Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 33, 2012: 29-35
© Івануса В., Савіна О., Мальцов І., Бриндза Я., 2012



УДК 634.2: 57.063.6

# ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІОХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ПЛОДІВ ГЕНОФОНДУ ЧЕРЕШНІ СЛОВАЧЧИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ FTIR СПЕКТРОФОТОМЕТРА

Івануса В., Савіна О., Мальцов І., Бриндза Я.

***Ідентифікація біохімічних речовин плодів генофонду черешні словаччини за допомогою ftir спектрофотометра.- Івануса В.[1], Савіна О[2]., Мальцов І.[3], Бриндза Я.[4]-****Проведений біохімічний аналіз плодів черешні (Prunus avium L.) з допомогою FTIR спектрофотометра. Встановлена цінність шкірки плоду для косметичної промисловості, так як вона якісно, і кількісно більш багатша на антоціани, білки, ліпіди, вуглеводи, ароматичні та інші речовини. Вимірюванням плодів черешні за допомогою FTIR спектрофотометра можна визначити наявність або відсутність речовин в них навіть без попередньої хімічної обробки.*

***Ключові слова:*** *черешня (Prunus avium L.), FTIR спектрофотометр, сік, шкірка, білково-вуглеводно-жировий склад, коньюговані ароматичні кетони, ідентифікація.*

***Адреса****: 1,4 - Slovak University of Adriculture, Tr. A. Hlinku, 94976 Nitra. Tel.: 037/641 4770, e-mail: Jan.Brindza@uniag.sk; 2- Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000, Україна; 3- Національний ботанічний сад ім. Н. Н. Гришка НАН України, Київ 01014, вул. Тимірязевська, 1, e-mail: maltsov@yandex.ru*

***Identification biochemicals fetuses Genofond Cherry Slovakia bu FTIR Spectrophotometer.-****Ivanusa B.[1], Savina O.[2] , Maltsov I.[3] Bryndza I.[4]-Conducted biochemical analysis of sweet cherry fruit (Prunus avium L.) using FTIR spectrophotometer. The established value of the fruit skin for cosmetic industry, as it is qualitatively and quantitatively more richer in anthocyanins, proteins, lipids, carbohydrates, aromatic and other substances. Fruit pulp is able to accumulate substances amide and amine groups, which are both within the protein, and as other substances. This study helped to ensure that the direct measurement of products using FTIR spectrophotometer can determine the presence or absence of substances in them even without prior chemical treatment.*

***Keywords:*** *cherry (Prunus avium L.), FTIR spectrophotometer, juice, peel, protein-carbohydrate-fat composition, aromatic ketones, the absorption band identification.*

***Address****: 1,4- Slovak University of Adriculture, Tr. A. Hlinku, 94976 Nitra. Tel.: 037/641 4770, e-mail: Jan.Brindza@uniag.sk; 2- Uzhgorod National University, 32 A. Voloshyn St., Uzhgorod, 88000, Ukraine; 3- M.M. Gryshko National Botanic Garden, Kyjiv, 01014, Timirjasev Str., 1, e-mail: maltsov@yandex.ru*

**Постановка проблеми**. Черешня відіграє велике значення у харчуванні людини. Ця культура є об'єктом високодохідної комерційної діяльності не лише за рахунок високого вмісту вітамінів, мінеральних солей, цукрів, а також за зовнішнім виглядом і смаковими характеристиками.

Черешня ціниться за високі харчові властивості. В плодах міститься 7,7-17,0% цукрів, 0,49-1,37% кислот, 0,54-1,16% білків, 0,06-0,39% пектинових речовин; вітамінів А, В1, В2, Е, провітаміна А; мінеральних солей, Са - 18 мг%, Fe - 0,5 мг%, Р - 20% (75,4-84,8%) [1-6].

Зміна вмісту цукрів, органічних кислот і летких речовин упродовж процесу дозрівання відіграють ключову роль у встановленні смаку і можуть впливати на хімічні і сенсорні характеристики (pH, загальну кислотність, мікробіологічну стійкість, солодкість).

