

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037558**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.14

(21) Номер заявки
201992537

(22) Дата подачи заявки
2019.11.22

(51) Int. Cl. **G01N 33/02** (2006.01)
G01N 24/08 (2006.01)
A23L 21/25 (2016.01)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА МЕД

(31) **2019101600**

(32) **2019.01.22**

(33) **RU**

(43) **2020.07.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-
ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.К.
АММОСОВА" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Иванова Изабелла Карловна,
Федорова Анна Ивановна,**

**Скороходкина Евдокия Анатольевна
(RU)**

(74) Представитель:
Винокуров А.А. (RU)

(56) **ИВАНОВА И.К. и др. Определение аутентичности и термической преобразованности продуктов пчеловодства методом ЯМР-спектроскопии. // Вопросы питания, 2013. - N 3 - т. 82. с. 72-76.**

ИВАНОВА И.К. и др. Применение метода ¹³C ЯМР-спектроскопии для определения термической преобразованности меда. Химия растительного сырья, 2011, (4), 153-156.

BOFFO Elisangela et al. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. LWT - Food Science and Technology. 2012, 49, 55-63.

**SU-A1-883741
CN-A-107561110**

(57) Изобретение относится к пищевой промышленности, а именно к способу определения термического влияния на мед методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, и может быть использовано для контроля качества пчелиного меда путем определения термического воздействия на мед. Способ определения воздействия высоких температур на мед, включающий приготовление водных растворов меда, для чего используют смеси тяжелой и дистиллированной воды, последующую съемку ¹H-спектров на ЯМР-спектрометре с использованием стандартной импульсной последовательности zgpg с подавлением сигнала растворителя, фазирование спектров в автоматическом режиме, проведение коррекции базовой линии, интегрирование в составе меда дублетного сигнала аномерных протонов β-глюкозы при 4,45 м.д. (J=7,9 Гц) и дублетного сигнала аномерных протонов α-глюкозы при 5,05 м.д. (J=3,7 Гц), отличающийся тем, что рассчитывают соотношение количества α/β-форм глюкозы в исследуемых образцах путем деления интегральных интенсивностей целевых сигналов и при значении соотношения >1 определяют отсутствие воздействия высоких температур, а при значении соотношения <1 - наличие воздействия высоких температур на мед. Заявленное техническое решение основано на учете изменений концентрационного распределения аномеров глюкозы в меде по протонным спектрам. Использование настоящего изобретения позволит сократить затраты времени на анализы и повысить точность определения влияния высоких температур на мед.

B1**037558****037558****B1**

Изобретение относится к пищевой промышленности, а именно к способу определения термического влияния на мед методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, и может быть использовано для контроля качества пчелиного меда путем определения термического воздействия на мед.

Известны лабораторные способы определения влияния высоких температур на мед, например термическое воздействие на мед определяют по показателю диастазного числа (см. ГОСТ 19792-2001. Мед натуральный. Технические условия. Издание официальное - Минск: ИПК Издательство стандартов, 2001. 15 с. Методика санитарного исследования меда (Кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы)/Методика составлена доцентом В.А. Маматовым. - Омск: Омский государственный ветеринарный институт, 1979. 19 с.), которое характеризует активность амилолитических ферментов меда. Определение активности диастазы основано на способности этого фермента расщеплять крахмал на амилодекстрины. Количественно данный показатель выражается диастазными числами (ед. Готе), которые обозначают количество 1% раствора крахмала, расщепляемого диастазой (амилазой), содержащейся в 1 г меда (в пересчете на сухое вещество).

По известной методике для определения диастазного числа используют свежеприготовленные растворы 1% крахмала, 0,58% поваренной соли, йода (для чего в 100 мл воды растворяют 0,5 г металлического йода и 1 г йодистого калия) и 10% меда.

