Валидация метода количественного определения насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в пищевых маслах с помощью настольной ямр-спектроскопии

Шукуров Сардоржон Салимович

(соавторы: Тоштемиров Бобомурод Бекзод уг`ли, Мавланов Умрбек, Атажанов Сардорбек, Нуриддинов Шарофиддин, Бозоров Сойибжон, Чая Томас Павел, Хакимов Бекзод)

Аннотация. В настоящем исследовании валидирован метод настольной 1H ЯМР-спектроскопии (80 МГц) для прямого количественного определения насыщенных, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в пищевых маслах. Использование аутентичных триглицеридных стандартов и характеристических резонансов позволило исключить необходимость хемометрического моделирования. Метод продемонстрировал исключительную точность и воспроизводимость, сопоставимые с показателями высокопольной ЯМР-спектроскопии, представляя собой экономически эффективное, безмодельное решение для рутинного клинического профилирования липидов и контроля качества пищевой продукции.

Ключевые слова: настольная ЯМР-спектроскопия, пищевые масла, количественный анализ, жирные кислоты, кардиометаболическое здоровье, SFA, MUFA, PUFA.

Введение и актуальность исследования. Пищевые масла являются важнейшим компонентом рациона человека, выступая основным источником энергии и таких ключевых нутриентов, как омега-3 и омега-6 жирные кислоты, жирорастворимые витамины (A, D, E и K) и фитостеролы. С клинической точки зрения, липидный профиль потребляемых масел играет критическую роль в регулировании кардиометаболического здоровья. Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), представленные преимущественно линолевой и альфа-линоленовой кислотами, обладают выраженным противовоспалительным действием. Мононенасыщенные жирные кислоты (MUFA), в частности олеиновая кислота, способствуют благоприятной регуляции липидного обмена и достоверно снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний. В свою очередь, избыточное потребление насыщенных жирных кислот (SFA), содержащихся в пальмовом и кокосовом маслах, зачастую ассоциируется с дислипидемией.

Традиционно золотым стандартом для анализа жирнокислотного состава масел выступает газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД). Несмотря на высокую чувствительность и селективность, данный метод остается крайне трудоемким, длительным и финансово затратным. Он требует использования токсичных химических реагентов и наличия сложной лабораторной инфраструктуры, что существенно ограничивает его применение для рутинного контроля качества на производственных линиях.

Высокопольная протонная ядерная магнитная резонансная (1H ЯМР) спектроскопия (например, на 500 МГц) зарекомендовала себя как превосходная альтернатива, позволяющая быстро и точно определять состав ацильных цепей. Однако высокая стоимость оборудования и его обслуживания делает высокопольный ЯМР недоступным для многих исследовательских и промышленных лабораторий. В этом контексте настольная ЯМР-спектроскопия (low-field benchtop NMR) на частоте 80 МГц представляет собой экономически выгодное, компактное и экологичное решение. Главным историческим ограничением настольных приборов было их низкое спектральное разрешение, из-за чего исследователи ранее вынужденно прибегали к сложным хемометрическим моделям, таким как регрессия частичных наименьших квадратов (PLSR) или алгоритмы машинного обучения, что делало методику нестабильной при малейших изменениях экспериментальных условий.

Цель исследования. Настоящая работа направлена на комплексную валидацию прямого, свободного от математического моделирования метода количественной оценки SFA, MUFA и PUFA в пищевых маслах с использованием настольного ЯМР-спектрометра (80 МГц) путем калибровки по аутентичным триглицеридным стандартам.

Материалы и методы. Для подтверждения надежности предложенного подхода мы впервые использовали аутентичные триглицеридные стандарты высочайшей степени чистоты: глицерил тридеканоат (маркер SFA), глицерил триолеат (маркер MUFA) и глицерил трилинолеат (маркер PUFA). Исходные растворы были подготовлены в дейтерированном хлороформе (CDCl3) в концентрациях 100, 50 и 25 мг/мл. Из этих растворов была сформирована масштабная репрезентативная выборка, включающая 86 образцов.

