

Krzysztof Michalski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Porównanie stosowania różnych zakresów widma do oznaczania glukozynolanów w nasionach rzepaku ozimego żółtonasiennego za pomocą metody NIRS

Comparison of the application of different spectral range for measurement of glucosinolate content in seeds of yellow winter oilseed rape by NIRS method

Słowa kluczowe: rzepak żółtonasienny, glukozynolany, analiza NIRS

Key words: oilseed rape, yellow seed, glucosinolates, chemical analysis NIRS

W pracach hodowlanych istnieje potrzeba szybkiego oznaczenia zawartości glukozynolanów w nasionach rzepaku. Obecnie istnieje tylko jedna metoda analizy instrumentalnej — spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIRS). Możliwości oznaczania tą metodą zależą od zakresu oraz typu użytego widma (odbite czy transmisyjne). Podjęto próbę porównania kalibracji w pełnym zakresie widma (400–2500 nm) VIS-NIR z kalibracją w zakresie bliskiej podczerwieni (1100–2500 nm) NIR. Na podstawie błędów walidacji stwierdzono, iż nie ma między nimi istotnych różnic. Jednak gdy mierzone próby wykazują się wysoką wartością niezgodności ze zbiorem kalibracyjnym, to kalibracja dla pełnego zakresu znacznie lepiej aproksymuje zawartość glukozynolanów niż kalibracja obliczona tylko dla NIR.

Breeding work needs quick analytical method for estimation of glucosinolate content in seeds of oilseed rape. At present there is only one physical method for glucosinolate measurement — spectrometry in NIR/VIS range. The applicability of the method depends on a spectral range and type of spectrum (transmission or reflectance). The trial was taken to compare methods using full available spectrum (400–2500 nm, VIS-NIR) against only NIR (1100–2500 nm) spectrum. Obtained results of comparison of full spectrum and NIR calibrations on the basis of validation error show that there are no significant differences in obtained results. However, if the measured samples show high Global H parameter in comparison to calibration set, better approximation of glucosinolate content was obtained for full spectrum (VIS-NIR) calibration.

Wstęp

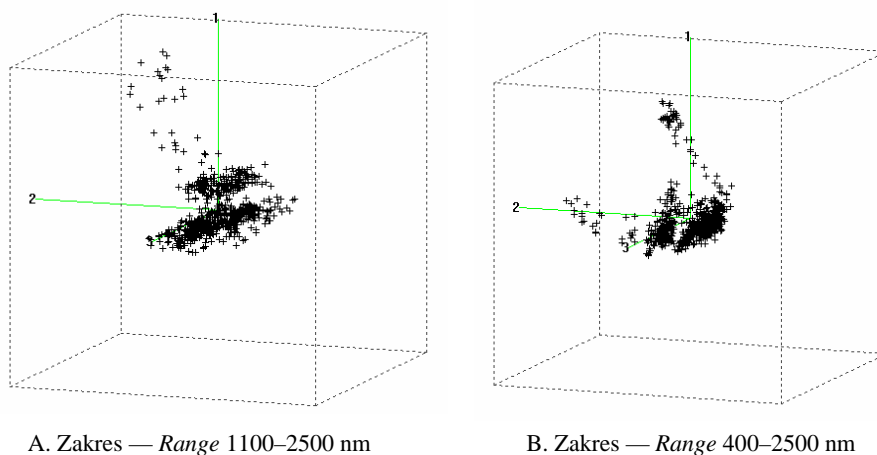
W hodowli nowych odmian rzepaku istotna jest znajomość składu i zawartości glukozynolanów. Analiza chemiczna jest kosztowna i czasochłonna, testy glukozowe zawodne i mało dokładne, przy czym otrzymuje się tylko sumaryczną

zawartość glukozyznanów. Jedyną obecnie dostępną metodą instrumentalną pozwalającą na pomiar zawartości indywidualnych glukozyznanów jest wprowadzona w latach 60-tych przez Norrisa (1965) spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIRS). Pozwala ona określić zawartość związków zawierających charakterystyczne grupy funkcyjne, takie jak CH-, OH-, NH-. Dostępne aparaty pozwalają na pracę zarówno w świetle odbitym, jak i w przechodzącym, choć ta druga metoda ogranicza górny zakres widma do 1100 nm. Zwykle przyjmuje się założenie, że im więcej danych spektralnych i im szerszy zakres widma, tym lepsze są osiągane wyniki. Podjęto próbę porównania dwu typów kalibracji wykorzystujących różne zakresy widma

