



Спектроскопия комбинационного рассеяния света растительных масел и БАД Омега-3: количественный анализ

С. М. Кузнецов¹, В. С. Новиков¹, Д. Д. Васимов^{1,2},
П. К. Лаптинская¹, В. В. Кузьмин¹, М. Н. Московский³,
Е. А. Сагитова¹

¹ Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН,
Москва, Россия.

² Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет),
г. Долгопрудный, Московская область, Россия.

³ Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ,
Москва, Россия.

Обсуждаются возможности спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света для диагностики растительных масел и биологически активных добавок (БАД) на основе полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 (ПНЖК ω -3). Показано, что по спектрам КР можно определять йодное число растительных масел, форму и относительное общее содержание ПНЖК ω -3, а также соотношение массовых долей эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК) кислот в БАД Омега-3. Обсуждаются возможности применения метода главных компонент для диагностики БАД Омега-3 по спектрам КР.

Ключевые слова: биологически активные добавки, омега-3 кислоты, растительные масла, йодное число, спектроскопия комбинационного рассеяния света, метод главных компонент.

Статья получена: 14.11.2024

Статья принята: 28.11.2024

Raman Spectroscopy of Vegetable Oils and Omega-3 Fish Oil Supplements: Quantitative Analysis

S. M. Kuznetsov¹, V. S. Novikov¹, D. D. Vasimov^{1,2},
P. K. Laptinskaya¹, V. V. Kuzmin¹, M. N. Moskovskiy³,
E. A. Sagitova¹

¹ Prokhorov General Physics Institute of the RAS, Moscow,
Russia.

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny,
Moscow Region, Russia.

³ Federal Scientific Agronomic and Engineering Center VIM,
Moscow, Russia.

This paper discusses the potential of Raman spectroscopy for the characterization of vegetable oils and dietary supplements based on polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family (ω -3 PUFA). The present study demonstrates that Raman spectra can be employed to determine the iodine value of vegetable oils, form of ω -3 PUFA, relative total ω -3 PUFA content, and ratio of the mass fractions of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids in the Omega-3 dietary supplements. Furthermore, the paper discusses potential applications of the principal component analysis (PCA) to Omega-3 supplement characterization using Raman spectra.

Keywords: dietary supplements, omega-3 fatty acids, vegetable oils, iodine value, Raman spectroscopy, principal component analysis.

Article received: 14.11.2024

Article accepted: 28.11.2024

INTRODUCTION

Today, many industries (medical, pharmaceutical, and agricultural) require the implementation of non-destructive quality control methods for both raw materials and final products. The development of such methods is of a great importance for mass-market products, which include vegetable oils and animal fats. Vegetable



ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во многих отраслях промышленности (медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве и т. д.) весьма востребованы неразрушающие методы экспресс-контроля качества сырья и производимой продукции. Развитие таких методов особенно актуально для продуктов массового потребления, к которым относятся растительные масла и животные жиры.

Как известно, растительные масла и животные жиры являются ценным продуктом питания, широко применяются для создания лекарственных препаратов и косметических средств [1]. Помимо этого, они рассматриваются в качестве перспективных возобновляемых сырьевых ресурсов для создания биодизельного топлива [1, 2], входят в состав биологически активных добавок (БАД). Например, в России БАД на основе рыбьего жира, а именно на основе омега-3 жирных кислот (БАД Омега-3), являются одними из самых потребляемых добавок [3]. Регулярный прием таких добавок помогает восполнить традиционный для России дефицит длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 (ПНЖК ω -3), в частности, дефицит эйкозапентаеновой (ЭПК, $C_{20}H_{30}O_2$) и докозагексаеновой (ДГК, $C_{22}H_{32}O_2$) кислот, а также помогает поддерживать здоровье сердечно-сосудистой и нервной систем [4].

Растительные масла и животные жиры представляют собой смеси триглицеридов (ТГ) насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Соотношение числа ненасыщенных двойных (C=C) и насыщенных одинарных (C-C) углерод-углеродных связей в молекулах таких ТГ в значительной степени определяет многие свойства растительных масел (чувствительность к нагреву, устойчивость к окислению, стабильность, скорость высыхания и т. д.), условия их хранения и область применения [5]. Это соотношение характеризуется с помощью йодного числа, определяемого как масса йода (в г), которая может присоединиться к 100 г масла при проведении химической реакции галогенирования.

Знание йодного числа необходимо при использовании масел в фармацевтической, косметической и лакокрасочной промышленности, а также для создания биодизельного топлива [1, 2]. Тем не менее, для ряда применений, в частности при производстве БАД Омега-3, требуется определять не йодное число, а общее содержание ПНЖК ω -3, а также содержание и соотношение ЭПК и ДГК.

ПНЖК ω -3 в коммерческих БАД Омега-3 могут быть в нескольких различных формах, от которых

oils and animal fats are valuable food products that are widely used in the manufacture of pharmaceuticals and cosmetics [1]. They are also a potential renewable raw material for biodiesel production [1,2] and are main part of the composition of nutritional supplements. In Russia, for example, fish oil supplements (omega-3 supplements), especially based on omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA), are among the most widely consumed categories of supplements [3]. Regular intake of such supplements helps one to compensate the traditional deficiency of ω -3 PUFAs in Russia, especially the deficiency of eicosapentaenoic acid (EPA, $C_{20}H_{30}O_2$) and docosahexaenoic acid (DHA, $C_{22}H_{32}O_2$), as well as helps to maintain the health of the cardiovascular and nervous systems [4].

Vegetable oils and animal fats are mixtures of triglycerides (TG) of saturated and unsaturated fatty acids. The ratio of the number of unsaturated double (C=C) and saturated single (C-C) carbon-carbon bonds in the molecules of such TG largely determines many properties of vegetable oils (sensitivity to heat, resistance to oxidation, stability, drying rate, etc.), their storage conditions and applications [5]. This ratio is characterised by the iodine value, defined as the mass of iodine (in grams) that can bond to 100 grams of oil in a chemical halogenation reaction.

Knowledge of the iodine value is essential when using oils in the pharmaceutical, cosmetic and paint industries, as well as in the production of biodiesel [1,2]. However, for a number of applications, particularly in the manufacture of omega-3 supplements, it is necessary to determine the total ω -3 PUFA content and the content and ratio of EPA and DHA rather than the iodine value.

The ω -3 PUFAs found in commercial omega-3 supplements exist in a number of different forms, which can affect the rate at which the body absorbs the ω -3 PUFAs. The most prevalent forms of the ω -3 PUFAs in such supplements are TG and ethyl esters (EE) of fatty acids.

The structural formulas of fatty acid TG and EE molecules, as well as EPA and DHA, are shown in Figure 1.

The counterfeiting or production of low-quality vegetable oils and dietary supplements, as well as violations of transport and storage conditions, pose a significant risk to the safety and health of consumers. Therefore, the development of rapid and efficient analytical methods for these products is essential to ensure quality control, particularly at the stage of delivery from the manufacturer to the consumer, as well as for the in-time detection of counterfeit products.

