

**Національна академія аграрних наук України**

**Селекційно-генетичний інститут-  
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення**

**Оцінка селекційного матеріалу соняшнику на  
якість насіння за біохімічними показниками**

**Методичні рекомендації**

Одеса – 2020

СГІ-НЦНС

Друкується за рішенням вченої ради  
Селекційно-генетичного інституту –  
Національного центру  
насіннезнавства та сортовивчення  
(протокол № , від 2019 р.

В представлених методичних рекомендаціях описані біохімічні методи оцінки якості насіння соняшнику, апробовані на різноманітному селекційному матеріалі відділу селекції та насінництва соняшнику в лабораторії біохімії рослин СГІ-НЦНС. Запропоновані методи можна використовувати для масової оцінки селекційного матеріалу соняшнику з метою добору цінного вихідного матеріалу за комплексом біохімічних ознак. Автори розробки рекомендують для підвищення достовірності й точності оцінки в роботі використовувати не один якийсь біохімічний показник, а кілька, які відповідають за різні аспекти формування якості насіння (сорна та олійна домішки, вміст жиру та його жирнокислотний склад, кислотне, перекисне та йодне число, вміст та компонентний склад токоферолів, вміст фосфоліпідів).

Для спеціалістів в області селекції та насінництва соняшника, біохімії рослин, а також для викладачів та студентів вищих навчальних закладів біологічного та сільськогосподарського профіля.

Автори:

**Молодченкова О. О.**, д.б.н., **Вареник Б. Ф.**, к.с.-г.н., **Крутько В. І.**, к.с.-г.н., **Безкровна Л. Я.**, ст. наук. співр., **Левицький Ю. А.**, наук. співр., **Фанін Я. С.**, аспірант

Рецензент: **Тихонов П. С.**, доцент ОДАУ

Відповідальний за випуск: директор СГІ-НЦНС, чл. – кор. НААНУ  
**В. М. Соколов**

© Селекційно-генетичний інститут–  
Національний центр насінне-  
знавства та сортовивчення  
(СГІ–НЦНС), 2020.

## 1. Теоретичне обґрунтування досліджень

Соняшник є однією з основних олійних культур у світі. За засвоюваністю та поживністю олія з нього перевищує багато інших видів рослинних жирів. Вона використовується у кулінарії, при виготовленні хлібних виробів, консервів, маргарину, а насіння низького гатунку – у переробній промисловості (лакофарбовій, миловарній та інш.). Соняшний шрот, жмих та макуха – високоцінний корм для тварин, лузга насіння застосовується на виробництві гексозного цукру, який годиться і для отримання кормових дріжджів та етилового спирту. Крім того, відсепаровані відходи використовують і для отримання біодизельного пального. Отже, є заради чого, широко впроваджувати соняшник. Важливо лише створювати дедалі цінніші гібриди цієї культури. І передусім – налагодити справді високоефективну селекцію цієї культури. А селекція соняшнику ведеться за більш ніж 30 ознакам: врожайністю, стійкістю до хвороб та шкідників, якістю його насіння, рівня олійності, поживна цінність тощо. І тут найперспективнішим виступає показник жирнокислотного складу олії, зокрема вміст у ній насичених (пальмітинової, стеаринової та ненасичених (олеїнової, лінолевої та ліноленової жирних кислот. Жирнокислотний склад олії відселектованого зразка дозволяє визначити його генотип і майже безпомилково прогнозувати рівень цієї ознаки в гібридах соняшнику. Дослідженнями ряду вчених доведено також, що підвищений вміст олеїнової кислоти в рослинних оліях позитивно впливає на обмін холестерину та сприяє у вирішенні ряду важливих проблем, пов'язаних із якістю рослинних олій, підвищення їхньої стійкості до автоокиснення в процесі переробки, зберіганні та використанні [1]. У медичній та дієтологічній літературі останніми роками з'являється дедалі більше даних про зв'язок споживання рослинних олій з високим вмістом поліненасичених жирних кислот, в першу чергу лінолевої, із схильністю до алергійних, серцево-судинних та онкологічних захворювань. Тому підвищений вміст олеїнової кислоти в харчових оліях є пріоритетною ознакою. Для нарощування її вмісту у соняшниковій олії створюються гібриди, у яких більша частина лінолевої кислоти замінена олеїною. В результаті соняшникова олія з високим (>80%) вмістом олеїнової кислоти має склад, схожий з таким визнаним дієтичним продуктом, як оливкова олія. Сьогодні найбільші площі під посівами соняшнику олеїнового типу знаходяться в країнах Європейського союзу, а також у США.

В СГІ-НЦНС налагоджено селекцію соняшнику олеїнового типу, спільно з Інститутом рослинництва ім. В. Я. Юр'єва уже створені гібриди олеїнового типу 'Гектор', 'Кадет' [1]. З метою відбору високоолеїнових ліній соняшнику в лабораторії

біохімії рослин СГІ-НЦНС відпрацьований метод ідентифікації окремих жирних кислот застосуванням газорідної хроматографії. Метод забезпечує швидке та високоточне виконання аналізів, автоматизований та впроваджений для масової оцінки селекційного матеріалу (до 100 зразків на добу). В НВА “Одеська біотехнологія” із насіння високоолеїнових гібридів соняшнику була отримана високоолеїнова олія “Оливка” [2], яка зареєстрована у МОЗ України та дозволена до використання.

Одним із актуальних напрямків селекції соняшнику є також створення форм з підвищеним вмістом пальмітинової кислоти. Збільшення вмісту насичених жирних кислот (переважно пальмітинової) до 30% може сприяти зростанню температури плавлення та оксистабільності олії. Натуральні рослинні олії такого типу дозволять замінити гідрировані рослинні та тваринні з повною відсутністю трансізомерів та холестерину [3].

Важливими ознаками якості насіння соняшнику є кислотне, перекисне та йодне число [4]. Кислотне число служить показником вмісту у ній вільних жирних кислот. Кількість таких кислот у жирі є непостійною та залежить від кількості жирової сировини, способу отримання жирів, тривалості та умов зберігання, інших факторів. Їхнє накопичення зумовлено гідролітичним розщепленням гліцеридів на дигліцериди, моногліцериди, гліцерин та жирні кислоти. Частково вільні жирні кислоти утворюються і внаслідок окиснювальних перетворень жиру на більш пізніх стадіях його окиснення. Гранично допустимі норми для рафінованої соняшникової олії – 0,4 мг КОН, гідратованої олії I сорту – 1,5 мг КОН, гідратованої олії II сорту – 2,25 мг КОН, нерафінованої олії вищого сорту – 1,5 мг КОН, нерафінованої олії I сорту – 2,25 мг КОН, нерафінованої олії II сорту – 6,0 мг КОН.

Пероксидне число (peroxide value) характеризує кількість первинних продуктів окиснення жирів – пероксидних сполук (гідроперекисів, перекисів, діалкілперекисів). Пероксидне число є показником ступеня свіжості олій та жирів.

Йодне число – це показник, що характеризує ненасиченість жирних кислот, які входять до складу жиру. Воно залежить від кількості етиленових (подвійних) зв'язків в жирних кислотах: з їхнім збільшенням йодне число зростає. Крім того, чим більше у жирі міститься ненасичених жирних кислот, тим також вищим є його йодне число. Рослинні олії внаслідок підвищеного вмісту ненасичених жирних кислот порівняно з тваринними жирами мають більш високі значення йодних чисел. Це число застосовують при визначенні виду харчового жиру, його здатності до висихання, розрахунку потрібної кількості водню для його гідрогенізації. За величиною йодного

числа жирів та олій роблять висновок про їхню здатність до різноманітних хімічних перетворень, оскільки ненасичені жирні кислоти можуть приєднувати кисень по місцю розриву подвійних зв'язків, що зумовлює процеси згіркнення та висихання жирів. У процесі окиснення жирів кількість ненасичених жирних кислот знижується і, як наслідок, зменшується йодне число, що засвідчує псування жиру. Для соняшникової олії характерні наступні значення йодного числа: 125–145 % I<sub>2</sub>.

