

Научная статья

УДК 633.853.494:57.088.1

DOI: 10.25230/2412-608X-2024-4-200-45-51

Усовершенствованная методика определения содержания глюкозинолатов в семенах масличных культур семейства Brassicaceae

Сергей Григорьевич Ефименко
Светлана Константиновна Ефименко

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
biohim@vniimk.ru

Аннотация. Полномасштабная селекционная работа с озимыми и яровыми формами рапса и сурепицы, направленная на создание безэруковых и низкоглюкозинолатных сортов («тип 00»), ведется во ВНИИМК более 40 лет. Для оценки селекционного материала на содержание глюкозинолатов в семенах рапса использовали модифицированную методику Н.С. Осик. Цель наших исследований – сравнительный анализ существующих методов определения содержания глюкозинолатов в семенах и поиск наиболее простой, точной и производительной методики, позволяющей эффективно вести селекционную работу с масличными культурами семейства Brassicaceae. Исследования проводили в лаборатории биохимии на образцах рапса, выращенных в 2022–2024 гг. в условиях центральной зоны Краснодарского края. Общее содержание глюкозинолатов оценивали представленной методикой в сравнении с методическими указаниями 1988 г. Г.Т. Демьянчука и методом ВЭЖХ. Проведенный сравнительный анализ существующих методов определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса показал сопоставимые значения результатов испытаний, различия которых были в пределах допустимых погрешностей. Представленная методика определения общего содержания глюкозинолатов в семенах показала адекватную повторяемость на спектрофотометре В-1200 и встряхивателе типа вортекс. Получены уравнения расчета содержания глюкозинолатов в зависимости от оптической плотности комплексного раствора глюкозинолатов с тетрахлорпалладатом (II) натрия в мкмоль/г семян. Усовершенствованная методика является наиболее простой, достаточно

точной и производительной и позволяет эффективно вести селекционную работу с масличными культурами семейства Brassicaceae.

Ключевые слова: спектрофотометрический метод, семена, рапс, глюкозинолаты, анализ, тетрахлорпалладат натрия (II)

Благодарности. Авторы выражают особую признательность за предоставленные материалы по проведению испытания образцов семян рапса: Артему Загоруйко, сотруднику испытательной лаборатории ФГБУ «Центр оценки качества зерна» и Алексею Кузнецову, сотруднику «Учебно-научного центра коллективного пользования «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Для цитирования: Ефименко С.Г., Ефименко С.К. Усовершенствованная методика определения содержания глюкозинолатов в семенах масличных культур семейства Brassicaceae // Масличные культуры. 2024. Вып. 4 (200). С. 45–51.

An improved method for determining glucosinolate content in Brassicaceae oil crops

Efimenko S.G., head of the lab., leading researcher, PhD in biology

Efimenko S.K., leading researcher, PhD in biology

V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops
17 Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia
biohim@vniimk.ru

Abstract. For more than 40 years, at V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops there has been carried out extensive breeding work with winter and spring varieties of rapeseed and turnip rape with the aim of developing non-erucic and low-glucosinolate (“type 00”) varieties. For evaluation of breeding material for glucosinolate content in rapeseed seeds we used modified method of Osik N.S. The purpose of our research is comparative analysis of existing methods for determination of glucosinolate content in seeds and search for the most simple, precise and productive method allowing efficient breeding work with oil crops of Brassicaceae family. The research was carried out in the laboratory of biochemistry on samples of rapeseed grown in 2022–2024 in conditions of the central zone of Krasnodar region. The total content of glucosinolates was evaluated by the presented method in comparison with methodical instructions of 1988 by Demyanchuk G.T. and by HPLC method. The comparative analysis of existing methods for determination of glucosinolate content in rapeseed seeds showed comparable values of test results, the differences of which were within the reasonable errors. The presented method for determination of the total glucosinolate content in seeds showed adequate repeatability on a spectrophotometer B-1200 and a shaker of the vortex type. The equations of calculation of glucosinolates

content depending on optical density of complex solution of glucosinolates with sodium tetrachloropalladate (II) in $\mu\text{mol/g}$ of seeds were obtained. The improved methodology is the simplest, sufficiently precise and productive, which allows effective breeding work with oil crops of the Brassicaceae family.

