



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOTOPOVÉ SLOŽENÍ NĚKTERÝCH OVOCNÝCH DŽUSŮ - AUTENTICITA Z HLEDISKA ZASTOUPENÍ DEUTERIA POMOCÍ SNIF-NMR

ISOTOPIC CHARACTERIZATION OF SELECTED FRUIT JUICES -

DETERMINATION OF AUTHENTICITY ON THE BASIS OF DEUTERIUM CONTENT BY SNIF-NMR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUCIE VYČÍTALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MGR. PAVLÍNA SEČKÁŘOVÁ, PH.D.

BRNO 2009



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0269/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lucie Vyčítalová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	Mgr. Pavlína Sečkářová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Izotopové složení některých ovocných džusů -
autenticita z hlediska zastoupení deuteria pomocí SNIF-NMR

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše zaměřená obecně na problematiku autenticity ovocných džusů, na botanický původ cukrů - rozdělení rostlin podle metabolismu cukrů (C3, C4 rostliny), rozdíly v izotopovém složení cukru, potažmo ethanolu.

Stručné seznámení s metodami pro určování zastoupení izotopů, podrobně pak metoda SNIF-NMR (nukleární magnetické rezonance sledující distribuci izotopů na různých místech v molekule).

Stanovení zastoupení deuteria pomocí metody SNIF-NMR u konkrétních vzorků autentických i komerčně dostupných ovocných šťáv, případně stanovení dalších izotopů pomocí jiných metod, diskuze výsledků, porovnání s daty dostupnými v literatuře.

Zhodnocení potenciálu dané metody pro určování autenticity ovocných džusů.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Vyčítalová
Student(ka)

Mgr. Pavlína Sečkářová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Obsah deuteria v cukrech v ovoci je ovlivněn hlavně botanickým a částečně také geografickým původem ovoce. Informaci o původu ovoce poskytuje ethanol po fermentaci cukrů. Obsah deuteria na methylové skupině ethanolu se liší v závislosti na botanickém původu ovoce.

SNIF NMR - nukleární magnetická rezonance sledující distribuci izotopů na různých místech v molekule je specifická metoda pro stanovení zastoupení deuteria (izotopový poměr D/H) v malých molekulách, např. v ethanolu. Tato izotopová technika je běžně používána pro stanovení nepovoleného přídavku cukru v ovocných nápojích (víno, ovocné džusy...).

V této diplomové práci bylo pomocí SNIF-NMR analyzováno pět druhů ovoce (jablka, pomeranče, grapefruity, ananasy a hroznové víno) dostupných na trhu v České republice. Tato data jsou porovnávána s hodnotami změřenými pro komerčně dostupné ovocné džusy a nektary.

ABSTRACT

The deuterium content of sugar in fruits is influenced mainly by two factors – the botanical and also the geographical origin of the fruit. The information of the fruit origin is kept even after fermentation of the sugar, in the molecules of ethanol. The deuterium content on the methyl group of ethanol then varies depending upon the botanical origin of the fruit.

SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance) is a specific method for determination of the deuterium isotopic ratio (D/H) in small molecules, e.g. ethanol. This isotopic technique is widely used for determination of sugar adulteration of fruit-based beverages (wines, fruit juices..).

In this thesis, the authentic samples of five different fruits (apples, oranges, grapefruits, pineapples and grapes) available in the Czech market have been collected and analyzed by SNIF-NMR. The results are presented as well as the comparison to some commercially available fruit juices and nectars.

KLÍČOVÁ SLOVA

ovocné džusy, autenticita, SNIF-NMR, deuterium

KEYWORDS

fruit juices, authenticity, SNIF-NMR, deuterium

VYČÍTALOVÁ, L. *Izotopové složení některých ovocných džusů - autenticita z hlediska zastoupení deuteria pomocí SNIF-NMR*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 53 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Pavlína Sečkářová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Velmi ráda bych poděkovala Mgr. Pavlíně Sečkářové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce za poskytnutí cenných informací a rad.

OBSAH:

1	ÚVOD	5
2	TEORIE	6
2.1	Výroba ovocných džusů	6
2.2	Falšování ovocných džusů	7
2.3	Metody stanovení autenticity ovocných džusů	7
2.4	Izotopové metody	8
2.4.1	Stabilní izotopy	8
2.4.1.1	<i>Izotopový poměr</i>	9
2.4.2	Frakcionace izotopů	9
2.4.2.1	<i>Geograficita</i>	10
2.4.2.2	<i>Frakcionace v rámci rostliny, fotosyntéza</i>	11
2.4.2.3	<i>C3 fotosyntéza, Calvinův cyklus</i>	13
2.4.2.4	<i>C4 fotosyntéza, Hatch-Slack cyklus</i>	14
2.4.2.5	<i>CAM fotosyntéza</i>	15
2.4.2.6	<i>Frakcionace v rámci molekuly metabolitu</i>	15
2.4.2.7	<i>Fermentace sacharidů na ethanol</i>	16
2.4.3	Nukleární magnetická rezonance - SNIF NMR	17
2.4.3.1	<i>Princip NMR spektrometrie</i>	17
2.4.3.2	<i>Stanovení falšování džusů přidavkem cukru pomocí SNIF NMR</i>	19
2.4.4	Hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů – IRMS	21
2.4.5	Kombinace SNIF NMR a IRMS	23
2.4.5.1	<i>Interpretace výsledků</i>	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Stanovení poměru stabilních izotopů vodíku D/H na methylové skupině ethanolu pomocí nukleární magnetické rezonance (SNIF-NMR) - stanovení botanického původu cukrů ovocných šťáv	27
3.1.1	Vybavení a chemikálie	27
3.1.1.1	<i>Přístroje a pomůcky</i>	27
3.1.1.2	<i>Software</i>	28
3.1.1.3	<i>Chemikálie</i>	28
3.1.1.4	<i>Referenční materiály</i>	28
3.1.2	Příprava vzorku	28
3.1.2.1	<i>Evidence vzorku</i>	29
3.1.2.2	<i>Fermentace</i>	29
3.1.2.3	<i>Stanovení alkoholu ve zfermentovaném džusu - t_D</i>	29
3.1.2.4	<i>Destilace na Cadiotových kolonách – izolace ethanolu</i>	30
3.1.2.5	<i>Stanovení obsahu ethanolu v destilátu - t_D</i>	31
3.1.2.6	<i>Příprava vzorku pro NMR analýzu</i>	31
3.1.3	NMR analýza	31
3.1.3.1	<i>Spektrometr, experimentální podmínky</i>	31
3.1.3.2	<i>Výpočet $(D/H)_1$</i>	32
3.1.3.3	<i>Validace dat</i>	32
3.1.4	<i>Interpretace dat – stanovení přidavku cukru</i>	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Analýza autentických vzorků džusů - databáze	33
4.2	Analýza komerčně dostupných 100% džusů a nektarů	35
4.3	Stanovení $(D/H)_1$ třtinového a řepného cukru	39
4.4	Pomerančový džus s přidavky řepného cukru	39
4.5	Nejistota měření	40

4.6	Kombinace hodnot $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$	41
5	ZÁVĚR.....	42
6	ZKRATKY A SYMBOLY	43
7	PŘÍLOHY.....	44
8	LITERATURA.....	48

1 ÚVOD

Výrobky z ovoce jsou častým předmětem falšování, nejvíce jsou vzhledem k objemům produkce falšovány ovocné šťávy. Cenový rozdíl mezi ovocem a cukrem svádí k finančně výhodnému nahrazování ovoce levnějším cukrem.

Nepovolený přídavek cukru se stejným inverzním poměrem glukózy a fruktózy jako je v ovoci společně s koktejlem maskovacích ingrediencí jako minerály, aminokyseliny organické kyseliny atd. je běžnými metodami neodhalitelný.²

K odhalení takového falšování se využívají tzv. izotopové metody. Jsou založeny na faktu, že každá rostlina má charakteristické zastoupení izotopů biogenních prvků - vodíku, uhlíku, kyslíku a dusíku. Rozdíly v izotopovém složení jednotlivých rostlin jsou způsobeny frakcionací těchto izotopů, která probíhá během koloběhu prvků v přírodě včetně fotosyntézy. Izotopové složení rostliny je tedy ovlivněno klimatickými, environmentálními podmínkami a druhem fotosyntézy, kterou rostlina používá (C3, C4 a CAM).^{2,5,27,43}

SNIF NMR - nukleární magnetická rezonance sledující distribuci izotopů na různých místech v molekule je specifická metoda pro stanovení zastoupení deuteria (izotopový poměr D/H) v malých molekulách, např. v ethanolu. Tato izotopová technika je běžně používána pro stanovení nepovoleného přídavku cukru v nápojích jako je víno, ovocné džusy, destiláty...^{1,2,27,43}

Informaci o botanickém původu cukru nese methylová skupina ethanolu získaného fermentací cukrů přítomných v ovoci. Obsah deuteria na methylové skupině ethanolu se liší hlavně podle druhu biosyntézy cukrů a částečně podle toho, zda rostlina roste v oblasti s teplým a suchým klimatem nebo v oblasti s mírným klimatem. Např. cukrová třtina využívající C4 metabolismus a ananas využívající CAM metabolismus mají obsah deuteria vyšší, jablka, pomeranče, řepa cukrovka atd. využívající C3 metabolismus mají obsah deuteria nižší. Obsah deuteria v rámci C3 rostlin se ještě liší podle klimatických podmínek, ve kterých rostliny vyrůstaly.^{2,5,43}

Analýzou autentických vzorků se tvoří databáze hodnot, se kterou se porovnávají hodnoty neznámých vzorků. Přídavek řepného cukru do ovocného džusu způsobuje snížení obsahu deuteria, zatímco přídavek třtinového cukru obsah deuteria zvyšuje.^{1,2,43}

Metoda se často používá v kombinaci s hmotnostní spektrometrií izotopových poměrů (IRMS) stabilních izotopů uhlíku v ethanolu.^{1,2,27}

2 TEORIE

2.1 Výroba ovocných džusů

Ovocné džusy hrají významnou roli ve výživě člověka. 100 % ovocné džusy obsahují čistou ovocnou šťávu bez přídavku cukru, vody, barviv či konzervantů.³⁻⁵ Ve srovnání s řadou sladkých nealkoholických nápojů obsahují méně cukru a mají nízkou energetickou hodnotu.

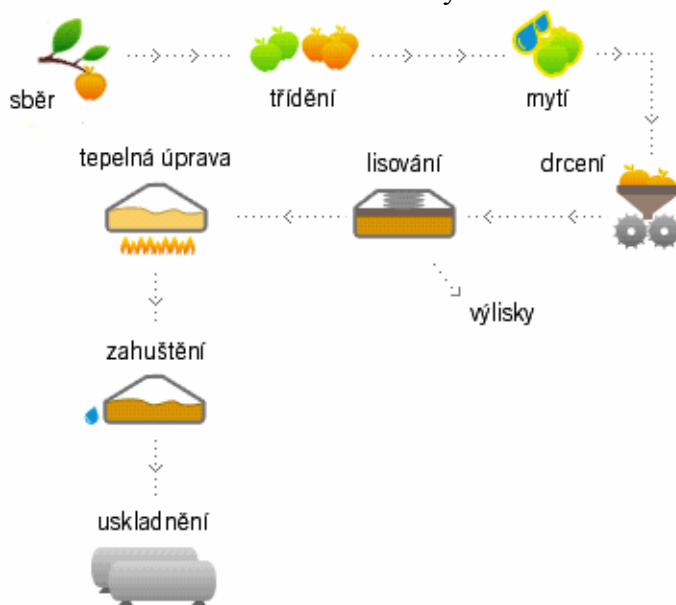
Podle obsahu dužiny se ovocné šťávy dělí na šťávy bez dřene (čiré) a dřevové šťávy (kalné). Čiré jsou buněčné šťávy bez nerozpustného plodového pletiva a získávají se čiřením a filtrací čerstvé šťávy. Jsou stabilnější při skladování. Šťávy s dužinou (např. pomerančové) mají více minerálních látek a ve vodě nerozpustného vitamínu A.⁵

Pro výrobu džusů se používá ovoce plně zralé s vyváženým obsahem cukrů a kyselin bez známky hniloby a plsnivění. Zpracování ovoce musí být rychlé, citlivé, aby nedocházelo ke ztrátám způsobených převážně oxidací.

Mezi přípravné operace se řadí odstranění mechanických nečistot, kontrola a odstranění vadných kusů, oplach pitnou vodou a případně odstranění obalových vrstev (citrusy). Poté se ovoce drtí nebo řeže. Pro zvýšení výtěžnosti lisování je třeba narušit buněčnou stěnu nebo zvýšit její propustnost enzymaticky, drcením, záhřevem, a méně často mrazením, elektrickým proudem, ultrazvukem atd.

Oddělení šťávy se provádí lisováním. Působením tlaku je oddělena šťáva od drtě, přičemž proběhne ještě filtrace přes vrstvu lisovaného materiálu. Pokud surovina obsahuje větší množství samotoku, provede se před lisováním centrifugace. Urychlí se tím proces lisování.^{5,7,29} Technologický postup se mírně odlišuje podle druhu zpracovávaného ovoce.

Z ekonomických a technických důvodů se z čerstvě vylisované ovocné šťávy odstraní voda odpařením nebo vymražením na obsah sušiny 60 - 75 %. Při odpařování dochází také k oddělení aromat, která jsou jímána. Koncentrát se skladuje zmrazený nebo tekutý, většina typů nepodléhá rozkladu díky nízké aktivitě vody. Snížením objemu výrobku klesají náklady na přepravu zejména z oblastí, které jsou situovány daleko od země určení. V tomto případě je ekonomičtější odstranit vodu u výrobce, transportovat džus ve formě koncentrátu, a znovu naředit vodou v místě určení dodávky.^{1,4-7,29}



obr. 1 výrobní schéma⁷

100 % džusy neobsahují konzervanty. Trvanlivosti je dosaženo tepelným ošetřením – pasterizací a aseptickým plněním do obalů, které zabraňují přístupu světla a vzduchu.^{4,5,29}

Na trh jsou uváděny přírodní čisté džusy a džusy vyrobené z koncentrátu a je mezi nimi nemalý finanční rozdíl. To, o jaký se jedná druh džusu, musí být uvedeno na obalu výrobku.¹

2.2 Falšování ovocných džusů

Výrobky z ovoce jsou častým předmětem falšování, nejvíce jsou vzhledem k objemům produkce falšovány ovocné šťávy. Cenový rozdíl mezi ovocem a cukrem svádí k finančně výhodnému nahrazování ovoce levnějším cukrem. S cukrem jsou do džusů přidávány minerály, aminokyseliny, organické kyseliny atd.^{2,8,25,34} Mezi další způsoby falšování patří náhrada dražších druhů ovoce levnějšími (přidávky jablek do malin, borůvek, ostružin apod.), u citrusových šťáv jsou to přidávky „pulp wash“ což je šťáva získaná extrakcí výlisků ke šťávě z prvního lisování, nebo příprava rekonstituovaného nápoje pouze z koncentrátu pulp wash nebo směsi pulp wash a koncentrátu šťávy, dále např. vydávání šťávy získané rekonstitucí koncentrátu za šťávu získanou lisováním z ovoce.⁸

2.3 Metody stanovení autenticity ovocných džusů

Při falšování džusů dochází ke změnám ve složení - např. nižší podíl ovoce než je deklarováno, nedeklarovaný přírůstek jiného ovoce, cukrů, barviv, nižší refraktometrická sušina, nižší obsah markerů charakteristických pro daný druh ovoce. Při detekci falšování ovocných šťáv je analýza zaměřena právě na tyto parametry. Sleduje se obsah organických kyselin - jablečná, citrónová, isocitrónová, který je ovlivněn odrůdou, podmínkami kultivace, zralostí. Dále se analyzuje sacharidový profil - sacharóza, glukóza, fruktóza, sorbitol, aminokyselinový profil. Vyšší obsah flavonoidních glykosidů indikuje použití méně kvalitního ovoce, vyšší tlak při lisování nebo přírůstek pulp-wash. Flavonoidní glykosidy - hesperidin, naringin, sacharidy, organické kyseliny a aminokyseliny se stanovují převážně pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Formolové číslo se stanovuje titrací karboxylových skupin aminokyselin po blokaci aminoskupin formaldehydem. Kationty Na, K, Ca a Mg se stanovují kapilární isotachofórou s vodivostním detektorem a AAS. Refraktometrická sušina podává informaci o tom, zda byl džus zředěn vodou. Pro všechny výše uvedené markery je asociací A.I.J.N. (European Fruit Juice Association, asociace, která shromažďuje údaje o ovocných džusech) definováno rozmezí hodnot autentických vzorků.^{1,4,8-10,24,29}

Pro odhalení porušení integrity džusu (přírůstek jiného ovoce, vydávání džusu z koncentrátu za šťávu získanou lisováním z ovoce) lze provést analýzu aromat pomocí plynové chromatografie.¹²

Kompletní výčet analytů, pro které jsou asociací A.I.J.N. uvedena doporučená rozmezí hodnot pro autentické vzorky ovocných šťáv: relativní hustota, refraktometrická sušina, těkavé kyseliny jako kys. octová, ethanol, kys. mléčná, glycerol, kys. glukonová, patulin, kys. askorbová, silice, hydroxymethylfurfural, titrační kyselost, kys. citronová a isocitronová, kys. jablečná, kys. vinná, popel, Na, Ca, Mg, K, P, dusičnany, sírany, formolové číslo, flavonoidní

glykosidy, naringin, pektinové látky, glukóza, fruktóza, sacharóza, sorbitol, bezcukerný extrakt a také zastoupení izotopů vodíku, uhlíku a kyslíku.¹⁴

2.4 Izotopové metody

Každá rostlina má charakteristické zastoupení izotopů biogenních prvků - vodíku, uhlíku, kyslíku a dusíku. Jelikož se jedná o hlavní komponenty organické hmoty, má tento fakt specifický význam při studiích autenticity potravin.^{13,17,24,39}

Nepovolený přídavek cukru se stejným inverzním poměrem glukózy a fruktózy jako je v ovoci společně s „koktejlem“ maskovacích ingrediencí jako minerály, aminokyseliny organické kyseliny atd. je běžnými metodami neodhalitelný. K odhalení takového falšování se využívají metody sledující rozdělení izotopů, ať už v rámci celé molekuly nebo vzorku - hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů IRMS nebo na určitých místech v molekule - izotopové poměry na specifických místech v molekule pomocí nukleární magnetické rezonance - SNIF NMR. Na specifických místech rostlinného metabolitu dochází během jeho biosyntézy k redistribuci izotopů biogenních prvků. Zastoupení izotopů v metabolitu je ovlivněno nejen druhem biosyntézy, kterou rostlina používá, ale i klimatickými a environmentálními faktory. Pro stanovení autenticity je nutné nejdříve vytvořit databázi hodnot autentických vzorků. Porovnáním hodnot neznámých vzorků s databází lze odhadnout, případně potvrdit či vyvrátit deklarovaný botanický, geografický původ mateřské rostliny.^{1,2,11,13,15,23-25,29,32-35,37,40}

tab. 1. využití stabilních izotopů pro detekci falšování potravin^{15,17,32,39}

obsah	je ovlivněn	může odhalit	matrice
¹³ C, ² H	botanickým původem	přídavek cukrů z jiných rostlin	ovocné džusy, víno, destiláty, medy
	druhem syntézy	přídavek syntetických látek	aromata: vanilin...
¹⁸ O, ² H	původem vody	ředění exogenní vodou	džusy, víno
¹³ C, ² H, ¹⁸ O, ¹⁵ N	geografickým původem	klamavé označení geografického původu	všechny produkty
¹³ C, ¹⁵ N	stravou	krmný režim	živočišné produkty

2.4.1 Stabilní izotopy

Izotopy, které nepodléhají radioaktivnímu rozpadu, se nazývají stabilní. Běžně analyzované jsou stabilní izotopy kyslíku, uhlíku, vodíku, dusíku a síry. Vyskytují se běžně v přírodě, ale jejich zastoupení je závislé na environmentálních podmínkách. Jsou využívány pro studie frakcionace izotopů v přirozených systémech a to zejména v biologii, geologii a hydrologii.^{17,18,37}

Zastoupení stabilních izotopů vodíku a uhlíku hraje klíčovou roli při stanovení botanického původu cukrů. Jelikož je tato práce zaměřená na falšování džusů přídavkem exogenního cukru, budeme se dále zabývat pouze jimi.