До структурних ліпідів насіння соняшнику відноситься велика група полярних ліпідів—складових компонентів біомембран: фосфоліпідів, гліколіпідів, сульфоліпідів, а також різноманітних за хімічним складом ізопреноїдів. Масова частка фосфоліпідів у насінні соняшнику складає 0,7–0,8% відносно маси насіння. Відомо, що фосфоліпідиди мають високу біологічну активність та відіграють важливу роль у нормалізації діяльності організму людини та тварин. При зберіганні олії фосфоліпідиди поглинають вологу із навколишнього середовища та утворюють оводнені рештки, які знижують якість олії. Отримані в результаті гідратації олії фосфоліпідиди висушують у вакуумі та отримують з того фосфатидний концентрат, який використовують у харчових та кормових продуктах [5].

Вміст токоферолів – це важливий показник якості насіння соняшнику і олії, оскільки однією з важливих проблем поліпшення якості олії є підвищення її стійкості до окиснення з метою запобігання накопиченню токсичних речовин, що утворюються при деструкції ліпідів. У насінні соняшнику відомі 4 основні форми токоферолів  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , у ряду яких зростає антиокиснювальна активність. Звичайний генотип характеризується переважним вмістом  $\alpha$ -форми в основі токоферолів (близько 92,2–95,0 % від загальної кількості токоферолів). Але сьогодні у світі створюються нові мутантні лінії із спадково зміненими профілями токоферолів у насінні соняшнику. Генетична ідентифікація таких мутацій складу токоферолів, а також вивчення стабільності прояву цієї ознаки в різних генотипових середовищах є важливим селекційно-генетичним завданням [6].

У наших рекомендаціях описані методи, апробовані на різноманітному селекційному матеріалі відділу селекції та насінництва соняшнику у лабораторії біохімії рослин СГІ-НЦНС.

## **2. Визначення сміттевої та олійної домішки насіння**

Терміни та визначення понять [7].

Домішки органічного та неорганічного походження, що їх поділяють на олійну та сміттеву, які впливають на якість насіння соняшнику.

### Олійна домішка

- 1) бите насіння – насіння соняшнику з рештками ядра, що менші половини;
- 2) насіння, поїдене шкідниками – насіння з ознаками пошкодження ядра шкідниками;
- 3) проросле насіння – з ознаками проростання;
- 4) ушкоджене насіння – зі зміненим кольором ядра від сіро-жовтого до коричневого внаслідок сушіння, самозигрівання або ураження хворобами (згниле, запліснявіле);
- 5) недозріле насіння – щупле, з мінімальним умістом ядра;
- 6) насіння, захоплене морозом – щупле, білуватого кольору, з неміцним лушпинням і зміненим кольором ядра;
- 7) насіння, пошкоджене рослиноїдними клопами – з темними плямами на ядрі різного розміру та інтенсивності;
- 8) повністю або частково обрушене насіння – із різним ступенем порушення лузги та ядра.

### Сміттева домішка

- 1) мінеральна домішка – пісок, грудочки землі, галька тощо;
- 2) органічна домішка – частини стебел і кошиків, листя, лушпиння тощо;
- 3) шкідлива домішка – домішки рослинного походження, що шкодять здоров'ю людини та тварини, змінюють органолептичні показники насіння і впливають на вибір технологічних процесів його переробки;
- 4) зіпсоване насіння – із зіпсованим ядром чорного кольору.

### 3. Основне насіння, олійна і сміттева домішки

До основного насіння соняшнику відносять ціле та ушкоджене, що за характером ушкоджень не віднесене до олійної чи сміттевої домішок.

До олійної домішки відносять у залишку на ситі з вічками діаметром 3,0 мм насіння:

- бите;
- давлене;
- поїдене шкідниками;
- проросле;

- пошкоджене;
- недозріле;
- насіння, захоплене морозом;
- повністю або частково обрушене;
- пошкоджене рослиноїдними клопами.

До сміттевої домішки відносять:

- домішки, що проходять крізь сито з вічками діаметром 3,0 мм;
- у залишку на ситі з вічками діаметром 3,0 мм: мінеральну домішку, органічну домішку, пусте насіння, насіння усіх диких та культурних рослин, шкідливу домішку, зіпсоване насіння.

### **Устаткування**

1. Ваги лабораторні із похибкою зважування не більше 0,001 кг.
2. Лупа за ГОСТ 25706 – 88 ( кратність збільшення не менше 3).
- 3.Комплект лабораторних сит ГОСТ — 214–88 з круглими отворами діаметром 1,5, 2,5 мм, діаметром 3,0 см.
4. Дошка аналізна (з чорним і білим склом).
5. Годинник піщаний на 1 або 2 хв.
6. Термометр.
7. Шпатель.
8. Совочок.
9. Пінцет.
- 10.Тара для зберігання проб.
11. Підковоподібний магніт (вагопід'ємність – не менше 12 кг).

### **Методика проведення аналізу**

Наважку насіння зважують з точністю до 0,01 г. Після цього наважку просівають через сито з круглими отворами діаметром в 3 мм.

У сході із сита виділяють (на розбірній дошці) неорганічні домішки (земля, пісок, каміння), органічні домішки (стебла, солому, насіння інших культур, пусте насіння, вільні оболонки насіння) і олійну домішку у відповідності з характеристикою. Прохід через сито на фракції не розбирають і відносять його до брудних домішок.

Виділені фракції і брудних, і олійних домішок зважують на технічних вагах і виражають у відсотках від взятої для аналізу наважки.

1. Визначаємо вміст у насінні соняшнику порожніх, зіпсованих, засмажених та ушкоджених сім'янок.

Із наважки у 100 г, яку брали для визначення забруднення насіння, виділяють бруд та олійні домішки.

Із залишку насіння беруть наважку в 10 г. Всі сім'янки в наважці 10 г руйнують і виділяють дві фракції:

- порожні сім'янки, які відносяться до забруднення;
- ушкоджені і засмажені ядра зі знятими з них плодовими оболонками, згідно з вимогами стандарту насіння соняшнику, відносять до олійної домішки.

Обчислення вмісту порожніх та зіпсованих сім'янок проводять наступним чином.

**Приклад:** Під час дослідження 100 г наважки отримали сім'янок: порожніх – 5,3 г; зіпсованих – 6,7 г; нормальних за зовнішнім виглядом 88,0 г.

При дослідженні 10 г наважки знайдено: сім'янок порожніх – 2,0 г; зіпсованих 1,5 г; нормальних – 6,5 г.

Обчислюють кількість порожніх та зіпсованих сім'янок у 88,0 г:

порожніх –  $2 \times 88 / 10 = 17,6$  г; зіпсованих –  $1,5 \times 88 / 10 = 13,2$  г.

Загальна маса забруднення (порожніх та зіпсованих сім'янок) в 100 г наважці дорівнюватиме:

порожніх –  $5,3 + 17,6 = 22,9$  г. або 22,9 %;

зіпсованих –  $6,7 + 13,2 = 19,9$  %.

## 2. Визначення зараження олійного насіння шкідниками.

Зараженим шкідниками вважають насіння олійних культур, в якому знаходяться живі комахи та кліщі на всіх стадіях їхнього розвитку.