Key words: spectrophotometric method, seeds, rapeseed, glucosinolates, analysis, sodium tetrachloropalladate (II)

Acknowledgments. The authors would like to express their special gratitude to Artem Zagoruiko, employee of the testing laboratory of the Federal State Budgetary Institution "Grain Quality Assessment Centre" and Alexey Kuznetsov, employee of the "Collective Use Educational and Research Centre "Service Laboratory of Complex Analysis of Chemical Compounds" of the K.A. Timiryazev Russian State Agricultural Academy.

Введение. Полномасштабная селекционная работа с озимыми и яровыми формами рапса и сурепицы была начата во ВНИИМК в 1983 г. и направлена на создание безэруковых и низкоглюкозинолатных сортов («тип 00»). До этого времени в масле всех районированных и возделываемых отечественных сортов этих культур содержалось свыше 43 % эруковой кислоты, а в обезжиренных семенах – от 90 до 140 мкмоль/г глюкозинолатов. Масло, получаемое из семян таких сортов, использовалось на технические цели, а шрот – в ограниченном количестве на корм скоту. Снижение содержания глюкозинолатов в семенах рапса почти в 2 раза (с 45 до 22–26 мкмоль/г семян) было достигнуто селекционным путем в период с 1984 по 1988 гг. В это время были созданы первые отечественные сорта рапса ярового типа «00» Эввин, Шпат и Ярвэлон методом многократного индивидуального отбора с оценкой по потомству из гибридных комбинаций и обязательным контролем общего содержания глюкозинолатов в семенах [1].

В процессе продолжительной совместной работы селекционеров и биохимиков были получены биотипы рапса и сурепицы, содержащие менее 8 мкмоль/г глюкозинолатов в семенах. Успешное выполнение поставленных селекционных задач

по снижению этих серосодержащих веществ было обусловлено разработкой и внедрением Н.С. Осик эффективной методики определения общего содержания глюкозинолатов в семенах капустных культур [2].

Данная методика явилась модификацией метода Тисса (W. Thies, Institute of Agronomy and Plant Breeding, University Göttingen, Germany, 1982 г.), в основе которого лежало образование окрашенного комплекса при взаимодействии глюкозинолатов с тетрахлорпалладатом (II) натрия [3]. Параллельно Г.Т. Демьянчуком с коллективом проводилась аналогичная работа. И в 1988 г. были выпущены методические указания по «Оценке селекционного материала рапса и сурепицы на содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов» [4]. Методические указания Г.Т. Демьянчука являлись долгое время единственным официальным нормативным документом в Российской Федерации по определению глюкозинолатов в семенах рапса и сурепицы.

Достоинством методики, разработанной во ВНИИМК, является более высокая производительность в сравнении с методикой Демьянчука, а также наличие разработанной калибровочной таблицы показаний оптической плотности растворов D с известным содержанием глюкозинолатов, выраженных в процентах или мкмоль на грамм семян [2]. С другой стороны, это достоинство является и некоторым неудобством в современном способе заполнения электронного журнала. Потому что градуировочная таблица, выполненная с шагом в 0,01 % содержания глюкозинолатов от величины оптической плотности испытуемого раствора, достаточно объемная и занимает более трех страниц табличного текста.

С 2016 г. действует новый нормативный документ ГОСТ ISO 9167-1-2015. «Рапс. Определение содержания глюкозинолатов. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии» [5], который характеризуется довольно сложным по ис-

полнению и большим набором импортных, узкоспециализированных химических реактивов, а также непредсказуемой логистикой их приобретения.

Цель наших исследований – сравнительный анализ существующих методов определения содержания глюкозинолатов в семенах и поиск наиболее простой, точной и производительной методики, позволяющей вести эффективно селекционную работу с масличными культурами семейства Brassicaceae.

Материалы и методы. Исследования проводили в лаборатории биохимии на образцах рапса, выращенных в 2022–2024 гг. в условиях центральной зоны Краснодарского края.