В выборку вошли бинарные смеси (n=9) и тернарные смеси (n=9), составленные в равных объемах. Для имитации реальных пищевых матриц были созданы искусственные купажи: смесь, имитирующая профиль подсолнечного масла (соотношение SFA:MUFA:PUFA как 1:2:7), и смесь, имитирующая оливковое масло (2:7:1). Кроме того, были проанализированы натуральные бленды (n=27), состоящие из оливкового, кунжутного и рапсового масел в пропорциях 3:1 и 1:3. Для оценки чувствительности метода (стандартная добавка) мы использовали коммерческое подсолнечное масло, обогащенное пятью различными концентрациями каждого из трех стандартов.

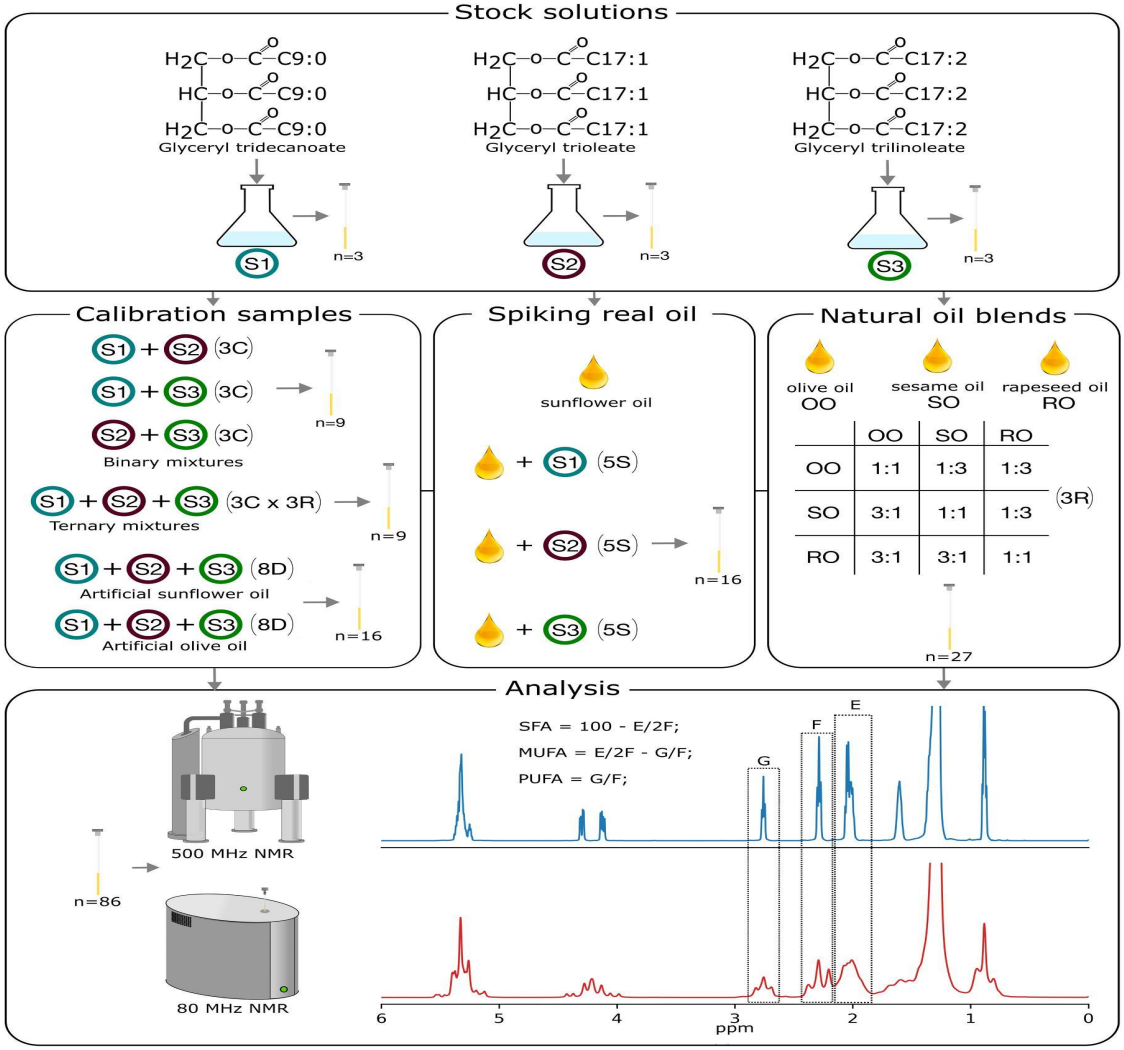


Рисунок 1 – Схема исследования и рабочий процесс. Подготовка стоковых растворов, калибровочных образцов и натуральных купажей масел.

