

Krzysztof Michalski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

Oznaczanie tłuszczu w nasionach rzepaku – porównanie metod spektrometrii NMR oraz NIR odbiciowej i transmisyjnej

Measurement of fat content in oilseed rape seeds – comparison of NMR and NIR reflectance and transmittance methods

Słowa kluczowe: rzepak, tłuszcz, bliska podczerwień, NIR, NIT, NMR, selekcja na zawartość oleju

W pracach hodowlanych nad rzepakiem istnieje potrzeba szybkiego oznaczania zawartości różnych składników chemicznych w nasionach, w tym również tłuszczu będącego jedną z ważnych gospodarczo cech i podstawą selekcji nowych genotypów. Oznaczanie tłuszczu metodami chemicznymi jest kosztowne i czasochłonne. Alternatywą mogą być metody instrumentalne, a mianowicie spektrometria w bliskiej podczerwieni oraz powszechnie stosowana od lat metoda rezonansu magnetycznego (NMR). W badaniach zastosowano pulsacyjną metodę NMR (pozwala oddzielić od sygnału tłuszczu sygnał wody).

Badano też analizę za pomocą bliskiej podczerwieni, w dwu wersjach, tj. pomiar w świetle przechodzącym i odbitym (NIR i NIT). Porównano wyniki otrzymane za pomocą powyższych metod z metodą Soxhleta. Wykorzystano spektrofotometr NIRS 6500 pracujący w świetle odbitym oraz Infracore 1255 pracujący w świetle przechodzącym, a także analizator rezonansu magnetycznego NMR model MQA 7005.

Przebadano serię próbek nasion odmian i linii hodowlanych pochodzących z prac IHAR Oddział w Poznaniu. Zaletą analizy NIR/NIT jest możliwość równoległego pomiaru innych parametrów, jak zawartość białka i glukozydów (NIR).

Key words: rapeseed, fat, near infrared, NIR, NIT, NMR, selection for oil content

Breeding works on rapeseed demand fast seed analysis for different chemical compounds, including fat content, which is a basic parameter for new lines selection. Soxhlet wet analysis of fat content is a time consuming and expensive procedure. Alternatively, instrumental analysis by NIR/NIT (near infrared reflectance/transmittance) or NMR (nuclear magnetic resonance) method can be applied. NMR method is commonly used in breeding works, although allows only the measurements of fat and moisture content (pulse NMR).

NIR analysis can be conducted in the transmittance or reflectance mode. An attempt to compare both methods was made. Samples of seeds were measured on reflectance machine NIRS 6500, transmittance machine Infracore 1255 and pulse NMR Oxford MQA 7005 with rapeseed calibration.

For comparison the seed sample set of 46 breeding lines and varieties was used. Obtained results show that the lowest error against Soxhlet reference method was attained by NIT method and NMR (NIT, commercial ANN equation, SEP 0.59, correlation coeff. 0.843, NMR SEP 0.67, correlation coefficient 0,800). The worst results were obtained by NIR (in house equation, error about 1.0). The NIR calibration needs further work to enhance the results quality.

Wstęp

W pracach hodowlanych nad rzepakiem istnieje potrzeba szybkiego oznaczania zawartości różnych składników chemicznych w nasionach, w tym również tłuszczu będącego podstawą przy selekcji nowych linii. Klasycznie zawartość tłuszczu oznacza się metodą Soxhleta zmodyfikowaną dla rzepaku (Krzymański 1954, Krzymański 1967). Jest to metoda czasochłonna, niemniej nadal jest stosowana jako metoda referencyjna. Używa się jej również do kalibrowania metod drugorzędowych, takich jak NMR (Krzymański 1970) czy NIR. Metoda NMR polega na wzbudzeniu w silnym jednorodnym polu magnetycznym próbki materiału falami radiowymi, co powoduje zaburzenie spinu protonów wodoru zawartych w składnikach płynnych, to jest w wodzie i oleju, po scałkowaniu sygnału z detektora możliwe jest obliczenie zawartości tłuszczu (dla aparatów ze stałą falą konieczne jest doprowadzenie próbki do stałej wilgotności, aparaty pulsacyjne są w stanie rozdzielić sygnał wody i oleju na podstawie czasu zaniku sygnału). Do kalibrowania aparatów NMR wykorzystywano początkowo jedną próbkę wzorcową (Krzymański 1970); w późniejszych wersjach aparaty wzorcowano na większej ilości próbek, wykorzystując regresję do wyliczenia krzywej (PN EN ISO 5511:1999). W analizie w bliskiej podczerwieni metoda regresji była stosowana od początku z uwagi na specyfikę tej techniki (Panford i in. 1988). Najnowsza generacja NMR firmy Oxford to spektrometry pulsacyjne (PN EN ISO 10565:1999), które pozwalają oddzielić od sygnału tłuszczu sygnał wody.

