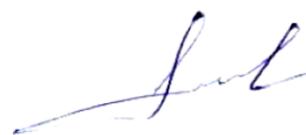


На правах рукописи



Балаева Шамсият Абдулмеджидовна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАВ В ПЛОДАХ РАСТОРОПШИ
ПЯТНИСТОЙ [*Silybum marianum* (L) Gaertn.], ДИКОРАСТУЩЕЙ В
РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВЕННО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОНАХ**

1.4.2 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Краснодар
2022

Работа выполнена на кафедре аналитической и фармацевтической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет»

Научный руководитель: **Рамазанов Арсен Шамсудинович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Боголицын Константин Григорьевич**
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой теоретической и
прикладной химии ФГАОУ ВО «Северный
(Арктический) федеральный университет
им. М.В. Ломоносова»

Коробкова Виктория Васильевна
кандидат химических наук, доцент кафедры
аналитической химии ФГБОУ ВО «Кубанский
государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «**Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова**»

Защита диссертации состоится 7 июля 2022 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 24.2.320.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «КубГУ», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <https://vak.minobrnauki.gov.ru/> и ФГБОУ ВО «КубГУ» <http://www.kubsu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Расторопша пятнистая *Silybum marianum* (L) Gaertn. (РП) – уникальный представитель семейства сложноцветных за счет содержания большого перечня биологически активных веществ (БАВ). Она является источником флаволигнанов - единственных природных гепатопротекторов, используемых при лечении заболеваний печени. Важным компонентом плодов РП является также жирное масло с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, которые нашли свое применение в дерматологии и косметологии. Шрот плодов РП содержит протеиногенные аминокислоты и минеральные вещества, благодаря чему его добавляют для улучшения биологической ценности хлебобулочных изделий.

В России и других странах РП культивируют для получения лекарственного растительного сырья. В зависимости от генотипических и фенотипических факторов - сорта, места произрастания, климатических и иных условий возделывания, качественный и количественный состав БАВ в РП и продуктах их переработки может меняться. Республика Дагестан (далее Дагестан) расположена в трех почвенно-климатических зонах - горной, предгорной и равнинной. Вегетационный период роста и развития РП в Дагестане составляет 200-240 дней. Равнинная почвенно-климатическая зона располагается на высоте от -28 до 200 м и занимает площадь 2,35 млн. га (43,3 % территории Дагестана). Из-за сухости климата в равнинных районах северного Дагестана мало рек, на юге вдоль Каспийского моря и в Прикаспийской низменности климат субтропический полусухой. Предгорная почвенно-климатическая зона располагается на высоте от 200 до 1000 м и занимает площадь 0,84 млн.га (15,8 % территории Дагестана). На этой территории, из-за влияния высоты и Каспийского моря, климат более умеренный и влажный, чем на равнине. Горная почвенно-климатическая зона располагается на высоте выше 1000 м и занимает площадь 2,12 млн.га (39,9 % территории Дагестана), где климат умеренно прохладный. Самый влажный период в горных районах протекает с конца весны до лета. В высокогорьях лето прохладное, а в долинах и котловинах — теплое.

Являясь достаточно привлекательным для получения лекарственного растительного сырья, с аналитической точки зрения (идентификация и определение БАВ) РП дикорастущая в различных почвенно-климатических зонах мало изучена. Литературные данные о химическом составе и различиях в компонентном составе плодов РП носят весьма отрывочный и противоречивый характер.

Цель диссертационной работы - идентификация и определение БАВ (жирное масло, белки, флаволигнаны, витамины, углеводы) в плодах РП,

дикорастущей в различных почвенно-климатических зонах (на примере Дагестана).

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

- изучение и оптимизация условий экстракции жирного масла из плодов РП различными методами;
- установление числовых показателей и жирнокислотного состава масла РП;
- определение содержания флаволигнанов, белков, углеводов, витаминов и минерального состава в плодах РП;
- установление хроматографического профиля аминокислот, флаволигнанов, витаминов в плодах РП;
- изучение теплофизических свойств жирного масла, выделенного из плодов РП.

Научная новизна. Хроматографическими методами идентифицированы и установлены жирно-кислотный и витаминный составы масла, в составе флаволигнанов идентифицированы и определены силибин, силикрестин и силидианин в плодах РП, выращенной в различных почвенно-климатических зонах.

Установлена зависимость концентрации БАВ в плодах РП от почвенно-климатических условий: содержание жирного масла и белка повышалось с уменьшением температуры воздуха, ростом количества атмосферных осадков и влажности почвы на месте произрастания, а содержание углеводов и флаволигнанов в исследованных образцах находилось в обратной зависимости от содержания жирного масла.

Предложена математическая модель сверхкритической флюидной экстракции масла из плодов РП в зависимости от давления, температуры и времени.

Практическая значимость. Установленная вариативность содержания БАВ в плодах РП может быть использована для оценки биологической, биохимической, диетологической и пищевой ценности сырья в зависимости от почвенно-климатических условий произрастания сырья.

По теплофизическим свойствам выделенного из плодов РП жирного масла предложен алгоритм установления его подлинности.

Положения, выносимые на защиту:

- методики и результаты определения общего содержания жирного масла, белка, флаволигнанов, углеводов, витаминов в плодах дикорастущей РП;
- результаты экстракционного извлечения БАВ из плодов РП различными методами;
- математическая модель сверхкритической флюидной экстракции масла из плодов РП в зависимости от давления, температуры и времени;

- методики идентификации и количественного определения БАВ в плодах РП;

- алгоритм установления подлинности выделенного из плодов РП жирного масла по теплофизическим свойствам масла РП.

Апробация работы. Результаты работы доложены на: Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию фармацевтического факультета ДМГУ (Махачкала, 2019); X Научно-практической конференции «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» с международным участием (Ростов-на-Дону, 2019); XIII - XV Международных научно-практических конференциях «Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии» (Астрахань, 2019, 2020, 2021); Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» с международным участием (Барнаул, 2020); IV Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (Краснодар, 2020); VI Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2021), Международной научно-практической конференции "Химия, экология и рациональное природопользование" (Магас, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 7 статей в журналах перечня ВАК и 11 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа выложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 33 таблиц и 22 рисунка, состоит из введения, литературного обзора, 5 разделов экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы из 190 наименований.

Личный вклад автора состоял в постановке задач исследования, выполнении экспериментальной части работы, подготовке публикаций, докладов и выступлений на конференциях, практической апробации результатов. Интерпретация полученных данных и формулировка выводов проводились совместно с научным руководителем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследования.

В первой главе представлен обзор литературы по исследованию и идентификации основных классов БАВ, содержащихся в плодах РП, и их фармакологической активности. Анализируются различные способы экстракционного извлечения БАВ из растительного сырья под действием

различных физических и химических факторов, обсуждаются их преимущества и недостатки. Обобщены имеющиеся данные по определению и идентификации БАВ в плодах РП. На основе анализа литературных данных обоснован выбор методов анализа для определения химического состава изучаемого объекта.

В экспериментальной части описаны объекты исследования, реактивы и материалы, научное оборудование, а также методики исследования растительных материалов и продуктов на их основе.

Для проведения экспериментальных исследований использовали стандартные образцы БАВ чистотой $\geq 85\%$. Для определения метиловых эфиров жирных кислот использовали стандартный раствор смеси 37 метиловых эфиров жирных кислот «Supelco 37 Component FAME Mix»; аминокислотного состава белка - стандартный образец аминокислот фирмы «Sykam GmbH»; флаволигнанов - раствор СО силибина фирмы «Sigma-Aldrich»; витаминов - смесь СО тиамин хлорида, никотиновой кислоты, никотиамида, пантотеновой кислоты, цианокобаламина, фолиевой кислоты, биотина, пиридоксина и рибофлавина фирмы «Эколан».

