesējošu savienojumu ekstrakcijai no šķīdumiem, cieto fāzi izmanto arī interesējošo savienojumu aizturēšanai no gāzēm [38]. SPE shēma attēlota 1.12. attēlā.



1.12. att. SPE principiālā shēma [39]

Ir pieejamas dažādas SPE tehnikas: šļirce ar disku, SPE 96 pozīciju iekārta un pipešu uzgaļi. Šī pētījuma ietvaros tika izmantoti SPE sorbenta pipešu uzgaļi. SPE sorbenta pipešu uzgaļu priekšrocības ir:

- stacionārās fāzes mazgāšanai ir nepieciešams neliels ūdens vai buferšķīduma daudzums;
- īsāks ieguves laiks;
- tīri ekstrakti;
- mazāks parauga daudzums;
- mazāks daudzums šķīdinātāju atkritumu [40].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotās vielas

- Laboratorijas standarts L-glutamīnskābe, 98,5 – 100,5%;
- O₂, instrumentu skābeklis;
- Nesējgāze He, 99,994%;
- References gāze N₂, 99,999%;
- References gāze CO₂, 99,999%;
- HCl, 0,1M;
- EZ:faast aminoskābju analīzes komplekts:
 - Cietfāzes ekstrakcijas sorbenta pipešu uzgaļi;
 - 1. reaģents – iekšējais standarts (0,2 nM norvalīns, N-propanols 10%);
 - 2. reaģents – 1 M nātrija karbonāta šķīdums (Na₂CO₃);
 - 3.A reaģents – eluēšanas komponents I (0,33 M NaOH);
 - 3.B reaģents – eluēšanas komponents II (N-propanols);
 - 4. reaģents – derivatizācijas šķīdums (3-pikolīns, propolhlorformāts, hloroforms);
 - 5. reaģents – ekstrakcijas šķīdums (isooktāns);
 - 6.reaģents – skābes šķīdums (20 nM HCl).

2.2. Izmantotā aparatūra un piederumi

- Nepārtrauktās plūsmas IRMS *Nu Horizon*;
- Elementanalizators *EuroEA3024*;
- Datorprogramma *Horizon Stable Gas Control Software*, 1.69.4. versija;
- Alvas kapsulas 3,5x5 mm;
- Analītiskie svāri *BOECO Germany*, ± 0,01 mg, max 210g;
- Gāzu hromatogrāfs ar liesmas jonizācijas detektoru *Agilent 6890 (GC-FID)*;
- Ultraskaņas vanna;
- Automātiskā pipete.

2.3. Analizējamo paraugu apraksts

Analizējamos paraugus saņēma no Dārzkopības institūta, Dobeles. Tika analizētas sekojošas ābolu šķirnes: *Gita*, *Rubin*, *Antej*, *Ligol*, *Aļesja*. No katras šķirnes bija sekojoši paraugi:

- Sēklas no trīs dažādām ābelēm (1; 2; 3);
- Sēklas no 3 dažādiem viena koka āboliem (A, B, C).

No katras šķirnes bija ievākti paraugi ar dažādiem apsaimniekošanas veidiem:

- N₂ – ābeles, kas apstrādātas ar slāpekli 6g uz 1 m²;
- Bio – ābeles, kas apstrādātas ar vermikompostu;
- O – ābeles, kurām netika pievienots mēslojums.

2.1. tabulā ir norādīts analizējamo paraugu saraksts.

2.1. tabula

Analizējamo paraugu saraksts

Šķirne	Apsaimniekošanas veids
Gita	N ₂ ; O
Rubin	N ₂ ; O
Antej	N ₂ ; O
Ligol	N ₂ ; O
Aļesja	N ₂ ; Bio

Šķirnes *Gita*, *Rubin*, *Antej*, *Ligol* tika audzētas vienā kvadrantā un to stādīšanas gads bija 2009, bet *Aļesja* tika audzēta citā kvadrantā un tās stādīšanas gads bija 2015.

2.4. Izotopu attiecības noteikšana paraugos

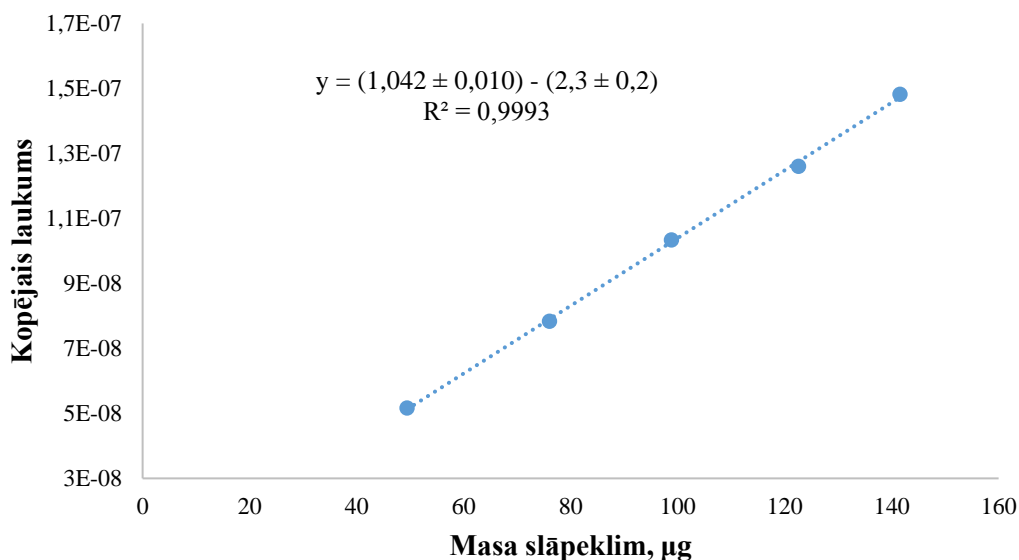
Pirmkārt, tika iesvērts laboratorijas iekšējais standarts L-glutamīnskābe. L-glutamīnskābe tika iesvērta 5 dažādos iesvaros, alvas kapsulās, veidojot lodītes. Šis solis bija nepieciešams kalibrēšanas līknes iegūšanai (iekšējā standarta iesvars bija diapazonā 0,150 – 1,500 mg).

Otrkārt, alvas kapsulās iesvēra L-glutamīnskābi (aptuveni 1,500 ± 0,150 mg). Šis solis bija nepieciešams, lai ik pēc 10 paraugiem pārlicinātos par iegūto rezultātu ticamību un atbilstību.

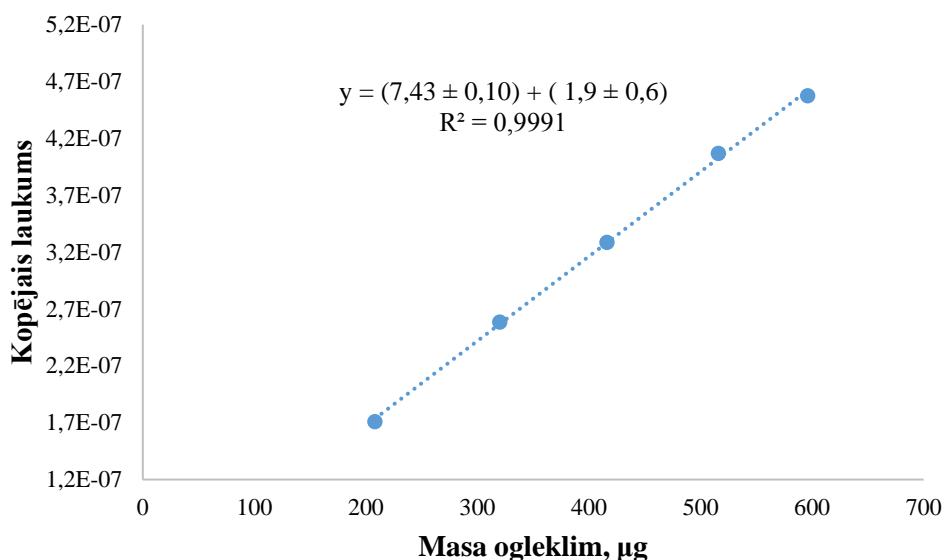
Treškārt, alvas kapsulās tika iesvērti analizējamie paraugi, iesvars bija diapazonā no 1,000 līdz 1,500 mg parauga. Katram paraugam tika iesvērti divi paralēlie iesvari.

Kad viss nepieciešamais tika sagatavots un iesvērts, paraugi tika ievadīti ar autosamplera palīdzību sadedzināšanas kamerā, kur temperatūra bija 1020 °C, kur skābekļa klātbūtnē tika veikta parauga sadedzināšana. Izejošās gāzes nonāca reducēšanas krāsnī, kur temperatūra bija 600 °C. Iegūtās gāzes NO_x tika reducētas līdz N₂. Ūdens tika saistīts izmantojot Mg(ClO₄)₂. Ar nesējgāzi He sausās gāzes nonāca gāzu hromatogrāfijas kolonnā, kur tās tika atdalītas un tālāk aizvadītas uz masspektrometra jonizācijas kameru. CO₂ pirms gāzu ievadīšanas tika atšķaidīts 5 reizes ar nesējgāzi He. Iegūtie rezultāti slāpeklim tika izteikti pret atmosfēras gaisu, bet ogleklim pret PDB.

Lai iegūtu informāciju par slāpekļa un oglekļa procentuālo saturu ābolu sēklās tika konstruēti kalibrēšanas grafiki, L-glutamīnskābi kā standartu, skatīt 2.1. un 2.2. attēlus.



2.1. att. Kopējā slāpekļa noteikšanas kalibrēšanas grafiks



2.2. att. Kopējā oglekļa noteikšanas kalibrēšanas grafiks

2.5. Aminoskābju noteikšana paraugos

Pirmkārt, tika veikta paraugu ekstrakcija. Paraugu iesvēra 2 mL Eppendorf stobriņā (50 ± 1 mg), pievienoja 300 µL 0,1M HCl šķīduma, samaisīja, izmantojot Vortex vertikālo paraugu maisītāju, apmēram 15 - 30 s. Pēc tam ievietoja ultraskaņas vannā uz 15 minūtēm. Pēc ultraskaņas, paraugus centrifugēja 5 minūtes (15000 rpm, 20 °C). Tālākai analīzei tika izmantoti 100 µL ekstrakta augšējā slāņa.

