

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Дагестанский государственный университет»

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:

Рамазанов Арсен Шамсудинович  
доктор химических наук, профессор

Краснодар 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....   | 4  |
| Введение.....  | 5  |
| 1 Аналитический обзор.....   | 8  |
| 1.1 Химический состав и роль плодов расторопши пятнистой в жизнедеятельности человека .....      | 8  |
| 1.2 Методы экстракции БАВ из плодов расторопши пятнистой.....                                    | 12 |
| 1.3 Методы идентификации и определения БАВ в плодах расторопши пятнистой .....                   | 17 |
| 1.3.1 Методы идентификации и определения флаволигнанов .....                                     | 17 |
| 1.3.2 Методы идентификации и определения аминокислот .....                                       | 20 |
| 1.3.3 Методы идентификации и определения витаминов .....   | 23 |
| 1.3.4 Методы определения минерального состава.....   | 25 |
| 1.4 Методы контроля качества и подлинности растительных масел.....                               | 26 |
| 1.4.1 Числовые показатели масла расторопши пятнистой .....                                       | 27 |
| 1.4.2 Методы определения жирно-кислотного состава масла.....                                     | 28 |
| 1.4.3 Дифференциальная сканирующая калориметрия .....  | 30 |
| 1.5 Почвенно-климатические условия произрастания расторопши пятнистой в Республике Дагестан..... | 32 |
| 1.6 Вывод к аналитическому обзору и постановка задач исследования .....                          | 36 |
| 2. Экспериментальная часть.....  | 38 |
| 2.1 Ресурсы, аппаратура и методы.....  | 38 |
| 2.1.1 Оборудование, реактивы и материалы .....   | 38 |
| 2.1.2 Приготовление рабочих растворов .....  | 42 |
| 2.2 Определение БАВ и минерального состава плодов, масла и шрота расторопши пятнистой .....      | 47 |
| 2.2.1 Определение содержания жирного масла .....   | 48 |
| 2.2.2 Определение суммарного содержания флаволигнанов .....                                      | 49 |
| 2.2.3 Определение содержания углеводов.....  | 50 |
| 2.2.4 Определение общего содержания белка.....   | 50 |
| 2.2.5 Определение минерального состава .....   | 51 |
| 2.3 Оптимизация условий экстракции жирного масла из плодов расторопши пятнистой .....            | 53 |
| 2.4 Анализ жирного масла плодов расторопши пятнистой .....                                       | 55 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 2.4.1 | Определение числовых показателей качества .....  | 55  |
| 2.4.2 | Идентификация и определение жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой методом ГХ МС ..... | 56  |
| 2.4.7 | Идентификация и определение жирорастворимых витаминов .....  | 57  |
| 2.4.8 | Изучение теплофизических свойств масла методом дифференциальной сканирующей калориметрии.....      | 59  |
| 2.5   | Идентификация и определение БАВ в плодах расторопши пятнистой .....                                | 59  |
| 2.5.1 | Определение флаволигнанов методом ВЭЖХ .....   | 59  |
| 2.5.2 | Определение аминокислотного состава .....  | 61  |
| 2.5.3 | Определение водорастворимых витаминов .....  | 64  |
| 3.    | Результаты и их обсуждение.....  | 66  |
| 3.1   | Содержания БАВ и минеральных компонентов в плодах дикорастущей расторопши пятнистой.....           | 66  |
| 3.2   | Экстракция жирного масла из плодов расторопши пятнистой.....                                       | 70  |
| 3.3   | Идентификация и определение БАВ в жирном масле плодов расторопши пятнистой .....                   | 76  |
| 3.4   | Теплофизические свойства жирного масла расторопши пятнистой .....                                  | 91  |
| 3.5   | Идентификация и определение флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой .....                      | 97  |
| 3.6   | Идентификация и определение аминокислот в белке плодов расторопши пятнистой .....                  | 100 |
| 3.7   | Идентификация и определение водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой.....           | 109 |
|       | Выводы .....   | 115 |
|       | СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ .....   | 117 |
|       | ПРИЛОЖЕНИЯ .....   | 140 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РП – расторопша пятнистая

БАВ – биологически активные вещества

РФ – Российская Федерация

ГФ – государственная фармакопея

СКФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция

ЛРС – лекарственное растительное сырье

СЭ – Сокслет-экстракция

МВЭ – микроволновая экстракция

ЖЭ – жидкостная экстракция (экстракция растворителем)

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

УФ – спектроскопия в ультрафиолетовой области спектра

МС – масс-спектрометрия

ДФМ - детектор с фотодиодной матрицей

ТАГ – триацилглицерин

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ПИД – пламенно ионизационный детектор

ОФС – общая фармакопейная статья

МВО – микроволновая обработка

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ТХ – тонкослойная хроматография

СО – стандартный образец

## Введение

**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 (далее 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.

## 1 Аналитический обзор

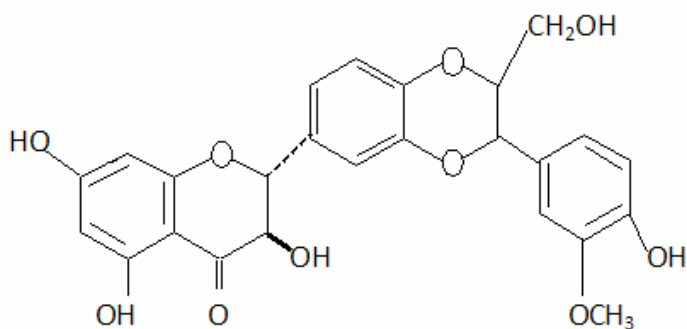
### 1.1 Химический состав и роль плодов расторопши пятнистой в жизнедеятельности человека

Расторопша пятнистая (РП) (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) уникальное растение семейства Астровых или Сложноцветных (Asteraceae) синтезирующее и накапливающее в результате онтогенеза целый ряд БАВ. Основные БАВ (масло, флаволигнаны, белки, водорастворимые и жирорастворимые витамины, углеводы, макро – и микроэлементы) накапливаются в плодах (семенах) растения, промышленная обработка которых является безотходной [1]. В наибольшем количестве в плодах РП содержится масло. Его содержание колеблется в пределах от 15 до 30 %, в зависимости от климатических условий произрастания [2–6]. Масло представлено триглицеридами пальмитиновой, стеариновой, линолевой, олеиновой, эйкозеновой и эйкозановой кислот. Иногда встречаются и следы линоленовой, миристиновой, бегеновой и лигноцериновой кислот [3–9]. Помимо ненасыщенных жирных кислот масло содержит в большом количестве токоферолы (витамин Е) [10–12]. Благодаря своему составу масло обладает ранозаживляющим, регенерирующим, противовоспалительным, антиоксидантным и холестерин понижающим действием. Так линолевая кислота ингибирует процессы аутофагии, улучшая антиоксидантную защиту клеток организма. Исследования показали улучшение состояния печени и кожных покровов человека при использовании масла РП в пищу [13–16].