Таким образом, в 11 пробирок разливают 10% раствор одного образца меда и другие компоненты согласно табл. 1, затем закрывают пробками, тщательно перемешивают и помещают в водяную баню на 1 ч при температуре $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Затем их вынимают из водяной бани и охлаждают под струей воды до комнатной температуры, после чего в каждую пробирку добавляют по одной капле раствора йода. В тех пробирках, где крахмал остался не разложенным, появляется синяя окраска, а при его отсутствии раствор принимает темноватую, частично фиолетовую окраски. Последняя, со слабоокрашенным раствором пробирка перед рядом обесцвеченных (с желтоватым оттенком), соответствует диастазной активности испытуемого меда.

Известен способ определения влияния высоких температур на мед методом количественной ^{13}C -спектроскопии ядерного магнитного резонанса по соотношению α/β -форм глюкозы (см. Иванова И.К., Корякина В.В., Шиц Е.Ю. Определение аутентичности и термической преобразованности продуктов пчеловодства методом ЯМР-спектроскопии//Вопросы питания, 2013. - № 3 - Т. 82. С. 72-76).

^{13}C -спектры получают на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Avance III ("Bruker"), имеющем рабочую частоту по углероду 100 МГц. Исследуемые образцы готовят путем растворения 200 мг меда в смеси тяжелой и дистиллированной воды (1:9) объемом 0,5 мл. ^{13}C -спектры регистрируют в режиме широкополосной развязки от протонов с применением составной импульсной последовательности WALTZ-16. Параметры регистрации: количество сканов - 140, длина 30° импульса - 21,6 мкс, время релаксации между сканами - 10 с. При этом фазовая коррекция и коррекция базовой линии осуществляется с помощью пакетов, входящих в программу Top Spin. Температура проведения экспериментов - 27°C , длительность анализов - 30 мин. Запись спектров проводится без вращения образца. Все спектры калибруются относительно TSP. Отнесение химических сдвигов производят при помощи спектров индивидуальных веществ: глюкозы, фруктозы и сахарозы. Для каждой линии рассчитывается интегральная интенсивность, нормированная на суммарную интенсивность линий спектра. Далее, путем суммирования интенсивностей линий по всем атомам углерода, входящим в молекулу аномера, рассчитывается содержание сахаров. В этой работе установлено, что на распределение α/β -форм фруктозы нагрев меда не влияет. Однако в случае глюкозы значение соотношения α/β -форм глюкозы >1 означает отсутствие термического воздействия на мед, а при <1 - нагрев меда.

К недостаткам перечисленных методик следует отнести:

при нагревании меда и длительном хранении (более года) диастаза частично или полностью инактивируется, при этом фальсификация меда также приводит к снижению активности диастазы;

определение термического воздействия на мед по соотношению интегральных интенсивностей α/β -форм глюкозы в составе меда, полученных по ^{13}C -спектрам, является точным, но трудоемким и длительным по времени анализом.

Таким образом, по значению диастазного числа невозможно отличить нагретый мед от старого или фальсифицированного, поскольку все они характеризуются низкими диастазными числами, что снижает достоверность оценки нагрева меда.

Задача, на решение которой направлено заявленное изобретение, выражается в повышении экспрессности и достоверности оценки воздействия высоких температур на мед.

Технический эффект, получаемый при решении поставленной задачи, выражается в получении способа определения термического воздействия на мед путем определения соотношения аномеров глюкозы в составе меда с использованием метода ^1H -ЯМР-спектроскопии, что исключает неточности, связанные с интерпретацией диастазного числа, которое может иметь заниженные значения как при нагреве меда, так и при его нагревании и фальсификации.

Для решения поставленной задачи способ определения воздействия высоких температур на мед включает приготовление навески меда, растворение навески в смеси тяжелой и дистиллированной воды,

съемку ^1H -спектров свежеприготовленных водных растворов меда на ЯМР-спектрометре, интегрирование сигналов аномерных протонов глюкозы в составе меда: дублетного сигнала аномерных протонов β -глюкозы при 4,45 м.д. ($J=7,9$ Гц) и дублетного сигнала аномерных протонов α -глюкозы при 5,05 м.д. ($J=3,7$ Гц), при этом расчет соотношений количества α/β -форм глюкозы в исследуемых образцах проводят путем деления интегральных интенсивностей целевых сигналов и при значении соотношения >1 определяют вывод о том, что мед не был предварительно подвергнут воздействию высоких температур, а при значении соотношения <1 - мед был предварительно нагрет.