Sprawdzono też metody analiz w bliskiej podczerwieni, w dwu wersjach, tj. pomiar w świetle przechodzącym i odbitym. Podstawą metody jest wzbudzenie drgań grup funkcyjnych zawierających proton wodoru (np. NH, OH, CH). Zakres bliskiej podczerwieni (400–2500 nm) operuje na nadtonach od pasma podstawowego, używanego do identyfikacji substancji. Nadtony (drgania harmoniczne od tonu podstawowego) mają długości fal znacznie krótsze niż pasmo podstawowe, a ich natężenie jest statystycznie powiązane z zawartością mierzonej grupy funkcyjnej w próbce. Stanowi to podstawę analizy jakościowej tą techniką. Ze względu na to, że otoczenie grup funkcyjnych modyfikuje długość fali nadtonu, ta sama grupa funkcyjna występująca w dwu różnych związkach chemicznych daje sygnał na różnej długości fali. Ta cecha pozwala na wydzielenie w tym samym widmie sygnałów od bardzo różnych związków chemicznych: np. białko, woda, glukozynolany, tłuszcz. W rzeczywistości w kompleksowym widmie bardzo trudno wydzielić czyste piki oznaczanych substancji i np. sygnał dla glukozynolanów może być mierzony na zboczu piku zamiast na jego szczycie. Dlatego aparaty bliskiej podczerwieni skaluje się wykorzystując próbki materiału o oznaczonej chemicznie zawartości danego składnika. Równania kalibracyjne oblicza się za pomocą różnych odmian regresji, wykorzystując zarówno pojedyncze długości fal (regresja wielokrotna), jak i całe widma (analiza głównych składowych).

Aby kalibracja dawała poprawne odczyty baza próbek powinna zawierać materiały reprezentujące wysoki procent zmienności całej populacji. Do obliczania kalibracji używa się również metod opartych o sztuczne sieci neuronowe (ANN), co np. dla zbóż daje bardzo stabilne kalibracje nadające się do stosowania na całym świecie. Wadą tego rozwiązania jest liczba próbek wymaganych do kalibracji sięgająca wielu tysięcy, przy minimum co najmniej jednego tysiąca. Aparaty stosowane w bliskiej podczerwieni dzielą się ze względu na sposób pomiaru próbki na transmisyjne i odbiciowe, choć jest to podział nieostry i zależy od budowy aparatu (niektóre, np. NIRS 6500 mogą pracować zamiennie w obu trybach). Aparaty transmisyjne pracują zwykle w zakresie 400–1100 nm, ograniczenie to wynika z tego, iż wraz ze wzrostem długości fali maleje energia przez nią niesiona i przy około 1100 nm jest ona za mała, aby przeniknąć przez próbkę. Aparaty odbiciowe mogą pracować w całym zakresie widma, chociaż ze względu na geometrię pomiaru mierzona jest tylko stosunkowo cienka warstwa przylegająca do okienka kuwety (1–0,1 mm). W chwili obecnej w przemyśle i skupie ziarna dominują aparaty transmisyjne z kalibracjami ANN (na sztucznych sieciach neuronowych), nie mogą one jednak mierzyć wszystkich składników (np. glukozyolanów). Dlatego aparaty odbiciowe powszechnie używa się do selekcji w hodowli zarówno pojedynczych nasion (Velasco i in. 1999, Velasco i Möllers 2002), jak i próbek całych nasion (Mika i in. 2003) z uwagi na możliwość kompleksowego pomiaru podstawowych składników, jak np. białko, woda, glukozyolany, włókno.

Podjęto próbę porównania wyników otrzymanych za pomocą powyższych metod na podstawie serii próbek odmian i linii hodowlanych pochodzących z prac Zakładu Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych IHAR Oddział w Poznaniu.

Materiały i metody

Wykorzystano spektrometry:

- spektrofotometr NIRS 6500 pracujący w świetle odbitym i kalibrację PLS (wyliczona w IHAR),
- spektrofotometr Infratec 1255 pracujący w świetle przechodzącym i kalibrację ANN (komercyjna, FOSS),
- spektrometr rezonansu magnetycznego NMR model MQA 7005 kalibrowany fabrycznie.

