

УДК 634.11:663.81:543.429.23

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОСТАВА СОКА ЯБЛОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Е.Д. Скаковский¹, Л.Ю. Тычинская¹, О.А. Молчанова¹, А.И. Колечкина¹,
Н.В. Кухарчик², Н.Г. Капичникова²

¹ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,
ул. Сурганова, 13, г. Минск, 220072, Беларусь

²РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@it.org.by

РЕЗЮМЕ

Исследования проведены в 2012-2013 гг. в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси» и РУП «Институт плодоводства». Объектами исследования были плоды 6 районированных в Беларуси сортов яблок позднего срока созревания: Алеся, Белорусское сладкое, Вербнае, Заславское, Имант и Надзейны. Для анализа растворимых органических компонентов соков использовали метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ¹H и ¹³C. Спектры записывали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker, Германия).

Показана высокая информативность использования метода ЯМР в анализе сока яблок. В результате исследований установлено, что более половины растворимых сухих веществ (РСВ) приходится на фруктозу, которая представлена 5 изомерами (β-фруктопираноза, β-фруктофураноза, α-фруктофураноза, α-фруктопираноза, кетофруктоза). Глюкоза представлена двумя изомерами (β-глюкопираноза и α-глюкопираноза). Показаны изменения состава РСВ в процессе хранения яблок, в том числе уменьшение содержания сахарозы и яблочной кислоты, и возрастание доли глюкозы и фруктозы.

Ключевые слова: сорта яблони, сок, фруктоза, глюкоза, сахароза, сорбитол, яблочная кислота, ядерный магнитный резонанс, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Химический состав яблок изучен достаточно детально, показана его зависимость от многочисленных факторов, в том числе сортовых характеристик, погодных и комплекса агротехнических условий [1]. Определение химического состава яблок проводится с использованием утвержденных методик. Традиционно химический состав мякоти плода характеризуется по содержанию сухого вещества, титруемой кислотности, сумме сахаров, содержанию аскорбиновой кислоты и другим параметрам.

В то же время в последние годы развивается ряд методов химического анализа, способных существенно ускорить и упростить проводимые анализы, а также, что наиболее значимо, повысить их разрешающую способность. В плане одновременного анализа растворимых органических компонентов соков хорошо зарекомендовал себя метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ¹H и ¹³C [2]. Метод позволяет не только

проанализировать качественный и количественный состав растворимых углеводов, но и определить соотношение пространственных изомеров углеводов.

Цель исследований – оценить возможность использования метода ЯМР для анализа состава сока плодов яблок.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в 2012-2013 гг. в РУП «Институт плодоводства» и ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси». Объектами исследования были плоды 6 районированных в Беларуси сортов яблок позднего срока созревания: Алеся, Белорусское сладкое, Вербнае, Заславское, Имант и Надзейны.

Сорт Алеся привит на подвой 62-396, сад 1995 г. посадки. Сорта Белорусское сладкое, Надзейны, Имант привиты на подвой 57-545, сад 2000 г. посадки. Сорта Вербнае и Заславское привиты на подвой ММ 106, сад 2001 г. посадки. Схема посадки деревьев в садах – 4,5 x 2,0 м, плотность – 1110 дер./га.

Рельеф участка выровненный, почва дерново-подзолистая, среднеподзоленная, развивающаяся на мощном легком лессовидном суглинке.

В междурядьях сформирован естественный газон с периодическим подкашиванием. В приствольную полосу вносятся однократно глифосатсодержащие гербициды при высоте сорняков не более 10-15 см. Защита насаждений от болезней и вредителей проведена согласно рекомендациям РУП «Институт защиты растений».

Сок из яблок указанных сортов выделяли из гомогенизированной мякоти плодов методом фильтрования с использованием фильтра Шотта. Сок выделяли в два срока: после сбора урожая и после 3 месяцев хранения. Яблоки хранили в бытовом холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре +10 °С (в условиях, приближенных к хранению потребителями).

Для записи спектров ЯМР в качестве растворителя использовали дейтерированную воду (D₂O) с добавленным в качестве репера трет-бутиловым спиртом. Спектры записывали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker, Германия). В протонных спектрах метильным группам трет-бутилового спирта соответствует химический сдвиг $\delta=1,10$ м.д., в углеродных – 30,4 м.д. Для идентификации компонентов сока предварительно были записаны в аналогичных условиях спектры растворов в D₂O фруктозы, глюкозы, сорбитола, сахарозы и яблочной кислоты.

Количественное определение компонентов сока проводили, используя интегральные интенсивности линий, принадлежащих конкретным соединениям. Поскольку каждое соединение (в том числе и изомерные формы) характеризуется в спектрах ¹H и ¹³C набором соответствующих линий, для анализа выбирали наиболее удобные сигналы, имеющие индивидуальные химические сдвиги, т.е. не перекрывающиеся друг с другом для разных соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сухом веществе сока было проанализировано количественное содержание фруктозы, глюкозы, сорбитола, сахарозы и яблочной кислоты, а также определены изомеры глюкозы и фруктозы и их соотношение.

