

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ И РЕЛАКСАЦИЯ ВОДЫ ОБРАЗЦОВ ЦВЕТОЧНОГО МЕДА ДИКИХ И ДОМАШНИХ ПЧЕЛ

© 2016 г. Т.А. Бабушкина, Т.П. Климова, А.А. Кудашов*,
В.В. Новиков, А.С. Перегудов

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28;

*ООО Агрофирма «Здоровье», 301030, Ясногорск Тульской области, ул. Советская, 4

E-mail: tab@ineos.ac.ru

Поступила в редакцию 20.10.15 г.

Методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР высокого разрешения и ядерной магнитной релаксации исследованы образцы водных растворов башкирского цветочного меда диких и культурных пчел. Показано, что ЯМР-спектроскопия образцов меда может дать в основном качественную информацию о составе изученных образцов меда. Данные о составе минорных компонентов меда (аминокислот), а также о подвижности протонов воды в меде дают основание считать, что различия между бортевым медом и медом из ульев могут быть обусловлены как составом меда, так и разницей во взаимодействии компонентов меда между собой и с водой.

Ключевые слова: спектры ЯМР, метод TOCSY, ядерная магнитная релаксация.

Мед является сложной композицией сахаров (фруктоза и глюкоза) и других биологически активных веществ различной природы. Эти компоненты (белки, свободные аминокислоты, пигменты, витамины и др.), присутствующие в меде, придают ему своеобразные органолептические, питательные и медицинские свойства, чрезвычайно сильно зависящие от растений, с которых он собирается пчелами. Качество меда, его аутентичность изучается различными методами, в том числе и спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопией) (см., например, [1–7]).

Так, было показано методом ^{13}C -ЯМР, что термически преобразованный мед можно идентифицировать по распределению аномеров глюкозы [1]. При нагревании происходит аномеризация глюкозы с образованием ее β -формы, которая не кристаллизуется из воды. Поэтому мед после термической обработки имеет жидкую консистенцию. Однако в других работах [2–4] указывается, что соотношение интенсивностей сигналов ^1H -ЯМР аномерных протонов для α - и β -форм остается неизменным ($\sim 1 : 2$ вне зависимости от термической предыстории образца).

В последнее время широко применяются методы метабономики к анализу ЯМР-спектров

коммерческих образцов меда [5–7]. Этот метод включает рассмотрение всех составляющих компонент образца одновременно, следовательно, можно выявлять полный профиль малейших отличий в наборах компонент данного вида биоматериала. Были исследованы образцы меда в зависимости от их географического и ботанического происхождения. Однако, как было показано в работе [6], методы метабономики не передают соотношения минорных компонент в такой сложной смеси, как мед. При изучении минорных составляющих меда может быть более перспективным 1D selTOCSY – одномерный селективный вариант метода TOCSY (Total Correlation Spectroscopy – суммарная корреляционная спектроскопия). В этом методе возбуждается и дает сигнал только одна спиновая система соединения. Другие сигналы, имеющиеся в спектре, не возбуждаются и, следовательно, отсутствуют [3].

Заметим, что литературные данные по ЯМР меда относятся, главным образом, к образцам меда всех стран, кроме России. Образцы меда различных регионов нашей страны изучались методом ЯМР крайне редко [1,2].

Нас интересовало различие состава меда диких и домашних пчел, поскольку в процессе эволюции изменялась не только анатомия самой пчелы, но и метод извлечения ею нектара из цветка и его переработка. При этом нахождение семьи пчел в дупле еще не гарантирует, что данная семья является дикой, а не отделилась

Сокращения: ЯМР – ядерный магнитный резонанс, TOCSY – Total Correlation Spectroscopy (суммарная корреляционная спектроскопия).