Do badań użyto nasiona rzepaku z 46 linii wyhodowanych w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych IHAR Oddział w Poznaniu oraz pochodzących z kolekcji odmian. Próbki zeskanowano na spektrometrze NIRSystems 6500 w zakresie widma 400–2500 nm (widma odbiciowe) i spektrometrze Infratec 1255 w zakresie widma 750–1050 nm (widma transmisyjne) oraz zmierzono zawartość tłuszczu na spektrometrze NMR Oxford MQA 7005 z kalibracją fabryczną na

nasiona oleiste, która dodatkowo została dopasowana za pomocą regresji do wyników otrzymywanych metodami chemicznymi w Laboratorium Biochemicznym IHAR w Poznaniu. Analizę chemiczną zawartości tłuszczu przeprowadzono w ekstraktorze Soxhlet'a. Każda próbka po zmieleniu była odtłuszczana 3 dni, mielona i dodatkowo poddana odtłuszczaniu 1 dzień (6 h), aby osiągnąć jak najlepszą ekstrakcję. Każda próbka była analizowana w dwóch powtórzeniach, co pozwoliło oszacować błąd powtarzalności pomiaru. Opis statystyczny zbioru oraz otrzymany błąd powtarzalności analiz przedstawiono w tabeli 1.

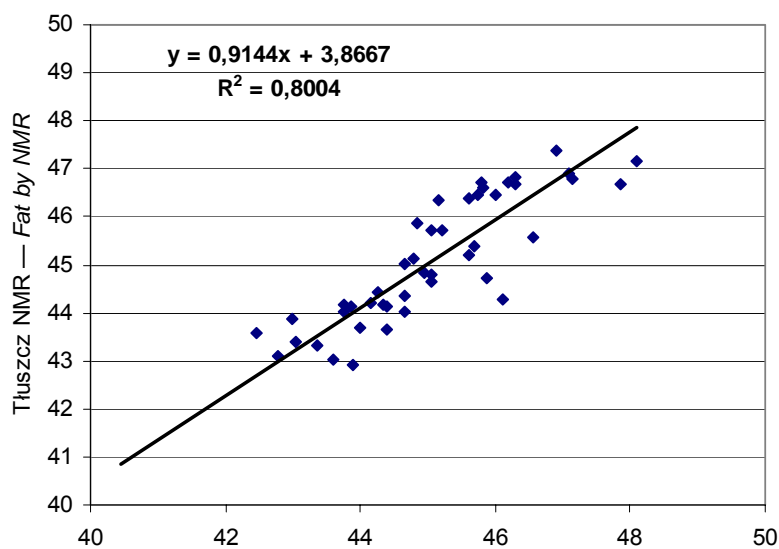
Tabela 1
Dane statystyczne analizy referencyjnej zawartości tłuszczu metodą Soxletha zbioru referencyjnego 46 próbek użytych do sprawdzenia metod instrumentalnych — *Statistical data of reference analysis of fat in rapeseed by Soxleth method – 46 validation samples*

Liczba próbek <i>Number of samples</i>	Zawartość tłuszczu <i>Fat content [%]</i>		Średnia zawartość tłuszczu <i>Average of fat content [%]</i>	Odchylenie standardowe zbioru <i>Standard deviation of sample set</i>	Błąd standardowy różnic równoległych oznaczeń <i>Standard error of differences</i>
	minimalna <i>minimum</i>	maksymalna <i>maximum</i>			
46	40,5	48,1	44,8	1,48	0,26

Dla wszystkich metod instrumentalnych wykonano pomiary w 3 powtórzeniach, opis statystyczny przedstawiono w tabeli 2, a porównanie wyników pomiędzy metodami prezentują wykresy 1–6. W tabeli 3 pokazano porównanie współczynników korelacji oraz błędów pomiędzy metodami.