При пошаровому відборі проб зараженість визначають у середній пробі, відібраній з кожного шару.

Грудки насіння, які оплетені гусінню метеликів, розбирають вручну, і живих шкідників додають до їх загальної кількості у середній пробі.

Після цього середню пробу насіння зважують з похибкою не більше 0,01 кг, а потім просівають через набір сит з отворами діаметром 1,5 мм (нижнє) і 2,5 мм (верхнє). Просіювання проводять вручну протягом 2 хв приблизно при 120 кругових рухах на хвилину. Якщо насіння відібрано при температурі, нижчій 5°C, отримані сід і прохід через сита роздільно витримують при температурі (25±5)°C протягом 10–20 хв до активізації комах і кліщів, які впали в оціпеніння.

Сід із сита з отворами діаметром 2,5 мм вміщують на аналізну дошку, розрівнюють тонким шаром і розбирають вручну за допомогою пінцета. Окремо по



видах підраховують знайдених комах (гусінь, метеликів, мавританську кузьку, великого борошняного та смолянобурого хрущаків і т. ін.)

Схід із сита з отворами діаметром 1,5 мм вміщують на біле скло аналізної дошки, виділяють та підраховують знайдених шкідників. Проходи через сита з отворами діаметром 1,5 мм вміщують на чорне скло, розсипають їх тонким розрідженим шаром і, розглядаючи під лупою, підраховують кількість кліщів і окремо по видах дрібних комах (булавовусого і малого борошняного хрущаків, суринамського і коротковусого борошноїдів та ін.) Віднайдених мертвих шкідників, а також живих польових, які не псують насіння при зберіганні, під час визначення зараження не враховують.

Кількість знайдених шкідників у сходах і проході з сит складають окремо за видами.

#### Опрацювання результатів.

1. Кількість живих комах окремо по видах, а також кліщів ( $X$ ) у кожній середній пробі визначають за формулою:

$$X = n/m,$$

де  $n$  – кількість знайдених живих шкідників даного виду, шт.;

$m$  – маса середньої проби, кг.

Обчислення проводять до першого десяткового знаку з наступним округленням до цілого числа.

За кінцевий результат зараження береться результат визначення середньої проби, в якій знайдено найбільшу кількість шкідників даного виду.

Ступінь зараження насіння кліщами визначають за таблицею 1.

Таблиця 1

Ступінь зараження насіння кліщами

Ступінь зараження	Кількість кліщів в 1кг середньої проби, шт.
I	до 20 включно
II	вище 20, які вільно рухаються і не утворюють стовпища
III	кліщі утворюють войлочні скуплення

### Визначення металевих домішок.

Вміст металевих домішок у насінні визначають після проведення аналізу їх на зараження шкідниками (насіння і проходи через сита при цьому об'єднують). Металеві домішки виділяють із насіння за допомогою підковоподібного магніту вагопід'ємністю не менше 12 кг. Для цього зразок насіння в 1 кг розсипають на рівній поверхні (краще на склі) шаром не більше 0,5 см і потім полюсами магніту повільно проводять по насінню вдовж і поперек таким чином, щоб полюси магніту торкались скла. Періодично з магніту щіточкою знімають металеві частки і збирають на годинникове скло. Після того, як магнітом оброблена вся поверхня шару, насіння збирають, змішують, знову розсипають тонким шаром, як зазначено вище, і в тому ж порядку повторюють виділення металевих домішок.

Зібрані із магніту металеві частки зважують з точністю до 0,0002 г і кількість їх виражають в мг на 1 кг насіння.

### **3. Визначення вмісту жиру в насінні**

Проводять його екстракційним методом з використанням парорідинного екстрактора. У цьому апараті екстрагування здійснюється пароподібною та рідинною фазами розчинника при температурі кипіння, що значно прискорює процес виділення жиру [8].

#### **Реактиви та обладнання**

1. Парорідинний екстрактор.
2. Сушильна шафа.
3. Аналітичні ваги.
4. Фільтрувальний папір.
5. Хлороформ, х.ч.

Хід визначення жиру.

Насіння соняшнику, звільнені від лузги, в кількості 5–6 г насипають в металеві пронумеровані бюкси та, не закриваючи кришками, поміщають до сушильної шафи. Витримують 6–7 годин при температурі 105°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Після сушки бюкси з насінням накривають кришками та поміщають в ексікатор під свіжопокаленим  $\text{CaCl}_2$ . Після того, як насіння досягнуть кімнатної температури (через 0,5-1 годину), їх розмелюють у млині (протягом 1 хв.) та швидко заповнюють паперовий пакет, який має розміри 5 x 5 см та середню масу 0,5–0,6 г. Звичайно в один пакет поміщають 0,8–1,3 г подрібненого насіння. На аналітичних вагах визначають точну масу пакета з насінням ( $m_1$ ). Після зважування пакети кладуть до екстракційної камери екстрактора та після її заповнення завантажують в апарат, заливають 5–6 л

хлороформу, закривають внутрішнім холодильником, що приєднаний до водопровідної мережі, та вмикають в електричну мережу через автоматичне реле, яке відключає екстрактор за зниження тиску води у водопровідній мережі. Екстрагування має тривати не менше 12 годин.

Після відключення екстрактора залишають його на 1–1,5 години для охолодження. При цьому подачу води до нього не припиняють. Виймають холодильник, камеру зі зразками піднімають наверх та, не виймаючи повністю із екстрактора, дають можливість позбутися хлороформу. Після цього пакети розміщують у витяжній шафі для випаровування основної маси хлороформу, а потім висушують у витяжній шафі протягом 6 годин при 105°C. Після висушування поміщають в екстрактор над CaCl<sub>2</sub> та потім зважують на аналітичних вагах (m<sub>2</sub>).

Вміст жиру розраховують за наступною формулою:

$$Ж = [(m_1 - p_1) - (m_2 - p_2)] \times 100 / m_1 - p_1,$$

де

Ж – % жиру;

m<sub>1</sub> – маса зразка з пакетом до екстракції, в (г);

m<sub>2</sub> – маса зразка з пакетом після екстракції, в (г);

p<sub>1</sub> – маса 1 пакета до сушки, в (г);

p<sub>2</sub> – маса 1 пакета після сушки, в (г);

Звичайно розраховують шляхом множення маси 1 пакета до сушки на коефіцієнт 0,95, який визначають дослідним шляхом.

#### **4.Визначення жирнокислотного складу насіння [9]**

Метод заснований на перетворенні тригліцеридів кислот у метилові ефіри жирних кислот та газохроматографічному аналізі останніх.

##### **Устаткування, матеріали, реактиви**

1. Хроматограф газовий лабораторний з полум'яно-іонізаційним детектором, термостатом на температурі не нижче 200°C, з випарником на температурі не нижче 300°C.
2. Колонка газохроматографічна з нержавіючої сталі або скляна завдовжки 1,5–2 м, внутрішнім діаметром 2–4 мм.
3. Наповнювач для колонок: хроматон N-AN, оброблений 10% реоплексу 400 або карбоваксу 20M, або наповнювач аналогічної якості.
4. Пристрій інтегруючий або комп'ютер з програмним управлінням для газового хроматографа.
5. Мікрошприц місткістю 100 мкл або автосамплер.