В качестве основы для усовершенствования определения глюкозинолатов в семенах рапса была использована методика, разработанная Н.С. Осик, выполняемая на фотоколориметре КФК-2. Методика заключается в колориметрическом определении палладиевым реактивом алкенилглюкозинолатов (глюконапита, глюкобрассиканапина, прогойтрина) содержащихся в водном экстракте семян [2].

Для расчета доверительного интервала использовали метод статистического анализа ряда данных.

Результаты и обсуждение. В последние годы было предпринято много усилий по выявлению ошибок и причин повышения погрешности определения общего содержания глюкозинолатов в семенах рапса и сурепицы. Был проведен тщательный анализ приготовления применяемых растворов, способы перемешивания и использования различных устройств. Установлено, что применение ультразвуковой бани для интенсивного перемешивания негативно влияет на образование окрашенного комплекса глюкозинолатов с тетрахлорпалладатом (II) натрия. Так как это количественный анализ, точность и своевременность проведения всех этапов манипуляций позволяет снизить погрешность определения до 1–2 мкмоль/г семян.

Ниже представлена усовершенствованная методика общего определения глюкозинолатов в семенах масличных культур семейства Brassicaceae с использованием современных приборов: электронного спектрофотометра В-1200 и вортекса (устройство для быстрого и эффективного смешивания/перемешивания компонентов маловязких жидкостей за счет создания сильного вихревого движения смеси в емкости).

Для анализа берут 3–5 г очищенных семян рапса с влажностью не более 7 %, тщательно измельчают на мельнице или кофемолке дважды: первый раз 10 с и перемешивают измельченную массу шпателем, второй – немного дольше, в зависимости от масличности и влажности. Пересыпают в фарфоровую ступку и равномерно распределяют полученную массу. Взвешивают навеску 200 мг на торсионных весах и переносят в пробирку с пробкой с меткой на 5 мл, в пробирку добавляют по 0,3 мл 80 % этанола. Металлический штатив с пробирками и пробками к ним устанавливают в ультротермостат на 5 мин при температуре 90 °С для инактивации фермента мирозиназы. Достают штатив из термостата, приподнимая пробку, приливают в каждую пробирку пипеточным автоматическим дозатором 3 мл кипящей воды. В это время термостат закрывают крышкой и переводят регулятор температуры на 95 °С. Затем снова устанавливают штатив в термостат на 20 мин. Пробирки охлаждают в емкости с водой до комнатной температуры (10 мин) и в каждую добавляют по 100 мкл 30 % водного раствора сернокислого цинка пипеточным автоматическим дозатором. Тщательно перемешивают каждую пробирку, используя пробирочный встряхиватель – вортекс. После этого добавляют по 100 мкл 15%-ного раствора желтой кровяной соли (гексацианоферрат (II) калия $K_4[Fe(CN)_6]$) и также перемешивают. Эти манипуляции проводят для освобождения экстракта от белковых и цветообразующих компонентов. Затем доводят объем раствора до 5 мл дистиллированной водой до метки на пробирке.

Содержимое снова перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Из полученного фильтрата отбирают дозатором по 200 мкл в две пробирки каждый образец, после чего во все пробирки приливают по 1,8 мл 0,02 М раствора тетрахлорпалладата (II) натрия дозатором переменного объема. Также готовят пробирку холостой пробы. Для этого берут 200 мкл дистиллированной воды и 1,8 мл 0,02 М раствора тетрахлорпалладата (II) натрия. Полученный раствор перемешивают и инкубируют в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре (25 °С). Время отмечают, когда начинают добавлять раствор тетрахлорпалладата (II) натрия.

Оптическую плотность окрашенного комплекса измеряют на спектрофотометре В-1200 при 440 нм в кювете толщиной 3 мм и общим объемом 2 мл против холостой пробы. Перед анализом на спектрофотометре кюветы обрабатывают хромовой смесью (смесь концентрированной серной кислоты и дихромата калия) в течение 5 мин. Полученные данные параллельных испытаний оптической плотности растворов D проверяют правильность выполнения анализа, если разница превышает 8 %, то данный образец повторяют, если меньше – вычисляют среднее значение. Расчет общего содержания глюкозинолатов в семенах рапса и сурепицы ведут по калибровочной таблице показаний оптической плотности растворов D с известным содержанием глюкозинолатов, выраженных в процентах или мкмоль на грамм семян.