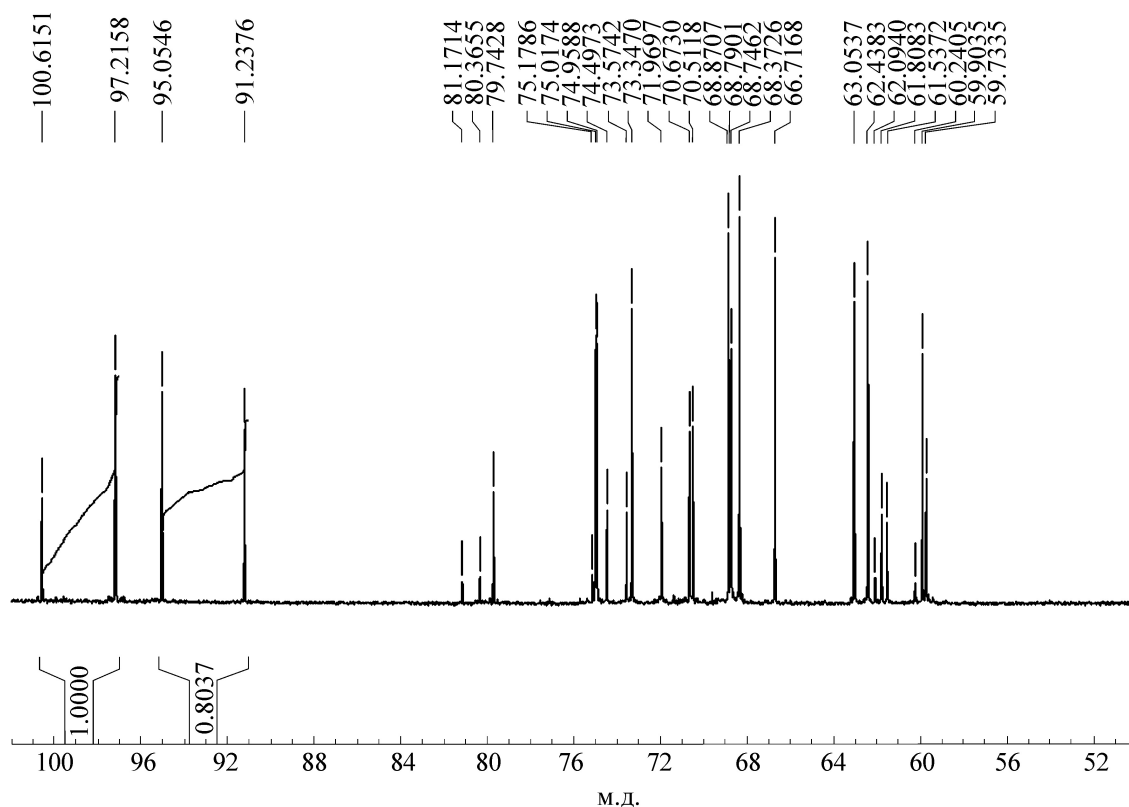


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР образца башкирского меда из ульев.

просто из какого-нибудь улья домашних пчел. Поэтому нами был сужен регион сбора меда и время отбора проб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были изучены образцы башкирского меда из заповедника «Шульган-Таш»: четыре образца меда диких пчел (бортовой мед) (сбор сентябрь–октябрь 2013 г., сентябрь 2014 г. с пергой) и четыре образца меда домашних пчел (сбор сентябрь 2014 г.).

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР были получены на спектрометрах Avance-400 и Avance-600 (Bruker, США). 30 мг меда растворяли в фосфатном буфере на D_2O объемом 0,7 мл. Температура образцов равнялась 25°C . Для увеличения отношения сигнал/шум для сигналов минорных аминокислотных компонентов использовали концентрацию меда ~ 60 мг/0,7 мл и число накоплений до 120 сигналов свободной индукции. Общее время выборки увеличивалось до 10 мин. В спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР в качестве стандарта использовали тетраметилсилан. Для одномерных селективных TOCSY экспериментов на минорных компонентах меда использовали стандартную импульсную последовательность selmlgr из библиотеки импульсных про-

грамм фирмы Bruker. Длительность селективного гауссового 180-градусного импульса составляла 80 мс. Время смешивания для спинлока MLEV-17 составляло 70 мс. Для достижения достаточного соотношения сигнал/шум усредняли результаты 1024-х измерений, что привело к общему времени регистрации спектра в 1 ч.