2.4.1.1 Izotopový poměr

Obsah izotopů se vyjadřuje jako izotopový poměr množství těžkého ku lehkému izotopu, např. $R_C = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ nebo $R_H = {}^2\text{H}/{}^1\text{H} = \text{D}/\text{H}$. Často se pro vyjádření obsahu izotopů používá relativní izotopový poměr v ‰:

$$\delta D = \frac{(D/H)_{\text{vzorek}} - (D/H)_{\text{SMOW}}}{(D/H)_{\text{SMOW}}} \times 1000$$

$$\delta {}^{13}\text{C} = \frac{({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{vzorek}} - ({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \times 1000$$

obecně:

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

kde standardem je pro vodík

VSMOW – Vienna-Standard Mean Ocean Water $R = 0,0001558$

pro uhlík

PDB – Pee Dee Belemnite $R = 0,0012372$ ^{13,17-19,21,23-25,27,29,30,33,37-39}

2.4.2 Frakcionace izotopů

Zastoupení stabilních izotopů mezi různými sloučeninami je proměnlivé. Je to způsobeno frakcionací izotopů během chemických a fyzikálních, reverzibilních a ireverzibilních procesů. K izotopové frakcionaci dochází vlivem rozdílných fyzikálních vlastností molekul s rozdílným izotopovým zastoupením. Molekuly obsahující těžké izotopy mají silnější chemické vazby, v důsledku své vyšší hmotnosti menší rychlost difúze, nižší pohyblivost a tudíž i menší počet kolizí mezi molekulami.

Kinetická frakcionace probíhá u ireverzibilních jednosměrných chemických a fyzikálních procesů. Příkladem je změna skupenství, např. odpařování vody a kondenzace páry; absorpce a difúze plynů; ireverzibilní reakce jako je bakteriální rozklad rostlin nebo tvorba sraženin. Fáze nebo sloučeniny vzniklé při kinetické frakcionaci jsou ochuzené o těžké izotopy v porovnání s původními fázemi nebo sloučeninami. Např. rychle odpařená voda je ochuzená o těžké izotopy. V některých případech může nastat i opačný případ, tzv. inverzní kinetický izotopový efekt. Nastává častěji v procesech, ve kterých figurují atomy vodíku.

Rovnovážná frakcionace je v podstatě izotopový efekt spojený rovnovážnou reakcí. Příkladem je chemická rovnováha mezi CO_2 a HCO_3^- a fyzikální rovnováha v systému voda – vodní pára. V rovnovážných procesech nemůže být s určitostí předpovězeno, zda bude jedna fáze nebo sloučenina obohacena nebo ochuzena těžkými izotopy. Kompaktní fáze (skupenství

s nižší energií, tedy kapalina spíše než pára) nebo sloučenina s vyšší molekulovou hmotností obvykle obsahuje vyšší zastoupení těžkých izotopů.^{17,20,37,39}

Frakcionace v procesech v přírodě nejsou vždy striktně kinetické nebo nevratné. Frakcionace plynoucí z kinetického izotopového efektu zpravidla převyšuje frakcionaci při rovnovážném procesu. Sloučeniny vytvořené při kinetické frakcionaci mohou být ochuzené o vzácné (těžké) izotopy, kdežto při rovnovážném procesu jsou obohaceny, např. rychle odpařená voda je více ochuzená o těžké izotopy než vodní pára v rovnováze s vodou.^{1,20,37}

Obvykle se frakcionace snižuje při zvyšující se teplotě. Při velmi vysokých teplotách izotopové rozdíly mezi sloučeninami mizí. K frakcionaci v rámci celé molekuly nedochází, pokud je substrát kvantitativně konvertován na produkt – např. ¹³C při fermentaci cukrů na ethanol.^{20,37}

Oba druhy frakcionací jsou ovlivněny klimatickými, environmentálními faktory a fyziologií rostlin.^{1,11,19,28} Zastoupení izotopů se mění se zeměpisnou polohou. Rostliny rostoucí v určité oblasti dále „zpracovávají“ biosyntetickými procesy prvky s izotopovým poměrem charakteristickým pro danou oblast a dochází ke frakcionaci izotopů v rámci rostliny a metabolitů. Fermentací sacharidů z rostlin dochází k frakcionaci izotopů vodíku v rámci molekuly ethanolu.¹¹

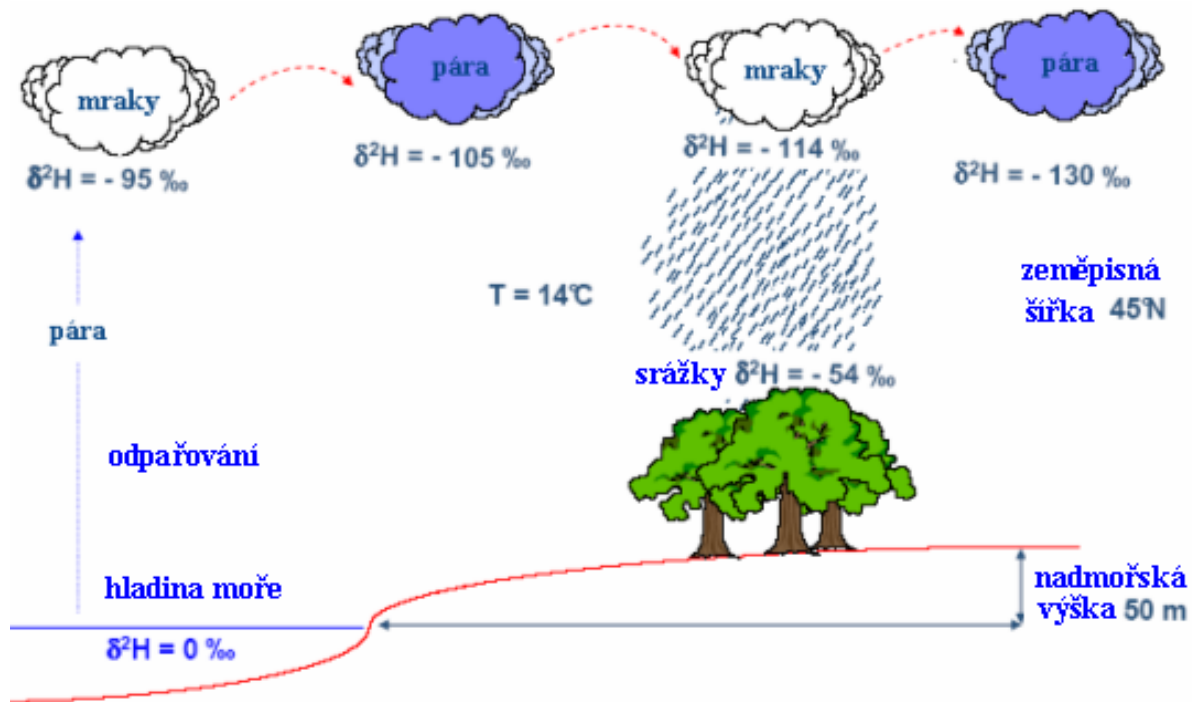
2.4.2.1 Geograficita

Zastoupení izotopů v rámci zeměpisné polohy je závislé na několika faktorech:

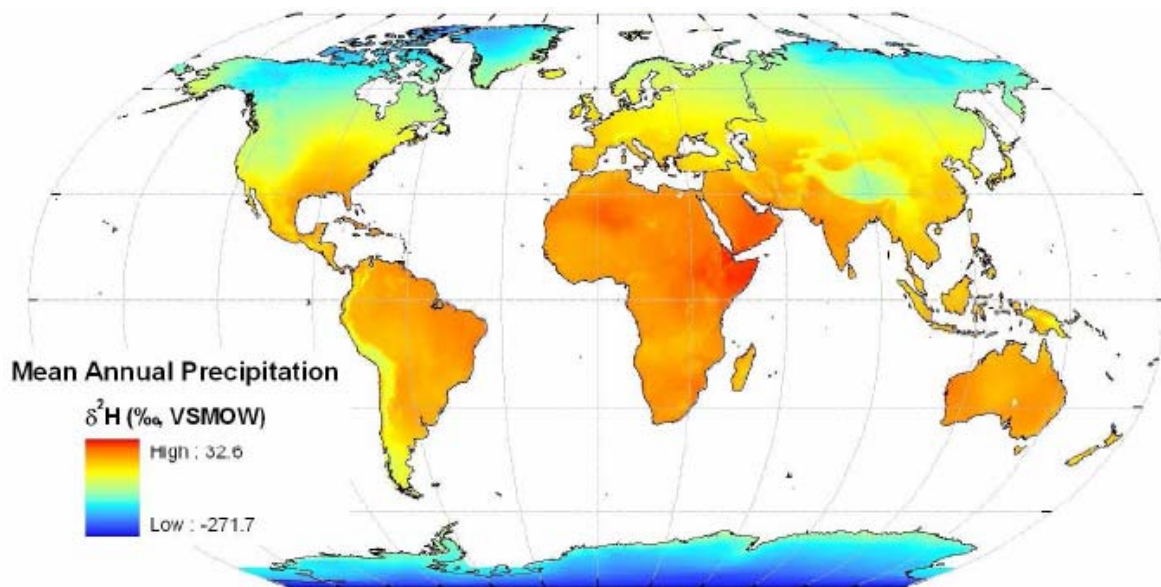
- klimatické vlivy – teplota, srážky
- geografické parametry - vzdálenost od pobřeží, nadmořská výška, zeměpisná šířka
- geologické parametry a kultivační podmínky – zavlažování a hnojení^{11,15,19,23}

Frakcionace stabilních izotopů vodíku (a kyslíku) probíhá během evaporace a kondenzace. Jedná se o frakcionaci podle hmotnosti izotopů v jednosměrných procesech. Izotopicky lehčí voda se odpařuje snadněji než těžká. Při odpařování jsou mraky obohaceny lehkou vodou, mořská těžkou vodou. Ve formě srážek kondenzuje přednostně těžká voda a mraky jsou ochuzeny o těžkou vodu. Z toho plyne, že se zvyšující se nadmořskou výškou a vzdáleností od pobřeží se snižuje obsah těžké vody v mracích a tedy i ve srážkách.^{15,17,18,20,39} Součástí kinetické frakcionace je evapotranspirace, což je odpařování lehké vody z listů rostlin a z půdy.^{18,19}

Na obr. 4 je zobrazena závislost zastoupení deuteria ve srážkové vodě na zeměpisné poloze. U rovníku v teplejších a suchých zemích je obsah deuteria vyšší. Směrem od rovníku se obsah deuteria snižuje. Je zde patrný i vliv nadmořské výšky – Andy, Himaláje... Obsahu deuteria ve srážkové vodě se také mírně mění rok od roku.^{11,13,15, 19}



obr. 3 izotopová frakcionace deuteria ve srážkové vodě¹⁵



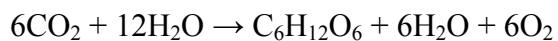
obr. 4 vliv geograficity na poměr stabilních izotopů vodíku ve srážkové vodě¹⁵

2.4.2.2 Frakcionace v rámci rostliny, fotosyntéza

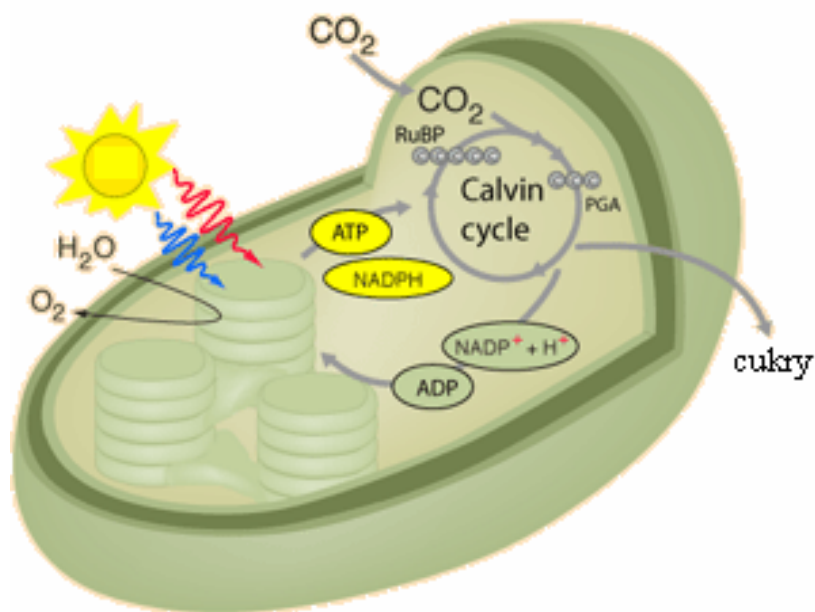
Rychle rostoucí rostliny – vodní meloun, okurka s vyšším obsahem vody jsou méně obohaceny těžkými izotopy (^2H , ^{18}O) než pomalu rostoucí ovoce jako jablka, hrušky a švestky. Také jednotlivé části rostliny se liší svým izotopovým složením. Obsah těžkých izotopů klesá v pořadí listy > plody > stonek > podzemní voda.³¹

Izotopový profil vody v listech rostliny koresponduje se srážkovou vodou, není však přímo úměrný. Voda z listů je dále obohacena těžkými izotopy jako následek evapotranspirace.^{11,13,19,31,32} Je to kombinace transpirace – odpařování vody obsažené ve tkáních rostlin prostřednictvím stomat a evaporace - odpařování vody z půdy. Intenzita evapotranspirace je ovlivněna environmentálními podmínkami – slunečním zářením, teplotou, prouděním vzduchu, vlhkostí a rostlinným druhem a růstovou fází rostliny. Většina vody se při transpiraci odpaří a jen malá část se účastní fotosyntézy, která probíhá právě v listech rostliny.¹⁹

Fotosyntéza je proces, kdy je z oxidované formy uhlíku o nejnižší energii za přítomnosti vody a energie ze slunečního záření produkován redukovaný materiál o vysoké energii – sacharidy a kyslík. Proces popisuje sumární rovnice:



Průběh fotosyntézy se dělí do dvou oddělených na sebe navazujících fází – světla a temná. Při světelné fázi dochází k přeměně energie fotonů slunečního záření na chemickou energii a zároveň dochází k uvolnění kyslíku po fotooxidaci vody. Temná fáze se skládá ze série enzymových reakcí využívající energii a redukované ze světelné fáze. V této fázi dochází k fixaci CO_2 ze vzduchu, který slouží pro tvorbu sacharidů. Biosyntéza sacharidů probíhá v chloroplastech prostřednictvím několika metabolických drah lišících se podle druhu rostliny.¹⁶



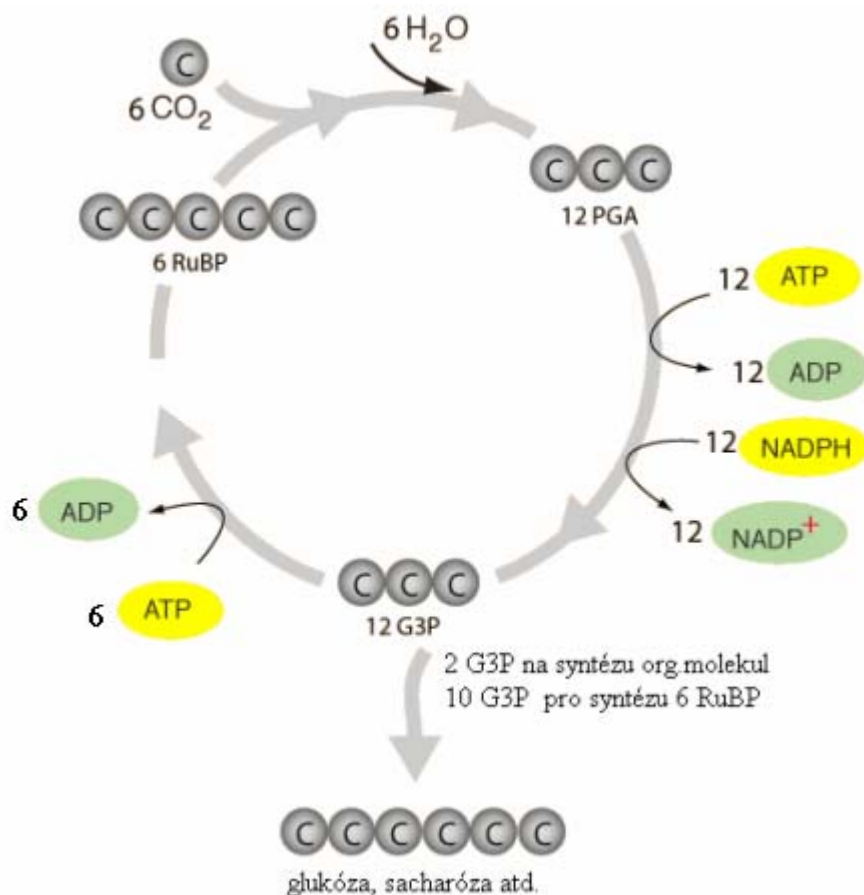
obr. 5 schéma fotosyntézy²⁶

Substrát vstupující do fotosyntézy je obecně bohatší na těžké izotopy než produkt fotosyntézy. K další frakcionaci izotopů dochází podle toho, jaký způsob metabolismu rostlina používá.^{17,20,28,32}

2.4.2.3 C3 fotosyntéza, Calvinův cyklus

Většina rostlin používá pro fixaci CO₂ ze vzduchu pouze Calvinův cyklus. Tyto rostliny se nazývají C3 rostliny. Patří mezi ně např. pšenice, ječmen, řepa cukrovka, citrusy atd.