Черешня містить різні фенольні з'єднання, які сприяють загальній антиоксидантній активності. Феноли черешні включають флавоноїди (антоціани), флаван-3-оли, флаваноли, гідроксикоричну, гідроксибензойну кислоти, кавову кислоту і р-кумаринові кислотні похідні. Флавоноїди і флаван-3-оли включають катехін, епікатехін, кверцетин-3-глікозид, кверцетин-3-рутинозид і кемпферол-3-рутинозид. Головними антоціанами є ціанідин-3-О-глікозид, ціанідин-3-О-рутинозид, пеонідин-3-О-глікозид, пеонідин-3-О-рутинозид, пеларгонідин-3-О-глікозид, аглікон мальвідин [7]. Поліфеноли і антоціани можуть знизити ризик дегенеративних захворювань, викликаних процесом окислення, таких як рак,

серцево-судинні захворювання й інсульт. Загальний вміст поліфенолів коливається в межах 4,12 – 8,34 мг галової кислоти еквівалент/г сухої маси плоду і загальний вміст дубильних речовин складає 0,19-1,95 мг галової кислоти еквівалент/г сухої маси плоду. Загальна кількість флавоноїдів складає 0,42-1,56 мг рутина еквівалент/г сухої маси плоду і загальний вміст антоціанів – 0,35-0,69 мг ціанідин-3-глікозида еквівалент/г сухої маси плоду [8].

Із-за цікавості промисловості управляти якістю їжі були розроблені швидкі методи спектроскопічних вимірювань присутніх там речовин [9,10]. Так для аналізу суміші і ідентифікації чистих речовин широко використовують ІЧ спектрофотометрію. Перевагами FTIR спектрофотометра є: високе відношення «сигнал/шум», можливість працювати в широкому діапазоні довжин хвиль без зміни диспергуючого елементу, швидка (за долі секунди) регістрація спектру, висока роздільна здатність (до 0,001см$^{-1}$), можливість ідентифікації речовин з концентрацією від 0,05мкг/мл. Кількісний аналіз при цьому відпрацьований на залежності інтенсивності смуг поглинання від концентрації речовини в пробі з похибкою долі відсотка. З допомогою FTIR спектрофотометра проведено аналіз рідких і сухих зразків. При цьому основним обмеженням відмічено довжину спектру, при якій поглинається та чи інша речовина.

**Мета і завдання**. Основна мета досліджень полягала у використанні простої, швидкої і неруйнівної FTIR методології в DRIFTS режимі, порівнянні детермінації хімічних речовин у різних нових генотипах черешні за допомогою побудови кривої методом деконволюції.

**Матеріали і методика досліджень**. У досліджені використовувалось 10 генотипів черешні вирощених в кадастрі Брдарка Словацької Республіки (5 генотипів темного кольору: PA843, PA855, PA2247, PA902, PA817; і 5 – світлого: PA837, PA822, PA844, PA814 и PA830). Плоди зібрані в стані повної біологічної стиглості в пластикову тару і заморожені в морозильних камерах при -15ºС. Перед вимірюванням плоди розморожувались в чашках Петрі при температурі +20ºС. З кожного генотипу використано по 5 плодів і проводилось по 2 вимірювання на кожному соку та м'якоть відділяли від шкірки, яку висушували на фільтрувальному папері.

FTIR спектри зразків вимірювали на FTIR *(Fourier transform infrared)* спектрофотометрі Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) в діапазоні 400-4000см-$^{1}$. Найбільш критичними факторами при успішному використанні FTIR спектрофотометра для продовольчого аналізу виявлена типова підготовка і метод запису спектрів. Його дифузний коефіцієнт відображення (DRIFTS) виявився досить швидким методом, який може використовуватись для виділення сухих речовин без попередньої хімічної обробки. FTIR спектрофотометр вимірює основні частоти різних хімічних зв'язків (C=O, C-O, C-H, O-H, N-H и т.д). Групи спектрів відповідають декільком з'єднанням. У таких спектральних зонах, як 3600-3000 см-$^{1}$, 2400-2000, 1700-1550 см-$^{1}$, відбувається перекриття багатьох груп. Використання деконволюції для спектрів усунули недоліки їх перекриття. Виміряні FTIR спектри автоматично відкоректовані з допомогою вбудованого програмного забезпечення спектрофотометра (Omnic). З допомогою цієї ж програми визначені піки ідентифікованих речовин.