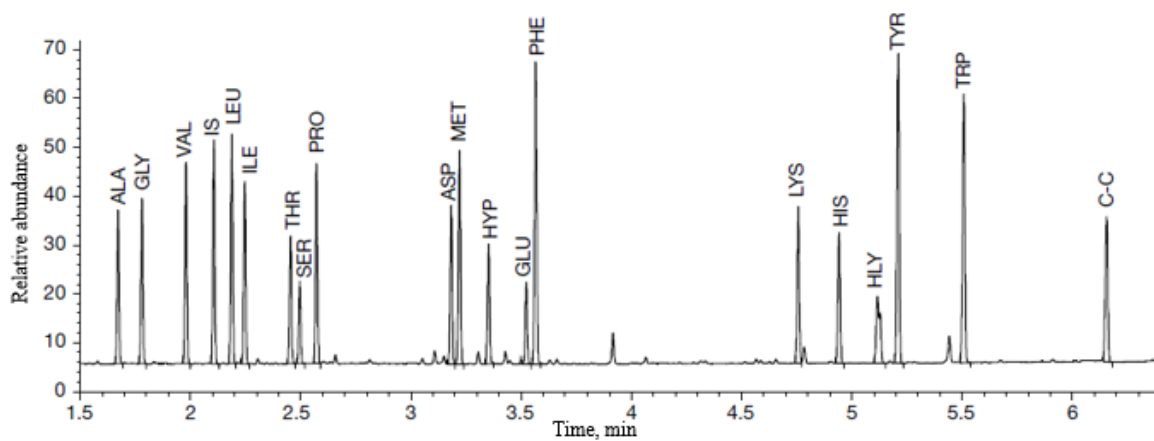
Ekstrakcijas šķīduma augšējo slāni pārnesa stikla stobriņā, pievienoja 200 µL 2. reaģenta, lai parauga pH ir starp 2-5, samaisīja. Šķīduma pH pārbaudīja ar universālā indikatora loksniņiem. Paraugam pievienoja 100 µL iekšējā standarta šķīduma (1. reaģents), paraugu samaisīja. Stikla stobriņā ievietoja cietfāzes ekstrakcijas sorbenta pipešu uzgali, ar šļirces palīdzību šķidrumu izlaida cauri sorbentam, tad veica sorbenta mazgāšanu ar 200 µL dejonizēta ūdens. Sorbentu ar šļirces palīdzību atbrīvoja no liekā ūdens. Pudelītē pārnesa 200 µL ekstrakcijas šķīdumu (3A un 3B reaģentu maisījumu, attiecībā 3:2 v/v). Ar šī maisījuma palīdzību izvadīja sorbentu no sorbenta uzgaļa. Pudelītē pievienoja 50 µL 4. reaģenta un maisīja ar vorteksu 5 - 8 sekundes, nogaidīja minūti un atkārtoja maisīšanu. Nogaidīja minūti un pievienoja 100 µL ekstrakcijas šķīduma (5. reaģenta), maisīja 5 sekundes, nogaidīja minūti un pievienoja 100 µL 6. reaģenta, maisīja 5 sekundes. Hromatogrāfijas pudelītē pārnesa 50 µL augšējā slāņa.

Aminoskābes tika noteiktas ar GC-FID. GC-FID bija sekojoši apstākļi:

- Injekcijas tilpums – 1 µL;

- Nesējgāze – He 1,5 mL/ min;
- Krāsns programma – 32 °C/ min no 110 °C līdz 320 °C;
- Detektora temperatūra – 320 °C.

2.3. attēlā ir parādīta aminoskābju izdalīšanās secība.



2.3. att. Aminoskābju izdalīšanās hromatogramma [41]

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Izotopu attiecība analizējamajos paraugos

Noteiktās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās izotopu attiecību vērtības ābolu šķirnēs apkopotas 3.1. tabulā.

3.1. tabula

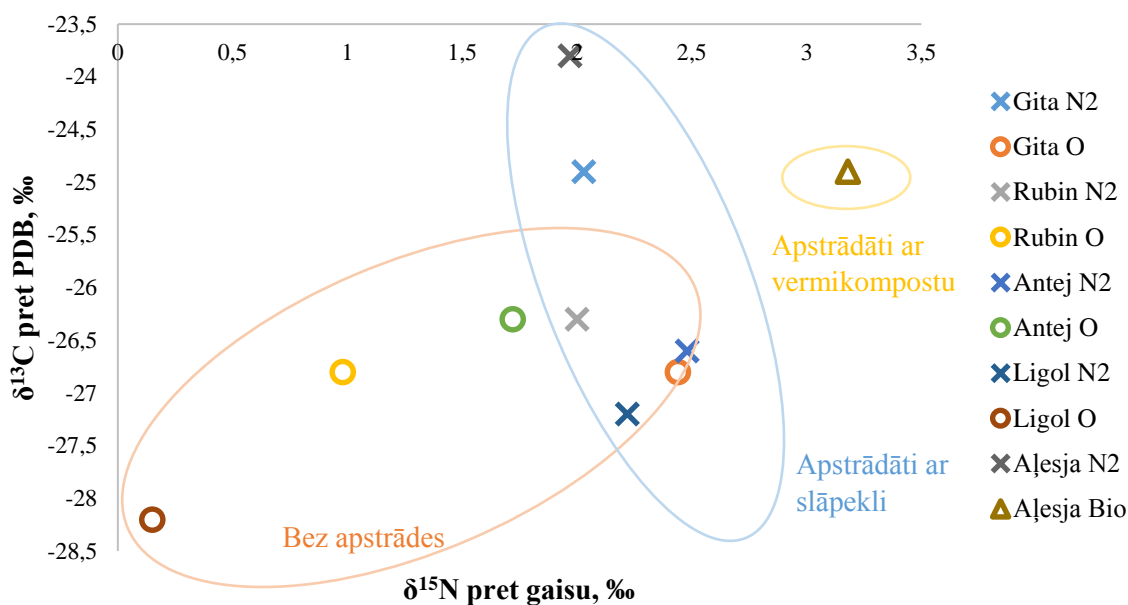
$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vidējās vērtības atkarībā no šķirnes un apsaimniekošanas veida

Šķirne/ apsaimniekošanas veids	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$\delta^{15}\text{N}$, ‰
Gita N₂	-26 ± 1	2,0 ± 0,3
Gita O	-27 ± 1	2,4 ± 0,3
Rubin N₂	-26 ± 1	2,0 ± 0,3
Rubin O	-27 ± 1	1,0 ± 0,5
Antej N₂	-27 ± 1	2,5 ± 0,2
Antej O	-26 ± 1	1,7 ± 0,4
Ligol N₂	-27 ± 1	2,2 ± 0,1
Ligol O	-28,2 ± 0,4	0,2 ± 0,1
Aļesja N₂	-23,8 ± 0,4	2,0 ± 0,2
Aļesja Bio	-25 ± 1	3,2 ± 0,4

No 3.1. tabulā apkopotajiem rezultātiem var redzēt, ka $\delta^{13}\text{C}$ vidējās vērtības šķirnēs ir no -27 līdz -23,8 ‰, iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ vidējās vērtības atbilst literatūrā sniegtajai informācijai, par ābolu $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām. Tā kā ābeles tiek pieskaitītas pie C3 fotosintēzes ceļa augiem, tad to $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām jābūt diapazonā no -34‰ līdz -22‰. Iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ vērtības iekļaujas literatūrā sniegtajam vērtību diapazonam [9].

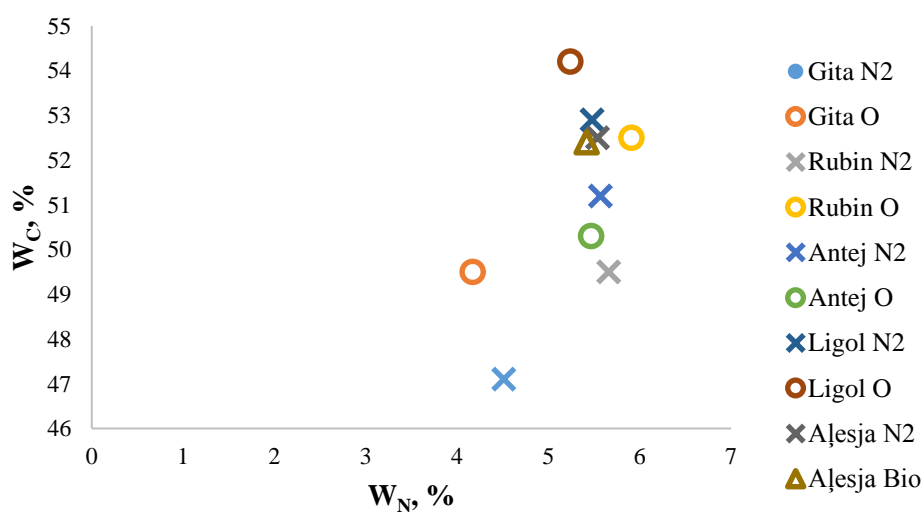
$\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības analizējamajos paraugos ir diapazonā no 0,2‰ līdz 3,2‰. Slāpekļa izotopu attiecība ir atkarīga no apsaimniekošanas veida. Pēc literatūras sniegtās informācijas parasti organiskā slāpekļa avoti sniedz augstāku $\delta^{15}\text{N}$ vērtību diapazonā no 3,5 ‰ līdz 16,2 ‰, savukārt, neorganiskie vai sintētiskie slāpekļa avoti sniedz vērtības diapazonā no -4 ‰ līdz 4 ‰ [42].

3.1. attēlā grafiski attēloti 3.1. tabulā sniegtie dati.



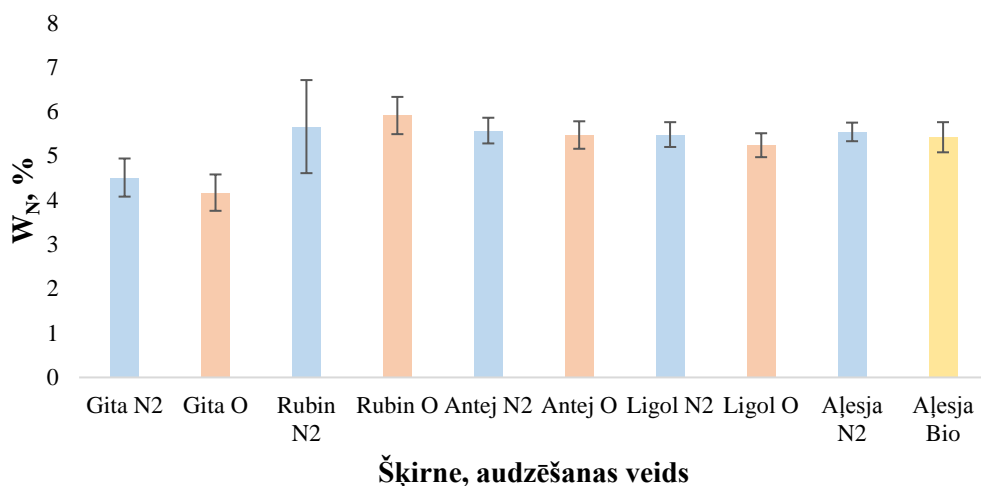
3.1. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vidējās vērtības paraugos

3.1. attēlā sagrupētas dažādu ābolu sēkļu paraugu izotopu attiecības. Visblīvākā $\delta^{15}\text{N}$ diapazonā no 1,7‰ līdz 2,5‰, bet $\delta^{13}\text{C}$ no -28,2‰ līdz -26,3‰. $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības veido trīs grupas, atkarībā no apsaimniekošanas veida. Var novērot, ka paraugiem, kuri netika apstrādāti, $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir diapazonā no 0,2‰ līdz 1,7‰, paraugiem, kuri tika apstrādāti ar slāpekli – no 2,0‰ līdz 2,5‰, un vienīgais paraugs, kas tika apstrādāts ar vermikompostu, $\delta^{15}\text{N}$ vērtība ir 3,18‰. Kas attiecas uz $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām, ir novērojama sadalīšanās grupās atkarībā no apsaimniekošanas. Paraugiem, kuri netika apstrādāti, $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no -28,2‰ līdz -26,3‰; paraugiem, kas tika apstrādāti ar slāpekli - no -27,2‰ līdz -23,8‰ un paraugam, kas tika apstrādāts ar vermikompostu ir -24,9‰.



