

УДК 633.853.494:631.52:581.192.7

## ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МАСЛЕ СЕМЯН РАПСА С ПОМОЩЬЮ ИК-СПЕКТРОМЕТРИИ

**С.Г. Ефименко,**

кандидат биологических наук

**С.К. Ефименко,**

кандидат биологических наук

**Л.А. Кучеренко,**

кандидат технических наук

**Я.А. Нагалева,**

младший научный сотрудник

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

E-mail: efimenko-km@yandex.ru

*Для цитирования:* Ефименко С.Г., Ефименко С.К., Кучеренко Л.А., Нагалева Я.А. Экспресс-оценка содержания основных жирных кислот в масле семян рапса с помощью ИК-спектроскопии // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2015. – Вып. 4 (164). – С. 35–40.

**Ключевые слова:** рапс, семена, жирно-кислотный состав масла, ИК-спектроскопия, градуировочная модель.

Целью данной работы явилась разработка градуировочных моделей для ИК-анализатора MATRIX-I, позволяющих проводить экспресс-оценку содержания олеиновой, линолевой и линоленовой кислот масла семян рапса. Исследования проведены на семенах озимого и ярового рапса урожая 2014–2015 гг. в лаборатории биохимии ВНИИМК. Хроматографический анализ проводили на газовом хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» с автоматическим дозатором ДАЖ-2М на капиллярной колонке SolGelWax 30 м × 0,25 мм × 0,5 мкм в токе газа-носителя – гелия, со скоростью 22 см/с, с программированием температуры в пределах 178–230 °С. Получение метиловых эфиров и их хроматографирование выполняли в соответствии с ГОСТ Р 51486-99 (Получение метиловых эфиров жирных кислот) и ГОСТ Р 51483-99 (Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме). Спектры регистрировались в соответствии с руководством на ПО

OPUS в спектральном диапазоне 3500–12500 см<sup>-1</sup> с разрешением 16 см<sup>-1</sup> на ИК-анализаторе MATRIX-I фирмы Bruker Optics (Германия). На долю олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в масле безэруковых семян рапса приходится от 92,0 до 93,5 % от суммы всех 13 жирных кислот, поэтому для рапса они являются основными жирными кислотами. Для выполнения программы по градуировке ИК-анализатора подобрана партия из 68 образцов семян рапса с максимальным возможным диапазоном варьирования по содержанию олеиновой кислоты в масле – 61,7–82,7 %. Остаточное содержание эруковой кислоты во всех образцах не превышало 0,03 % от суммы жирных кислот. Использование в калибровочной партии образцов рапса с содержанием эруковой кислоты 10,0 и 16,9 % значительно ухудшило градуировочную зависимость, поэтому они были исключены. Погрешность определения содержания олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, полученная по градуировочным моделям с помощью ИК-спектроскопии, не значительно превышает стандартный метод. Разработаны градуировочные модели для определения содержания основных жирных кислот в масле семян рапса в малой навеске в стаканчике диаметром 22 мм. Это позволяет оперативно проводить предварительную оценку селекционного материала с высокой скоростью, более 100 образцов за рабочую смену, а также контролировать жирно-кислотный состав отдельных растений.

UDC 633.853.494:631.52:581.192.7

### Quick-assay of the content of the main fatty acids in oil of rapeseed seeds by means of IR-spectrometry.

**Efimenko S.G.**, candidate of biology

**Efimenko S.K.**, candidate of biology

**Kucherenko L.A.**, candidate of engineering

**Nagalevskaya Ya.A.**, junior researcher

FGFNU VNIIVK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 259-44-23

E-mail: efimenko-km@yandex.ru

**Key words:** rapeseed, seeds, fatty-acid composition of oil, IR-spectrometry, calibrating model.

The purpose of this work was development of calibrating models for IR-analyzer MATRIX-I allowing to do the quick-assay of contents of oleic, linoleic and linolenic acids in oil of rapeseed seeds. The researches were conducted on seeds of winter and spring rapeseed of 2014–2015 yields at the laboratory of biochemistry of VNIIVK. A chromatographic analysis was done on a gas chromatograph “Chromatech-