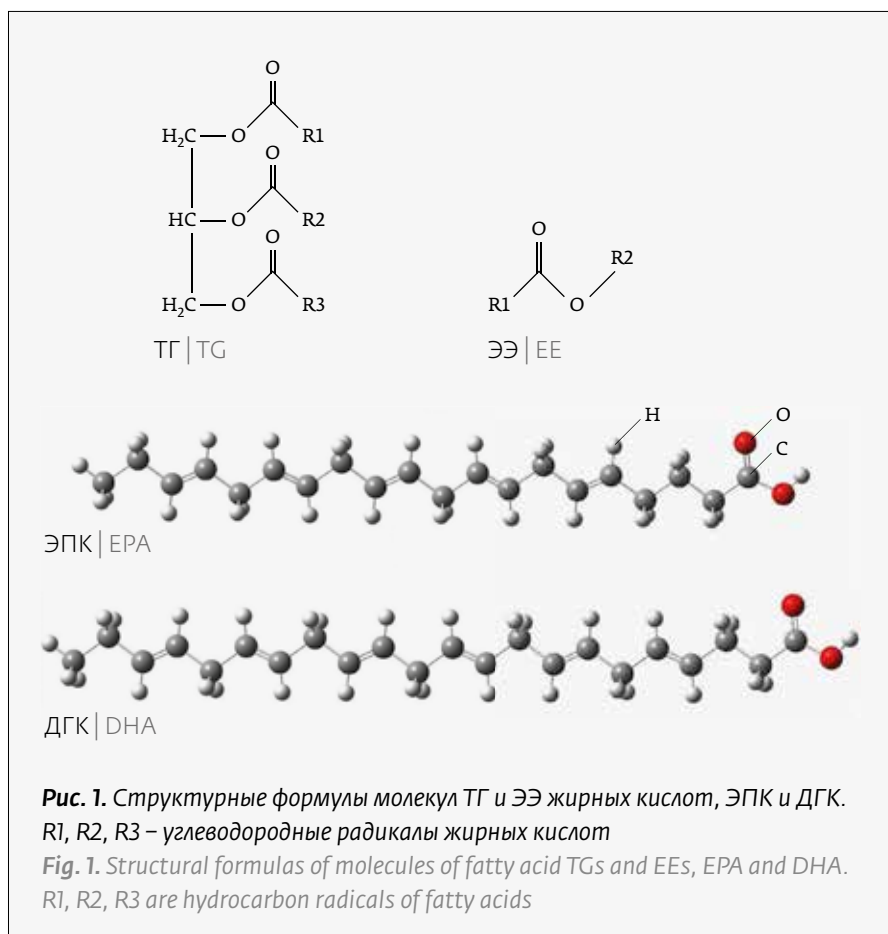
The traditional techniques for analyzing the composition and quality of vegetable oils and animal fats are chemical and physicochemical methods, namely liquid

зависит скорость их усвоения организмом. Наиболее распространенными являются формы ТГ и этиловых эфиров (ЭЭ) жирных кислот. Структурные формулы молекул ТГ и ЭЭ жирных кислот, а также ЭПК и ДГК показаны на рис. 1.

Фальсификация или производство некачественных растительных масел и БАД, нарушение условий транспортировки и хранения создают серьезную угрозу безопасности жизни и здоровью людей. Таким образом, разработка быстрых и эффективных методов анализа этих продуктов необходима для обеспечения контроля качества, прежде всего, на этапе доставки от производителя к потребителю, а также для своевременного обнаружения контрафактной продукции.

Традиционными методами анализа состава и качества растительных масел и животных жиров являются химические и химико-физические методы, такие как жидкостная или газовая хроматография или титриметрический анализ [6-8]. Эти методы требуют высокого профессионального уровня персонала, применения небезопасных реактивов и могут быть использованы только в условиях специальных лабораторий. Ввиду этого сейчас активно развиваются альтернативные методы исследования масел, основанные, в частности, на колебательной спектроскопии [9-12].

Возможность проводить исследования неразрушающим способом и вне специальных лабораторий, быстрота получения результата, отсутствие этапа подготовки проб делают спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) света перспективным методом исследования растительных масел и животных жиров. В отличие от других методов, спектроскопия КР позволяет проводить их исследование через пластиковую упаковку, а в случае БАД Омега-3 – через желатиновую капсулу [13]. Немаловажным фактором для развития в России этого метода применительно к задачам мониторинга качества продукции является налаженное производство портативных КР-спектрометров [14].



or gas chromatography and titrimetric analysis [6-8]. These techniques require a high level of expertise and the use of potentially hazardous reagents. In addition, they can only be provided in specialized laboratories. For this reason, alternative methods of oil characterization, based, in particular, on vibrational spectroscopy, are now being actively developed [9-12].

Raman spectroscopy is a fast and non-destructive analytical method that requires no sample preparation. The analysis can be performed in a mobile laboratory or "in situ". For this reason, this technique is a very attractive option for the study of vegetable oils and animal fats. In contrast to traditional techniques, Raman spectroscopy permits analysis through plastic packaging and, in the case of Omega-3 supplements, through a gelatin capsule [13]. For the Russian Federation, the important factor in the development of this technique for tasks of product quality monitoring is the established production of portable Raman spectrometers [14].

In this paper, we study the potential of Raman spectroscopy to determine the degree of unsaturation (iodine value) in vegetable oils, as well as the content and form of ω -3 PUFAs in Omega-3 supplements.



В этой работе мы изучаем возможность определения по спектрам КР степени ненасыщенности (йодного числа) растительных масел, а также содержания и формы ПНЖК ω -3 в БАД Омега-3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовались образцы 18 различных коммерческих растительных масел и 18 коммерческих БАД Омега-3. Для регистрации спектров КР масел и БАД использовался конфокальный КР-микроскоп Senterra II (Bruker, США), оснащенный объективом с увеличением $20\times$ (Ч. А. 0,40) и лазером с длиной волны излучения 785 нм и с выходной мощностью 100 мВт. Спектры регистрировались в геометрии рассеяния на 180° со спектральным разрешением $1,5\text{ см}^{-1}$. Для каждого образца было записано 40 спектров, время накопления каждого спектра составляло 5 с.

Йодные числа растительных масел определялись с помощью титриметрического анализа, проводимого по методу Маргошеса [15]. Для каждого образца было сделано от 3 до 6 измерений йодного числа, в дальнейшем использовалось их усредненное значение.