Фруктоза в водных растворах может присутствовать в виде 5 конформеров (углеродные атомы пронумерованы) [3]:

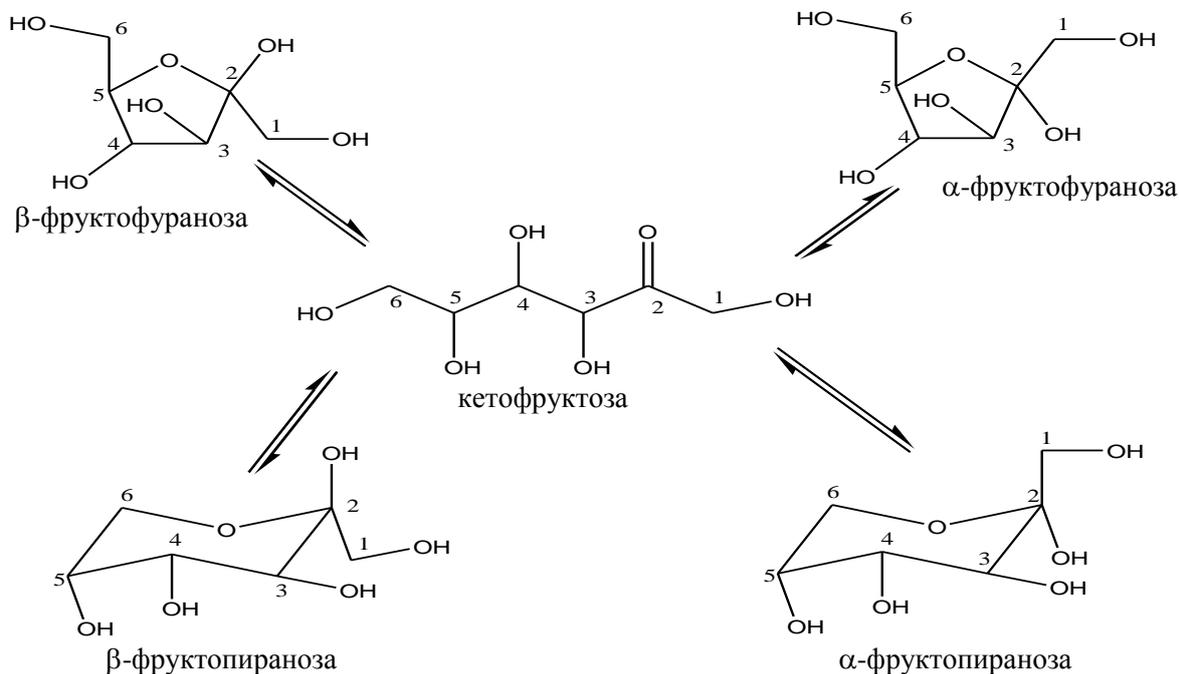


Рисунок 1 – Конформеры фруктозы.

Спектры ЯМР растворов в D₂O (а – ¹H; б – ¹³C) фруктозы показаны на рисунке 2.

Определенные нами химические сдвиги протонов изомеров фруктозы приведены в таблице 1, эти данные хорошо согласуются с работой Т. Barclay с соавторами [3].

Таблица 1 – Химические сдвиги ¹H (δ, м.д.) изомеров фруктозы в D₂O

Изомер	Номер атома						
	1	1'	3	4	5	6	6'
β-фруктопираноза	3,56	3,41	3,65	3,74	3,84	3,87	3,55
β-фруктофураноза	3,44	3,40	3,96	3,96	3,69	3,65	3,52
α-фруктофураноза	3,52	3,49	3,95	3,84	3,91	3,66	3,54
α-фруктопираноза	3,54	3,50	3,87	3,80	3,72	3,71	3,54
Кетофруктоза	4,50	4,39	4,49	3,79	3,62	3,69	3,51

В углеродном спектре отчетливо наблюдаются в наших условиях только три первых изомера, химические сдвиги которых приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Химические сдвиги ¹³C (δ, м.д.) изомеров фруктозы в D₂O

Изомер	Номер атома					
	1	2	3	4	5	6
β-фруктопираноза	64,6	98,7	68,2	70,4	69,9	64,0
β-фруктофураноза	63,4	102,2	76,7	75,1	81,3	63,1
α-фруктофураноза	63,5	105,1	82,7	76,7	81,9	61,7

Для спектрального наблюдения других изомеров требуется заметное увеличение времени накопления. Наши результаты хорошо согласуются с результатами работы S.J. Angyal и G.T. Bethell [4].

