

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zastosowanie fluorescencyjnej spektroskopii synchronicznej do oceny jakości próbek ziarna pszenicy i nasion rzepaku

MAŁGORZATA TAŃSKA¹, IWONA KONOPKA¹, BOGDAN SMYK², STANISŁAW KONOPKA³
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE, WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI,
¹KATEDRA PRZETWÓRSTWA I CHEMII SUROWCÓW ROŚLINNYCH, ²KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI,
WYDZIAŁ NAUK TECHNICZNYCH, ³KATEDRA MASZYN ROBOCZYCH I METODOLOGII BADAŃ

Słowa kluczowe: pszenica, rzepak, fluorescencyjna spektroskopia synchroniczna, analiza składowych głównych

STRESZCZENIE

Celem prezentowanych badań było określenie możliwości zastosowania synchronicznej fluorescencji do odróżniania próbek ziarna pszenicy oraz nasion rzepaku różniących się jakością. Ocenie poddano próbki ziarna/nasion „zdrowych” oraz eksperymentalnie uszkodzonych termicznie (przesuszenie) i hydrolityczno-mikrobiologicznie (przechowywanie w warunkach podwyższonej wilgotności). Jakość kontrolnych próbek ziarna pszenicy i nasion rzepaku oceniono za pomocą standardowych wyróżników technologicznych oraz za pomocą analizy zawartości wybranych związków bioaktywnych (kwas fenolowy, toko-chromanole, chlorofile). Wszystkie próbki poddano analizie spektralnej wykorzystując rejestrację synchroniczną widm fluorescencji. Zastosowanie analizy składowych głównych (PCA) pozwoliło na wskazanie głównych obszarów spektralnych wskazujących na różne typy (jakość) analizowanych próbek. Zastosowane warianty uszkodzenia ziaren/nasion bardziej wpłynęły na próbki nasion rzepaku.

Application of synchronous scanning fluorescence spectroscopy to analysis quality of wheat grain and rapeseed samples

Keywords: wheat, rapeseed, synchronous scanning fluorescence spectroscopy, principal component analysis

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the possibility of using synchronous fluorescence to distinguish the wheat grain and rapeseed samples of different quality. We compared "healthy" grain/seed samples and experimentally damaged by heat (drying) and moisture-microbial deteriorated by storing at high moisture content. Quality of control samples was evaluated using standard methods according to Polish Standards. Additionally some selected bioactive compounds (phenolic acids, tocochromanols and chlorophylls) were also analyzed. All samples were subjected to spectral analyses using synchronous fluorescence spectroscopy. Application of principal component analysis (PCA) allowed us to identify the main areas indicating different spectral types (quality) of the analyzed samples. Utilized variants of the grains/seeds deterioration affected more significantly the rapeseed samples quality.

1. WSTĘP

Poszukiwanie szybkich i czułych metod oceny jakości surowców i gotowej żywności jest jednym z podstawowych kierunków rozwoju analityki związanej z oceną i bezpieczeństwem żywności. Ze względów praktycznych i z punktu widzenia ochrony środowiska powinny to być metody niszczące oraz niewykorzystujące odczynników chemicznych [1]. Do takich metod można zaliczyć np. techniki spektroskopowe, analizujące obrazy w zakresie światła widzialnego, w podczerwieni, czy też wykorzystujące zjawisko fluorescencji. W praktyce coraz częściej techniki te opierają się na analizie bardzo złożonych trójwymiarowych macierzy danych wejściowych „data cubes”, pozyskiwanych w procesach zwanych obrazowaniem hyperspektralnym i skanowaniem synchronicznym [2, 3].

Podczas badania fluorescencji próbek surowców/żywności analizuje się odpowiedź obecnych w nich fluoroforów, do których należą, m.in.: tryptofan, kwasy fenolowe, witamina A, ryboflawina, związki Maillarda i chlorofile [4]. Zaletą fluorescencji w porównaniu do innych technik spektrofotometrycznych jest przede wszystkim jej wysoka czułość i szybkość pomiaru [2]. Ważna jest również możliwość tworzenia wielowymiarowych baz informacji o próbkach podczas skanowania synchronicznego, których analiza pozwala na klasyfikację lub skuteczne różnicowanie/odróżnianie obiektów [4]. Fluorescencję synchroniczną wykorzystano, m.in.: do klasyfikacji różnych typów mąki [5], określenia odmiany, typu i rocznika win

[1, 6] oraz badań rodzaju i jakości oleju [7-9]. Ze względu na ogromną ilość zbieranych informacji podczas skanowania synchronicznego przy analizie wyników konieczna jest ich odpowiednia obróbka matematyczna. Do tego celu wykorzystuje się coraz częściej narzędzia chemometrii, np. analizę składowych głównych (PCA), której zastosowanie pozwala na znaczącą redukcję liczby analizowanych zmiennych [10].