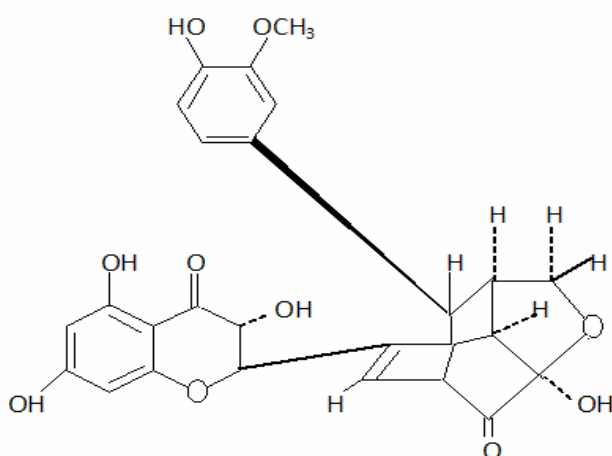
Наиболее ценным компонентом плодов РП являются флаволигнаны – производные флавоноидов и фенилопропаноидов, единственные природные гепатопротекторы. Флаволигнаны РП представлены силибином, силикристином, силидианином, изосилибином, 2,3-дегидросилибином, силандрином, силимонином, 2,3-дегидросиликристином, изосиликристином, силигермином, помимо которых присутствует и флавоноид таксифолин (дегидрокверцетин). Сумму доминирующих флаволигнанов: силибина, силикристина, силидианина объединяют под общим названием силимарин. Силидианин в отличие от силикристина и силибина имеет дополнительную несвязанную карбонильную



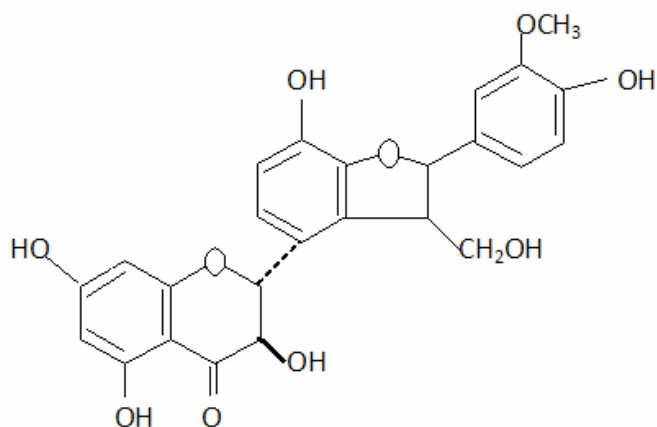
группу. Из таксифолина в результате конденсации с конифероловым спиртом образуются флаволигнаны [1, 17–22]. Химические формулы главных флаволигнанов и таксифолина приведены на рисунке 1 [1, 18, 22].



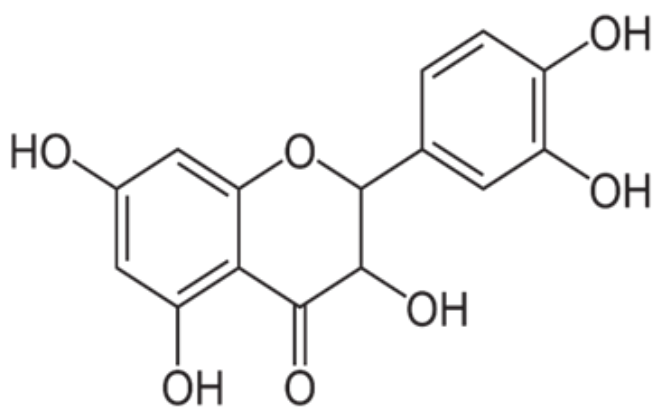
Силибин



Силидианин



Силикрестин



Таксифолин

Рисунок 1 – Основные компоненты флаволигнанов [1, 18, 22].

Они используются при гепатитах вирусной и не вирусной этиологии, при отравлениях ядом бледной поганки [22–26]. Смягчают повреждающее действие лекарственных препаратов на гепатоциты. Улучшают липидный обмен лиц, имеющих алкогольное поражение печени. Все эти свойства флаволигнаны имеют благодаря гепато – и мембраностабилизирующим, антиоксидантным действиям. Антиоксидантный эффект наблюдается и на других клетках организма: эритроцитах и тромбоцитах [23, 24, 27, 28]. Выявлены и противоопухолевые свойства силимарина в различных органах и тканях человека [29].

Существуют лилоцветковая и белоцветковая разновидность РП. В фармацевтической промышленности используют лилоцветковую разновидность. В зависимости от преобладания силибина или силидианина выделяют две хеморасы РП лилоцветковой разновидности, силибиновую и силидианиновую. Хеморасы РП являются следствием изменчивости растения в зависимости от фенотипических факторов среды произрастания [1, 18, 22, 30–33].

Помимо масла и флаволигнанов плоды РП содержат белок в пределах 13-30 %. Накопление белка зависит от условий культивирования, наличия или отсутствия удобрений, от орошения [33–37]. Сведения об аминокислотном составе белка плодов и шрота РП в научной литературе ограничены, и неполные [37–42]. Например, в работах [39, 41] в составе белка плодов РП из восьми незаменимых аминокислот не обнаружен триптофан. При этом в работе румынских авторов [37] содержание идентифицированных аминокислот в 100 г

белка ошибочно составляет более 134 г. В работе авторов из Словакии [43] отсутствует информация не только о содержании триптофана, но и о содержании условно незаменимых аминокислот – цистеина и пролина. В указанной работе на долю обнаруженных 15 аминокислот, приходится 74.62 % от всего белка РП. В соответствии с данными [37, 39, 43] белок РП содержит 8 незаменимых (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, триптофан, фенилаланин и лизин) и 10 заменимых (аспаргиновая кислота + аспаргин, серин, глутаминовая кислота + глутамин, глицин, аланин, цистеин, тирозин, гистидин, аргинин и пролин) аминокислот.

Содержание углеводов в плодах РП колеблется в пределах 28–52 % [37, 44, 45]. В состав плодов РП входят сахара: арабиноза, рамноза, ксилоза, глюкоза [22]. Плоды РП отличаются высоким содержанием структурных волокнистых углеводов (22.5 %), гемицеллюлозы (10.9 %), пектиновых веществ (5.92 %), благодаря чему его шрот добавляют в макаронные изделия для улучшения перистальтики кишечника и адсорбирования токсинов из организма [45]. Обезжиренные плоды РП используются вместе со шротом других масличных культур, таких как тыква, арбуз, грецкий орех, косточки винограда и шиповника для создания пищевых продуктов с энтеросорбирующими свойствами и обладающими усиленными функционально-технологическими свойствами и целевыми функциями [46]. Множество исследований направлено на изучение влияния добавки шрота в хлебобулочные и кондитерские изделия, в том числе и для получения безглютеновых продуктов [47–50].

Плоды РП содержат в своем составе водорастворимые и жирорастворимые витамины, такие как А, Е, D и К, следы β-каротина [34, 41, 52–55]. В работе [55] приведены следующие данные о содержании в плодах РП витаминов: А – 0.2 МЕ, D – 5.1 МЕ, Е – 6.0 мг/кг, В<sub>1</sub> – 6.2 мг/кг, В<sub>2</sub> – 5.6 мг/кг, В<sub>3</sub> – 17.4 мг/кг, В<sub>4</sub> – 2015 мг/кг, В<sub>5</sub> – 52.4 мг/кг, В<sub>6</sub> – 7.8 мг/кг, В<sub>12</sub> – 0.4 мкг/кг.

По данным авторов [22, 56] зола плодов РП содержит макроэлементы (мг/г): калий – 9.20; кальций – 16.60; магний – 4.20; железо – 0.08; микроэлементы (мкг/г): марганец – 0.10; медь – 1.16; цинк – 0.71; хром – 0.15; алюминий – 0.02;

ванадий – 0.01; селен – 22.90; никель – 0.20; стронций – 0.08; свинец – 0.08; йод – 0.09; бор – 22.40. В шроте РП обнаружены: кальций 687 мг/100 г; селен 30 мкг/100 г [57]; цинк – 15.7 мг/кг; железо – 145.7 мг/кг; магний – 3516 мг/кг; кальций – 11200 мг/кг [39].

Родиной РП является Средиземноморье, Южная и Атлантическая Европа, откуда она распространилась по всему миру, в том числе и по Дагестану [30, 31, 33, 58, 59]. Испокон веков люди интуитивно использовали ее в целях врачевания от болезней печени и желчного пузыря. После определения немецкими учеными в 60 х гг. XX века химического состава флаволигнанов (силимарина), РП получила настоящую популярность в медицине и науке. Эти исследования позволили включить РП в фармакопеи многих стран. В настоящее время РП широко культивируется как сырьевой источник силимарина и масла для фармацевтической промышленности. Интерес к исследованию химического состава РП не иссекает, так как качественный и количественный состав БАВ плодов РП зависит условий обитания и хеморасы РП [18, 32, 60].