Регистрация спектров проводилась параллельно на высокопольном спектрометре Bruker Avance III 500 МГц и настольном спектрометре Magritek Spinsolve 80 МГц. Для настольного прибора записывалось 32 скана с временем сбора данных 3,2 с и задержкой релаксации 10 с.

Обработка полученных массивов данных выполнялась в среде MATLAB. Количественный расчет базировался на интегрировании резонансов, общих для всех триацилглицеринов: аллильных протонов (область E, 1,85–2,23 м.д.), альфа-метиленовых протонов (область F, 2,28–2,36 м.д.) и бис-аллильных протонов (область G, 2,60–2,95 м.д.). Доля PUFA рассчитывалась по формуле (G/F)*100, общая доля ненасыщенных жирных кислот (UFA) – как (E/2F)*100, MUFA – как разность UFA и PUFA, а SFA определялись по остаточному принципу (100 - UFA).

Результаты исследования и их обсуждение. Сравнительный анализ спектров наглядно продемонстрировал различия в разрешающей способности приборов. Высокопольный спектрометр обеспечивал четкое разделение сигналов в критических аллильных и бис-аллильных областях. Напротив, настольный прибор (80 МГц) давал более широкие и частично перекрывающиеся пики. Тем не менее, ключевые диагностические сигналы оставались достаточно различимыми для проведения корректного численного интегрирования.