Celem prezentowanych badań było określenie możliwości zastosowania fluorescencyjnej spektroskopii synchronicznej do odróżnienia próbek ziarna pszenicy oraz nasion rzepaku o różnej jakości. Zróżnicowanie jakości polegało na wyróżnieniu z każdego gatunku próbek: 1) kontrolnych, 2) uszkodzonych termicznie i 3) uszkodzonych przez przechowywanie przy podwyższonej wilgotności. Jako wariant 4 przyjęto próbki z opisu 3, które dodatkowo odtłuszczono eterem naftowym.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 Materiał badawczy

Wyjściowy materiał badawczy stanowiły ziarna pszenicy odmiany Muszelka (wilgotność 12%) oraz nasiona rzepaku odmiany Nelson (wilgotność 6%). Wstępne testy technologiczne (dane nie zamieszczone) wskazały na zgodność jakości próbek z wymaganiami polskich norm [11, 12], co wskazuje na ich przydatność do celów konsumpcyjnych. W materiale wyjściowym określono ponadto zawartość kwasów fenolowych [13] i tokoferoli [14], a w nasionach rzepaku również chlorofili [15]. Dane te zamieszczono w Tabeli 1 i na Ry-

sunku 1. Główny etap badań rozpoczęto od przygotowania 4 rodzajów próbek:

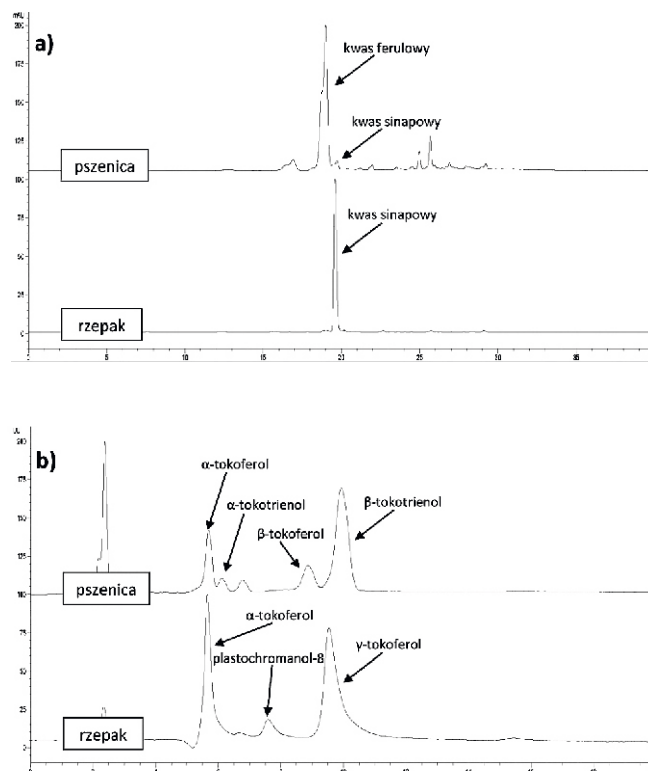
1) próbki kontrolne – ziarno (1) i nasiona (5) nie poddane dodatkowej obróbce,

2) próbki uszkodzone termicznie – ziarno (2) i nasiona (6) ogrzewane w temperaturze 130°C przez 1 h,

3) próbki uszkodzone przez przechowywanie w stanie wilgotnym – ziarno (3) i nasiona (7) nawilżone do wilgotności 20% (pszenica) i 14% (rzepak), przechowywane w temperaturze 24°C w szczelnie zamkniętych pojemnikach przez 96 h, a następnie wysuszone na powietrzu w temperaturze pokojowej do wilgotności równowagowej,

4) ziarno (4) i nasiona (8) przygotowano tak samo jak próbki nr 3, po czym zmielono je w młynku laboratoryjnym i poddano 16 h ekstrakcji eterem naftowym w aparatach Soxhleta. Po ekstrakcji próbki wysuszone na powietrzu w temperaturze pokojowej.

Tak przygotowane próbki zmielono do postaci mąki o wielkości cząstek poniżej 200 µm i doprowadzono do wilgotności równowagowej (20°C/ wilgotność względna 65%), a następnie przechowywano szczelnie zamknięte w temp. 6±3°C bez dostępu światła do czasu pomiaru widm fluorescencji.