Prvním krokem Calvinova cyklu je reakce CO₂ s ribulóza-1,5-bifosfátem za vzniku dvou tříuhlíkatých molekul 3-fosfoglycerátu (odtud název C3 rostliny). Reakce probíhá za katalýzy enzymu Rubisco. 3-fosfoglycerát se redukuje s NADPH za spotřeby 2 ATP přes 1,3-bifosfoglycerát na glyceralaldehyd-3-fosfát. Z něho pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trióz jde na syntézu sacharidů, aldolovou kondenzací se přeměňují na fruktóza-1,6-bifosfát. Odštěpením fosforylové skupiny v poloze 1 a isomerací vzniká glukóza-6-fosfát. Během jednoho cyklu vznikne z pentozy hexoza a je zapojena 1 molekula CO₂. Pro syntézu jedné molekuly hexózy je třeba, aby cyklus proběhl šestkrát (viz. obr.6.) Cyklus se uzavírá regenerací šesti molekul ribulózy, které vstupují do dalších cyklů. Během jednoho cyklu je na fixaci jedné molekuly CO₂ spotřebováno 3 ATP a 2 NADPH.^{16,26}



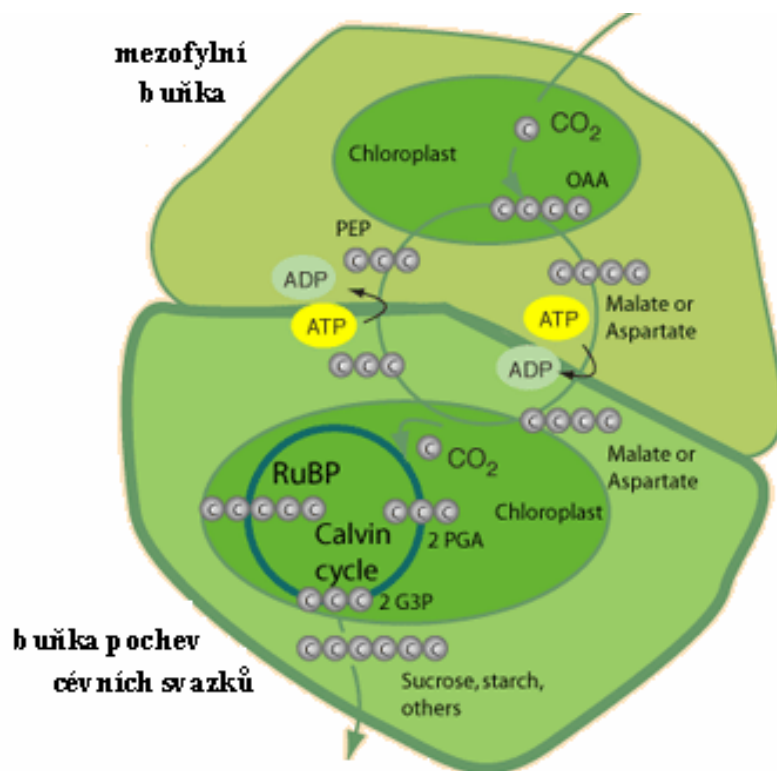
obr. 6 Calvinův cyklus. PGA - 3-fosfoglycerát, G3P - glyceralaldehyd-3-fosfát, RuBP - ribulóza-1,5-bifosfát^{16,26}

Na výtěžnost fotosyntézy u C3 rostlin má vliv *fotorespirace*. Při mírných teplotních podmínkách a dostatku vody je dostatečný přísun CO₂ a fotorespirace není problém. Volný CO₂ difunduje skrz stomata listů přes membránu chloroplastů, zatímco voda difunduje skrz stomata ven. V teplém a suchém prostředí se stomata uzavřou, aby se zabránilo ztrátám vody.

Přísun CO_2 do chloroplastů se sníží a tím klesá jeho koncentrace až k určité kritické hranici. V tomto okamžiku enzym rubisco, který katalyzuje fixaci CO_2 , začne katalyzovat fixaci O_2 . Rozsah fototespirace stoupá s intenzitou záření. Při nasycení světlem rostliny ztrácí 30 – 50 % fixovaného uhlíku, fotorespirace tedy konkuruje Calvinovu cyklu. Intenzita fotorespirace má tudíž vliv na frakcionaci izotopů.^{11,16,26}

2.4.2.4 *C4* fotosyntéza, Hatch-Slack cyklus

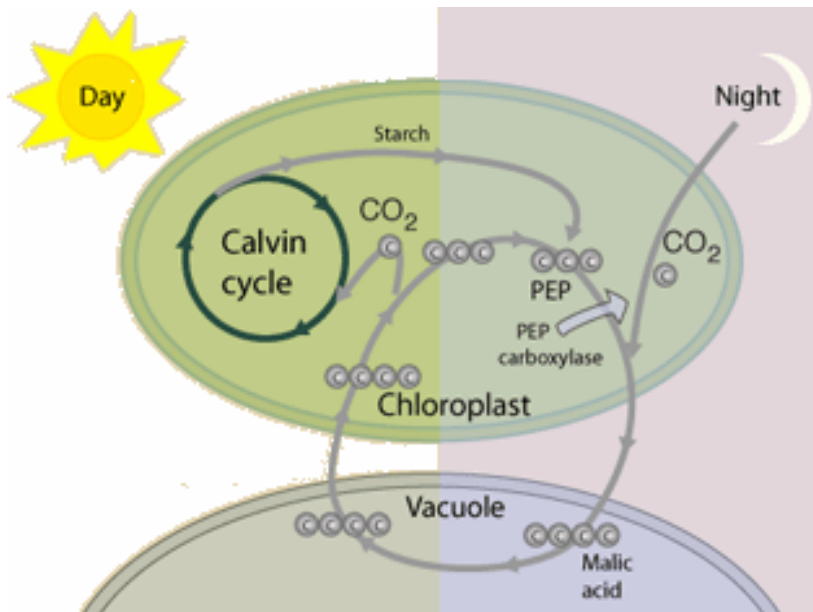
Některé tropické rychle rostoucí rostliny jako např. cukrová třtina, kukuřice, bambus atd. mají jiný způsob fixace CO_2 než C_3 rostliny. C_4 rostliny mají odlišnou anatomii listu, tzv. Kranz anatomii (tlustostěnný věnčitý obal cévních svazků). V tenkostěnných mezofylních buňkách se CO_2 váže na fosfoenolpyruvát, vzniká oxalacetát, ten se dále přeměňuje na malát nebo aspartát. Tyto čtyřuhlíkaté sloučeniny putují za pomoci ATP do buněk pochev cévních svazků. Zde dekarboxylací vzniká velké množství CO_2 , který pak vstupuje do Calvinova cyklu. Fosfoenolpyruvát putuje zpět do mezofylních buněk za pomoci ATP. Na fixaci jedné molekuly CO_2 se u C_4 rostlin spotřebuje 5 ATP a 2 NADPH, jsou tedy energeticky náročnější než C_3 rostliny. Intenzivní sluneční záření dodává rostlinám dostatek energie a fosfoenolpyruvát reaguje s CO_2 v mnohem nižších koncentracích než ribulóza-1,5-bifosfát. Tím je zabezpečen stálý přísun CO_2 do Calvinova cyklu a je zcela potlačena fotorespirace. Stačí tedy menší přísun CO_2 do listu, jeho póry (stoma) mohou být uzavřenější a tím jsou menší ztráty vody. Fotosyntéza u C_4 rostlin má mnohem vyšší účinnost než u C_3 rostlin.^{16,26} Z tohoto důvodu mají rostliny C_4 vyšší zastoupení těžkých izotopů ^{13}C , D než rostliny C_3 .^{32,33}



obr. 7. *C4* fotosyntéza²⁶

2.4.2.5 CAM fotosyntéza

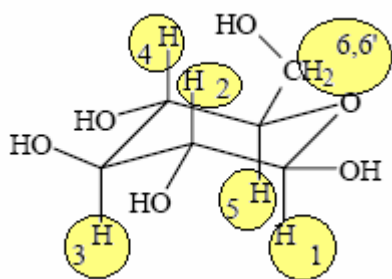
Rostliny z čeledi tučnolistých (např. ananas, kaktusy, agave atd.) využívají k fotosyntéze kombinaci C3 a C4 cesty. Procesy neprobíhají souběžně, ale odděleně - C4 v noci a C3 ve dne. V noci při nižších teplotách jsou stomata otevřená a CO₂ difunduje do chloroplastů. Váže se na fosfoenolpyruvát a ve formě malátu se hromadí ve vakuolách. Ve dne se stomata uzavírají, aby se zabránilo odparu vody. Malát přechází do chloroplastu a dekarboxylací se uvolňuje CO₂, který vstupuje do Calvinova cyklu. Tento typ fixace CO₂ se označuje CAM – Crassulacean Acid Metabolism. Název Crassulacean je podle čeledi sukulentů *Crassulaceae*, u kterých byl tento metabolismus poprvé objeven.^{16,26}



obr. 8. CAM den-noc cyklus²⁶

2.4.2.6 Frakcionace v rámci molekuly metabolitu

Sacharidy jako jedny z rostlinných metabolitů mají v různých místech v molekule rozdílné izotopové poměry. Hodnoty D/H u vodíků vázaných na uhlík sacharidu se liší mezi jednotlivými skupinami rostlin používajících C3, C4 a CAM metabolismu a zároveň jsou rozdíly mezi jednotlivými rostlinnými druhy ve skupině. Izotopové složení sacharidu vzniklého u rostlin stejné skupiny není konstantní, rozdíly jsou způsobeny environmentálními faktory. Pravidla, která řídí distribuci deuteria v jednotlivých místech molekuly, jsou také ovlivněna fyziologickými znaky rostliny. Ve skupině C3 je na pozicích 4 a 5 výraznější obohacení deuteriem a např. u řepného cukru je vyšší než u pomerančů. Skupina C4 má vyšší obsah deuteria na pozici 1 a 6, 6' glukózy. Ovoce ze skupiny CAM má izotopový profil sacharidů blíže k C3 rostlinám než k C4.



obr. 9. pozice v molekule glukózy^{11,28}

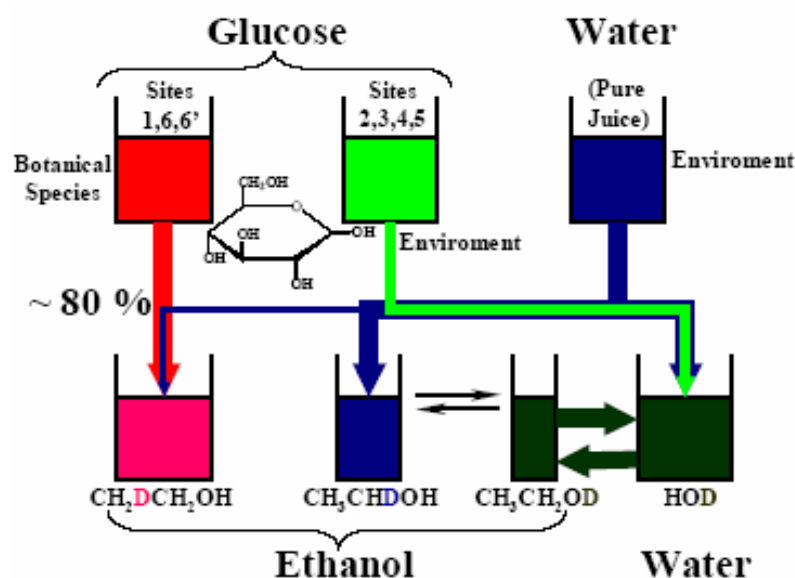
Odstupňování izotopového profilu vodíku je v kontrastu s distribucí izotopu ^{13}C , která je dost podobná, pokud jde o molární frakce pro C3 a C4 glukózu. V obou případech je obohacení ^{13}C na pozicích 3 a 4.^{11,28,36}

2.4.2.7 Fermentace sacharidů na ethanol

V chemických nebo biochemických transformacích probíhá přerozdělení izotopových poměrů podle přesných pravidel. Izotopové poměry na specifických místech produktů a reaktantů jsou na sobě závislé. Izotopový poměr $(\text{D}/\text{H})_1$ na methylové skupině ethanolu je závislý na D/H v pozicích 1, 6 a 6' glukózy a částečně na vodě. Izotopový poměr $(\text{D}/\text{H})_2$ na methylenové skupině je silně závislý na D/H vodního media viz. obr. 10.^{11,13,19,22,25,27,36,38}

Také hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ se během fermentace mění. $\delta^{13}\text{C}$ ethanolu je o cca 1 ‰ nižší než $\delta^{13}\text{C}$ u sacharidů – substrátu. Příčinou tohoto rozdílu je izotopová frakcionace spojená s tvorbou CO_2 během fermentace.^{25,27}

Navzdory složitosti metabolismu cukrů v rostlinách, který zahrnuje mnoho kroků, kdy dochází k přeskupení izotopů vodíků, každý rostlinný druh má svůj typický izotopový profil. Analýza izotopových poměrů v molekule ethanolu poskytuje kompletní kritéria pro určení autenticity cukru rozdílného původu a falšování.^{11,23}



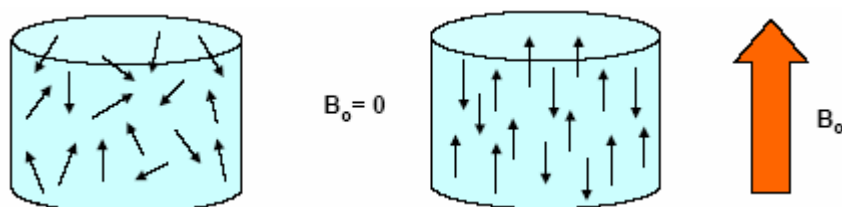
obr. 10. přerozdělení izotopů vodíku při fermentaci cukru na ethanol⁴²

2.4.3 Nukleární magnetická rezonance - SNIF NMR

Určité rozlišení jednotlivých rostlinných druhů v rámci skupin C3, C4 a CAM umožňuje analýza zastoupení deuteria na specifických místech v molekule ethanolu pomocí nukleární magnetické rezonance – ^2H SNIF NMR.^{28,33}

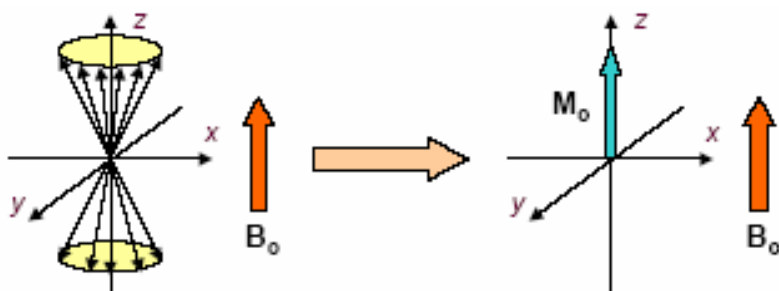
2.4.3.1 Princip NMR spektrometrie

Nukleární magnetická rezonance je založena na interakci radiofrekvenčního pulsu s jádry měřené látky umístěnými ve vnějším magnetickém poli. Využívá se jader atomů s magnetickým momentem. Magnetický moment m mají jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem I např. ^1H , ^{13}C a ^{15}N $I = \frac{1}{2}$, D $I = 1$. Spiny jsou v základním stavu neuspořádané, působením magnetického pole se orientují do určitých poloh, kterým odpovídají určité energetické hladiny. Orientují se buď v souhlasném nebo opačném směru vůči působení vnějšího magnetického pole (pro $I = \frac{1}{2}$) (viz obr.13). Mírná převaha jader je



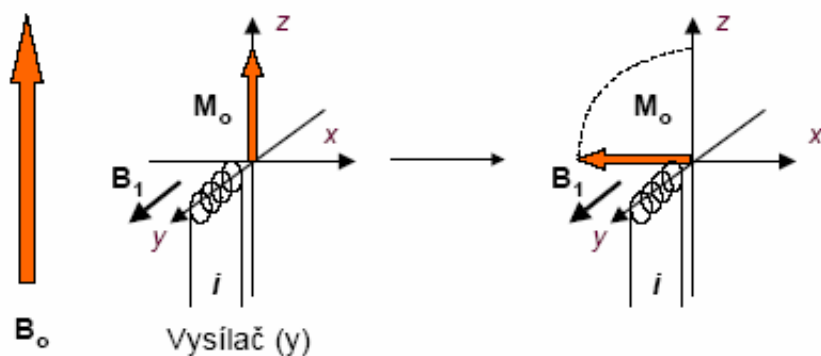
obr.13. orientace spinů bez působení magnetického pole $B_0 = 0$, orientace spinů ve vnějším magnetickém poli $B_0 > 0$ ⁴²

v souhlasném směru na nižší energetické hladině. Vzniká makroskopická magnetizace M_0 , která je přímo úměrná rozdílu populací na jednotlivých energetických hladinách (viz obr. 14). Vektor magnetického momentu vykonává precesní pohyb okolo osy z . Frekvence tohoto pohybu je identická s frekvencí RF záření potřebného k přechodu jader do vyšší energetické hladiny.



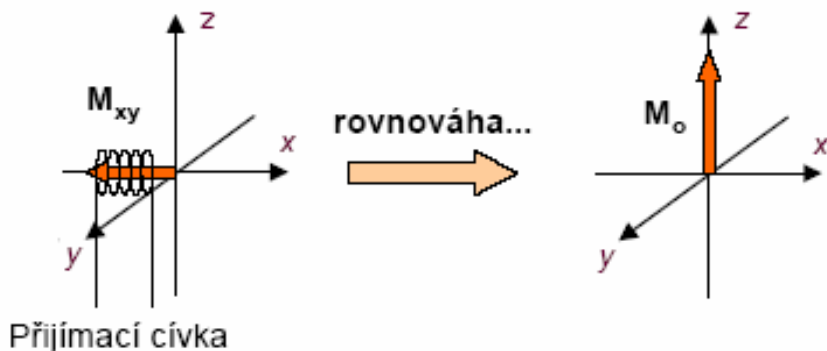
obr.14. vektor magnetického momentu může být rozložen do složek v ose z a v rovině xy , složky v rovině xy se zprůměrují a navzájem se vyruší, M_0 charakterizuje stav populací na jednotlivých energetických hladinách⁴²

Po aplikaci radiofrekvenčního pulsu kolmo na osu z dochází k vyrovnání podílů jader na jednotlivých energetických hladinách. Vektorovým součtem jejich magnetických momentů je magnetizace M_{XY} ležící na ose x tedy kolmo na magnetizaci M_0 (odtud puls 90°).



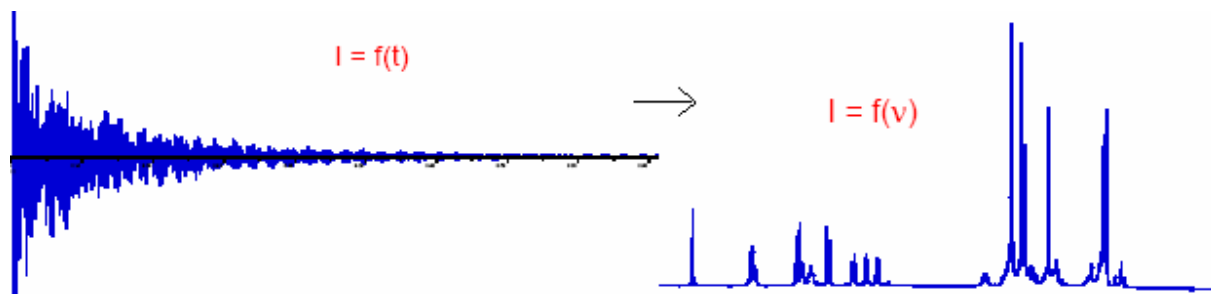
obr. 15. aplikace RF pulsu B_1 kolmo na M_0 způsobí převrácení vektoru magnetizace o 90° na osu x ⁴²

Po odeznění RF pulsu dochází k pozvolnému obnovení zastoupení jader na energetických hladinách a M_{xy} má tendenci vrátit se zpět na osu z . Tomuto obnovení rovnováhy se říká relaxace.



obr. 16. indukce napětí při návratu jader do rovnovážného stavu⁴²

V přijímací cívce se indukuje napětí a návrat jader do rovnovážného stavu se sleduje jako volné doznívání indukce (FID – free induction decay). FID má tvar exponenciálně tlumené periodické funkce představující kombinaci signálů o různé frekvenci. Zpracováním signálu ve formě FID Fourierovou transformací získáme NMR spektrum. Pulsy se po návratu jader do rovnováhy několikrát opakují, odezvy se sčítají, měření má pak vyšší citlivost.