**Результати і обговорення**. ***1. Вимірювання соку черешні з допомогою FTIR спектрофотометра.*** З допомогою FTIR спектрофотометрії визначали білково-вуглеводно-жировий склад продуктів. У сокові черешні, для якого характерні всі основні речовини, які знаходяться в м'якоті плоду, майже у всіх досліджених генотипів зафіксований пік 1034 см-$^{1}$, що зв'язано з валентними коливаннями C-O, C-C, C-N груп, які характерні для білків і вуглеводів. Це свідчить про наявність зафіксованих речовин для всіх генотипів. Виходячи із ідентифікованих кривих видно, що в сокові генотипу PA844 кількість даних речовин дуже низька, а в генотипі PA902 – найбільша.

Смуги поглинання при 1640-1630 см-$^{1}$, 1604-1585 и 1580-1562 см-$^{1}$ зв'язані з валентними коливаннями C=C груп, а 1640-1750см-$^{1}$ - з розтягненою зоною поглинання C=O груп. У сокові більшості досліджуваних генотипів виділяється пік в зоні 1634-1633 см-$^{1}$, зв'язаний з поглинанням ароматичних C=C груп, які містять і антоціани (рис.1).

Площа цих піків для всіх генотипів майже однакова, що свідчить про приблизно однакову кількість присутніх тут речовин. Тільки в генотипу PA902 збільшується інтенсивність поглинання до 1639 см-$^{1}$, що зв'язано з збільшенням кількості C=O груп у порівнянні з іншими генотипами. Як наслідок в сокові генотипу PA902 трохи збільшилася кількість коньюгованих ароматичних кетонів, а в інших досліджуваних генотипів у цій зоні більше води, ліпідів і амінокислот. Також зафіксовані смуги поглинання 3297-3274 см-$^{1}$, що зв'язано з наявністю в більшій кількості амідів и амінів і трохи меншою кількістю OH груп. Тільки в генотипів PA837 и PA844 різко збільшилася інтенсивність поглинання при 3318-3315 см-$^{1}$, що зв'язано зі збільшенням кількості OH груп і зменшенням амідів і амінів (N-H) (рис.1, табл.1).