Все реактивы, использованные в экспериментальных исследованиях, имели квалификацию «осч.» или «хч.».

Объектами исследования были плоды дикорастущей РП, заготовленные в Сулейман Стальском, Кайтагском, Магарамкентском, Левашинском и Кулинском районах Дагестана в период 2017-2020 г.г.

Научное оборудование. Исследования проводили с использованием: лабораторной экстракционной системы модели SFE 1000M1-2-FMC 50, «Waters Corporation», США; спектрофотометра SPECORD 210 Plus BU, «Analytik Jena», Германия; газового хроматографа Agilent Technologies 7820A GC System Maestro с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 Series MSD; жидкостного хроматографа LC-20 Prominence компании «Shimadzu» с спектрофотометрическим детектором на основе диодной матрицы SPD-M20A; прибора синхронного термического анализа STA 449 F3 Jupiter фирмы «NETZSCH», Германия; системы микроволновой минерализации TOPware компании «Analytik Jena», Германия; установки для разложения белка Turbotherm компании «Gerhardt», Германия, атомно-абсорбционного спектрометра Contra AA 700 «Analytik Jena», Германия, терморектора «Термион» и анализатора жидкости «Флюорат-02-5М» компании «Люмекс», Россия.

Содержания БАВ в плодах дикорастущей расторопши пятнистой

Условия произрастания изученных образцов РП в выбранных районах характеризуются различными высотами над уровнем моря, климатическими условиями и почвенным составом (табл. 1).

Таблица 1 - Условия и район произрастания расторопши пятнистой

Условия произрастания	Район сбора - Дагестан				
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	С. Стальский	Кайтагский
Высота над уровнем моря, м	2066	1593	532	480	408
Тип почвы	Горно-луговой	Горно-каштановый	Бурый-лесной	Горно-луговой	Аллювиально-луговой
рН почвы	6.0÷6.1	7.0÷7.3	6.5÷7.0	5.4÷6.0	7.0÷7.5
Содержание гумуса в почве, %	6.5	6.5	5	4.5	5
Содержание Na, мг-экв/100г почвы	0.2-0.7	0.01	1.6-2.2	-	0.98-2.00
Содержание K, мг-экв/100 г почвы	1.9-2.7	27-37	9-27	10.2-21.5	1.5-2.9
Содержание Mg, мг-экв/100г почвы	2.8-6.3	4.6-8.1	0.8-3.4	4.0-9.0	2.6-8.4
Содержание Ca, мг-экв/100г почвы	7.2-17.7	14.2-18.2	4.2-15.4	3.0-23.0	14.6-19.3
Средняя дневная температура воздуха, °С	20	24	25	25	26
Амплитуда температуры °С	38	35	36	37	35
Сумма осадков, мм	515	332	128	123	59
Влажность воздуха, %	55	52	50	49	45
Количество солнечных дней	46	73	77	77	68
Сумма активных температур, °С	2173	2746	3005	3168	3111
Гидротермический коэффициент (ГТК)	2.4	1.2	0.4	0.4	0.2

Высушенные воздушно-теневым способом плоды РП представляли собой семянки длиной 5-7 мм, шириной 2-4 мм, массой 21±1 мг, черного или коричневого цвета с черными вкраплениями. Суммарное содержание БАВ в плодах определяли по методикам Государственной Фармакопеи 13 издания (табл. 2).

Таблица 2 – Суммарное содержание БАВ в плодах дикорастущей расторопши пятнистой (n=3, p=0.95)

Район сбора	Содержание БАВ, %			
	Жирное масло	Белки	Углеводы	Флаволигнаны
Кулинский	29.7±0.1	13.8±0.3	34.5±0.2	3.4±0.1
Левашинский	28.2±0.2	13.4±0.2	34.0±0.3	3.6±0.1
Магарамкентский	27.9±0.2	12.5±0.1	36.2±0.5	3.8±0.2
С - Стальский	27.1±0.3	12.8±0.2	37.8±0.1	4.0±0.1
Кайтагский	26.0±0.2	12.8±0.2	38.4±0.2	3.8±0.2

С понижением температуры воздуха, ростом количества атмосферных осадков и влажности почвы содержание жирного масла в растениях возрастает. Наибольшие содержания жирного масла и белка выявлены в плодах РП, собранных в Кулинском районе, средние - Левашинском и наименьшие - С. Стальском и Кайтагском районах. Данный факт, по-видимому, связан с увеличением суммы активных температур и снижением суммы осадков в этих районах (табл. 1 и 2). Концентрация углеводов в исследуемых образцах плодов РП находится в обратной зависимости от содержания жирного масла, так как углеводы служат материалом для синтеза жирного масла. Максимальное содержание флаволигнанов наблюдали в образцах плодов РП, собранных в С. Стальском и Кайтагском районах, где выпадало наименьшее количество осадков, среднее в Левашинском и наименьшее в Кулинском районе.

Экстракция жирного масла из плодов расторопши пятнистой

Для извлечения жирного масла из растительного сырья используются различные способы. Метод горячего отжима не позволяет в полном объеме извлечь масло, ухудшает его качество, так как требуется предварительное нагревание, приводящее к прогорканию и окислению высших полиненасыщенных карбоновых кислот. При экстракции масла из плодов РП органическими растворителями (петролейный эфир, гексан, ацетон, хлороформ и т.д.) достигается максимальный выход масла. Но остаточное содержание органических растворителей, ухудшает его качество, масло становится непригодным для внутреннего применения, что ограничивает использование этого метода.

Перспективным способом обезжиривания плодов РП представляется СКФЭ-СО₂. Проведенные исследования показали, что метод позволяет получить натуральное масло в одну технологическую стадию за 1-2 часа. Для сравнения,

обезжиривание растительного сырья экстракцией органическим растворителем достигается в течение 12 часов.

Изучили влияние размера фракции и условий СКФЭ-СО₂ на выход и состав жирного масла в зависимости от давления, температуры и продолжительности экстракции.

Для математического описания процесса извлечения масла СКФЭ-СО₂ из фракции 0.1-1.0 мм плодов РП составили и реализовали полнофакторный рототабельный униформ-план второго порядка. Полученная математическая модель адекватно описывает зависимость выхода (W) масла из плодов РП от давления (x), температуры (y) и времени (z):

$$W = 18.46 + 2.69x + 0.78y + 0.95z + 0.96xy - 0.47yz - 0.32x^2 - 0.14y^2 + 0.16z^2$$

С использованием программы Wolfram Mathematica провели анализ полученного регрессионного уравнения, рассчитали оптимальные значения переменных факторов, соответствующих максимальному выходу масла из плодов РП (26.4 %), которые составили: давление - 418 бар, температура - 70 °С, время - 140 мин. Подтверждающий эксперимент в оптимальных условиях экстракции показал выход масла 26.0 %.

Анализ поверхности отклика функции выход масла из плодов расторопши пятнистой на изменение давления и температуры (рис. 1) показал, что в области малых давлений с ростом температуры выход экстракта снижается, а в области высоких давлений рост температуры повышает выход экстракта.