Kristall 5000” with an automatic batcher DAG-2M on a capillary column SolGelWax 30 m × 0,25 mm × 0,5 mkm in a flow of carrier-gas helium with a speed 22 cm/m and with a temperature programming within 178–230 °C. Creation of methyl ethers and their chromatography was conducted due to the State Standards R 51486-99 (A creation of methyl ethers of fatty acids) and R 51483-99 (A definition of a weight percentage of methyl ethers of individual fatty acids to their sums by means of a gas chromatography). Spectra were registered subject to a manual on OS OPUS in a spectral range 3500–12500 cm<sup>-1</sup> with a definition 16 cm<sup>-1</sup> on IR-analyzer MATRIX-I by Bruker Optics (Germany). The rates of oleic, linoleic and linolenic acids in oil of seeds of erucic acid free rapeseed are from 92.0 to 93.5% of the total sum of all 13 fatty acids, so they are the primary fatty acids for rapeseed. To do a calibration of IR-analyzer a lot containing 68 rapeseed seed sample were used; the seeds had a maximally possible variation range on contents of oleic acid in oil – 61.7–82.7%. A rest content of erucic acid in all samples did not exceed 0.03% of the total sum of fatty acids. The usage in a calibrating lot of rapeseed samples with erucic acid content 10.0 and 16.9% significantly impaired a calibrating dependence so they were eliminated. An error in determination of oleic, linoleic and linolenic acids contents obtained on the calibrating models by means of IR-spectrometry does not exceed substantively the standard method. The calibrating models for determination of contents of the primary fatty acids in oil of rapeseed seeds in a small test charge in a glass with diameter 22 mm were developed. It allows swiftly conducting preliminary estimation of breeding material with a high speed, more than 100 samples during working shift, and to control fatty-acid composition of separate plants.

**Введение.** В Краснодарском крае, как и во всем мире, производство рапса в современных условиях базируется на высокопродуктивных безэруковых и низкоглюкозинолатных сортах и гибридах, гарантирующих получение масла и шрота, соответствующих мировым стандартам качества [1].

В последнее время в селекции рапса на изменение состава жирных кислот во ВНИИМК достигнуты значительные успехи. В результате целенаправленного отбора биотипов ярового и озимого рапса

на повышение содержания олеиновой и снижение линоленовой кислот были выделены селекционные номера со значительными изменениями по этим признакам. На государственное испытание в 2014 г. передан высокоолеиновый сорт рапса ярового Амулет. Отличительной особенностью этого сорта является высокое содержание олеиновой кислоты в масле – более 77 % при 67 % у стандарта [2].

Дальнейшее создание сортов рапса с высоким содержанием олеиновой и низким уровнем линоленовой кислот в сочетании с высокой масличностью, урожайностью, повышенной толерантностью к основным патогенам и выравненностью по высоте связано с проработкой большого объема селекционного материала по биохимическим признакам. Успешное выполнение селекционных работ на современном этапе предполагает исследование количественных и качественных показателей методами, способными оценить селекционный материал в малой навеске и без его разрушения. Этой задаче соответствует спектральный метод с помощью приборов нового поколения. Одним из таких приборов является ИК-анализатор MATRIX-I фирмы Bruker Optics (Германия), который позволяет оценивать показатели качества семян и масла в средней пробе. Преимущество метода ИК-спектрометрии заключается в следующем:

- высокая производительность проведения анализов;
- возможность одновременного определения различных показателей в одном образце, количество показателей ограничено только возможностями исследователя и целесообразностью их разработки;
- анализ проводится в средней пробе в стакане диаметром 97 мм (навеска 60–90 г), в стакане диаметром 51 мм (навеска 7–15 г) и в стаканчике диаметром 22 мм (навеска 2–3 г);
- сохранение целостности семян, что позволяет оценивать по этим показателям семена отдельных растений без потери их количества на анализ.

В связи с этим были проведены исследования, целью которых явилась разработка градуировочных моделей для ИК-анализатора MATRIX-I, позволяющая проводить экспресс-оценку содержания олеиновой, линолевой и линоленовой кислот масла семян рапса. Программой исследований были предусмотрены:

- подбор калибровочных образцов с максимально возможным диапазоном варьирования по содержанию олеиновой, линолевой и линоленовой кислот;

- разработка градуировочной модели для отдельного определения каждой искомой жирной кислоты;

- создание метода в программе для рутинного анализа с одновременным определением содержания трех жирных кислот;

- предварительная оценка разработанной градуировочной модели, её уточнение, проверка на селекционном материале и метрологическая оценка погрешностей;

- массовая оценка селекционного материала с целью отбора номеров с высоким содержанием олеиновой кислоты и последующим хроматографическим определением полного жирно-кислотного состава масла образцов семян.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на семенах рапса озимого и ярового урожая 2014–2015 гг. в лаборатории биохимии ВНИИМК.