Времена релаксации воды водных растворов меда (20 мг меда в 0,5 мл дистиллированной воды) измеряли на приборе WM-250 (фирма Bruker, США) с помощью программ «насыщение–восстановление» для спин-решеточного времени T_1 и метода Карр–Парселл–Мейбум–Гилл для спин-спинового времени T_2 [8]. Времена релаксации были изучены в интервале температур $5\text{--}55^\circ\text{C}$ с помощью стандартной температурной приставки B-VT 1000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В значительном количестве мед содержит три компонента: глюкозу, фруктозу и воду [1]. Кроме них содержатся также другие простые сахара и в минорных количествах некоторые аминокислоты. Спектры ^{13}C -ЯМР образцов меда практически идентичны (рис. 1). Сигналы с $\delta = 100,6$ и $97,2$ м.д. относятся к атомам углерода α - и β -аномеров фруктозы, а сигналы

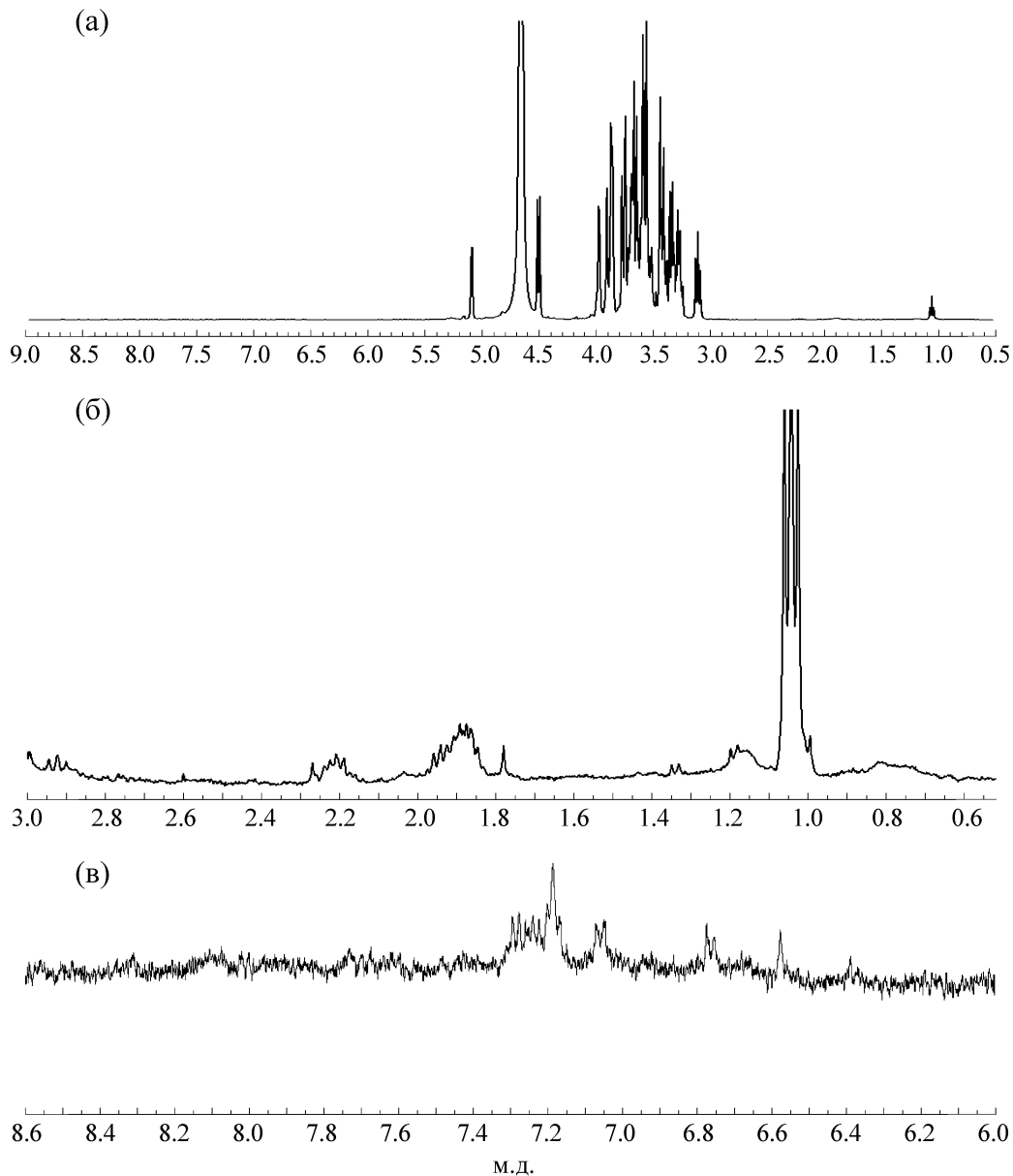


Рис. 2. (а) – Протонный спектр образца (углеводная часть) меда из ульев, (б) – высокопольная часть спектра 2а (число накоплений 120), (в) – низкопольная часть спектра (число накоплений 120).