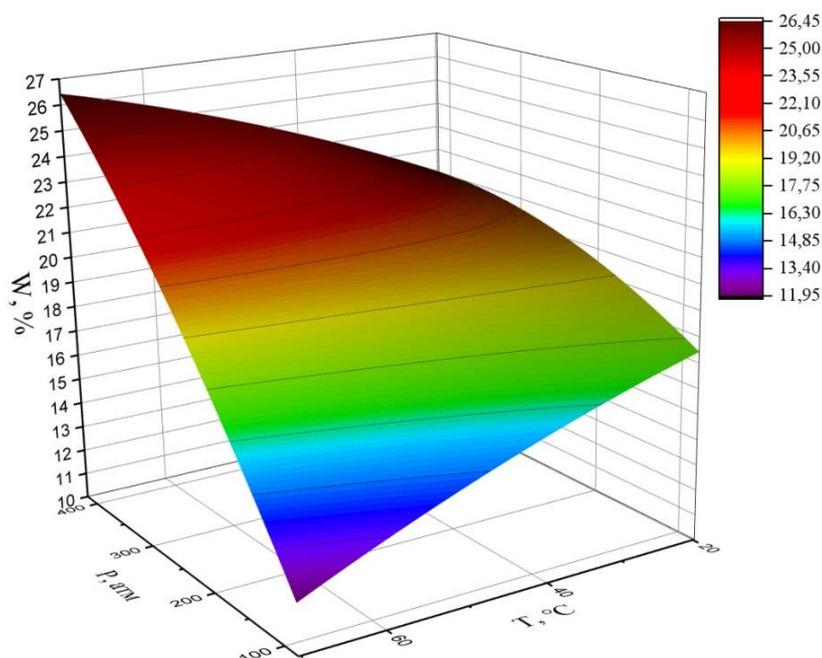


Рисунок 1 – Анализ поверхности отклика функции выход масла из плодов расторопши пятнистой (W) на изменение давления и температуры при времени экстракции 140 мин.

Идентификация и определение БАВ в жирном масле плодов расторопши пятнистой

Перед определением жирно-кислотного состава масла триглицериды кислот переводили в метиловые эфиры раствором метилата натрия в метаноле. Хроматографическую идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе Agilent Technologies 7820A GC System Maestro, оснащённом масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 Series MSD с ионизацией электронным ударом, энергия ионизации 70 эВ, использовали кварцевую капиллярную колонку с малополярной неподвижной фазой HP – 5ms 30м × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм. Условия анализа - температура 185 °С, 50 мин. Изотерма, температура детектора и интерфейса испарителя 250 °С, газ носитель гелий, 1см³/мин (постоянный расход); проба 0.5 мкл с делением потока (Split 1:40). Хроматограф отградуирован стандартным раствором метиловых эфиров жирных кислот. Идентификацию зарегистрированных соединений (рис. 2) осуществляли по временам удерживания пиков на хроматограммах исследуемого образца и стандартного раствора метиловых эфиров, а также сравнением экспериментальных масс-спектров с библиотечными масс-спектрами Wiley 275 и NIST 14 (табл. 3). Количественное определение жирных кислот C₁₄–C₂₀ проводили по площадям соответствующих пиков по полному ионному току (табл.3).

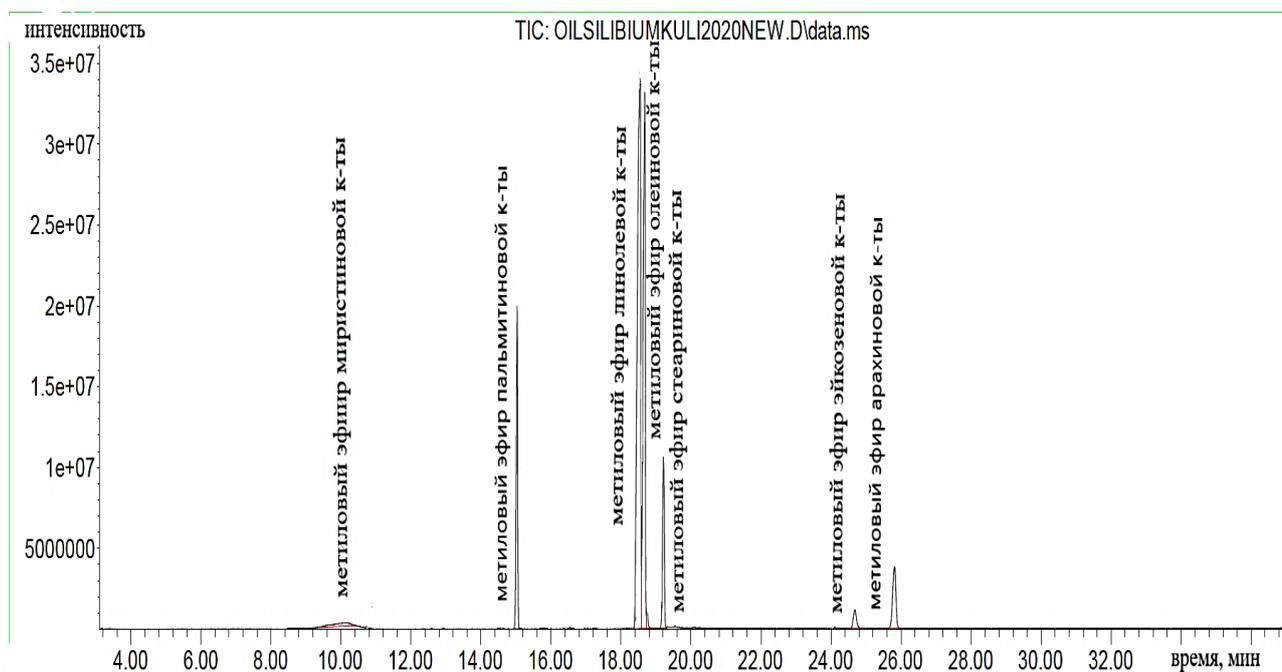


Рисунок 2 - Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой.

Таблица 3 - Масс-спектральные данные метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой

Время выхода, мин.	Компонент	Масс-спектр, масса/ интенсивность
10.509	Метиловый эфир миристиновой кислоты	74/999, 87/651, 55/213, 143/178, 75/165, 69/114, 57/111, 199/107, 59/86, 83/65
15.034	Метиловый эфир пальмитиновой кислоты	74/999, 87/691, 55/215, 75/190, 143/177, 57/130, 69/123, 227/111, 59/80, 83/77
18.638	Метиловый эфир линолевой кислоты	67/999, 81/884, 95/626, 55/592, 82/477, 79/424, 68/420, 96/402, 54/327, 69/313
18.679	Метиловый эфир олеиновой кислоты	55/999, 69/720, 74/654, 83/586, 97/540, 96/538, 84/507, 87/497, 67/459, 81/441
19.211	Метиловый эфир стеариновой кислоты	74/999, 87/716, 55/236, 75/225, 143/221, 57/167, 69/145, 255/141, 298/119, 83/98
24.678	Метиловый эфир эйкозеновой кислоты	55/999, 69/601, 74/514, 83/466, 97/445, 87/435, 96/385, 67/326, 84/323, 57/319
25.818	Метиловый эфир арахидиновой кислоты	74/999, 87/750, 75/264, 55/247, 143/221, 57/194, 69/160, 326/140, 283/116, 83/109

ВЭЖХ-определение жирорастворимых витаминов проводили после щелочного гидролиза образца масла. Условия анализа: колонка C18 (250×4.8 мм, 5мкм), режим градиентного элюирования (элюент: А – вода, Б- метанол), со скоростью потока 1.5 см³/мин, температура термостатирования колонки 40°C и спектрофотометрическое детектирование при 280 и 328 нм, проба 20 мкл (рис.3). Идентификацию витаминов в масле проводили сравнением времен выхода пиков на хроматограммах раствора смеси стандартных образцов витаминов и экстракта исследуемого образца в н-гексане.