Сопоставительный анализ признаков заявленного решения с признаками аналогов свидетельствует о соответствии заявленного решения критерию "новизна".

Совокупность признаков изобретения обеспечивает решение заявленной технической задачи, а именно сокращение времени анализа и повышение точности определения влияния высоких температур на мед, которое учитывает изменение концентрационного распределения аномеров глюкозы в меде по протонным спектрам.

Достоверное определение термической обработки меда необходимо для контроля качества меда и продовольственной безопасности населения. Известно, что при нагревании меда при температуре выше 50°C происходит разрушение биологически активных веществ в составе меда, в результате чего мед утрачивает свои полезные свойства, при этом в нем возможно образование токсичного вещества - оксиметилфурфурола, который обладает канцерогенными свойствами и при употреблении может способствовать угнетению центральной нервной системы, вызвать паралич и инициировать развитие злокачественных опухолей. В связи с этим необходима точная и достоверная оценка определения и установление факта предварительного термического воздействия на мед.

Существующие способы оценки термического влияния на мед по значению диастазного числа не достоверны, т.к. диастазное число является показателем не только нагрева, но и длительности хранения, а также фальсификации меда, а определение соотношения аномеров глюкозы по углеродным спектрам является точным, но длительным по времени и обработке полученных результатов анализом. В предложенном изобретении решается задача повышения точности определения термического воздействия на мед и сокращения длительности анализа определения соотношения аномеров глюкозы.

Способ осуществляется следующим образом.

Взвешивают навеску меда массой 200 мг, растворяют навеску в смеси тяжелой и дистиллированной воды (1:9) объемом 0,5 мл, снимают ^1H -спектр свежеприготовленного раствора меда на ЯМР-спектрометре Avance III 400 МГц (Bruker), интегрируют дублетные сигналы аномерных протонов глюкозы: аномерных протонов β -глюкозы при 4,45 м.д. ($J=7,9$ Гц) в интервале 4,39-4,48 м.д. и дублетного сигнала аномерных протонов α -глюкозы при 5,05 м.д. ($J=3,7$ Гц) в интервале 4,97-5,05 м.д., рассчитывают концентрации аномеров глюкозы и находят соотношение α/β -форм глюкозы в исследуемом образце, в случае, если значение соотношения >1 , значит мед не был подвергнут воздействию высоких температур, если <1 - мед нагревался.

Особенностью предложенного способа является определение термического влияния на мед, где соотношение α/β -форм глюкозы определяют по протонным спектрам меда. В результате этого исключаются погрешности, связанные с определением нагрева меда по диастазному числу, поскольку этот показатель характеризует не только нагрев, а также длительность хранения и фальсификацию меда, а длительность анализа сокращается с 27 до 2 мин для получения углеродного и протонного спектра меда соответственно.

Таким образом, при проведении определения термической обработки меда по данной методике производится учет изменений концентраций α - и β -форм глюкозы по протонным спектрам меда методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, что предопределяет точное определение действия высоких температур на мед и сокращение длительности анализа с 30 до 2 мин.

Пример конкретного выполнения заявленного изобретения.

Для демонстрации влияния высоких температур на распределение аномеров глюкозы в меде по предложенному способу определяют соотношение α/β -форм глюкозы в весовых образцах меда до и после их нагрева. Закристаллизованные весовые образцы были приобретены с частных пасек - урожай 2010 г., которые различаются своим геоботаническим происхождением:

№1 Мед "Разнотравие", урожай 2010 г. (Алтайский край);

№ 2 Мед "Расторопша", урожай 2010 г. (Оренбургская область);

№ 3 Мед "Липа", урожай 2010 г. (Приморский край).

Эти же образцы были подвергнуты термическому воздействию на водяной бане до их перехода в вязкотекучее состояние с полным расплавлением кристаллов.