95,05 и 91,24 м.д. – к атомам β - и α -аномеров глюкозы. Соотношение глюкозы к фруктозе – 0,8:1,0. Это соотношение соответствует цветочному меду, хотя в ряде образцов меда других стран фруктоза может содержаться в гораздо большем соотношении [9]. Аномер β -глюкозы превалирует в образцах бортевого меда и меда из ульев, согласно данным как спектров ¹³C-ЯМР, так и спектров ¹H-ЯМР.

Спектр ¹H-ЯМР изученных образцов меда можно разделить на три области: углеводную (3,0–5,4 м.д.) (рис. 2а), ароматических (8,4–

6,0 м.д.) (рис. 2б) и алифатических протонов (0,8–2,8 м.д.) (рис. 2в).

В слабом поле можно видеть сигналы фенилаланина, тирозина, синглеты муравьиной кислоты (8,4 м.д.), fumarовой кислоты (6,57 м.д.), пирувиновой кислоты (6,39 м.д.). Спектры ¹H-ЯМР башкирского меда в этой области близки к спектрам аргентинского и итальянского меда [4].

В сильном поле (выше 3 м.д.) наиболее сильными являются сигналы пролина (1,8–2,25 м.д.), аланина (1,35 м.д.), ацетата

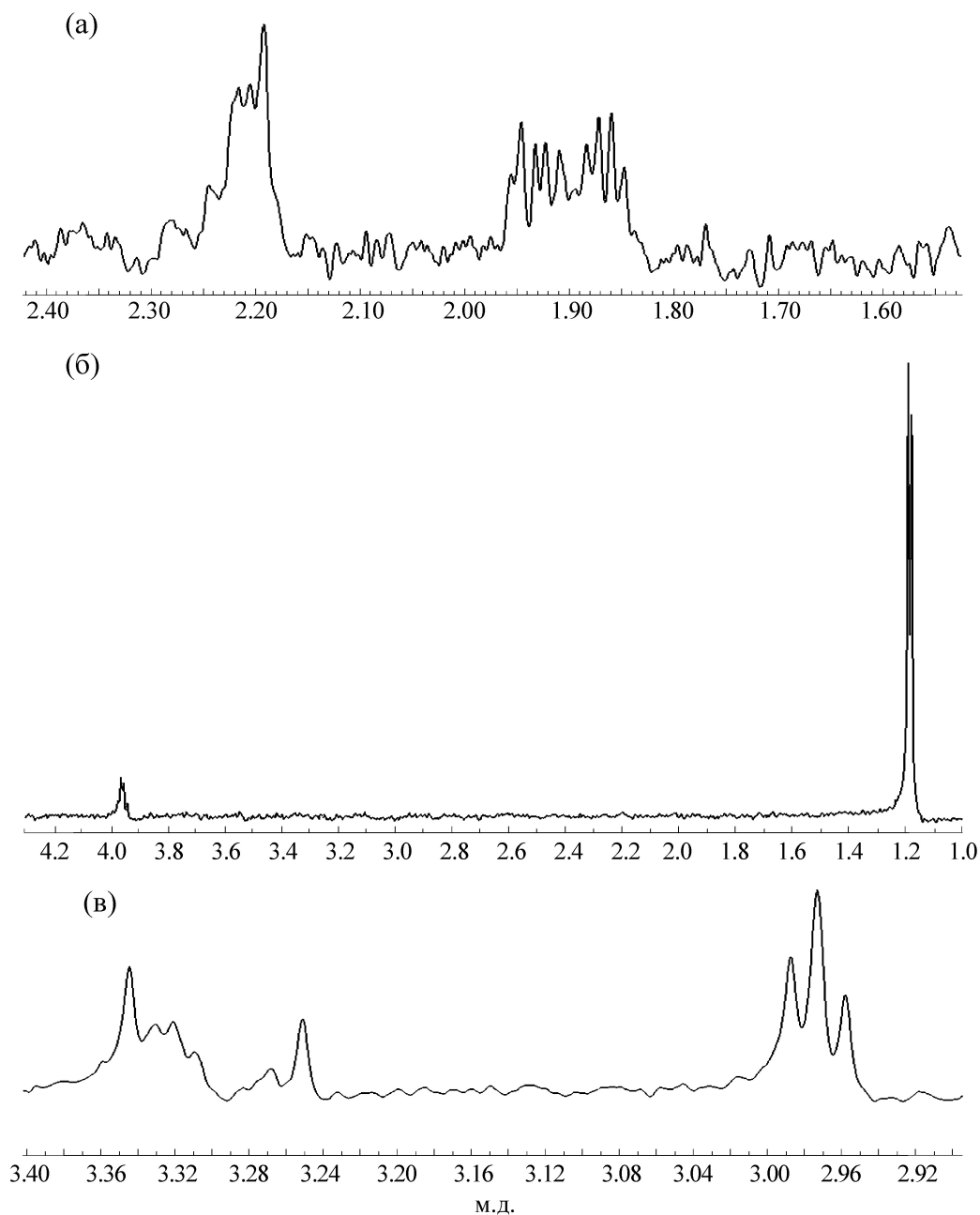


Рис. 3. (а) – ^1H -ЯМР-спектр (пролин) селективного TOCSY для образца башкирского меда из ульев с насыщением сигнала с $\delta = 2,20$ м.