

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МАСЛЕ ЯРОВОГО РАПСА С УЛУЧШЕННЫМ ЖИРНОКИСЛОТНЫМ ПРОФИЛЕМ

Эмма Константиновна Горшкова
Владимир Иванович Горшков

Всероссийский научно-исследовательский институт рапса

Роль масличных капустных культур, как поставщиков ценных непредельных жиров в рационе современного человека, непрерывно возрастает. Во многих странах мира рапсовое масло стали широко использовать на пищевые цели после создания в конце 60-х годов прошлого века в Канаде безэруковых, а затем в начале 70-х годов и низкоглюкозинолатных сортов. С этого момента культура получила второе название – «сапола», подразумевающее содержание эруковой кислоты в масле менее 2% в сочетании с низким содержанием в семенах глюкозинолатов. В настоящее время усилия селекционеров направлены и на увеличение доли олеиновой кислоты в рапсовом масле. В связи с этим возникла необходимость разработки экспресс-метода для селекции сортов и гибридов рапса с улучшенным жирнокислотным составом масла, преимущество которого заключается не только в высокой производительности проведения анализов и возможности одновременного определения различных показателей в одном образце, но и в сохранении целостности семян. Для этого исследовались сортообразцы ярового рапса с различным жирнокислотным составом масла для построения калибровочной кривой на содержание олеиновой кислоты в масле и идентификации жирнокислотного состава масла рапса для ИК-анализатора Nir-System Model 4500F. Полевые и лабораторные исследования проводили в селекционном севообороте отдела селекции и аналитическом отделе института рапса. В результате проделанной в 2016–2017 гг. работы подобрана градуировочная партия образцов с максимально возможным диапазоном варьирования содержания олеиновой кислоты. Разработана градуировочная модель для определения искомого показателя. Проведены предварительная оценка разработанной градуировочной модели, ее уточнение, проверка на селекционном материале и оценка метрологического значения погрешностей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: яровой рапс, жирнокислотный состав, олеиновая кислота, хроматографический анализ, ИК-спектроскопия, калибровочная кривая, руководство по идентификации.

EXPRESS ANALYSIS OF OLEIC ACID CONTENT IN SPRING RAPESEED OIL WITH AN IMPROVED FATTY ACID PROFILE

Emma K. Gorshkova
Vladimir I. Gorshkov

All-Russian Research Institute of Rapeseed

The importance of oil-bearing cole crops as a source of valuable unsaturated fats in the diet of modern people is continuously increasing. In many countries rapeseed oil has become widely used for dietary purposes after the creation of non-erucic varieties (in the late 1960s in Canada), and then low-glucosinolate varieties (in the early 1970s). At that time the crop received its second name «canola», which means that erucic acid content in oil is less than 2% in combination with low content of glucosinolates in seeds. At present the efforts of plant breeders are aimed at increasing the proportion of oleic acid in rapeseed oil. Consequently, it became necessary to develop an express method for the selection of rapeseed varieties and hybrids with an improved fatty acid composition of oil. The advantage of such method lies not only in the high performance of analyses and the possibility of simultaneous determination of different parameters in one sample, but also in preserving the integrity of seeds. For this purpose the authors studied the varieties of spring rapeseed with different fatty acid composition of oil in order to plot a calibration curve for the content of oleic acid in oil and identification of fatty acid composition of rapeseed oil for the Nir-System Model 4500F IR analyzer. Field and laboratory studies were carried out in the breeding crop rotation of the Department of Selection and Analytical Department of the Institute of Rapeseed. As a result of work performed in 2016–2017 a calibration lot of samples with the maximum possible range of variation in the content of oleic acid was selected. A calibration model has been developed to determine the desired parameter. The authors have also performed a preliminary assessment of the developed calibration model, its refinement, verification on the breeding material and an estimation of metrological error values.

KEY WORDS: spring rapeseed, fatty acid composition, oleic acid, chromatographic analysis, IR spectroscopy, calibration curve, identification guidelines.

Введение

Увеличение производства масличного сырья при одновременном повышении его качества является важнейшей задачей агропромышленного комплекса России [1]. В связи с этим роль масличных капустных культур, как поставщиков ценных непредельных жиров в рационе современного человека, непрерывно возрастает.