Приготовление растворов. Водный раствор тетрахлорпалладата (II) натрия готовят непосредственно перед измерением массовой доли глюкозинолатов в семенах. На аналитических весах отweighивают 0,0354 г и растворяют в стаканчике с 2 мл насыщенного раствора NaCl и с 2 мл горячей дистиллированной воды на водяной бане при 90 °С, постоянно помешивая глазной палочкой до полного растворения. Раствор должен быть прозрачным. Если не становится прозрачным, то необходимо добавить немного горячей дистиллированной воды. Прозрачный раствор переносят

в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор переливают в колбу с воронкой по палочке очень аккуратно. Затем ополаскивают палочку и стаканчик, выливая все в колбу, и доводят до метки.

Для приготовления насыщенного раствора NaCl берут навеску 35 г и растворяют ее в 100 мл дистиллированной воды.

30%-ный водный раствор сульфата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$): 30 г сульфата цинка растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем раствора водой до 100 мл.

10%-ный водный раствор желтой кровяной соли (железистосинеродистого калия): 15 г $[K_4Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ растворяют с небольшим подогревом с дистиллированной водой и доводят объем до 100 мл.

По калибровочной таблице [2] нами получено уравнение расчета общего содержания глюкозинолатов в семенах в зависимости от оптической плотности раствора D, представленное на рисунке.

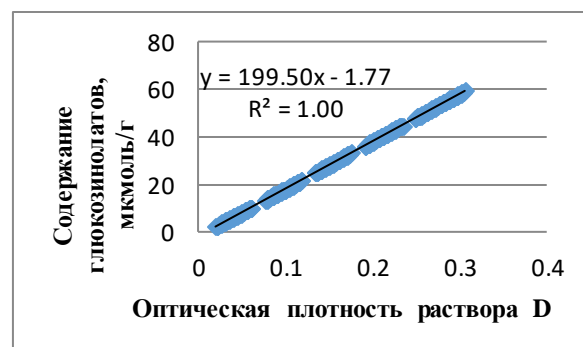


Рисунок – Калибровочный график зависимости содержания глюкозинолатов в семенах рапса от оптической плотности раствора D

Полученное уравнение: $y = 199,5x - 1,77$, позволяет использовать электронные таблицы и ввод значений аргумента (оптической плотности раствора) в ячейку. Таким образом, будет автоматически рассчитываться значение ординаты.

Для подтверждения качества предлагаемой методики были взяты данные значений содержания глюкозинолатов в контрольном образце из журнала регистрации массовых анализов по рапсу. В июне 2023 г.

контрольным образцом стал перспективный номер (новый сорт озимого рапса Оливин), 300 г семян которого были подготовлены для исследований повторяемости и влияния несистематических факторов на результаты. За прошедшее время было проанализировано 1300 образцов, из которых контрольный образец оценили в 52 повторениях. Статистический анализ данных ряда значений содержания глюкозинолатов в семенах сорта Оливин представлен в таблице 1.

Таблица 1

Параметры статистического анализа данных ряда значений содержания глюкозинолатов в семенах рапса сорта Оливин

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2024 г.

Параметры	Значение содержания глюкозинолатов в семенах рапса, мкмоль/г
Среднее значение	14,2
Мин	13,7
Мах	15,1
Размах варьирования	1,4
Стандартное отклонение	0,27
Величина -n	52
Доверительный интервал	0,07

Среднее значение искомого показателя составило 14,2 мкмоль/г. Диапазон изменчивости содержания глюкозинолатов в семенах сорта Оливин был от 13,7 до 15,1 мкмоль/г с размахом варьирования 1,4 мкмоль/г. Наблюдается небольшая асимметрия представленных данных с модой этого ряда – 14,3 мкмоль/г.

Погрешность определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса составила менее 1 мкмоль/г при стандартном отклонении в 0,27.