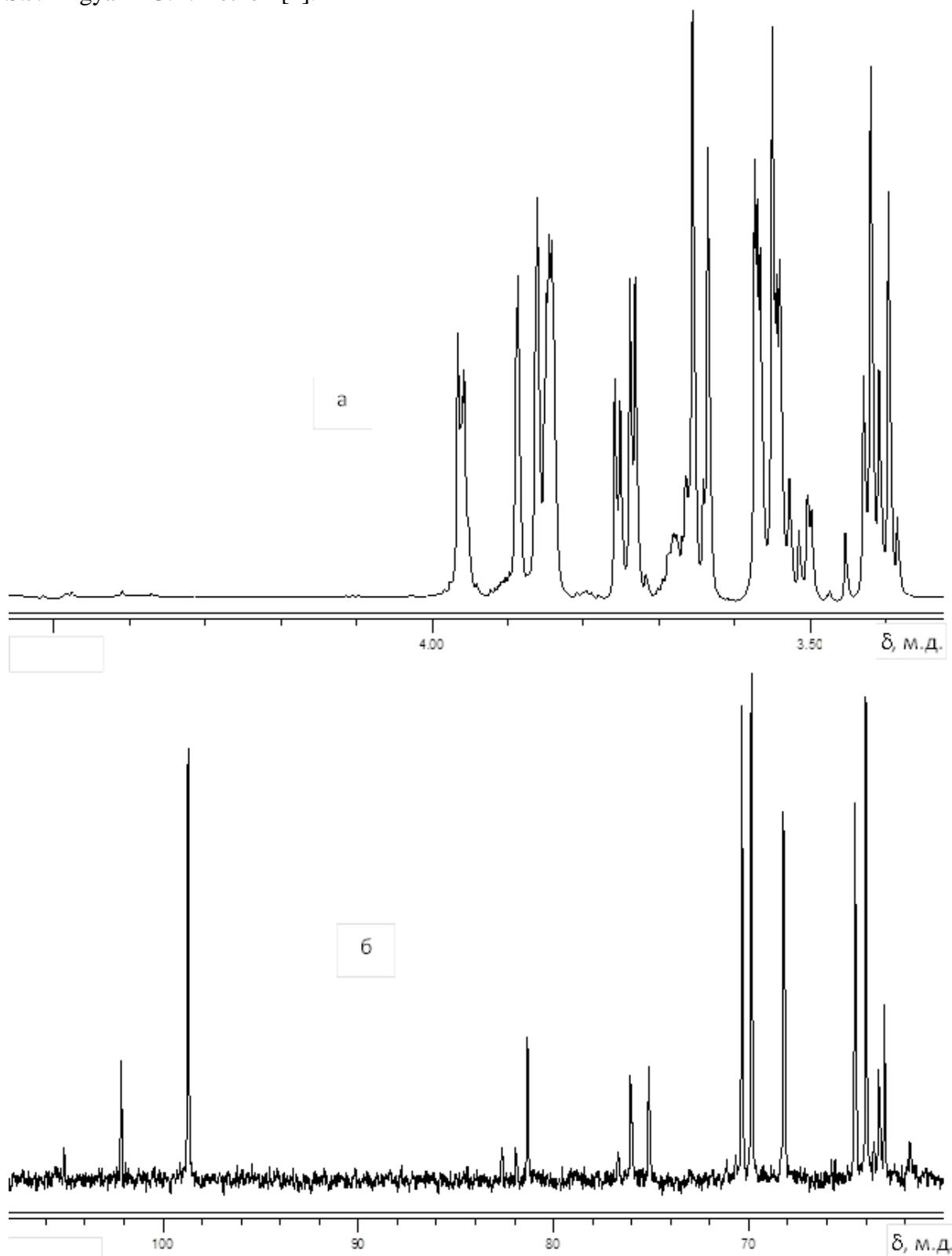


Рисунок 2 – ЯМР-спектры раствора фруктозы в D₂O: а – ¹H, б – ¹³C.

Глюкоза, в отличие от фруктозы, в водном растворе присутствует в виде двух изомеров: α -глюкопираноза и β -глюкопираноза (рисунок 3).

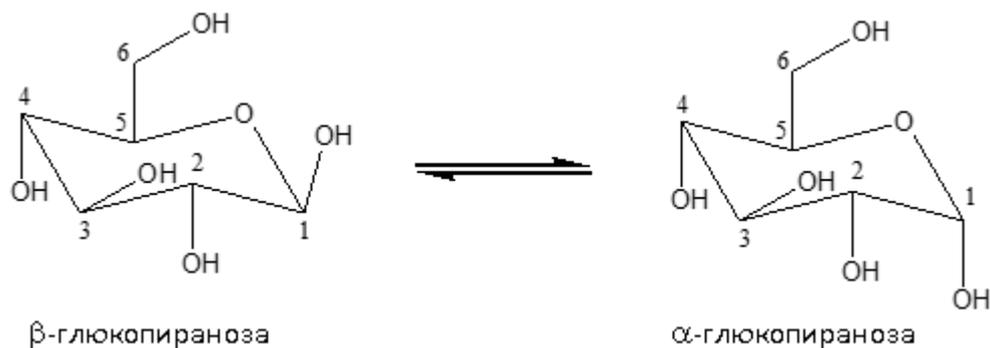


Рисунок 3 – Изомеры глюкозы.

Протонные химические сдвиги глюкозы в D_2O приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Химические сдвиги 1H (δ , м.д.) изомеров глюкозы в D_2O

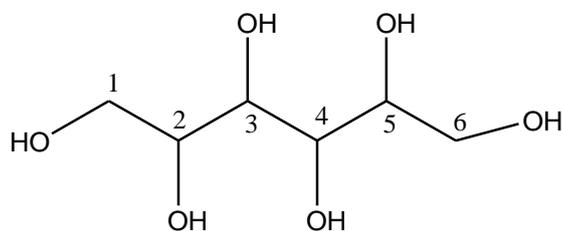
Изомер	Номер атома						
	1	2	3	4	5	6	6'
β -глюкопираноза	4,49	3,10	3,32	3,26	3,31	3,75	3,57
α -глюкопираноза	5,08	3,38	3,55	3,27	3,67	3,66	3,61

Отнесение сигналов было сделано на основании работы W. Curatolo с соавторами [5], а использование результатов [6] позволило интерпретировать спектр на ядрах ^{13}C . Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Химические сдвиги ^{13}C (δ , м.д.) изомеров глюкозы в D_2O