д. (б) – ^1H -ЯМР-спектр (молочная кислота) селективного TOCSY для образца башкирского меда из ульев с насыщением сигнала с $\delta = 1,18$ м.д. (в) – ^1H -ЯМР-спектр (алифатическая часть фенилаланина) селективного TOCSY для образца башкирского меда из ульев с насыщением сигнала с $\delta = 2,97$ м.д.

(2,00 м.д.), молочной кислоты (1,18 и 3,95 м.д.) и этилового спирта.

Использование экспериментов селективного насыщения TOCSY дало возможность выделить сигналы пролина (рис. 3а), молочной кислоты (рис. 3б) и алифатической части фенилаланина (рис. 3в).

Сигналы ацетилхолина были обнаружены в образцах бортевого меда ($\delta = 2,27$ м.д.). Со-

держание соединений, таких как моно- и дигидраты метилглиоксаля, которые были найдены в образцах новозеландского меда красного и белого чайного дерева (манука мед) [10,11], в башкирском меде, по-видимому, очень мало, поскольку в спектрах ^1H -ЯМР сигналы этих веществ находятся на уровне шумов.

По данным российского эксперта по меду И.Л. Чепурного [12], мед отечественного про-

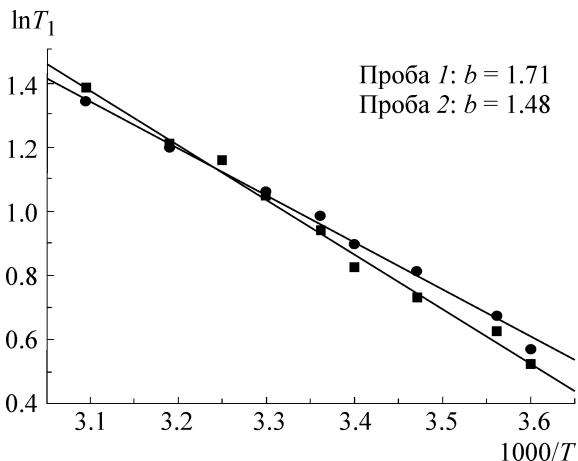


Рис. 4. Зависимость $\ln T_1$ от обратной температуры для образцов башкирского бортевого меда (проба 2) и меда из ульев (проба 1). Значение b – угол наклона соответствующих прямых.

