

Krzysztof Michalski, Krystyna Czernik-Kolodziej

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Zastosowanie spektrofotometrii w bliskiej podczerwieni (NIR) do oznaczania podstawowych składników nasion rzepaku

Application of NIR spectrometry for analysis of basic chemical constituents of rapeseed

Słowa kluczowe: NIR, rzepak, NDF – neutralne włókno detergentowe, ADF – kwaśne włókno detergentowe, spektroskopia NIR

Keywords: NIR, rapeseed, NDF – neutral detergent fiber, ADF – acid detergent fiber, NIR spectroscopy

Analizy chemiczne rzepaku są pracochłonne i kosztowne, stąd do szybkiego oznaczania próbek konieczne jest stosowanie metod fizycznych, jak NMR czy NIR. W pracy opisano zastosowanie analizy transmisyjnej w NIR do oznaczania takich składników nasion rzepaku, jak NDF, ADF, białko, tłuszcz. Wykonano kalibrację na bazie około 100 próbek dla NDF i ADF oraz 50 próbek dla białka i tłuszczu. Otrzymane rezultaty wskazują na możliwość zastosowania tej metody w rutynowej analizie w pracach hodowlanych.

The chemical analyses of rapeseed are time and labor consuming, thus to quick analysis of breeding materials it is necessary to use the physical method – such as NMR or NIR. In this work NIR transmittance analysis was applied for analysis of such constituents of rapeseed as NDF, ADF, protein and fat content. Calibration was made on the basis of about 100 samples for NDF and ADF and 50 samples for fat and protein. Obtained results reveal the opportunity to apply this method for routine analysis in breeding works.

Wstęp

Do badań nad otrzymaniem materiałów wyjściowych do hodowli rzepaku potrzeba dużej ilości analiz, co w wypadku badania kilku parametrów jest bardzo kosztowne. Jedyne dostępne metody fizyczne to analiza NMR — można tą metodą oznaczać jedynie zawartość tłuszczu lub w bardziej zaawansowanych aparatach tłuszczu i wody — oraz analiza odbiciowa lub transmisyjna w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR/NIT). Metodą NIR można oznaczać jednocześnie kilka parametrów, niemniej kalibrowanie aparatu jest długotrwałe i wymaga dostępu do próbek o dużej zmienności składu chemicznego i uwzględnienia w zbiorze kalibracyjnym różnych dodatkowych parametrów, jak pogoda, klimat, jakość

gleby. Osiąga się to dodając do podstawowego zbioru próbki zebrane w różnych latach i miejscach. Analiza w bliskiej podczerwieni po raz pierwszy została zastosowana przez Karla Norrisa (1965) w latach sześćdziesiątych, a w szerszym stopniu, po upowszechnieniu się tanich komputerów, na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych. Analiza NIT/NIR od dawna jest stosowana także do badań nad rzepakiem. Font (1999), Pruvot (1999) i Velasco (1999) użyli tej metody do badań nad glukozynolanami, zarówno sumą jak i pojedynczymi, Mollers (1999) do oznaczania estrów kwasu sinapinowego, Patel (1999), Marcroft, Allen (1999) i Potter (1999) do oznaczania zawartości białka i tłuszczu. W cytowanych pracach wykorzystywano różne wersje aparatów NIRS pracujących w trybie analizy odbiciowej.

Celem badań było zastosowanie szybkiej analizy w podczerwieni do opracowania metody szybkiej analizy materiałów genetycznych i hodowlanych rzepaku żółto- i czarnonasiennego na zawartość białka, tłuszczu, NDF (neutralne włókno detergentowe) i ADF (kwaśne włókno detergentowe).