Изомер	Номер атома					
	1	2	3	4	5	6
β -глюкопираноза	96,5	74,7	76,4	70,2	76,5	61,4
α -глюкопираноза	92,7	72,1	73,4	70,2	72,0	61,2

Сорбитол в водном растворе присутствует в развернутой конфигурации:



Его 1H ЯМР-спектр (рисунок 4а) демонстрирует, что все протоны сорбитола поглощают в той же области, где и фруктоза, и глюкоза. Поэтому в данном случае протонный спектр мало информативен для анализа содержания этого углевода. Напротив, спектр на ядрах ^{13}C позволяет идентифицировать даже малые количества сорбитола в смеси (рисунок 4б). Согласно AISTRIO-DB Spectral Database [7] можно отнести сигналы в спектре: 1 – 63,5; 2 – 71,7; 3 – 71,8; 4 – 70,3; 5 – 73,6 и 6 – 63,1 м.д.

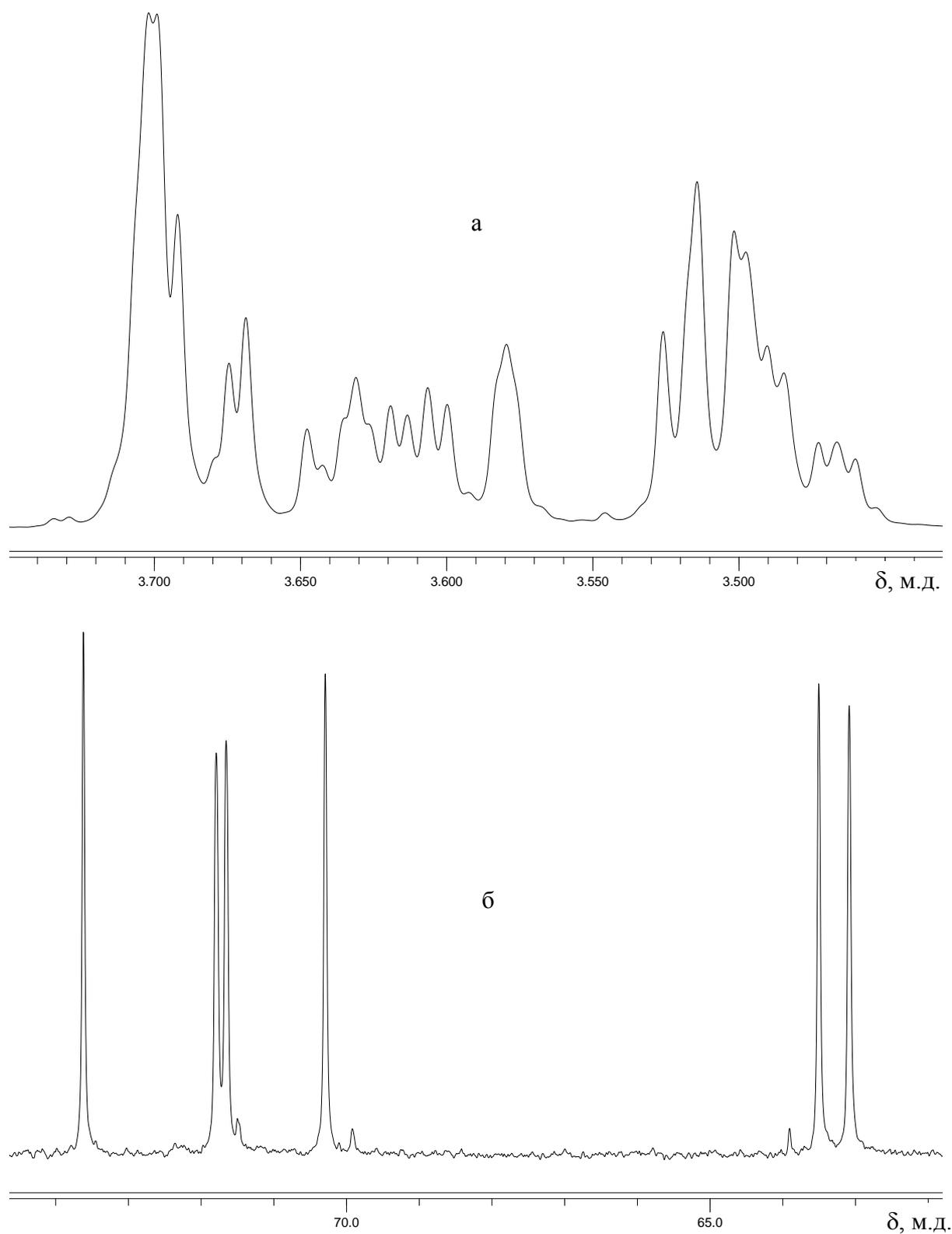
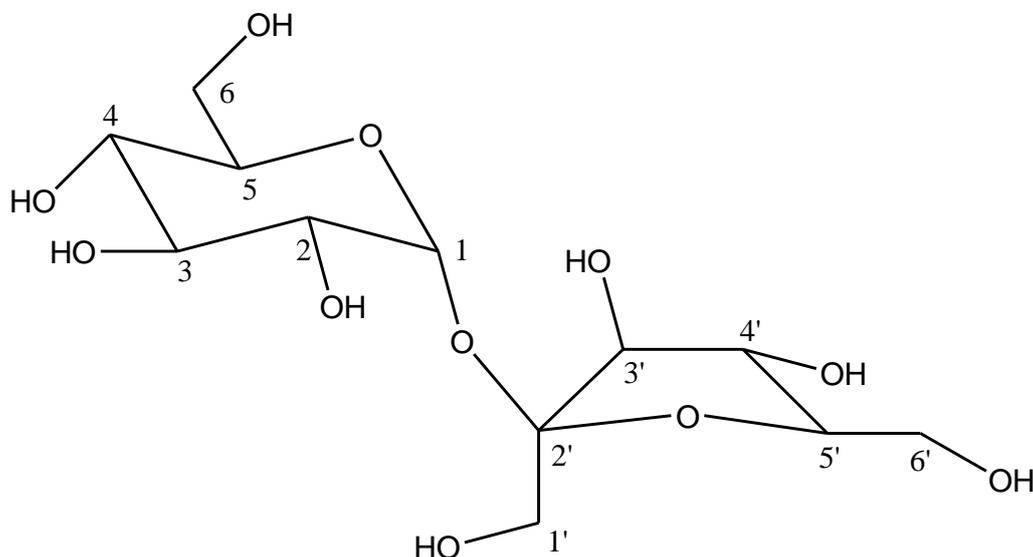