Анализ методом главных компонент проводился с использованием приложения Principal Component Analysis for Spectroscopy для программного пакета OriginPro (лицензия Learning Edition).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 и 3 показаны соответственно спектры КР растительных масел с различным йодным числом и спектры КР БАД Омега-3 с различным относительным содержанием ПНЖК ω -3. Под относительным содержанием понималось отношение массы всех ПНЖК ω -3 к массе рыбного жира в препарате. Спектры нормированы на максимальную интенсивность полосы КР, соответствующей деформационному колебанию CH_2 групп ($\delta(\text{CH}_2)$). Это колебание наблюдается в спектрах растительных масел и БАД Омега-3 с содержанием ПНЖК ω -3 менее 40% на частоте 1440 см^{-1} , для БАД Омега-3 с содержанием ПНЖК ω -3 более 40% – на частоте 1448 см^{-1} . В области $1200\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ эволюция спектров КР БАД с ростом содержания ПНЖК ω -3 аналогична эволюции спектров, наблюдаемой для растительных масел с возрастанием йодного числа (рис. 2 и 3). А именно: с ростом степени ненасыщенности масел и содержания ПНЖК ω -3 увеличиваются интенсивности линий КР с частотами около 1265 и 1658 см^{-1} , относящихся соответственно к дефор-

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

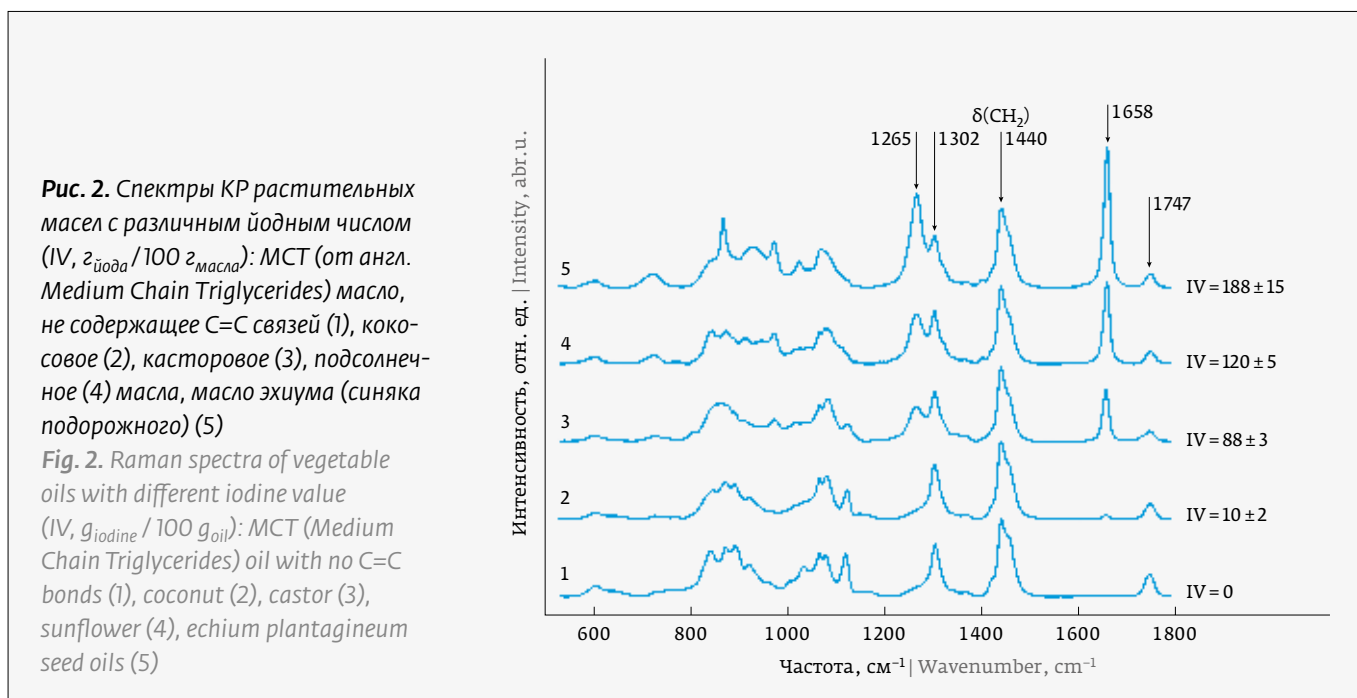
This study examined samples of 18 commercial vegetable oils and 18 commercial Omega-3 dietary supplements. A Senterra II confocal Raman microscope (Bruker, USA) equipped with a $20\times$ objective (N.A. 0.40) and a laser with an emission wavelength of 785 nm and an output power of 100 mW was used to record the Raman spectra of oils and dietary supplements. Spectra were recorded at 1.5 cm^{-1} spectral resolution in a 180° scattering geometry. For each sample, 40 spectra were recorded. The accumulation time of each spectrum was 5 s. The iodine values of the vegetable oils was determined by titrimetric analysis using the Margoshes method [15]. The iodine value for each sample was measured 3 to 6 times, and the average value was used in the following analysis.

Principal component analysis was performed using the utility “The Principal Component Analysis for Spectroscopy application” for the OriginPro software package (Learning Edition license).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Figs. 2 and 3 show the Raman spectra of vegetable oils with different iodine values (IV) and the Raman spectra of Omega-3 supplements with different relative content of ω -3 PUFAs, respectively. The relative content was taken as the ratio of the mass of all the PUFAs ω -3 to the total mass of the fish oil in the supplement. Spectra were normalized to the peak intensity of the Raman band belonging to deformation CH_2 vibration ($\delta(\text{CH}_2)$). This vibration is observed in the spectra of vegetable oils and Omega-3 supplements with ω -3 PUFA content less than 40% at 1440 cm^{-1} . For the content of these acids in the Omega-3 supplements more than 40%, the $\delta(\text{CH}_2)$ vibration has a wavenumber of 1448 cm^{-1} . In the $1200\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ spectral region, the evolution of the Raman spectra of dietary supplements with increasing ω -3 PUFA content is similar to that observed for vegetable oils with increasing iodine value (Figs. 2 and 3). Namely, when the degree of unsaturation of the oils and the ω -3 PUFA content increases, the intensities of the Raman bands with wavenumbers of 1265 and 1658 cm^{-1} increase. These vibrations are related to the deformation C–H vibrations and stretching C=C vibrations in $\text{HC}=\text{CH}$ groups, respectively.