Широкому использованию рапсового масла на пищевые цели положило начало создание в 60–70-х годах прошлого века в Канаде вначале безэруковых (типа «0+»), а затем и низкоглюкозинолатных (типа «00») сортов рапса. С этого момента культура получила второе название – «сапола», подразумевающее содержание эруковой кислоты в масле менее 2% в сочетании с низким содержанием в семенах глюकोзинолатов.

Следующий эволюционный этап селекционного изменения жирно-кислотного профиля рапсового масла – увеличение доли олеиновой кислоты (не менее 75%). Из-за низкой окислительной способности такого масла значительно повышаются его потребительские характеристики [10].

При создании новых сортов (гибридов) рапса, характеризующихся высоким содержанием олеиновой кислоты в масле, традиционные методы определения жирнокислотного состава масла на основе газожидкостной хроматографии или метода рефрактометрии, во-первых, не обеспечивают проработку большого объема селекционного материала, а во-вторых, не позволяют определять содержание олеиновой кислоты в семенах без их разрушения, имеют длительную и сложную пробоподготовку, низкую производительность, требуют большого количества токсичных химических реактивов [2, 6]. Поэтому разработка экспресс-методов для селекции сортов и гибридов рапса с улучшенным жирнокислотным составом масла является актуальной задачей.

Наиболее полно требованиям экспрессности анализа в малой навеске и без разрушения семян отвечают спектральные методы с помощью приборов, которые в настоящее время находят широкое применение для решения различных аналитических задач, имеющих прикладное значение. Одним из таких приборов, успешно использованным нами, является ИК-анализатор NIR-System Monochromator Model 4500 F (Индия).

Преимущество ИК-скопии заключается также в высокой производительности проведения анализов, возможности одновременного определения различных показателей в одном образце, при этом сохраняется целостность семян [9].

Новизна исследований состоит в построении градуировочной модели для спектрального прибора по определению жирнокислотного состава высокоолеинового рапсового масла и возможности проработки большого количества селекционного материала без разрушения семян.

Цель работы заключается в построении и оценке метрологических значений калибровочной кривой на содержание олеиновой кислоты в масле семян рапса для ИК-анализатора Nir-System Model 4500F.

Задачи исследований:

- подбор и размножение сортообразцов ярового рапса с максимально возможным диапазоном варьирования олеиновой кислоты в масле;
- проведение хроматографического анализа сортообразцов ярового рапса;
- подбор градуировочной партии образцов с максимально возможным диапазоном варьирования олеиновой кислоты в масле;
- разработка градуировочной модели для искомого показателя;
- проведение предварительной оценки разработанной градуировочной модели; ее уточнение и проверка на селекционном материале;
- оценка метрологического значения погрешностей.

Методика эксперимента

Посев отобранных сортообразцов ярового рапса производился ручной сеялкой СР-1 в селекционно-семеноводческом севообороте ФГБНУ «ВНИИ рапса» в питомнике гибридизации. Площадь делянок составляла 0,15–0,3 м². Самоопыление производилось на всех растениях высеваемых образцов. Уборка проводилась вручную. Все сортообразцы обмолачивались по одному растению [7, 8].

Определение жирнокислотного состава рапсового масла, в том числе олеиновой кислоты, проводилось на газожидкостном хроматографе CHROM 5 в аналитическом отделе ФГБНУ «ВНИИ рапса» по ГОСТ Р 51486-99 Получение метиловых эфиров жирных кислот и по ГОСТ Р 51483-99 Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме [3, 4].

Регистрация спектров осуществлялась на ИК-анализаторе NIR-System Model 4500 F в ближнем инфракрасном свете при длине волны 1850 Нм, значении 0,634793, в подобранной коллекции образцов семян рапса с максимальным диапазоном варьирования содержания олеиновой кислоты в масле, в соответствии с руководством пользователя и программой для расчета калибровочных уравнений.

Математическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью методов вариационной статистики в табличном редакторе Microsoft Excel после формирования коллекции образцов для градуировки, уточнения и проверки результатов калибровочной кривой [5].

Результаты и их обсуждение

В питомнике гибридизации было высеяно 60 образцов ярового рапса, отобранных из сортов отечественной и зарубежной селекции с различным содержанием олеиновой кислоты в масле в пяти повторениях.