Рисунок 4 – ЯМР-спектры раствора сорбитола в D₂O: а – ¹H, б – ¹³C.

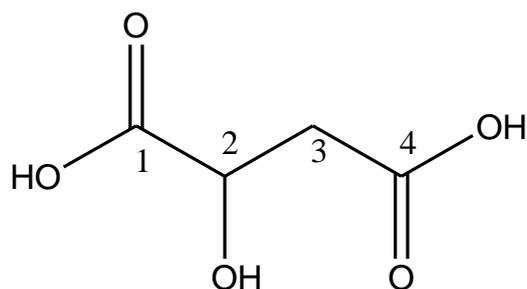
Дисахарид **сахароза** в водном растворе присутствует также в виде одного изомера:



Отнесение сигналов в спектрах сделано согласно имеющимся данным [7]. Для ^1H : 1 – 5,26; 2 – 3,41; 3 – 3,61; 4 – 3,32; 5 – 3,70; 6 – 3,67; 1' – 3,53; 3' – 4,06; 4' – 3,90; 5' – 3,74 и 6' – 3,67 м.д.

Для ^{13}C : 1 – 92,8; 2 – 71,7; 3 – 73,0; 4 – 69,9; 5 – 53,2; 6 – 60,8; 1' – 62,0; 2' – 104,3; 3' – 77,1; 4' – 74,6; 5' – 82,0 и 6' – 63,0 м.д.

Главная из присутствующих кислот в соке яблок – **яблочная**:



Это соединение имеет достаточно простые спектры ЯМР, показанные на рисунке 5: а – ^1H , б – ^{13}C . Отнесение линий для ^1H спектра в D_2O : 2 – 4,47; 3 – 2,80; 2,73 м.д., а для ^{13}C спектра: 1 – 177,0; 2 – 67,4; 3 – 39,1 и 4 – 175,0 м.д.