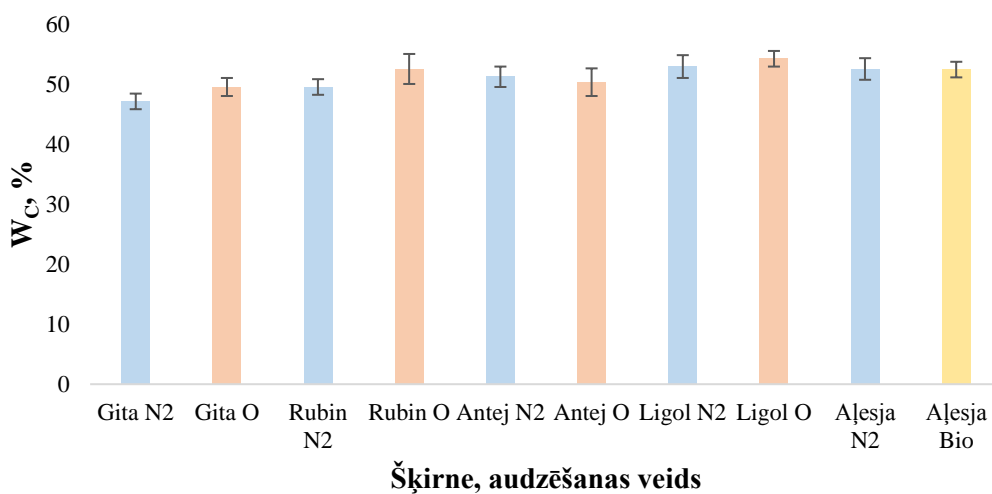
3.2. att. Oglekļa un slāpekļa masas daļa analizējamajos paraugos, %

No 3.2. attēlā var secināt, ka oglekļa masas daļa analizējamajos paraugos ir diapazonā no 47,1 līdz 54,2 %, bet slāpekļa masas daļa ir diapazonā no 4,17 līdz 5,91%. No 3.2. attēla nav skaidrs, vai ir atšķirība starp paraugu apsaimniekošanas veidiem. 3.3. un 3.4. attēlos ir attēlotas attiecīgi slāpekļa un oglekļa masas daļas analizējamajos paraugos atkarībā no apsaimniekošanas veidiem.



3.3. att. Slāpekļa masas daļa analizējamajos paraugos, %

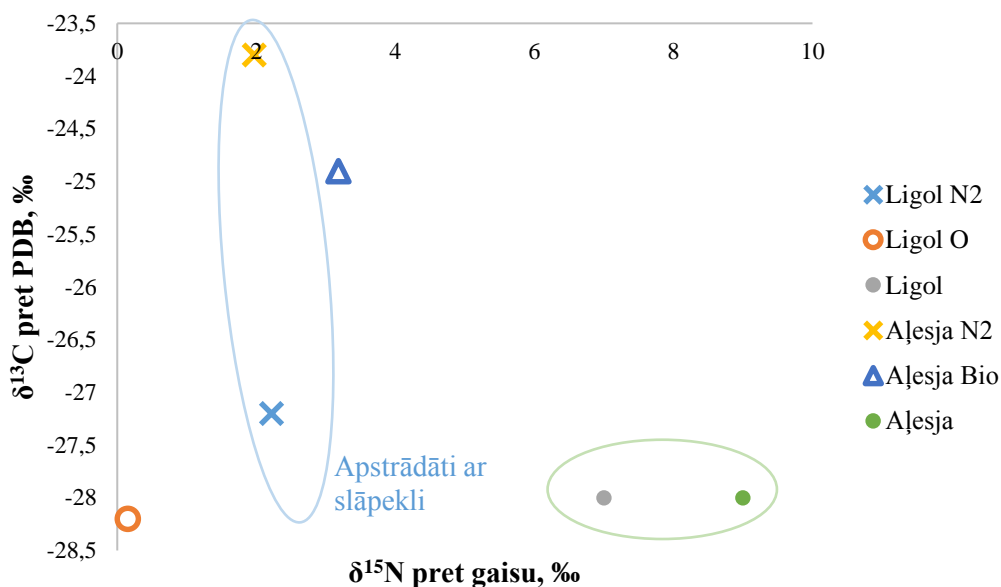
No 3.3. attēla var secināt, ka paraugos, kuri tika apstrādāti ar slāpekli, ir lielāka slāpekļa masas daļa salīdzinot ar paraugiem, kuri netika apstrādāti. Un ja salīdzināt šķirnes *Aļesja* paraugus, tad var novērot, ka paraugiem, kuri tika apstrādāti ar slāpekli, slāpekļa masas daļa ir lielāka salīdzinājumā ar paraugiem, kas apstrādāti ar vermikompostu.



3.4. att. Oglekļa masas daļa analizējamajos paraugos, %

Paraugos, kuri tika apstrādāti ar slāpekli, ir mazāka oglekļa masas daļa salīdzinājumā ar neapstrādātiem paraugiem. Kā arī paraugos, kas tika apstrādāti ar vermikompostu, oglekļa masas daļa ir lielāka salīdzinot ar paraugiem, kas tika apstrādāti ar slāpekli.

Iepriekš tika veikti pētījumi, kuru ietvaros pētīti paraugi no tās pašas ābeļu audzētas no Dārzkopības institūtā, Dobelē. Tika analizētas kopumā 11 ābolu šķirnes [43], no kurām divas *Ligol* un *Aļesja* tika iekļautas arī šajā pētījumā. Šo divu pētījumu apkopojums par šīm šķirnēm attēlots 3.5. attēlā.



3.5. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vedējās vērtības *Ligol* un *Aļesja* ābolu šķirnēs

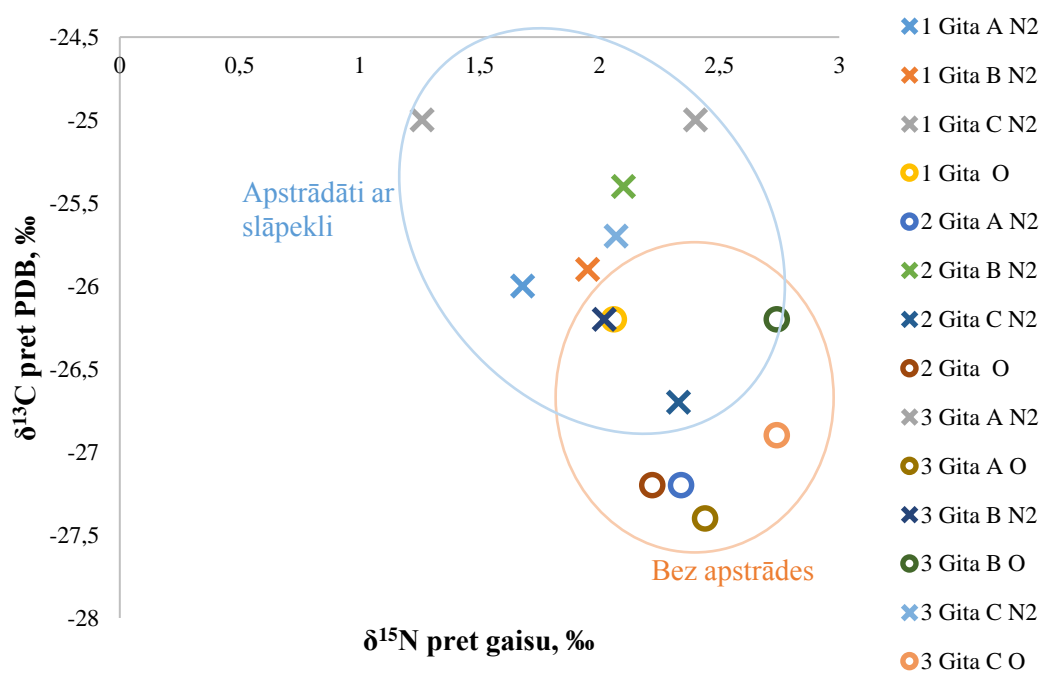
Iepriekš veiktajiem pētījumiem $\delta^{13}\text{C}$ vērtības abām šķirnēm ir -28 ‰, savukārt $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vidējās vērtības ir 7 ‰ un 9 ‰, attiecīgi *Ligol* un *Aļesja*. Kā jau iepriekš tika minēts, slāpekļa izotopu attiecība ir atkarīga no apsaimniekošanas veida. Iepriekš veiktos pētījumos iegūtās vērtības neiekļaujas nevienā no pētāmajiem apsaimniekošanas veidiem, jo ir noteiktas vidējās vērtības, nešķirojot pa apstrādes veidiem. Savāktās sēklas apvienotas vienā kopparaugā. Līdz ar to īsti salīdzināt nevar.

Šī pētījuma ietvaros tika pētīta ne tikai izotopu attiecības atšķirība starp šķirnēm un apsaimniekošanas veidiem, bet arī vienas šķirnes ietvaros starp ābelēm un starp vienas ābeles āboliem. Noteiktās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecību vērtības ābolu šķirnē *Gita* apkopotas 3.2. tabulā. No tabulā attēlotām vērtībām var secināt, ka nav novērojama krasa atšķirība starp vienas ābeles āboliem.

$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vērtības atkarībā no ābeles (1; 2; 3), ābola (A, B, C) un apsaimniekošanas veida (N_2 ; O) ābolu šķirnē *Gita*

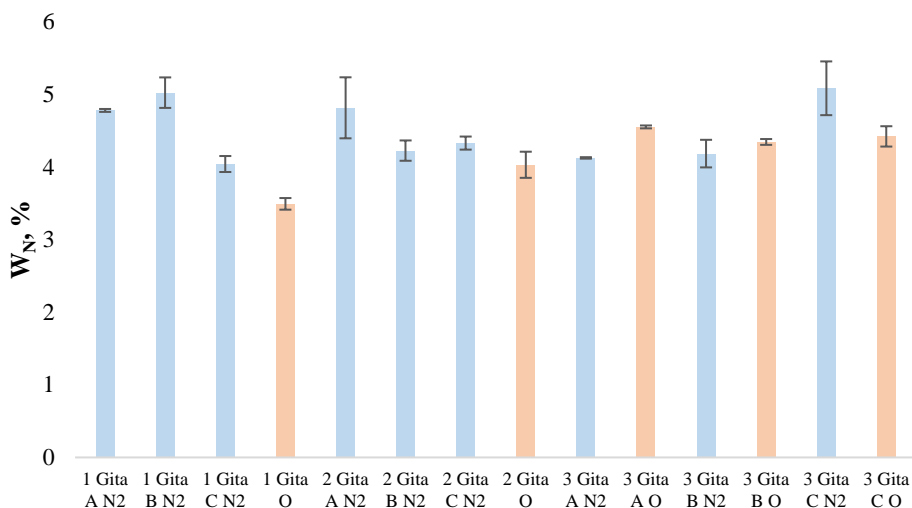
Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
1A N_2	$1,84 \pm 0,04$	$-26,00 \pm 0,01$	1 O	$2,06 \pm 0,05$	$-26,200 \pm 0,002$
1B N_2	$1,95 \pm 0,09$	$-25,90 \pm 0,05$			
1C N_2	$1,26 \pm 0,10$	$-25,00 \pm 0,10$			
2A N_2	$2,34 \pm 0,01$	$-27,20 \pm 0,05$	2 O	$2,22 \pm 0,05$	$-27,20 \pm 0,02$
2B N_2	$2,10 \pm 0,05$	$-25,40 \pm 0,02$			
2C N_2	$2,33 \pm 0,01$	$-26,70 \pm 0,03$			
3A N_2	$2,40 \pm 0,03$	$-25,00 \pm 0,01$	3A O	$2,44 \pm 0,05$	$-27,40 \pm 0,02$
3B N_2	$2,02 \pm 0,01$	$-26,20 \pm 0,01$	3B O	$2,74 \pm 0,06$	$-26,20 \pm 0,04$
3C N_2	$2,07 \pm 0,06$	$-25,70 \pm 0,04$	3C O	$2,7 \pm 0,1$	$26,90 \pm 0,01$

3.6.attēlā ir novērojams, ka no iegūtajiem rezultātiem veidojas divas grupas, kurās arī sadalās neapstrādāti paraugi un paraugi, kas apstrādāti ar slāpekli. Paraugiem, kuri netika apstrādāti $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no $-27,4$ ‰ līdz $-26,2$ ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības – $2,06$ ‰ līdz $2,74$ ‰. Savukārt ar slāpekli apstrādātajiem paraugiem $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā $-26,2$ ‰ līdz $-25,00$ ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības – $1,26$ ‰ – $2,4$ ‰.