Tabela 2
Dane statystyczne analiz instrumentalnych zawartości tłuszczu
Statistical data of instrumental analysis of fat content in rapeseed

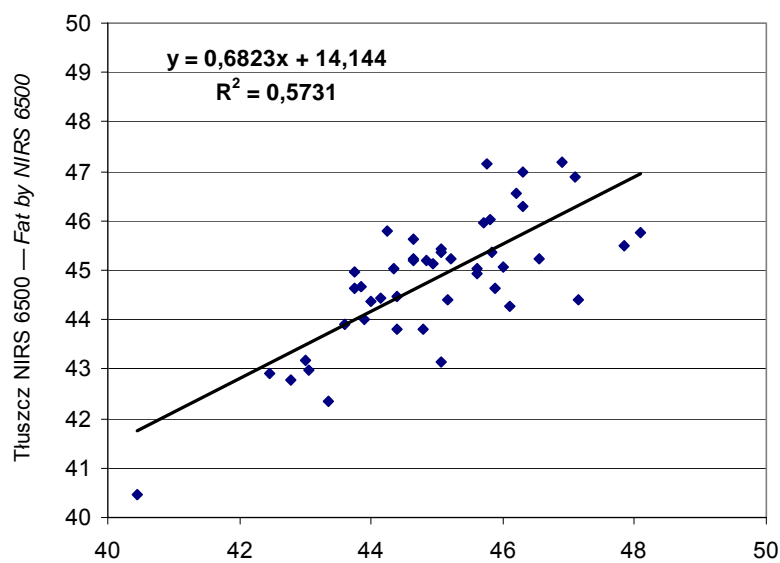
Metoda pomiaru <i>Measuring method</i>	Zawartość tłuszczu <i>Fat content [% s.m.]</i>		Średnia zawartość tłuszczu <i>Average of fat content [% s.m. — d.m.]</i>	Odchylenie standardowe zbioru <i>Standard deviation of sample set</i>	Średni błąd powtarzalności (3 powt.) <i>Average repeatability error (3 repetitions) [% s.m. — d.m.]</i>
	minimalna <i>minimum</i>	maksymalna <i>maximum</i>			
NMR	39,9	47,4	44,9	1,5	0,4
NIR	40,5	47,2	44,8	1,33	0,4
NIT	41,5	47,6	45,3	1,4	0,4



Tłuszcz NMR — Fat by NMR

Tłuszcz ref. (Soxhlet) — Fat by Soxhlet (ref.)

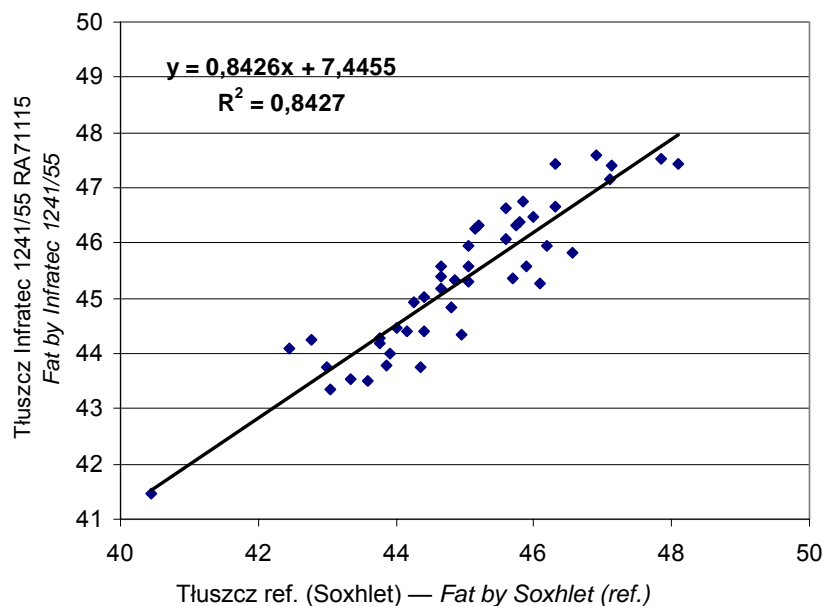
Rys. 1. Porównanie wyników analizy za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego (NMR) z wynikami analizy referencyjnej (%) — Comparison of reference data obtained by NMR method with results of fat content analysis (%)