6. Ваги лабораторні по ГОСТ 24104-80 3-го класу точності з найбільшою межою зважування 1000 г.
7. Піпетка 4-1-1, 4-1-2 або 5-1-1, 5-1-2 за ГОСТ 20292-74.
8. Піпетка П4-10-14/23 за ГОСТ 26336-82.
9. Циліндр 1-250 або 3-25 за ГОСТ 1770-74.
10. Воронка лабораторна В-25- 38 ХС або В36-50 ХС за ГОСТ 26336-82.
11. Колба мірна 2-23-2 за ГОСТ 1770-74.
12. Колба круглодонна К1-1000-29/32 ТС за ГОСТ 26336-82.
13. Холодильник ХШІ-400-29/32 ХС за ГОСТ 26336-82.
14. Скляночка для зважування СВ19/9 за ГОСТ 26336-82.
15. Перегонний апарат:
  - Колба КІ-500-29/32 ТС за ГОСТ 26336-82;
  - Насадка НІ-29/32-14/23 ТС за ГОСТ 26336-82;
  - Холодильник ХНТІ-100-14/23 ТС за ГОСТ 26336-82;
  - Алонж АІО-29/32-14/23-60 або АКП-29/32- 14/23 ТС за ГОСТ 26336-82;
  - Термометр КШ-14/23+40+100/0.2-60 за ГОСТ 16590-71;
  - Лазня водяна.
16. Папір фільтрувальний лабораторний.
17. Водень технічний марки А за ГОСТ 3022-80 або електролізний від генератора водню типу СГС-2.
18. Повітря за ГОСТ 17433-80, клас 0.
19. Газо-носії: азот газоподібний за ГОСТ 9293-74, гелій стиснутий, аргон.
20. Натрій металічний за ГОСТ 3273-75 або метилат натрію.
21. Закис кальцію за ГОСТ 8677-76, ч. д. а.
22. Гексан, ч. д. а., для хроматографії.
23. Метанол за ГОСТ 6995-77, х. ч.

## **Підготовка до випробування**

### **Приготування абсолютного метанолу**

У колбу місткістю 500 мл зважують 30+1 г закису кальцію, додають 250 мл метанолу та кип'ячать з холодильником типу ХШ (зворотним) протягом 6–8 годин. Потім метанол переганяють у спеціальному апараті при температурі 64,7°С.

### **Приготування розчину метилату натрію в метанолі концентрації 2 моль/л**

Зважують 2,7 г метилату натрію або 1,15 г металічного натрію з записом результату до другого десяткового знаку в склянці для зважування.

У мірну колбу на 25 мл заливають 10-12 мл абсолютного метанолу, в нього всипають наважку метилату натрію або кидають маленькими шматочками натрій. Після перемішування розчин охолоджують до кімнатної температури та доливають абсолютним метанолом до мітки. Зберігають розчин у холодильнику.

#### **Приготування метилових ефірів кислот**

5-10 насінин заливають гексаном та витримують протягом 1 години, періодично перемішуючи, потім центрифугують. У скляну пробірку беруть 1,9 мл надосадової рідини або 2-3 краплі олії у 1,9 мл гексану. В розчин вводять 0,1 мл метилату натрію в метанолі концентрації 2 моль/л. Після інтенсивного перемішування протягом 2 хвилин реактивну суміш відстоюють 5 хв та пропускають крізь паперовий фільтр і розчин готовий до аналізу. Зберігають його не більше 2 діб у холодильнику.

#### **Підготовка хроматографа до випробування**

Підключення хроматографа до мережі, підготовка та установка колонок, виведення приладу на потрібний режим здійснюється за інструкцією з монтажу та налагоджування хроматографа.

#### **Випробування**

Встановлюють на хроматографі наступні умови аналізу:  
температура термостата колонок 180-190°C,  
температура випарювача 250-280°C,  
температура печі детектора 200°C,  
швидкість потоку газу-носія (азот, гелій, аргон) – 30-40 мл/хв  
величина проби близько 1 мкл гексанового розчину метилових ефірів кислот у гексані.

Час виходу метиллінолеату близько 15 хв, метилерукату – близько 30 хв (табл. 2).

Таблиця 2

Порядок виходу метилових ефірів кислот

№ n/n	Метиллові ефіри кислот
1	тетрадеканова (міристинова)
2	гексадеканова (пальмітинова)
3	гексадеценнова (пальмітоолеїнова)
4	октадеканова (стеаринова)
5	октадеценнова (олеїнова)
6	октадекадієнова (лінолева)

7	октадекатрієнова (ліноленова)
8	ейкозано́ва (арахінова)
9	ейкозено́ва (гондоїнова)
10	Ейкозадієнова
11	докозано́ва (бегено́ва)
12	докозено́ва (ерукова)
13	Докозадієнова
14	тетракозено́ва (нервонова)

### Обробка результатів

Розрахунок складу метилових ефірів жирних кислот насіння (олії) проводять методом внутрішньої нормалізації. Площу піків компонентів ( $S_i$ ) в мкл розраховують за формулою:

$$S_i = h_i \times a_i,$$

де

$h_i$  – висота піку, мм;

$a_i$  – ширина піку, виміряна на половині висоти, мм.

Висоту піку вимірюють із записом результатів до цілих чисел; ширину піку – із записом результату до першого десятичного знаку.

Суму площ піків на хроматограмі ( $\sum S_i$ ) приймають за 100 %.

Масову частку кожної жирної кислоти ( $X_i$ ) в процентах розраховують за формулою:

$$X_i = S_i \times 100 / \sum S_i,$$

де

$S_i$  – площа піку метилового ефіру жирної кислоти,

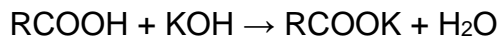
$\sum S_i$  – сума площ всіх піків на хроматограмі.

Розрахунки проводять до другого десятичного знаку з округленням результату до першого десятичного знаку.

За результат аналізу беруть середнє арифметичне результатів двох послідовних визначень.

## 5. Визначення кислотного числа [4]

Кислотне число – це кількість міліграмів гідроксиду калію або натрію, необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру:



### Устаткування, матеріали

1. Технічні ваги.
2. Конічна колба місткістю 150–200 мл.
3. Бюретка місткістю 50 мл.
4. Водяна баня.

### Реактиви

1. 1%-ний спиртовий розчин фенолфталеїну або тимолфталеїну.
2. 0,1 М розчин KOH або NaOH.
3. Нейтральна суміш спирту та ефіру.
4. Хлороформ.

Нейтральна суміш спирту та хлороформу готується так: суміш з двох частин хлороформу та однієї частини етилового спирту нейтралізують 0,1 М розчином KOH або NaOH у присутності п'яти крапель фенолфталеїну (індикатор) до ледь помітної зміни забарвлення суміші.

### Хід визначення

20 г насіння вміщують у колбу та заливають 200 мл діетилового ефіру (хлороформу). Колбу закривають корковою пробкою та витримують протягом 2 годин при кімнатній температурі, періодично струшуючи. Потім суміш центрифугують при 8000 г протягом 10 хв. Автоматичною піпеткою відбирають по 25 мл надосадової рідини в дві конічні колби для титрування та додають по 15 мл нейтралізованої суміші етанолу й хлороформу (1:2) і збовтують вміст. Якщо олія не розчиниться, то колбу необхідно підігріти на водяній бані і охолодити до температури 15–20 °С. Додають 3–5 крапель 1%-го спиртового розчину фенолфталеїну і за постійного перемішування титрують пробу 0,1 н спиртовим розчином гідроксиду калію або натрію до появи слабомалинового забарвлення, що не зникає протягом 30 с.

Одночасно відбирають ще по 25 мл надосадової рідини в 2 попередньо висушені та зважені колби, відганяють хлороформ під тягою на водній бані та висушують олію у сушильній шафі при температурі 90–95 °С до постійної маси. Потім колбу з висушеною олією зважують до сотих долей грама та визначають масу олії в

25 мл надосадової рідини, взятої для титрування, за різницею маси колби з висушеною олією та порожньою колбою.