Materiały i metody

Do badań użyto spektrofotometru transmisyjnego Infratec 1255 pracującego w zakresie 700–1100 nm i kuwety 6 mm, która pozwalała na otrzymanie sygnału w optymalnym zakresie intensywności dla rzepaku, rzepiku i gorczycy. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Unscrambler metodą PLS, która pozwala na wykorzystanie w kalibracji całego widma (Martens, Naes 1990). Analizy referencyjne próbek kalibracyjnych wykonano metodami: Kjeldahla (białko), Soxletha (tłuszcz) oraz Van Soesta (NDF i ADF). Każda z analiz była przeprowadzana w dwu powtórzeniach celem zmniejszenia błędów próbek wzorcowych. Ogółem do kalibracji użyto 99 (w obliczeniach dla białka i tłuszczu użyto 52 próbki) próbek nasion rzepaku żółtonasiennego i czarnonasiennego, pochodzących ze zbiorów w latach 1996–1999 z własnych materiałów IHAR, a dobranych pod kątem największej zmienności oznaczanych składników. Kalibrację wykonywano w sposób krokowy, w pierwszym kroku wykorzystano dostępną w danej chwili mniejszą ilość próbek do kalibracji. Następnie badając za pomocą tak otrzymanego równania dostępne materiały i selekcyjując próbki które dawały wyniki niezgodne z rzeczywistością, lub dla których test „outliers” wykazywał wartości powyżej 1 w jego spektralnej części, co sugerowało niezgodność próbek na poziomie spektralnej z tymi, których użyto do kalibracji. Próby takie po analizie chemicznej dołączano w następnym kroku do kalibracji, aby zwiększyć jej uniwersalność i odporność. Operacje takie dokonuje się co roku, starając się poszerzyć bazę kalibracji o czynniki nie ujęte dotąd w zbiorze próbek, np. wpływ pogody i zmian klimatycznych lub glebowych na przestrzeni lat.

Wyniki

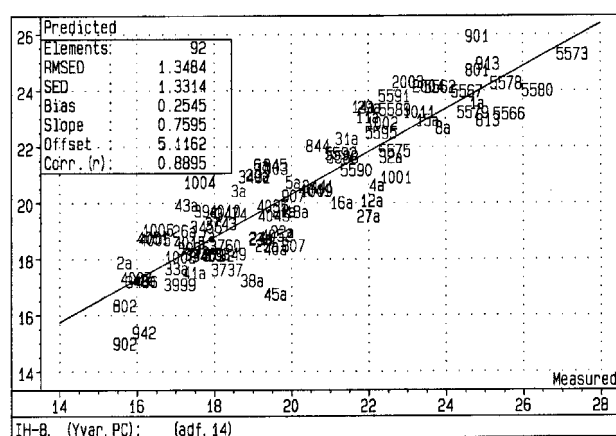
Wyniki kalibracji na obecnym etapie badań pokazano w tabeli 1 oraz graficznie na rysunkach 1–4. Kalibracje wykazują wysoki stopień korelacji dla białka (0,96), tłuszczu (0,96) oraz NDF (0,93), gorszy dla ADF (0,88), co związane jest głównie z zakresem zmienności zawartości oznaczanego składnika. Oznaczone składniki chemiczne nie stanowią pojedynczego związku chemicznego lecz są grupami związków, stąd piki absorcyjne są rozmyte modyfikacjami wprowadzonymi poprzez otoczenie chromoforowych grup funkcyjnych, co powoduje obniżenie stopnia korelacji i zwiększenie błędu standardowego.

Dużą zaletą metody jest możliwość jednoczesnej analizy wszystkich czterech parametrów w tym samym czasie. Pomiar ten trwa około 2 minut.

Tabela 1

Zestawienie wyników kalibracji — *Calibration summary*

| Składnik <i>Component</i> | Zakres zmienności (%) <i>Variability range</i> | Współczynnik korelacji <i>Correlation coefficient</i> | Błąd standardowy(%) <i>Standard error</i> |
|------------------------------|---|--|--|
| Białko — <i>Protein</i> | 15–29 | 0,96 | 0,69 |
| Tłuszcz — <i>Oil</i> | 39–50 | 0,96 | 0,89 |
| NDF | 13–31 | 0,93 | 1,6 |
| ADF | 16–27 | 0,89 | 1,3 |



Objaśnienie opisów z wykresu:

Elements — liczba próbek

RMSED — główny średni błąd standardowy

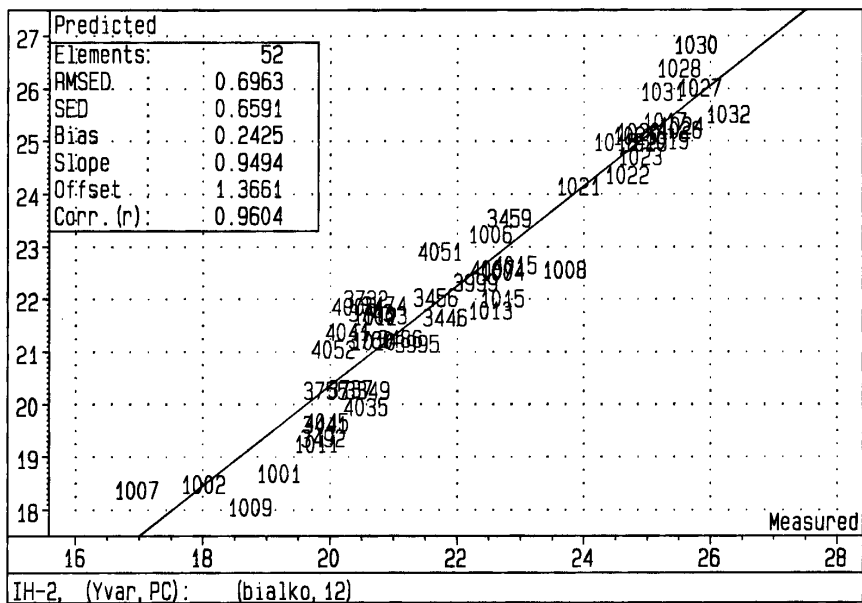
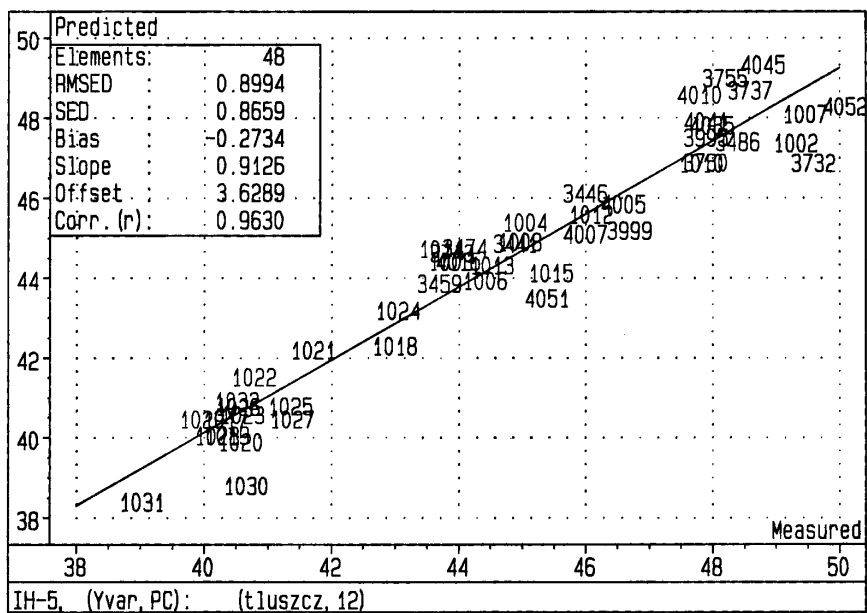
SED — błąd standardowy — w stosunku do RMSED liczba stopni swobody pomniejszona o 1