В России РП выращивается в Пензенской, Ульяновской, Саратовской областях и Республике Башкортостан [18, 33]. В Дагестане РП пока еще не культивируют, хотя произрастает в диком виде во всех почвенно-климатических зонах республики, кроме крайнего высокогорья и степей. С аналитической точки зрения РП дикорастущая недостаточно изучена.

## 1.2 Методы экстракции БАВ из плодов расторопши пятнистой

На основе флаволигнанов извлеченных из плодов РП получают уникальные гепатопротекторные лекарственные препараты, широко используемые в медицинской практике при лечении болезней печени [1, 2]. Извлечению флаволигнанов из плодов РП посвящен ряд работ [61-66]. В работе [61] приведены результаты количественного извлечения флаволигнанов из плодов РП 60 % этиловым спиртом различными методами (перколяция, мацерация, экстракция под действием ультразвука и метод, описанный в ГФ РФ – кипячение с обратным холодильником в течение 30 и 60 мин). Изучено влияние метода

экстракции на флаволигнановый состав спиртового извлечения. В результате сделан вывод, что экстракция кипячением на водяной бане с обратным холодильником дает наибольший выход флаволигнанов. К такому же выводу пришел автор [62], изучавший извлечение флаволигнанов из плодов, жмыха (обезжиренные прессованием плоды) и шрота (обезжиренные экстракцией органическим растворителем плоды) многократной перколяцией и реперколяцией с нагреванием и без действия высоких температур. Многократная и длительная перколяция растительного сырья растворителем без нагревания, не позволяет провести исчерпывающую экстракцию (в сырье остается до 1.0 % флаволигнанов). Нагреванием сырья на водяной бане при 70 °С в течение 30 мин с 80 % этиловым спиртом, можно извлечь 70–75 % флаволигнанов. Украинские авторы [63] исследовали влияние степени измельчения сырья и концентрации этилового спирта на степень извлечения флаволигнанов. Полученные экстракты анализировали на спектрофотометре при длине волны 288 нм. В результате проведенных исследований пришли к выводу, что наилучшим растворителем для извлечения флаволигнанов является 95 % этиловый спирт. Для определения оптимальной степени измельчения сырья были отобраны фракции, проходящие сквозь сита с размером частиц 0.25–0.50; 0.50–0.75; 0.75–1.00 см. Максимальное количество флаволигнанов переходит в экстракт уже при измельчении сырья до размеров 0.50–0.75 см. Наиболее полная экстракция флаволигнанов происходит в течение 60 мин.

Авторы [64] изучили жидкостную экстракцию силимаринового комплекса из обезжиренных гексаном и нативных плодов РП с использованием ацетона, этилацетата, метанола под давлением 60 бар, в интервале температур 50–150 °С, времени 5–20 мин, и 1–5 циклов экстракции. В результате проведенных исследований сделан вывод, что лучшим растворителем для извлечения флаволигнанов является ацетон, затем метанол, наименьшее количество флаволигнанов извлечено этилацетатом. Содержание силикрстина, силидианина, силибина А, силибина В, изосилибина А и изосилибина В при экстракции ацетоном из нативных плодов составляют 3.3, 6.9, 3.3, 5.1, 2.6 и 1.5 мг/г

соответственно. Этот метод предлагается как одностадийный метод извлечения флаволигнанов из нативных плодов РП, пропуская процесс обезжиривания органическими растворителями. Однако, токсичность растворителя ограничивает применение этого метода.

В работе [65] для извлечения флаволигнанов из плодов РП опробован сверхкритический диоксид углерода. Этот метод позволил извлечь всего 0.42 % флаволигнанов в масляный экстракт. В работе [66] при сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода (СКФЭ-СО<sub>2</sub>) с соразтворителем этанолом при давлении 220 бар и температуре 40 °С был получен масляно – спиртовой экстракт с 30.8 % суммарным выходом масла и флаволигнанов. Полученный экстракт содержал триглицериды 8 основных жирных кислот и флаволигнаны.

При извлечении флаволигнанов этиловым спиртом из нативных плодов РП в экстракт частично переходит масло. Это требует дополнительной технологической операции по его удалению из спиртового экстракта флаволигнанов. Поэтому перед извлечением флаволигнанов необходимо обезжирить плоды РП. Самым простым методом для этого является прессование [6, 31, 33, 51, 67]. Однако в этом случае неполный выход продукта, помимо этого в масло попадают балластные вещества, такие как фермент липаза, белки и т. д. Это приводит к быстрому прогорканию и порче масла [68]. В Государственной фармакопее (ГФ) XIII Российской Федерации (РФ) для извлечения масла из плодов РП предлагается использовать петролейный эфир ( $t_{кип}$  40–70 °С) [69]. Но этот способ длительный (около 14 ч), полученное масло содержит в своем составе остаточное количество токсичного растворителя, что исключает его применение внутрь. Авторы [68] предлагают получать мало РП экстракцией сжиженным хладоном-12 при температуре 10–28 °С, давлении 3.5–6.0 кгс/см<sup>2</sup> в течение 1.5–2 часов в замкнутом цикле. В работе [70] для извлечения масла из плодов РП предложен сжиженный фреон R141В. За два с половиной часа фильтрационной экстракции скорости фильтрации 0.96 л/(кг·ч), извлечено 98 % от общей массы липофильного вещества. Однако, хладагенты в случае утечки, являются

озоноразрушающими веществами, попадая в атмосферу, они разлагаются под действием ультрафиолетового излучения, образующийся галоген реагирует с озоном [71, 72].

В работе [73] предлагают применение микроволновой обработки, для увеличения выхода масла из плодов РП. При микроволновом облучении (800 Вт) в течение 2–4 минут выход масла, извлекаемого органическими растворителями, возрастает на 6 %. Микроволновое излучение влияет и на физико-химические параметры масла: увеличивается содержание токоферолов, число омыления; однако йодное число, содержание полиненасыщенных жирных кислот и соотношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот уменьшается, что отрицательно сказывается на качестве масла.

В таблице 1 приведены методы экстракции БАВ из плодов РП, для последующей их идентификации и определения. Флаволигнаны экстрагируются этиловым спиртом разных концентраций, применяя методы кипячения с обратным холодильником, перколяцию, мацерацию, ультразвуковую экстракцию и СКФЭ с добавлением этилового спирта как со растворителя. В полученных экстрактах идентифицируют и определяют основные БАВ с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным и ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-УФ) и тонкослойной хроматографии (ТХ). Для определения жирнокислотного состава в основном используется экстракция в аппарате Сокслета органическими растворителями, микроволновая экстракция органическими растворителями, СКФЭ хладоном-12, фреоном-R141В, и углекислым газом, с последующим определением БАВ методами ВЭЖХ и ГХ.

Современным и перспективным методом получения масла из растительного сырья является СКФЭ-СО<sub>2</sub>. Она является многообещающей и широко распространенной для экстракции БАВ из растительного сырья. Диоксид углерода является нетоксичным и негорючим экстрагентом, обладает низкими критическими параметрами ( $T_{\text{крит}}=30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{\text{крит}}=72.8$  атм, критическая плотность  $0.469$  г/см<sup>3</sup>). Варьируя давление и температуру, можно контролировать плотность

растворителя, и тем самым влиять на выход и селективность экстракции [74, 75]. Экстракция сверхкритическим диоксидом углерода соответствует принципам «зеленой химии» [76]. Этот метод позволяет получать фармацевтические препараты в одну стадию, не требующих дальнейшей очистки и доработки. Так экстракты, полученные при различных вариациях физических параметров диоксида углерода, содержат в своем составе каротиноиды, флавоноиды, антоцианы, масло, эфирные масла, флаволигнаны и другие БАВ [77-83]. Известны способы извлечения масла из косточек винограда, ягод морошки, черного тмина, рапса этим методом [84-88].