3.6. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē *Gita*

Vienas šķirnes ietvaros nav novērojama krasa atšķirība slāpekļa masas daļā starp šķirnes ābelēm un vienas ābeles ietvaros (skatīt 3.7.att.). Savukārt ir novērojama atšķirība starp audzēšanas veidiem, tas būtu starp apstrādātiem ar slāpekli un neapstrādātiem paraugiem. Neapstrādātiem paraugiem ir zemāka slāpekļa masas daļa salīdzinājumā ar apstrādātiem paraugiem.



Vienas šķirnes sēklas no dažādām ābelēm (1;2;3) un dažādiem āboliem (A, B, C) un dažādiem audzēšanas apstākļiem (N₂; O)

3.7. att. Slāpekļa masas daļa *Gita* ābolu šķirnes analizējamajos paraugos, %

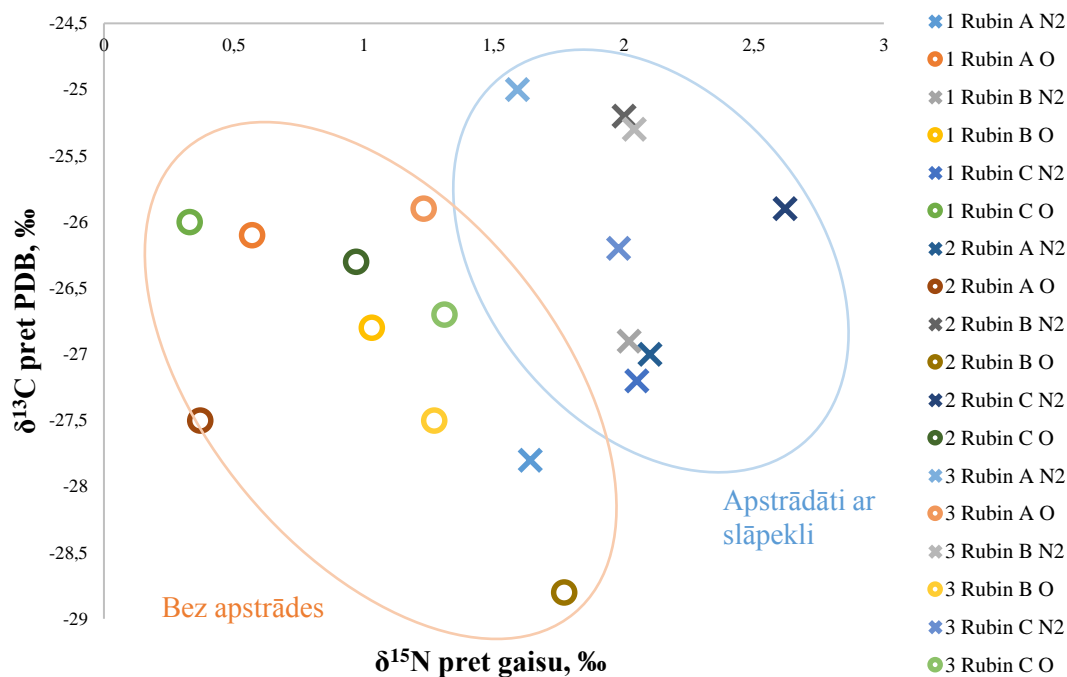
Ābolu šķirnē *Rubin* noteiktās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecību vērtības apkopotas 3.3. tabulā.

3.3. tabula

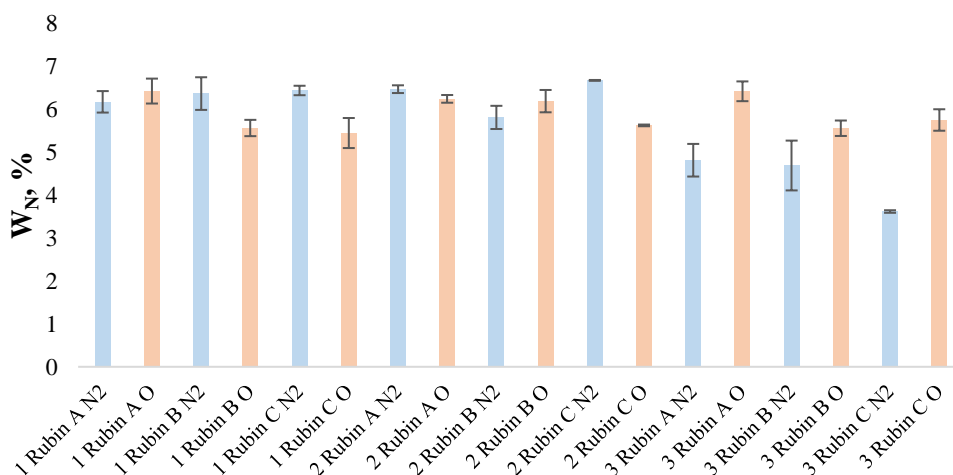
$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vērtības atkarībā no ābeles (1; 2; 3), ābola (A, B, C) un apsaimniekošanas veida (N₂; O) ābolu šķirnē *Rubin*

Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
1A N ₂	1,64 ± 0,05	-27,80 ± 0,01	1A O	0,57 ± 0,05	-26,10 ± 0,10
1B N ₂	2,02 ± 0,09	-26,90 ± 0,03	1B O	1,03 ± 0,01	-26,80 ± 0,02
1C N ₂	2,05 ± 0,03	-27,20 ± 0,03	1C O	0,33 ± 0,02	-26,00 ± 0,02
2A N ₂	2,10 ± 0,10	-27,00 ± 0,02	2A O	0,37 ± 0,09	-27,50 ± 0,04
2B N ₂	2,00 ± 0,04	-25,20 ± 0,01	2B O	1,77 ± 0,02	-28,80 ± 0,03
2C N ₂	2,620 ± 0,001	-25,90 ± 0,04	2C O	0,97 ± 0,15	-26,30 ± 0,10
3A N ₂	1,59 ± 0,08	-25,00 ± 0,04	3A O	1,230 ± 0,002	-25,90 ± 0,10
3B N ₂	2,04 ± 0,03	-25,30 ± 0,02	3B O	1,27 ± 0,04	-27,50 ± 0,05
3C N ₂	2,0 ± 0,2	-26,20 ± 0,01	3C O	1,31 ± 0,02	-26,70 ± 0,04

3.8. un 3.9. attēlos attēloti *Rubin* šķirnes iegūtie rezultāti. 3.8. attēlā ir novērojams sadalījums starp apstrādātiem un neapstrādātiem paraugiem. Apstrādāto ar slāpekli paraugu $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no -27,2 ‰ līdz -25 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības diapazonā no 1,59 ‰ līdz 2,62 ‰. Neapstrādāto paraugu $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no -28,8 ‰ līdz -25,9 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības – 0,33 ‰ līdz 1,77 ‰. Slāpekļa masas daļa apstrādātajos paraugos ir diapazonā no 3,6 ‰ līdz 6,67 ‰, savukārt neapstrādātiem paraugiem - 5,45 ‰ - 6,42 ‰. Atšķirība starp vienas ābeles āboliem nav novērojama ne apstrādātiem, ne neapstrādātiem paraugiem.



3.8. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē *Rubin*



Vienas šķirnes sēklas no dažādām ābelēm (1;2;3) un dažādiem āboliem (A, B, C) un dažādiem audzēšanas apstākļiem (N₂; O)

3.9. att. Slāpekļa masas daļa *Rubin* ābolu šķirnes analizējamajos paraugos, ‰

Noteiktās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecību vērtības ābolu šķirnei *Antej* apkopotas 3.4. tabulā.

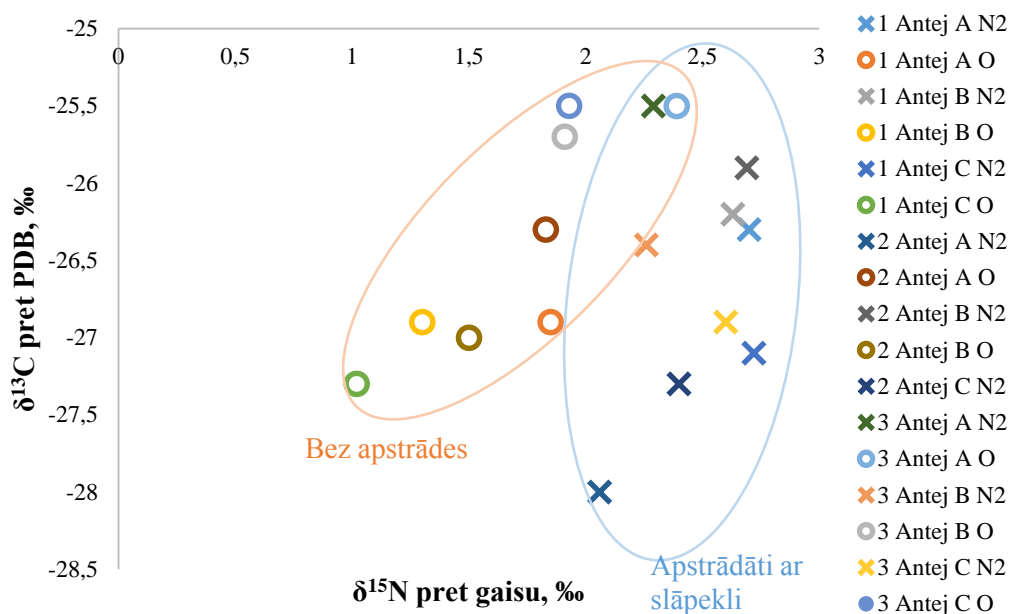
3.4.tabula

$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vērtības atkarībā no ābeles (1; 2; 3), ābola (A, B, C) un apsaimniekošanas veida (N₂; O) ābolu šķirnē *Antej*