В сухих бюксах готовили навески исследуемых образцов массой 200 мг. Непосредственно перед анализом каждую навеску растворяли в смеси тяжелой и дистиллированной воды с добавлением внутреннего стандарта TSP (1:9) объемом 0,5 мл. Снимали ^1H -спектры свежеприготовленных растворов меда на ЯМР-спектрометре Avance III 400 МГц (Bruker). При съемке ^1H -спектров использовали стандартную импульсную последовательность zgpg с подавлением сигнала растворителя методом преднасыщения сиг-

нала воды. Спектры фазировались в автоматическом режиме, при этом проводили коррекцию базовой линии, интегрировали целевые сигналы аномерных протонов глюкозы в интервалах: 4,39-4,48 м.д. для протонов β -глюкозы и 4,97-5,05 м.д. для протонов α -глюкозы, длительность анализов 2 мин. Температура съемки 25°C. Отнесение сигналов осуществляли по TSP. Рассчитывали интегральные интенсивности аномеров глюкозы и определяли соотношение α/β -форм глюкозы в исследуемых образцах. Инструментальная ошибка интегрирования составляла 3% (см. Г.А. Калабин, Л.В. Каницкая, Д.Ф. Кушнарв. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. - М.: Химия, 2000. 408 с.).

Полученные результаты представлены в табл. 2 и на фиг. 1-3:

¹H-спектры ЯМР образца меда № 1 до (А) и после (Б) его термической обработки (фиг. 1);

¹H-спектры ЯМР образца меда № 2 до (А) и после (Б) его термической обработки (фиг. 2);

¹H-спектры ЯМР образца меда № 3 до (А) и после (Б) его термической обработки (фиг. 3).

Результаты исследования показывают (см. фиг. 1-3), что полученные протонные спектры всех водных проб имеют идентичный характер и отличаются только по интенсивностям отдельных линий. В образцах до нагрева преобладает α -глюкоза, а после нагрева - ее β -форма. Соотношение α/β -форм глюкозы в образцах до нагрева имеет значение >1 , а в образцах после нагрева <1 (см. табл. 2). Следовательно, соотношение аномеров глюкозы, полученных по протонным спектрам меда, может выступать критерием термического воздействия на мед.

Результаты анализа исследуемых образцов по прототипу приведены в табл. 3 и на фиг. 4-6:

¹³C-спектры ЯМР образца №1 до (А) и после (В) его термической обработки (фиг. 4);

¹³C-спектры ЯМР образца №2 до (А) и после (В) его термической обработки (фиг. 5);

¹³C-спектры ЯМР образца №3 до (А) и после (В) его термической обработки (фиг. 6).

Результаты исследования показывают (см. фиг. 1-3), что полученные углеродные спектры всех водных проб меда имеют идентичный характер и отличаются только по интенсивностям отдельных линий. Видно, что интенсивность пиков α -глюкозы в меде до термической обработки выше, чем у β -аномера, а после термического воздействия распределение аномеров глюкозы обратное. При этом во всех образцах сахара присутствует в следовых количествах, что говорит о зрелости исследуемых проб меда (см. табл. 3). Глюкоза и фруктоза содержатся в приблизительно равных пропорциях. В меде до нагревания преобладают α -глюкоза и β -фруктоза. Причем температурное воздействие на распределение аномеров фруктозы не влияет. Вероятно, этот факт можно объяснить тем, что изначально в натуральном меде аномеры фруктозы находятся в концентрациях, близких к равновесным. В противовес этому, глюкоза находится в состоянии далеко от равновесного и среди таутомеров доминирует неустойчивый изомер - α -D-глюкопираноза. Нагрев проб привел к аномеризации α -глюкозы с образованием более термодинамически выгодного диастереомера - β -D-глюкопиранозы. Если соотношение аномеров фруктозы во всех образцах до нагрева и после нагрева меда не изменяется и составляет 0,3, то соотношение α/β -форм глюкозы в образцах до нагрева имеет значение >1 , а в образцах после нагрева <1 , что позволяет в качестве показателя термической преобразованности меда использовать соотношение аномеров глюкозы, как наиболее чувствительного к температурному воздействию. Следует отметить, что получение углеродного спектра водного раствора меда составляет 30 мин, а его расшифровка и обработка является трудоемким и длительным по времени процессом.