Таблица 1 – Экстракция и определение БАВ в плодах расторопши пятнистой

| Определяемое соединение | Способ экстракции  | Метод определения    | Ссылка        |
|-------------------------|--|----------------------|---------------|
| Флаволигнаны            | ЖЭ кипячением на водяной бане с обратным холодильником (96, 80, 60 % этанолом, 1:10, 0,5-1 ч)        | ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-УФ, ТХ | 4, 7, 61-64   |
|                         | Перколяция (спирт 1:1, 2 ч)  |                      |               |
|                         | Мацерация (спирт 1:5, 5 дней)  |                      |               |
|                         | УЗ (спирт 1:5, 0,5 ч)  |                      |               |
|                         | СКФЭ - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ОН (160-200бар, 40-80°C, 430- 810 кг/м <sup>3</sup> , 7-15 мин, |                      |               |
| Жирные кислоты          | СЭ (гексан, 12 ч)  | ВЭЖХ, ГХ             | 65, 66, 68-73 |
|                         | СЭ (хлороформ, 12 ч)   |                      |               |
|                         | МВЭ (гексан, 6 ч)  |                      |               |
|                         | СКФЭ (хладон -12, 1,5-2 ч)   |                      |               |
|                         | СКФЭ (фреон- R141В, 2,4 ч)   |                      |               |
|                         | СКФЭ (СО <sub>2</sub> , 2 ч)   |                      |               |

СЭ – Сокслет-экстракция, МВЭ – микроволновая экстракция, СКФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция, ЖЭ – жидкостная экстракция (экстракция растворителем), ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГХ – газовая хроматография, УФ – спектроскопия в ультрафиолетовой области спектра, МС – масс-спектрометрия.

Исследованию влияния параметров СКФЭ-СО<sub>2</sub> на выход масла из растительного сырья посвящены работы [84, 87, 89], в которых для определения оптимальных параметров, обеспечивающих максимальный выход масла, используется метод вариации одного из параметров, и каждого по очереди. Такой



метод не учитывает взаимное влияние давления, температуры, времени на выход масла, требует серию экспериментов с большим количеством опытов, и связано большими затратами материалов и времени. В последнее время, для оптимизации многофакторного эксперимента используется метод активного планирования [90]. Полнофакторное планирование основано на одновременном варьировании всех факторов эксперимента, в отличии от однофакторного. Данный метод дает экспериментатору возможность с помощью небольших серий опытов и математических расчетов выбрать условия близкие к оптимальным. Это способствует повышению производительности труда, надежности полученных результатов. Достоинствами планирования является универсальность и пригодность в большом спектре областей исследований [91]. Так, например, этот метод использован для оптимизации процесса СКФЭ-СО<sub>2</sub> жмыха плодов морошки [85] и усниевой кислоты из лишайника уснеи цветущей [92]. Основным оптимизирующим фактором при экстракции масла является выход масла. Для получения полинома второго порядка, обычно, используют метод построения униформ-плана второго порядка, учитывающий влияние трех и более факторов. В результате получают математическую регрессионную модель, которая представляет собой функцию зависимости выхода масла от параметров экстрагирования.

Определение оптимальных параметров СКФЭ-СО<sub>2</sub> масла из плодов РП методом планирования и реализации полнофакторного эксперимента, изучение состава БАВ в зависимости от метода экстракции из плодов РП является актуальной аналитической задачей.

### 1.3 Методы идентификации и определения БАВ в плодах расторопши пятнистой

#### 1.3.1 Методы идентификации и определения флаволигнанов

Уникальными БАВ содержащимися в плодах РП являются флаволигнаны, идентификации которых посвящено много работ [16-22, 63, 93-97].

Наиболее удобным и широко применяемым методом определения суммарного содержания флаволигнанов является спектрофотометрия в УФ области [16–22, 63]. Силибиновый комплекс имеет максимум поглощения при длине волны 288 нм. Преимуществами этого метода являются экспрессность, точность, высокая чувствительность. Этот метод является фармакопейным и описан в ГФ РФ, Украины, Белоруссии и т.д. [69, 99]. Применяются попытки усовершенствования этого метода. Авторами [93] проведены исследования по определению флаволигнанов при двух длинах волн – 289 и 380 нм, на примере шрота РП компании «Биокор». Предложен модифицированный спектрофотометрический метод анализа спиртового извлечения плодов РП. При реакции с хлоридом алюминия образуется комплекс за счет фенольных гидроксиллов. В результате хромофорная система силибина и его изомеров перестраивается, это приводит к батохромному сдвигу максимума поглощения с 289 до 380 нм. Проведено сравнение количественных методик определения флаволигнанов, установлено, что приведенный в ГФ РФ методика дает наилучшие результаты.

В немецкой фармакопее описан метод определения подлинности плодов РП тонкослойной хроматографией (ТХ) с использованием силикагеля, в системе растворителей хлороформ – ацетон – муравьиная кислота (9:2:1) [100]. По видимым при УФ освещении пятнам, определяют силикрестин, силибин и таксифолин и в малых количествах силидианин. Этот метод предложен для определения расы РП. Авторы из Белгородского государственного университета [94] изучили системы разных растворителей для разделения компонентов силимарина: хлороформ – ацетон – муравьиная кислота (9:2:1); этилацетат – этиловый спирт (95:5); хлороформ – метанол (97:3); ацетонитрил – хлороформ (3:1); н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5); хлороформ – муравьиная кислота – вода (50:45:5); этилацетат – муравьиная кислота – вода – метанол (10:2:2:1). В качестве проявителя использовали 10 % водный раствор аммиака. Наиболее четко дифференцируемой системой оказалась система – хлороформ –

ацетон – муравьиная кислота (9:2:1), в условиях которой  $R_f$  силибина составляет  $0,69 \pm 0,03$ .

Куркин В.А. с соавторами предложили метод определения подлинности плодов и экстракта РП жидкого [95], который вошел в ГФ РФ [69]. Четкое разделение доминирующих флаволигнанов достигнуто на пластинках «Силуфор» в системе четыреххлористый углерод – ацетонитрил в соотношениях 6:4. Пятна ярко фиолетовой флюоресценции проявляются при облучении хроматограммы УФ светом 254 нм. Величина  $R_f$  на уровне пятна силибина составляют 0.6, 0.7, 0.8 для силибина, силидианина и силикрстина соответственно. Идентификацию этих флаволигнанов можно провести обработкой пластинки раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе карбоната натрия. Нагревание хроматографических пластинок при 110 °С около 5 мин ускоряет процесс азосочетания. В этом случае пятна имеют желтый цвет.

Группа исследователей во главе Н.В. Никитченко [96] разработали методику определения качества плодов РП, основанную на извлечении БАВ методом жидкостной экстракции под давлением, с последующим хроматографическим анализом экстракта. В качестве экстрагентов использовали воду, этанол, субкритическую воду, смесь воды с этанолом в соотношениях 90:10 и 50:50. Статистический и динамический режимы экстракции сочетали при давлении пределах 0.1–12.5 мПа и температуре 100–250 °С. Максимальное суммарное количество флаволигнанов, и отдельных компонентов извлекается динамической экстракцией этанолом при давлении 12.5 мПа и температуре 105 °С. При этих условиях извлекается в сумме 33.5 мг/г флаволигнанов в составе которых 4.7 мг/г таксифолина, 18.0 мг/г силикрстина, 3.9 мг/г силидианина и 6.9 мг/г силибина. Субкритической водой в динамическом режиме при давлении 12.5 мПа и температуре 250 °С получен экстракт в концентрациях БАВ соизмеримых со спиртовой экстракцией.