Rysunek 1 Wybrane fluorofory występujące w badanych próbkach ziarna pszenicy i nasion rzepaku: kwasy fenolowe (a), tokochromanole (b)

Figure 1 Main fluorophores of the wheat and rapeseed samples : phenolic acids (a), tocopherols (b)

Tabela 1 Zawartość związków fenolowych, tokochromanoli i chlorofili w materiale badawczym
Table 1 The content of phenolic compounds, tocopherols and chlorophylls in analyzed samples

Związek chemiczny		Ziarno pszenicy	Nasiona rzepaku
Związki fenolowe(η) (mg/100 g s.m.b.)	ogółem	415	271
	kwas sinapowy	76	9
	kwas ferulowy	14	54
	protokatechowy	22	-
	p-OH-benzoesowy	-	1
	p-kumarowy	-	4
	wanilinowy	-	1
Tokochochromanole (mg/100 g s.m.)	ogółem	35,95	4,55
	α-tokoferol	14,69	1,46
	α-tokotrienol	-	0,63
	β-tokoferol	-	0,57
	β-tokotrienol	-	1,89
	γ-tokoferol	15,55	-
	plastochromanol-8	5,60	-
δ-tokoferol	0,11	-	
Chlorofile (mg/100 g s.m.)	ogółem	0,38	-

2.2 Pomiary widm fluorescencji

Do pomiarów synchronicznych widm fluorescencji wykorzystano spektrofluorometr Perkin-Elmer LS50B. Monochromatory: wzbudzający i analizujący pracowały przy szczelinach 4 nm (mąka pszenna) i 5 nm (mąka rzepakowa). Widma rejestrowano w zakresie 280-580 nm (pszenica) i 280-650 nm (rzepak) z krokowym wzrostem różnicy długości fali obu monochromatorów wynoszącej 5 nm w zakresie od 15 do 210 nm. Natężenie fluorescencji próbek umieszczonych w jednocentymetrowej kwarcowej kuwecie mierzono wykorzystując wzbudzenie frontalne (front-face excitation) z powodu nieprzezroczystości próbek.

2.3 Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu Statistica PL v.10. Wykorzystano do tego celu analizę składowych głównych PCA według zaleceń podanych w opracowaniach Cordella [4] oraz Gramacki i Gramacki [10]. Celem zastosowania PCA było uproszczenie struktury danych wejściowych do wskazania głównych, wzajemnie nieskorelowanych nowych zmiennych, zwanych składowymi głównymi. W prezentowanej pracy kolumny macierzy danych odpowiadały DI, czyli wzrostowi odstępu pomiędzy długością fali wzbudzenia i emisji (od 15 do 210 nm, 43 kolumny – przy badaniu próbek rzepaku i 39 kolumn – przy badaniu próbek pszenicy), a wiersze – wzrostowi długości fali wzbudzenia (od 280 do 580/650 nm, rejestrowanej z krokiem 0,5 nm). Macierz wyników posiadała 272 104 dane.