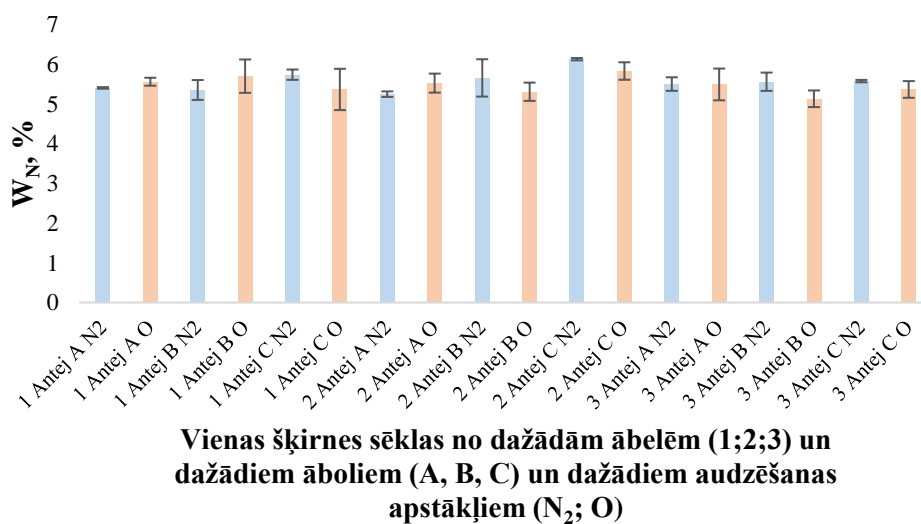
Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
1A N₂	2,70 ± 0,08	-26,300 ± 0,001	1A O	1,80 ± 0,10	-26,90 ± 0,03
1B N₂	2,63 ± 0,10	-26,2 ± 0,1	1B O	1,30 ± 0,08	-26,90 ± 0,10
1C N₂	2,72 ± 0,09	-27,10 ± 0,02	1C O	1,020 ± 0,002	-27,30 ± 0,03
2A N₂	2,05 ± 0,03	-28,00 ± 0,01	2A O	1,83 ± 0,04	-26,30 ± 0,03
2B N₂	2,69 ± 0,06	-25,90 ± 0,03	2B O	1,50 ± 0,01	-27,00 ± 0,03
2C N₂	2,40 ± 0,03	-27,300 ± 0,002	2C O	1,81 ± 0,03	-26,00 ± 0,03
3A N₂	2,29 ± 0,06	-25,50 ± 0,01	3A O	2,39 ± 0,05	-25,50 ± 0,02
3B N₂	2,26 ± 0,01	-26,40 ± 0,05	3B O	1,91 ± 0,04	-25,70 ± 0,03
3C N₂	2,60 ± 0,01	-26,900 ± 0,001	3C O	1,93 ± 0,01	-25,50 ± 0,10

No 3.4. tabulas var novērot, ka nav novērojama būtiska atšķirīga starp vienas ābeles āboliem. Ja salīdzina vienu apsaimniekošanas veidu, piemēram, apstrādājot ar slāpekli, nav novērojama arī būtiska atšķirība starp ābelēm. Tā, piemēram, salīdzinot $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības starp ābelēm 1; 2 un 3 attiecīgi ir 2,68 ‰; 2,38 ‰ un 2,38 ‰. Otrajai un trešajai ābelei pat sakrīt vidējās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības. Savukārt, ja salīdzina neapstrādātu ābeļu vidējās vērtības, tad sekojoši tās ir 1,39 ‰; 1,71 ‰ un 2,07 ‰. Neapstrādātām ābelēm jau ir novērojama atšķirība starp $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām.

Antej iegūtie rezultāti ir attēloti 3.10. un 3.11. attēlos. Apstrādāto paraugu $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no -28,0 ‰ līdz -25,5 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības – 2,06 ‰ – 2,72 ‰. Savukārt to slāpekļa masas daļa ir diapazonā no 2,05 ‰ līdz 2,72 ‰. Neapstrādāto paraugu $\delta^{13}\text{C}$ vērtības ir diapazonā no -27,3 ‰ līdz -25,5 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ vērtības – 1,02 ‰ – 2,39 ‰. Slāpekļa masas daļa tajos ir diapazonā no 1,02 ‰ līdz 2,39 ‰.



3.10. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē Antej



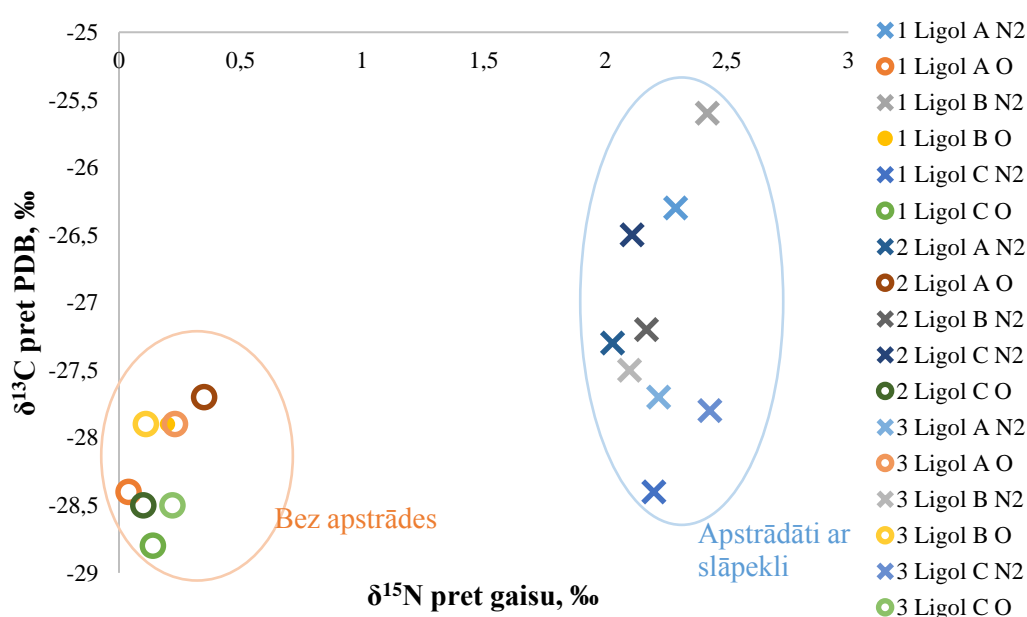
3.11. att. Slāpekļa masas daļa Antej ābolu šķirnes analizējamajos paraugos, %

Ābolu šķirnes *Ligol* iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecības vērtības ir attēlotas 3.5. tabulā. Salīdzinājumā ar iepriekš apskatītajām šķirnēm, *Ligol* neapstrādātu ābolu sēklu $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ir viszemākās. Tas arī apstiprina to, ka $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ietekmē ne tikai apsaimniekošanas veids, bet arī tās atšķiras starp šķirnēm.

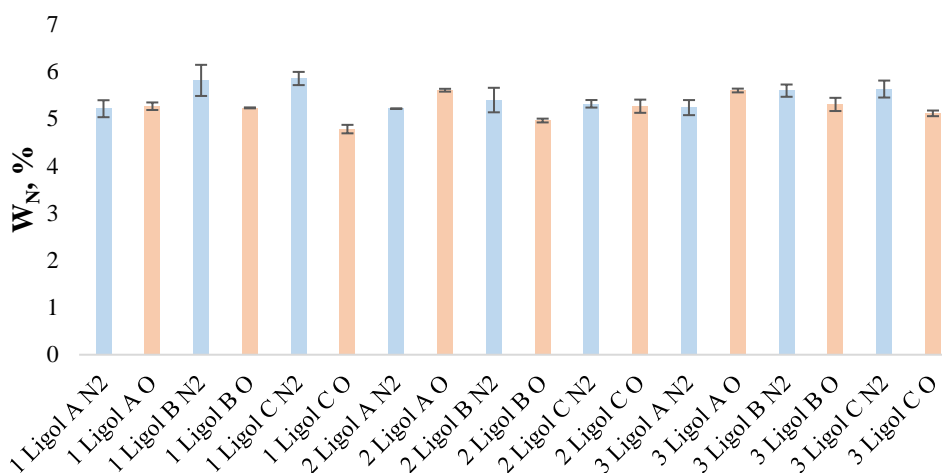
$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vērtības atkarībā no ābeles (1; 2; 3), ābola (A, B, C) un apsaimniekošanas veida (N₂; O) ābolu šķirnē *Ligol*

Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
1A N ₂	2,29 ± 0,01	-26,30 ± 0,01	1A O	0,04 ± 0,01	-28,40 ± 0,03
1B N ₂	2,42 ± 0,07	-25,60 ± 0,10	1B O	0,20 ± 0,05	-27,90 ± 0,10
1C N ₂	2,20 ± 0,06	-28,40 ± 0,10	1C O	0,14 ± 0,01	-28,80 ± 0,02
2A N ₂	2,03 ± 0,10	-27,30 ± 0,02	2A O	0,35 ± 0,03	-27,70 ± 0,02
2B N ₂	2,2 ± 0,1	-27,20 ± 0,10	2B O	-0,08 ± 0,02	-27,90 ± 0,03
2C N ₂	2,110 ± 0,002	-26,50 ± 0,10	2C O	0,10 ± 0,03	-28,50 ± 0,10
3A N ₂	2,22 ± 0,01	-27,70 ± 0,03	3A O	0,23 ± 0,03	-27,90 ± 0,01
3B N ₂	2,10 ± 0,02	-27,50 ± 0,03	3B O	0,110 ± 0,006	-27,90 ± 0,03
3C N ₂	2,43 ± 0,05	-27,80 ± 0,02	3C O	0,22 ± 0,07	-28,50 ± 0,01

Šķirnes *Ligol* izotopu attiecībā ir novērojams acīmredzams sadalījums starp apsaimniekošanas veidiem. Neapstrādāto paraugu $\delta^{13}\text{C}$ izotopu vērtības ir diapazonā no -28,8 ‰ līdz -27,7 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības diapazonā no 0,04 ‰ līdz 0,35 ‰ (skatīt 3.12. att.). Slāpekļa masas daļa šajos paraugos ir no 4,78 ‰ līdz 5,61 ‰ (skatīt 3.13. att.). Ar slāpekli apstrādāto paraugu $\delta^{13}\text{C}$ izotopu vērtības ir diapazonā no -28,4 ‰ līdz -25,6 ‰, savukārt, $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības -2,03 ‰ -2,43 ‰. Slāpekļa masas daļa šajos paraugos -5,22 ‰ -5,86 ‰.



3.12. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē *Ligol*



Vienas šķirnes sēklas no dažādām ābelēm (1;2;3) un dažādiem āboliem (A, B, C) un dažādiem audzēšanas apstākļiem (N₂; O)

3.13. att. Slāpekļa masas daļa *Ligol* ābolu šķirnes analizējamajos paraugos, %

Aļesja no visiem analizējamiem paraugiem ir vienīgā šķirne, kurai ir pieejami paraugi, apstrādājot divos veidos; apstrādājot ar slāpekli un otrs, tā saucamais bioloģiskais apstrādāšanas veids, ar vermikompostu. *Aļesja* iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecību vērtības ir apkopotas 3.6. tabulā.