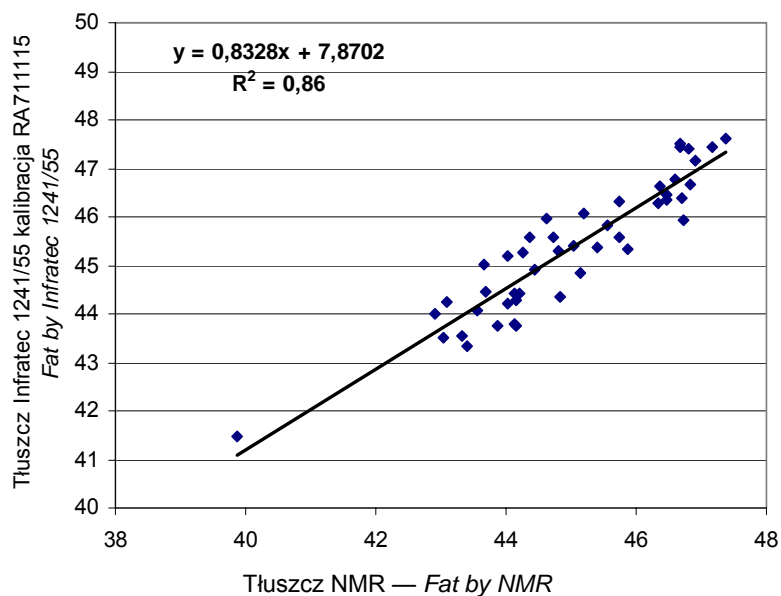
Tłuszcz NIRS 6500 — Fat by NIRS 6500

Tłuszcz ref. (Soxhlet) — Fat by Soxhlet (ref.)

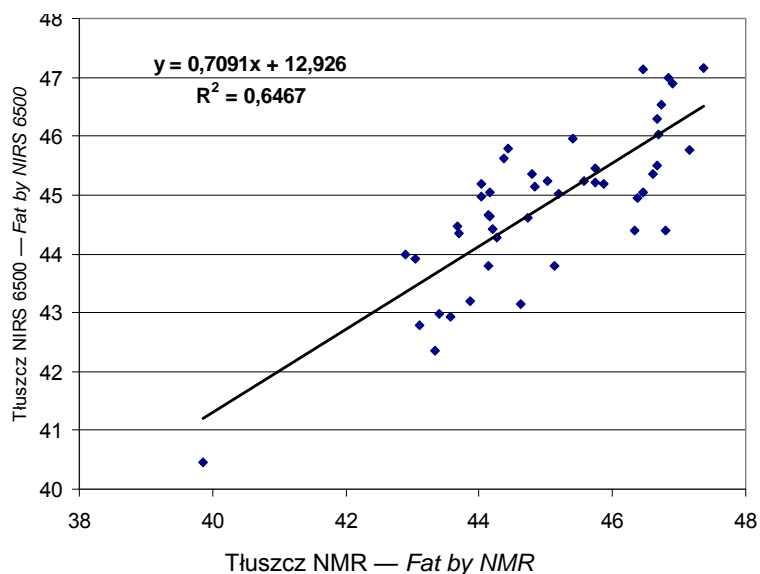
Rys. 2. Porównanie wyników analizy odbiciowej w bliskiej podczerwieni (NIR) z wynikami analizy referencyjnej (%) — Comparison of data obtained by near infrared reflectance method (NIR) with reference results of fat content analysis (%)



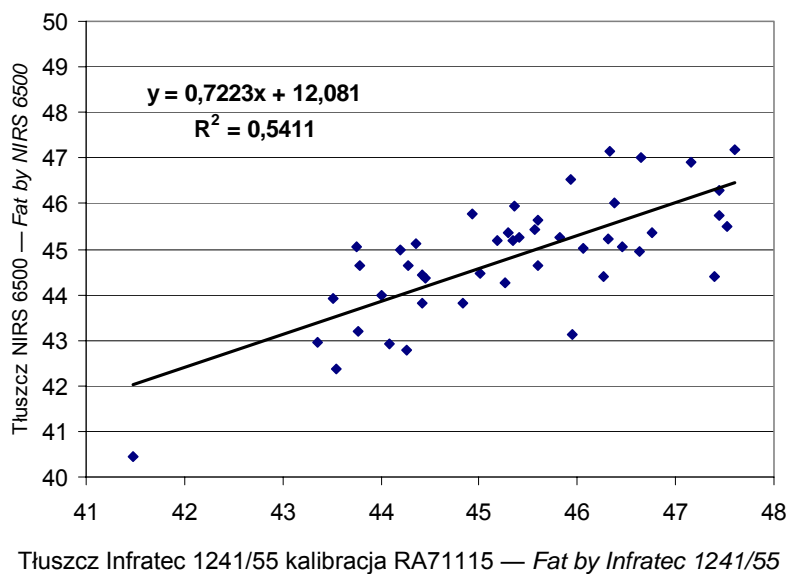
Rys. 3. Porównanie wyników analizy transmisyjnej w bliskiej podczerwieni (NIT) z wynikami analizy referencyjnej (%) — Comparison of data obtained by near infrared transmittance method (NIT) with reference results of fat content analysis (%)