Хроматографический анализ проводили на газовом хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000» с автоматическим дозатором ДАЖ-2М на капиллярной колонке SolGelWax 30 м × 0,25 мм × 0,5 мкм в токе газа-носителя – гелия, со скоростью 22 см/с, с программированием температуры в пределах 178–230 °С. Получение метиловых эфиров и их хроматографирование выполняли в соответствии с нормативными методами [3; 4].

Спектры регистрировались в спектральном диапазоне 3500–12500 см<sup>-1</sup> с разрешением 16 см<sup>-1</sup>, в соответствии с руководством на ПО OPUS.

**Результаты и обсуждение.** Для выполнения программы по градуировке ИК-анализатора подобрана партия из 68 об-

разцов семян рапса с максимально возможным диапазоном варьирования по содержанию олеиновой кислоты в масле 61,7–82,7 %. Остаточное содержание эруковой кислоты во всех образцах не превышало 0,03 % от суммы жирных кислот.

Градуировочные спектры регистрировались с пересыпанием в трех повторностях в стаканчике диаметром 22 мм в режиме отражения (рис. 1).

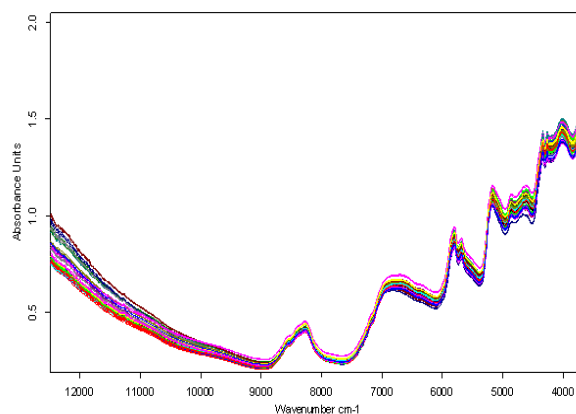
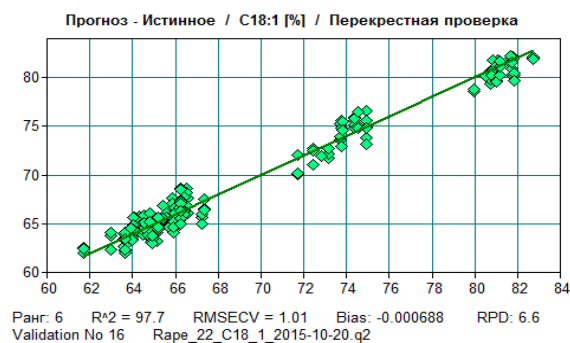


Рисунок 1 – Результирующие спектры отражения 28 образцов семян рапса

Неожиданный результат был получен при включении в калибровочную партию образцов с различным содержанием эруковой кислоты. В нашем исследовании было только два образца с содержанием 16,9 и 10,0 % эруковой и 35,2 и 47,7 % олеиновой кислот соответственно. Мы предполагали, что расширение диапазона изменчивости позволит получить более устойчивую градуировочную модель и уменьшение абсолютной погрешности определения олеиновой кислоты. Однако разница между предсказанными и «истинными» (хроматографическими) значениями составила в отдельных образцах более 17 %. Такой результат ставил под сомнение применимость данного метода для оценки содержания основных жирных кислот масла в целых семенах рапса в малой навеске (менее 3 г). На долю олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в масле безэруковых семян рапса приходится от 92,0 до 93,5 % от суммы всех 13 кислот, поэтому для рапса они являются основными жирными кислотами.

Для получения градуировочной модели часть ИК-спектров исключали из таблицы стандартов из-за значительных отклонений от хроматографических данных, а также изменяли параметры вычисления множественной линейной регрессии (рис. 2).



**Рисунок 2** – График предсказанных значений содержания олеиновой кислоты (Ось Y) по сравнению с истинными значениями содержания олеиновой кислоты (Ось X) градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_1» для определения содержания олеиновой кислоты в масле семян рапса

Для оценки градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_1» была проанализирована проверочная партия семян в том же диапазоне изменчивости, что и при разработке модели (табл. 1).

Таблица 1

**Проверка градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_1» для определения содержания олеиновой кислоты в масле семян рапса**

ВНИИМК, 2015 г.