Кислотне число (мг КОН) розраховують за формулою:

$$\text{К.ч.} = 5,61 \times K \times V/m, \text{ де}$$

5,61 – кількість NaOH або КОН, що міститься в 1 мл розчину концентрації 0,1 н. Цей множник є постійним незалежно від виду застосованого луку;

K – коефіцієнт поправки до 0,1 н розчину NaOH або КОН;

V – об'єм 0,1 н NaOH або КОН, що використаний на нейтралізацію вільних жирних кислот у масі наважки жиру, мл;

m – маса взятої для аналізу наважки, г.

За кінцевий результат приймають середнє арифметичне двох паралельних визначень.

Вміст жирних кислот в олії можна виразити також не кислотним числом, а кількістю вільних кислот у процентах від маси олії (насіння). Умовно розрахунки ведуть на вільну олеїнову кислоту, яка є однією із найбільш поширених кислот, що входять у більшість рослинних олій. Для цього кислотне число множать на коефіцієнт 0,503. Цей коефіцієнт отримують із наступної формули:

$$\text{Кількість вільних жирних кислот} = \text{К. ч.} \times 282,3 \times 100 / 56,11 \times 1000 \text{ або}$$

$$\text{К. ч.} \times 0,503,$$

де

282,3 – молекулярна маса олеїнової кислоти;

56,11 – молекулярна маса КОН;

100 – перерахунок на процентний вміст;

1000 – перерахунок міліграмів у грами.

## **6. Визначення йодного числа [4]**

Визначення йодного числа ґрунтується на здатності ненасичених жирних кислот приєднувати молекули галогену (хлор, бром, йод) в умовах, за яких ця реакція не супроводжується заміщенням водню на галоген. На кожен подвійний зв'язок витрачається одна молекула галогену. Отже, йодне число залежить від кількості етиленових (подвійних) зв'язків у жирних кислотах: з їхнім збільшенням йодне число зростає. Під йодним числом розуміють кількість грамів йоду, що приєднується до 100 г жиру.

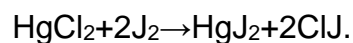
Для визначення йодного числа олій та жирів використовують кілька методів, що відрізняються, в основному, галогеновмісним реагентом та умовами



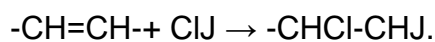
проведення досліду. Найпоширенішими з них є метод Гюбля (із застосуванням йодно-ртутного розчину), Кауфмана, Війса, Гануса, Вобурна. Три перших з перерахованих методів є стандартизованими і забезпечують порівняно високу точність.

### **Визначення йодного числа методом Гюбля**

Метод базується на використанні для насичення подвійних зв'язків хлористого йоду  $\text{ClI}$  (розчин Гюбля), який утворюється внаслідок взаємодії спиртових розчинів сулеми ( $\text{HgCl}_2$ ) і йоду за реакцією:



Хлористий йод приєднується до подвійних зв'язків, кількісно насичуючи їх.



#### **Реактиви, посуд та устаткування**

1. Хлороформ.
2. Розчин Гюбля, 10 %-ний.
3. Розчин йодиду калію масовою часткою 10 %.
4. Розчин гіпосульфіту натрію концентрацією 0,1 н.
5. Розчин крохмалю масовою часткою 1 %.
6. Дистильована вода.
7. Аналітичні ваги.
8. Скляні палички.
9. Бюретка.
10. Колби місткістю 250 мл зі шліфами.
11. Термометр з інтервалом вимірювань від 0 °С до 100 °С.

#### **Приготування розчину Гюбля**

Розчин готують за дві доби до використання. 30 г сулеми ( $\text{HgCl}_2$ ) розчиняють у 500 мл етилового спирту. 25 г йоду розчиняють в етиловому спирті об'ємом 500 см. Отриманий розчин додають до розчину сулеми і змішують.

#### **Хід виконання**

20 г насіння вміщують у колбу та заливають 200 мл (діетилового ефіру. (хлороформу). Колбу закривають корковою пробкою та витримують протягом 2 годин при кімнатній температурі, періодично струшуючи. Потім суміш центрифугують при 8000 г протягом 10 хв. Автоматичною піпеткою відбирають по 10–15 мл надосадової рідини або на аналітичних вагах у дві колби зважують від 0,1 до 0,2 г жиру, додають 10–15 мл хлороформу і обережно розмішують до повного

розчинення. Потім наливають із бюретки точно 25 мл розчину Гюбля, взмішують, закривають колбу притертою пробкою, змоченою розчином йодиду калію, і залишають для насичення подвійних зв'язків у темному місці за температури 20°C протягом 18–20 год. Одночасно готують контрольний дослід. Для цього в колбу наливають таку саму кількість хлороформу, 25 мл розчину Гюбля і залишають у темноті протягом такого самого часу. Після цього у колби додають по 20 мл розчину КJ і 50–60 мл дистильованої води, струшують. Йод, що виділився, титрують, розмішуючи, розчином гіпосульфїту натрію концентрацією 0,1 н до блідо-жовтого забарвлення. Після цього додають від 1 до 2 мл розчину крохмалю і продовжують титрувати до повного зникнення синього забарвлення.

### **Опрацювання результатів**

Йодне число розраховують за формулою:

$$X = 1,269 \times F \times (V - V_1) / G, \text{ де}$$

F – поправка до титру 0,1 н розчину гіпосульфїта натрію;

V – кількість 0,1 н розчину гіпосульфїта натрію, витраченого на контрольний (холостий) дослід, в мл;

V<sub>1</sub> – кількість 0,1 н розчину гіпосульфїту натрію, витраченого на основний дослід, в мл;

G – наважка насіння, олії в г ;

X – йодне число, % I<sub>2</sub>.

Розраховують середнє значення та похибку вимірювання. Розходження між двома паралельними визначеннями не має перевищувати 1 % значення йодного числа.

## **7. Визначення перекисного числа [4]**

Перокисне число (peroxide value) – відношення кількості речовин у пробі, у перерахунку на активний кисень, які за стандартних умов окислюють йодид калію, до маси дослідної проби. Характеризує кількість первинних продуктів окиснення жирів – пероксидних сполук (гідроперексидів, перексидів, діалкілперексидів), які здатні виділяти з водного розчину йодистого калію йод. Виражається у мілімолях активного кисню на кілограм проби.

Принцип методу ґрунтується на реакції взаємодії продуктів окиснення олій та жирів (пероксидів та гідропероксидів) із йодистим калієм у розчині оцтової кислоти і хлороформу та подальшому кількісному визначенні йоду, що виділився, розчином тіосульфату натрію титриметричним методом.

## Реактиви

1. Вода дистильована.
2. Льодяна оцтова кислота, х.ч.
3. Хлороформ.
4. Водний розчин йодиду калію, х. ч. із масовою часткою 50–55% свіжоприготований.
5. 1%-ний розчин крохмалю.
6. Водний розчин натрію сіркуватистокиислого (натрію тіосульфату) пентагідрату ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) молярних концентрацій 0,01 моль/л (0,01 н) або 0,002 моль/л (0,002 н).
7. Стандарт-титри тіосульфату натрію з масою речовини в ампулі, що дорівнює 0,1 г-екв – 0,1 г-моль.

Розчин йодиду калію зберігають у темній посудині. Перед застосуванням перевіряють придатність розчину, додаючи дві краплі розчину крохмалю до 0,5 мл розчину йодиду калію в 30 мл суміші оцтової кислоти і хлороформу у співвідношенні 3:2. Якщо для знебарвлення блакитного забарвлення, що з'явилося, витрачають більше однієї краплі 0,01 моль/л розчину тіосульфату натрію – розчин йодистого калію непридатний і необхідно приготувати свіжий.