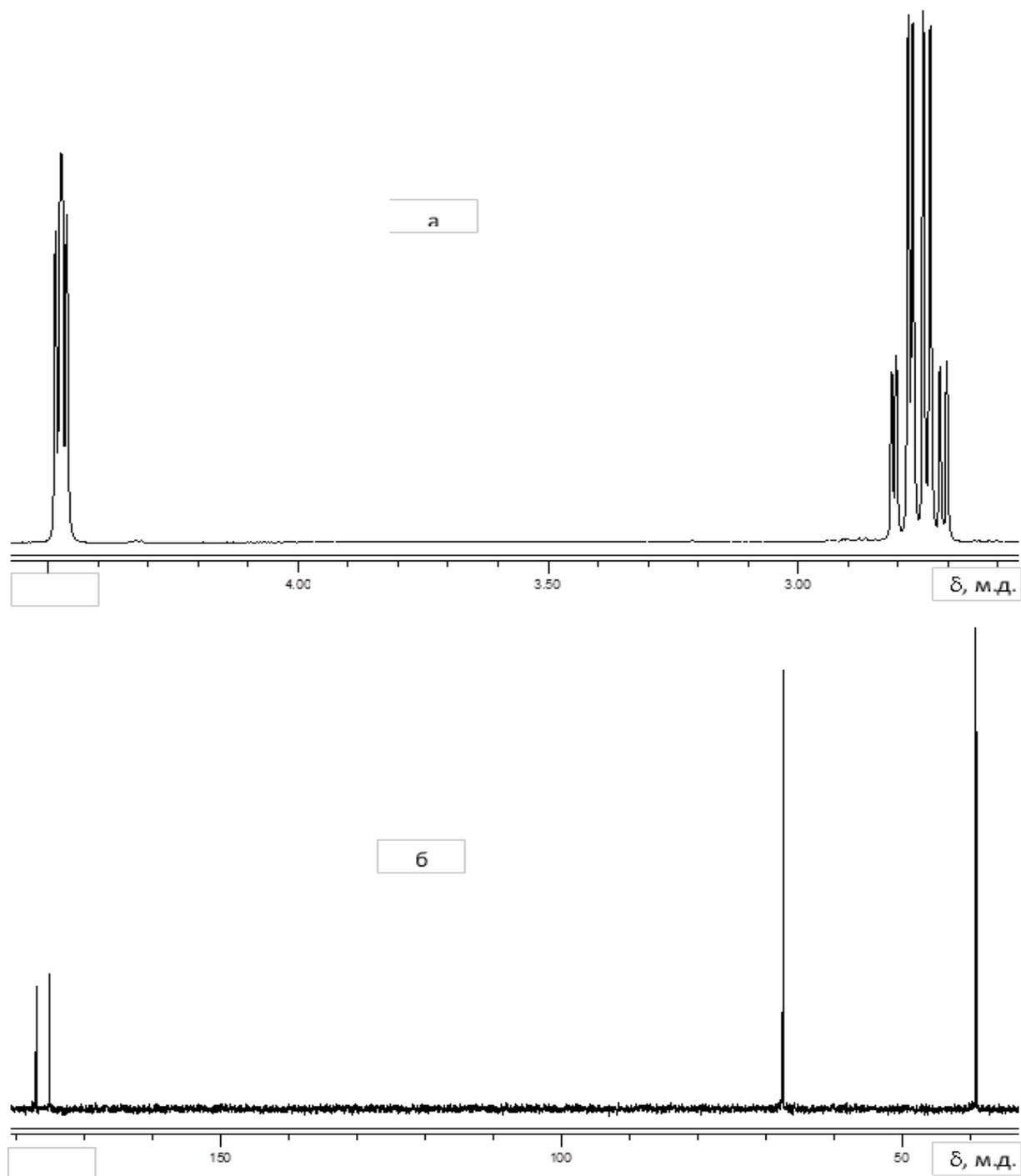


Рисунок 5 – ЯМР-спектры раствора яблочной кислоты в D_2O : а – 1H , б – ^{13}C .

Спектры ЯМР раствора в D_2O сухого остатка сока яблок сорта Алеся, выделенного после 3 месяцев хранения, приведены на рисунке 6: а – 1H , б – ^{13}C . Рисунки демонстрируют, что они являются суперпозицией спектров рассмотренных выше соединений. Для всех других исследованных соков спектры качественно подобны, но отличаются интенсивностью линий, что обусловлено разным содержанием компонентов, представленных в таблице 5.