Для подтверждения работоспособности усовершенствованной нами методики были проведены межлабораторные исследования на трех образцах рапса с различным содержанием искомого показателя. Часть исследований выполнили сотрудники испытательной лаборатории ФГБУ

«Центр оценки качества зерна» согласно методическим указаниям 1988 г. Г.Т. Демьянчука [4].

Полученные результаты испытаний были предоставлены для сравнительного анализа подобных методик, статистический анализ данных представлен в таблице 2.

Таблица 2

Сравнительный анализ подобных методик определения и параметры статистического анализа данных ряда значений содержания глюкозинолатов в семенах рапса трех образцов

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2024 г.

Параметры	Содержание глюкозинолатов в семенах рапса, мкмоль/г		
	№ 254	№ 328	№ 294
Среднее значение, по методике ВНИИМК	20,5	49,5	75,4
Среднее значение, по методике Демьянчука Г.Т.	21,7	48,3	72,1
Мин	20,4	46,8	70,8
Мах	22,8	50,4	73,2
Размах варьирования	2,4	3,6	2,4
Стандартное отклонение	0,71	1,08	0,85
Величина -n	22	22	22
Доверительный интервал	0,30	0,45	0,36

Анализ полученных данных показал, что разница средних значений содержания глюкозинолатов образца № 254 составила 1,2 единицы при величине признака 20,5 мкмоль/г, у № 328 – 0,8 при значении 49,5 мкмоль/г, а у образца № 294 получили 3,3 при 75,4 мкмоль/г, такие различия допустимы для межлабораторных испытаний. С другой стороны, представленные статистические данные ряда значений содержания глюкозинолатов, полученные по методике Г.Т. Демьянчука, имеют несколько большее стандартное отклонение и доверительный интервал, но не превышают допустимой погрешности.

Необходимо отметить, что эти методики по последовательности и использованию химических реактивов идентичны, а различаются по величине навески, концентрации некоторых реактивов, значению оптической плотности комплексного раствора фильтрата глюкозинолатов с тетрахлорпалладатом (II) натрия и способом расчета концентрации глюкозинолатов в семенах рапса. Различия незначительны по величине средних значений, а усовершенствованная методика ВНИИМК в два раза производительнее и более технологичная по выполнению испытания и использованию химической посуды. Однако исследования были выполнены по расчетным методикам.

Для подтверждения точности разрабатываемой методики были проведены межлабораторные испытания в сравнении с методом ВЭЖХ [5]. Данный метод предполагает экстракцию семян рапса горячим метанолом с использованием внутреннего стандарта, проведение десульфатирования

и элюирования десульфоглюкозинолатов и дальнейшее разделение на ВЭЖХ колонке с градиентом элюирования вода/ацетонитрил. Регистрацию отдельных форм глюкозинолатов оценивают с помощью диодно-матричного детектора (ДАД) с идентификацией индивидуальных глюкозинолатов на масс-детекторе. Расчет общего содержания глюкозинолатов в семенах рапса производили по сумме площадей всех глюкозинолатов и коэффициенту отклика детектора индивидуальных форм.

Часть исследований выполнили сотрудники из «Учебно-научного центра коллективного пользования «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева согласно ГОСТ ISO 9167-1-2015. «РАПС. Определение содержания глюкозинолатов. Метод ВЭЖХ» [5]. Сравнительный анализ различных методов проведенных испытаний восьми образцов рапса представлен в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительный анализ различных методов (спектрофотометрический и ВЭЖХ) проведенных испытаний средних значений восьми образцов рапса

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, 2024 г.