Наиболее экспрессным и надежным методом определения флаволигнанов является ВЭЖХ. Этот метод сочетает в себе идентификацию и количественное определение флаволигнанов одновременно. Так в работе [97] предложен метод

суммарного определения компонентного состава препарата «Силимар» производимого из плодов РП. Анализ проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Biotronic» с УФ-детектором с использованием хроматографической колонки «Phenomenex Luna C18(2)» (250x2.0 мм). В качестве элюентной системы использовали смесь ацетонитрила и буферного раствора, подкисленного фосфорной кислотой до pH 3.0, в соотношении 30:70 (изократический режим) при аналитической длине волны 288 нм. В результате наблюдалось разделение компонентов флаволигнанов с относительными временами удерживания по отношению к стандартному образцу (СО) силибина 0.5 для силикрстина и 1.2 для силидианина. Британские химики [98] определили флаволигнаны ВЭЖХ УФ детектором. Разделение проводили на колонке Agilent TC-C18 (5 мкм, 4.6 мм × 250 мм) при 25°C и длине волны 288 нм. Использованы следующие элюенты: (А) фосфорная кислота, метанол, вода (0.5: 35: 65) и (Б) 100 % ацетонитрил при скорости потока 0,8 мл/мин. Программа градиентного элюирования: А от 0 % между 0 и 28 минутами линейно увеличивалось до 100 % В, то же соотношение сохранялось до 35 минут, а затем до 36 минут линейно увеличивалось до 100 %. Силикрстин, силидианин, силибинин А, силибинин В, изосилибинин А и изосилибинин В идентифицированы путем сравнения с хроматограммой стандартного образца флаволигнанов.

### 1.3.2 Методы идентификации и определения аминокислот

Одним из важнейших БАВ в растительном сырье наряду с жирными кислотами, фенольными соединениями являются аминокислоты. Если состав флаволигнанов и масла изучен хорошо, то сведения об аминокислотном составе белка плодов РП в научной литературе ограничены, и они неполные [37, 39, 43, 101]. Следует отметить, что в литературе нет сведений об аминокислотном составе белка плодов РП, произрастающей на территории Дагестана. Этот вопрос является актуальным в связи с ростом интереса к нетрадиционным культурам в хлебопечении и кулинарии.

Для определения и идентификации аминокислот наиболее приемлемыми являются хроматографические методы [101-103].

Для определения аминокислотного состава белка плодов РП узбекскими химиками [101] применен метод ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией фенилтиокарбамидом и постколоночным УФ-детектированием при 254 нм. Идентификация аминокислот проводили на приборе Agilent Technologies 1200 хроматограф на 75x4.6 мм Discovery HS, на колонке C18. Элюент А: 0.14 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  + 0,05% изопропилового спирта в ацетонитриле – рН 6.4; элюент В: ацетонитрил. В градиентном режиме при расходе элюента 1.2 мл/мин, поглощение 269 нм. Градиент Б/мин: 1–6 %/0 –2.5 мин; 6–30 %/2.51–40 мин; 30–60 %/40.1–45мин; 60–60 %/45.1–50мин; 60–0 %/50.1–55мин. В результате определено 7 незаменимых и 13 заменимых АК.

По сравнению с ВЭЖХ, ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией нингидрином определения аминокислот имеет ряд преимуществ. К ним относятся простая пробоподготовка, более высокая точность определения, воспроизводимость результата и надежность. Самым главным преимуществом является быстрое передвижение загрязнений по колонке до разделения аминокислот. Этот метод стандартизирован Международной организацией по стандартизации (EN ISO 13903), рекомендован для определения аминокислотного состава белка сырья и кормов, а также контроля полноценности комбикормов Европейской федерацией производителей кормовых добавок и кормов для животных. Метод ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином применен при определении аминокислотного состава (кроме триптофана) комбикормов для животноводства [102]. Для анализа использовали систему ВЭЖХ (HPLC) Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), с автоматическим реакционным модулем для постколоночной дериватизации нингидрином APM-1000 (Sevko&Co, Россия) и колонкой с ионообменной смолой 4.6 x 150 мм (Sevko&Co, Россия). В результате определены 17 протеиногеновых аминокислот. Данный метод основывается на существовании аминокислот в виде катионов при рН 2.2 и их сорбции ионообменной смолой колонки, которые при

элюировании градиентом с повышением рН десорбируются с нее при достижении изоэлектрической точки молекул. При выходе с колонки аминокислоты образуют с нингидрином окрашенные соединения, которые фотометрически детектируются при 570 нм (фиолетовый комплекс) для всех аминокислот, кроме пролина – 440 нм (желтый комплекс). Недостатком метода ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией является разложение дериватизатов до завершения анализа. Комплексы, образуемые аминокислотами с ортофталевым ангидридом, детектируются с помощью УФ анализатора. Авторы работы [103] сравнили два метода – пред и постколоночной дериватизации и пришли к выводу о преимуществе использования последнего. Так же в этой работе исследован способ перевода рН в образце после гидролиза до 2.2. Были проверены два подхода: испарение соляной кислоты и растворение сухого остатка в буферном растворе; доведение кислотности среды в образцах путем добавления раствора щелочи. Установили, что при первом подходе, некоторые гидрофобные аминокислоты (валин) частично растворяются в буфере, после упаривания и итоговые результаты анализа оказываются заниженными. Второй подход дает более точные результаты, несмотря на большой расход щелочи (0.3 г натрия гидроксида на одну пробу).

Для определения аминокислотного состава плодов РП приемлемо применение метода, указанного в ГОСТ 32195-2013, этим методом определяют все аминокислоты кроме триптофана [104]. Для определения триптофана используют метод, приведенный в ГОСТ 32201-2013 [105].

Актуальным является идентификация и определение аминокислотного состава, установление наиболее характерных фенотипических соотношений для протеиногенных аминокислот, выяснение зависимости биологической ценности белка дикорастущей РП в разных природно-климатических условиях.

### 1.3.3 Методы идентификации и определения витаминов

Плоды РП могут служить дополнительным источником жирорастворимых и водорастворимых витаминов, сведения о которых приведены в работах [52, 106–108].

Для определения жирорастворимых витаминов применяют хроматографические методы: ТХ, ВЭЖХ [52, 109 - 111]. В работе [52] описана методика идентификации водорастворимых и жирорастворимых витаминов в плодах РП с применением ТХ. Установлено, что наиболее полное разделение водо- и жирорастворимых витаминов РП при использовании хроматографической бумаги и пластин марки «Sorbfil» достигается на фоне смесей растворителей: для водорастворимых витаминов - бутанол: уксусная кислота: вода (5: 5: 4 и 4: 1:5), ацетон: бутанол: бензол (1: 1: 10), уксусная кислота: ацетон: бутанол (1: 1: 4); для жирорастворимых витаминов – бензол: этилацетат (1: 1); ацетон: бутанол: бензол (1: 1: 1). Детектирование хроматографических пятен предложено проводить следующими методами: витамин В<sub>1</sub> (тиамин) - по его фиолетовой флуоресценции в УФ-свете; или после опрыскивания хроматограммы свежеприготовленным раствором гексацианоферратом калия (II); витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) - при дневном свете по желтому окрашиванию и по зеленому свечению в УФ-свете; витамин В<sub>5</sub> (никотиновая кислота) – по синевато-белой флуоресценции в ультрафиолетовом свете; витамин В<sub>6</sub> (пиридоксин) – по белой флуоресценции при УФ облучении; витамин В<sub>12</sub> (цианкобаламин) – при дневном свете по красному окрашиванию, в УФ по темным пятнам на ярком фоне, или по фиолетовому окрашиванию после опрыскивания раствором йодистого калия; витамин Е (токоферол) – по темным пятнам на флуоресцирующем фоне после опрыскивания раствором хлорного железа (III); витамин А (ретинол) – в ультрафиолетовом свете, при этом пятна витамина А были темными на светлом флуоресцирующем фоне (флуоресцирует золотисто-коричневым цветом); витамин Д (кальциферол) – хлоридом сурьмы (III) или хлоридом сурьмы (V). Авторы подчеркивают токсичность используемых растворителей как недостаток

метода. В качестве достоинства отмечается возможность дальнейшего исследования разделенных компонентов другими способами.