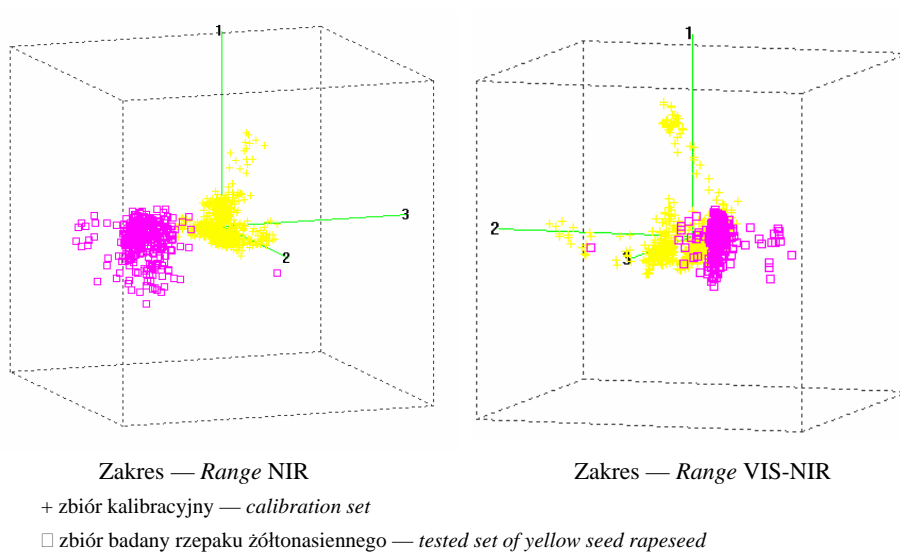
Metodę NIRS dla oznaczania zawartości glukozyznanów zaczęto stosować w latach osiemdziesiątych (Michalski 1987, Renard 1987) po upowszechnieniu się komputerów PC. Obecnie obserwuje się stałe rozszerzanie stosowania metody NIR w pomiarach zawartości glukozyznanów (Font 1999, Pruvot 1999, Velasco 1999), w tym tworzenie ogólnokrajowej sieci (www.vdlufa.de) urządzeń umożliwiającej ujednolicenie otrzymanych rezultatów, a także rozszerzanie pola zastosowań na inne składniki, jak np. estry kwasu sinapowego (Mollers 1999), zawartość tłuszczu i białka (Patel 1999, Marcroft 1999, Potter 1999, Michalski 2000). Dokładność opracowanych metod zbliża się do wartości granicznej, jaką jest dokładność metody referencyjnej. Oznaczanie zawartości glukozyznanów za pomocą metody bliskiej podczerwieni stosuje się w Laboratorium Biochemicznym IHAR w Poznaniu od ponad 10 lat, choć dopiero dostęp do spektrometru NIRSystems 6500 umożliwił pomiar z zadowalającą dokładnością. Kalibracje oparto na próbach rzepaku zarówno żółto-, jak i czarnonasiennego zebranych w badaniach genetycznych i hodowlanych w Oddziale IHAR w Poznaniu oraz w Hodowli Roślin Strzelce.

Materiały i metody

Zbiór kalibracyjny obejmuje 800 widm zmierzonych dla różnych odmian i linii rzepaku ozimego czarno- i żółtonasiennego w latach 2000–2003. Równania regresji obliczono dla poszczególnych glukozyznanów, jak i sumy glukozyznanów alkenowych. Do pomiarów użyto spektrofotometru NIRSystems 6500 pracującego w zakresie widma 400–2500 nm. Obliczenia matematyczne i kalibrację wykonano za pomocą pakietu WINISI II wersja 1.50 metodą modyfikowanego PLS (Partial Least Squares). Sprawdzenie równań wykonano metodą walidacji skrośnej (crossvalidation) (rys. 1 i 2, tab. 1). Za pomocą otrzymanych równań przemierzono 47 próbek rzepaku żółtonasiennego pochodzących z doświadczenia polowego założonego w roku 2002 i porównano wyniki z oznaczeniami chemicznymi (dane w tabeli 2). Zawartości poszczególnych glukozyznanów zostały oznaczone stosowaną w Laboratorium Biochemicznym IHAR metodą chromatografii



Rys. 1. Rozkład widm prób zbioru kalibracyjnego w przestrzeni Mahalanobisa dla pierwszych trzech głównych składowych dla zakresu NIR oraz VIS-NIR — *Sample pattern in Mahalanobis space for calibration set – three first principal components – for NIR and VIS-NIR range*