Розчин крохмалю готують так: змішують 10 г розчинного крохмалю з 30 мл холодної дистильованої води та при перемішуванні вливають цю суміш у 1000 мл киплячої води і кип'ятять протягом 3 хвилин.

Розчин натрію сіркуватистокиислого (натрію тіосульфату) молярної концентрації  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$  моль/л (0,1 н) готують двома способами:

- з натрію сіркуватистокиислого – реактиву згідно з ГОСТ 25794.2, п. 2.11;
- зі стандарт-титрів (фіксаналів) натрію сіркуватистокиислого. Розчин придатний до застосування через 10–14 діб. Розчин зберігають у склянці з темного скла. Термін зберігання отриманого зі стандарт-титрів розчину молярної концентрації  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$  моль/л без додаткового контролю концентрації 1 місяць. Після закінчення терміну зберігання необхідно визначити поправку до номінальної концентрації розчину тіосульфату натрію згідно з ГОСТ 25794.2, п. 2.11.3. Якщо під час зберігання з'являються пластівці або осад, розчин не застосовувати.

Для отримання розчину тіосульфату натрію необхідних молярних концентрацій  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,002$  моль/л або  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,01$  моль/л приготуваний розчин натрію сіркуватистокиислого (натрію тіосульфату) молярної концентрації

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$  моль/л розбавляють відповідно в 50 та 10 разів. Розбавляють безпосередньо перед використанням.

### **Хімічний посуд і прилади**

1. Ваги лабораторні 2-го та 3-го класу точності.
2. Конічні колби місткістю 250 мл з притертими скляними пробками.
3. Циліндри на 25 та 100мл.
4. Годинник піщаний на 1 хв та 5 хв.
5. Піпетки.
6. Бюретки.
7. Секундомір.

### **Хід виконання роботи**

У колбу з пришліфованою пробкою беруть наважку насіння або олії 1 г та розчинюють її в 20 мл суміші, що складається із двох частин льодяної оцтової кислоти та однієї частини хлороформу. До отриманого розчину додають 1 мл насиченого розчину йодистого калію і суміш витримують 20 хвилин без доступу світла. Після цього вміст колби розбавляють 50 мл дистильованої води, додають 3 мл розчину (1%-ного) крохмалю та йод, що виділився, відтитрують 0,002 н розчином тіосульфата натрію. В цих же умовах ставлять контрольний варіант.

Перекисне число (x) в процентах йоду обчислюють за формулою:

$$X = (V_1 - V_2) \times 0,02538 \times K / P, \text{ де}$$

$V_1$  – кількість 0,002 н розчину тіосульфату натрію, використаного на титрування йоду, що виділився, в основному досліді, в мл;

$V_2$  – кількість 0,002 н розчину тіосульфату натрію, використаного на титрування йоду, що виділився, в контрольному досліді, в мл;

0,02538 – титр 0,002 н розчину тіосульфату натрію, виражений за йодом та помножений на 100;

K – коефіцієнт нормальності (поправка) до титру тіосульфату натрію;

P – наважка насіння, олії в г.

Для того, щоб виразити перекисне число в ммоль/кг  $\frac{1}{2} \text{O}$ , слід помножити результат, виражений в % йоду на 78.

### **8. Визначення вмісту токоферолів (вітаміну E) [10]**

Метод заснований на утворенні хінонів при окисненні молекул токоферолу хлорним залізом. При цьому хлорне залізо відновлюється до хлористого, кількість якого визначається за інтенсивністю забарвлення ортофенантраліну.

## **Обладнання, матеріали та реактиви**

1. Ваги аналітичні.
2. Фотоелектроколориметр або спектрофотометр.
3. Баня водяна.
4. Випарник ротаційний.
5. Воронка ділильна місткістю 250 мл за ГОСТ 25336.
6. Колби мірні місткістю 25 та 100 мл за ГОСТ 1770.
7. Колби конічні місткістю 100 мл за ГОСТ 25336.
8. Колба круглодонна місткістю 250 мл за ГОСТ 25336.
9. Циліндр вимірювальний місткістю 50 мл за ГОСТ 25336.
10. Холодильник скляний за ГОСТ 25336.
11. Фільтр паперовий.
12. 60%-й спиртовий розчин КОН.
13. 0,5%-й розчин  $\alpha, \alpha'$ -дипіриділу (0,5 г  $\alpha, \alpha'$ -дипіриділу розчиняють в абсолютному етиловому спирті в мірній колбі на 100 мл, розчин придатний протягом місяця при зберіганні в темній склянці).
14. 0,5%-й спиртовий розчин ортофенантраліну.
15. 0,2 %-й спиртовий розчин хлорного заліза ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ).
16. Адсорбент – силікагель марки КСК.
17. 5%-й спиртовий розчин пірогаллолу.
18. 96%-й етанол.
19. Бензол.
20. Діетиловий ефір.

## **Хід аналізу**

Підготовка зразка. Беруть наважку насіння 4–6 г та поміщають в колбу на 250 мл зі шліфом. До наважки доливають 40–60 мл суміші етанолу з гексаном (1:4), 0,2 г пірогаллолу і ставлять зі зворотним холодильником на водяну баню при 50°C для екстракції олії в м'яких умовах протягом години. Після охолодження беруть частину екстракту, відповідну 1–2 г олії, і розчинник відганяють. До жирового залишку доливають 5%-й розчин пірогаллолу (із розрахунку 4 мл на 1 г олії) та для прискореного омилення 60%-й розчин КОН (із розрахунку 1 мл на 1 г олії).

Омилення проводять на киплячій водяній бані протягом 3 хвилин. Вміст колби переносять в ділильну воронку, ретельно обмиваючи колбу подвійним об'ємом води. Неомильну фракцію екстрагують вільним від перекисів етиловим ефіром порц іями 40–35–30 мл. Ефірні екстракти об'єднують та промивають у ділильній воронці водою

до негативної реакції на лакмус (або фенолфталеїн). Потім ефірний екстракт висушують, пропускаючи його через адсорбційну трубку з  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Висушений екстракт переносять у суху колбу та відганяють розчинник у струмі азоту. Залишок розчиняють у бензолі та переносять у мірну колбу на 25 мл.

**Адсорбція.** Із отриманого бензольного розчину беруть 5-10 мл та вносять в адсорбційну колонку з силікагелем (висота стовпчика 3 мл). Токофероли з адсорбенту змивають трічі порціями бензолу по 6 мл. Елюати збирають, об'єднують та відганяють у струмі азоту. У подальшому замість бензолу використовують абсолютний етанол. До залишку приливають 10 мл абсолютного етанолу, трохи нагрівають (15–20 с) на водяній бані (при  $60^\circ\text{C}$ ) та переносять у мірну колбу на 25 мл.

**Колориметрування.** Для проведення реакції беруть 2 мл отриманого розчину в мірну колбу на 25 мл та приливають 1 мл 0,5% розчину  $\alpha, \alpha'$ -дипіриділу або 0,5%-го розчину ортофенантралину. Потім по краплях при перемішуванні приливають 1 мл 0,2 %-ного розчину хлорного заліза та залишають у темному місці на 10 хвилин. Об'єм доводять до мітки абсолютним спиртом та вимірюють інтенсивність забарвлення. Одночасно ставлять контроль, доливаючи ті ж реактиви в мірну колбу на 25 мл. Розчини колориметрують на фотоелектроколориметрі при 490 нм у кюветі з робочою довжиною 5 мм. Із показників випробуваного розчину віднімають показники контролю.