Образец	Содержание олеиновой кислоты, %		Разница, %	
	хим. анализ	по «Rape_22_C18_1»	абсолютная	относительная
103	65,9	66,7	-0,8	1,21
105	80,5	79,6	+0,9	1,12
120	63,7	63,9	-0,2	0,31
124	68,5	68,9	-0,4	0,63
133	81,4	79,5	+1,9	2,33
136	73,6	72,6	+1,0	1,36
Диапазон	65,9–81,4	63,9–79,6	-0,8–1,9	0,31–2,33
Среднее	72,3	71,9	0,87	1,16

Ошибка определения содержания олеиновой кислоты в среднем составила 0,87 % абсолютных единиц, относитель-

ная ошибка при высоких значениях показателя не превысила 3 % и составила в среднем 1,16 %.

Необходимо отметить, что согласно ГОСТ Р 51483-99 погрешность определения зависит от величины значения жирной кислоты и для значения более 5 % в категории воспроизводимости разница составляет 3 % абсолютных. Полученная зависимость между истинными и прогнозируемыми значениями позволяет оценивать селекционные образцы с максимальной ошибкой в 3 % абсолютных.

Диапазон изменчивости по содержанию линолевой кислоты из 68 образцов семян рапса составил 7–28 %. Лучшей градуировочной моделью по всем параметрам оказалась «Rape\_22\_C18\_2» (табл. 2).

Таблица 2

**Проверка градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_2» для определения содержания линолевой кислоты в масле семян рапса**

ВНИИМК, 2015 г.

Образец	Содержание линолевой кислоты, %		Разница, %	
	хим. анализ	по «Rape_22_C18_2»	абсолютная	относительная
82	7,6	7,4	+0,2	2,6
103	20,1	19,7	+0,4	2,0
120	21,1	21,5	-0,4	1,9
124	17,1	17,4	-0,3	1,7
133	7,1	8,0	-0,9	12,7
136	13,5	14,4	-0,9	6,7
Диапазон	7,1–21,1	7,4–21,5	-0,9–0,4	1,7–12,7
Среднее	14,4	14,7	0,52	4,60

Ошибка определения содержания линолевой кислоты в среднем составила 0,52 % абсолютных единиц, относительная ошибка при средних значениях показателя не превысила 15 % и составила в среднем 4,6 %. Полученная зависимость между истинными и прогнозируемыми значениями, рассчитанная по градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_2» для определения содержания линолевой кислоты в масле семян рапса, позволяет оценивать селекционный материал с максимальной ошибкой 3 % абсолютных.

Различия между калибровочными образцами по содержанию линоленовой кислоты были меньшими и составили от 3,5

до 8 %. Поэтому характеристика этой модели значительно уступает предыдущим (табл. 3).

Таблица 3

**Характеристика градуировочных моделей по определению олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в масле семян рапса для ИК-спектрометрии**

ВНИИМК, 2015 г.

Компонент	Ранг	*R <sup>2</sup>	*RMSECV	Предобработка	Спектральный диапазон	Количество калибровочных спектров
Олеиновая	6	97,7	1,01	Первая производная + векторная нормализация	9002,5–5400	200
Линолевая	10	96,9	0,937	Первая производная + MSC	9002,5–4179,4	204
Линоленовая	10	92,8	0,286	Первая производная + MSC	9002,5–4590	196

\*Качество хемометрических моделей зависит от выбора правильного числа необходимых факторов, что также называется **рангом** модели.

**R<sup>2</sup>** – коэффициент детерминации. **RMSECV** – среднеквадратичная погрешность предсказания при перекрестной проверке. **MSC** – мультипликативная коррекция рассеяния.

Однако полученная зависимость «Rape\_22\_C18\_3» по оценке содержания линоленовой кислоты показывает, что она адекватно оценивает искомый показатель (табл. 4).

Таблица 4

**Проверка градуировочной модели «Rape\_22\_C18\_3» для определения содержания линоленовой кислоты в масле семян рапса**

ВНИИМК, 2015 г.

Образец	Содержание линоленовой кислоты, %		Разница, %	
	хим. анализ	по «Rape_22_C18_2»	абсолютная	относительная
103	6,3	6,4	-0,1	1,6
120	7,1	7,0	+0,1	1,4
124	7,7	6,9	+0,8	10,4
133	5,0	4,9	+0,1	2,0
136	6,3	5,9	+0,4	6,3
Диапазон	5,0–7,7	4,9–7,0	-0,1–0,8	1,4–10,4
Среднее	6,48	6,22	0,30	4,34

В среднем ошибка определения содержания линоленовой кислоты составляет около 0,3 % абсолютных единиц, однако относительная ошибка при низких значениях показателя не превысила 15 % и в среднем составила 4,34 %. В целом она дополняет общую картину по содержанию основных жирных кислот.