Rys. 2. Nałożenie na zbiór kalibracyjny widm rzepaku żółtonasiennego (47 próbek) dla zakresów NIR oraz VIS-NIR — *Overlapping of 47 spectra of yellow seed rapeseed samples with calibration set for NIR and VIS-NIR ranges*

Tabela 1

Kalibracja dla rzepaku czarno- i żółtonasiennego (800 próbek) w zakresie VIS-NIR i NIR
Calibration results for VIS-NIR and NIR range (800 samples black and yellow seed rapeseed)

SEC — błąd standardowy kalibracji — *standard error of calibration*

RSQ — współczynnik determinacji — *linear determination coefficient*

SECV — błąd standardowy walidacji skrośnej — *standard error of cross validation*

1-VR — współczynnik wariancji — *residual variance of validation*

Glukozynolan <i>Glucosinolate</i>	Zakres zawartości <i>Glucosinolate range</i> [μM/g]	SEC	RSQ	SECV	1-VR	Liczba głównych składowych <i>No of principal components</i>
Kalibracja w zakresie VIS-NIR — <i>Calibration results for VIS-NIR range</i>						
Glukonapina <i>Gluconapin</i>	0,2–6,2	0,5	0,71	0,56	0,64	15
Glukobrassicianapina <i>Glucobrassicianapin</i>	0,1–1,8	0,152	0,559	0,171	0,443	15
Progoitryna <i>Progoitrin</i>	0,1–17	0,675	0,790	1,119	0,723	15
Napoleiferyna <i>Napoleiferin</i>	0,1-0,3	0,03	0,475	0,036	0,236	15
Glukobrassicyna <i>Glucobrassicin</i>	0,1–0,4	0,08	0,251	0,08	0,18	7
4-OH glukobrasycyna <i>4-OH glucobrassicin</i>	1,1–7,2	0,74	0,54	0,8	0,46	11
Suma alkenowych <i>Total alkenyl</i>	1,7–27,5	1,53	0,78	1,7	0,73	16
Suma całkowita <i>Grand total</i>	4,1–20,7	1,7	0,79	1,9	0,731	16
Kalibracja w zakresie NIR — <i>Calibration results for NIR range</i>						
Glukonapina <i>Gluconapin</i>	0,2–6,5	0,51	0,71	0,56	0,64	16
Glukobrassicianapina <i>Glucobrassicianapin</i>	0,1–1,8	0,215	0,507	0,174	0,418	13
Progoitryna <i>Progoitrin</i>	0,9–29,2	1,05	0,807	1,097	0,771	16
Napoleiferyna <i>Napoleiferin</i>	0,1–0,4	0,03	0,5	0,036	0,36	14
Glukobrassicyna <i>Glucobrassicin</i>	0,1–0,5	0,08	0,2	0,09	0,13	7
4-OH glukobrasycyna <i>4-OH glucobrassicin</i>	1,1–7,2	0,72	0,45	0,78	0,36	11
Suma alkenowych <i>Total alkenyl</i>	1,7–27,5	1,57	0,79	1,7	0,75	16
Suma całkowita <i>Grand total</i>	4,1–27	1,6	0,8	1,8	0,75	16

gazowej silylowanych desulfoglukozynolanów (Michalski 1995). Sumaryczna zawartość glukozynolanów mieściła się w zakresie od 4,6 do 14,1 $\mu\text{M/g}$. Opis statystyczny badanego zestawu prób żółtonasiennych został przedstawiony w tabeli 2.