Таким образом, опираясь на проведенные испытания, можно заключить, что техническим результатом изобретения является сокращение времени анализа и повышение точности определения влияния высоких температур на мед, которое учитывает изменение концентрационного распределения аномеров глюкозы в меде по протонным спектрам, что будет способствовать продовольственной безопасности и улучшению качества потребляемых населением продуктов пчеловодства.

Таблица 1

Ход анализа определения диастазного числа для одной пробы натурального меда

Компоненты	Номера пробирок										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10% раствор меда, мл	1,0	1,3	1,7	2,1	2,8	3,6	4,6	6,0	7,7	11,1	15
Дистиллированная вода, мл	9,0	8,7	8,3	7,9	7,2	6,4	5,4	4,0	2,3	-	-
0,58% раствор поваренной соли, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1% раствор крахмала, мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Диастазное число (ед. Готе)	60	38	29,4	23,8	17,9	13,9	10,9	8,0	6,5	4,4	3,3

Таблица 2

Содержание и соотношение аномеров глюкозы в различных марках меда до и после термической обработки по данным количественной ^1H -ЯМР-спектроскопии

Образец меда	Содержание аномера* (%)		Соотношение аномеров α -глюкоза/ β -глюкоза
	α - глюкоза	β -глюкоза	
Образцы меда до термической обработки			
№1	71,3±2,1	28,7±0,8	2,5
№2	67,6±2,0	32,4±1,0	2,1
№3	65,3±2,0	34,7±1,0	1,9
Образцы меда после термической обработки			
№1	41,3±1,2	58,7±1,8	0,7
№2	41,5±1,2	58,5±1,8	0,7
№3	42,9±1,3	57,1±1,7	0,8

Прим.: * - расчет проведен, считая за 100% содержание аномеров глюкозы

Таблица 3

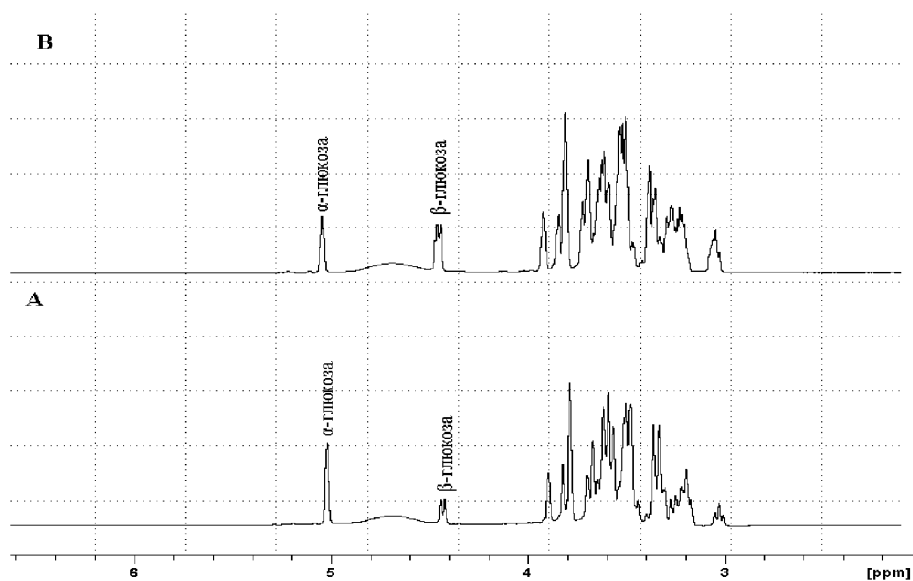
Состав и содержание глюкозы и фруктозы в исследуемых образцах меда методом количественной ^{13}C - ЯМР-спектроскопии