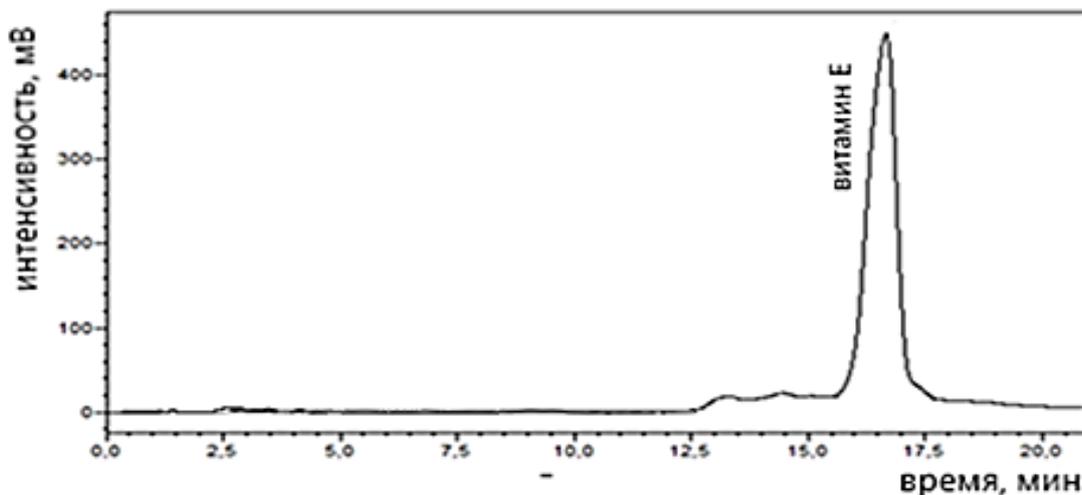


Рисунок 3 – Хроматографический профиль жирорастворимых витаминов в гексане масла плодов расторопши пятнистой.

Основными компонентами масла из плодов РП оказались линолевая (омега-6) и олеиновая (омега-9) кислоты, на долю которых в полученном СКФЭ-СО₂ приходило более 86 % от содержания идентифицированных жирных кислот. Из жирорастворимых витаминов идентифицировали только витамин Е, концентрация которого в масле с применением СКФЭ несколько выше, чем полученном экстракцией н-гексаном (табл.4).

Таблица 4 – Концентрации жирных кислот и жирорастворимых витаминов в экстрактах, полученных различными методами экстракции, (Кулинский район, 2019) (n=3, p=0.95)

Метод экстракции	СКФЭ-СО ₂	Экстракция н-гексаном
Наименование кислоты	Содержание жирных кислот, %	
Миристиновая (С14:0)	0.16±0.04	0.15±0.05
Пальмитиновая (С16:0)	8.4±0.5	11±1
Линолевая (С18:2)	57±1	56.4±0.7
Олеиновая (С18:1)	29±1	26±1
Стеариновая (С18:0)	3.6±0.5	4.9±0.8
Эйкозеновая (С20:1)	0.7±0.5	0.5±0.3
Арахидиновая (20:0)	1.1±0.5	1.2±0.7
Σ ненасыщенных	87±3	83±4
Σ насыщенных	13±2	17±3
Содержание витамина, мг/кг		
витамин Е	53±3	49±2
витамин А	менее 0.5	менее 0.5
витамин Д	менее 0.5	менее 0.5

Теплофизические свойства масла расторопши пятнистой

Теплофизические свойства образцов масел РП методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) определяли в диапазоне температур от -150 до +20 °С при скорости нагрева 5 град/мин. Систему охлаждали жидким азотом со скоростью охлаждения 1 град/мин для исключения рекристаллизации (холодной кристаллизации). Измерения выполняли в атмосфере гелия (расход продувочного газа 10 см³/мин, расход защитного газа 10 см³/мин). Точность измерения температуры составляла ±0.3 °С. Для повышения информативности термограмм, полученных методом ДСК, использовали программный расчет вторых производных кривых плавления ДСК и разделение суперпозиции плохо

разделенных пиков тепловых эффектов в программе NETZSCH Peak Separation по алгоритму General (рис.4).

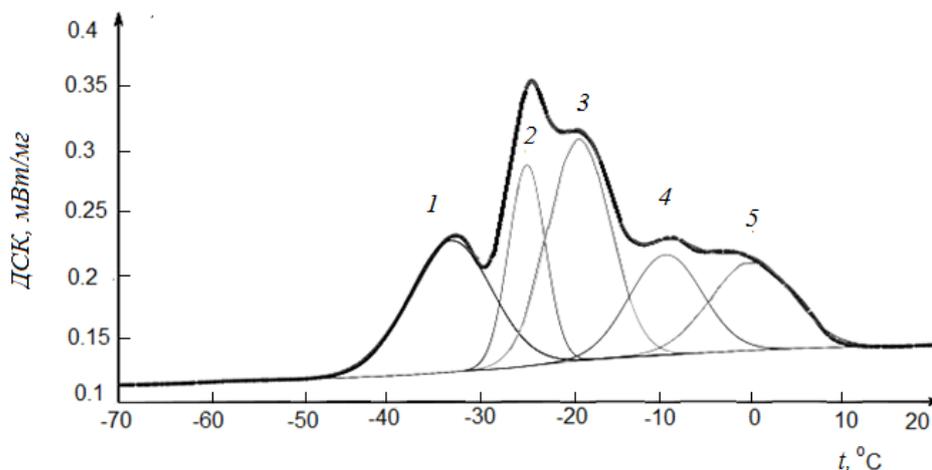


Рисунок 4 - Профиль плавления масла рапсорпши пятнистой с использованием программно-разделенных пиков, полученный методом ДСК (Кулинский район).

Для серии образцов масла на термограммах ДСК установили характеристические максимумы эндотермических эффектов в диапазонах от -37.6 до -31.1°C (T_1), от -27.6 до -23.8°C (T_2), от -19.9 до -14.4°C (T_3), от -13.5 до -4.2°C (T_4) и от -4.7 до -1.2°C (T_5) и рассчитали площади этих пиков (рис. 5).

Максимум эффекта при T_1 отнесли фракции триненасыщенных триацилглицеринов, имеющих самые низкие $T_{\text{пл}}$. Наиболее выраженные эффекты при T_2 и T_3 формировала смесь фракций триненасыщенных и диненасыщенных, мононасыщенных триацилглицеринов. Эффекты T_4 и T_5 образуются при плавлении фракций мононенасыщенных и триненасыщенных триацилглицеринов. Анализ температурных превращений серии образцов подлинного масла дикорастущей РП позволил экспериментально установить диапазоны изменения его теплофизических параметров.

Установили, что на положение максимумов эндотермических пиков (T_i) и их площади (S_i) оказывают влияние фенотипические факторы – совокупность условий произрастания сырья (высота над уровнем моря, содержание гумуса в почве, количество осадков и солнечных дней в течение года).