Tabela 2

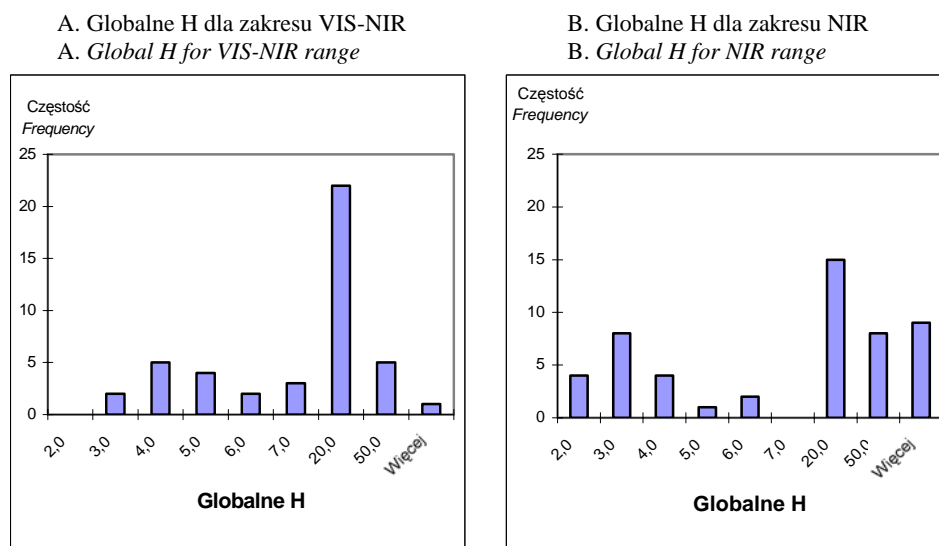
Opis statystyczny badanego zestawu 47 próbek rzepaku żółtonasiennego
Statistical description of examined set of 47 samples of yellow seed rapeseed

Glukozynolan <i>Glucosinolate</i>	Min [$\mu\text{M/g}$]	Max [$\mu\text{M/g}$]	Średnia <i>Mean</i> [$\mu\text{M/g}$]	Odchylenie standardowe <i>Standard deviation</i>	Błąd oznaczenia met. referencyjnej <i>Reference method error</i> [$\mu\text{M/g}$]
Glukonapina <i>Gluconapin</i>	0,2	3,6	1,1	0,6	0,44
Glukobrassicinapina <i>Glucobrassicinapin</i>	0	0,2	0,1	0,06	0,17
Progoitryna <i>Progoitrin</i>	0,3	5,1	1,7	0,96	1,0
Napoleiferyna <i>Napoleiferin</i>	0	0,1	0,05	0,05	0,3
Glukobrassicyna <i>Glucobrassicin</i>	0	0,3	0,2	0,07	0,05
4-OH glukobrasycyna <i>4-OH glucobrassicin</i>	3,4	5,6	4,5	0,5	0,72
Suma glukozynolanów <i>Total of glucosinolates</i>	4,6	14,1	7,6	1,6	1,7

Wyniki

Próbki nasion skanowano i równocześnie mierzono wykorzystując wcześniej opracowane równanie kalibracyjne dla nasion rzepaku czarno- i żółtonasiennego. Rysunek 1 pokazuje rozkład widm w przestrzeni Mahalanobisa dla pierwszych trzech głównych składowych. Na podstawie wykresów można stwierdzić, porównując rozkład Global H (dystans Mahalanobisa opisujący zbiór), iż bardziej prawidłowy jest wykres dla pełnego zakresu, aczkolwiek kalibracja wymaga uzupełnienia o testowane próbki. Na rysunku 2 pokazano nałożenie widm nowych prób żółtonasiennych na plik kalibracyjny (składający się z obu rodzajów nasion rzepaku, z przewagą czarnych nasion), przy czym tu również widoczna jest nieco lepsza zgodność obu zbiorów dla pełnego zakresu widma. Do oceny zgodności mierzonych widm ze zbiorem kalibracyjnym wykorzystywane są parametry Global H i Neighborhood H wyliczane na bazie dystansów Mahalanobisa. Pierwszy z nich ocenia zgodność badanej próbki z całym zbiorem kalibracyjnym, a drugi wyszukuje w zawężonym polu najbardziej podobne próbki, co upewnia analityka, iż

w zbiorze kalibracyjnym znajdują się próbki zbliżone do mierzonych. Podczas pomiaru zawartości glukozyolanów za pomocą równania opracowanego dla nasion rzepaku parametr oceny statystycznej Global H dawał wartości rzędu 10 i więcej, przy dopuszczalnej wartości poniżej 3, również Neighborhood H przekraczał przyjęte granice (poniżej 1). Histogram rozkładu wartości Global H pokazano na rysunku 3, tu również uwidacznia się gorszy rozkład dla zakresu NIR w stosunku do pełnego zakresu.



Rys. 3. Histogram dla globalnego H 47 prób żółtonasiennych zmierzonych za pomocą równań w zakresie VIS-NIR i NIR — *Global H histogram for 47 samples of yellow seed samples measured by equations NIR and VIS-NIR*

W tabeli 1 ujęto parametry kalibracyjne równań wyliczonych dla całego zakresu oraz tylko dla NIR. Porównując błąd walidacji skrośnej (SECV) dla obu tabel nie można wyróżnić jednego z równań jako istotnie lepszego.