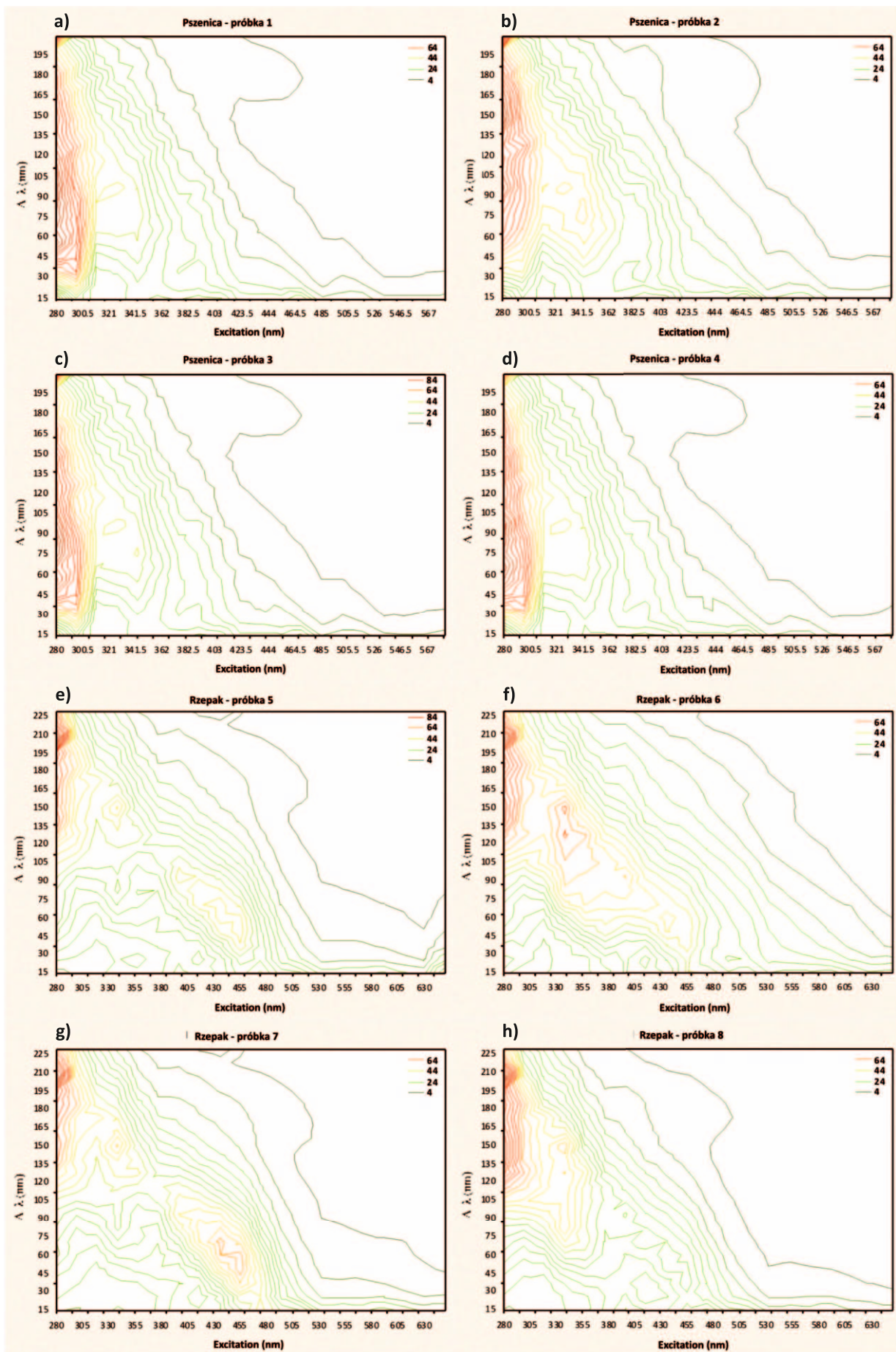
Wyniki przedstawiono w postaci map konturowych surowych wyników badań (Rys. 2), wykresów liniowych ładunków PC1 i PC2 względem $\Delta\lambda$ (Rys. 3) oraz położenia badanych próbek na płaszczyźnie dwóch pierwszych składowych głównych dla długości fali wzbudzenia 280, 290, 300, 310, 330, 350, 400, 450, 500 i 550 nm (Rys. 4).