исхождения, в отличие от европейского меда, содержит много треонина (30–70%). В образцах цветочного башкирского меда нами не были обнаружены сигналы ^1H -ЯМР треонина. Европейский мед [13] содержит много пролина и фенилаланина. По своему содержанию аминокислоты в европейском меде составляют следующий ряд: $\text{Phe} > \text{Pro} > \text{Tyr} \sim \text{Lys} > \text{His}$. Образцы меда, изученные в этой работе, также содержат достаточно сильные ^1H -ЯМР-сигналы этих аминокислот. В образцах меда из ульев аминокислоты составляют по содержанию ряд $\text{Pro} > \text{Phe} > \text{Ala} \sim \text{Tyr}$, а в образцах бортевого меда наблюдается последовательность аминокислот $\text{Tyr} > \text{Pro} > \text{Phe} > \text{Ala}$. При этом Pro в образцах меда из ульев больше, чем в бортевом меде, так же как Phe . Содержание пролина является важным критерием при определении качества меда, являясь показателем зрелости меда [13].

Таким образом, ^1H -ЯМР-спектры в области проявления минорных компонентов (аминокислот) различны для бортевого меда и меда из ульев. Отметим также, что в спектрах бортевого меда интенсивность сигналов протонов спирта и ацетилхолина больше, чем в спектрах меда из ульев. Кроме того, в спектрах ^1H -ЯМР образцов бортевого меда присутствуют широкие сигналы достаточной интенсивности в области 5,8–6,2 м.д. и 6,7–6,9 м.д., отсутствующие в образцах меда из ульев. Эти мультиплеты, возможно, относятся к ненасыщенным соединениям, содержащимся в диком меде.

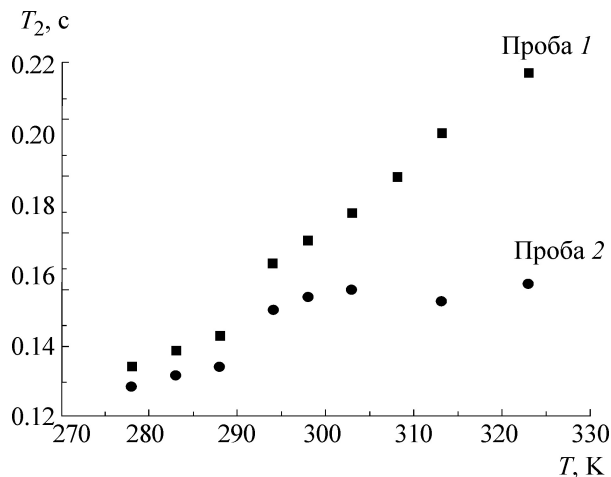


Рис. 5. Зависимость T_2 от температуры для образцов башкирского бортевого меда (проба 2) и меда из ульев (проба 1).

Отличие спектров ^1H -ЯМР образцов бортевого меда и меда из ульев не ограничивается только разным содержанием аминокислот. Протоны воды растворов меда обладают различной подвижностью. Вода в растворах меда достаточно сильно отличается от чистой воды как по значениям T_1 , так и особенно по значениям T_2 . Поскольку мед представляет собой совокупность нескольких видов моносахаров, имеющих в своем составе ОН-группы, то энергия активации движения протонов воды в растворах меда зависит в значительной степени от водородных связей с гидроксильными группами углеводов. Значения времени протонной спин-решеточной релаксации T_1 воды растворов меда того же порядка, что и T_1 объемной воды. Однако температурная зависимость (5–50°C) $T_1(T)$ (рис. 4), в отличие от обычной воды, подчинялась аррениевскому закону с одной константой $\ln T_1 \sim E_a/RT$. Значения E_a для воды растворов меда из ульев были больше (14,2 кДж/моль), чем E_a для воды растворов бортевого меда (12,1 кДж/моль). Эти значения характерны для E_a дистиллированной воды в высокотемпературном диапазоне, где основной вклад в значения T_1 дают вращательные движения «свободных» молекул воды [8].

Необходимо отметить, что значения времени спин-спиновой релаксации T_2 водных растворов меда (0,15–0,50 с) почти в 10 раз меньше, чем для объемной воды (~ 1,5 с). Это может указывать как на достаточно сильное взаимодействие молекул углеводов между собой, так и на участие молекул воды в этом взаимодействии. Подобное изменение времени спин-спиновой релаксации наблюдалось для растворов агара, где также име-

ются две цепочки моносахаров, соединенных между собой молекулами воды [14].