Porównanie błędów analizy NIR względem analizy referencyjnej (tab. 3) pozwala na stwierdzenie, iż równanie dla pełnego zakresu jest stabilniejsze dla prób charakteryzujących się wysokim Global H w stosunku do równania opartego tylko o zakres NIR. Odsetek prób różnych spektralnie w stosunku do zbioru kalibracyjnego był wyjątkowo duży i parametry globalnego H przekraczały bardzo wysoko dozwoloną granicę, co widać na histogramach, gdzie dla zakresu 1100–2500 nm odsetek prób o wartościach H przekraczających 50 był znacznie większy niż dla pełnego zakresu, a to przekłada się również na większy błąd pomiarowy.

Praca będzie kontynuowana w celu sprawdzenia jak zachowują się kalibracje VIS-NIR oraz NIR, gdy mierzone próbki są spektralnie zgodne ze zbiorem kalibracyjnym.

Tabela 3

Porównanie średnich błędów analizy NIRS w stosunku do analizy referencyjnej dla kalibracji wykorzystującej pełne widmo VIS-NIR i widmo NIR — *Comparison of average errors of NIRS measurement against reference analysis for calibrations using full spectra (VIS-NIR) and NIR only*

Glukozyzolan <i>Glucosinolate</i>	Zakres widma — <i>Spectral range</i> [nm]	
	1100–2500	400–2500
Glukonapina — <i>Gluconapin</i>	1,94	2,80
Glukobrassicapina — <i>Glucobrassicapin</i>	0,29	0,29
Progoitryna — <i>Progoitrin</i>	1,34	2,85
Napoleiferyna — <i>Napoleiferin</i>	0,05	0,06
Glukobrassicyna — <i>Glucobrassicin</i>	0,21	0,09
4-OH glukobrasycyna — <i>4-OH glucobrassicin</i>	2,37	3,18
Suma całkowita glukozyzolanów <i>Total of glucosinolates</i>	2,91	3,13

Podsumowanie

- Porównując kalibracje dla pełnego zakresu widma (400–2500 nm) oraz dla zakresu (1100–2500 nm) NIR stwierdzono na podstawie błędu walidacji, iż nie ma między nimi istotnych różnic.
- Wypełnienie przestrzeni Mahalanobisa wydaje się bardziej prawidłowe dla zakresu NIR — optymalna jest równomiernie wypełniona kula.
- Jeśli mierzone próby wykazują się wysoką wartością niezgodności ze zbiorem kalibracyjnym, to kalibracja dla pełnego zakresu znacznie lepiej aproksymuje zawartość glukozyzolanów niż kalibracja obliczona tylko dla NIR.

Summary

- Comparison of full spectrum and NIR calibrations on the basis of validation error shows that there are no significant differences in obtained results.
- Filling of Mahalanobis space looks more properly in NIR range only — the optimal situation is when the globe is equally filled by samples.
- If measured samples are characterized by high Global H comparing to calibration set, then better approximation for glucosinolates is obtained by applying full-scale calibration.

Literatura

- 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.
- 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.
- Krzymański J., Piętko T., Michalski K., Krótka K. 1999. Study on winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) very low in aliphatic glucosinolate content. 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.
- Martens H., Naes T. 1990. Multivariate calibration. John Wiley and Sons, New York 1990.
- Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J. 1995. Quantitative analysis of glucosinolates in seeds of oilseed rape. Effect of sample preparation on analytical results. Proceedings of 9th International Congress, Cambridge.
- Michalski K., Kołodziej K. 2000. Zastosowanie spektrometrii w bliskiej podczerwieni (NIR) do oznaczania podstawowych składników nasion rzepaku. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops XXI (3): 801-806.
- Michalski K., Krzymański J., Byczyńska B. 1987. Determination of glucosinolate in intact seeds of winter rape (*B. napus*) by near infrared reflectance method Proceedings of 7th International Rapeseed Congress, 1541-1546.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Renard M., Bernard C., Deschamps M., Furtoss V., Lila M., Quinsac A., Regnier J.M., Riballier D. 1987. Glucosinolate analysis in whole rapeseed by near infrared reflectance spectroscopy. Glucosinolates in Rapeseeds: Analytical aspects. Ed. J.P. Wathelet, Martinus, Nijhof: 173-176.
- 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.