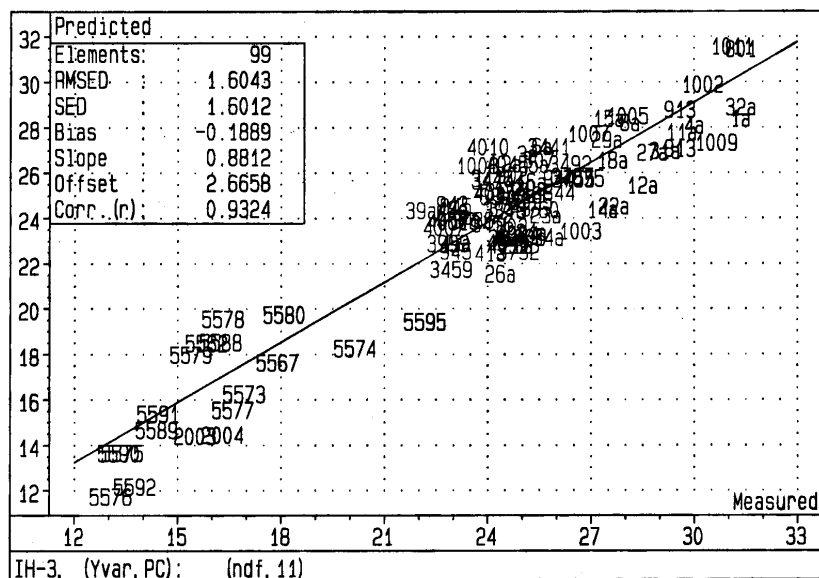
Bias — średnia różnica pomiędzy wynikami laboratoryjnymi a zmierzonymi

Offset — przesunięcie na osi Y

Corr — współczynnik korelacji wielokrotnej

Rys. 1. Wyniki kalibracji dla ADF — *ADF calibration results*

Rys. 2. Wyniki kalibracyjne dla białka — *Protein calibration results*Rys.3. Wyniki kalibracyjne dla tłuszczu — *Fat calibration results*

Rys. 4. Wyniki kalibracyjne dla NDF — *NDF calibration results*

Wnioski

Analizując wielkość błędów standardowych można zakwalifikować opracowaną metodę jako przydatną do wstępnej selekcji materiałów hodowlanych, co pozwoli wyeliminować większość próbek nie spełniających wymogów i ograniczyć ilość analiz chemicznych.

Badania będą kontynuowane, a baza kalibracji rozszerzana o nowe próbki.

Literatura

- Baetzl R., Friedt W., Voss A. 1999. Development of yellow-seed high-erucid acid rapeseed (*Brassica napus* L.). Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Greenwood C., Allen J., Leong A., Pallot T., Golder T., Golebiowski T. 1999. An investigation of the stability of NIRS calibrations for the analysis of oil content in whole seed canola. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Marcroft S., Potter T., Salisbury P., Burton W., Ballinger D. 1999. Effect of farmer-retained canola seed on yield and quality. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Potter T., Kay J., Ludwig I. 1999. Effect of row spacing and sowing rate on canola cultivars with varying early vigour. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.

- Font R., DelRio M., Dominguez J., Fernandez-Martinez J., DeHaro A. 1999. Using of NIRS for determining glucosinolate content in *Brassica juncea* seed. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Velasco L., Mollers C. 1999. Selection for reduced sinapic acid esters content in rapeseed. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Velasco L., Mollers C. 1999. Analysis of individual glucosinolates in *Brassica* spp by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Velasco L., Mollers C., Becker H. 1999. Screening for quality traits in single seeds of rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Mollers C., Lickfett T., Matthaus B., Velasco B. 1999. Influence of P-fertilizer on phytic acid content in seeds of *Brassica napus* L. and development of a NIRS calibration. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Patel J., Elhalwagy M., Falak I., Tulsieram L. 1999. S1 per se recurrent selection in three spring canola (*Brassica napus*) populations. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Pruvot J., Kraling K., Charne D., Tulsieram L. 1999. Development of low glucosinolate restorer and OGU CMS winter rape hybrid. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 26-29.9.1999.
- Martens H., Naes T. 1990. Multivariate calibration. John Willey and Sons, New York 1990.
- Norris K.H., Hart J.R. 1965. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. Principles and methods of measuring moisture in liquids and solids, 4: 19-25.
- Anonym 1985. The use of principal components in the analysis of near-infrared spectra. Applied Spectroscopy, 39 (2): 257-266.