3. WYNIKI I Dyskusja

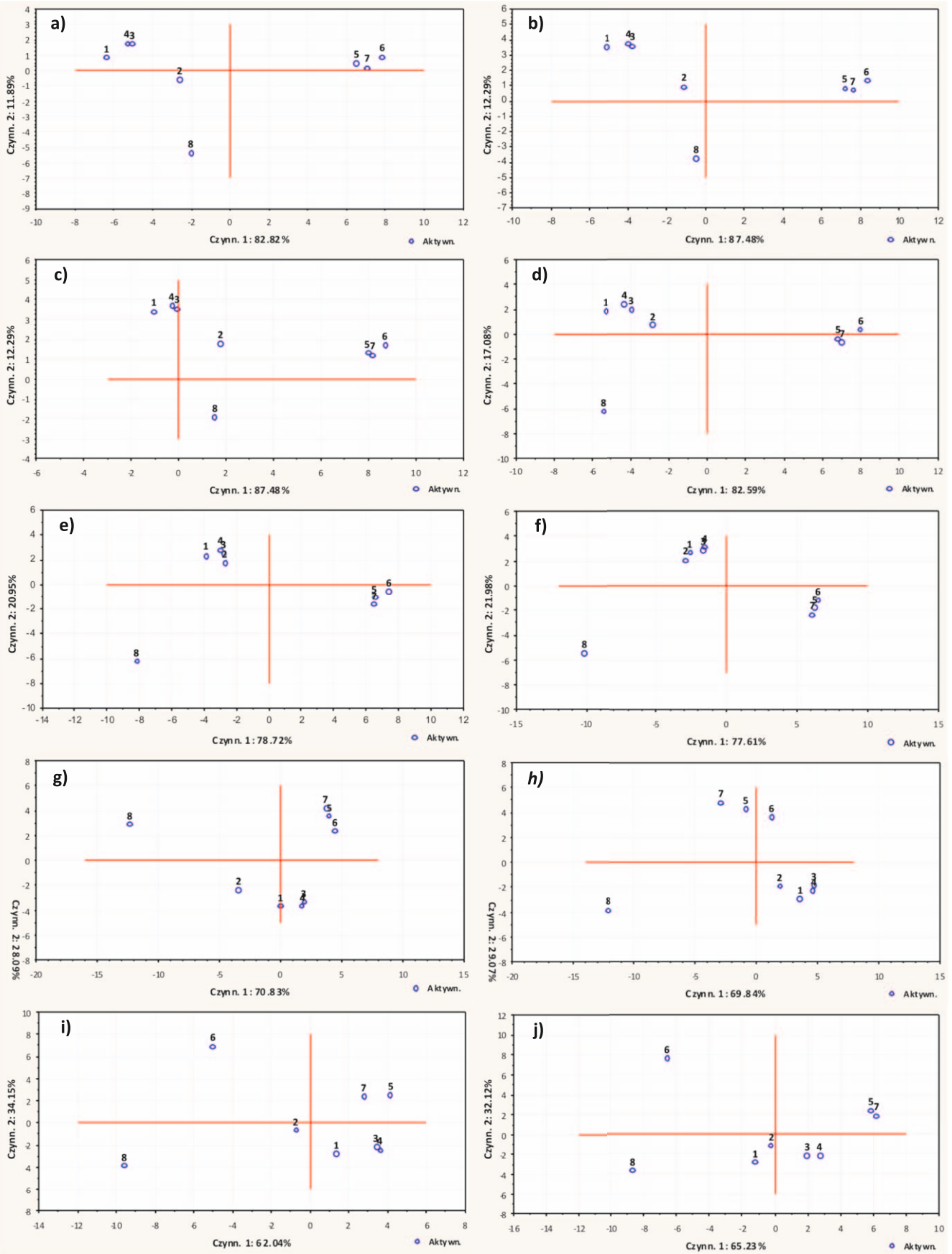
Rezultaty synchronicznego skanowania badanych próbek przedstawiono na Rysunku 2 w postaci tzw. map warstwico- /konturowych. Tego typu mapy jako dane wejściowe są wykorzystywane, m.in. do odróżniania obiektów, monitorowania zmian ich jakości lub wykrywania zafałszowań [16]. Analiza map dla próbek rzepaku (Rys. 2e-h) wskazała na ich zróżnicowanie ze względu na za-

stosowany wariant modyfikacji. W obrazie kontrolnej próbki nasion rzepaku dominowała fluorescencja w obszarze 400-500 nm przy wzbudzeniu 280 nm, a w przypadku próbki uszkodzonej termicznie zaobserwowano dodatkowo wzrost natężenia fluorescencji przy wzbudzeniu w zakresie 330-370 nm. Z kolei w nasionach przechowywanych w stanie wilgotnym stwierdzono wzrost natężenia fluorescencji przy wzbudzeniu w zakresie 430-460 nm. Te ostatnie fluorofory miały charakter hydrofobowy, bowiem odtłuszczenie próbki spowodowało zanik tego charakterystycznego fragmentu mapy. W odróżnieniu od próbek rzepaku mapy konturowe próbek pszenicy (Rys. 2a-d) były stosunkowo mało zróżnicowane. Zauważono jedynie, podobnie jak w przypadku nasion rzepaku, wzrost intensywności fluorescencji próbek uszkodzonych termicznie przy wzbudzeniu w zakresie 330-370 nm.

Dane literaturowe wskazują, że fluorescencja ziaren pszenicy wynika głównie z obecności aminokwasów aromatycznych – głównie tryptofanu (wzbudzenie ok. 280 nm/emisja ok. 335 nm), kwasów fenolowych (ok. 350 nm/420 nm) oraz ryboflawiny – witamina B2 (450 nm/520 nm) [17], chociaż emisja przy długości fali ok. 420 nm może pochodzić również od witaminy B6 lub tokochochromanoli [18]. W tym zakresie mogą również fluorozować nieutlenione, sprzężone tetraeny kwasów tłuszczowych, np. kwas *cis*-parinarowy [19]. W dostępnej literaturze nie spotkano informacji o wykorzystaniu do badań widma synchronicznego fluorescencji nasion rzepaku. Natomiast szeroko badane były tą metodą oleje roślinne, również rzepakowe, w których sygnały fluorescencyjne pochodziły od tokoferoli, polifenoli, ryboflawiny, chlorofili i produktów utlenienia [7-9]. Stwierdzone w próbkach o numerach 2 i 6 (uszkodzone termicznie) obszary fluorescencji w zakresie 40-500 nm (przy wzbudzeniu 330-370 nm) mogą wskazywać na obecność związków Maillarda [2, 4], które mogły powstać w temperaturze 130°C w wyniku reakcji cukrów i aminokwasów [20]. Fluorescencja tych związków, podobnie jak w przypadku tryptofanu i witaminy A, jest jednak silnie związana z wpływem mikrootoczenia, zwłaszcza pH i obecności soli [20]. W środowisku bardziej polarnym maksimum widma emisji fluoroforów polarnych przesuwają się zazwyczaj w kierunku niższej energii (fale o większej długości) [16]. Prezentowane wyniki wskazują na małe zróżnicowanie map fluorescencji prób poddanych uszko-