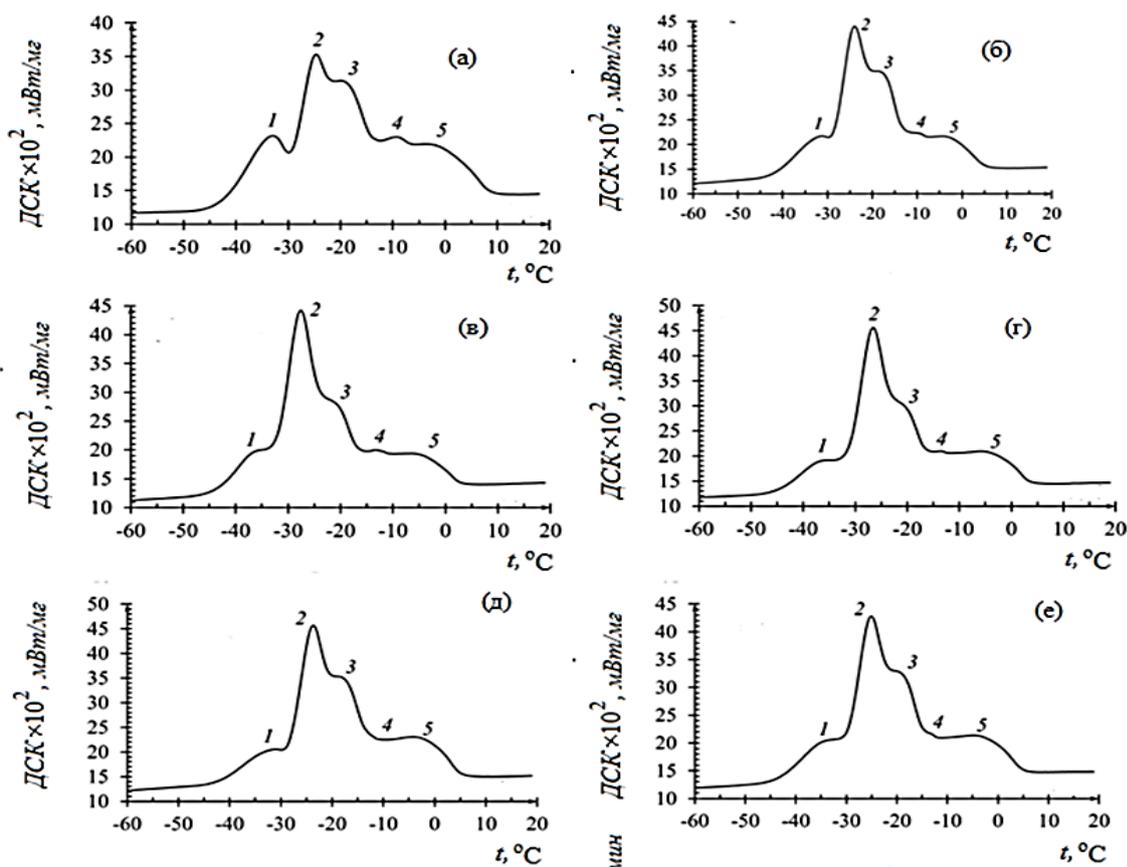


Рисунок 5 - Профили плавления масел рапсоропши пятнистой, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии. (а) – Кулинский район; (б) – Левашинский район; (в) – Сулейман Стальский район; (г) – Кайтагский район; (д) – Магарамкентский район; (е) – смесь со всех районов Дагестана; 1–5 – эндотермические максимумы

Выполненные исследования подтверждают тот факт, что фазовые переходы растительного масла взаимосвязаны с определенным фракционным составом триацилглицеринов, который варьирует при изменении фенотипических факторов в довольно широких диапазонах, но не случайным образом, а в соответствии с генотипом и природными закономерностями созревания растительного сырья. Найденные корреляции между тепловыми эффектами в образцах жирного масла РП и климатическими условиями произрастания сырья могут быть полезными не только с точки зрения термического анализа, но и для химии растительного сырья, биохимии и фармакогнозии.

Анализируя профиль плавления масла рапсоропши пятнистой с использованием программно-разделенных пиков, представляется возможным контроль методом ДСК подлинности масла РП и его происхождения.

Идентификация и определение флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой

Суммарное содержание флаволигнанов в плодах РП определяли спектрофотометрически с использованием спиртового раствора стандартного образца силибина. Содержание флаволигнанов в плодах РП, в зависимости от зоны сбора, колебалось от 3.3 до 4.0 % (табл. 2). Разделение изомеров флаволигнанов проводили методом ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования на колонке Luna C18 100A 250 (длина)×2.0 (диаметр) мм, 5 мкм (зернение) (рис. 6). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил (А) и воду, содержащую 0.1 % муравьиной кислоты (В). Скорость потока подвижной фазы составляла 0.35 см³/мин, температура колонки 30 °С, объем пробы – 5 мкл. Детектирование компонентов осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне 190–800 нм. Идентификацию проводили путем сопоставления хроматографических параметров соединений с аналогичными данными, полученными для стандартных образцов.

Концентрации силибина, силикрстина и силидианина в спиртовых экстрактах рассчитывали по площадям соответствующих пиков относительно силибина.

В зависимости от способности накапливать силибин или силидианин, РП относят к силибиновой или силидианиновой хеморасе. Содержание силидианина в произрастающей в Дагестане РП более чем два раза выше содержания силибина (табл. 5), что позволяет ее отнести к силидианиновой расе.

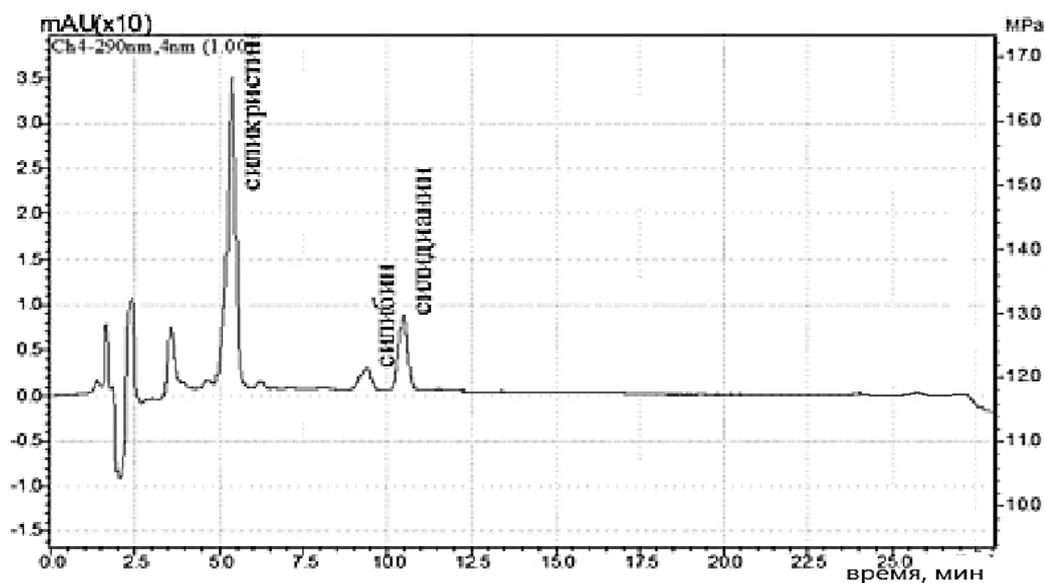


Рисунок 6 - Хроматографический профиль спиртового извлечения плодов расторопши пятнистой.