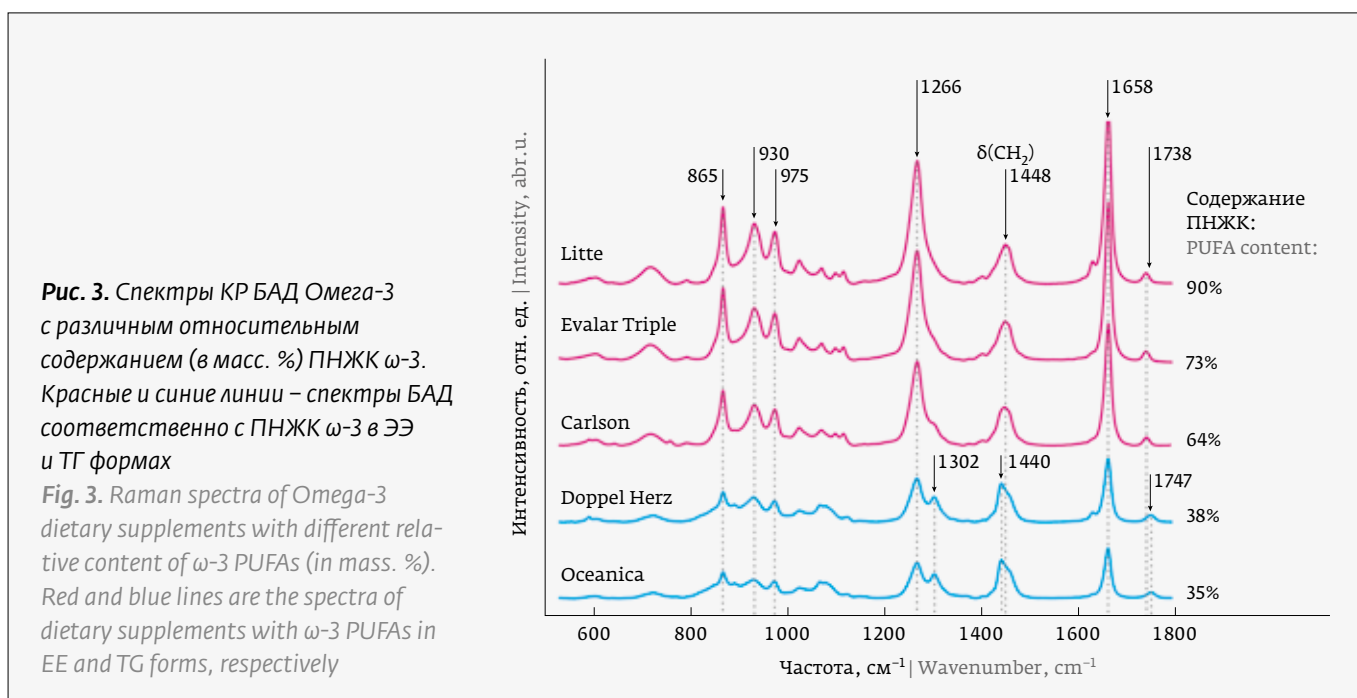
Figs. 4 and 5 show the dependences of the ratio ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) of the peak intensities of the Raman band at 1658 cm^{-1} and the band corresponding to the $\delta(\text{CH}_2)$ vibration on the iodine value (for vegetable oils) and on the relative mass content (in % of the total fat mass) of ω -3 PUFAs in Omega-3 dietary supplements, respectively. For both cases, it was found that the experimental values of ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) are well approximated by lin-



мационному С–Н и валентному С=C колебаниям в НС=СН группах.

На рис. 4 и 5 показаны соответственно зависимости отношения ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) пиковых интенсивностей линии с частотой 1658 cm^{-1} и полосы, отвечающей $\delta(\text{CH}_2)$ -колебанию, от йодного числа (для растительных масел) и от относительного массового содержания (в % от общей массы жира) ПНЖК ω -3 в БАД Омега-3. В обоих случаях обнаружено,

ear functions (coefficient of linear correlation $r > 0.95$). Thus, the ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) ratio can be used to estimate both the iodine values of vegetable oils and the relative mass content of ω -3 PUFAs in Omega-3 supplements. Note, in contrast to vegetable oils, we did not observe a direct proportionality between the ratio ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) and the ω -3 PUFA content in dietary supplements. This is due to the contribution to the intensity of the band at 1658 cm^{-1} of vibrations of other fatty acids present



что экспериментальные значения $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ достаточно хорошо аппроксимируются линейными зависимостями (коэффициент линейной корреляции $r > 0,95$). Следовательно, отношение $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ может быть использовано для оценки как йодных чисел растительных масел, так и относительного массового содержания ПНЖК ω -3 в БАД Омега-3. Отметим, что в отличие от растительных масел в случае БАД прямой пропорциональности между отношением $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ и содержанием ПНЖК ω -3 не наблюдается, поскольку вклад в интенсивность линии с частотой 1658 см^{-1} вносят колебания присутствующих в БАД других, в частности мононенасыщенных жирных кислот.

Обнаружено, что по спектрам КР можно различать форму (ЭЭ или ТГ), в которой ПНЖК ω -3 присутствуют в БАД (рис. 1). А именно: в спектрах БАД Омега-3, помимо частотного сдвига для колебания $\delta(\text{CH}_2)$, частотный сдвиг ($\sim 9 \text{ см}^{-1}$) наблюдался для валентного колебания $\text{C}=\text{O}$ связей ($\nu(\text{C}=\text{O})$). В спектрах КР БАД с низким (менее 40%) содержанием ПНЖК ω -3, как и в спектрах КР растительных масел, линия, отвечающая $\nu(\text{C}=\text{O})$ колебанию, имела частоту 1747 см^{-1} . В спектрах КР БАД с содержанием ПНЖК ω -3 более 40% это колебание наблюдалось на частоте 1738 см^{-1} . Отметим, что производитель не всегда указывает, в какой форме в БАД присутствуют ПНЖК ω -3. Из исследованных нами образцов форма ЭЭ была заведомо известна только для БАД, содержащих 90 и 73% ПНЖК ω -3. Для растительных масел, как уже говорилось выше, характерна форма ТГ жирных кислот. Сопоставив частоты $\nu(\text{C}=\text{O})$ колебания для этих образцов, мы пришли к выводу, что в исследованных нами образцах БАД с содержанием ПНЖК ω -3 40–90% эти кислоты находятся в форме ЭЭ, а в образцах с содержанием ПНЖК ω -3 менее 40% – в форме ТГ.

Таким образом, традиционные методы анализа спектров КР позволяют оценивать две характеристики БАД Омега-3: форму и относительное общее содержание ПНЖК ω -3.

С целью извлечь информацию о соотношении содержания ЭПК и ДГК, спектры КР БАД Омега-3 были проанализированы методом главных компонент (ГК). Он позволяет анализировать спектр целиком без выделения отдельных линий. При применении этого метода все данные изначально центрируются: из всех спектров S_i вычитается усредненный спектр \bar{S} обучающей выборки. После этого выделяется набор ГК и вычисляются счета – проекции на них центрированных спектров $\Delta S_i = S_i - \bar{S}$. В пространстве счетов каждому спектру S_i ставится в соответствие точка O_i с координатами –

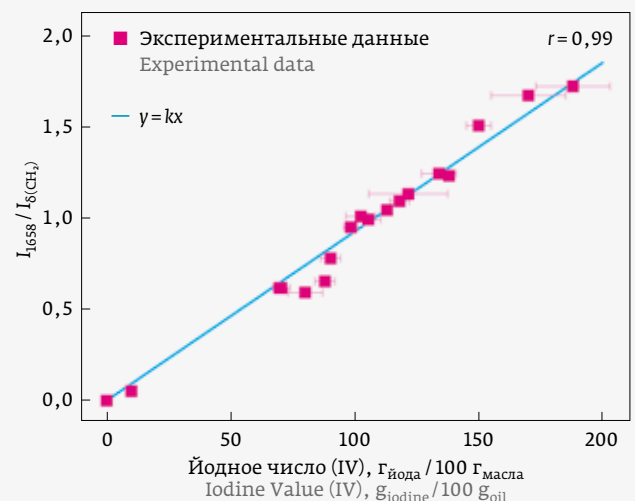


Рис. 4. Отношение $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ как функция йодного числа растительных масел