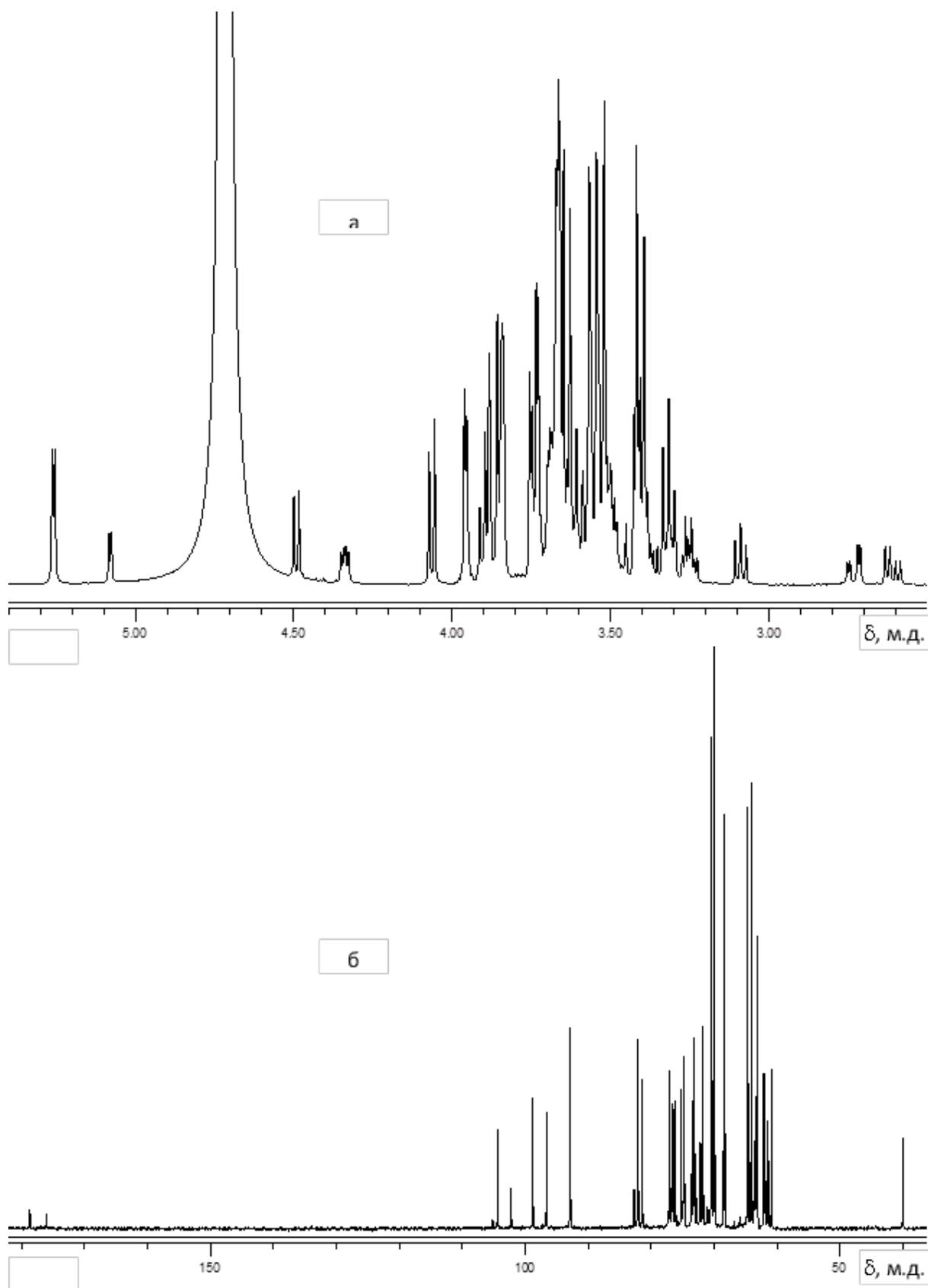


Рисунок 6 – ЯМР-спектры яблочного сока, сорт Алеся, в D₂O: а – ¹H, б – ¹³C.

Таблица 5 – Состав соков яблок (моль % в сухом веществе)

Компонент	Сорт											
	Алеся		Белорусское сладкое		Вербнае		Заславское		Имант		Надзейны	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
β-фруктопираноза	30,6	35,6	40,7	41,0	35,0	33,8	43,2	48,6	35,0	35,7	38,5	39,6
β-фруктофураноза	10,1	11,7	13,4	13,5	11,5	11,1	14,2	15,9	11,5	11,7	12,6	13,0
α-фруктофураноза	2,8	3,2	3,7	3,7	3,2	3,1	3,9	4,4	3,2	3,2	3,5	3,6
α-фруктопираноза	1,2	1,4	1,6	1,6	1,4	1,3	1,7	1,9	1,4	1,4	1,5	1,6
Кетофруктоза	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
Фруктоза (Σ)	44,9	52,2	59,7	60,1	51,3	49,5	63,4	71,2	51,3	52,4	56,4	58,0
β-глюкопираноза	8,9	8,9	9,4	12,1	6,1	9,0	8,2	7,7	8,8	11,6	9,5	12,7
α-глюкопираноза	5,9	6,0	6,2	8,0	4,1	6,0	5,4	5,1	5,9	7,8	6,3	8,5
Глюкоза (Σ)	14,8	14,9	15,6	20,1	10,2	15,0	13,6	12,8	14,7	19,4	15,8	21,2
Сахароза	22,7	15,8	12,8	8,7	22,4	18,6	8,1	4,5	18,7	13,2	11,4	5,2
Сорбитол	5,9	6,6	7,7	7,9	5,1	6,9	5,9	4,5	7,1	8,6	6,4	8,6
Яблочная кислота	9,8	8,5	2,1	1,3	9,0	8,1	7,0	5,0	6,3	4,4	8,0	5,0

Примечания: * 1 – анализ проведен после сбора плодов; ** 2 – анализ проведен после 3 месяцев хранения.

Таким образом, более половины РСВ приходится на фруктозу (рисунок 7), которая представлена 5 изомерами (β -фруктопираноза, β -фруктофураноза, α -фруктофураноза, α -фруктопираноза, кетофруктоза). Существенно ниже количество остальных компонентов. Глюкоза представлена двумя изомерами (β -глюкопираноза и α -глюкопираноза). Несмотря на некоторый разброс результатов анализов, связанный с небольшой выборкой, можно достоверно утверждать, что в процессе хранения яблок в бытовом холодильнике в их соке уменьшается содержание сахарозы и возрастает доля глюкозы и фруктозы. Одновременно уменьшается количество яблочной кислоты.