	Значение содержания глюкозинолатов в семенах рапса, мкмоль/г на а.с.в.							
№ образца	№ 1	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 9	№10	№13
Методика ВНИИМК	8,5	27,1	33,4	46,2	49,4	16,3	30,3	92,1
Метод ВЭЖХ	7,6	25,7	31,6	47,0	49,6	15,1	26,5	87,0
Разница	0,9	1,4	1,8	-0,8	-0,2	1,2	3,8	4,6

Полученные сравнительные данные показали, что различия между стандартным современным арбитражным методом и представленной методикой соответствуют в ранге прецизионности результатов межлабораторных испытаний по повторяемости. Значения погрешности определения должны быть не более 2 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов менее 20 мкмоль/г и не более 4 мкмоль/г при содержании глюкозинолатов в диапазоне от 20 до 35 мкмоль/г. Исключением является образец № 13, содержание глюкозинолатов составило

87 мкмоль/г, а требование в ранге «воспроизводимости» допускает погрешность не более 8 мкмоль/г.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ существующих методов определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса показал сопоставимые значения результатов испытаний, различия которых были в пределах допустимых погрешностей.

Заключение. Представленная методика определения общего содержания

глюкозинолатов в семенах показала адекватную повторяемость на спектрофотометре В-1200 и встряхивателе типа вортекс. Получено уравнение расчета содержания глюкозинолатов в зависимости от оптической плотности комплексного раствора глюкозинолатов с тетрахлорпалладатом (II) натрия в мкмоль/г семян.

Усовершенствованная методика является наиболее простой, достаточно точной и производительной, что позволяет эффективно вести селекционную работу с различными культурами семейства Brassicaceae.

Список литературы

1. Бочкарева Э.Б., Горлова Л.А., Сердюк В.В., Стрельников Е.А. История селекции рапса ярового во ВНИИМК (обзор) // Масличные культуры. – 2023. – Вып. 3 (195). – С. 88–97.

2. Осик Н.С., Швецова В.П. Метод быстрой оценки общего содержания глюкозинолатов в семенах капустных для целей селекции // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – Вып. 116. – 1995. – С. 98–99.

3. Thies W. Complex-formation between glucosinolates and tetrachloropalladate (II) and its utilization in plant breeding // Fette. Seifen. Anstrichm. – 1982. – Vol. 84. – P. 338–342.

4. Оценка селекционного материала рапса и сурепицы на содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов: метод. указания / Подготовил Г.Т. Демьянчук [и др.]. ВАСХНИЛ, Ивано-Франковская научно-исследовательской станции крестоцветных культур. – М.: ВАСХНИЛ, 1988. – 16 с.

5. ГОСТ ISO 9167-1-2015. РАПС. Определение содержания глюкозинолатов. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Введен с 01.07.2016. – М.: Стандартинформ, 2016. – 12 с.

References

1. Bochkareva E.B., Gorlova L.A., Serdyuk V.V., Strel'nikov E.A. Istoriya selektsii rapsa yarovogo vo VNIIMK (obzor) // Maslichnye kul'tury. – 2023. – Vyp. 3 (195). – S. 88–97.

2. Osik N.S., Shvetsova V.P. Metod bystroy otsenki obshchego sodержaniya glyukozinolatov v semenakh kapustnykh dlya tseley

selektsii // Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – Vyp. 116. – 1995. – С. 98–99.

3. Thies W. Complex-formation between glucosinolates and tetrachloropalladate (II) and its utilization in plant breeding // Fette. Seifen. Anstrichm. – 1982. – Vol. 84. – P. 338–342.

4. Otsenka selektsionnogo materiala rapsa i surepitsy na sodержanie erukovoy kisloty i glyukozinolatov: metod. ukazaniya / Podgotovil G.T. Dem'yanchuk [i dr.]. VASKhNIL, Ivano-Frankovskaya nauchno-issledovatel'skoy stantsii krestotsvetnykh kul'tur. – М.: VASKhNIL, 1988. – 16 s.

5. ГОСТ ISO 9167-1-2015. RAPS. Opredele-nie sodержaniya glyukozinolatov. Metod vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. Vveden s 01.07.2016. – М.: Standartinform, 2016. – 12 s.

Сведения об авторах

С.Г. Ефименко, зав. лаб., вед. науч. сотр., канд. биол. наук
С.К. Ефименко, вед. науч. сотр., канд. биол. наук

Получено/Received

21.10.2024

Получено после рецензии/Manuscript peer-reviewed

25.10.2024

Получено после доработки/Manuscript revised

29.10.2024

Принято/Accepted

31.10.2024

Manuscript on-line

25.12.2024