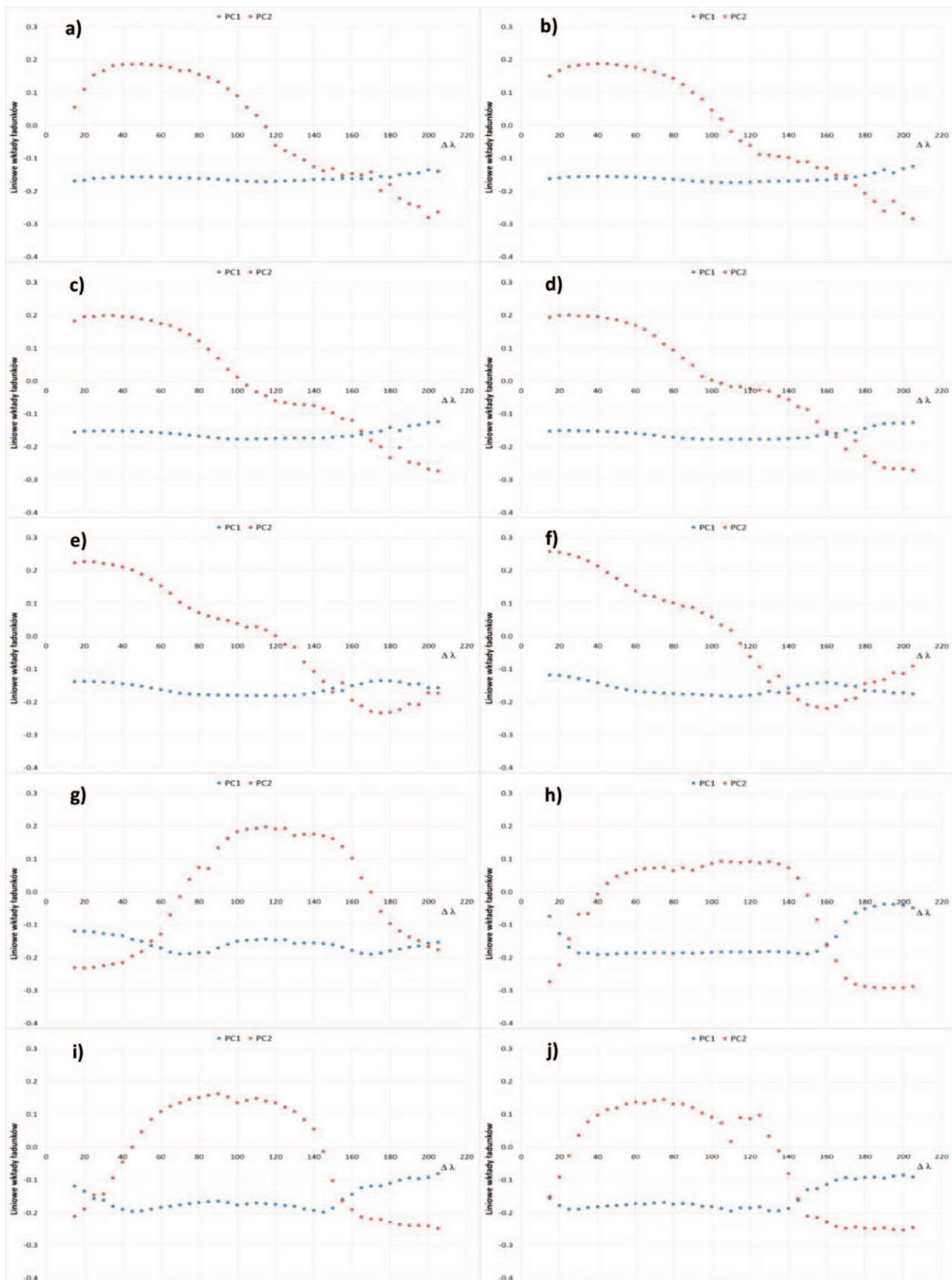


Rysunek 2 Mapy konturowe fluorescencji synchronicznej badanych próbek
Figure 2 Contour maps of synchronous fluorescence of the samples