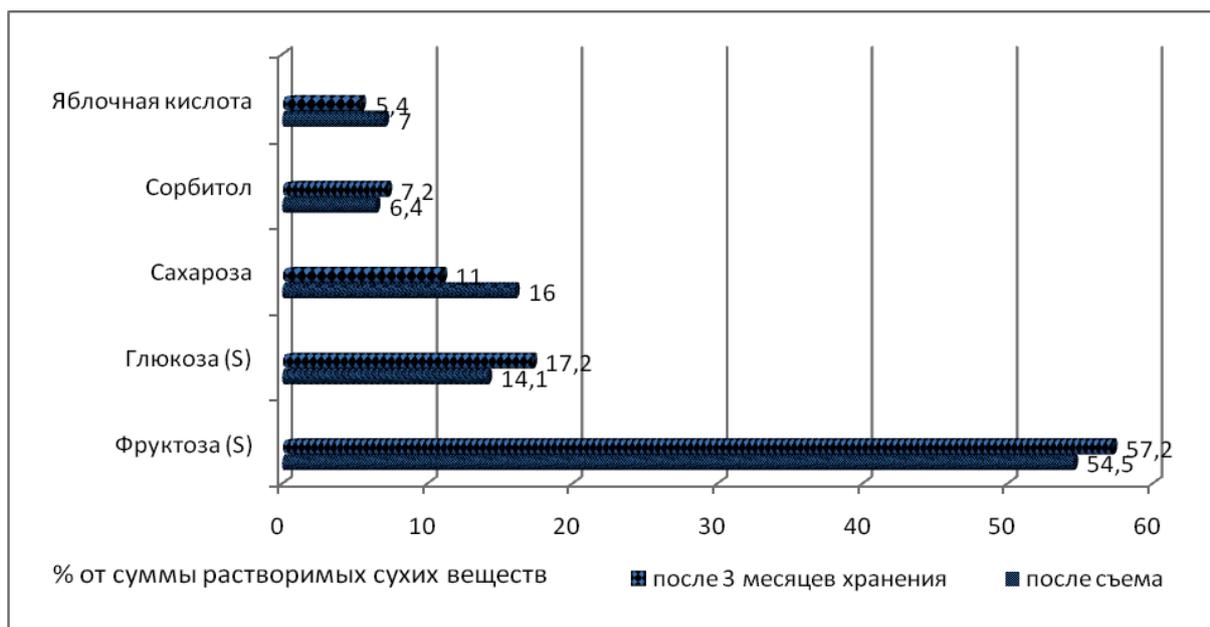


Рисунок 7 – Соотношение сахаров и яблочной кислоты в соке яблок в процессе хранения (средние значения по сортам).

Из таблицы 5 видно, что в соке из яблок сорта Заславское больше, чем в остальных, содержится фруктозы (63–71 % в сухом остатке), глюкозы – в сортах Надзейны и Белорусское сладкое, сахарозы – в сортах Алеся и Вербнае, а сорбитола – в сортах Белорусское сладкое, Имант и Надзейны после хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана высокая информативность использования метода ЯМР в анализе сока яблок.

Проведен первичный анализ растворимых органических компонентов соков сортов яблок позднего срока созревания: Алеся, Белорусское сладкое, Вербнае, Заславское, Имант и Надзейны методом ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C .

Более половины РСВ приходится на фруктозу, которая представлена 5 изомерами. Глюкоза представлена двумя изомерами. В процессе хранения яблок в бытовом холодильнике в соке уменьшается содержание сахарозы и возрастает доля глюкозы и фруктозы. Одновременно уменьшается количество яблочной кислоты.

Сок из яблок сорта Заславское характеризуется более высоким содержанием фруктозы (63–71 % в сухом остатке), сорта Надзейны и Белорусское сладкое – глюкозы, сорта Алеся и Вербнае – сахарозы, сорта Белорусское сладкое, Имант и Надзейны (после хранения) – сорбитола.

Литература

1. Ширко, Т.С. Биохимия и качество плодов / Т.С. Ширко, И.В. Ярошевич. – Мн.: Навука і тэхніка, 1991. – 294 с.
2. Скаковский, Е.Д. Некоторые биохимические показатели плодов и семян районированных в Беларуси сортов аронии черноплодной / Е.Д. Скаковский [и др.] // Перспективы развития технологий хранения и переработки плодов и ягод в современных экономических условиях: материалы междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. д-ра с.-х. наук Р.Э. Лойко, аг. Самохваловичи, 9-11 октября 2012 г. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2012. – С. 156-162.
3. Barclay, T. Observation of keto tautomer of D-fructose in D₂O using ¹H NMR spectroscopy / T. Barclay [et al.] // Carbohydrate Research. – 2012. – Vol. 347. – № 1. – P. 136-141.
4. Angyal, S.J. Conformational analysis in carbohydrate chemistry. III. The ¹³C N.M.R. spectra of the hexuloses / S.J. Angyal, G.T. Bethell // Australian journal of chemistry. – 1976. – Vol. 29. – № 6. – P. 1249-1265.
5. Curatolo, W. Two-dimensional j-resolved ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of α,β -D-glucose at 500 MHz / W. Curatolo [et al.] // Carbohydrate Research. – 1983. – Vol. 112. – P. 297-300.
6. <http://www.aktuelle-wochenschau.de/2008/woche44/w44.html>
7. AISTRIO-DB Spectral Database for Organic Compounds, SDBS/URL [Electronic resource]. – Mode of access: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct.frame_top.cgi. – Date of access: 14.01.2013.

A PRELIMINARY ESTIMATION OF AN APPLE JUICE COMPOSITION USING THE METHOD OF A NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

E.D. Skakovski, L.Yu. Tychinskaya, O.A. Molchanova, A.I. Kolechkina,
N.V. Kukharchik, N.G. Kapichnikova

ABSTRACT

The researches have been made in 2012-2013 in the Institute of physical and organic chemistry of National Academy of Sciences of Belarus together with the Institute for fruit growing. The fruits of 6 late ripening apple cultivars zoned in Belarus were the objects of the research. Among them were the following cultivars: 'Alesya', 'Byelorusskoye sladkoye', 'Verbnaye', 'Zaslavskoye', 'Imant' and 'Nadzejny'. The method of nuclear magnetic resonance (NMR) at the nuclei ¹H and ¹³C was used for the analysis of juice soluble organic components. The spectra were written down on spectrometer AVANCE-500 (Bruker, Germany).

A high informational content of NMR method use in the analysis of apple juice was shown. As a result of the researches it has been established that more than half of soluble dry matters is accounted for by a fructose which is introduced by 5 isomers such as β -fructopyranose, β -fructofuranose, α -fructofuranose, α -fructopyranose and ketofructose. Glucose is introduced by two isomers such as β -glucopyranose and α -glucopyranose. Some changes of the composition of soluble dry matters during apple storage time are presented. They include the reduction of sucrose content and malic acid and increase of glucose and fructose content.

Key words: apple cultivars, juice, fructose, glucose, sucrose, sorbitol, malic acid, nuclear magnetic resonance, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 11.04.2013