Самоопыление рапса проводили в фазе начала цветения на 300 растениях. В фазе полной спелости их обмолачивали вручную по одному растению. Ввиду того что на некоторых растениях под изоляторами получили недостаточное количество семян, из всего полученного материала для дальнейшей работы были отобраны только высокопродуктивные генотипы.

В сформированной нами коллекции ярового рапса, состоящей из 97 образцов, был проведен хроматографический анализ жирнокислотного состава масла, для наибольшей точности результатов в трех повторениях.

По результатам биохимического анализа семян было проведено ранжирование коллекции образцов ярового рапса по содержанию олеиновой кислоты в масле на 5 классов (табл. 1).

Таблица 1. Результаты ранжирования коллекции высокоолеинового рапса

Номер класса / группы	Диапазон варьирования олеиновой кислоты	Количество образцов, шт.
1	До 65%	7
2	От 65 до 70%	26
3	От 70 до 75%	41
4	От 75 до 80%	22
5	Свыше 80%	1

Установлено, что у 7 образцов содержание олеиновой кислоты не превышает 65%, 26 образцов содержат 65–70%, 41 образец – 70–75%, 22 образца – 75–80% и 1 образец – свыше 80%.

Среди образцов коллекции ярового рапса с улучшенным жирнокислотным профилем масла выделены самоопыленные формы с высоким содержанием (78,0–82,0%) олеиновой кислоты (табл. 2). Они могут быть использованы в селекции в качестве исходного материала при создании новых сортов рапса.

Нами также были подсчитаны основные статистические показатели жирнокислотного состава рапсового масла (табл. 3). Размах изменчивости содержания олеиновой кислоты в масле составляет 61,45–82,41%. Средняя арифметическая этого показателя равна 71,88%. Ошибка средней арифметической на уровне вероятности 95% составила $\pm 0,888\%$.

Таблица 2. Жирнокислотный состав масла у высокоолеиновых образцов ярового рапса

Номер		Содержание жирных кислот в масле, %					
образца	шкалы	пальмитиновая	олеиновая	линолевая	линоленовая	эйкозеновая	эруковая
111	91	3,79	78,28	11,36	5,02	1,55	0,00
127	92	3,96	78,29	12,59	3,18	1,96	0,02
129	93	3,54	78,45	13,17	2,92	1,92	0,00
104	94	3,39	78,48	11,90	4,61	1,62	0,00
126	95	4,54	78,49	12,30	3,03	1,63	0,00
75	96	3,66	78,66	10,32	5,77	1,59	0,00
121	97	3,30	82,41	7,86	4,69	1,73	0,00

Основным показателем изменчивости вариационного ряда является среднее квадратическое (или стандартное) отклонение. В нашем случае стандартное отклонение для олеиновой кислоты равно 4,369%. Ошибка среднего квадратического отклонения для олеиновой кислоты на уровне 95% составила $\pm 0,628\%$.

Известно, что основное достоинство среднего квадратического отклонения заключается в том, что оно дает полную количественную характеристику изменчивости содержания олеиновой кислоты в масле. Однако сравнить изменчивость двух образцов с разными значениями олеиновой кислоты и тем более изменчивость двух разных кислот с помощью данного показателя нельзя. Поэтому на помощь приходит следующий показатель изменчивости – коэффициент вариации, который характеризует изменчивость в относительных величинах, т. е. в % [9].

Таблица 3. Основные статистические показатели образцов калибровочной кривой

Статистические показатели	Содержание жирных кислот в масле, %					
	пальмитиновая	олеиновая	линолевая	линоленовая	эйкозеновая	эруковая
min	3,17	61,45	7,86	2,34	1,08	0,00
max	5,83	82,41	25,31	9,34	3,88	2,94
Средняя арифметическая (M)	3,984	71,883	16,593	5,672	1,896	0,059
Ошибка средней арифметической ($\pm m$)	0,058	0,444	0,365	0,169	0,037	0,030
Среднее квадратическое отклонение (S)	0,574	4,369	3,594	1,668	0,360	0,299
Ошибка среднеквадратического отклонения на уровне 95% (S_x)	0,082	0,628	0,516	0,240	0,052	0,044
Коэффициент вариации (V, %)	14,408	6,078	21,660	29,408	18,987	506,78
Ошибка коэффициента вариации (S_v)	1,035	0,437	1,555	2,111	1,363	36,386

Коэффициент вариации для содержания олеиновой кислоты в масле имеет среднее значение – 6,08%. Ошибка коэффициента вариации для этого показателя составляет $\pm 0,437\%$.