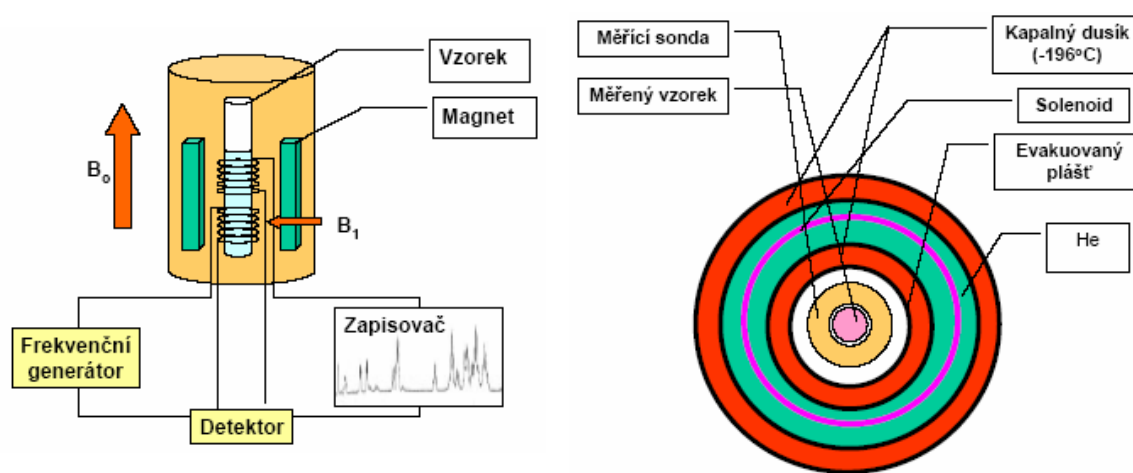


obr. 17. volné doznívání indukce FID po několikanásobné aplikaci pulsu a zpracování Fourierovou transformací na spektrum⁴²

Každému signálu ve spektru odpovídá určitá rezonanční frekvence. Na ose x se nevynáší frekvence, ale používáme relativní stupnici, tzv. chemický posun δ , kdy je pozice signálu

vztahená k pozici standardu. Rezonanční frekvence není u všech jader stejného prvku v různých molekulách či skupinách stejná, je vždy ovlivněna chemickým okolím v molekule. Proto každé skupině jader odpovídá signál s rozdílným chemickým posunem. Např. ethanol má vodíky v methylové, methylenové a hydroxylové skupině, proto má ve spektru 3 signály.^{13,40,41,42}

Měření se provádí na NMR spektrometru. Skládá se ze supravodivého elektromagnetu chlazeného kapalným heliem a dusíkem – zdroj magnetického pole, radiofrekvenčního vysílače – zdroj RF pulsů. Jako detektor slouží cívka vinutá okolo kyvety kolmo na směr magnetického pole a zároveň na osu cívky zdroje RF pulsu. Vzorek je umístěn ve skleněné kyvetě ve tvaru zkumavky o délce cca 15 cm a průměru 10 mm a rotuje uvnitř spektrometru.⁴²



obr. 18. schéma a průřez NMR spektrometrem⁴²

NMR spektrometrie se používá k identifikaci a strukturní analýze organických látek. Nejvíce se využívají ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra, poskytují informaci o složení směsi v jednom kroku. Pozice a rozdělení peaků identifikuje neznámou sloučeninu – porovnání s databází. Jelikož je intenzita signálu úměrná počtu jader, můžeme NMR spektrometrii použít i pro kvantitativní analýzu. Má široké uplatnění v analýze potravin.^{13,37,42}

2.4.3.2 Stanovení falšování džusů přídavkem cukru pomocí SNIF NMR

SNIF NMR je metoda, při které se sleduje zastoupení izotopů na specifických místech v molekule pomocí nukleární magnetické rezonance. Využívá se pro stanovení autenticity potravin. Zastoupení deuteria se nejčastěji měří v ethanolu, dále pak v kyselině octové, citrónové, glycerolu, vanilinu atd. SNIF NMR byla nejdříve využívána pro stanovení přídavku řepného cukru ve víně. Nyní je to oficiální metoda Mezinárodního úřadu pro víno (OIV) a je uznaná Evropskou unií jako oficiální metoda pro detekci falšování přídavkem řepného cukru do vína. Od té doby byla použita pro charakterizaci původu rostlin v mnoha dalších produktech, jako jsou lihoviny a vinný ocet. Nyní je aplikována pro detekci přidaného řepného cukru do džusů.^{2,13,36,40}

Pro stanovení autenticity ovocných džusů se využívá ethanol kvantitativně vyizolovaný z džusu po fermentaci cukrů. Izotopové poměry měřené NMR spektrometrem ukazují rozdělení deuteria na specifických místech v molekule ethanolu. Dávají informace o

botanickém původu mateřské rostliny, druhu biosyntézy a o geografickém původu. Ethanol po fermentaci představuje spolehlivý zdroj informací o cukru – prekursoru ethanolu a využívá se pro detekci přidaného řepného, řepného invertovaného cukru, fruktóзовého kukuřičného sirupu, třtinového cukru atd. v ovocných džusech. Deuterium obsažené v cukrech a vodě v džusech je předistribuíváno po fermentaci v molekulách $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$, CH_3CHDOH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ a HDO . Izotopový poměr $(\text{D}/\text{H})_1$ v 1. molekule je využíván pro detekci přidaného cukru. $(\text{D}/\text{H})_1$ charakterizuje rostlinný druh, který produkuje cukr pro něj specifickým druhem fotosyntézy, a v menší míře geografický původ rostliny (rozdílné izotopové složení H_2O použité během fotosyntézy).^{2,4,13,22,24,36,38,42,43}

tab. 4 hodnoty $(\text{D}/\text{H})_1$ ethanolu získaného fermentací cukrů pro džusy doporučené asociací A.I.J.N.¹⁴

DŽUS	GRAPEFRUIT	VÍNO	POMERANČ	JABLKO	ANANAS
$(\text{D}/\text{H})_1$ ethanol $^2\text{H-NMR}$ ppm	102-106	99-106	103-107	97-101	107-111,5

Metoda je založená na faktu, že hodnota $(\text{D}/\text{H})_1$ řepného (cca 92 ppm), třtinového cukru (cca 110 ppm) a cukerného sirupu z kukuřice se liší od hodnot ovoce z C3 rostlin. Přídavek třtinového a kukuřičného cukru hodnotu zvyšuje a přídavek řepného cukru hodnotu $(\text{D}/\text{H})_1$ naopak snižuje. Výjimkou je přídavek třtinového cukru do ananasového džusu (CAM), kdy se hodnota $(\text{D}/\text{H})_1$ nemění, jelikož hodnoty pro třtinu a ananas jsou velmi blízké. Mezi množstvím přidaného cukru a hodnotou $(\text{D}/\text{H})_1$ existuje výborná korelace.^{2,11,13,25,35,43}

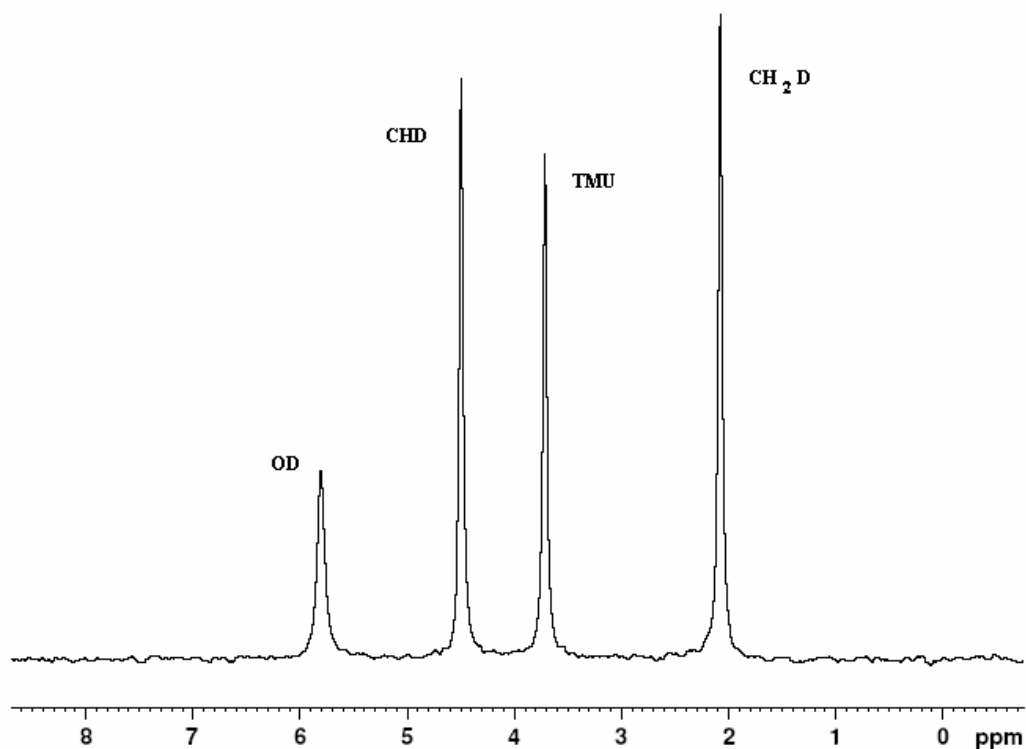
Izotopové poměry $(\text{D}/\text{H})_1$ jsou určitou měrou ovlivněny klimatickými a environmentálními faktory. Následkem toho je široké rozpětí hodnot autentických vzorků džusů a tudíž je nemožné odhalit falšování nízkým přídavkem cukru. Pro přesnější kvantifikaci přidaného cukru je dobré znát zemi původu (rozsah hodnot se zužuje) a nebo použít pro vyhodnocení kombinaci více parametrů, např. $(\text{D}/\text{H})_1$ a $\delta^{13}\text{C}$ ethanolu.^{1,13,24,27,28}

Výstupem měření ^2H SNIF NMR je spektrum ethanolu. Obsahuje 3 peaky odpovídající methylové, methylenové a hydroxylové skupině a peak tetramethylmočoviny o různých intenzitách (viz obr.19).

Hodnota $(\text{D}/\text{H})_1$ se vypočítá přímým porovnáním signálů vzorku a interního standardu tetramethylmočoviny (TMU) o známé hodnotě D/H dle vztahu:

$$(\text{D}/\text{H})_1 = 1,5866 \left(\frac{m_{\text{TMU}}}{m_{\text{vz.}}} \right) \times \frac{T_1}{t_D} \times (\text{D}/\text{H})_{\text{TMU}}$$

kde m_{TMU} je navážka standardu, $m_{\text{vz.}}$ navážka vzorku, t_D obsah alkoholu v destilátu a $T_1 = I_1/I_{\text{TMU}}$ výška signálu 1 ($\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$) ku výšce signálu TMU.^{13,22,25,43}



obr. 19. ^2H NMR spektrum ethanolu

2.4.4 Hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů – IRMS

Zastoupení lehkých izotopů (H, C, O, N) jsou měřena pomocí hmotnostního spektrometru izotopových poměrů. Ten se sestává z elementárního analyzátoru a hmotnostního spektrometru (viz příloha 1).

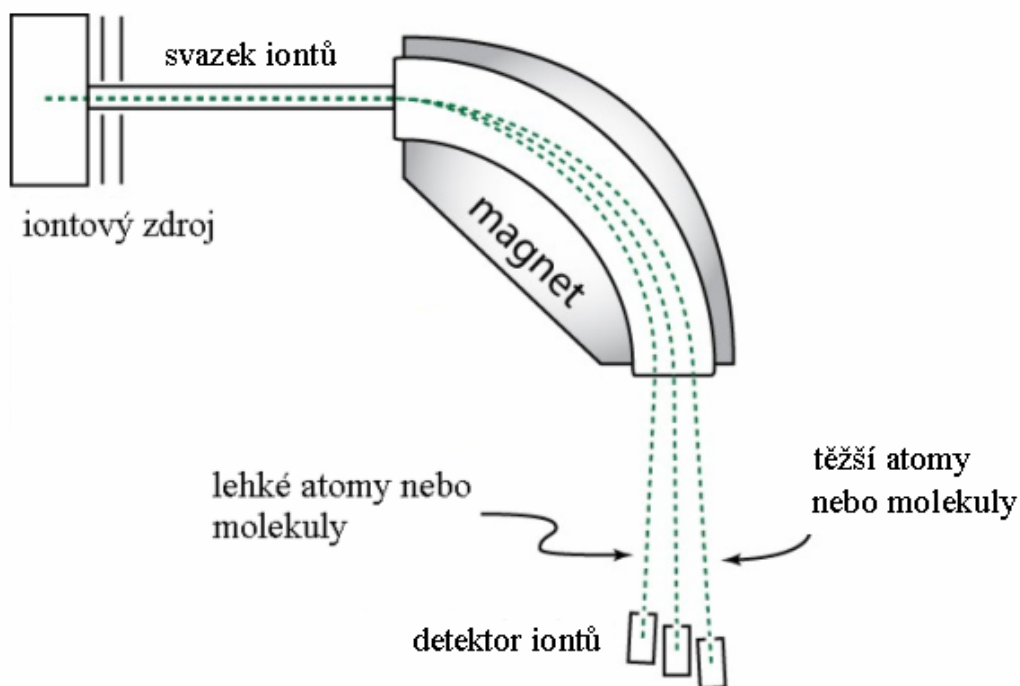
Před analýzou na hmotnostním spektrometru musíme získat prvek, který chceme analyzovat, v plynném stavu (H_2 , CO , CO_2 , N_2). Vzorek, v našem případě ethanol, prochází přes elementární analyzátor (konkrétně přes oxidační kolonu), kde je při teplotě cca $1000\text{ }^\circ\text{C}$ rozložen na CO_2 a vodu. Ta je pak odstraněna. Hmotnostní spektrometr může analyzovat pouze ionty, proto je plyn při vstupu do hmotnostního spektrometru ionizován proudem elektronů v iontovém zdroji. Ionty putují do letové trubice pod vakuem, magnetem jsou vychýleny z dráhy pod úhlem, který je funkcí jejich molekulových hmotností. Na detektor umístěný na konci letové trubice dopadají molekuly CO_2 s různým izotopovým složením (viz. obr. 11):

$$^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{16}\text{O} \sim 44$$

$$^{16}\text{O}^{13}\text{C}^{16}\text{O} \sim 45$$

$$^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{18}\text{O} \sim 46$$

Z poměru molekul 45/44 se vypočítá poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a získaná data jsou porovnávána s referenčním plynem o známém poměru izotopů uhlíku.^{13,17,24,25,33,35,37}



obr. 11. Schéma hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometr obsahuje zdroj pro ionizaci plynu, letovou trubici s magnetem pro stočení dráhy ionizovaného plynu a detektor na konci letové trubice k měření molekul s rozdílným izotopovým složením.¹⁷

Obsah izotopu ^{13}C je velmi specifický znak pro rozlišení organických produktů pocházejících z C3 a C4 rostlin, jelikož je závislý na typu fotosyntézy, kterou rostlina používá (viz. tab. 2). Tohoto faktu lze využít pro odhalení přídavku třtinového cukru nebo kukuřičného sirupu či jiných komponent z rostlin používajících C4 metabolismus do pomerančových, grapefruitových, hroznových a jablečných džusů (C3 rostliny). Podobně je to s přídavkem řepného cukru nebo jiného produktu z C3 rostlin do ananasového džusu (CAM rostlina).^{1,13,22,27,30,33,35,37,40}

tab. 2. zastoupení izotopů uhlíku v rostlinách C3, C4 a CAM²⁹

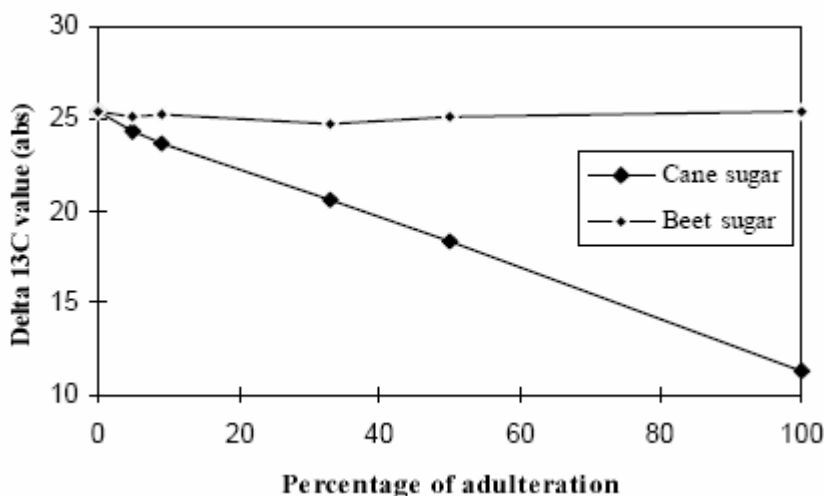
FOTOSYNTÉZA	ROSTLINA	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]
C3	citrusy, jablka, hroznové víno, řepa cukrovka, pšenice, rýže, oves, ječmen, žito, brambory, sojové boby...	-32 až -24
C4	kukuřice, cukrová třtina, proso	-16 až -10
CAM	ananas, agáve	-30 až -12

Pro stanovení autenticity džusů se využívá jak cukr, tak i ethanol získaný fermentací cukrů. Výhodnější je využití ethanolu jako zdroje informací o původu cukrů, jelikož jeho izolace a analýza je méně náročná než u cukrů a využije se i pro SNIF NMR.

tab. 3. hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ pro džusy doporučené asociací A.I.J.N., pro cukr a ethanol získaný fermentací cukru¹⁴

DŽUS	GRAPEFRUIT	VÍNO	POMERANČ	JABLKO	ANANAS
$\delta^{13}\text{C}$ cukr ‰	-28 - -25	-28 - -23	-27 - -24	-27 - -24	-13,5 - -11
$\delta^{13}\text{C}$ ethanol ‰	-29 - -26	-29 - -24	-28 - -25	-28 - -25	-15 - -12

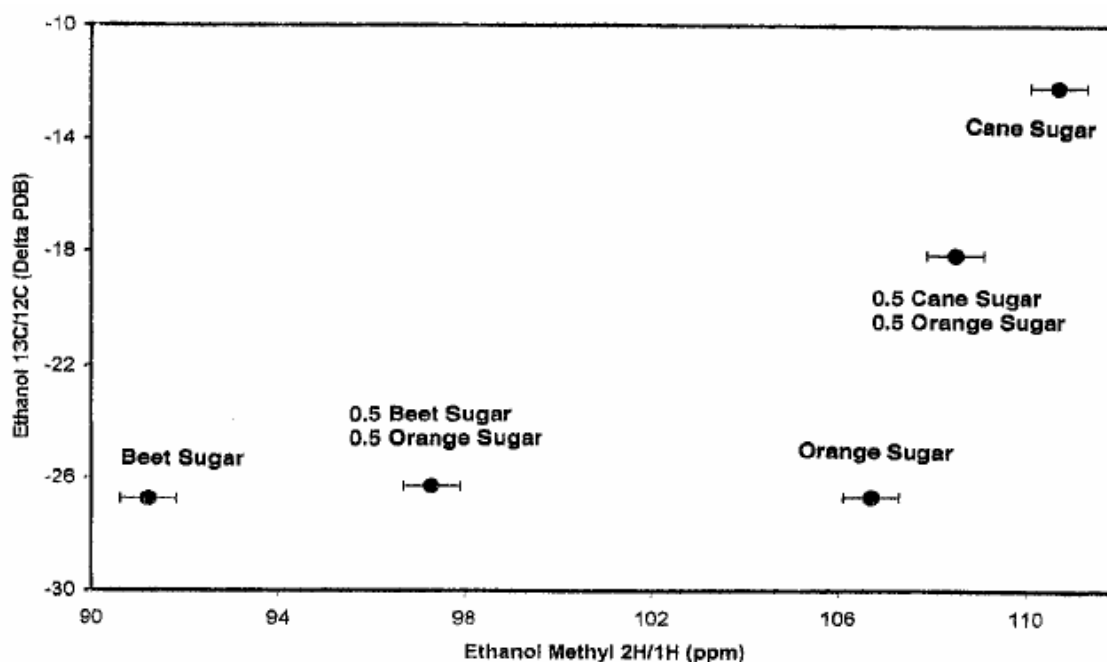
Přídavek řepného cukru do šťáv z citrusů, jablek, hroznového vína nelze odhalit, jelikož pocházejí z rostlin se stejným metabolismem C3 a jejich obsah ^{13}C je podobný (viz obr. 12). Stejně tak je nemožné odhalit přídavek třtinového cukru do ananasového džusu. Ananas sice využívá jiný metabolismus než třtina, ale hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ananasu se blíží k hodnotám třtiny. Tato metoda je tedy použitelná pouze pro odlišení cukrů z C3 a C4 rostlin.^{2,13,24,30,33-35}



obr. 12. absolutní hodnota $\delta^{13}\text{C}$ ethanolu z pomerančového džusu s přídavky řepného – beet a třtinového – cane cukru³³