**Складання калібрувального графіка та обчислення результатів.** Готують стандартний розчин токоферолу, для чого зважують на аналітичних вагах 10 мг  $\alpha$ -токоферолу, розчиняють його в абсолютному спирті в мірній колбі на 50 мл. Із отриманого стандартного розчину в мірні колби на 25 мл наносять по 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75; 2,0 мл, додають  $\alpha, \alpha'$ -дипіриділу або ортофенантралину,  $\text{FeCl}_3$  та об'єм доводять до мітки. Після закінчення 10 хвилин розчин колориметрують. Нульові показники встановлюють за чистим спиртом. Паралельно ставлять дослід з чистими реактивами (контроль). Із показників випробуваного розчину віднімають показання контрольного зразка. Концентрацію вітаміну знаходять за калібрувальним графіком.

Обчислюють вміст за формулою:

$$x = a \times V \times V_2 \times 100 / n \times V_1 \times V_3, \text{ де}$$

$x$  – вміст токоферолів, мг/100 г;

$a$  – вміст токоферолів, знайдений за калібрувальним графіком, мг/100 г;

$V$  – об'єм початкового екстракту (звичайно 25 мл);

$V_1$  – кількість розчину, взятого для адсорбції на колонку, мл;

$V_2$  – об'єм елюату після пропускання через колонку з силікагелем, мл;

$V_3$  – кількість розчину, взятого для проведення кольорової реакції;

$n$  – маса наважки, г.

За остаточний результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, допустимі розбіжності між якими не мають перевищувати 1,5 %.

## **9. Визначення вмісту фосфоліпідів [10]**

Метод заснований на вилученні фосфоліпідів розчинниками із насіння та кількісному визначенні за фосфором.

### **Обладнання, матеріали, реактиви**

1. Ваги аналітичні.
2. Фотоелектроколориметр або спектрофотометр.
3. Плітка для спалювання при температурі 160-200°C.
4. Випарник ротаційний.
5. Воронка ділильна місткістю 250 мл за ГОСТ 25336.
6. Колби мірні місткістю 25 та 100 мл за ГОСТ 1770.
7. Колби конічні місткістю 100 мл за ГОСТ 25336.
8. Колба круглодонна місткістю 250 мл за ГОСТ 25336.
9. Циліндр вимірювальний місткістю 50 мл за ГОСТ 25336.
10. Холодильник скляний за ГОСТ 25336.
11. Фільтр паперовий.
12. Хлороформ, х. ч.
13. Метиловий спирт, х. ч.
14. 0,29% розчин KCl.
15. Стандартний розчин однозаміщеного фосфату калію (0,439 г  $KH_2PO_4$  розчиняють у 1 л дистильованої води; в 1 мл розчину міститься 0,1 мг фосфору).
16. 2,5%-й розчин молібденовокислого амонія.
17. 0,2%-й розчин ейконогена або амідолу.
18. 30%-й розчин пероксиду водню.
19. Фенолфталеїн – 0,5 %-й спиртовий розчин.
20. 0,2%-й розчин іонолу.

## **Хід аналізу**

### Виділення фосфоліпідів

До наважки тонкоподрібнених насінин доливають суміш хлороформу з метанолом (1:2) у кількості 100 мл на 10 г насіння. Екстракцію проводять у струмі азоту з додаванням в якості антиоксиданту 0,2% розчину іонолу. Ліпіди екстрагують 30 хвилин, а для повного виділення екстракцію проводять 2 рази. До об'єднаних ліпідних вилучень доливають суміш хлороформу з КСІ (1:1) із розрахунку 1 мл на 2 мл екстракту. Утворюється двофазна система, яку розшаровують у ділильній воронці або центрифугуванням. У верхній водно-метанольний шар переходять водорозчинні неліпідні домішки. Для уникнення втрат ліпідів до нього додають хлороформ для утворення двофазної системи. Хлороформний шар відокремлюють та приєднують до основного. Потім розчинник відганяють у струмі азоту. Ліпідні рештки висушують у вакуумному ексікаторі над фосфорним ангідридом (12–16 годин) та зважують. Ліпіди розчиняють у суміші хлороформ + метанол (2:1) з додаванням іонолу. Розчин упарюють на роторному випарювачі.

### **Кількісне визначення фосфоліпідів по фосфору**

Сухий залишок розчиняють у 1 мл концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$  та 3 крапель перексиду водню. Спалюють проби у металічному блоці при температурі 160–200°C. Після охолодження до проби доливають 2 мл води, нейтралізують по фенофталеїну, додають 0,5 мл 2,5%-го молібденовокислого амонію, 0,5 мл 0,2%-го розчину амідлолу (або ейконогена) та доводять об'єм до 5 мл водою. Для розвитку забарвлення суміш витримують на киплячій водяній бані протягом 10 хвилин. Фосфор визначають на спектрофотометрі при 830 нм. Для побудови калібрувального графіка використовують вихідний розчин  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , розведений у 10 разів.

Вміст фосфору (мкг) в кожному зразку знаходять по калібрувальному графіку.

Вміст фосфора (мг/100г) обчислюють за формулою:

$$X = a \times V \times V_2 \times 100 / (V_1 \times n), \text{ де}$$

$a$  – концентрація фосфору, знайдена по калібрувальному графіку;

$V$  – загальний об'єм проби, мл;

$V_1$  – об'єм проби, взятої для визначення фосфору, мл;

$V_2$  – кінцевий об'єм перед колориметрируванням (10 мл);

$n$  – маса наважки, г.



## 10. Визначення вмісту білка за методом К'єльдаля

Сутність методу полягає в мінералізації органічної речовини концентрованою сірчаною кислотою в присутності каталізатора з утворенням сульфату амонію, руйнуванні сульфату амонію гідрокисом натрію з виділенням аміаку, відгонки аміаку водяною парою в розчин борної кислоти з наступним титруванням соляною кислотою.

### Хід визначення

Наважку рівномірно здрібненого матеріалу помістити в пробірку. Аналіз проводимо, як завжди, у двох-трьох повторностях. Величина наважки – 0,100 г.

До наважки в пробірку додати одну таблетку каталізатора (1т містить 1,5 г  $K_2SO_4$  та 0,0075 г Se, Kjeltabs Auto Tecator). Потім до вмісту пробірки долити 3 мл концентрованої сірчаної кислоти. Штатив з пробірками помістити в попередньо прогрітий блок для спалення (температура  $410^{\circ}C$ , термін – 1 година). Необхідно звернути увагу, що для повної мінералізації органічних речовин після просвітлення розчину в пробірках їх потрібно витримати в блоці ще 20–30 хвилин. По закінченню спалення пробірки охолодити та приступати до відгонки аміаку на приладі “Kjeltec Auto 1030” (за інструкцією до нього).

### Обрахунок результатів

1. Визначити полярність соляної кислоти за формулою:

$M=21,20 \times m/1,401 \times ml$ , де:

21,20 – % азоту в сульфаті амонію;

m – наважка для аналізу;

ml – кількість 0,1 M HCl для титрування.

2. Вирахувати калібрувальний коефіцієнт за формулою:

$V(N \times 6,25)= 14,01 \times M \times 6,25$

Значення, отримані на приладі, відповідають процентному вмісту сирого протеїну в дослідному матеріалі.

Розрахунок зробити за формулою:

$\% \text{ білка}=14,01 \times M \times 6,25 \times ml \times 100/n$ , де

ml – показники приладу;

n – наважка.