Авторы [110] предложили методику определения жирорастворимых витаминов А, D, Е в объектах животного происхождения, поливитаминных комплексах и комбикормах методом ВЭЖХ с детектором с фотодиодной матрицей. Снизить пределы обнаружения удалось благодаря использованию фотодиодной матрицы и сканирования длин волн во всем выбранном диапазоне с минимальным шагом, что позволило измерить аналитический сигнал каждого компонента при заданной длине волны, соответствующей максимуму поглощения соединения. Предложен способ очистки и концентрирования жирорастворимых витаминов при извлечении из сложных биологических объектов твердофазной экстракцией на патронах «Strata». Определены пределы детектирования, диапазоны определяемых концентраций анализируемых веществ, относительные погрешности измерения массовой доли компонентов.

В работе А. О. Руденко и Л. А. Карцовой [111] приводится методика определения водорастворимых витаминов группы В и витамина С в премиксах, БАВ и комбикормах методом ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования. Предлагается способ очистки экстрактов комбикорма методом твердофазной экстракции на колонке, заполненной сорбентом SepPak C18. Изучили устойчивость аскорбиновой кислоты и рибофлавина в водных растворах с различными значениями рН. Сделан вывод об оптимальном разделении при содержании ацетонитрила в элюенте 12 об. %. Полностью разделить пики удалось при введении в подвижную фазу гептансульфоната натрия, в качестве ионпарного реагента. Обращено фазовый Сорбент SepPak C18 является лучшим для очистки и по коэффициентам извлечения, который позволяет снизить пределы обнаружения аналитов. Однако введение ионпарного реагента не позволяет разделять пики в многокомпонентной системе. Решить эту проблему градиентным элюированием предложили группа авторов во главе с Бендрышевым А. А. [112]. В этой работе приводятся результаты изучения влияния кислотности, температуры и природы неподвижной фазы на разделение и удерживание витаминов. Установлено, что



температура влияет на времена удерживания незначительно. Наилучшее разделение витаминов достигается при кислотности среды 1.5–1.8 при следующих условиях хроматографирования: элюент А – 0.6 % фосфорная кислота, элюент Б – ацетонитрил. Градиентный профиль: 0–6 мин – 0 % Б, 6–15 мин от 0 до 18 % Б, 15–28 мин – 18 % Б, 25–50 мин – от 18 до 50 % Б, 29–30 мин от 50 до 15 % Б, 30–31 мин от 15 до 0 % Б; скорость потока элюента 0.8 мл/мин, температура колонки 20 °С.

Метод, предложенный в работе [112], является наиболее приемлемым для определения водорастворимых витаминов в объектах растительного происхождения, в том числе в плодах РП.

В доступных нам источниках нет сведений, описывающих зависимость содержания витаминов в плодах РП от почвенно-климатических условий.

#### 1.3.4 Методы определения минерального состава

Минеральный состав играет важную роль в действии ЛРС на организм человека. Многие обменные процессы, такие как водно-солевой и кислотно-щелочной баланс, на клеточном уровне зависят от макроэлементов. Микроэлементы участвуют в ферментативных реакциях организма. Содержание микро- и макроэлементов в ЛРС на прямую зависит от аккумулирующих свойств растения, от природно-климатических условий, состава и типа почв.

Для определения минерального состава в растительном сырье необходима минерализация – окисление органической части. Для этого используют сухую, мокрую и микроволновую минерализацию. Сухая минерализация основана на полном окислении органической части растения путем сжигания на электроплитке и затем доокисления в муфельной печи. Достоинствами метода являются доступность и простота. Недостатками – длительность процесса, потеря элементов (ртуть, мышьяк, свинец, сурьма, молибден) при термообработке, неудобство из-за задымления. Мокрая минерализация заключается в нагревании проб в смеси концентрированных кислот в колбе Кьельдаля или в автоклаве. Достоинствами мокрой минерализации является использование низких

температур и исключение потерь элементов. Недостатками – большая длительность операции, большой расход реактивов, высокое значение поправки контрольного (холостого) опыта. Наиболее перспективным, удобным и экспрессным методом является микроволновая минерализация. Она заключается в минерализации сильными кислотами окислителями при повышенном давлении с использованием микроволнового способа нагрева [113].

Наиболее селективным и экспрессным методом определения металлов в минерализатах является атомно-абсорбционная спектрометрия. Этот метод имеет низкие пределы обнаружения элементов в растворах.

Узбекские исследователи изучили минеральный состав сухого экстракта плодов РП методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Выявлено, что основными элементами в сухом экстракте являются, мг/кг: фосфор – 9477, калий – 9469, кальций – 6620, магний – 3742, натрий – 645, сера – 557, железо – 23, кремний – 196, алюминий – 80, бор – 44, цинк – 40, стронций – 27, медь – 25, марганец – 17, титан – 9, барий – 7, рубидий – 6, хром – 4. Содержание ультрамикроэлементов составляет следующее, мг/кг: никель – 1.95, селен – 0.25, литий – 0.20, ванадий – 0.18, кобальт - до 0.11, серебро-0.09. В экстракте плодов РП обнаружено низкое содержание токсичных элементов свинца, кадмия, бериллия, ртути [114].

В научной литературе сведения о минеральном составе плодов РП не полные, в связи с чем, представляет интерес изучение минерального состава плодов РП в зависимости от почвенно-климатических условий.

#### 1.4 Методы контроля качества и подлинности растительных масел

Растительные масла являются ценными биологически активными добавками и пищевыми продуктами, производят в мире в огромных количествах. Основным сырьем для получения растительных масел являются подсолнечник, кукуруза, соя, арахис, рапс, оливки, нетрадиционным сырьем являются семена черного тмина, тыквы, кунжута, хлопка и плоды РП [115]. Полезные растительные масла не редко разбавляются более дешевыми, в том числе

пальмовым маслом с целью уменьшения себестоимости продукта. Помимо этого, при длительном хранении происходит автоокисление и прогоркание масел. В связи с чем, проблема сертификации, установления подлинности и контроль качества растительных масел является важной аналитической задачей. Существуют несколько методов контроля качества и подлинности масел: определение числовых показателей (плотность, показатель преломления, кислотное, йодное, перекисное, омыления и эфирное числа) [69, 116-119]; определение жирнокислотного состава; определение теплофизических свойств дифференциальной сканирующей калориметрией.

#### 1.4.1 Числовые показатели масла расторопши пятнистой

В ГФ РФ нет регламентированных требований к числовым показателям масла РП. Приведенные в литературных источниках сведения о числовых показателях отличаются в зависимости от места произрастания РП и метода получения масла (таблица 2).