Fig. 4. The $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ ratio as a function of the iodine value of vegetable oils

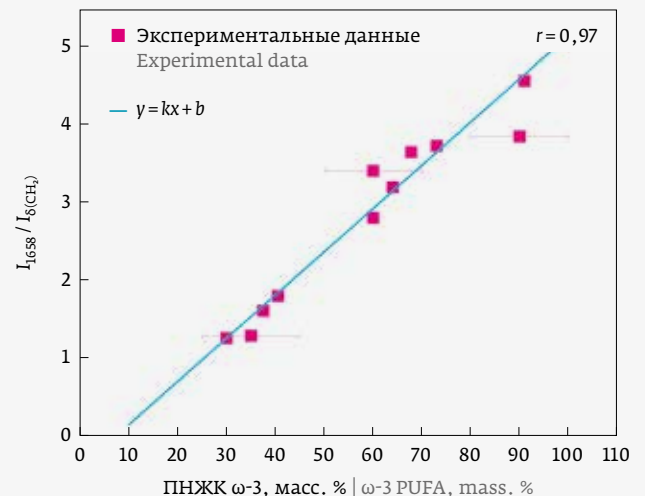


Рис. 5. Отношение $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ как функция относительного массового содержания ПНЖК ω -3 в БАД Омега-3.

Ошибка в определении содержания ПНЖК ω -3 дана в соответствии с данными, указанными на упаковках БАД. Экспериментальные данные представлены только для тех БАД, для которых было заведомо известны относительные содержания ПНЖК ω -3

Fig. 5. The $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ ratio as a function of the relative mass content of ω -3 PUFAs in Omega-3 dietary supplements. The error in determining the content of ω -3 PUFAs is provided according to the data indicated on the packaging of the dietary supplements. Experimental data are presented only for the dietary supplements with the relative contents of ω -3 PUFAs known in advance

проекциями ΔS_i на главные компоненты [16]. Их взаимное расположение анализируется на основе T^2 распределения Хотеллинга с формированием областей, в которые с заданной вероятностью попадут точки, соответствующие образцам определенной группы. Результаты анализа методом ГК во многом зависят от того, как сформирована обучающая выборка спектров и от отбора анализируемых ГК.

На рис. 6 показаны результаты анализа методом ГК, примененного ко всему массиву спектров КР исследуемых в работе БАД Омега-3. В данном случае анализировался спектральный диапазон $540-1800 \text{ см}^{-1}$. Как видно из рис. 6, все исследуемые БАД разделились на две группы. Сопоставив частоты $\nu(\text{C}=\text{O})$ колебания и группы, в которые попали БАД Омега-3, на плоскости первой и второй главных компонент (ГК1 и ГК2, рис. 6) обнаружено,

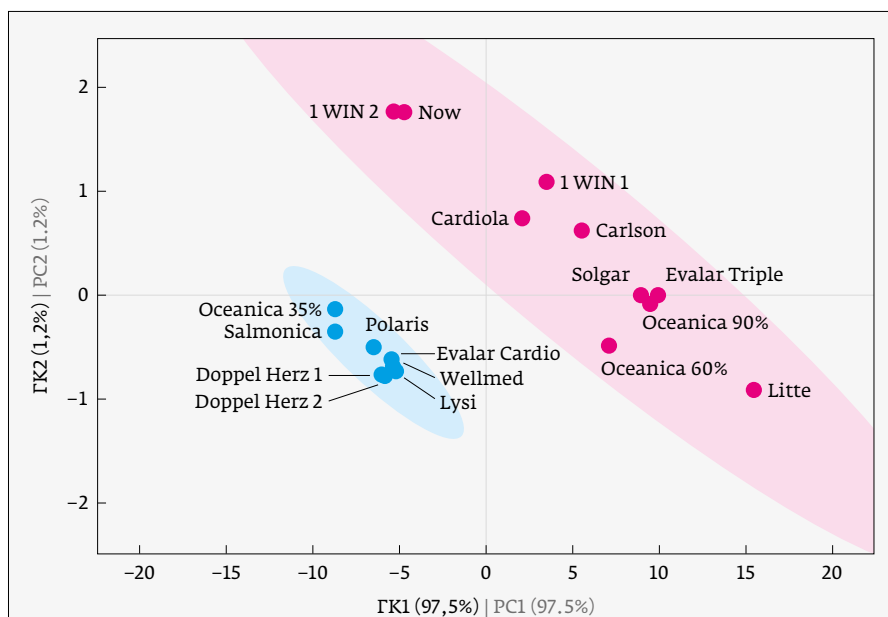


Рис. 6. Результаты анализа методом ГК, примененного ко всему массиву спектров КР исследуемых БАД Омега-3 в диапазоне $540-1800 \text{ см}^{-1}$. Эллипсы – области, в которые с вероятностью 95% попадает спектр каждой исследуемой БАД Омега-3

Fig. 6. Results of the PCA applied to the entire set of Raman spectra of the studied Omega-3 dietary supplements in the range of $540-1800 \text{ cm}^{-1}$. Ellipses are the areas in which the spectrum of each studied Omega-3 dietary supplement is included with a probability of 95%