Таблица 5 - Содержание изомеров флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой (n=3, p=0.95)

Флаволигнаны	Содержание, %
Силикристин	1.7±0.1
Силибин	0.17±0.05
Силидианин	0.5±0.1

Идентификация и определение аминокислот в плодах расторопши пятнистой

Аминокислотный состав белков плодов РП изучали методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином и спектрофотометрическим детектированием фиолетовых аддуктов аминокислот при 570 нм и желтого аддукта пролина при 440 нм (рис.7).

Идентификацию аминокислот в белке плодов РП проводили по временам удерживания с использованием стандартного образца аминокислот фирмы Sykam GmbH. В растворы стандартного и анализируемого образцов аминокислот добавляли внутренний стандарт норлейцина. В белках плодов РП идентифицировали и определили 18 аминокислот, входящие в состав белка-эталона, в том числе триптофан, цистеин и пролин, о которых в литературных источниках отсутствовала информация (табл. 6).

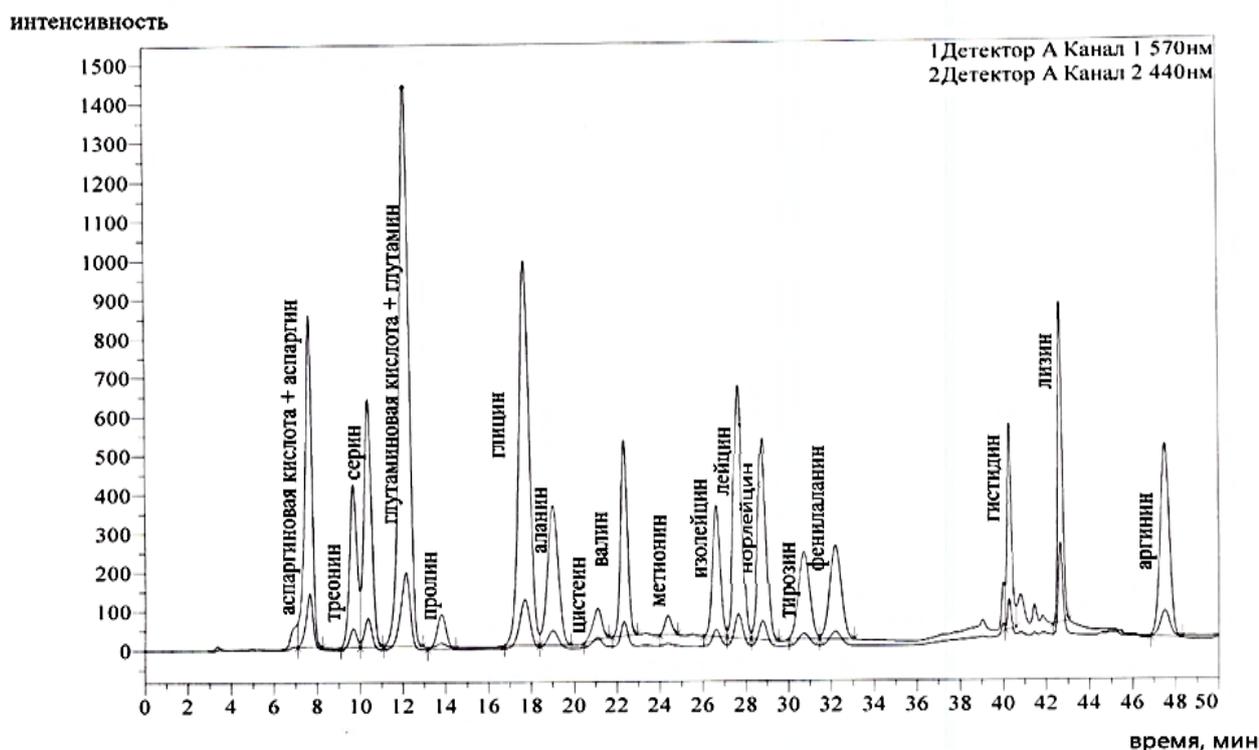


Рисунок 7 - Хроматограмма аминокислот белка плодов расторопши пятнистой.

Таблица 6 - Содержание аминокислот в белке плодов расторопши пятнистой (n=3, p=0.95)

Название кислоты	Массовая доля в белке, %				
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	С.Стальский	Кайтагский
Аспаргиновая кислота + аспаргин	9.92±0.05	9.60±0.05	10.00±0.04	9.90±0.05	10.30±0.02
Треонин	4.10±0.02	4.13±0.03	4.14±0.05	4.05±0.05	4.21±0.03
Серин	5.61±0.03	5.63±0.03	5.69±0.02	5.56±0.03	5.73±0.02
Глутаминовая кислота + глутамин	21.90±0.03	21.50±0.02	21.80±0.01	21.82±0.02	21.41±0.04
Глицин	6.23±0.02	6.24±0.02	6.01±0.05	6.03±0.07	6.36±0.02
Аланин	4.48±0.05	4.31±0.04	4.30±0.01	4.32±0.03	4.54±0.02
Цистеин	1.30±0.01	1.61±0.04	1.45±0.06	1.50±0.03	1.14±0.05
Валин	5.00±0.02	4.88±0.03	4.88±0.02	4.96±0.05	4.97±0.03
Метионин	0.46±0.05	1.27±0.03	0.58±0.05	0.86±0.08	0.27±0.05
Изолейцин	4.27±0.02	4.10±0.01	4.12±0.02	4.13±0.01	4.24±0.02
Лейцин	6.87±0.03	6.54±0.05	6.62±0.02	6.69±0.06	6.81±0.03
Тирозин	4.03±0.01	4.43±0.02	4.08±0.06	4.07±0.02	4.11±0.05
Фенилаланин	4.25±0.02	4.17±0.03	4.12±0.01	4.29±0.01	4.30±0.02
Гистидин	2.54±0.03	2.43±0.04	2.45±0.06	2.43±0.02	2.55±0.05
Лизин	4.86±0.02	5.26±0.05	5.19±0.04	4.78±0.05	5.13±0.08
Аргинин	9.03±0.02	8.77±0.06	9.42±0.08	9.60±0.07	8.75±0.05
Пролин	4.56±0.02	4.58±0.04	4.56±0.01	4.40±0.02	4.61±0.03
Триптофан	0.63±0.01	0.61±0.01	0.58±0.02	0.62±0.01	0.59±0.02

Таблица 7 - Биологическая ценность белка плодов расторопши пятнистой

Незаменимая аминокислота	Содержание, г/100 г в образцах белка					
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	С. Стальский	Кайтагский	Эталонный
Треонин	4.1	4.1	4.2	4.1	4.1	2.5
Валин	5.0	4.9	5.0	4.9	5.0	4.0
Метионин+ цистеин	1.8	2.9	1.4	2.0	2.4	2.3
Изолейцин	4.3	4.1	4.2	4.1	4.1	3.0
Лейцин	6.8	6.5	6.8	6.6	6.7	6.1
Триптофан*	0.63	0.61	0.59	0.58	0.62	0.66
Фенилаланин +	8.3	8.6	8.4	8.2	8.4	4.1

тирозин						
Лизин	4.9	5.3	5.1	5.2	4.8	4.8
Суммарно	35.7	37.0	35.8	35.8	36.0	27.5
БЦ	49	59	35	60	64	100
U	0.6	0.7	0.5	0.7	0.7	1
ИНАК	1.2	1.3	1.2	1.2	1.3	1

* - лимитирующая аминокислота

Суммарное содержание незаменимых аминокислот во всех образцах выше, чем в эталонном белке (ФАО/ВОЗ 2013) за счет более высоких концентраций треонина, валина, изолейцина, лейцина и лизина (табл. 7). Более высокие концентрации незаменимых аминокислот содержали собранные в Левашинском районе (1593 м над уровнем моря) плоды - 37 г/100 г белка. В белках плодов РП с других районов Дагестана суммарные содержания незаменимых аминокислот оказались менее 36 г. По обобщающему коэффициенту утилитарности (U) аминокислотного состава, биологической ценности (БЦ) и индексу незаменимых аминокислот (ИНАК) наиболее предпочтительными оказались плоды произрастающей на территории Кайтагского района РП (408 м над уровнем моря), чем плоды РП с Магарамкентского района (532 м над уровнем моря).