Rys. 4. Porównanie wyników pomiaru tłuszczu na NMR z wynikami z NIT (Infratec 1241/55, kalibracja RA71115) (%) — Comparison of NMR results of fat content analysis with data obtained by near infrared transmittance method (NIT — Infratec 1241/55, RA71115 calibration) (%)



Rys. 5. Porównanie wyników pomiaru tłuszczu na NMR z wynikami z NIR (NIRS 6500, kalibracja IHAR) (%) — Comparison of NMR results of fat content analysis with data obtained by near infrared reflectance method NIR (NIRS 6500, IHAR in house calibration) (%)



Rys. 6. Porównanie wyników pomiaru tłuszczu na Infratec 1241 kalibr. RA71115 z wynikami z NIR (NIRS 6500, kalibracja IHAR) (%) — Comparison of NIT (Infratec 1241 RA71115) results of fat content analysis with data obtained by near infrared reflectance method NIR (NIRS 6500, IHAR in house calibration) (%)

Tabela 3

Zestawienie współczynników determinacji i błędów pomiaru
Comparison of determination coefficients and measurement errors

Współczynnik determinacji — *Determination coefficient (R²)*

Metoda — <i>Method</i>	Soxhlet (ref)	NMR	NIT	NIR
Soxhlet (ref)	1,000	0,800	0,843	0,573
NMR	0,800	1,000	0,860	0,647
NIT	0,843	0,860	1,000	0,541
NIR	0,573	0,647	0,541	1,000

Średnie błędy pomiędzy metodami — *Average errors among the methods*

Metoda — <i>Method</i>	Soxhlet (ref)	NMR	NIT	NIR
Soxhlet (ref)	0,00	0,67	0,59	0,97
NMR	0,67	0,00	0,57	0,91
NIT	0,59	0,57	0,00	0,91
NIR	0,97	0,91	0,91	0,00

Wnioski

- W stosunku do metody referencyjnej wyniki z Infratec wykazują się najmniejszym błędem pomiarowym i najwyższym współczynnikiem regresji (błąd — 0,59, współczynnik determinacji — 0,843, kalibracja komercyjna ANN).
- Metoda odbiciowa (NIR) daje największy błąd w porównaniu do metody referencyjnej, jak również w stosunku do NMR i NIT, i wymaga dopracowania poprzez dołączenie nowych próbek.
- W stosunku do NMR wyniki otrzymane za pomocą Infratec'a (NIT) wykazują największą zgodność (błąd — 0,57, współczynnik korelacji — 0,86).
- Można uznać iż dokładności metod NMR i NIT są porównywalne.

Literatura

- Krzymański J. 1954. Badanie chemiczne nasion oleju i makuchu z kapusty abisyńskiej (*Crambe abissinica* Hochst.). Roczniki Nauk Rolniczych, 69-A-3: 341-348.
- Krzymański J. 1967. Skład chemiczny nasion i oleju krokosza odmiany Borowski Gładki (*Carthamus tinctorius* L.). Biuletyn IHAR, 6: 161-163.

- Krzymański J. 1970. Oznaczanie zawartości wody i tłuszczu w nasionach oleistych metodą NMR. *Tłuszcze, Środki Piorące i K.*, 14, 45: 202-208.
- Mika, Tillmann V., Koprna R., Nerusil P., Kucera V. 2003. Fast prediction of quality parameters in whole seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil Environ.*, 49, 2003 (4): 141-145.
- Panford J.A., Williams P.C., deMan J.M. 1988. Analysis of oilseeds for protein, oil, fibre and moisture by NIRS. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65 (10): 1627-1634.
- PN EN ISO 5511:1999. Nasiona oleiste. Oznaczanie zawartości oleju. Metoda z użyciem niskorozdzielczej spektrometrii jądrowego rezonansu magnetycznego o fali ciągłej (metoda szybka).
- PN EN ISO 10565:1990. Nasiona oleiste. Równoczesne oznaczanie zawartości oleju i wody. Metoda z zastosowaniem spektrometrii pulsacyjnej magnetycznego rezonansu jądrowego.
- Velasco L., Möllers C., Becker H. 1999. Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, 106 (1): 79-85.
- Velasco L., Möllers C. 2002. Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*, 123 (1): 89-93.