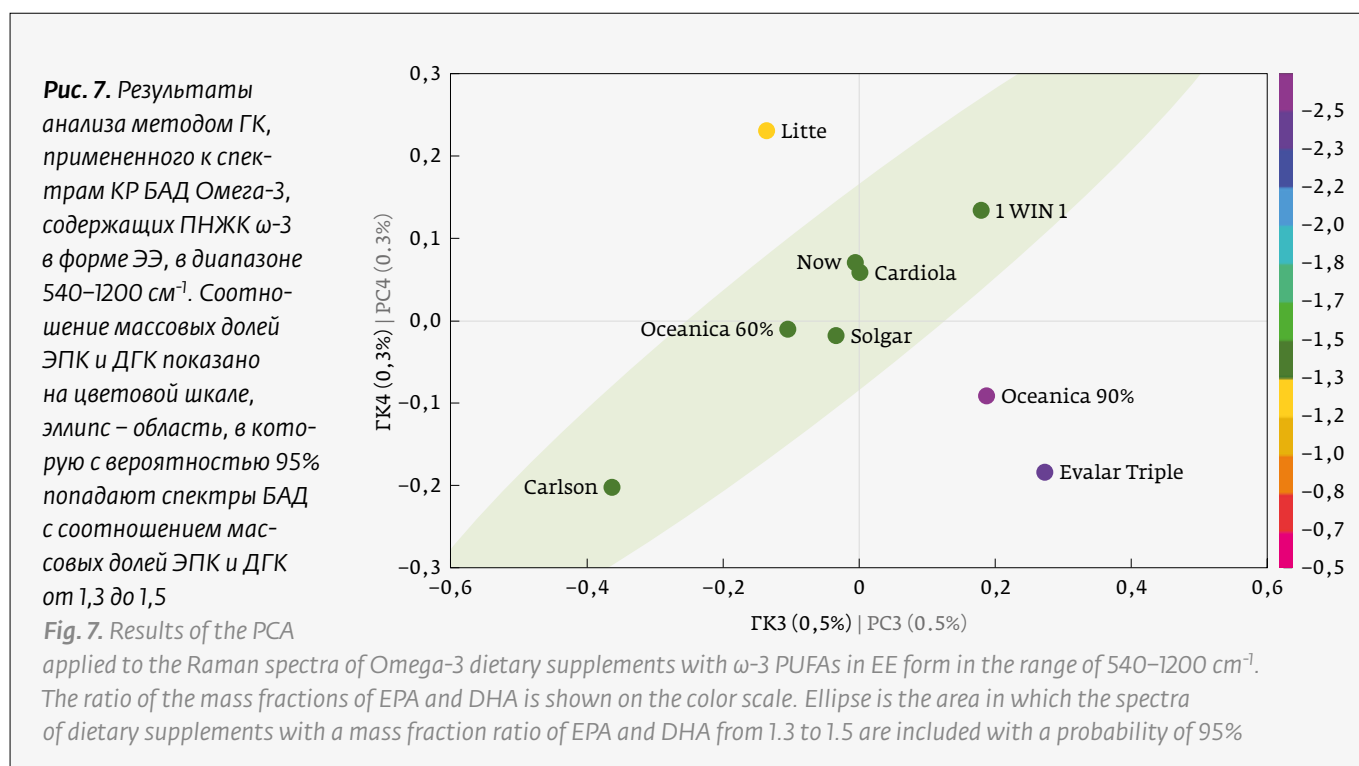


Рис. 7. Результаты анализа методом ГК, примененного к спектрам КР БАД Омега-3, содержащих ПНЖК $\omega-3$ в форме ЭЭ, в диапазоне $540-1200 \text{ см}^{-1}$. Соотношение массовых долей ЭПК и ДГК показано на цветовой шкале, эллипс – область, в которую с вероятностью 95% попадают спектры БАД с соотношением массовых долей ЭПК и ДГК от 1,3 до 1,5

Fig. 7. Results of the PCA applied to the Raman spectra of Omega-3 dietary supplements with $\omega-3$ PUFAs in EE form in the range of $540-1200 \text{ cm}^{-1}$. The ratio of the mass fractions of EPA and DHA is shown on the color scale. Ellipse is the area in which the spectra of dietary supplements with a mass fraction ratio of EPA and DHA from 1.3 to 1.5 are included with a probability of 95%

что разделение произошло по форме (ЭЭ и ТГ) ПНЖК ω -3. Стоит уточнить, что для наглядности на рис. 6 показана только часть розового эллипса, в которой сосредоточены все экспериментальные данные. Отметим, что БАД фирм Doppel Herz и NOW попали в разные группы, несмотря на то, что содержание в них ПНЖК ω -3 различалось незначительно (38 и 40%). Таким образом, такой подход не предоставил никакой новой информации о характеристиках БАД по сравнению с данными, полученными на основе традиционного анализа спектров КР. Ввиду этого, мы исключили из рассмотрения наиболее чувствительную к форме ПНЖК ω -3 спектральную область 1200–1800 cm^{-1} и применили метод ГК к спектрам КР БАД, в которых ПНЖК ω -3 имели форму ЭЭ. По данным производителей такие БАД различались по соотношению в них содержания ЭПК и ДГК. Результаты анализа методом ГК, примененного к спектрам КР этой группы БАД в области 540–1200 cm^{-1} , показаны на рис. 7. Как видно из рис. 7, на плоскости третьей и четвертой главных компонент (ГК3 и ГК4) удалось разделить БАД по соотношению в них массовых долей ЭПК и ДГК. В БАД, содержащих ПНЖК ω -3 в форме ТГ, соотношение массовых долей ЭПК и ДГК было примерно одинаковым. Проведя подобный анализ для этих БАД, было получено, что ни одна из точек в пространстве ГК не вышла за пределы области, в которую с вероятностью 95% попадают спектры БАД с соотношением массовых долей ЭПК и ДГК от 1,3 до 1,5.

ВЫВОДЫ

В работе показано, что спектроскопия КР является быстрым способом определения степени ненасыщенности (йодного числа) растительных масел. А именно: отношение пиковых интенсивностей $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$ линии с частотой 1658 cm^{-1} и полосы, отвечающей $\delta(\text{CH}_2)$ -колебаниям, пропорционально йодному числу в диапазоне йодных чисел от 0 до 188 $\text{г}_{\text{йода}}/100 \text{ г}_{\text{масла}}$ и может быть использовано для определения этой важной характеристики растительных масел.

В случае БАД Омега-3 традиционные методы анализа спектров КР, основанные на анализе отдельных спектральных линий, позволяют оценивать две характеристики: относительное содержание всех ПНЖК ω -3 и их форму в БАД. Под относительным содержанием принималось отношение массы всех ПНЖК ω -3 к массе рыбного жира в препарате. Для быстрой оценки относительного содержания ПНЖК ω -3 удобно использовать отношение $I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$, которое линейно зависит от

in in dietary, in particularly monounsaturated fatty acids.

It was found that Raman spectra permit to distinguish the forms (EE or TG) in which ω -3 PUFAs are present in the supplements (Fig. 1). Namely, a wavenumber shift ($\sim 9 \text{ cm}^{-1}$) in the spectra of Omega-3 supplements was observed for the stretching vibration of the C=O bonds ($\nu(\text{C}=\text{O})$) in addition to the wavenumber shift of the $\delta(\text{CH}_2)$ vibration. In the Raman spectra of dietary supplements with low (less than 40%) ω -3 PUFA content, as well as in the Raman spectra of vegetable oils, the band corresponding to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibration has a maximum at 1747 cm^{-1} . In the Raman spectra of the dietary supplements with a ω -3 PUFA content of more than 40%, this vibration was observed at 1738 cm^{-1} . Note that the manufacturer does not always specify the form of ω -3 PUFA present in supplements. Among all the studied samples, the form of EE was known only for the supplements containing 73% and 90% ω -3 PUFAs. As it mentioned above, fatty acids in vegetable oils present in TG form. After comparing the wavenumbers of $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibration for these samples, we concluded that the samples of dietary supplements with the ω -3 PUFA content of 40–90% contain these acids in the EE form, and the samples with the content of ω -3 PUFA less than 40% – in the TG form. Therefore, traditional methods of analyzing Raman spectra allow us to evaluate two characteristics of Omega-3 supplements: the form and the relative total content of ω -3 PUFAs.

In order to extract information about the ratio of EPA and DHA contents, the Raman spectra of Omega-3 dietary supplements were analyzed using principal component analysis (PCA). It allows analyzing each spectrum as a whole without selecting particular bands. When applying this method, all the data were initially centered by subtracting the mean spectrum \bar{S} of the training data set from all spectra S_i . After that, a set of principal components (PC) was extracted, and scores were calculated as projections of the centered spectra $\Delta S_i = S_i - \bar{S}$ onto them. In the score space, each spectrum S_i corresponds to a point O_i with coordinates that are the projections of ΔS_i onto the PCs [16]. Their mutual arrangement was analyzed using Hotelling's T^2 distribution with the establishment of regions into which points corresponding to samples of a certain group are included with a specified probability. The results of the PCA largely depend on the way the training set of spectra was built and on the selection of the analyzed PCs.