2.4.5 Kombinace SNIF NMR a IRMS

Kombinací SNIF NMR a IRMS je možné lépe detekovat přídavek cukrů odvozených z C4 rostlin (kukuřice a cukrová třtina) (viz. obr.20) a zároveň zlepšit kvantifikaci přídavku cukru jakéhokoliv původu (řepa, třtina, kukuřice). $\delta^{13}\text{C}$ se stanovuje v ethanolu, příprava vzorku až po izolaci ethanolu je společná se SNIF NMR.^{2,13,22,27,35,36}

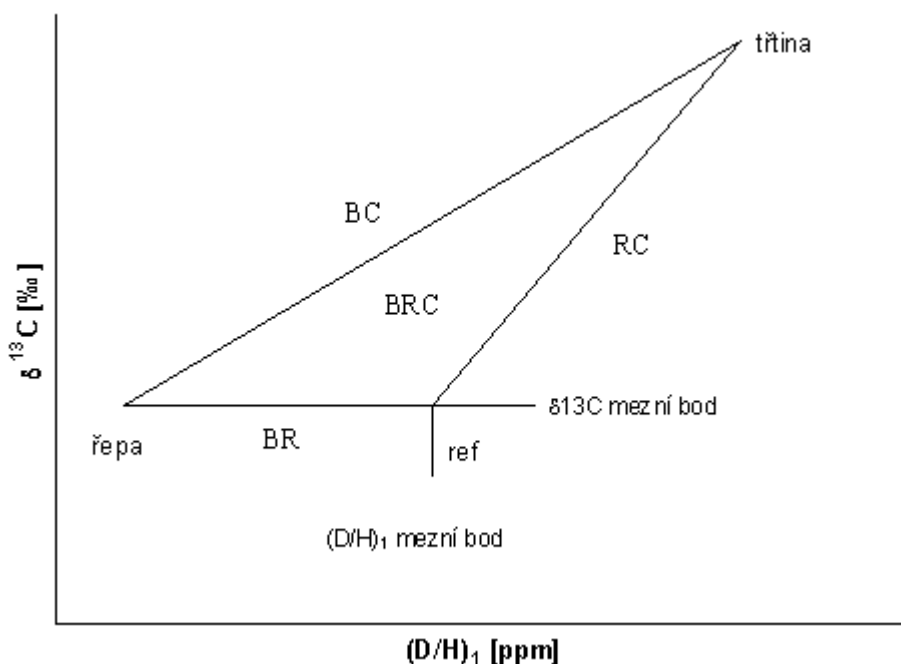


obr. 20. analýza ethanolů z řepného cukru, pomerančového džusu s přidavkem 50 % řepného cukru, 100 % pomerančového džusu, pomerančového džusu s přidavkem 50 % třtinového cukru, třtinového cukru. Hodnoty $(D/H)_1$ džusů s přidavkem cukrů leží zhruba v polovině mezi hodnotami čistých cukrů.²⁸

2.4.5.1 Interpretace výsledků

Na základě změřených hodnot $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$ lze kvantitativně určit množství přidaného řepného a/nebo třtinového cukru. Jelikož ethanol z třtiny a z ananasu má přibližně stejné hodnoty $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$, je tato kalkulace použitelná pouze pro falšování džusů z C3 rostlin.

Na obr.21. je grafické znázornění interpretace dat pomocí trojúhelníku falšování. Na ose x grafu se vynášejí hodnoty $(D/H)_1$ a na ose y $\delta^{13}C$ ethanolu. Vrcholy trojúhelníku odpovídají izotopovým parametrům autentických alkoholů ze třtinového cukru, řepného cukru a autentického vzorku. Každý vzorek je reprezentován hodnotami $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$ ethanolu a případné falšování může být detekováno pozicí vzorku v grafu. Nefalšovaný produkt leží v zóně REF. Pokud je k autentickému vzorku přidán řepný, třtinový nebo směr obou cukrů, spadají do oblastí BR, RC nebo BRC. Pokud leží vzorek v oblasti BC, jedná se pravděpodobně o produkt jiného původu než je dané ovoce^{13,24,27,35}



obr. 21. BC zóna – směs řepného a třtinového cukru, BR zóna – autentický vzorek s řepným cukrem, RC zóna - autentický vzorek s třtinovým cukrem, BCR zóna uvnitř trojúhelníku - autentický vzorek s řepným a třtinovým cukrem, REF zóna – autentické vzorky^{13,24,27,35}

Pokud leží vzorek v zóně BR, minimální množství přidaného řepného cukru se vypočte dle:

$$\text{řepa}_{\min} = 100 \times \frac{\left(\frac{D}{H}\right)_1^{VZ} - \left(\frac{D}{H}\right)_1^{MB}}{\left(\frac{D}{H}\right)_1^{\text{řepa}} - \left(\frac{D}{H}\right)_1^{MB}} \quad [\%]$$

Pokud leží vzorek v oblasti RC minimální množství přidaného třtinového cukru se vypočte dle:

$$\text{třtina}_{\min} = 100 \times \frac{\delta^{13}C^{VZ} - \delta^{13}C^{MB}}{\delta^{13}C^{\text{třtina}} - \delta^{13}C^{MB}} \quad [\%]$$

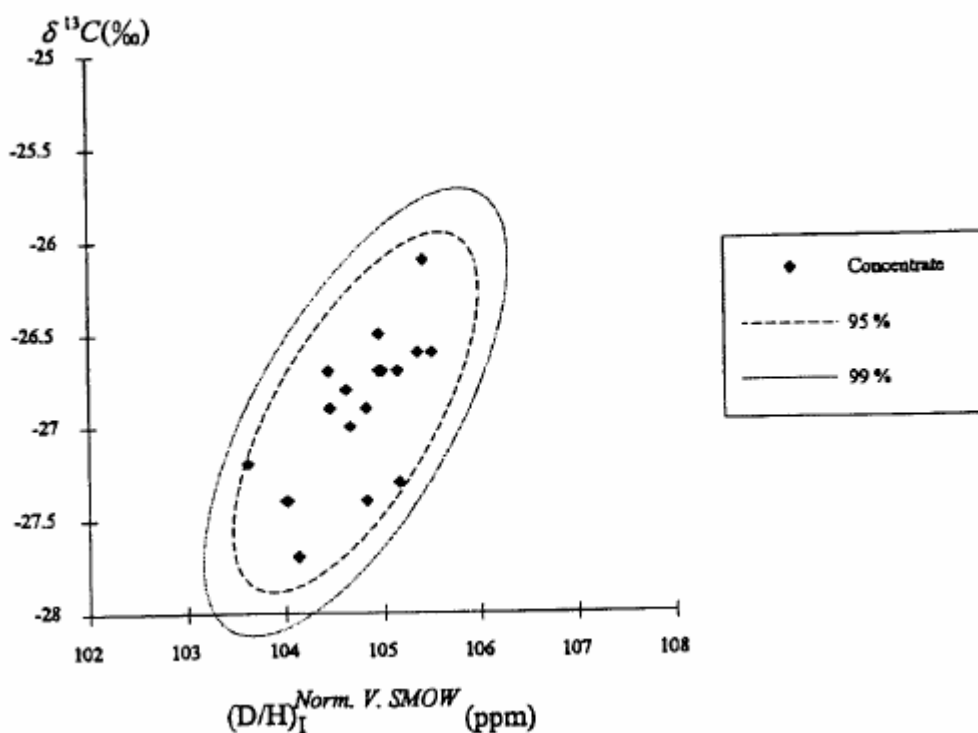
kde index MB je mezní bod pro dané ovoce a VZ vzorek. Mezní bod $\delta^{13}C$ je maximální hodnota $\delta^{13}C$ u autentických vzorků. Mezní bod $(D/H)_1$ je minimální hodnota $(D/H)_1$ autentických vzorků. Pokud vzorek leží v zóně BRC, je falšován přidávkem třtinového i řepného cukru. Jeho množství se vypočítá dle:^{13,27,43}

$$\text{přídavek cukru}_{\min} = \text{třtina}'_{\min} + \text{řepa}'_{\min}$$

$$\text{řepa}'_{\min} = 100 \times \frac{\left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{VZ}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řtina}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}}) - \left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řtina}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{VZ}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}})}{\left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řepa}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řtina}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}}) - \left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řtina}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řepa}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}})}$$

$$\text{řtina}'_{\min} = 100 \times \frac{\left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řepa}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{VZ}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}}) - \left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{VZ}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řepa}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}})}{\left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řepa}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řtina}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}}) - \left[\left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{řtina}} - \left(\frac{D}{H} \right)_1^{\text{MB}} \right] \times (\delta^{13}\text{C}^{\text{řepa}} - \delta^{13}\text{C}^{\text{MB}})}$$

V grafu na obr. 22 je zobrazena korelace mezi $(D/H)_1$ a $\delta^{13}\text{C}$ u autentických vzorků pomerančových džusů. Pokud leží neznámý vzorek pomerančové šťávy mimo ohraničenou oblast, nejedná se o autentický vzorek.



obr. 22. autentické vzorky pomerančových džusů, korelace mezi $(D/H)_1$ a $\delta^{13}\text{C}$ ²⁷

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Stanovení poměru stabilních izotopů vodíku D/H na methylové skupině ethanolu pomocí nukleární magnetické rezonance (SNIF-NMR) - stanovení botanického původu cukrů ovocných šťáv

Ethanol vzniklý primární fermentací je ze zfermentované ovocné šťávy izolován destilací. Zastoupení deuteria na methylové skupině vyizolovaného ethanolu je stanoveno pomocí deuteriové nukleární magnetické rezonance (^2H SNIF-NMR). NMR analýzou ethanolu získaného z příslušného vzorku a obsahujícího známá množství lockovacího roztoku a izotopového standardu TMU získáme ^2H NMR spektrum s odezvami pro methylovou, methylenovou a hydroxylovou skupinu ethanolu a pro methylovou skupinu TMU. Odezvy reprezentují relativní hodnoty zastoupení deuteria na konkrétních skupinách. Ze známé hodnoty obsahu deuteria ve standardu TMU pak lze určit přesnou hodnotu obsahu deuteria na methylové skupině ethanolu, vyjádřené jako poměr D/H v jednotkách ppm.

3.1.1 Vybavení a chemikálie

3.1.1.1 Přístroje a pomůcky

- odšťavňovač ZELMER
- digitální refraktometr DR 301-95 (Kruss)
- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*
- ACCU-CHEK Active - měření zbytkového cukru (Roche)
- centrifuga 5810 (Eppendorf)
- destilační přístroj Gibertini
- densitometr DMA 5000 (Anton Paar)
- destilační aparatura - Cadiotovy kolony: chladič, teplotní čidlo v parafínu, spirála + motor, ventil, topné hnízdo (Eurofins)
- Karl-Fischer titrátor DL31 (Mettler Toledo)
- digitální váhy Classic Plus s přesností 0,01 g (Mettler Toledo)
- digitální váhy Excellence s přesností 0,0001 g (Mettler Toledo)
- digitální váhy Excellence Plus s přesností 0,0001 g (Mettler Toledo)
- NMR spektrometr, 400 MHz Ultrashield Plus + příslušenství (Bruker)
- kompresor pro přívod stlačeného vzduchu
- Erlenmeyerovy baňky PP 1000 ml a 2000 ml se zátkou a špičkou naplněnou vatou
- odměrné baňky 100 ml
- stříkačky
- destilační baňky 500 ml
- Erlenmeyerovy baňky 100 ml
- skleněné lahvičky 15 ml s uzávěrem
- mikrofiltry
- mikropipety + špičky

- NMR kyvety 10 mm
- NMR spinnery

3.1.1.2 Software

- aplikace EURODAT (Eurofins)
- aplikace EUROFERM (Eurofins)
- aplikace EURODENS (Eurofins)
- aplikace ADCS – Automated Distillation Control System (Eurofins)
- aplikace LabX (Mettler Toledo)
- aplikace PREPSAMP (Eurofins)
- aplikace EUROSPEC (Eurofins)
- aplikace EURODIAG (Eurofins)

3.1.1.3 Chemikálie

- hydroxid sodný o koncentraci $c = 9 \text{ mol/l}$
- ethanol technický (pro čištění měřicí cely)
- aceton technický (pro čištění měřicí cely)
- čerstvá demineralizovaná voda, zbavená plynů
- 10% ethanol - zásobní roztok
- HYDRANAL Solvent E
- HYDRANAL Titrant 5 E
- lockovací roztok: 10 ml hexafluorbenzen + 1 ml trifluoroctová kyselina

3.1.1.4 Referenční materiály

- CRM/BCR-656, ethanol
- CRM/BCR-660, směs voda-ethanol („syntetické víno“)
- CRM/BCR-123A, ethanol H (třtina), 10mm NMR kyveta
- CRM/BCR-123A, ethanol M (víno), 10mm NMR kyveta
- CRM/BCR-123A, ethanol L (řepa), 10mm NMR kyveta
- CRM/STA-003, tetramethylmočovina (TMU)
- Ultra Pure Water, standard pro hustotu
- HYDRANAL Water Standard 10.0 pro Karl Fischer titraci

3.1.2 Příprava vzorku

Cílem přípravy vzorku je získání ethanolu kontrolovanou fermentací ovocných šťáv. Ten je pak analyzován na NMR spektrometru s deuteriovou sondou a lockováním na fluor.

3.1.2.1 Evidence vzorku

Před započítáním vlastního procesu přípravy vzorku jsou veškeré dostupné informace o vzorku zaneseny do systému EURODAT. Ten pro vzorek vygeneruje unikátní číslo, které vzorek doprovází po celou dobu přípravy vzorku, analýzy a závěrečného vyhodnocení. Systém řídí krok po kroku zpracování vzorku a shromažďuje výsledky z jednotlivých kroků před finální analýzou na NMR spektrometru.

3.1.2.2 Fermentace

Princip: Alkoholová fermentace je anaerobní proces, kdy dochází k přeměně sacharidů na ethanol prostřednictvím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Proces probíhá při laboratorní teplotě řádově několik dnů. Konec fermentace je indikován množstvím zbytkového cukru ve vzorku. Vliv na výsledné izotopové poměry má teplota, délka fermentace a rychlost konverze cukru na ethanol. Vliv těchto faktorů je větší u CH_3CHDOH než u $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$.²² Proto je vhodné dodržovat stálé podmínky fermentace. Výtěžek fermentace ρ_F se vypočítá dle:

$$\rho_F = \frac{t_Q \times 1543,2}{C}$$

kde 1,5432 je molární koeficient transformace glukózy na ethanol, obsah cukru v džusu před fermentací C [g/l], obsah alkoholu v produktu t_Q [% obj.].²²

Postup: Šťáva je získána na odšťavňovači z cca 1,5 kg ovoce zbaveného obalových vrstev (vyjma jablek a hroznového vína). Pomocí digitálního refraktometru je změřen celkový obsah cukrů v ovocné šťávě (°Brix). Z naměřené hodnoty obsahu cukru je aplikací EUROFERM vypočítán teoretický obsah alkoholu ve vzorku po fermentaci (cca 6% obj.). 600 ml ovocné šťávy je zváženo v Erlenmeyerově baňce, ke šťávě je přidáno cca 3 g kvasnic. Všechny hmotnosti se zaznamenávají v systému EUROFERM. Baňka se šťávou se nechá stát za laboratorní teploty. Každý následující den je zaznamenáván obsah zbytkového cukru ve fermentujícím vzorku pomocí přístroje Accu-Chek. Fermentace je považována za ukončenou, když koncentrace zbytkového cukru klesne pod 0,4 g/l. Fermentační baňka je zvážena pro kontrolu hmotnostních ztrát během fermentace. Veškerá data jsou exportována do systému EURODAT. Zbytky kvasnic a dužina jsou ze vzorku odstraněny centrifugací (4000 ot./min po dobu 5 min).

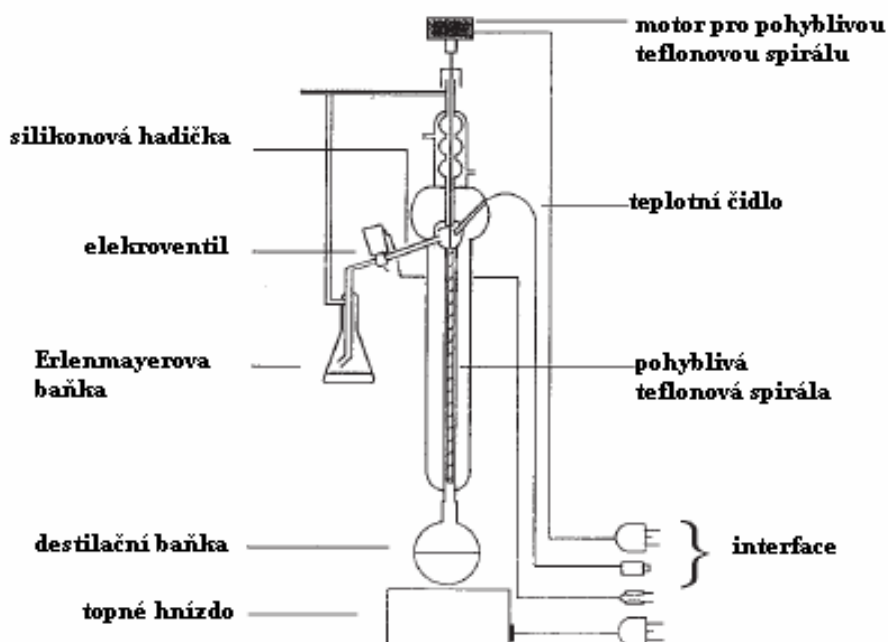
3.1.2.3 Stanovení alkoholu ve zfermentovaném džusu - t_Q

Princip: Ethanol ze zfermentované ovocné šťávy je kvantitativně destilován. Poté je stanovena hustota destilátu a jí odpovídající obsah alkoholu v obj. % v původním vzorku (t_Q).

Postup: 100 ml vzorku s přidavkem roztoku NaOH je destilováno do odměrné baňky. Destilát je doplněn vodou po rysku a po homogenizaci je změřena jeho hustota densitometrem při 20°C. Výsledná hodnota [g/ml] je densitometrem automaticky přeočtena na koncentraci ethanolu t_Q [% obj.] v původním (zfermentovaném) vzorku. Tato hodnota je uložena v aplikaci EURODENS a je použita při výpočtu výtěžku destilace na Cadiotových kolonách.