Таким образом, анализ вариационного ряда полученных данных позволил охарактеризовать основные статистические показатели содержания олеиновой и других кислот в рапсовом масле.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Градуировочные спектры регистрировались нами пересыпанием образцов партии по одному в порядке возрастания значения содержания олеиновой кислоты в режиме отражения в стаканчик диаметром 22 мм. По окончании регистрации градуировочных спектров получившейся градуировочной модели было присвоено название «Rare_oil». Для оценки последней была проанализирована проверочная партия семян в том же диапазоне изменчивости, что и при разработке модели.

Диапазон изменчивости по содержанию олеиновой кислоты градуировочной модели «Rare_oil», состоящей из 97 образцов семян рапса, был в пределах 62,77–81,33%. Абсолютная ошибка определения содержания олеиновой кислоты в среднем составила 0,29%, относительная ошибка – 0,79% (табл. 4).

Таблица 4. Проверка градуировочной модели «Rare_oil» для определения содержания олеиновой кислоты в масле рапса

№ образца	Содержание олеиновой кислоты в масле, %		Абсолютная разница, %	Относительная разница, %
	по химическому анализу	по шкале «Rare_oil»		
1	61,45	62,77	1,32	2,15
3	62,26	62,81	0,55	0,88
4	63,34	63,59	0,25	0,40
5	64,10	64,73	0,63	0,98
8	65,28	65,62	0,34	0,52
10	65,88	66,14	0,26	0,40
12	66,25	66,91	0,66	1,00
15	67,05	67,48	0,43	0,64
18	67,67	68,04	0,37	0,55
21	68,04	68,92	0,88	1,29
24	68,71	69,23	0,52	0,76
27	69,41	69,85	0,44	0,63
30	69,58	70,03	0,45	0,65
32	69,67	70,22	0,55	0,79
34	70,03	70,68	0,65	0,93
36	70,30	70,99	0,69	0,98
38	71,02	71,35	0,33	0,47
41	71,67	72,13	0,46	0,64
43	71,92	71,24	-0,68	0,95
45	72,15	72,69	0,54	0,75
48	72,49	72,97	0,48	0,66
51	72,70	73,14	0,44	0,61
53	72,84	72,15	-0,69	0,95
55	73,08	73,67	0,59	0,81
58	73,52	73,96	0,44	0,60
61	73,85	73,44	-0,41	0,56
63	73,88	73,27	-0,61	0,83
65	74,02	73,63	-0,39	0,53
68	74,39	73,82	-0,57	0,77
71	74,68	74,21	-0,47	0,63
73	74,82	74,44	-0,38	0,51
75	75,20	74,79	-0,41	0,55
78	75,57	75,20	-0,37	0,49
81	76,03	75,69	-0,34	0,45
83	76,78	77,32	0,54	0,70
85	76,99	77,51	0,52	0,67
89	77,43	76,74	0,69	0,89
91	78,28	77,84	0,44	0,56
93	78,45	77,63	0,82	1,05
95	78,49	77,64	0,85	1,08
97	82,41	81,33	1,08	1,31
min	61,45	62,77	-0,69	0,40
max	82,41	81,33	1,32	2,15
Среднее (M)	71,76	71,86	0,29	0,79

Между двумя различными методами определения содержания олеиновой кислоты в масле установлена сильная корреляционная зависимость ($r = 0,996 \pm 0,015$), свидетельствующая о сопоставимости полученных результатов.

Достоверность разработанной нами градуировочной модели также подтверждается коэффициентом детерминации (d_{yx}), который является более непосредственным и прямым способом выражения зависимости одной величины от другой и равен, в нашем случае, 0,992, или 99,2%. Рассчитанное нами значение максимальной относительной ошибки составляет немногим выше 2%, а согласно ГОСТ Р 51483-99 расхождение между результатами двух единичных определений в категории «воспроизводимость» не должно превышать при доверительной вероятности 0,95% абсолютных значений, равных 3% по отношению к среднему значению двух результатов при содержании олеиновой кислоты, равном или более 5%.