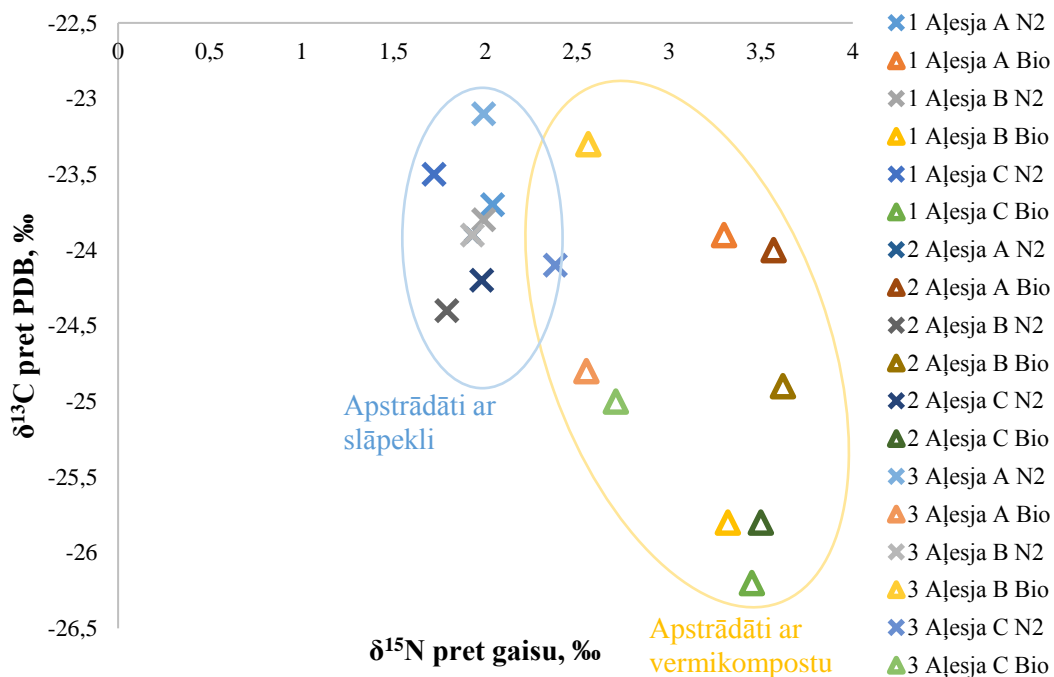
3.6. tabula

$\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ attiecību vērtības atkarībā no ābeles (1; 2; 3), ābola (A, B, C) un apsaimniekošanas veida (N₂; O) ābolu šķirnē *Aļesja*

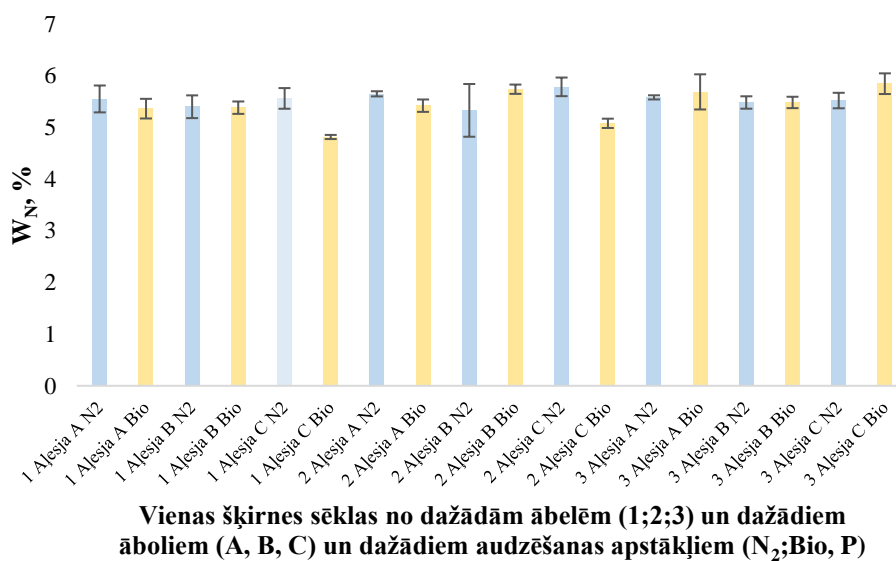
Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	Ābele/ Ābols	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰
1A N ₂	2,04 ± 0,10	-23,7 ± 0,1	1A Bio	3,30 ± 0,03	-23,90 ± 0,04
1B N ₂	1,99 ± 0,01	-23,8 ± 0,1	1B Bio	3,32 ± 0,01	-25,800 ± 0,002
1C N ₂	1,72 ± 0,06	-23,50 ± 0,02	1C Bio	3,45 ± 0,04	-26,200 ± 0,003
2A N ₂	1,93 ± 0,01	-23,9 ± 0,1	2A Bio	3,57 ± 0,08	-24,00 ± 0,03
2B N ₂	1,79 ± 0,07	-24,4 ± 0,1	2B Bio	3,62 ± 0,04	-24,90 ± 0,04
2C N ₂	1,98 ± 0,03	-24,2 ± 0,1	2C Bio	3,50 ± 0,14	-25,80 ± 0,05
3A N ₂	1,99 ± 0,04	-23,10 ± 0,04	3A Bio	2,55 ± 0,04	-24,80 ± 0,10
3B N ₂	1,93 ± 0,07	-23,9 ± 0,1	3B Bio	2,56 ± 0,05	-23,30 ± 0,04
3C N ₂	2,380 ± 0,002	-24,100 ± 0,001	3C Bio	2,71 ± 0,04	-25,000 ± 0,001

Aļesja šķirnes paraugu rezultāti apkopoti 3.14. un 3.15 attēlos. No 3.14. attēla var redzēt, ka $\delta^{13}\text{C}$ izotopu vērtības apstrādātiem ar slāpekli paraugiem ir diapazonā no -24,4 ‰ līdz -23,1

‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības – 1,72 ‰ – 2,38 ‰. Savukārt ar vermikompostu apstrādātiem paraugiem $\delta^{13}\text{C}$ izotopu vērtības ir diapazonā no -26,2 ‰ līdz – 23,3 ‰, bet $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības – 2,55 ‰ – 3,63 ‰. Slāpekļa masas daļa šajos paraugos bija sekojoša, apstrādātiem ar slāpekli paraugiem 5,33 ‰ - 5,78 ‰, bet ar vermikompostu apstrādātiem paraugiem 4,81 ‰ līdz 5,84 ‰.



3.14. att. $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē *Aļesja*



3.15. att. Slāpekļa masas daļa *Aļesja* ābolu šķirnes analizējamajos paraugos, ‰

Apkopojot iepriekš sniegtos rezultātus, var secināt, ka apsaimniekošanas veids ietekmē $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības. Neapstrādātiem paraugiem bija viszemākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības, kas liecina to, ka to sastāvā ir mazāka ^{15}N izotopu koncentrācija. ^{15}N izotopu mazāka koncentrācija liecina par to, ka paraugiem nebija pievienoti nekādi slāpekļa avoti. *Ligol* šķirnei no visām šķirnēm bija šaurākais un zemākais $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtību diapazons 0,04 ‰ – 0,35 ‰, savukārt starp neapstrādātiem paraugiem visaugstākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības iegūtas *Gita* šķirnes paraugiem – 2,06 ‰ – 2,74 ‰. Paraugiem, kas tika apstrādāti ar slāpekli, $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ir diapazonā no 1,59 ‰ līdz 2,72 ‰. Šķirne ar viszemākajām $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām ir *Gita* – 1,26 ‰ – 2,4 ‰, bet šķirne ar augstākajām $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām ir *Antej* – 2,06 ‰ – 2,43 ‰. Savukārt paraugam, kas tika apstrādāts ar vermikompostu, ir visaugstākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības diapazonā no 2,55 ‰ līdz 3,63 ‰. $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības paraugos atšķiras ne tikai no apsaimniekošanas veida, bet arī tās ir atkarīgas no šķirnes.

Salīdzinot iegūtos rezultātus par izotopu attiecību ābolu sēklās ar literatūrā sniegto informāciju, ir novērojama sakarība starp izotopu vērtībām. Mazākas $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības nozīmē to, ka augs bija mazāks pakļauts ^{15}N izotopu koncentrācijai. ^{15}N izotopu koncentrācijas galvenais avots ir mēslošana. Piemēram, sintētiskais slāpekļis sniedz mazāku ^{15}N izotopu koncentrāciju salīdzinot ar organisko slāpekli.

Šajā pētījumā tika noskaidrots, ka neapstrādātu ābolu sēklās ir mazākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības (0,2 – 1,7 ‰), savukārt paraugiem, kas tika apstrādāti ar organiskā slāpekļa avotu, vermikompostu, bija novērojamas augstākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības (3,18 ‰). Iegūtie rezultāti sakrīt ar literatūrā sniegto sakarību, par to, kā mēslojuma veids ietekmē izotopu attiecību. Analizējamajos paraugos $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības palielinājās sekojošā secībā: neapstrādāti paraugi < ar slāpekli apstrādāti paraugi < ar vermikompostu apstrādāti paraugi. ^{15}N izotopu koncentrācija mēslojuma veidā attiecīgi: bez mēslojuma < neorganiskais slāpekļis < organiskais slāpekļis.

Atšķirība starp vienas ābeles āboliem un ābelēm nav novērojama viena apsaimniekošanas veida ietvaros, ko var izskaidro ar to, ka ābelēm bija vienādi augšanas apstākļi.

Iegūtās $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu attiecības vērtības apstiprina to, ka tās sniedz informāciju par augu tipu ($\delta^{13}\text{C}$), kā arī sniedz informāciju par cilvēcisko darbību, tas būtu, tieši par augu apstrādes veidu, kas, savukārt ir būtiska informācija patērētājiem. Tāpat $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības atšķiras starp ābolu šķirnēm.

Izotopu attiecība sniedz būtisku informāciju paraugu autentificēšanai.

3.2. Aminoskābes analizējamajos paraugos

3.7. tabulā ir attēlots aminoskābju procentuālais daudzums paraugu ekstraktos. Aminoskābju koncentrācija netiek izteikta uz parauga svaru, jo nav zināma aminoskābju atgūstamība no ābolu sēklām šķidrums-šķidrums ekstrakcijas laikā. To iespējams noskaidrot veicot papildus standartpiedevu eksperimentus.

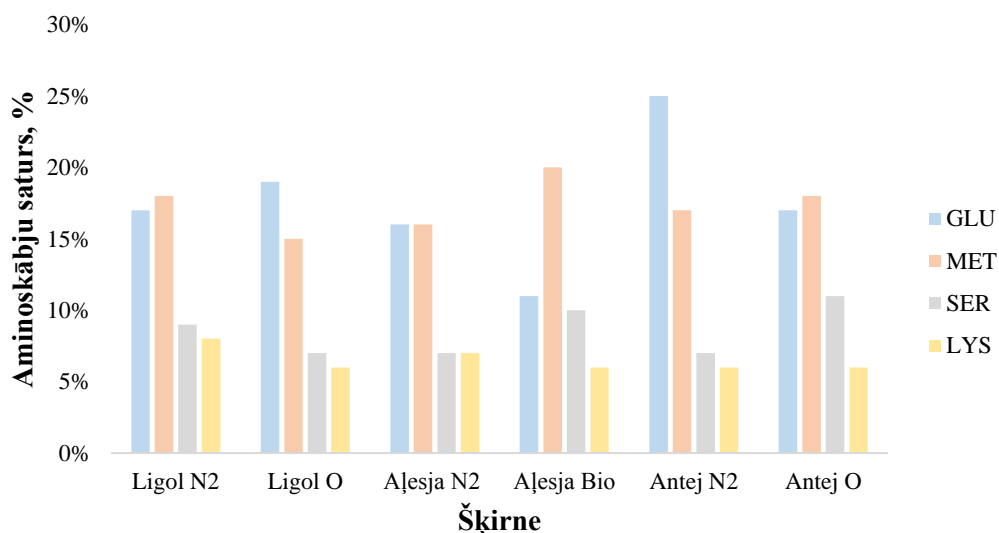
3.7.tabula

Aminoskābju relatīvais saturs analizējamo paraugu ekstraktos

Šķirne	Ekstrahēto aminoskābju relatīvais saturs, %																	
	Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Thr	Ser	Pro	Met	Asp	Hyp	Glu	Phe	Lys	His	Hly	Tyr	Trp
<i>Ligol</i> N ₂ (1A)	6	3	5	6	4	4	8	4	18	2	<LOD	19	3	7	2	<LOD	4	4
<i>Ligol</i> N ₂ (1C)	5	2	8	4	3	5	8	3	22	2	<LOD	18	2	9	2	<LOD	3	4
<i>Ligol</i> N ₂ (2A)	7	3	7	7	5	4	12	4	13	2	1	14	4	8	4	1	3	3
<i>Ligol</i> O (1A)	8	2	5	5	3	4	5	3	16	2	<LOD	26	3	5	3	2	3	5
<i>Ligol</i> O (1B)	7	2	1	6	4	4	10	4	18	2	<LOD	18	3	7	4	1	4	4
<i>Ligol</i> O (1C)	8	3	6	8	5	5	6	5	11	3	<LOD	16	4	6	2	2	5	6
<i>Ligol</i> O (3A)	7	3	6	8	4	5	7	4	15	3	<LOD	16	4	7	2	<LOD	5	4
<i>Aļesja</i> N ₂ (1A)	6	2	6	7	5	5	7	5	16	2	<LOD	16	3	7	2	1	4	3
<i>Aļesja</i> Bio (1A)	6	3	6	7	4	5	10	7	20	2	<LOD	11	3	6	2	1	4	2
<i>Antej</i> N ₂ (1A)	5	2	5	6	4	4	7	4	17	1	1	25	4	6	2	1	3	4
<i>Antej</i> O (1A)	5	3	5	7	4	5	11	5	18	2	<LOD	17	6	6	3	<LOD	3	3