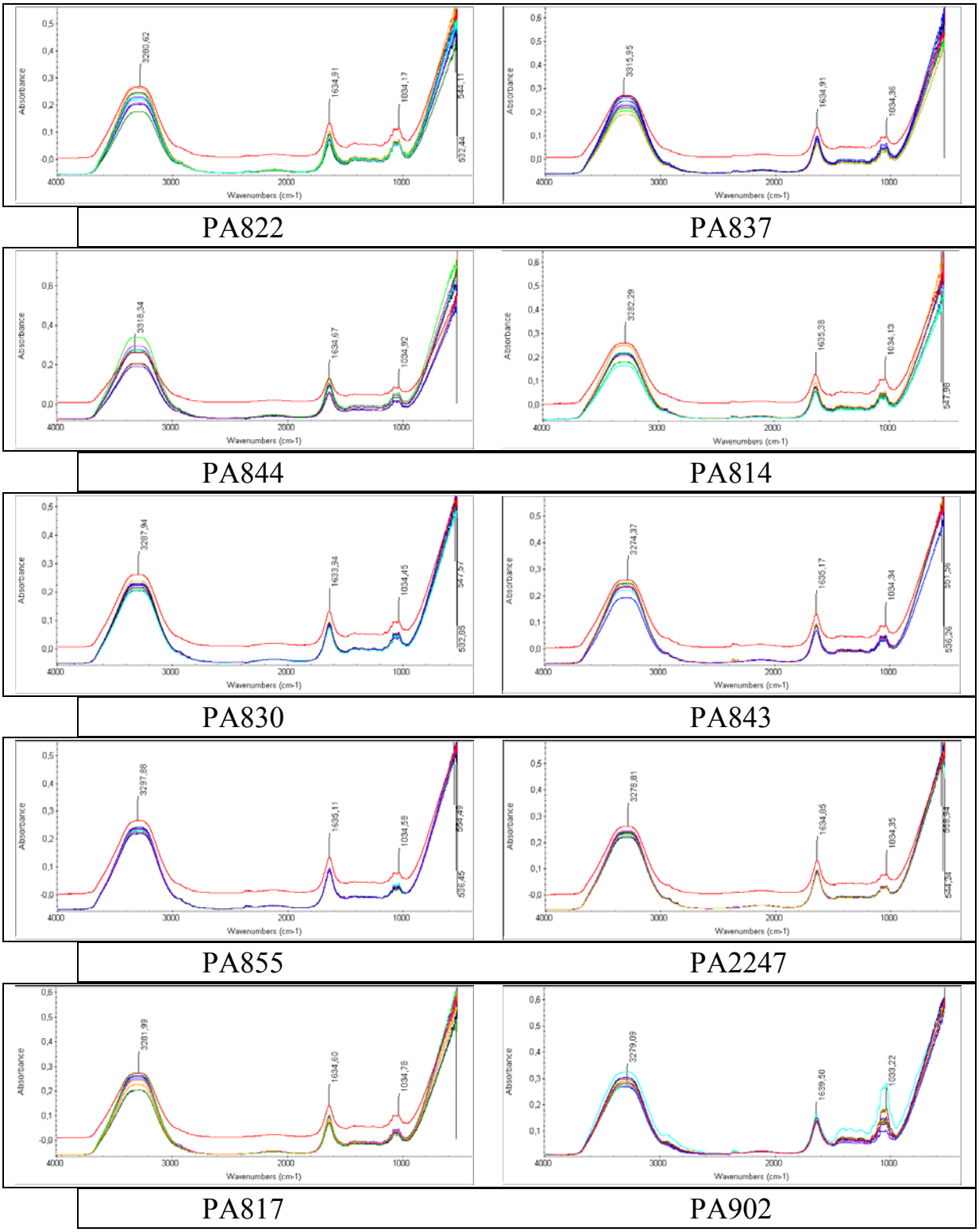


Рис.1. Спектри поглинання, отримані при вимірюванні соку досліджуваних генотипів черешні: PA822, PA837, PA844, PA814, PA830 – плоди світлого кольору, PA843, PA855, PA2247, PA817, PA902 – плоди темного кольору

Таблиця 1- Детермінація хімічних речовин в соці генотипів черешні для довжин хвиль

| Детермінація хімічних речовин / генотипи | 3500-3300, OH, вода, вуглеводи | 3300-3000, N-H, аміди, аміни | 1650-1600, H2O, C=C, $COO^-$, вода, ліпіди, амінокислоти | 1200-1000, CO, CN, вуглеводи, білки |
|---|---|---|---|---|
| PA822 | | 3280,62 | 1634,91 | 1034,17 |
| PA837 | 3315,95 | | 1634,91 | 1034,36 |
| PA844 | 3318,34 | | 1634,67 | 1034,92 |
| PA814 | | 3282,29 | 1635,38 | 1034,13 |
| PA830 | | 3287,94 | 1633,94 | 1034,45 |
| PA843 | | 3274,37 | 1635,17 | 1034,34 |
| PA855 | | 3297,88 | 1635,11 | 1034,58 |
| PA2247 | | 3278,81 | 1634,85 | 1034,35 |
| PA817 | | 3281,99 | 1634,6 | 1034,78 |
| PA902 | | 3279,09 | 1639,5 | 1033,22 |

*Примітка: (PA822, PA837, PA844, PA814, PA830 – плоди світлого кольору, PA843, PA855, PA2247, PA817, PA902 – плоди темного кольору)*

При вимірюванні шкірки вивчених генотипів ідентифіковано набагато більше піків і смуг поглинання, ніж при вимірюванні соку, що свідчить про однорідність забарвлення рідини. Шкірка, відповідно в залежності від впливу променів сонця на неї і місця формування плоду на кроні дерева може бути в різних місцях по-різному забарвлена. Крім того, в шкірці знаходиться набагато більше речовин, ніж у сокові.

У порівнянні з соком, в шкірці плодів даних генотипів ідентифіковано більше OH груп і цукрів (3348-3330см-¹), і практично відсутні піки поглинання амідів і амінів. Тільки в шкірці генотипу PA844 спостерігається накопичення амідних і амінних груп (3288 см-¹), а для генотипу PA837 пік в цій зоні не виявлений із-за низької їх наявності. Отже, плоди черешні мають здатність накопичувати речовини саме в сокові, тільки деякі генотипи здатні накопичувати їх ще і в шкірці, що залежить від самого генотипу.