Таким образом, низкий уровень абсолютной и относительной разницы между двумя способами определения содержания олеиновой кислоты в масле подтвердил работоспособность полученной градуировочной зависимости и позволил достоверно оценивать селекционные образцы ярового рапса экспресс-методом на ИК-анализаторе.

Заключение

В 2016–2017 гг. были проведены полевые исследования по поиску и размножению высокоолеиновых образцов в селекционных питомниках ярового рапса, определен жирнокислотный состав масла у самоопыленных растений ярового рапса хроматографическим методом, сформирована коллекция сортообразцов рапса с различным уровнем содержания олеиновой кислоты в масле, разработана градуировочная модель для искомого показателя, а также проведена оценка метрологических значений погрешностей градуировочной модели и проверка ее на селекционном материале.

Библиографический список

1. Горлов С.Л. Современные аспекты и тенденции развития производства и селекции рапса / С.Л. Горлов // Масличные культуры. – 2011. – № 2. – С. 51–56.
2. Горшкова Э.К. Экспресс-идентификация жирно-кислотного состава масла для повышения эффективности селекции ярового рапса / Э.К. Горшкова, Н.Б. Меркулова, И.С. Шилловских // Проблемы современных интеграционных процессов и пути их решения : сб. статей Международной науч.-практ. конф. (23 мая 2016 г., г. Киров) ; в 2 ч. – Уфа : МЦИИ ОМЕГА САЙНС, 2016. – Ч. 2. – С. 59–61.
3. ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме. – Введ. 2001–01–01. – Москва : ИПК Изд-во стандартов, 2000. – 7 с.
4. ГОСТ Р 51486-99. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. – Введ. 2001–01–01. – Москва : ИПК Изд-во стандартов, 2000. – 6 с.
5. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки исследований): учебник / Б.А. Доспехов. – 6-е изд. – Москва : Альянс, 2011. – 352 с.
6. Идентификация жирнокислотного состава и повышение эффективности селекции ярового рапса / Э.К. Горшкова [и др.] // Традиционная и инновационная наука: история, современное состояние, перспективы : сб. статей Международной науч.-практ. конф. (28 марта 2017 г., г. Екатеринбург) ; в 2 ч. – Уфа : МЦИИ «ОМЕГА САЙНС», 2017. – Ч. 2. – С. 27–28.
7. Карпачев В.В. Рапс яровой. Основы селекции : монография / В.В. Карпачев. – Липецк : ГНУ ВНИИ рапса, 2008. – 236 с.
8. Павлюк Н.Т. Методические указания по проведению статистической обработки опытных данных по основам научных исследований в селекции для студентов агрономического факультета / Н.Т. Павлюк, В.Т. Захарский, В.Е. Шевченко. – Воронеж : ВСХИ им. К.Д. Глинки, 1989. – 50 с.
9. Экспресс-оценка содержания основных жирных кислот в масле семян рапса с помощью ИК-спектрометрии / С.Г. Ефименко [и др.] // Масличные культуры. Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. – 2015. – № 4 (164). – С. 35–40.
10. Rucker B. Development of high oleic acid rapeseed / B. Rucker, G. Robbelen // Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, July 4–7, 1995, Cambridge, England, United Kingdom, 1995. – Vol. 2. – Pp. 389–391.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Эмма Константиновна Горшкова – кандидат сельскохозяйственных наук, ученый секретарь ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рапса», Российская Федерация, г. Липецк, тел. 8(4742) 34-63-61, e-mail: emmakonstantinovna@yandex.ru.

Владимир Иванович Горшков – кандидат сельскохозяйственных наук, зав. лабораторией селекции и семеноводства рапса ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рапса», Российская Федерация, г. Липецк, тел. 8(4742) 34-63-61, e-mail: gorshkov.vi@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию 04.04.2018

Дата принятия к печати 20.04.2018

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Emma K. Gorshkova – Candidate of Agricultural Sciences, Academic Secretary, All-Russian Research Institute of Rapeseed, Russian Federation, Lipetsk, tel. 8(4742) 34-63-61, e-mail: emmakonstantinovna@yandex.ru.

Vladimir I. Gorshkov – Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory of Rapeseed Breeding and Farming, All-Russian Research Institute of Rapeseed, Russian Federation, Lipetsk, tel. 8(4742) 34-63-61, e-mail: gorshkov.vi@yandex.ru.

Received April 04, 2018

Accepted April 20, 2018