Идентификация и определение водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой

Содержание водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой дикорастущей определяли методом ВЭЖХ. Для этого навеску образца предварительно заливали 1 % раствором фосфорной кислоты и обрабатывали ультразвуком в течение часа, после чего извлечения фильтровали и снимали хроматографический профиль на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (рис. 8). Для разделения витаминов использован градиентный режим: элюент А – 0.6 % фосфорная кислота, элюент Б – ацетонитрил. Скорость потока элюента 0.8 см³/мин. Температура колонки 20 °С. Прибор был отградуирован по раствору стандартных образцов витаминов фирмы «Эколан».

Идентификацию водорастворимых витаминов в плодах РП проводили по временам их удерживания с использованием стандартных образцов витаминов. Концентрацию витаминов рассчитывали по площадям соответствующих пиков относительно пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов.

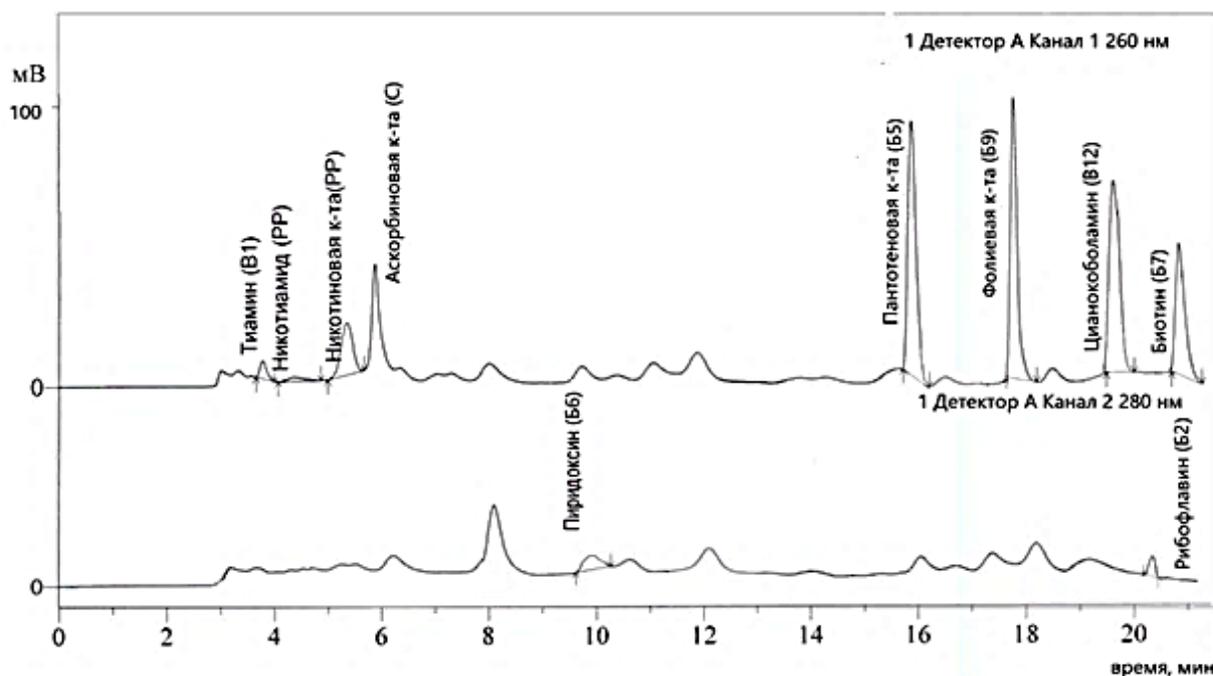


Рисунок 8 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения плодов расторопши пятнистой.

Таблица 8 - Содержание водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой (n=3, p=0.95)

Витамин	Содержание в образцах, мг/ 100 г				
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	С. Стальский	Кайтагский
Аскорбиновая кислота (С)	80±5	78 ±6	65±3	60 ±5	62±6
Тиамин (В1)	0.7±0.2	0.7±0.2	0.6±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1
Рибофлавин (В2)	0.5±0.1	0.5±0.1	0.9±0.2	1.0 ±0.1	2.5±0.2
Пантотеновая к-та (В5)	23±2	21±1	20±1	15.4±0.3	15±1
Пиридоксин (В ₆)	0.2±0.1	0.6±0.2	0.9±0.2	0.2±0.1	0.4±0.2
Биотин (В ₇)	8±2	10±3	11±2	13±1	18±3
Фолиевая к-та (В ₉)	18±1	20±3	21±1	21±1	22±2
Цианокоболамин (В12)	3.1±0.2	2.9±0.2	2.8±0.2	2.6±0.1	2.1±0.1
Никотиновая к-та (РР)	2.5±0.2	3.5±0.4	2.9±0.5	1.4±0.1	1.9±0.3
Никотинамид (РР)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
Сумма	137±11	137±12	116±10	116±9	125±13

Наибольшее содержание водорастворимых витаминов оказалось в плодах РП, собранных в Кулинском и Левашинском районах, наименьшее – Маграмкентском и С.-Стальском районах (табл. 8).

Выводы

1. Методом газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием установили жирно-кислотный состав образцов масел РП, полученных различными условиями извлечения. Основными компонентами полученного сверхкритической флюидной экстракцией диоксидом углерода масла являются ненасыщенные линолевая (омега-6) и олеиновая (омега-9) кислоты (86%). С увеличением количества осадков и уменьшением суммы активных температур при смене почвенно-климатической зоны от предгорного Кайтагского (408 м) до высокогорного Кулинского района (2066 м над уровнем моря) общее содержание ненасыщенных жирных кислот в образцах масла РП снижается.

2. Изучено влияние почвенно-климатических условий на содержание жирного масла и других БАВ в плодах РП дикорастущей. Концентрация жирного масла и белков в плодах РП возрастала с понижением температуры воздуха, ростом количества атмосферных осадков и влажности почвы на месте произрастания. Концентрация углеводов и флаволигнанов в исследуемых образцах находится в обратной зависимости от содержания жирного масла.

3. Методом планирования эксперимента и экспериментально установлены оптимальные условия извлечения жирного масла из плодов РП экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода: давление диоксида углерода 418 атм; температура 70 °С; продолжительность 140 минут при скорости потока диоксида углерода 50 г/мин. Выход пригодного для внутреннего применения натурального масла с улучшенными органолептическими свойствами и высоким содержанием триглицеридов ненасыщенных жирных кислот составил 26 мас. %.

4. Методом ионообменной хроматографии идентифицировали и определили 18 аминокислот в составе белка РП, включая незаменимые аминокислоты, доля которых в белке составляла более 30 %. По формальным показателям биологической ценности белок плодов РП дикорастущей сопоставим с белком озимых сортов пшеницы и ржи, и превосходит белок шрота подсолнечника.