3.1.2.4 Destilace na Cadiotových kolonách – izolace ethanolu

Princip: Ethanol ze zfermentované ovocné šťávy je kvantitativně destilován na Cadiotových kolonách (viz. příloha 2). Systém je řízen pomocí aplikace ADCS (Automated Distillation Control System), která reguluje jímání destilátu tak, aby byl získán co nejvyšší podíl ethanolu ze vzorku a nedošlo ke frakcionaci izotopů.



obr.23. Cadiotova kolona^{35,43}

Výtěžek destilace ρ_D se vypočítá dle:

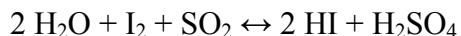
$$\rho_D = \frac{m_D \times t_D \times V}{m_{VZ}^2 \times t_Q}$$

kde V je objem zfermentovaného džusu v destilační baňce, m_D hmotnost destilátu, obsah alkoholu v destilátu t_D [% hm.], m_{VZ} hmotnost zfermentovaného džusu v destilační baňce.

Postup: Do destilační baňky je odměřeno 400 ml džusu po fermentaci. Ta je upevněna na Cadiotovu kolonu spolu se zváženou Erlenmayerovou baňkou. Destilační baňka je zahřívána, v momentě, kdy destilát dosáhne teplotního čidla (teplota cca 60°C), začne rotovat spirála a zaznamenává se průběh destilace (destilační křivka). Průběh destilace je kontrolován systémem ADCS, ten při teplotě cca 78°C spouští jímání destilátu. Jakmile začne teplota destilátu stoupat, znamená to, v předloze už není ethanol, systém uzavře ventil a po čase destilaci ukončí. Všechny hmotnosti jsou zaznamenány a jsou podkladem pro výpočet výtěžnosti destilace. Destilace proběhla správně pokud je váha destilátu větší než 10 g, ztráty během destilace jsou menší než 1,3 g, t_D je vyšší než 85 %, destilační křivka má charakteristický tvar a výtěžek destilace je vyšší než 90 %.

3.1.2.5 Stanovení obsahu ethanolu v destilátu - t_D

Princip: Obsah ethanolu v destilátu se stanoví nepřímo stanovením obsahu zbytkové vody v destilátu Karl-Fischer titrací. Obsah ethanolu je dopočítán do 100%. Voda reaguje s jódem podle následující reakce:



Reakce probíhá v prostředí solventu obsahujícího bezvodý ethanol a také imidazol, který reaguje se vznikající H_2SO_4 a tím posouvá rovnováhu reakce doprava. Bod ekvivalence je indikován voltametriky měřením napětí na dvouhroté platinové elektrodě.

Získaná hodnota obsahu alkoholu v destilátu (t_D) slouží jednak ke kontrole účinnosti destilace na Cadiotových kolonách a jednak k výpočtu přesného množství ethanolu při přípravě vzorku pro NMR analýzu.

Postup: Do titrační nádoby se nadávkuje cca 40 ml solventu. V něm se jako první krok provádí tzv. pretitrace - titrace vody přítomné v solventu. Poté je stanoven tzv. drift, tedy průnik vody do celého systému titrátoru za jednotku času. Tato hodnota vynásobená délkou stanovení je pak odečtena od stanoveného množství vody ve vzorku.

Množství vzorku dávkovaného do titrační baňky je zváženo na digitálních vahách s přesností 0,0001 g. Titrátor (viz. příloha 3) řízený aplikací LabX automaticky provede titraci a vyhodnotí množství vody ve vzorku destilátu (t_W) v hmotnostních procentech. Obsah ethanolu v destilátu (t_D) je dopočten do 100% podle vzorce:

$$t_D [\% \text{ hm.}] = 100 - t_W$$

3.1.2.6 Příprava vzorku pro NMR analýzu

Princip: Pro měření na NMR spektrometru se připraví roztok složený z destilátu (ethanol), vnitřního standardu (tetramethylmočovina - TMU) a lockovacího roztoku pro zajištění stability magnetického pole v průběhu NMR měření. Proces přípravy vzorku pro NMR analýzu je řízen aplikací PREPSAMP.

Postup: Do zvážené 15 ml lahvičky je postupně pipetováno 1,3 ml TMU, 3,2 ml vzorku ethanolu a 0,15 ml lockovacího roztoku. Hmotnost každé jednotlivé navážky je ukládána v aplikaci PREPSAMP. Hotový roztok je po promíchání převeden do NMR kyvety (viz. příloha 4) pomocí stříkačky a mikrofiltru. NMR kyveta je pak těsně uzavřena a zvážena a je tak připravena pro NMR analýzu. Data jsou exportována do systému EURODAT a jsou použita pro výpočet D/H v aplikaci EUROSPEC. Po měření je kontrolován úbytek hmotnosti NMR kyvety se vzorkem.

3.1.3 NMR analýza

3.1.3.1 Spektrometr, experimentální podmínky

Těsně uzavřená NMR kyveta upevněná v NMR spinneru je umístěna do autosampleru do vybrané pozice. Analyzované vzorky jsou měřeny v sériích, kde jako první i poslední vzorek

jsou měřeny standardy CRM-123A. Počet vzorků analyzovaných mezi standardy je dle aktuální potřeby, maximálně však 6. Nastavená sekvence vzorků v autosampleru je zapsána do aplikace Topspin, pomocí které se spouští vlastní měření.

Na NMR spektrometru (viz. příloha 5) jsou změřena deuteriová spektra (s protonovým dekaplingem) připravených vzorků. Locková stabilizace pole se provádí na fluor. Pro jeden vzorek se měří 10 spekter, počet scanů v rámci jednoho spektra je 200. Spektra jsou měřena za stabilní teploty 302 K.

Po ukončení procesu měření je NMR kyveta zvážena a její hmotnost je porovnána s hmotností před NMR analýzou (aplikace PREPSAMP).

3.1.3.2 Výpočet $(D/H)_1$

Z výšek signálů methyly z TMU a methyly z ethanolu v 2H NMR spektru a z hmotností destilátu a TMU použitých pro přípravu vzorku se vypočítá zastoupení deuteria na methylové skupině ethanolu. Parametr $(D/H)_1$ je automaticky vypočítán pomocí aplikace EUROSPEC. Zároveň je stanovena směrodatná odchylka pro sadu deseti měření u každého vzorku (viz. příloha 6).

3.1.3.3 Validace dat

Ve spektru zpracovaném bez exponenciální multiplikace ($LB = 0$) nesmí být pološířky signálů methyly z TMU a methyly a methyleny z ethanolu větší než 0,5 Hz.

Ve spektru zpracovaném s exponenciální multiplikací ($LB = 2$) musí být poměr signál/šum minimálně 150 pro methylový signál z ethanolu.

Směrodatná odchylka pro $(D/H)_1$ při deseti měřeních nesmí přesáhnout 0,55 ppm pro standardy i vzorky.

Hodnoty standardů změřených na začátku a na konci sekvence se nesmí lišit od certifikované hodnoty více jak o 0,43 ppm.

Rozdíl mezi hmotnostmi kyvety před a po NMR měření nemá přesáhnout 5 mg.

Na základě opakované analýzy absolutního a 10 % ethanolu v kontrolních vzorcích (stejný pracovní postup jako džusy) jsou vypočteny směrodatné odchylky pro hodnotu $(D/H)_1$. Po vynásobení koeficientem rozšíření ($k = 2$ pro hladinu pravděpodobnosti 95%) získáme rozšířenou nejistotu pro $(D/H)_1$ (podrobně viz. kap. 4.5.).

3.1.4 Interpretace dat – stanovení přídatku cukru

Stanovené hodnoty $(D/H)_1$ analyzovaného vzorku (uložené v centrálním systému EURODAT) se exportují do aplikace EURODIAG, která obsahuje referenční databáze vzorků charakterizující přirozené hodnoty pro jednotlivé komodity a současně vyhodnocuje složení vzorku nebo příslušnost vzorku k dané komoditě.

V prostředí EURODIAGu získáme grafické zobrazení polohy vzorku vzhledem k porovnávané komoditě - 1D zobrazení s osami $x, y = (D/H)_1$. Jestliže stanovené výsledky opustí rozsah přirozené variace hodnot pro ethanol z vybrané komodity nad rámec rozšířené nejistoty metody, je tímto prokázána přítomnost ethanolu jiného botanického původu. Pokud naměřené hodnoty $(D/H)_1$ analyzovaného vzorku zároveň nespádají ani do rozmezí doporučených hodnot vydaných asociací AIJN, je vzorek vyhodnocen jako nevyhovující.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Analýza autentických vzorků džusů - databáze

Bylo analyzováno 50 šťáv z ovoce dostupného na trhu v ČR různého geografického původu (pomeranč, jablko, grapefruit, ananas vždy po 10 vzorcích) a šťávy z hroznového vína z různých vinařských oblastí v ČR. Šťávy byly získány lisováním ovoce. Naměřená data jsou uvedena v tab. 5. Na obr. 24 jsou pak do grafu vyneseny hodnoty $(D/H)_1$ pro všechny vzorky.

tab. 5. experimentálně zjištěné hodnoty $(D/H)_1$ a hodnoty refraktometrické sušiny pro jednotlivé typy ovoce včetně porovnání s hodnotami doporučenými asociací A.I.J.N., červeně označené hodnoty ref. sušiny neodpovídají požadavkům A.I.J.N.

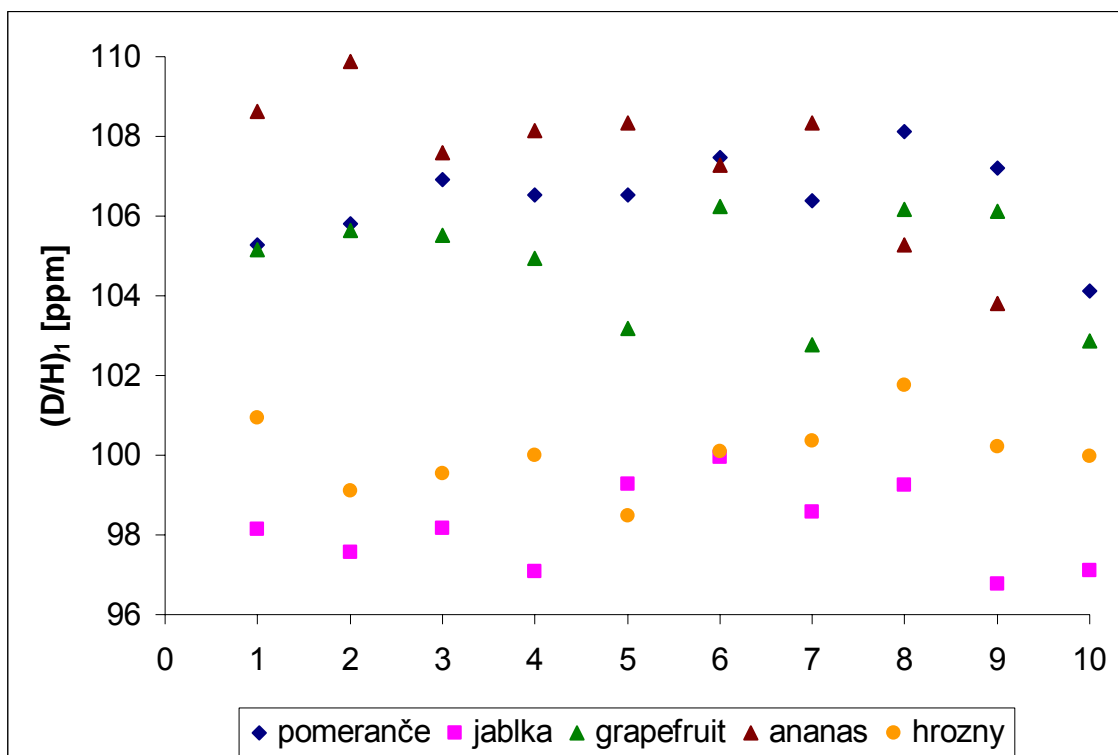
VZOREK	ref.suš.	$(D/H)_1$ [ppm]	
	[°Brix]	exp.	
pomeranče, Řecko , 13.5.2008	10,1	105,27	AIIN
pomeranče, Španelsko , 19.5.2008	11,7	105,80	
pomeranče Olindas, Španelsko , 28.5.2008	9,7	106,92	
pomeranče, Španelsko , 13.6.2008	9,3	106,52	
pomeranče Valencia-late, Španelsko , 16.6.2008	10,8	106,52	
pomeranče, Maroko , 7.7.2008	10,6	107,48	
pomeranče Valencia, J. Afrika , 21.8.2008	9,9	106,39	
pomeranče Navel, J. Afrika , 25.8.2008	10,6	108,12	
pomeranče Navelate, J. Afrika , 16.9.2008	11,5	107,21	
pomeranče Valencia, Argentina , 6.10.2008	10	104,11	
	min	104,11	103
	max	108,12	107

jablka Golden delicious, Rakousko , 13.5.2008	12,6	98,14	AIIN
jablka Idaret, ČR , 13.5.2008	12,7	97,57	
jablka Braeburn, Itálie , 14.5.2008	11,5	98,16	
jablka Jonagold, Belgie , 14.5.2008	11,7	97,08	
jablka Fuji, Čína , 19.5.2008	11,1	99,28	
jablka Jonagored, Francie , 2.6.2008	11,6	99,96	
jablka Gala, Rakousko , 16.6.2008	12,6	98,59	
jablka ROYAL GALLA , Itálie , 26.8.2008	12,4	99,25	
jablka Šampion, ČR , 16.9.2008	12,1	96,78	
jablka směs odrůd, ČR , 5.10.2008	11,9	97,11	
	min	96,78	97
	max	99,96	101

VZOREK	ref.suš.	(D/H) ₁	ppm
	[°Brix]	exp.	
grapefruit bílý, Turecko , 28.5.2008	9,4	105,16	AJIN
grapefruit růžový, Turecko , 2.6.2008	11,7	105,65	
grapefruit růžový, JAR , 13.6.2008	10,9	105,52	
grapefruit bílý, Izrael , 13.6.2008	7,5	104,95	
grapefruit červený STAR RUBY, JAR , 25.8.2008	7,7	103,17	
grapefruit bílý, JAR , 28.8.2008	8,5	106,24	
grapefruit růžový, Argentina , 28.8.2008	8,5	102,77	
grapefruit červený, JAR , 19.9.2008	11,1	106,17	
grapefruit bílý WHITE MARCH, Izrael , 3.11.2008	9,1	106,12	
grapefruit Sunrise, Izrael , 28.11.2008	10,7	102,86	
	min	102,77	102
	max	106,24	106

ananas, Kostarika , 7.7.2008	14,4	108,63	AJIN
ananas, Honduras , 25.8.2008	12,7	109,87	
ananas malý, Pobřeží slonoviny , 26.8.2008	11,4	107,60	
ananas velký, Ghana , 16.9.2008	13,1	108,15	
ananas velký, Pobřeží slonoviny , 18.9.2008	12,8	108,33	
ananas malý, Panama , 6.10.2008	9,6	107,28	
ananas malý, Ecuador , 6.10.2008	11,1	108,34	
ananas velký, Panama , 29.10.2008	13,5	105,27	
ananas velký, Kostarika , 28.11.2008	12,2	103,81	
ananas velký, Brazílie , 13.12.2008	10,5	111,13	
	min	103,81	107
	max	111,13	111,5

Sylvánské zelené	16,4	100,93	AJIN
Irsai Oliver	14,3	99,10	
Vetlínské červené ranné	17,7	99,55	
Tramín červený	20,5	100,01	
Müller Thurgau	19,7	98,49	
Ryzlink rýnský	17,4	100,09	
Rulandské modré	19,1	100,36	
Rulandské šedé	23,7	101,76	
Irsai Oliver	13,8	100,21	
Müller Thurgau	18,3	99,97	
	min	98,49	99
	max	101,76	106



obr. 24. grafické znázornění hodnot $(D/H)_1$ autentických vzorků džusů

Analyzované šťávy byly z ovoce různého stupně zralosti – různý obsah refraktometrické sušiny – cukru [°Brix]. Minimální hodnoty pro džusy doporučené asociací A.I.J.N. jsou pro pomaranče a jablka 11,2 °Brix, pro grapefruity 10 °Brix, pro ananas 12,8 °Brix, pro hroznové víno 15,8 °Brix. Část čerstvě vylisovaných džusů tento požadavek nesplňuje (označené červeně), ale vliv na hodnoty $(D/H)_1$ to nemá.

Naměřené hodnoty leží až na některé výjimky v rozmezí hodnot poručených asociací A.I.J.N. Výraznější odchylky vykazují 2 vzorky ananasových šťáv (označené červeně), ale např. v práci Martina, G.G a kol. je uvedeno rozpětí hodnot 104,7 – 112,6 ppm (měřeno 12 vzorků autentických ananasových džusů).²⁷

Jak je patrné z grafu na obr.24, vznikají zde 2 oblasti dat. V jedné oblasti 96,87 – 101,76 ppm leží částečně se překrývající hodnoty pro jablka a hrozny. Ve druhé oblasti 102,77 - 111,13 ppm leží hodnoty pro pomaranče, grapefruity a ananas. Ananas patří mezi rostliny s CAM metabolismem, proto má hodnoty $(D/H)_1$ nejvyšší. Pomaranče a grapefruity patří mezi rostliny s C3 metabolismem stejně jako jablka a hrozny, ale rostou stejně jako ananas v oblastech s horkým a suchým klimatem. Jablka a hrozny rostou převážně v oblastech s mírným klimatem, a proto jsou jejich hodnoty $(D/H)_1$ nižší. V této práci byly analyzovány vzorky hroznových šťáv pouze z ČR, proto je jejich rozmezí hodnot posazeno spíše u dolní meze hodnot doporučených A.I.J.N. U hroznů pěstovaných v oblastech s teplejším klimatem lze očekávat hodnoty vyšší.