Результати визначення загального азоту треба доповнити обов'язковим визначенням відсотка вологи в дослідному матеріалі для вираження даних у % на абсолютно суху речовину.

## **11. Визначення вмісту вологи висушування до постійної маси (арбітражний метод)**

### **Обладнання**

1. Ваги аналітичні.
2. Сушильна шафа.
3. Млин лабораторний.
3. Металеві бюкси.

### **Хід аналізу**

Для аналізу необхідна бюкса попередньо висушена до постійної маси (порожню або зі скляною паличкою і піском), її зважують з точністю до 0,0002 г та висушують у сушильній шафі за 100–105°C. У попередньо зважену бюксу поміщають подрібнену наважку досліджуваного продукту масою 3–5 г та висушують у сушильній шафі за 100–105°C. У процесі висушування бюксу з наважкою періодично зважують (після попереднього охолодження в ексікаторі протягом 15–20 хв). Перше зважування проводять після 2–4 год висушування, кожне повторне зважування – через 1 год, а під кінець аналізу – через кожні 30 хв. Під час зважування бюкси з наважкою кришка повинна бути закрита, висушують об'єкт з відкритою кришкою. Масу висушеної наважки вважають постійною тоді, коли різниця між двома останніми зважуваннями не перевищує 0,001 г. За кінцевий результат приймають середнє арифметичне 2–3-х паралельних визначень. Розбіжність між паралельними визначеннями за цим методом має бути в межах 1 %. Розрахунки здійснюють з точністю до 0,01 %.

Вологість обчислюють за формулою:

$$x = 100 \times (n - n_1) / n, \text{ де}$$

x – вміст вологи, %

n – маса наважки до висушування, г;

n<sub>1</sub> – маса наважки після висушування, г.

### **ЗАКЛЮЧЕННЯ**

Запропоновані методи можна використовувати для масової оцінки селекційного матеріалу з метою добору цінного вихідного матеріалу за комплексом біохімічних ознак. Автори розробки рекомендують для підвищення достовірності й точності оцінки в роботі використовувати не один якийсь біохімічний показник, а

кілька, які відповідають за різні аспекти формування якості насіння (сміттева та олійна домішки, вміст жиру та його жирнокислотний склад, кислотне, перекисне та йодне число, вміст токоферолів та фосфоліпідів).

Таблиця 3

Вимоги щодо якості насіння соняшнику за біохімічними показниками [7]

Показник	Гранична норма				
	для виробництва олії			для виробництва кондитерських виробів	для виробництва олеїнової кислоти
	I клас	II клас	III клас		
Вологість, %					
не менше ніж	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
не більше ніж	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Олійна домішка, %	3,0	5,0	7,0	5,0	5,0
не більше ніж, зокрема проросле насіння	1,0	2,0	3,0	2,0	2,0
Сміттева домішка, %	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0
не більше ніж, зокрема					
зіпсоване насіння	0,2	0,5	1,0	0,5	1,0
мінеральна домішка зокрема	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
галька, шлак, руда	0,15	0,3	0,3	0,3	0,3
насіння рицини, зараженість шкідниками зерна	не допустимо				
Вміст жиру, % на абс.сух. реч., не менше ніж	50,0	45,0	40,0	-	-
не більше ніж	-	-	-	42,0	-
Вміст білка, % на абс. сух. реч.	-	-	-	19,0	-
Вміст олеїнової кислоти, % від суми жирних кислот, не менше ніж	-	-	-	-	82,0
Кислотне число, мг КОН/г, не більше ніж	1,3	2,2	5,0	5,0	0,6
Перекисне число, ½ O ммоль/кг, не більше ніж	3,0	6,0	10,0	10,0	2,0-3,0
Йодне число, %I <sub>2</sub>	119,0-144,0				
Вміст токоферолів (вітаміну E), мг/100 г	не менше 80,0				
Вміст фосфоліпідів, %	0,5-1,0				

Використовуючи різноманітні аналізи за визначення олійності насіння науковці Селекційно-генетичного інституту-НЦНС створили велику кількість гібридів соняшнику, серед яких найкращими на сьогоднішній день є наступні: 'Базальт' (олійність 51–53%), 'Сучасник' (49–51%), 'Віват' (50–1%), 'Арциз' (51–52%), 'Гусяр' (51–53%), 'Ювілей СГІ 100' (50–52%). Найкращими самозапиленними лініями-батьківськими компонентами гібридів за вмістом олії є наступні: Од 973 (олійність 51–52%), Од 1008 (50–52%), Од 1042 (49–51%) та інші. У результаті застосування результатів аналізу насіння на його жирнокислотний склад в СГІ-НЦНС створили гібриди олеїнового типу: 'Одор' (вміст олеїнової кислоти 60–70%), 'Антрацит' (60–70%), 'Романтик' (60–65%), 'Тясмин' (60–65%), 'Бугаз' (60–65%), а також два високоолеїнових гібриди 'Олівер 90' (88–90%) та 'Волес' (83–85%). Крім того, створена велика колекція самозапиленних ліній з високим та підвищеним вмістом олеїнової кислоти, серед яких виділяються такі лінії, як Оранж В (85–87%), Лемон В (90%), Вол 55 В (85–87%), ОдОл 1А (85–87%), ОдОл 1404 А (86–88%), ОдОл 220 Б(82–87%).

## **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Крутько В. І., Вареник Б. Ф. Селекція самозапиленних ліній та гібридів соняшнику олеїнового типу. Тези Міжнародної наукової конференції "Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи". Одеса, 2012. С. 51–52.
2. Левицкий А. П. Оливка – уникальное подсолнечное масло, аналог оливкового. Одесса, 2013. 27 с.
3. Ефименко С. К. Генетико-биохимическая характеристика и селекционное использование мутации повышенного содержания пальмитиновой кислоты в масле семян подсолнечника: дис. канд. биол. наук : 06.01.05. Краснодар, 2007. 108 с.
4. Беззубов Л. П. Химия жиров. Москва: Пищепромиздат, 1962. С.222-251.
5. Боковикова Т. Н. Химический состав, структура и свойства фосфолипидов масел семян подсолнечника современных типов и разработка технологии их выведения методом химической поляризации. Автореф. дис. д-ра техн. наук: 05.18.06. Краснодар, 2000. 40 с.
6. Нечаев А. П. Харчова хімія . М.: ГИОРД, 2007. 640 с.
7. Соняшник. ДСТУ 7011: 2009. Київ. Держспоживстандарт України, 2010.
8. Левицкий А. П. Биохимические методы исследования селекционного материала. Сборник научных трудов ВСГИ . Одесса. ВСГИ, 1979. Т. 15. С. 79–83.
9. ДСТУ ISO 5508-2001. Національний стандарт України. Жири та олії тваринні і

рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот, 2001.

10. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П., Перуанский Ю. В., Луковникова Г. А., Иконникова М. И. Методы биохимического исследования растений. Ленинград: Агропромиздат, 1987. 430 с.

Науково-виробниче видання

**ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ СОНЯШНИКУ НА ЯКІСТЬ  
НАСІННЯ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ**

Методичні рекомендації

Автори: О. О. Молодченкова, Б. Ф. Вареник, В. І. Крутько, Л. Я. Безкровна,  
Ю. А. Левицький, Я. С. Фанін

Над випуском працювали: В. Я. Крижанівський,  
М. Г. Музикант

Зав. редакції видавництва "Астропринт" Т. М. Забанова

Здано до друку  
Формат 60x84/16.  
Замовл. №

Підписано до друку  
Ум. друк.арк.  
Тираж 100 прим.

Селекційно-генетичний інститут-  
Національний центр насіннезнавства та  
сортовивчення,  
65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3.