Для большей наглядности в таблице 5 приведены данные химического анализа и расчетные по градуировочной модели содержания основных жирных кислот. Сопоставление значений трех кислот позволит, опираясь на практическую особенность различных биотипов, однозначно сделать выбраковку образцов. После этого оставшиеся образцы анализируют точным хроматографическим методом для получения полной информации по всем кислотам.

Таблица 5

**Сравнительные данные химического анализа и расчетные по градуировочной модели содержания основных жирных кислот масла семян образцов рапса**

ВНИИМК, 2015 г.

№ образца	Жирная кислота	Содержание кислот, %	
		хим. анализ	по «Rape_22_C18_2»
103	Олеиновая	65,9	66,7
	Линолевая	20,1	19,7
	Линоленовая	6,3	6,4
133	Олеиновая	81,4	79,5
	Линолевая	7,1	8,0
	Линоленовая	5,0	4,9
136	Олеиновая	73,6	72,6
	Линолевая	13,5	14,4
	Линоленовая	6,3	5,9

После получения удовлетворительных значений погрешности определения по всем трем жирным кислотам был разработан метод в программе OPUS LAB для рутинного анализа по одновременному определению содержания олеиновой, линолевой и линоленовой кислот.

Для оценки надежности получения результатов в программе OPUS LAB были проанализированы семена рапса ярового

урожая 2014 г. с известными значениями (табл. 6).

Таблица 6

**Сравнительные данные химического анализа и расчетные по градуировочной модели содержания основных жирных кислот масла семян образцов рапса**

ВНИИМК, 2015 г.

№ образца	Жирная кислота	Содержание кислот, %	
		хим. анализ	по «Rare_22_C18_2»
467	Олеиновая	78,7	80,1
	Линолевая	10,4	11,0
	Линоленовая	3,6	3,8
468	Олеиновая	66,5	66,2
	Линолевая	18,3	20,3
	Линоленовая	7,8	6,5
471	Олеиновая	72,7	71,0
	Линолевая	12,8	16,1
	Линоленовая	7,5	5,5

Таким образом, разработаны градуировочные модели для определения содержания основных жирных кислот в масле семян рапса в малой навеске в малом стаканчике диаметром 22 мм. Это позволяет оперативно проводить предварительную оценку селекционного материала с высокой скоростью – более 100 образцов за рабочую смену, а также контролировать жирно-кислотный состав отдельных растений.

В дальнейшем будет разработана градуировочная модель по определению масличности и содержания глюкозинолатов, что значительно увеличит объем анализируемого селекционного материала и повысит его информативность.

#### Список литературы

1. Горлов С.Л., Горлова Л.А., Бочкарева Э.Б., Сердюк В.В. Результаты испытания сортов и гибридов рапса озимого в условиях центральной зоны Краснодарского края // Масличные культуры. Науч.-тех.

бюл. ВНИИМК. – 2015. – № 1 (161). – С. 52–56.

2. Горлов С.Л., Бочкарева Э.Б., Горлова Л.А., Сердюк В.В. Высокоолеиновый сорт рапса ярового Амулет // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2015. – № 2 (162). – С. 127–128.

3. ГОСТ Р 51486-99. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 2001. – С. 170–179.

4. ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 2001. – С. 151–159.

#### References

1. Gorlov S.L., Gorlova L.A., Bochkareva E.B., Serdyuk V.V. Rezul'taty ispytaniya sortov i gibridov rapsa ozimogo v usloviyakh tsentral'noy zony Krasnodarskogo kraya // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2015. – № 1 (161). – S. 52–56.

2. Gorlov S.L., Bochkareva E.B., Gorlova L.A., Serdyuk V.V. Vysokooleinovyy sort rapsa yarovogo Amulet // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK. – 2015. – № 2 (162). – S. 127–128.

3. GOST R 51486-99. Masla rastitel'nye i zhiry zhiivotnye. Poluchenie metilovykh efirov zhirnykh kislot. – M.: IPK Izd-vo standartov, 2001. – S. 170–179.

4. GOST R 51483-99. Masla rastitel'nye i zhiry zhiivotnye. Opredelenie metodom gazovoy khromatografii massovoy doli metilovykh efirov individual'nykh zhirnykh kislot k ikh summe. – M.: IPK Izd-vo standartov, 2001. – S. 151–159.