5. Суммарное содержание флаволигнанов в плодах РП дикорастущей колебалось в диапазоне 3.3 – 4.0 %. Методом ВЭЖХ в составе флаволигнанов идентифицировали и определили силибин, силикристин и силидианин, которые составили 0.17 ± 0.05 , 1.7 ± 0.1 и $0.5 \pm 0.1\%$, соответственно. С учетом соотношений концентраций силидианина и силибина, произрастающая в Дагестане РП дикорастущая относится к силидианиновой расе.

6. Методом ВЭЖХ идентифицировали и определили 9 водорастворимых витаминов (тиамин (В₁), рибофлавин (В₂), пиридоксин (В₆), биотин (В₇), цианокоболамин (В₁₂), никотиновая кислота и никотинамид (РР), пантотеновая (В₅), фолиевая (В₉), аскорбиновая (С) кислоты) в плодах РП. Можно отметить, что с учетом содержания аскорбиновой, фолиевой, пантотеновой кислот и биотина в 100 г плодов РП, данный продукт может обеспечить суточную потребность человека.

7. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии изучены теплофизические свойства жирного масла РП дикорастущей, позволивший выявить тенденции в изменении жирнокислотного и триглицеридного состава масла РП в зависимости от почвенно-климатических условий места произрастания растения. Показана возможность установления подлинности масла РП по теплофизическим свойствам.

Основное содержание диссертационной работы изложено в публикациях:

1. Рамазанов, А. Ш. Химический состав плодов и масла расторопши пятнистой, произрастающей на территории Республики Дагестан / А. Ш. Рамазанов, Ш. А. Балаева, К. Ш. Шахбанов // Химия растительного сырья. – 2019. – № 2. – С. 113-118.

2. Рамазанов, А. Ш. Аминокислотный состав плодов расторопши пятнистой, произрастающей на территории Республики Дагестан / А. Ш. Рамазанов, Ш. А. Балаева // Химия растительного сырья. – 2020. – № 3. – С. 215-223.

3. Рамазанов, А. Ш. Экстракция жирного масла из плодов расторопши пятнистой сверхкритическим диоксидом углерода / А. Ш. Рамазанов, Ш. А. Балаева // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2020. – Т. 15. – № 4. – С. 49-58.

A. Sh. Ramazanov, B, Sh. A. Balaeva. Extraction of Fatty Oil from Milk Thistle Fruits with Supercritical Carbon Dioxide // Russian Journal of Physical Chemistry B. - 2021, Vol. 15, No. 7, pp. 1–8.

4. Дифференциальная сканирующая калориметрия как метод контроля подлинности масла дикорастущей расторопши пятнистой / О. Б. Рудаков, И. А. Саранов, Ш. А. Балаева, А. Ш. Рамазанов, Я. О. Рудаков // Журнал аналитической химии. – 2021. Т. 76, № 12. – С.1137-1145.

Rudakov O. B., Saranov I. A., Balaeva Sh. A., Ramazanov A. Sh. and Rudakov Ya.O. Differential Scanning Calorimetry as a Method for Controlling the Authenticity of Wild Milk Thistle Oil // Journal of Analytical Chemistry, 2021, Vol. 76, No. 12, pp. 1468–1475. DOI: 10.1134/S1061934821100099.

5. Влияние климатических условий республики Дагестан на содержание жирного масла и других биологически активных веществ в плодах расторопши пятнистой / А.Ш. Рамазанов, Ш.А. Балаева, О.Б. Рудаков, И.А. Саранов // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 207-215.

6. Определение белковой ценности плодов расторопши пятнистой, произрастающей в Республике Дагестан / А.Ш. Рамазанов, Ш.А. Балаева, О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2021. № 5. – С. 697-707.

7. Применение метода дифференциальной сканирующей калориметрии при исследовании свойств масличного сырья и продуктов его переработки на примере расторопши пятнистой / И.А. Саранов, О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, А.Ш. Рамазанов, Ш.А. Балаева, Д.С. Киселев // Вестник ВГУИТ. - 2021. №2. - С.208-2016.

8. Балаева, Ш. А. Расторопша пятнистая, дикорастущая в Дагестане, перспективный источник биологически активных веществ / Ш. А. Балаева, А. Ш. Рамазанов // Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии: Материалы научн. трудов XIII Междун. научно-практ. конф. Астрахань. 2019 г. – С. 28-30.

9. Балаева, Ш. А. Содержание селена в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaertn, произрастающей на территории Республики Дагестан / Ш. А. Балаева, Г. Магомедова, А. Ш. Рамазанов // Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии: Материалы научн. трудов XIV Междун. научно-практ. конф., Астрахань. 2020 г. – С. 50-53.

10. Балаева, Ш. А. Зависимость выхода масла расторопши пятнистой от степени измельчения плодов и температуры экстракции сверхкритическим диоксидом углерода / Ш. А. Балаева, А. Ш. Рамазанов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием, Барнаул. 2020 г. – С. 171-173.

11. Балаева, Ш. А. Числовые показатели плодов расторопши пятнистой, произрастающей на территории Республики Дагестан // Актуальные вопросы фармации, фармакологии и клинической фармакологии: Сборник материалов Всерос. научно-практ. конф, Махачкала, 24 декабря 2019 года. – С. 27-30.

12. Балаева, Ш. А. Извлечение биологически активных веществ из расторопши пятнистой сверхкритической флюидной экстракцией диоксидом углерода / Ш. А. Балаева, А. Ш. Рамазанов // X Научно-практическая конференция (с международным участием) «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации». г. Ростов-на-Дону. 2019 г.

13. Рамазанов, А.Ш. Применение газожидкостной хроматографии для определения массовой доли жирных кислот в растительных маслах /Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А., Каспарова М.А., Шахбанов К.Ш. // IV Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием. Краснодар. 2020 г.

14. Балаева, Ш. А. Минеральный состав плодов *Silybum marianum* (L.) Gaertn произрастающей на территории Республики Дагестан / Ш. А. Балаева, А.Ш. Рамазанов // Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследования, инновации и технологии: Материалы научных трудов XV Междун. научно-практ. конф. Астрахань.2021. – С. 47-51.

15. Балаева, Ш. А. Применение различных вариантов экстракции для извлечения БАВ и последующего их определения в плодах *Silybum marianum* (L.) Gaertn / Ш.А. Балаева, А.Ш. Рамазанов // VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием Краснодар, 2021.

16. Саранов, И. А. Разделение фракций триглицеринов масла расторопши пятнистой в условиях ДСК / И.А. Саранов, О.Б. Рудаков, Ш.А. Балаева, А.Ш. Рамазанов, Я.О. Рудаков // VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием Краснодар, 2021.

17. Саранов, И. А. Влияние фенотипических факторов на теплофизические свойства жирного масла расторопши пятнистой / И.А. Саранов, О.Б. Рудаков, Ш.А. Балаева, А.Ш. Рамазанов // Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения Я.А. Угая Воронеж, 2021 г.

18. Балаева, Ш.А. Определение витаминов в плодах, масле и шроте расторопши пятнистой, произрастающей в республике Дагестан / Ш.А. Балаева, А.Ш. Рамазанов // Международная научно-практическая конференция «химия, экология и рациональное природопользование» Магас, 2021.

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

подписано в печать 29.04.2022. Формат 60x84 1/16

Гарнитура Times New Roman. Усл.п.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ №123

«Кировская типография», ИП «Газиханов А.М.»

г. Махачкала, Гайдара Гаджиева 11