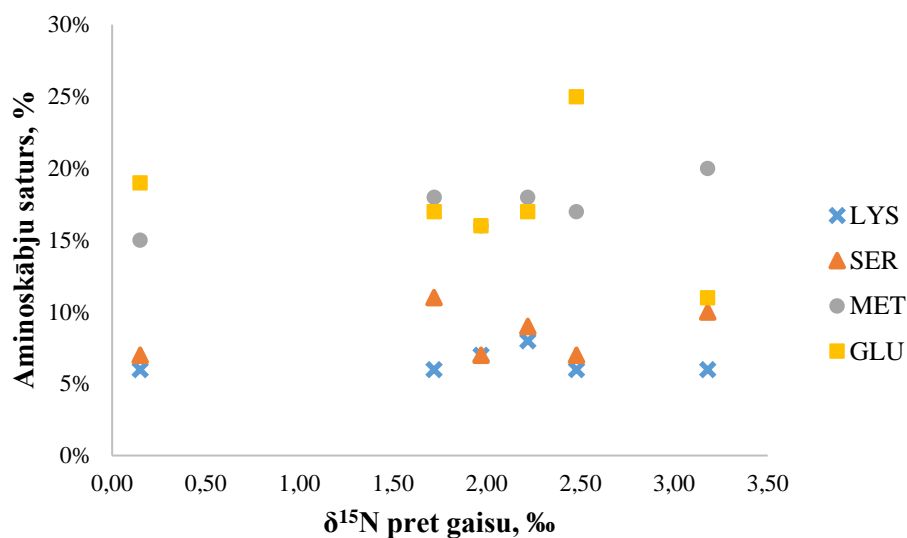
No literatūrā sniegtās informācijas ir zināms, ka ābolu sēklu paraugos lielākās koncentrācijās ir sekojošās aminoskābes: asparagīnskābe, glutamīnskābe, serīns, arginīns, glicīns un fenilalanīns [44, 45]. No 3.7.tabulas var redzēt, ka analizējamajos paraugos sekojošās aminoskābes ir vairāk kā 5%: alanīns, valīns, leicīns, serīns, metionīns, glutamīnskābe un lizīns. No iegūtiem rezultātiem ar literatūrā sniegto informāciju sakrīt tikai glutamīnskābe un serīns. Minētās aminoskābes ir sekojošās koncentrācijās: glutamīnskābe (Glu) 14-26 %, metionīns (Met) 11 – 22 %, lizīns (Lys) 4 – 14 %, alanīns (Ala) 5 – 8 % , valīns (Val) 1 - 8 % un leicīns (Leu) 4 – 8 %.

3.16. attēlā ir attēlots augstāk minēto aminoskābju daudzums analizējamajos ābolu sēklu paraugos. No 3.16. attēla var redzēt, ka glutamīnskābes un metionīna koncentrācijas ir augstākas visos paraugos un mainās atkarībā no apsaimniekošanas veida. Glutamīnskābe ir lielākā koncentrācijā tiem paraugiem, kuri tika apstrādāti ar slāpekli, savukārt metionīna koncentrācija ir augstāka tiem paraugiem, kuri netika apstrādāti vai apstrādāti ar vermikompostu.



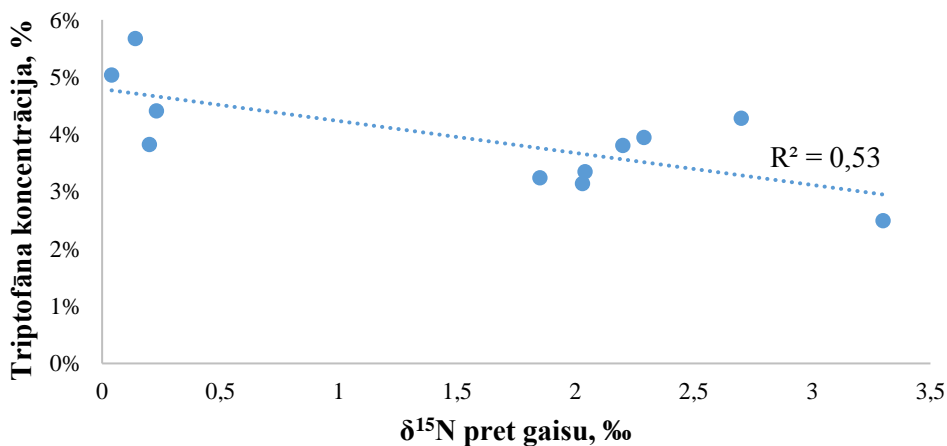
3.16. att. Aminokābju relatīvais salīdzinājums starp ābolu šķirnēm

Lai pārbaudītu vai ir sakarība starp aminoskābju un $\delta^{15}\text{N}$ izotopiem, paraugu vērtības attēlotas 3.17. att. No 3.17. attēla nevar novērot sakarību starp šīm vērtībām. No kā var secināt, ka nepastāv korelācijas starp aminoskābju koncentrācijām un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām. Savukārt literatūrā tiek minēts, ka notiekot slāpekļa uzņemšanai, palielinās aminoskābju koncentrācija, it īpaši glutamīnskābes, arginīna un asparagīna koncentrāciju gadījumā [45]. Tas nozīmē, ka analizējamajos paraugos, kas apstrādāti ar vermikompostu, būtu jābūt augstākai aminoskābju koncentrācijai, savukārt neapstrādātiem - zemākai, bet tas šajā pētījumā netika novērots.

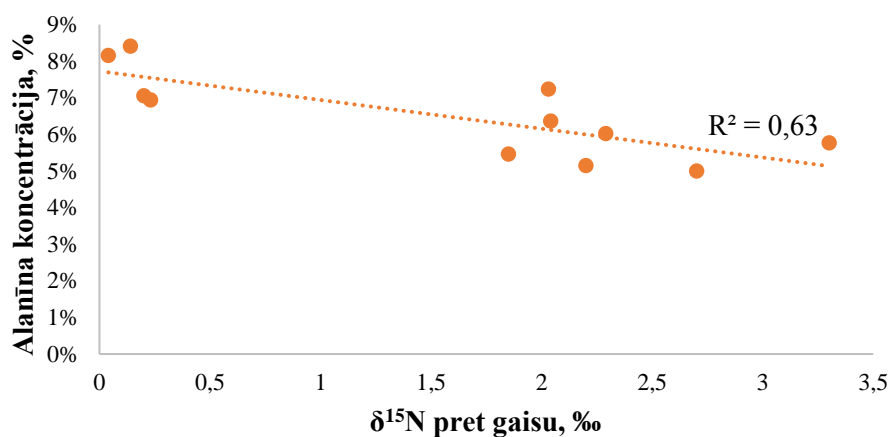


3.17. att. Aminoskābju un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnēs

Savukārt, izpētot visu noteikto aminoskābju korelāciju ar $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām, tika novērots, ka divām aminoskābēm, triptofānam un alanīnam, korelācijas koeficients ir $< 0,50$ (skatīt 3.18. un 3.19. attēlus). Korelācijas koeficients diapazonā $0,50 - 0,70$ ļauj pieņemt, ka pastāv vidēji cieša pozitīva korelācija [46]. Tā kā šo divu aminoskābju korelācijas koeficients iekļaujas šajā diapazonā, var uzskatīt, ka triptofānam un alanīnam pastāv vidēji ciešas korelācijas ar $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām.

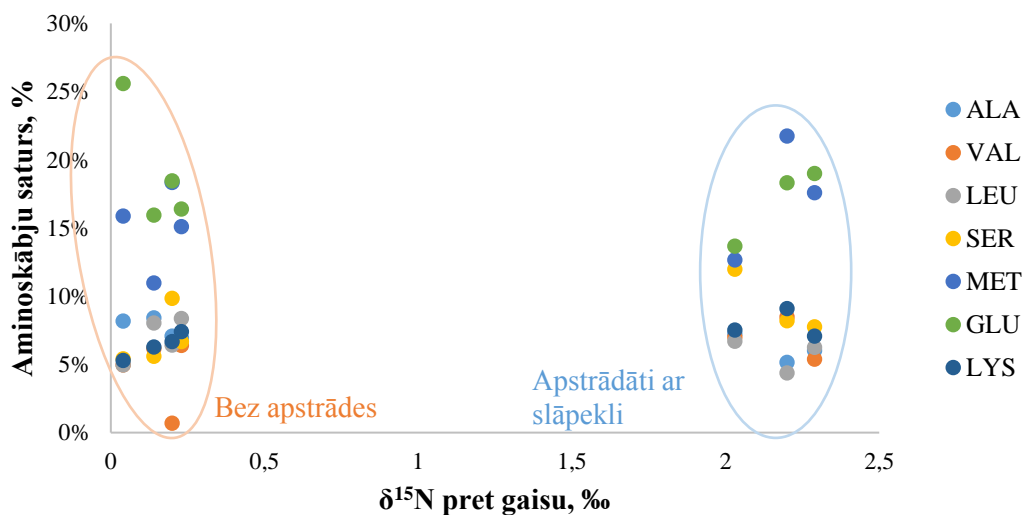


3.18. att. Korelācija starp triptofāna koncentrāciju un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām



3.19. att. Korelācija starp alanīna koncentrāciju un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām

Salīdzinot $\delta^{15}\text{N}$ izotopu un aminoskābju vērtības vienas šķirnes ietvaros (*Ligol*), bet dažādi apsaimniekotus paraugus (skatīt 3.20. att.), var novērot to pašu, ko 3.12. attēlā. Ir izveidojušās divas kopas, kur viena ir paraugi, kas audzēti apstrādājot ar slāpekli un otra - neapstrādāti paraugi. 3.20. attēlā var novērot to, ka šīs kopas galvenokārt veidojas balstoties uz $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtībām, tā kā aminoskābju koncentrācija abiem apsaimniekošanas veidiem ir vienā diapazonā no 1 – 26 %.



3.20.att. Aminoskābju un $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ābolu šķirnē *Ligol*

Aminoskābju un stabilo izotopu noteikšana paraugos sniedz informāciju par to apsaimniekošanu, tā, kā ir novērojama izkliede starp apsaimniekošanas veidiem. Kā arī, izmantojot šīs metodes tandēmā, ir iespējams pētīts dažādas šķirnes, nosakot to autentiskumu. Kā nākamais solis, ko varētu izpētīt, būtu korelācija starp aminoskābju koncentrācijām un stabilo izotopu attiecībām.