Образец	Глюкоза, %	α - β -глюкоза, %_%	α - β -глюкоза	Фруктоза %	α - β -фруктоза %_%	α - β -фруктоза	глюкоза/фруктоза	Сахароза
Образцы меда до термической обработки								
№1	51,5 $\pm$ 1,5	28,1_23,4	1,2	48,5 $\pm$ 1,4	10,1_38,4	0,3	1,1	Следы
№2	52,5 $\pm$ 1,6	34,6_17,9	1,9	47,5 $\pm$ 1,4	10,0_37,5	0,3	1,1	Следы
№3	55,2 $\pm$ 1,7	34,2_21,0	1,6	44,8 $\pm$ 1,3	9,8_35,0	0,3	1,2	Следы
Образцы меда после термической обработки								
№1	53,6 $\pm$ 1,6	22,3_31,3	0,7	46,4 $\pm$ 1,3	10,2_36,2	0,3	1,2	Следы
№2	53,2 $\pm$ 1,5	22,5_30,7	0,7	46,8 $\pm$ 1,4	10,1_36,7	0,3	1,1	Следы
№3	54,5 $\pm$ 1,6	23,0_31,5	0,7	45,4 $\pm$ 1,3	9,5_35,9	0,3	1,2	Следы

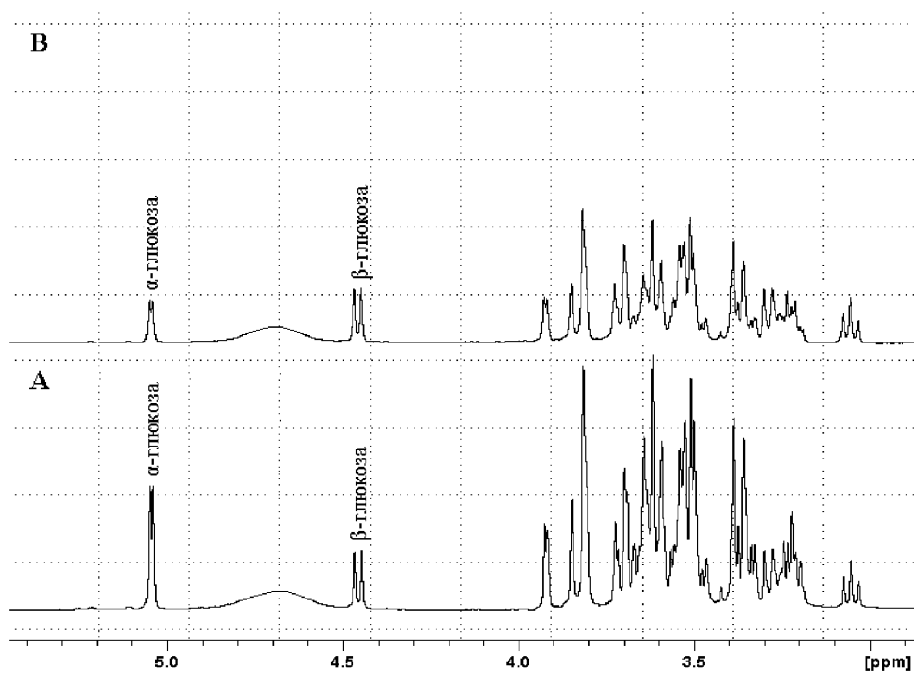
Прим.: * - расчет проведен, считая за 100% содержание аномеров глюкозы и фруктозы