Таблица 2. Числовые показатели жирного масла РП в зависимости от места произрастания сырья и способа получения

| Наименование показателя                   | Место произрастания сырья и метод получения масла |  |                                    |                               |                                  |
|---|---|--|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
|   | Тунис, холодное прессование [10]                  | Иран, мацерация с предварительной МВО [73] | Турция, холодное прессование [120] | Пакистан, СЭ н-гексаном [121] | Азербайджан, СЭ н-гексаном [122] |
| Плотность, г/см <sup>3</sup>              | 0.8129-0.9200                                     |  |                                    |                               |                                  |
| Показатель преломления                    | 1.4646-1.4720                                     |  |                                    |                               |                                  |
| Число омыления, мгКОН/г                   | 128-205   | 179-187                                    | 200                                | 195                           | 199                              |
| Кислотное число, мгКОН/г                  | 5.5-8.3   | 2.2-4.2                                    | 2.5-5.4                            | 1.9                           | 2.5                              |
| Йодное число, гI <sub>2</sub> /100г       | 112-118   | 99-107                                     | 112-118                            | 103.8                         | 117                              |
| Перекисное число, ммольО <sub>2</sub> /кг | 2.8-4.2   | 2.1-5.1                                    | 0.5-2.8                            | 0.85                          | 3.9                              |

Йодное число является важным показателем, указывающим на содержание ненасыщенных жирных кислот. У масла РП произрастающей в теплых странах оно находится в пределах 99-118 гI<sub>2</sub>/100г. Куркин В. А. в своих работах указывает что, йодное число масла РП находится в пределах 60-80 и объясняет это относительно малым содержанием ненасыщенных жирных кислот [18, 123]. Это различие можно объяснить тем, что содержание ненасыщенных жирных кислот зависит от климатических условий произрастания растения. Число омыления масла РП находится в пределах 128-205 мгКОН/г. Наименьшее значение кислотного числа имеет масло, полученное из плодов, выращенных в Пакистане [121], наибольшее – полученное из плодов, произрастающих в Тунисе холодным прессованием [10]. Перекисное число, указывающее на степень окисления масла, наименьшее в масле РП полученного экстракцией н-гексаном [121], максимальное - мацерацией с предварительной микроволновой обработкой из плодов, выращенных в Иране [73].

#### 1.4.2 Методы определения жирно-кислотного состава масла

Одним из наиболее достоверных способов определения фальсификатов растительных масел является определение жирно-кислотного состава.

Перед идентификацией жирных кислот все масла (растительные и животные) подвергаются гидролизу и переэтерификации триглицеридов в метиловые эфиры, методами, описанными в нормативных документах ГФ РФ, ГОСТ 31665-2012 и ГОСТ 30418-96 [124, 125]. Идентификацию последних проводят следующими методами: ГХ, ТХ, ВЭЖХ, инфракрасной спектрофотометрии и т.д. [69, 124-126].

Авторы [126] для идентификации метиловых эфиров жирных кислот использовали ВЭЖХ. Состав масла семян подсолнечника определен с помощью метода ВЭЖХ на колонке, заполненной сорбентом Диасфер-110-С18 (6 мкм) в потоке смеси (2: 8) ацетонитрил-ацетон с рефрактометрическим детектированием. Показано, что данный метод может быть использован для количественного определения жирно-кислотного состава масел разных растений. Метод ОФ ВЭЖХ

применен для установления видового состава и для дифференциации триаглицеридов с остатками октадекатриеновых жирных кислот без дополнительной обработки экстрагированных из растительного материала масел [127, 128]. Установлено, что ВЭЖХ в условиях, гарантирующих отсутствие артефактов, позволяет различать триаглицериды, образованные изомерными сопряженными октадекатриеновыми кислотами.

ГХ с МСД и ПИД широко используется для определения жирных кислот в растительных маслах [129-131].

Таблица 3 – Содержание жирных кислот, % в плодах расторопши пятнистой

| ЖК                | Место произрастания и метод определения |                    |                    |                    |                    |                  |
|-------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
|                   | ГЖХ с<br>МСД<br>[51]                    | ГЖХ<br>МС<br>[123] | ГХ<br>ПИД<br>[122] | ГЖХ<br>ПИД<br>[27] | ГХ<br>ПИД<br>[132] | ГХ<br>ПИД<br>[8] |
| Лауриновая        | 0.04                                    | 0.01               | -                  | -                  | -                  | -                |
| Миристиновая      | 0.08                                    | 0.13               | 0.1                | -                  | 0.08               | -                |
| Пентадеценовая    | 0.03                                    | 0.03               | -                  | -                  | -                  | -                |
| Пальмитоолеиновая | -                                       | 0.11               | -                  | -                  | 0.04               | -                |
| Пальмитиновая     | 8.12                                    | 9.9                | 9.0                | 19.2               | 7.45               | 7.8              |
| Гептадеценовая    | -                                       | 0.06               | -                  | -                  | -                  | -                |
| Марганриновая     | 0.08                                    | 0.09               | -                  | -                  | -                  | -                |
| Линолевая         | 52.51                                   | 34.8               | 46.1               | 43.4               | 56.12              | 49.5             |
| Линоленовая       | 0.82                                    | -                  | 3.3                | 0.46               | 0.31               | 0.05             |
| Олеиновая         | 21.13                                   | 25.7               | 32.9               | 25.6               | 24.22              | 27.2             |
| Стеариновая       | 5.20                                    | 11.4               | 5.6                | 8.7                | 5.3                | 5.7              |
| Эйкозеновая       | 1.02                                    | 1.6                | 0.8                | -                  | 0.76               | -                |
| Арахиновая        | 2.85                                    | 6.9                | -                  | 2.63               | 3.04               | 3.6              |
| Гейкозановая      | 0.03                                    | 0.09               | -                  | -                  | -                  | -                |
| Бегеновая         | 2.01                                    | 3.8                | -                  | -                  | 2.08               | 2.6              |
| Лигроцериновая    | 0.57                                    | 0.54               | -                  | -                  | 0.6                | -                |

В таблице 3 приведены литературные данные по определению жирно-кислотного состава масел, полученных разными методами из плодов РП, произрастающей в разных климатических условиях. Наибольшее количество

жирных кислот (24) обнаружено при определении ГЖХ с МСД в образцах масла полученного из РП прессованием [51]. В масле плодов РП, культивированной в Самарской области, полученного прессованием обнаружено 15 жирных кислот [6, 123]. В масле полученного холодным прессованием из плодов, выращенных в Республике Беларусь, при ГХ анализе определено 11 жирных кислот [132]. В масле индийских образцов плодов РП полученного экстракцией петролейным эфиром при ГХ анализе было обнаружено 7 жирных кислот [8]. Наименьшее число жирных кислот (6) определено методом ГХ ПИД в образцах масла полученного СЭ н-гексаном из плодов РП, произрастающей на территории Республики Беларусь [27].

Основным жирно-кислотным профилем масла РП являются ненасыщенные – линолевая и олеиновая, насыщенные – стеариновая, пальмитиновая и арахидоновая кислоты. Во всех пробах масла преобладает линолевая кислота. Наибольшее количество ее обнаружено в масле, полученного холодным прессованием из плодов РП, собранных в Республике Беларусь. Наименьшее – в масле из плодов РП, культивируемой в Самарской области. В содержании жирных кислот в масле РП наблюдается большой разброс. Это может быть связано с методикой определения метиловых эфиров, методом получения масла. На состав масла так же может влиять хемораса растения, климатические условия, состав почвы, наличие или отсутствие искусственного орошения и удобрения.

В литературе нет данных о влиянии природно-климатических условий на жирно-кислотный состав масла плодов РП дикорастущей. В связи с этим одной из задач исследования является изучение этого влияния на накопление жирных кислот в масле плодов РП, произрастающей на территории Дагестана.

#### 1.4.3 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) это один из немногих эффективных методов контроля качества и подлинности растительных масел и животных жиров, который не требует больших затрат реактивов, растворителей, дополнительного лабораторного оборудования. Преимуществами

этого метода является экспрессность и высокая чувствительность к составу жировой фазы проб [133]. С помощью этого метода можно подтвердить или опровергнуть подлинность образца масла, по характерному профилю термограмм ДСК. Он дает возможность проверить географическое происхождение, сорт, расу масличного растения из которого извлечено масла [134]. В работе Рудакова О. Б. с соавторами предложен способ идентификации растительных масел, с использованием контрольных карт, визуализирующих цифровую информацию, содержащую несколько параметров термограмм [135]. Изучены теплофизические свойства масел амаранта, льна, подсолнечника, рапса, расторопши, кукурузы, рыжика и тыквы [134–136]. Эти масла при комнатной температуре жидкие. Полученные при ДСК пики и площади на термограммах, сопоставлены с жирно-кислотным и триглицеридным составом, найденными хроматографическими методами. Установлены значимые корреляции между тепловыми эффектами и химическим составом масел. Тап С.Р. с соавторами в работе [137] сопоставляют кривые кристаллизации и кривые плавления растительных масел и животных жиров с данными о жирно-кислотном и триглицеридном составе хроматографического анализа. Воспроизводимость кривых плавления лучше, чем кривых кристаллизации [138, 139]. При быстром нагревании со скоростями 10–20 °С/мин пики тепловых эффектов разделяются хуже, частично или полностью сливаются, это снижает достоверность термограмм. Снижение скорости нагрева приводит к длительному анализу [139, 140]. Исходя из чего, для метода ДСК рекомендована скорость нагрева или охлаждения 5 град/мин [137].