SECINĀJUMI

1. Analizējamajos ābolu sēklu paraugos $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ir diapazonā no 0,2‰ līdz 3,2 ‰, bet $\delta^{13}\text{C}$ vērtības - -27,0‰ - -23,8‰. $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības atkarīgas no apsaimniekošanas veida, sugas, šķirnes, bet $\delta^{13}\text{C}$ vērtības atkarīgas galvenokārt no auga fotosintēzes ceļa.

2. Apsaimniekošanas veids ietekmē $\delta^{15}\text{N}$ vērtības: neapstrādātiem paraugiem – 0,2‰ – 1,7‰; ar slāpekli apstrādātiem paraugiem – 2,0‰ – 2,5‰, bet ar vermikompostu apstrādātiem paraugiem – 3,18‰. Augstākā ^{15}N izotopu koncentrācija ir paraugiem, kas tika apstrādāti ar organiskā slāpekļa avotu, vermikompostu.

4. Ābolu šķirnes *Ligol* paraugiem ir novērojama krasa frakcionēšanās pēc apsaimniekošanas veidiem: neapstrādātiem paraugiem $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības ir diapazonā no - 0,08‰ līdz 0,35‰, bet ar slāpekli apstrādātiem paraugiem – 2,03‰ – 2,43‰.

5. Ābolu šķirnes Aļesja paraugiem, kas tika apstrādāti ar vermikompostu ir visaugstākās $\delta^{15}\text{N}$ izotopu vērtības diapazonā no 2,55‰ līdz 3,63‰, savukārt ar slāpekli apstrādātiem paraugiem – 1,72‰ – 2,38‰.

6. Analizējamajos ābolu sēklu paraugos dominē aminoskābes sekojošā kārtībā: Glu (14-26%); Met (11-22%); Lys (11-14%); Ala (5-8%). Apsaimniekošanas veids galvenokārt ietekmē Glu un Met saturu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- [1] Bontempo, L.; Leeuwen, K.; Paolini, M.; Laursen, K.; Micheloni, C.; Prenzler, P.; Ryan D.; Camin, F. Bulk and compound-specific stable isotope ratio analysis for authenticity testing of organically grown tomatoes. *Food Chem.* **2020**, *318*, 126426.
- [2] Mimmo, T.; Camin, F.; Bontempo, L.; Capici, C.; Tagliavini, M.; Cesco, S.; Scampicchio, M. Traceability of different apple varieties by multivariate analysis of isotope ratio mass spectrometry data. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 1984-1990.
- [3] Danezis, G.; Tsagkaris, A.; Camin, F.; Brusic, V.; Georgious, C. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 123-132.
- [4] Cuadros-Rodriguez, L.; Ruiz-Samblac, C.; Valverde-Som, L.; Perez-Castano, E.; Gonzales-Casado, A. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication - A tutorial. *Anal. Chem. Acta*, **2016**.
- [5] Newton, J. *Stable Isotope Ecology*; Encyclopedia of Life Science, 2010; 1-7.
- [6] Baeta, A. *Stable Isotope Ecology*; Encyclopedia Ecology, 2019; Vol. 3, pp 606-615.
- [7] Magdas, D.; Dehelean, A.; Puscas, R. Isotopic and elemental determination in some Romanian apple fruit juices. *Scientific World Journal*, **2012**, 1-17.
- [8] Perini, M.; Giongo, L.; Grisenti, M.; Bontempo, L.; Camin, F. Stable isotope ratio analysis of different European raspberries, blackberries, blueberries, currants and strawberries. *Food Chem.*, **2018**, *239*, 48-55.
- [9] Zhang, Y. Application of isotope analysis for food authenticity and traceability: Process and Challenges. *D.Env. Sci.*, **2012**.
- [10] Suzuki, Y.; Nakashita, R. Chapter 18 - Authentication and Traceability of Fruits and Vegetables. *Compr. Anal. Chem.*, **2013**, *60*, 461-477.
- [11] Botteon, V.; Costa, M. L.; Kovalski, A.; Martinelli, L.; Mastrenghelo, T. Can stable isotope markers be used to distinguish wild and mass-reared *Anastrepha fraterculus* filies?. *Plos One*, **2018**, *13*, 1-15.
- [12] Bat, K.; Eler, K.; Mazej, D.; Vodopivec, B.; Molič, I.; Kump, P.; Ogrinc, N. Isotopic and elemental characterisation of Slovenian apple juice according to geographical origin: Preliminary results. *Food Chem.*, **2016**, *203*, 86-94.

- [13] Korenaga, T.; Suzuki, Y.; Chikaraishi, Y. 7 - Biochemical Stable Isotope Analysis in Food Authenticity. *Engineering Tools in the Beverage Industry*, **2019**, *3*, 209-227,
- [14] Muccio, Z.; Jackson, G. Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst*, **2009**, *134*, 213-222.
- [15] Carter, J.; Barwick, V. Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry. *Firms*, **2011**.
- [16] Rodrigues, C.; Maia, R.; Lauteri, M.; Brugnoli, E.; Maguas, C. Chapter 4 - Stable Isotope Analysis. *Compr. Anal. Chem.*, **2013**, *60*, 77-99.
- [17] Kelly, S.; Brodie, C.; Hilkert, A. Chapter 11 - Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotope-Ratio Mass Spectrometry (IRMS). *Modern Techniques for Food Authentication*, **2018**, *2*, 349-413.
- [18] <https://isotopes.forestry.ubc.ca/sample-preparation/> (skatīts 09.05.2020.).
- [19] <https://www.ru.nl/science/gi/facilities-activities/elemental-analysis/irms/> (skatīts 09.05.2020.).
- [20] Willis, L.; Lessard, P.; Sinskey, A. Amino Acids. *Encyclopedia of Genetics*, **2001**, 54-56.
- [21] Asadpoor, M.; Ansarin, M.; Nemati, M. Amino Acid Profile as a Feasible Tool for Determination of the Authenticity of Fruit Juices. *Adv. Pharm. Bull.*, **2014**, *4*, 359-362.
- [22] Ito, H.; Ueno, H.; Kikuzaki, H. Construction of a free-form amino acid database for vegetables and mushrooms. *Integr. Food Nutr. Metab.*, **2017**, *4*.
- [23] Ali, K.; Maltese, F.; Choi, Y.; Verpoorte, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem Rev.*, **2010**, *9*, 357-378.
- [24] Hernandez-Orte, P.; Pena, A.; Pardo, I.; Cacho, J.; Ferreira, V. Amino acids and volatile compounds in wines from Cabernet Sauvignon and Tempranillo varieties subjected to malolactic fermentation in barrels. *Food Sci. Technol. Int.*, **2012**, *18*, 103-112.
- [25] Di Maro, A.; Dosi, R.; Ferrara, L.; Rocco, M.; Sepe, J.; Ferrari, G.; Parente, A. Free amino acid profile of *Malus domestica* Borkh cv. Annurca from the Campania Region and other Italian vegetables. *Aust. J. Crop Sci.*, **2011**, *5*, 154-161.
- [26] Botoran, O.; Ionete, R.; Miricioiu, M.; Costinel, D.; Radu, G.; Popescu, R. Amino Acid Profile of Fruits as Potential Fingerprints of Varietal Origin. *Molecules*, **2019**, *24*, 4500.
- [27] Blanco Gomis, D.; Picinelli Lobo, A.; Gutierrez Alvarez, M.; Mangas Alonso, J. Determination of Amino Acids in Apple Extracts by High Performance Liquid Chromatography,» *Chromatographia*, **1990**, *29*, 155-160.

- [28] Ackermann, J.; Fischer, M.; Amado, R. Change in Sugar, Acids, and Amino Acids during Ripening and Storage of Apple (Cv. Glockenafel). *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 1131-1134.
- [29] Ma, S.; Neilson, A.; Lahne, J.; Peck, G.; Keefe, S. O.; Stewart, A. Free amino acid composition of apple juices with potential for cider making as determined by UPLC-PDA. *J. Inst. Brew.*, **2018**, *124*, 467-476.
- [30] Dadwal, V.; Agrawal, H.; Sonkhla, K.; Joshi, R.; Gupta, M. Characterization of phenolics, amino acids, fatty acids and antioxidant activity in pulp and seeds of high altitude Himalayan crab apple fruits (*Malus baccata*). *J. Food Sci. Technol.*, **2018**, *55*, 2160-2169.
- [31] Majidano, S.; Khuhawar, M.; Zounr, R.; Channar, A.; Jahangir, T.; Mughal, M. Determination of amino acids in jams, fruits and pharmaceutical preparations by gas chromatography using trifluoroacetylacetone and ethylchloroformate as derivatizing reagents. *Anal. Methods*, **2015**, *7*, 3148-3156.
- [32] Callejon, R.; Troncoso, A.; Morales, M. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta*, **2010**, *81*, 1143-1152.
- [33] <https://www.labochema.lv/products/gazes-hromatografija/> (skatīts 13.05.2020.).
- [34] <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/> (skatīts 13.05.2020.).
- [35] Hinshaw, J. The Flame Ionization Detector. *LCGC Europe*, **2006**, *19*, 2006.
- [36] Mališa, Ž. Benzodiazepīnu hromatogrāfiska/masspektrometriska noteikšana. Maģistra darbs. LU, Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2008.
- [37] https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-flame-ionization-detector-for-gas-chromatography-The-size-of-the-signal_fig12_292138082 (skatīts 13.05.2020.).
- [38] Moldoveanu, S.; David, V. Chapter 7 - Solid-Phase Extraction,» *Modern Sample Preparation for Chromatography*, **2015**, 191-286.
- [39] Sandoval, R. Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction. *Thesis*, **2017**.
- [40] Abd-Talib, N.; Mohd-Setapar, S.; Khamis, A. The Benefits and Limitations of Methods Development in Solid Phase Extraction: Mini Review. *J. Teknol.*, **2014**, *69*, 69-72.
- [41] EZ:faast Amino Acid Analysis of protein Hydrolysates by GC-MS. *User's manual*, Phenomenex.

- [42] Trandel, M.; Vigardt, A.; Walters, S.; Lefticariu, M.; Kinsel, M. Nitrogen Isotope Composition, Nitrogen Amount, and Fruit Yield of Tomato Plants Affected by the Soil–Fertilizer Types. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 6419-6426.
- [43] Zīriņa, S. Oglekļa un slāpekļa izotopu attiecību pētīšana dažādas šķirnes ābolos. Maģistra darbs. LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2019.
- [44] Silva, B.; Casal, S.; Andrade, P.; Seabra, R.; Oliveira, M.; Ferreira, M. Development and Evaluation of a GC/FID Method for the Analysis of Free Amino Acids in Quince Fruit and Jam. *Anal. Sci.*, **2003**, *19*, 1285-1290.
- [45] Xu, Y.; Xiao, H. Free amino acid concentrations and nitrogen isotope signatures in *Pinus massoniana* (Lamb.) needles of different ages for indicating atmospheric nitrogen deposition. *Environ. Pollut.*, **2017**, *221*, 180-190.
- [46] Mukaka, M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J.*, **2012**, *24*, 69-71.

PATEICĪBAS

Autore izsaka pateicību darba vadītājam Arturam Vīksnam, Jānim Ruško par sniegto palīdzību darba izstrādē. Mārim Bērtiņam par IRMS uzņemšanu.

Maģistra darbs „Dažādu ābolu šķirņu izcelsmes pētījumi” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____
(personiskais paraksts) _____
(paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs profesors, Dr. chem. Arturs Vīksna: _____
(personiskais paraksts) _____
(datums)

Recenzents docente, Dr. chem. doc. Vita Rudoviča: _____
(personiskais paraksts) _____
(datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) _____
(paraksta atšifrējums)