4.2 Analýza komerčně dostupných 100% džusů a nektarů

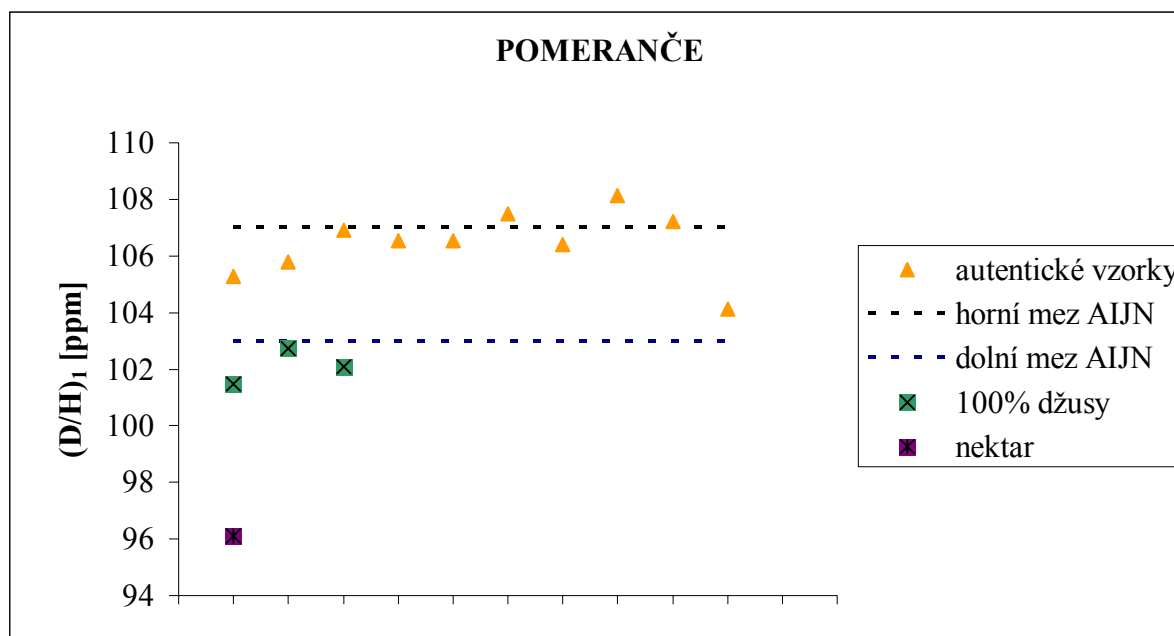
Pro porovnání s autentickými vzorky šťáv bylo podrobena analýze 7 vzorků 100% džusů vyrobených z koncentrátu a 5 nektarů obsahujících min. 50 % ovocné složky, přídavek cukru

a kyselin. Naměřená data jsou uvedena v tab. 6. Na obr. 25 – 29 je graficky zobrazeno porovnání hodnot 100% džusů a nektarů s autentickými vzorky a hodnotami doporučenými asociací A.I.J.N.

tab.6. hodnoty $(D/H)_1$ a refraktometrické sušiny komerčně dostupných džusů a nektarů

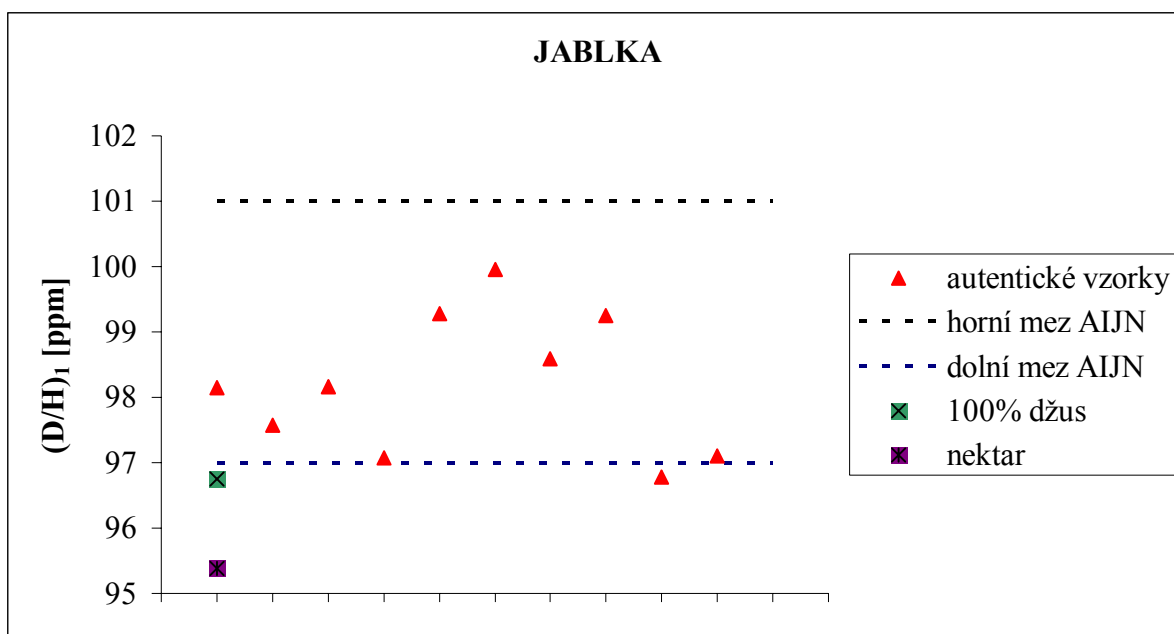
DŽUSY	ref.suš. [°Brix]	$(D/H)_1$ [ppm]
pomerančový džus DIZZY 100 %	10,9	101,49
pomerančový džus TOMA 100 %	10,8	102,73
pomerančový džus 100 %	12	102,10
jablečný džus DIZZY 100 %	11,4	96,75
ananasový džus VITAFIT 100 %	12,3	106,62
ananasový džus 100 %	12,1	104,99
růzový grapefruit 100 % džus HELLO	10	100,42

NEKTARY		
pomerančový nektar min. 50% TOMA	10,1	96,10
grapefruitový nektar min.50% TOMA	9,8	94,87
ananasový nektar min.50% TOMA	12,8	98,19
hroznový nektar bravo RAUCH, min. 50%	15,1	96,87
jablečný nektar TOMA min. 50%	10,5	95,38



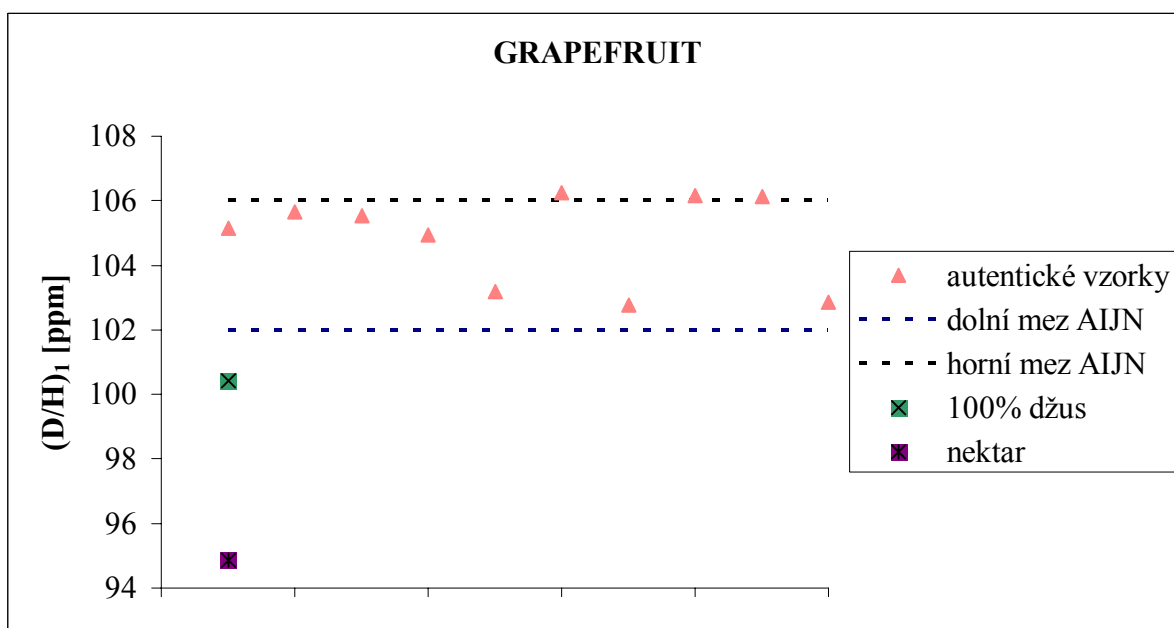
obr. 25. grafické znázornění porovnání komerčně dostupných vzorků 100% pomerančových džusů a nektaru s vytvořenou databází autentických vzorků šťáv

Hodnoty dvou 100% pomerančových džusů leží pod dolní mezí hodnot pro autentické vzorky a nevyhovují ani s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření (0,5 ppm viz. kap. 4.5.), třetí vyhovuje s přihlédnutím k rozšířené nejistotě metody.



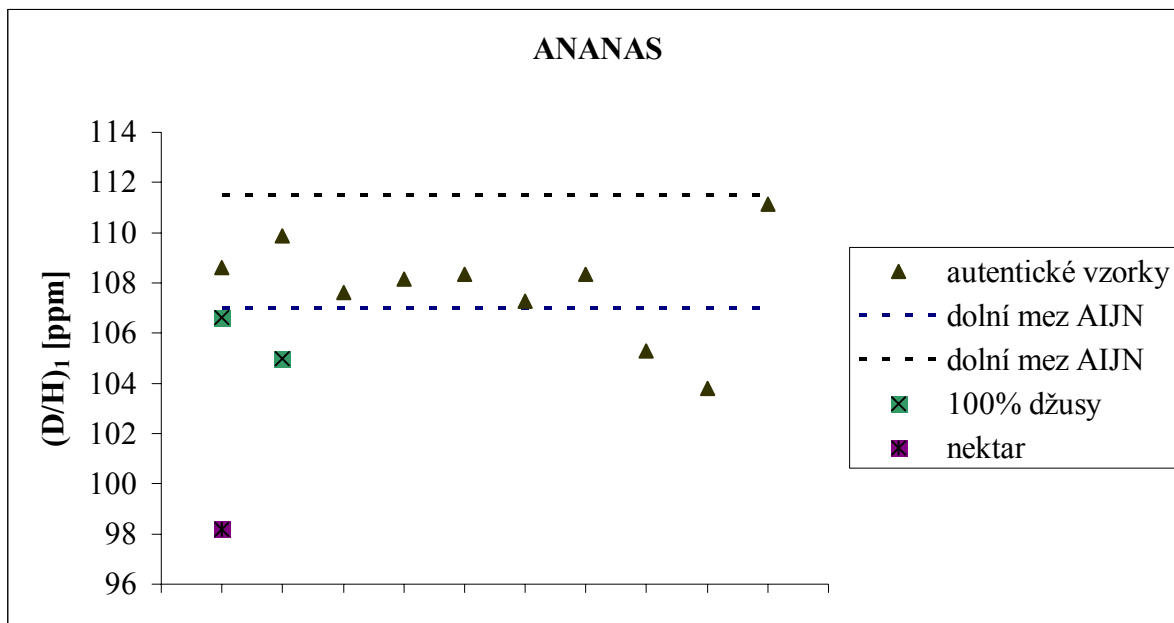
obr. 26. grafické znázornění porovnání komerčně dostupných vzorků 100% jablečného džusu a nektaru s vytvořenou databází autentických vzorků šťáv

Hodnota 100% jablečného džusu leží pod dolní mezí hodnot pro autentické vzorky, ale vyhovuje s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření (0,5 ppm viz. kap. 4.5.).



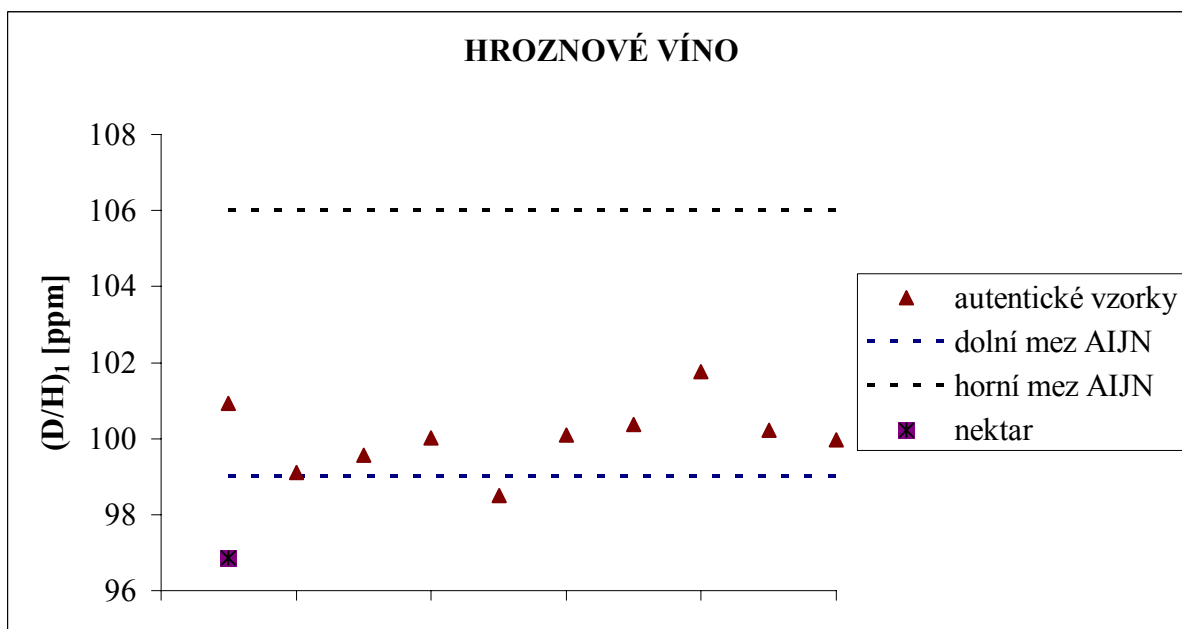
obr. 27. grafické znázornění porovnání komerčně dostupných vzorků 100% grapefruitového džusu a nektaru s vytvořenou databází autentických vzorků šťáv

Hodnota 100% grapefruitového džusu leží pod dolní mezí hodnot pro autentické vzorky a nevyhovuje ani s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření (0,5 ppm viz. kap. 4.5.).



obr. 28. grafické znázornění porovnání komerčně dostupných vzorků 100% ananasových džusů a nektaru s vytvořenou databází autentických vzorků šťáv

Hodnoty 100% ananasových džusů leží v rozmezí hodnot pro autentické vzorky, tudíž vyhovují požadavkům na 100% džusy.



obr. 29. grafické znázornění porovnání komerčně dostupného vzorku nektaru z hroznového vína s vytvořenou databází autentických vzorků šťáv, 100% hroznová šťáva nebyla změřena z důvodů nedostupnosti na trhu

U 100% šťáv, jejichž hodnoty leží mimo oblast pro autentické vzorky, je pravděpodobné, že obsahují přídavek cukru jiného botanického původu. Jelikož jsou hodnoty nižší než hodnoty pro ovoce, jedná se patrně o řepný cukr. Tyto výsledky je třeba brát s rezervou, neboť databáze by měla obsahovat mnohem více vzorků – možnost falešně nevyhovujících vzorků (v práci Martina, G.G a kol. je uvedeno rozpětí hodnot 100,3 – 105,9 ppm pro grapefruitu, 102,3 – 109,8 ppm pro pomeranče²⁷). Naopak falešně vyhovujícím vzorkům můžeme předejít, pokud známe geografický původ džusu a máme databázi autentických džusů z té dané oblasti, na kterou můžeme vzorek vyhodnotit. Rozpětí hodnot autentických vzorků se zužuje, což je patrné z naměřených hodnot autentických vzorků hroznových šťáv, které jsou všechny z ČR. Hodnoty všech analyzovaných nektarů leží výrazně pod dolní mezí pro autentické vzorky. Z toho plyne, že doslazení bylo zřejmě provedeno přídavkem řepného cukru.

4.3 Stanovení $(D/H)_1$ třtinového a řepného cukru

Ze dvou vzorků třtinového cukru a jednoho řepného byly připraveny roztoky o koncentraci cca 100 g/l. Roztoky prošly stejnou přípravou vzorku jako šťávy a byly změřeny hodnoty $(D/H)_1$ ethanolu získaného fermentací cukerných roztoků. Naměřené hodnoty jsou uvedené v tab. 7.

tab. 7. hodnoty $(D/H)_1$ třtinového a řepného cukru

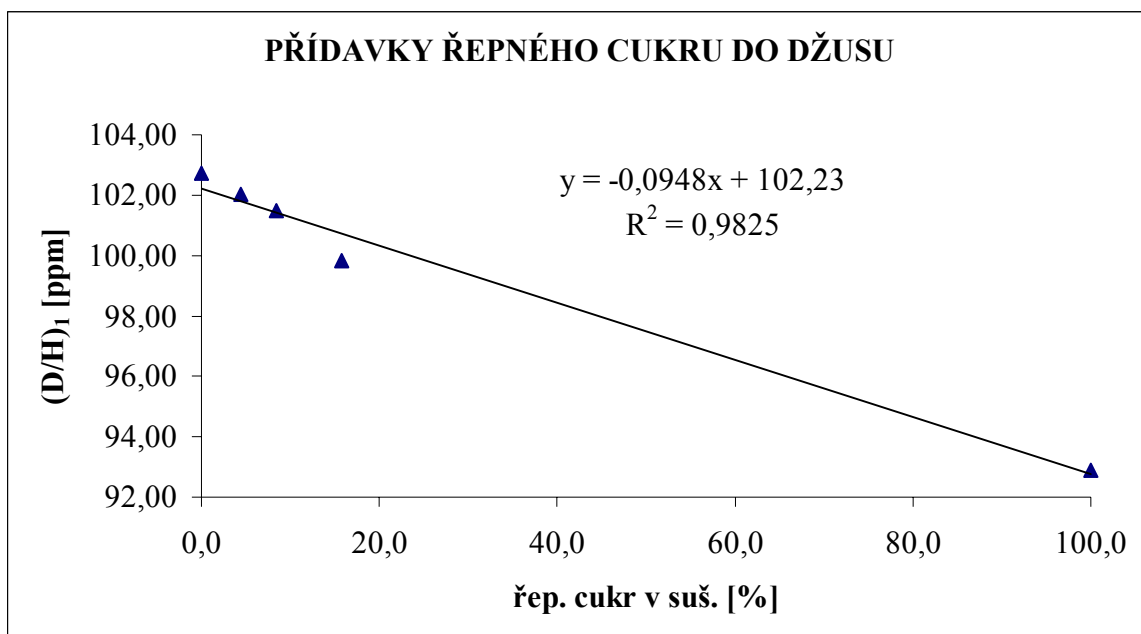
cukr	$(D/H)_1$ [ppm]
1.třtinový	109,79
2.třtinový	109,54
3.řepný	92,88

4.4 Pomerančový džus s přídavky řepného cukru

Dalším bodem této práce je sledování závislosti $(D/H)_1$ na přídavku cukru do džusu. Do 100% pomerančového džusu byla přidána různá množství cukru. Po rozpuštění cukru byla změřena refraktometrická sušina. Pokud měl pomerančový džus na počátku 108 g/l cukru (10,8 °Brix) a přídavek byl 5 g/l cukru, pak procentuální obsah přidaného cukru je $5/(108 + 5) = 4,4 \%$. Pro přídavky cukru byl použit stejný řepný cukr jako v testu v kapitole 4.3. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 8.

tab. 8. $(D/H)_1$ pomerančového džusu s přídavky řepného cukru

přídavek cukru [g/l]	$(D/H)_1$ [ppm]	ref.suš. [°Brix]	řep.cukr v s.[%]
0	102,73	10,8	0,0
5	102,03	11,3	4,4
10	101,47	11,8	8,5
20	99,84	12,7	15,7
čistý řepný cukr	92,88	100	100,0



obr. 30. závislost mezi $(D/H)_1$ a přidavky řepného cukru do džusu

Mezi hodnotami $(D/H)_1$ a přidavky cukru byla sledována lineární závislost. V porovnání s databází autentických vzorků pomerančových džusů lze říci, že už přídavek cukru 5 g/l u tohoto konkrétního džusu lze vyhodnotit jako nevyhovující i s přihlédnutím k rozšířené nejistotě měření. Pokud by ale hodnota 100% džusu ležela uvnitř intervalu hodnot pro autentické vzorky, tato mez detekce se zvyšuje a takový přídavek cukru nelze odhalit.

4.5 Nejistota měření

Každý týden je prováděna kontrola přípravy vzorku na absolutní ethanol a z něho naředěný cca 10% ethanol. U absolutního ethanolu je prováděn pouze PREPSAMP a měření na NMR spektrometru, zatímco 10% ethanol projde celou přípravou vzorku jako džus. Výsledná data jsou porovnána v tab. 9.