Ранее [15] было найдено два значения T_2 в образцах бразильского меда 0,6–1,8 и 2,3–5,4 мс. Бóльшее значение T_2 для образцов меда от различных растений коррелировало с содержанием воды в меде.

Зависимости T_2 от температуры показаны на рис. 4. Величины T_2 меда диких пчел при нагреве образцов выше 30°C (рис. 5) слабо изменялись в пределах ошибки эксперимента, что указывало на постоянство скорости обмена протонов между водой и гидроксильными протонами углеводов при нагреве.

ВЫВОДЫ

Мед является очень сложной композицией различных веществ, обеспечивающей ему специфические физико-химические свойства. ЯМР-спектроскопия образцов меда может дать в основном качественную информацию о происхождении и о составе меда. Данные о составе минорных компонент (аминокислот) меда, а также о подвижности протонов воды меда дают основание считать, что различия между бортевым медом и медом из ульев могут быть обусловлены как составом, так разницей взаимодействия компонент меда между собой и с водой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. К. Иванова, В. В. Корякина, Е. Ю. Шиц и А. И. Федорова, *Химия растительного сырья*, № 4, 153 (2011).
2. А. Е. Ангервакс и Е. Г. Апушкинский, *Химия растительного сырья*, № 4, 15 (1999).
3. R. Consonni and I. R. Cagliani, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6873 (2008).
4. V. Mazzoni, P. Bradesi, F. Tomi, and J. Casanova, *Magn. Reson. Chem.* **35**, 581 (1997).
5. J. C. Lindon, E. Holmes, and J. K. Nicholson, *Anal. Chem.* **75**, 384A (2003).
6. P. Sandusky and D. Raftery, *Anal. Chem.* **77**, 2455 (2005).
7. M. Ohmenhaeuser, Y. B. Monachova, T. Kuballa, and D. W. Lachenmeier, *Anal. Chem.* (2013). ID825318 (doi.org/10.1155/2013/825318).
8. А. А. Вашман и И. С. Пронин, *Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия* (Энергоатомиздат, М., 1986).
9. V. Kaskoniene and P. R. Venskutonis, *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* **9** (6), 620 (2010).
10. A. L. Gresley, J. Kenny, C. Cassar, et al., *Food Chem.* **135**, 2879 (2012).
11. J. Donarski, D. P. T. Roberts, and A. J. Charlton, *Anal. Methods* **2**, 1479 (2012).
12. И. Л. Чепурной, *Экспертиза меда* (Издательско-торговая корпорация «Дашков и Ко», М., 2002).
13. Х. Хорн и К. Люлльман, *Все о меде: производство, получение, экологическая чистота и сбыт*, пер. с нем. (Астрель, М., 2007).
14. Т. А. Бабушкина, М. И. Бузин, В. Г. Васильевы др., в сб. *Тезисы Международной конференции стран СНГ («Золь-гель»*, Суздаль, 2014), с. 182.
15. R. O. R. Ribeiro, E. T. Marsico, C. S. Cameiro, et al., *Food Sci. Techn.* **55**, 90 (2014).

NMR Spectroscopy and Water Relaxation of the Samples of the Floral Honey from Wild and Domesticated Bees

T.A. Babushkina*, T.P. Klimova*, A.A. Kudashov**, V.V. Novikov*, and A.S. Peregudov*

*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

**Agrocompany "Health", ul. Sovetskaya 4, Yasnogorsk, Tula Region, 301030 Russia

The samples of the Bashkir floral honey from wild and domesticated bees in water solution were investigated by the methods of NMR ^1H and ^{13}C and nuclear magnetic relaxation. It is shown that NMR spectroscopy of the honey samples can give only quality information about the honey's origin. Data on minor honey components (amino acids) and the mobility of honey water protons suggest that the differences between honey from the wild bee and honey from the domesticated bees can be explained by unlike honey constituents, different interaction between honey components and the difference in interaction of honey components with the water.

Key words: NMR spectra, TOCSY method, nuclear magnetic relaxation