2. **Вимірювання шкірки черешні з допомогою FTIR спектрофотометра**

Зона 3200-2700 см-¹ характерна для поглинання білків, ліпідів і вуглеводів. Для всіх генотипів виявлено інтенсивне поглинання в зоні 2924-2917 см-¹, що зв'язано з наявністю метиленових $CH_2$ груп, а ближче до 2924 см-¹ їх кількість зростає, ніж при 2917 см-¹, і 2852-2849 см-¹, що зв'язано з наявність метилових $CH_3$ груп.

Пік 1731-1732 см-¹ свідчить про присутність C=O групп (кетонів і алкілестерів). При вимірюванні соку пік в даній зоні не ідентифікований, відповідно накопичення цих речовин більш характерне саме для шкірки плоду черешні. Для всіх генотипів характерні смуги поглинання при 1634-1627см-¹, що зв'язано з наявністю C=C, $COO^-$ груп в ліпідах, амінокислотах і антоціанах. Також збільшилась інтенсивність їх поглинання у порівнянні з соком. Це свідчить про різноманітність антоціанів і їх кількість. Для генотипів PA830, PA855 і PA2247 характерно накопичення коньюгованих ароматичних кетонів в шкірці при 1686 см-¹. Також в PA855 зафіксований пік 1515 см-¹, зв'язаний з поглинанням C=C груп білків і ліпідів.

У зоні 1462-1441 см-¹ зафіксована наявність $CH_2$, $CH_3$, $COO^-$ груп білків, ліпідів, цукрів і амінокислот. Спостерігаються смуги поглинання при 1239-1237 см-¹, зв'язані з присутністю COC и OH груп.

У шкірці досліджуваних генотипів, як і в сокові, ідентифікована зона поглинання для C-O и C-N груп, тільки тут вона більш розтягнена і характеризується смугами 1165-1146 см-¹, 1102-1101, 1018-1015 см-¹, що свідчить про наявність більшої кількості цукрів і білків, ніж в сокові (рис. 2, табл.2).

Аналізуючи графіки вимірювання соку і шкірки встановлено, що у сокові вони більш наближені і за формою майже співпадають, що свідчить про більш однорідну рідину соку. У шкірці вони більш розтягнені між собою і навіть деякі піки зміщені в ту чи іншу сторони, дещо відрізняються за площею навіть в межах одного генотипу.

Це зв'язано з тим, що в залежності від впливу умов середовища і попадання сонячних променів безпосередньо на плід пігменти можуть дещо змінюватися і відрізнятися в різних частинах одного плоду. Але тим не менш з допомогою FTIR спектрофотометра при простому вимірюванні без обробки хімікатами є сенс визначити наявність або відсутність таких речовин.