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

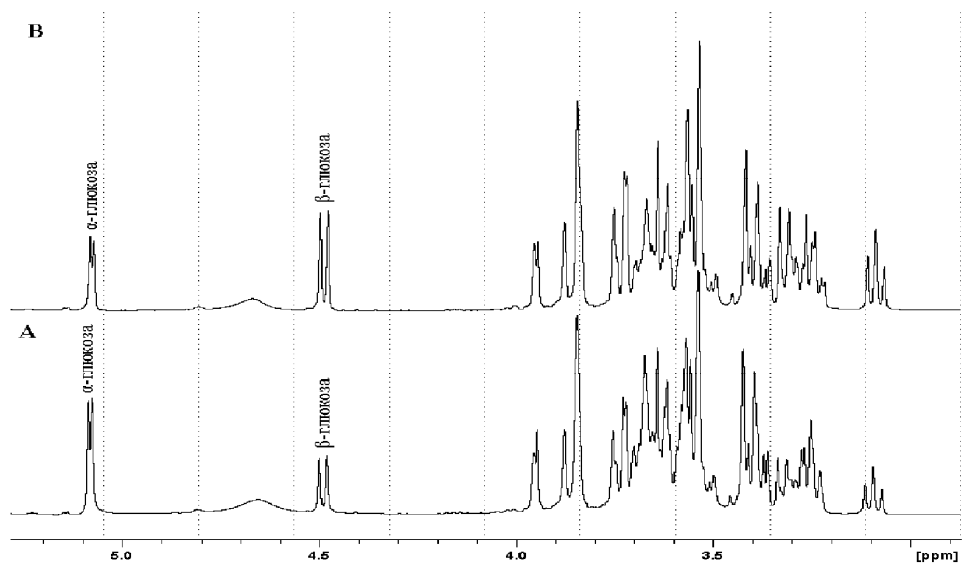
Способ определения воздействия высоких температур на мед, включающий приготовление водных растворов меда для последующей съемки ^1H -спектров на ЯМР-спектрометре с использованием стандартной импульсной последовательности zgpg с подавлением сигнала растворителя, фазирование спектров в автоматическом режиме, проведение коррекции базовой линии, интегрирование в составе меда дублетного сигнала аномерных протонов β -глюкозы при 4,45 м.д. и дублетного сигнала аномерных протонов α -глюкозы при 5,05 м.д., отличающийся тем, что рассчитывают соотношение количества α/β -форм глюкозы в исследуемых образцах путем деления интегральных интенсивностей целевых сигналов и при значении соотношения >1 определяют отсутствие воздействия высоких температур на мед, а при значении соотношения <1 - наличие воздействия высоких температур на мед.