Rysunek 3 Podobieństwo badanych próbek na płaszczyźnie składowych głównych: 280 nm (a), 290 nm (b), 300 nm (c), 310 nm (d), 330 nm (e), 350 nm (f), 400 nm (g), 450 nm (h), 500 nm (i), 550 nm (j)

Figure 3 The similarity of analyzed samples in the PCA plot: 280 nm (a), 290 nm (b), 300 nm (c), 310 nm (d), 330 nm (e), 350 nm (f), 400 nm (g), 450 nm (h), 500 nm (s), 550 nm (j)



Rysunek 4 Liniowe ładunki dwóch pierwszych składowych głównych: 280 nm (a), 290 nm (b), 300 nm (c), 310 nm (d), 330 nm (e), 350 nm (f), 400 nm (g), 450 nm (h), 500 nm (i), 550 nm (j)

Figure 4 Linear loadings of the PCA model: 280 nm (a), 290 nm (b), 300 nm (c), 310 nm (d), 330 nm (e), 350 nm (f), 400 nm (g), 450 nm (h), 500 nm (s), 550 nm (j)

dzeniu pod wpływem 96-godzinnej przechowywania w stanie wilgotnym, chociaż wyczuwalna organoleptycznie była zmiana ich zapachu i barwy. Wskazuje to na małe zmiany fluoroforów w próbkach wskutek pobudzenia rodzimego i mikrobiologicznego aparatu enzymatycznego. Wcześniejsze prace wskazują, że podwyższona wilgotność przechowywanych nasion sprzyja m.in. degradacji tokochromanoli, zwłaszcza plastochromanolu-8 oraz α - i γ -tokoferoli [21]. Niekorzystny wpływ na natywne antyoksydanty nasion rzepaku wywiera także suszenie. Nogala-Kałucka i Siger [22] stwierdzili, że suszenie nasion zmniejszało zawartość związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych, przy czym najbardziej destrukcyjny wpływ wywierała temperatura w zakresie 60-80°C. Autorzy sugerowali, że za „straty” związków fenolowych w tym zakresie temperatur mogą odpowiadać enzymy z klasy fenolooksydaz. Analizowany zbiór zmiennych wejściowych (43 zmienne – natężenie emisji fluorescencji mierzone przy rosnącym DI) zredukowano w wyniku analizy PCA do zaledwie dwóch składowych głównych, z którymi można wiązać od 95 do blisko 100% zaobserwowanej zmienności danych pierwotnych (wykresy liniowe ładunków PC1 i PC2 przy wybranych długościach fali wzbudzenia przedstawiono na Rysunku 3). Maksima tych linii wskazują wartości DI, które są najważniejsze przy różnicowaniu obiektów. Prezentacja badanych prób ziarna pszenicy i nasion rzepaku na płaszczyźnie czynników (Rys. 4) wskazuje, że możliwość ich odróżnienia jest zależna od zastosowanej długości fali wzbudzającej. Wraz ze wzrostem długości fali stwierdzono stopniowe obniżanie się wartości składowej PC1 od wartości 87,48% (przy 290 nm) do 65,23% (przy 550 nm). Przy długości fali wzbudzenia 280 nm bardzo podobne były do siebie widma próbek 5, 6 i 7 nasion rzepaku oraz 1, 3 i 4 ziarna pszenicy, a odrębne grupy stanowiły

tylko próbki nr 2 (ziarno pszenicy uszkodzone termicznie) oraz 8 (odtłuszczone nasiona rzepaku). Żadna z zastosowanych długości fali wzbudzenia nie przyczyniła się do zmiany położenia próbek 5 i 7 oraz 3 i 4 na Rysunku 3, co wskazywało na małe oddziaływanie zastosowanych modyfikacji na fluorofory. Przy długości fali wzbudzenia 500 i 550 nm możliwe było najlepsze odróżnienie próbki nasion rzepaku uszkodzonego termicznie (numery 5 i 6) od nasion kontrolnych.

4. PODSUMOWANIE BADAŃ

Wyniki prezentowanych badań wskazują na możliwość zastosowania synchronicznej fluorescencji odbiciowej połączonej z analizą PCA do odróżniania uszkodzonych termicznie nasion rzepaku i pszenicy. Próbki te różniły się od kontrolnych obszarem związanym z fluorescencją w obszarze 330-370/430-500 nm (wzbudzenie/emisja), co można wiązać z obecnością produktów utlenienia, np. związków Maillarda. Zastosowana do przygotowania próbek procedura uszkodzenia hydrolytycznego/mikrobiologicznego nie spowodowała zmian w odpowiedzi spektralnej, co może wskazywać na niewielki zasięg zmian chemicznych fluoroforów i/lub zmianę ich mikrootoczenia, utrudniającą procesy klasyfikacji.