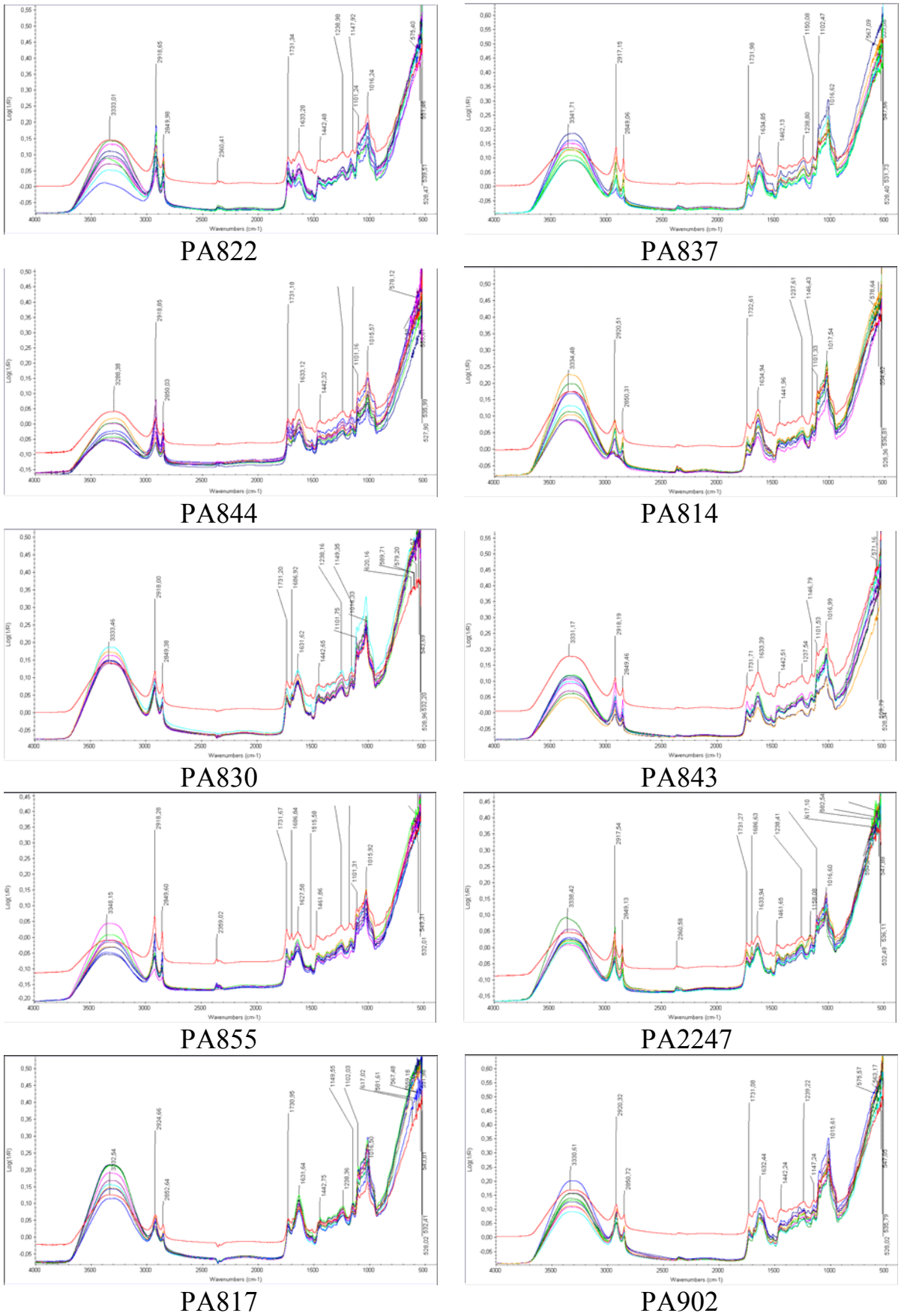


Рис.2. Спектри поглинання, отримані при вимірюванні шкірки досліджуваних генотипів черешні: PA822, PA837, PA844, PA814, PA830 – плоди світлого кольору, PA843, PA855, PA2247, PA817, PA902 – плоди темного кольору

Таблиця 2- Детермінація хімічних речовин в шкірці генотипів черешні для довжин хвиль

| Детермінація хімічних речовин / генотипи | 3500-3300, OH, вода, вуглеводи | 3300-3000, N-H, аміди, аміни | 2925, CH2, білки, ліпіди, вугле-води | 2855, CH3, білки, ліпіди, вугле-води | 1738; 1675 C=O; CN, алкіле-стери; коньюго-вані арома-тичні кетони, білки | 1650-1600, H2O, C=C, COO̅, вода, ліпіди, аміно-кислоти | 1445-1420, CH2, CH3, COO̅, білки, ліпіди, вуглеводи, аміно-кислоти | 1252-1236, COC, OH, алкілестери, вуглеводи | 1200-1000, CO, CN, вуглеводи, білки |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PA822 | 3333,01 | | 2918,7 | 2849,98 | 1731,3 | 1633,28 | 1442,48 | 1238,98 | 1101,24; 1016,24 |
| PA837 | 3341,71 | | 2917,2 | 2849,06 | 1732 | 1634,85 | 1462,13 | 1238,8 | 1150,08; 1102,47; 1016,62 |
| PA844 | | 3288,4 | 2918,9 | 2850,03 | 1731,2 | 1633,12 | 1442,32 | 1237,78 | 1147,80; 1101,16; 1015,57 |
| PA814 | 3334,48 | | 2920,5 | 2850,31 | 1732,6 | 1634,94 | 1441,96 | 1237,61 | 1146,43; 1101,33; 1017,54 |
| PA830 | 3333,46 | | 2918 | 2849,38 | 1731,2; 1686,92 | 1631,62 | 1442,65 | 1238,16 | 1149,35; 1101,75; 1016,33 |
| PA843 | 3331,17 | | 2918,2 | 2849,46 | 1731,7 | 1633,39 | 1442,51 | 1237,54 | 1146,79; 1101,53; 1016,99 |
| PA855 | 3348,15 | | 2918,3 | 2849,6 | 1731,7; 1686,84 | 1627,58; 1515,58 | 1461,86 | 1238,98 | 1165,31; 1101,31; 1018,07 |
| PA2247 | 3338,42 | | 2917,5 | 2849,13 | 1731,3; 1686,63 | 1633,94 | 1461,65 | 1238,41 | 1158,08; 1102,72; 1016,60 |
| PA817 | 3332,54 | | 2924,7 | 2852,64 | 1731 | 1631,64 | 1442,75 | 1238,36 | 1149,55; 1102,03; 1016,50 |
| PA902 | 3330,61 | | 2920,3 | 2850,72 | 1731,1 | 1632,44 | 1442,24 | 1239,22 | 1147,24; 1015,61 |