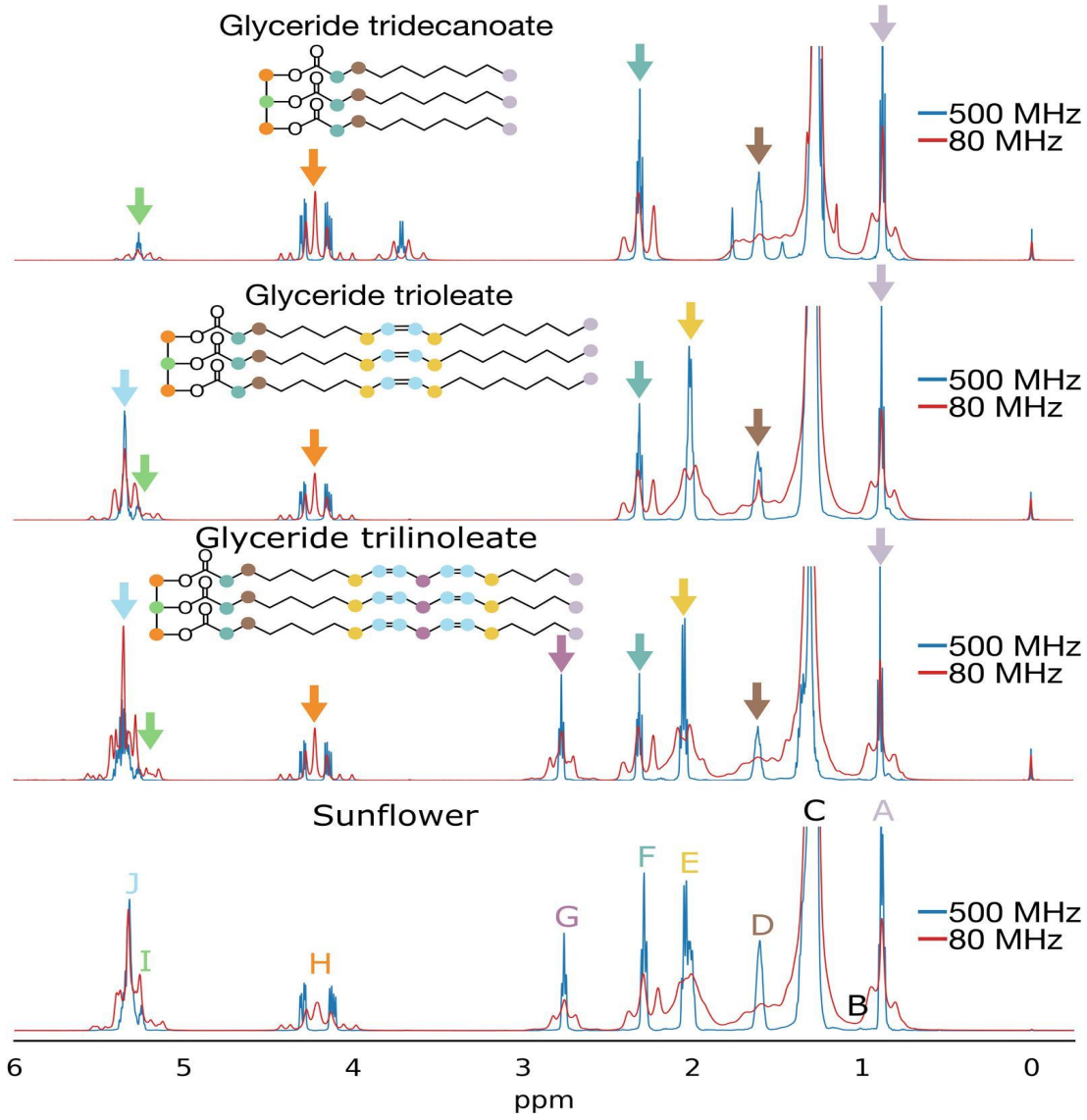


Рисунок 2 – Сравнительные 1H ЯМР спектры глицеридных стандартов и подсолнечного масла, полученные при 500 МГц и 80 МГц.

Особое внимание мы уделили выбору алгоритма предобработки спектров. Были протестированы различные методы коррекции базовой линии, включая полиномиальное сглаживание и метод асимметричных наименьших квадратов (ALS) со сглаживанием Уиттекера. Анализ показал, что любые математические манипуляции с базовой линией вносили небольшие, но систематические искажения в площади интегралов. Удивительным, но закономерным открытием стало то, что прямое трапециевидное интегрирование необработанных (сырых) спектров обеспечило наивысшую точность. Для 500 МГц среднеквадратичная ошибка (RMSE) составила 1,41, 1,24 и 1,25 для SFA, MUFA и PUFA соответственно. Для прибора на 80 МГц эти показатели составили 1,82, 2,70 и 1,45, что свидетельствует о крайне высокой надежности даже без сложных вычислений.

Отдельно оценивалось влияние разбавления образцов. Было установлено, что анализ неразбавленных (чистых) масел на частоте 80 МГц приводит к значительному уширению спектральных линий, что вызывает сильное перекрытие областей E и F. Для решения этой проблемы нами был применен метод мульти-гауссовой аппроксимации (MGF), позволивший программно разделить пики. Однако, наиболее простым и эффективным подходом оказалось банальное разбавление масел хлороформом (в соотношении 250 мкл масла на 400 мкл растворителя). Это резко снижало RMSE (с 2,03 до 1,18 для SFA) и делало метод максимально воспроизводимым.