Otrzymane wyniki wskazują kierunek możliwych przyszłych badań. Uogólnienie wniosków wymaga jednak walidacji wyników na większej populacji próbek i włączenia do interpretacji dodatkowych badań chemicznych (np. badanie ubytku fluoryzujących przeciwutleniaczy i powstawania nowych fluoroforów) oraz implementacji statystycznych metod klasyfikacji obiektów.

Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego nr N N312 201439.

LITERATURA

- [1] Dufour É., Letort A., Laguët A., Lebecque A., Serra J. N., Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 563, 1-2, 2006, 292-299.
- [2] Christensen J., Norgaard L., Bro R., Engelsen S. B., Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical Reviews*, 106, 6, 2006, 1979-1994.

- [3] Dale L. M., Thewis A., Rotar I., Fernandez P., Boudry C., Vidican R. M., Baeten V., Chemometric tools for NIRS and NIR hyperspectral imaging. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69, 1, 2012, 70-76.
- [4] Cordella Ch. B. Y., PCA: The basic building block of chemometrics. INTECH, http://cdn.intechopen.com/pdfs/40715/InTech-Pca_the_basic_building_block_of_chemometrics.pdf, 2012.
- [5] Zekovic I., Lenhardt L., Dramicanin T., Dramicanin M. D., Classification of intact cereal flours by front-face synchronous fluorescence spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 5, 5, 2012, 1205-1213.
- [6] Airado-Rodriguez D., Duran-Meras I., Galeano-Diaz T., Wold J. P., Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 2, 2011, 257-264.
- [7] Sikorska E., Romaniuk A., Khmelinskii I. V., Herance R., Boudelande J. L., Sikorski M., Koziół J., Characterization of edible oils using total luminescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 14, 1, 2004, 25-35.
- [8] Sikorska E., Gliszczyńska-Świątło, Khmielinskii I., Sikorski M., Synchronous fluorescence spectroscopy of edible vegetable oils. Quantification of tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 18, 2005, 6988-6994.
- [9] Sikorska E., Khmelinskii I. V., Sikorski M., Caponio F., Bilancia M. T., Pasqualone A., Gomes T., Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1, 2008, 55-61.
- [10] Gramacki J., Gramacki A., Statystyczne odkrywanie zależności w danych. *Przegląd Komunikacyjny*, 81, 62008, 711-713.
- [11] PN-R-74103:1996. Ziarno zbóż. Pszenica zwyczajna.
- [12] PN-EN ISO 10519:2001. Nasiona rzepaku. Oznaczenie zawartości chlorofilu. Metoda spektrofotometryczna.
- [13] Ogrodowska D., Czaplicki S., Zadernowski R., Mattila P., Hellström J., Naczek M., Phenolic acids in seeds and products obtained from *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51, 2, 2012, 96-101.
- [14] Gimeno E., Castellote A. I., Lamuela-Raventos R. M., Torre M. C., Lopez-Sabater M. C., Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881, 1-2, 2000, 251-254.
- [15] PN-R-66151:1990. Rośliny przemysłowe oleiste. Ziarno rzepaku i rzepaku podwójnie ulepszanego.
- [16] Karoui R., Blecker Ch., Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems – a review. *Food Bioprocess Technology*, 4, 3, 2011, 364-386.
- [17] Zandomenighi M., Carbonaro L., Caffarata Ch., Fluorescence of vegetable oils: Olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 3, 2005, 759-766.
- [18] Zandomenighi M., Fluorescence of cereal flours. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3, 1999, 878-882.
- [19] Smyk B., Amarowicz R., Szabelski M., Gryczynski I., Gryczynski Z., Steady-state and time-resolved fluorescence studies of stripped Borage oil. *Analytica Chimica Acta*, 646, 1-2, 2009, 85-89.
- [20] Matiacevich S. B., Buera M. P., A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 95, 3, 2006, 423-430.
- [21] Gawrysiak-Witulska M., Siger A., Wawrzyniak J., Nogala-Kałużka M., Changes of tocochromanol content in seeds of *Brassica napus* L. during adverse conditions of storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 9, 2011, 1379-1385.
- [22] Nogala-Kałużka M., Siger A., Changes of phenolic content in rapeseed during preliminary drying. *Journal of Oilseed Brassica*, 1, 1, 2010, 33-38.