Fig. 6 shows the results of PCA applied to the entire set of Raman spectra of the Omega-3 supplements studied in this work. In this case, spectral range from



этой характеристики БАД. Мониторинг частоты валентного колебания C=O связей ($\nu(\text{C}=\text{O})$) позволяет различать формы ПНЖК ω -3: $\nu(\text{C}=\text{O})=1747 \text{ см}^{-1}$ соответствует триглицеридной форме ПНЖК ω -3, $\nu(\text{C}=\text{O})=1738 \text{ см}^{-1}$ – форме этиловых эфиров.

Использование метода главных компонент позволяет расширить возможности спектроскопии КР по диагностике БАД Омега-3. В частности, применение этого метода при анализе спектрального диапазона $540\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$ показало, что третья и четвертая главные компоненты несут информацию о соотношении массовых долей ЭПК и ДГК. Однако для такого анализа необходимо предварительно установить форму ПНЖК ω -3. Таким образом, развитие экспресс-методик спектроскопии КР по определению качества БАД Омега-3 должно строиться на сочетании двух подходов к анализу спектров КР: традиционном подходе, основанном на анализе отдельных спектральных линий, и на применении метода главных компонент.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для развития неразрушающих методов анализа состава и качества растительных масел и БАД на основе омега-3 жирных кислот.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-22-20100, <https://rscf.ru/project/24-22-20100/>.

REFERENCES

1. *Oils and Fats Market Size & Share Analysis – Growth Trends & Forecasts (2024–2029)*. URL: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fats-and-oils-market> [accessed: 07.11.2024].
Анализ размера и доли рынка масел и жиров – тенденции роста и прогнозы (2024–2029 гг.). URL: <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/fats-and-oils-market> [дата обращения: 07.11.2024].
2. **Romantsova S.V., Gladysheva I.V., Vervekina N.V., Nagornov S.A., Liksutina A.P., Romantsova A.A.** Calculation of physical and chemical characteristics of biodiesel fuel. *Science in the central Russia*. 2020 Oct;47(5):105–11. Романцова С. В., Гладышева И. В., Вервекина Н. В., Нагорнов С. А., Ликсутина А. П., Романцова А. А. Расчет физико-химических характеристик биодизельного топлива. *Наука в центральной России*. 2020 Окт. 31;47(5):105–11.
3. *Rossiyskiy rynek BADov 2023. Obzor nishy*. URL: <https://delprof.ru/press-center/open-analytics/rossiyskiy-rynok-badov-2023-obzor-nishi/> [accessed: 07.11.2024].
Российский рынок БАДов 2023. Обзор ниши. URL: <https://delprof.ru/press-center/open-analytics/rossiyskiy-rynok-badov-2023-obzor-nishi/> [дата обращения: 07.11.2024].
4. **Shikh E.V., Makhova A.A.** Long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of diseases in adults and children: a view of the clinical pharmacologist. *Voprosy pitaniia [Problems of Nutrition]*. 2019;88(2):91–100. Ших Е. В., Махова А. А. Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты семейства ω -3 в профилактике заболеваний у взрослых и детей: взгляд клинического фармаколога. *Вопросы питания*. 2019;88(2):91–100.
5. **Burunkova Yu. E.** *Rastitelnye masla: svoystva, tekhnologii polucheniya i khraneniya, oksislitel'naya stabilnost.* 2020. 82 p. Бурункова Ю. Э., Успенская М. В., Самуйлова Е. О. Растительные масла: свойства, технологии получения и хранения, окислительная стабильность. 2020. 82 с.
6. **Zartmann A., Völcker L., Hammann S.** Quantitative analysis of fatty acids and vitamin E and total lipid profiling of dietary supplements from the German market. *Eur Food Res Technol*. 2023;249(4):1035–48.

$540\text{--}1800 \text{ см}^{-1}$ was analyzed. As can be seen in Figure 6, all the studied dietary supplements were separated into two groups. By comparing the wavenumbers of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibration and the groups where the spectra of Omega-3 supplements appeared on the plane of the first and second principal components (PC1 and PC2, Fig. 6), it was found that the separation occurred according to the forms (EE and TG) of the ω -3 PUFAs. For clarity, Fig. 6 shows only the part of the pink ellipse in which all the experimental data are concentrated. It should be noted that Doppel Herz and NOW supplement spectra appeared in different groups, in spite of the fact that their ω -3 PUFA content was almost the same (38 and 40%). Thus, this approach did not provide any new information on the characterization of dietary supplements compared to the data obtained from traditional Raman spectra analysis. For this reason, we excluded the spectral region $1200\text{--}1800 \text{ см}^{-1}$, which is the most sensitive to the form of ω -3 PUFA, from consideration and applied the PCA to the Raman spectra of dietary supplements with the EE form of ω -3 PUFA. According to the information provided by the manufacturers, these supplements differed in the ratio of EPA to DHA masses. Fig. 7 shows the results of PCA applied to the Raman spectra of this group of supplements and to spectral range from $540\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$. As it can be seen in Fig. 7, on the plane of the third and fourth principal components (PC3 and PC4), it was possible to divide the supplements according to the ratio of the EPA/DHA mass contents. The ratio of the EPA/DHA mass contents was about the same in supplements containing ω -3 PUFA in the TG form. Performing a similar analysis for these supplements, we found that none of the points in the PC plane was outside the region in which the spectra of supplements with the ratio of the EPA/DHA mass contents from 1.3 to 1.5 appear with a probability of 95%.

CONCLUSIONS

In this study, we revealed that Raman spectroscopy is a rapid tool to determine the degree of unsaturation (iodine value) of vegetable oils. Namely, the ratio of the peak intensities ($I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)}$) of the Raman band at 1658 см^{-1} and the Raman band assigned to deformation CH_2 vibration ($\delta(\text{CH}_2)$) is proportional to the iodine value in the range of iodine values from 0 to $188 \text{ g}_{\text{iodine}}/100 \text{ g}_{\text{oil}}$. This ratio can be used to determine this important characteristic of vegetable oils. In the case of Omega-3 supplements, traditional methods of analyzing Raman spectra, based on the analysis of individual spectral bands, permit the evaluation of two characteristics: the relative content of all ω -3 PUFAs and their form in the supplement. This rela-