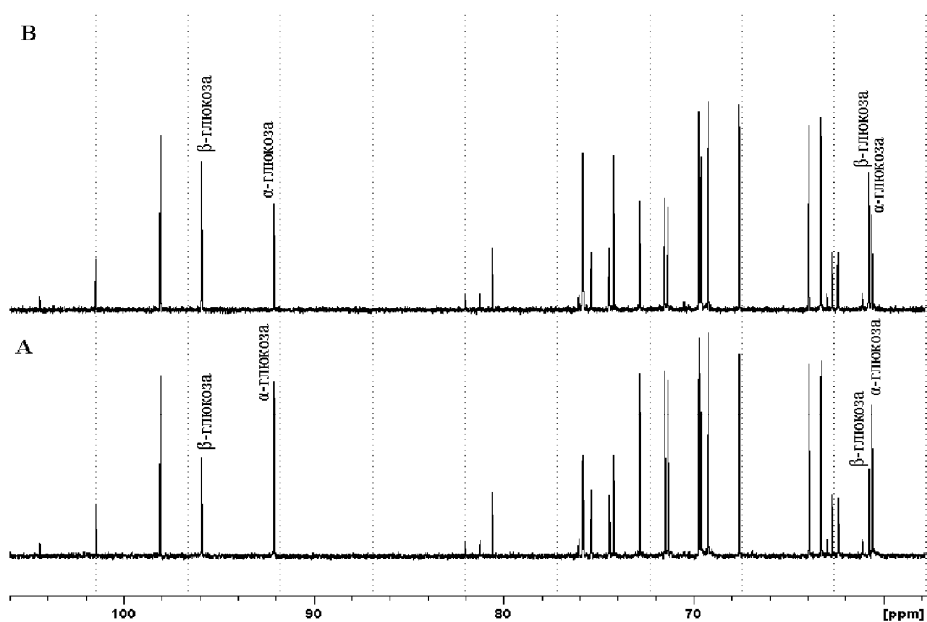
Фиг. 1



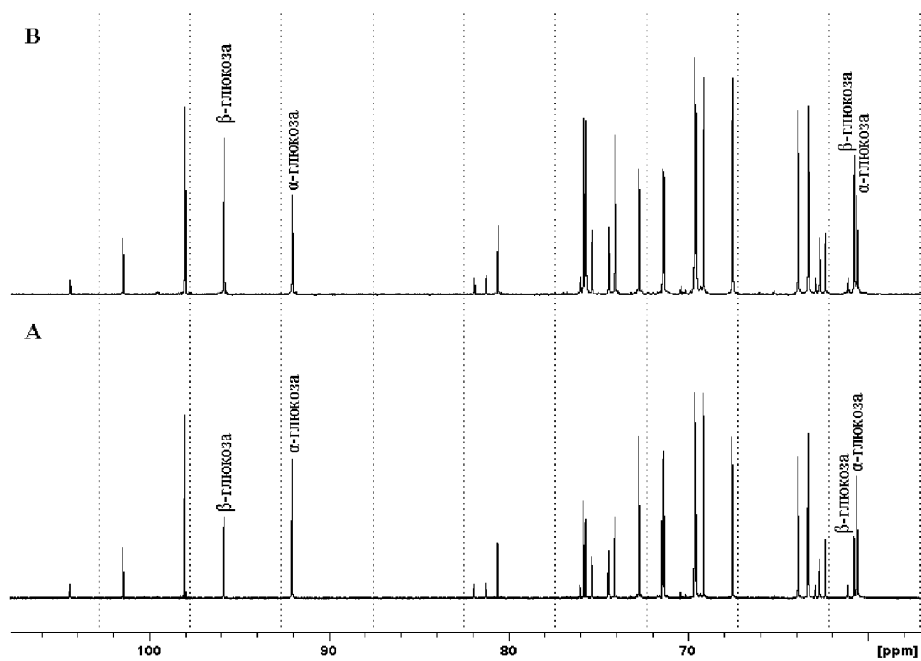
Фиг. 2



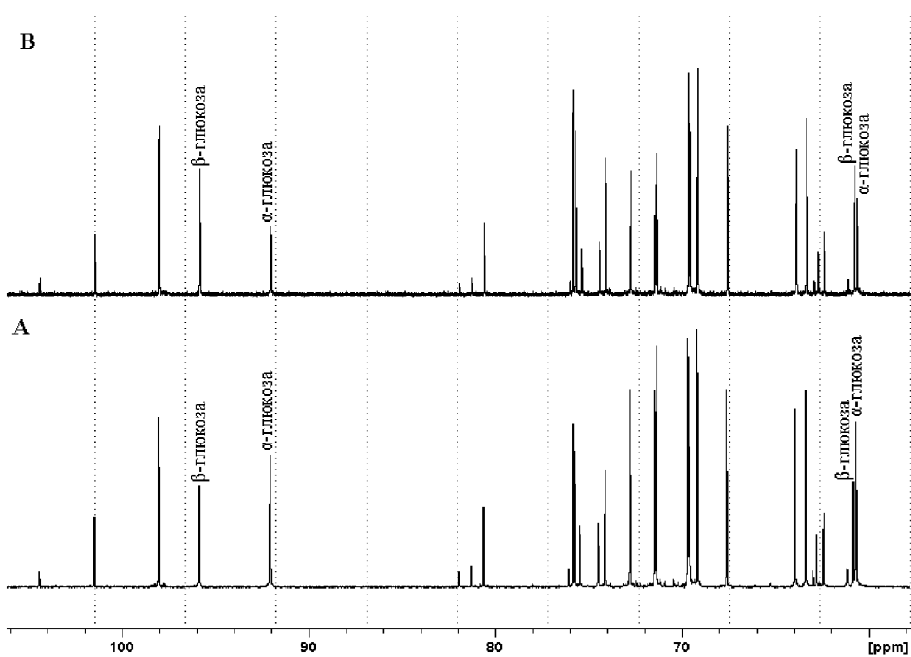
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2