Примітка: (PA822, PA837, PA844, PA814, PA830– плоди світлого кольору, PA843, PA855, PA2247, PA817, PA902 – плоди темного кольору)

**Висновки.** Використовуючи FTIR спектрофотометр можна визначити присутність тих чи інших речовин у продуктах навіть без попередньої їх хімічної обробки. При вимірюванні шкірки досліджуваних генотипів FTIR спектрофотометром ідентифіковано більше смуг поглинання, ніж при вимірювання соку із-за присутності більшої кількості речовин і різноманітності пігментів. У шкірці плодів черешні міститься більше метиленових і метинових груп, алкілестерів і коньюгованих ароматичних кетонів, яких в сокові не виявлено. Шкірка плодів більш багатша на білки, ліпіди, вуглеводи, антоціани та інші речовини, ніж сок, більш цінна і цікава для досліджень.

Для всіх генотипів характерне накопичення амідних і амінних речовин в сокові, лише генотип PA844 здатен накопичувати їх більше в шкірці, а генотипу PA837 властива дуже низька наявність даних груп в усіх частинах плоду. Генотипи PA830, PA855 і PA2247 характеризуються наявністю в шкірці коньюгованих ароматичних кетонів.

**Подяка. Ця робота була виконана в межах міжнародного науково-дослідницького проекту** «ITMS 26220220115: Підтримка інноваційних технологій для спеціальних біопродуктів для здорового харчування людини» при фінансовій підтримці Європейського фонду регіонального розвитку – Оперативна програма по дослідженнях і розвитку.

Автор Івануса Вікторія виражає вдячність Міжнародному Вишеградському фонду за представлену стипендію на наукове стажування, в ході якого були отримані результати і знання, представлені в цій роботі.

1. Барабаш О.Ю., Хараба В.В. Плодові садові культури. 1999. – 99 с.
2. Mccune, L.M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N.R. & Thomson, C.A. (2011). Cherries and health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51, 1–12.
3. Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., Boyce, M. C. and Saari N., 2012. Compositional Variation in Sugars and Organic Acids at Different Maturity Stages in Selected Small Fruits from Pakistan. International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067
4. Kelebek, H. and Selli, S., 2011. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars. International Journal of Food Science & Technology. Volume 46, Issue 12, pages 2530–2537
5. Revell, J. (2008). Sensory profile & consumer acceptability of sweet cherries. MSc Thesis, University of Nottingham, UK.
6. Usenik, V., Fabčič, J. & Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (Prunus avium L.). Food Chemistry, 107, 185–192.
7. Gonçalves, B., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E. & Meyer, A.S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (Prunus avium L.). Food Chemistry, 103, 976–984.
8. Serra, A.T., Duarte, R.O., Bronze, M.R. and Duarte, C.M.M., 2011. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. Food Chemistry, vol. 125, pp. 318-325.
9. Pappas, C.S., Malovikova, A., Hromadkova, Z., Tarantilis, P., Ebringerova, A., Polissiou, A.M.G., 2004. Determination of the degree of esterification of pectinates with decyl and benzyl ester groups by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and curve-fitting deconvolution method. Carbohydrate Polymers 56, 465–469
10. Применение ИК-спекторофотометрии с Фурье преобразованием для идентификации подлинности продовольственных товаров / Коновалова М.Ю., Евтушенко А.М. // Товароведенье, експертиза и технология продовольственных товаров «Товаровед 2010». – Москва. – 2010. – P.380-389.

Отримано: 11 березня 2012 р.
Прийнято до друку: 12 листопада 2012 р.