7. **Afanasyeva V. A., Alferov S. V.** The polyunsaturated fatty acids ratio in food oils. News of the Tula state university. *Natural sciences*. 2018;4:76–83.
Афанасьева В. А., Алферов С. В. Определение соотношения полиненасыщенных жирных кислот в пищевых маслах. *Известия ТулГУ Естественные науки*. 2018;4:76–83.
8. **Sharashina A. E.** Opredelenie iodnogo i kislotnogo chisel rastitelnykh masel. *Ratio Nat*. 2022;1(5):5–6.
Шарашина А. Е. Определение йодного и кислотного чисел растительных масел. *Ratio Nat*. 2022;1(5):5–6.
9. **Nechiporenko A. P., Plotnikova L. V., Nechiporenko U. Yu., Melnikova M. I., Uspenskaya M. V.** The study of vegetable oils and their blends by methods of reflection spectroscopy and refractometry. *Scientific journal NRU ITMO Series "Processes and Food Production Equipment"*. 2018;1:3–14.
Нечипоренко А. П., Плотникова Л. В., Нечипоренко У. Ю., Мельникова М. И., Успенская М. В. Исследование растительных масел и их купажей методами инфракрасной спектроскопии отражения и рефрактометрии. *Научный журнал НИУ ИТМО Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2018;1:3–14.
10. **Berezin K. V., Dvoretckii K. N., Chernavina M. L., Novoselova A. V., Nechaev V. V., Antonova E. M. et al.** The Use of Raman Spectroscopy and Methods of Quantum Chemistry for Assessing the Relative Concentration of Triglycerides of Oleic and Linoleic Acids in a Mixture of Olive Oil and Sunflower Seed Oil. *Opt. Spectrosc.* 2018;125(3):311–6.
Березин К. В., Дворецкий К. Н., Чернавина М. Л., Новоселова А. В., Нечаев В. В., Антонова Е. М. и др. Применение КР-спектроскопии и методов квантовой химии для оценки относительного содержания триглицеридов олеиновой и линолевой кислот в смеси оливкового масла и масла семян подсолнечника. *Журнал технической физики*. 2018;125(9):297.
11. **Ei-Abassy R. M., Donjack P., Materny A.** Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *J. Raman Spectrosc.* 2009;40(9):1284–9.
12. **Galeev R. R.** State-of-the-art approach to the organisation of quality control for drugs that are in use in the Russian Federation. *Vestnik roszdravnadzora*. 2017;2:41–3.
Галеев Р. Р. Современный подход к организации контроля качества лекарственных средств, находящихся в обращении на территории Российской Федерации. *Вестник Росздравнадзора*. 2017;2:41–3.
13. **Killeen D. P., Marshall S. N., Burgess E. J., Gordon K. C., Perry N. B.** Raman Spectroscopy of Fish Oil Capsules: Polyunsaturated Fatty Acid Quantitation Plus Detection of Ethyl Esters and Oxidation. *J. Agric Food Chem*. 2017;65(17):3551–8.
14. **Spectr-M – izgotovlenie i proizvodstvo pervoklassnykh analizatorov dlya razlichnykh veshchestv.** URL: <https://enspectr.ru/> [accessed: 07.11.2024].
Спектр-М – изготовление и производство первоклассных анализаторов для различных веществ. URL: <https://enspectr.ru/> [дата обращения: 07.11.2024].
15. **GOST 2070-55°.** *Nefteprodukty svetylye. Metod opredeleniya iodnykh chisel i sodержaniya nepredelnykh uglevodorodov.* 1956.
ГОСТ 2070-55°. *Нефтепродукты светлые. Метод определения йодных чисел и содержания непредельных углеводородов.* 1956.
16. **Beattie J. R., Esmonde-White F. W. L.** Exploration of Principal Component Analysis: Deriving Principal Component Analysis Visually Using Spectra. *Appl. Spectrosc.* 2021;75(4):361–75.

АВТОРЫ

С. М. Кузнецов, ORCID: 0000-0002-8378-7085
 В. С. Новиков, ORCID: 0000-0002-3304-1568
 Д. Д. Васимов, ORCID: 0009-0002-8105-0124
 П. К. Лаптинская, ORCID: 0000-0003-1100-0244
 В. В. Кузьмин, ORCID: 0000-0002-2434-1817
 М. Н. Московский, ORCID: 0000-0001-5727-8706
 Е. А. Сагитова, ORCID: 0000-0001-9992-5879; e-mail: lenochek73@mail.ru

ВКЛАД АВТОРОВ

С. М. Кузнецов: дизайн и проведение эксперимента, обработка результатов, обсуждения; В. С. Новиков: проведение эксперимента, обсуждения, предложения и замечания; Д. Д. Васимов: обработка результатов, обсуждения; П. К. Лаптинская: дизайн и проведение эксперимента, обсуждения; В. В. Кузьмин: обработка результатов, обсуждения; М. Н. Московский: организация работы, предложения и замечания; Е. А. Сагитова: идея, обработка результатов, организация работы, обсуждения, предложения и замечания.

tive content was calculated as the ratio of the mass of all the ω -3 PUFAs to the total mass of the fish oil in the supplement. We recommend using the $(I_{1658}/I_{\delta(\text{CH}_2)})$ ratio, which has a linear dependence on the relative ω -3 PUFA content, in order to rapidly estimate this property of the Omega-3 supplements. Raman monitoring the wavenumber of the C=O stretching vibration ($\nu(\text{C}=\text{O})$) allows the differentiation of the forms of ω -3 PUFAs: the triglyceride form is indicated by the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band at 1747 cm^{-1} , while the ethyl ester form is indicated by the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band at 1738 cm^{-1} .

The application of principal component analysis allows for the potential expansion of the diagnostic capabilities of Raman spectroscopy in relation to omega-3 supplements. In particular, the application of this method to the analysis of the spectral range of $540\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ demonstrated that the third and fourth principal components contain the information regarding the ratio of mass fractions of EPA and DHA. However, the form of ω -3 PUFAs must be identified before such analysis. Consequently, the development of rapid methods of Raman spectroscopy to determine the quality of omega-3 supplements should be based on the combination of two approaches to the analysis of Raman spectra: the traditional approach based on the analysis of individual spectral bands and the application of principal component analysis.

The results obtained in this study can be employed in the development of non-destructive analytical techniques for the characterization of the composition and quality of vegetable oils and dietary supplements based on Omega-3 fatty acids.

FUNDING SOURCES

This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-22-20100, <https://rscf.ru/project/24-22-20100/>.

AUTHORS

S. M. Kuznetsov, ORCID: 0000-0002-8378-7085
 V. S. Novikov, ORCID: 0000-0002-3304-1568
 D. D. Vasimov, ORCID: 0009-0002-8105-0124
 P. K. Laptinskaya, ORCID: 0000-0003-1100-0244
 V. V. Kuzmin, ORCID: 0000-0002-2434-1817
 M. N. Moskovsky, ORCID: 0000-0001-5727-8706
 E. A. Sagitova, ORCID: 0000-0001-9992-5879; e-mail: lenochek73@mail.ru

CONTRIBUTION OF THE AUTHORS

S. M. Kuznetsov: design and conduct of the experiment, processing of results, discussions; V. S. Novikov: conducting the experiment, discussions, suggestions and comments; D. D. Vasimov: processing of results, discussions; P. K. Laptinskaya: design and conduct of the experiment, discussions; V. V. Kuzmin: processing of results, discussions; M. N. Moscow: organization of work, suggestions and comments; E. A. Sagitova: idea, processing of results, organization of work, discussions, suggestions and comments.