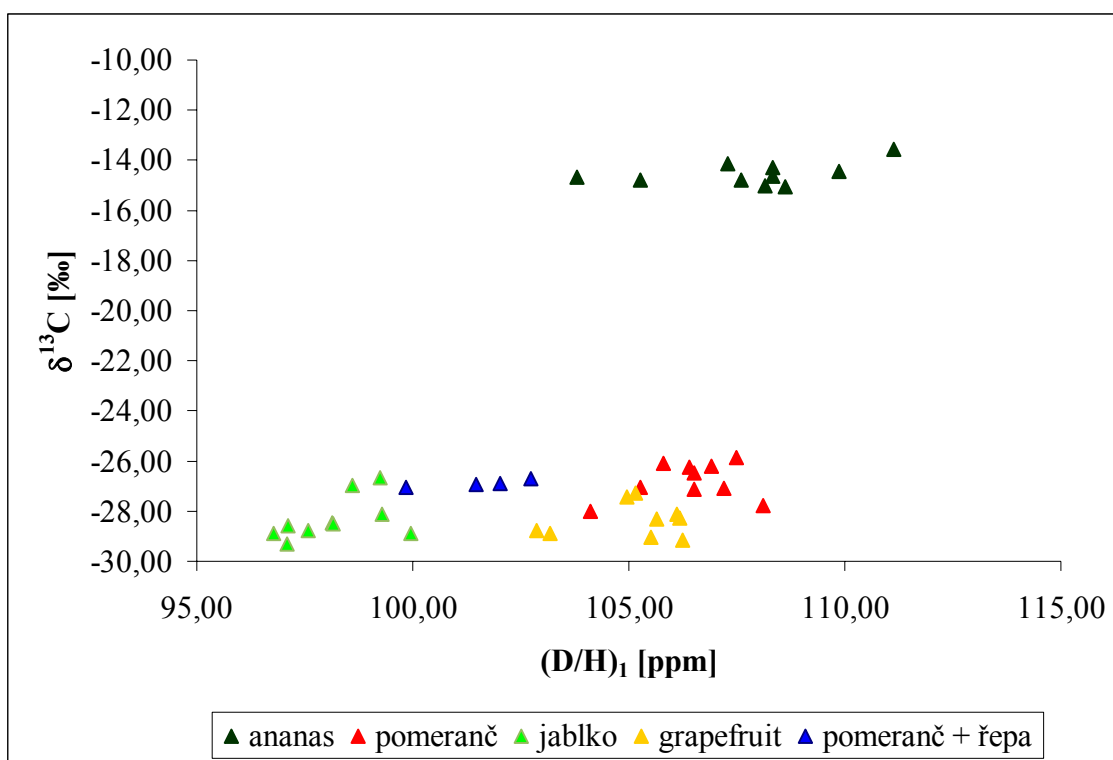
tab. 9. ukázka 5 sérií měření kontrolních vzorků ethanolu

Ethanol ze zásobního roztoku (Merck)		
absolutní	10% z absolut.	všechny hodnoty
98,06		98,06
	97,66	97,66
98,07		98,07
	97,61	97,61
97,70		97,70
	97,57	97,57
97,92		97,92
	97,61	97,61
97,57		97,57
	97,33	97,33
	SD	0,24

Rozšířená nejistota měření se vypočítá jako dvojnásobek nejvyšší standardní odchylky dosažené při opakovaných analýzách interního standardu ethanolu, tj. 0,5 ppm. Uvedená data jsou pouze na ukázkou, ve skutečnosti je počítáno z mnohem většího souboru dat, která jsou průběžně doplňována.

4.6 Kombinace hodnot $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$

Hodnoty $\delta^{13}C$ byly stanoveny ze stejných ethanolů jako $(D/H)_1$ jiným pracovníkem laboratoře na SZPI pomocí EA IRMS. Hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů není předmětem této práce, hodnoty jsou uvedené pouze pro doplnění, jako názorná ukáзка toho, jak lze kombinací více markerů lépe odlišit ethanoly z cukrů různého botanického původu, zejména cukry z rostlin C4 a CAM od cukrů z C3 rostlin, a tím i zlepšit detekci falšování džusů přidávkem cukru.



obr. 31. 2D graf – rozlišení jednotlivých skupin autentických vzorků ovocných šťáv pomocí $(D/H)_1$ a $\delta^{13}C$ ethanolu, modré značky jsou pro pomerančový džus s přidávkou řepného cukru z kapitoly 4.3.

5 ZÁVĚR

Databáze hodnot autentických vzorků byla vytvořena ze šťáv získaných z čerstvého ovoce různého geografického původu za laboratorních podmínek. Analyzováno bylo po 10 vzorcích od každého druhu – pomeranč, grapefruit, jablko, ananas a hroznové víno. Hodnoty $(D/H)_1$ ethanolu získaného fermentací těchto šťáv je ovlivněna převážně druhem fotosyntézy, kterou rostlina používá, a zčásti geografickým původem. Následkem toho byl velký rozptyl hodnot autentických vzorků. Intervaly hodnot pro jednotlivé skupiny autentických vzorků džusů se překrývaly. V jedné oblasti 96,87 – 101,76 ppm ležely hodnoty pro jablka a hrozny. Ve druhé oblasti 102,77 - 111,13 ppm ležely hodnoty pro pomeranče, grapefruity a ananas.

Pokud mluvíme o džusech vyrobených z koncentrátu, hodnota $(D/H)_1$ ethanolu je ovlivněna kromě výše uvedeného také vodou, kterou je koncentrát naředěn. Tím dochází k určitému zkreslení oproti hodnotám autentických vzorků. Hodnoty komerčně dostupných vzorků 100 % džusů analyzovaných v této práci ležely až na ananasové džusy pod dolní mezí vytvořené databáze a hodnot doporučených asociací A.I.J.N.

Mezi přídavky řepného cukru do pomerančového džusu a hodnotami $(D/H)_1$ ethanolu byla pozorována lineární závislost. Přídavkem řepného cukru do pomerančového džusu docházelo k výraznému snížení hodnoty $(D/H)_1$.

Vzhledem k tomu, že intervaly hodnot autentických vzorků jsou poměrně široké, je snížena možnost odhalení a kvantifikace přídavku cukru. Metoda je použitelná pouze pro detekci přídavku cukru jiného botanického původu nebo jako semikvantitativní metoda – určení minimálního množství přidaného cukru. Pro snížení meze stanovitelnosti a zvýšení přesnosti je dobré použít databázi ovoce z určité oblasti, která odpovídá geografickému původu ovoce, ze kterého byl džus či koncentrát vyroben.

Metoda není vhodná pro detekci přídavku třtinového cukru do ananasového džusu, jelikož jejich hodnoty $(D/H)_1$ se překrývají.

Pro lepší určení autenticity ovocných džusů se využívá kombinace několika markerů (izotopový profil H a C, stopové prvky, profil aminokyselin..) tzv. multivariační analýzy.

6 ZKRATKY A SYMBOLY

A.I.J.N. – asociace výrobců džusů a nektarů (Association of the Industry of Juices and nectars), shromažďuje údaje o ovocných džusech

AAS – atomová absorpční spektrometrie

EA IRMS – elementární analyzátor kombinovaný s hmotnostním spektrometrem izotopových poměrů (Elemental Analyzer Isotope Ratio Mass Spectrometer)

SNIF NMR – nukleární magnetická rezonance sledující distribuci izotopů na různých místech v molekule (Site-specific Natural Isotope Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance)

VSMOW – Vienna-Standard Mean Ocean Water – standard pro vodík

PDB – Pee Dee Belemnite – standard pro uhlík

CRM – certifikovaný referenční materiál

ATP – adenosin-5'-trifosfát

NADPH - nikotinamidadenindinukleotid

CAM – Crassulacean Acid Metabolism – metabolismus sukulentů

ADCS – Automated Distillation Control System – systém pro řízení destilace

TMU – tetramethylmočovina (TetraMethylUrea)

t_Q – obsah alkoholu ve zfermentovaném džusu v % obj.

t_D – obsah alkoholu v destilátu v % hm.

7 PŘÍLOHY



příloha 1. EA IRMS – hmotnostní spektrometr izotopových poměrů v laboratoři SZPI v Brně



příloha 2. Cadiotovy kolony



příloha 3. Karl Fischer titrátor



příloha 4. NMR kyvety se vzorkem



příloha 5. NMR spektrometr v laboratoři SZPI v Brně

ETHANOL

SAMPLE NUMBER: BCR-123A_M

Nb Spectra : 10
LE factor : 2.00

Preparation Parameters:

Product Weight : 782.8000g Purity: 0.9994
Reference Weight: 384.4000g Reference name: tmu(136.50ppm)

Treatment:

Type of processing : Ethanol Reprocessing

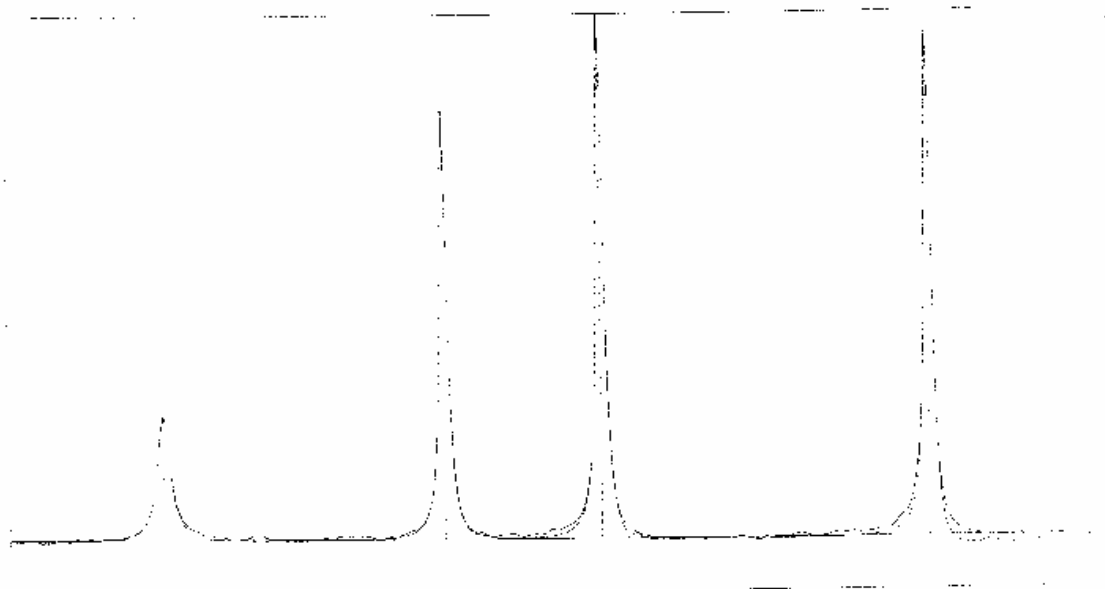
Results:

	(D/H) Intensity in ppm		(D/H) Area in ppm	
Spectrum	(D/H) 1	(D/H) 2	(D/H) 1	(D/H) 2
1	101.45	131.79	101.75	129.78
2	102.23	131.81	102.46	131.17
3	101.76	131.77	101.67	130.58
4	101.61	130.61	100.84	128.66
5	101.83	130.94	101.46	130.19
6	100.91	130.26	100.64	130.06
7	102.32	131.36	101.25	130.21
8	101.87	131.68	101.38	131.41
9	101.92	131.47	101.95	131.20
10	101.99	131.45	102.97	130.39
-----			-----	-----
Mean	101.75	131.30	101.64	130.36
SD	0.40	0.55	0.71	0.81

Ratio R Intensity (SD)

Mean : 2.580 (0.019)

Peaks Widths



COPYRIGHT EUROFINS 1997

J:\data\mr\inmr\BCR-123A_M\19\fd

05/05/2009 13:35:38

8 LITERATURA

1. Yunianta and Zhang, B.L. and Lees, M. and Martin, G.J.: Stable-Isotope Fractionation in Fruit Juice Concentrates - Application to the Authentication of Grape and Orange Products., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, vol. 43, pages 2411-2417
2. Martin, G.G. and Wood, R. and Martin, G.J.: Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR method): Collaborative study., *Journal of AOAC International*, 1996, vol. 79, pages 917-928
3. vyhláška č. 335/1997 v platném znění, dostupné:
http://www.portal.gov.cz/wps/portal/_s.155/696/_s.155/701?l=57/2003
4. Ashurst P. R.: *Production and Packaging of Non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages*, 2. vyd. Springer 1994. 429 s. ISBN 0834212897, 9780834212893
5. Drdák M.: *Technologia rastlinných neúdržných potravín*. Bratislava: ALFA, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatury, 1989. 304 s. ISBN 80-05-00121-5
6. Kadlec P.: *Technologie potravin I*. VSCHT Praha, 1. vyd., 2002, 300 str., ISBN 80-7080-509-9
7. dostupné z <http://www.frukolis.cz/ovocne-koncentraty.html>
8. dostupné z http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborII/falsovani.pdf
9. Linget, C. and Netter, C. and Heems, D. and Verette, E.: On-line dialysis with HPLC for the automated preparation and analysis of amino acids, sugars and organic acids in grape juice and wines. *Analisis*, 1998, vol. 26, pages 35 – 39
10. Voldřich M., Skálová P., Kvasnička F., Cuhra P., Kubík M., Pyš P.: Authenticity of 100 % Orange juice in the Czech Market in 1996 – 2001. *Czech Journal of Food Sciences*, 2002, vol. 20, pages 83 – 88
11. Zhang, B.L. and Billault, I. and Lo, X.B. and Mabon, F. and Remaud, G. and Martin, M.L.: Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway. 2002, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pages 1574-1580
12. Steffen, A and Pawliszyn, J.: Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, vol. 44, pages 2187 – 2193
13. Ashurst P. R., Dennis M. J.: *Analytical Methods of Food Authentication*. Springer, 1998, 350 s. ISBN 0751404268, 9780751404265

14. dostupné z www.aijn.org
15. dostupné z <http://www.eurofins-ifs.com/media/11617/jamin.pdf>
16. Vodrážka Z.: *Biochemie*. 2. vyd. Praha: AV ČR, 2002. 506 s. ISBN 80-200-0600-1
17. Ghidini S., Ianieri A., Zanardi E., Conter M., Boschetti T., Iacumin P., Bracchi. P. G.: Stable isotopes determination in food authentication: a review, *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, 2006, vol. 26, pages 193 – 204
18. Bruckner M. Z.: A Primer on Stable Isotopes and Some Common Uses in Hydrology [online]. poslední revize prosinec 2007 [cit. březen 2009], dostupné z http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/environ_sampling/stableisotopes.html
19. Martin, G. J. and Martin, M. L.: Climatic significance of isotope ratios. *Phytochemistry Reviews*, 2003, vol. 2, pages 179-190
20. dostupné z http://www.atmos.berkeley.edu/~aswann/EPS103webpage/handouts/iaea_isotopefract_ch03.pdf
21. Dunn S.: Gas Source Mass Spectrometry: Stable Isotope Geochemistry [online]. poslední revize červenec 2008 [cit. březen 2009] dostupné z http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/gassourcemasspec.html
22. Martin, G.J. and Koziat, J. and Rossmann, A. and Dennis, J.: Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determined by deuterium NMR - An European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta*, 1996, vol. 321, pages 137-146
23. Martin, G.J. and Guillou, C. and Martin, M.L. and Cabanis, M.T. and Tep, Y. and Aerny, J.: Natural Factors of Isotope Fractionation and the Characterization of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, vol. 36, pages 316-322
24. Ogrinc, N. and Kosir, I.J. and Spangenberg, J.E. and Kidric, J.: The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, vol. 376, pages 424-430
25. A. M. Pupin, M. J. Dennis, I. Parker, S. Kelly, T. Bigwood, and M. C. F. Toledo: Use of Isotopic Analyses To Determine the Authenticity of Brazilian Orange Juice (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 43, pages 1369 – 1373
26. dostupné z <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/calvin.html#c1>

27. Martin, G.G. and Hanote, V. and Lees, M. and Martin, Y.L.: Interpretation of combined H-2 SNIF/NMR and C-13 SIRA/MS analyses of fruit juices to detect added sugar. *Journal of Aoac International*, 1996, vol. 79, pages 62-72
28. Sandusky P. and Steven Ha.: The use of Site Specific Natural Isotope Fractionation NMR spectroscopy (SNIF-NMR) to detect sugar adulteration in fruit juices and spirits. 2004, *Customs and Border Protection Laboratory Bulletin*, vol. 12, pages 27 – 42, dostupné z http://www.cbp.gov/xp/cgov/trade/automated/labs_scientific_svcs/technical_documents/lab_bulletin/vol12_no1/
29. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. and Burghagen, M.M.: *Food Chemistry*. 3rd ed. New York, NY: Springer-Verlag, 2004, 1070 s., ISBN 3540408185, 9783540408185
30. Doner, L. W. and Bills, D. D.: Stable Carbon Isotope Ratios in Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1981, vol. 29, pages 803 – 804
31. Dunbar J. and Wilson A. T.: Oxygen and Hydrogen Isotopes in Fruit and Vegetable Juices. *Plant Physiology*, 1983, vol. 72, pages 725 – 727
32. Bricout, J. and Koziat, J.: Control of the Authenticity of Orange Juice by Isotopic Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, vol. 35, pages 758 – 760
33. Gucek M., Marsel J., Ogrinc N., Lojen S.: Stable Isotopes Determinations in Some Fruit Juices to Detect Added Sugar. *Acta Chimica Slovenica*, 1998, vol. 45, pages 217-228
34. Jamin, E. and Gonzalez, J. and Remaud, G. and Naulet, N. and Martin, G.G.: Detection of exogenous sugars or organic acids addition in pineapple juices and concentrates by C-13 IRMS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol. 45, pages 3961-3967
35. Jamin, E., Martin, F., Martin, G.G., Blanch-Cortes, A.I., Christoph, N., Ciambotti, A., Giraudon, S., Guerin, R., Guillou, C., Kelly, S., Lamoureux, C., Mazac, J., Naulet, N., Pavanello, F., Retif, M., Rossmann, A. and Versini, G.: Determination of the C-13/C-12 ratio of ethanol derived from fruit juices and maple syrup by isotope ratio mass spectrometry: Collaborative study. *Journal of Aoac International*, 2004, vol. 87, pages 621-631
36. Martin, G.J. and Martin, M.L. and Zhang, B.L.: Site-Specific Natural Isotope Fractionation of Hydrogen in Plant-Products Studied by Nuclear-Magnetic-Resonance. *Plant Cell and Environment*, 1992, vol. 15, pages 1037-1050
37. Lees M.: *Food authenticity and traceability*. Woodhead Publishing 2003, 612 s., ISBN 1855735261, 9781855735262
38. Martin, G.J. and Lizhang, B. and Naulet, N. and Martin, M.L.: Deuterium Transfer in the Bioconversion of Glucose to Ethanol Studied by Specific Isotope Labeling at the Natural

Abundance Level. Journal of the American Chemical Society, 1986, vol. 108, pages 5116-5122

39. Kelly S., Heaton K. and Hoogewerff J.: Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. Trends in Food Science & Technology, 2005, vol.16, pages 555–567
40. Linda M. Reid, L. M., O'Donnell C.P.and Downey G.: Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends in Food Science & Technology, 2006, vol. 17, pages 344–353
41. Zýka, J. a kol.: *Analytická příručka 2*. 4.vyd. SNTL Praha, 1988. 832 s. ISBN 04-611-88
42. dostupné z <http://www.vscht.cz/nmr/>
43. AOAC Official Method 995.17 Beet Sugar in Fruit Juices – Site Specific Natural Isotope Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance (SNIF NMR) Method. AOAC International, 1995
44. Stanovení poměru stabilních izotopů vodíku D/H na methylové a methylenové skupině ethanolu pomocí nukleární magnetické rezonance (SNIF-NMR) - stanovení botanického původu cukrů ovocných šťáv. Metoda SZPI