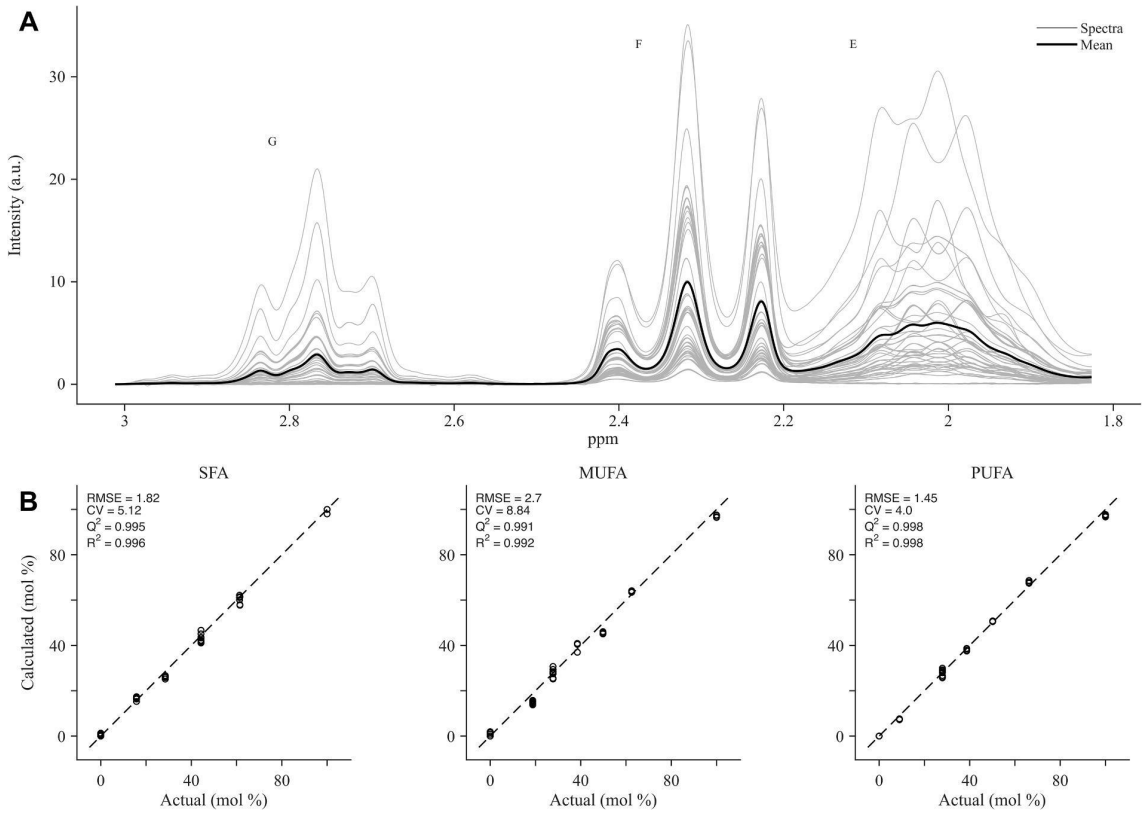


Рисунок 3 – Корреляция фактических и предсказанных молярных процентов SFA, MUFA и PUFA на настольном приборе 80 МГц.

Оценка чувствительности метода (анализ LOD/LOQ) подтвердила состоятельность настольной платформы. Пределы обнаружения (LOD) на 80 МГц составили 1,99% для SFA, 2,02% для MUFA и 0,15% для PUFA, тогда как на 500 МГц аналогичные показатели составили 1,12%, 0,64% и 0,76%. Эксперименты со стандартными добавками к подсолнечному маслу

продемонстрировали строгую линейность (R^2 > 0,99 для SFA), а расчетные концентрации нативных жирных кислот в матрице масла сошлись с погрешностью менее 1% между двумя приборами. Относительное стандартное отклонение (RSD) во всех повторных экспериментах не превышало 2%.

Вывод. В ходе масштабного исследования впервые проведена успешная валидация безмодельного метода количественной оценки жирнокислотного состава масел с помощью настольной ЯМР-спектроскопии на 80 МГц. Использование аутентичных триглицеридных стандартов доказало, что метод прямого интегрирования характеристических аллильных, бис-аллильных и альфа-метиленовых протонов обеспечивает точность, сопоставимую с высокопольными системами. Отказ от сложных хемометрических алгоритмов делает методику универсальной, переносимой между разными лабораториями и легко масштабируемой. Предложенный оптимизированный протокол открывает новые горизонты для экспресс-скрининга качества липидов, что особенно важно как для кардиологических и нутрициологических исследований, так и для рутинного контроля на предприятиях пищевой промышленности.

Список использованной литературы:

1. Guillén M. D., Uriarte P. S. Contribution to further understanding of the evolution of sunflower oil submitted to frying temperature in a domestic fryer: study by 1H nuclear magnetic resonance // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – Т. 57. – № 17. – С. 7790-7799.

2. Mavlanov U., Atajanov S., Nuriddinov S., Shukurov S. S., Bozorov S., Czaja T. P., Khakimov B. Validation of benchtop NMR-based quantification of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in edible oils // Journal of Food Composition and Analysis. – 2026. – Т. 150. – С. 108897.