В работах [9, 141] приведены результаты термического анализа образцов масел плодов РП, произрастающей в различных областях Туниса. Выявлено, что при нагревании от – 60 до 90°С в масле РП различного географического положения на кривых плавления ДСК наблюдается от 4 до 5 пиков (таблица 4).

При изучении профилей диаграмм плавления ДСК масел РП сделан вывод об их уникальности, и дано объяснение эндотермических переходов, которые связаны с наличием в образце таких молекулярных разновидностей ТАГ, как трилинолеилглицерин LLL (22.30 %), олеилдилинолеилглицерин OLL (20.40 %),

пальмитилдидиолеилглицерин PLL (17.31 %) пальмитилолеиллинолеилглицерин POL(14.30 %) и диолеилинолеилглицерин OLL (7.90 %), что не противоречит данным [9, 140] с учетом природной variability, обусловленной генотипическими и фенотипическими факторами.

Таблица 4 - Температуры максимумов эндотермических пиков масла расторопши пятнистой, произрастающей в разных районах Туниса

| Место   | Температура, °С |       |      |       |      |
|---------|-----------------|-------|------|-------|------|
|         | 1               | 2     | 3    | 4     | 5    |
| Бизерта | -22.9           | -11.6 | -3.3 | 2.89  | 11.6 |
| Зигуан  | -20.5           | -11.9 | -3.1 | 4.6   | –    |
| Сус     | -20.6           | 11.6  | -0.4 | 11.36 | –    |

#### 1.5 Почвенно-климатические условия произрастания расторопши пятнистой в Республике Дагестан

Дагестан расположен на большей части северо-восточного склона Большого Кавказа и Восточного Предкавказья, занимая область водораздельной линии Главного Кавказского хребта на юго-западе, горным массивом Базардюзю и нижним течением реки Самур на юго-востоке, Берегом Каспийского моря на востоке, рекой Кума на севере. В связи с геоморфологическим строением Дагестану характерна вертикальная поясность. Б. Ф. Добрытин разделил территорию республики на четыре физико-географических района: Низменный (равнинный), Предгорный (низкогорный), Внутригорный (среднегорный), Высокогорный (альпийский) [142, 143].

*Низменный или равнинный Дагестан* занимает около 46 % всей площади и расположен на юго-западной части прикаспийской низменности от реки Кума на севере до Кавказских гор на юге. По климатическим условиям делятся на два района – северный и южный. Северный район отличается резким континентальным, засушливым климатом. Сумма годовых осадков составляет 300 мм. Основная масса осадков (около 70 %) выпадает в вегетационный период, который составляет 180–210 дней. Наблюдаемый температурный максимум 40–41



°С, минимум – 30–32 °С мороза. Климат южного района мягче. Средняя температура в течение года составляет 11–12 °С, максимум до 36 °С, минимум – 24–28 °С. Сумма осадков в году наблюдается 350–400 мм, из них на вегетационный период приходится 50 %. Этот период составляет 230–250 дней в году. Соседство с Каспийским морем увлажняет воздух [144]. *Предгорный или низкогорный Дагестан* является самостоятельной физико-географической провинцией, где высота над уровнем моря колеблется от 150 до 1200 м, с характерными степными, лесостепными, горно-луговыми высотными ландшафтами [145]. Он делится на северо-западный предгорный, центральный предгорный, юго-восточный предгорный районы. Долина реки Сулак отделяет его от центральных предгорий. Климат этого района умеренно континентальный – зимы здесь в верхних предгорьях прохладные, в нижних предгорьях теплые. Средне годовая сумма осадков 350–900 мм в год. Наибольшее их количество приходится на конец весны -начало лета. Платообразная предгорно-равнинная часть района имеет недостаточное увлажнение, из почв встречаются темно-каштановые, каштановые и коричневые горные почвы. На хребтах (500–600 м) увлажнение больше и преобладают горнолесные бурые, черноземовидные почвы. Верхние склоны гор покрыты горнолесными бурими почвами. *Центральный предгорный район* расположен на участке от реки Сулак на северо-западе до реки Уллучай -на юго-востоке. Климат в этом районе умеренно-континентальный, с недостаточным увлажнением. Средне годовая сумма осадков составляет 350–600 мм в год. Наибольшая часть осадков наблюдается на верхних склонах гор, в долинах наименьшая. Различие в литологическом составе пород, в рельефе и увлажнении привело к разнообразию почвенно-растительного покрова района. В низких предгорьях до высоты 300–400 м встречаются каштановые и светло-каштановые почвы. [146]. *Юго-восточный предгорный район* начинается южнее реки Уллучай и располагается до реки Самур на границе с Азербайджаном. Здесь умеренно-континентальный, несколько более влажный, чем район центральных предгорий, климат. Годовая сумма осадков составляет 350–600 мм. Почвенно-растительный покров района неоднороден и изменяется с высотой. Предгорные

плато имеют каштановые и светло-каштановые почвы. Платообразные образования на высотах 300–500 м покрыты каштановыми почвами. В долинах и котловинах с большим грунтовым увлажнением сформировались лугово-солончаковые, аллювиально-луговые, лесные почвы. *Внутригорный Дагестан* располагается на высотах от 600 – 700 до 1100 –1200 м. Замкнутость территории этого района существенно влияет на температурный режим и количество осадков. Почти круглый год здесь наблюдается положительная температура. Среднегодовая температура составляет +9.8°C. сумма годовых осадков составляет 389 мм. Почвы здесь горностепные каштанового типа и горностепные [147]. *Высокогорный Дагестан* простирается запада – северо-запада на восток юго-восток, образован частью Главного Кавказского (Водораздельного) хребта, звеньями Бокового хребта и расположенными между ними межгорными котловинами. Зимы здесь холодные и длительные, лета короткие. Годовая сумма осадков 800–1000 мм [148].

Являясь эврибионтом, РП приспособилась практически ко всем эколого-географическим факторам распространена в РД повсеместно, кроме высокогорья. Хорошо развиваются дикие популяции вдоль дорог, заброшенных полей, пастбищ, огородов. В связи с жаркими климатическими условиями цветение и плодоношение РП в Дагестане происходит раньше, чем в других областях РФ [149–151]. В таблице 5 приведены климатические и почвенные условия произрастания плодов РП в разных районах РД в период активной вегетации 2020 г [152, 153].

С.-Стальский район расположен в Южном Предгорье, Марамкентский район в предгорной и приморской части Южного Дагестана, Кайтагский район расположен в юго-восточной части Предгорного Дагестана, Левашинский район находится в горной части, Кулинский район – на границе внутригорного и высокогорного Дагестана.

Таблица 5 – Условия прорастания плодов расторопши пятнистой в Дагестане (2020 г)

| Условия произрастания                                    | Район         |                 |                 |                    |                     |
|--|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|---------------------|
|  | Кулинский     | Левашинский     | Магарамкентский | Сулейман Стальский | Кайтагский          |
| Высота, м н.у.м., Н                                      | 2066          | 1593            | 532             | 480                | 408                 |
| Тип почвы  | Горно-луговой | Горнокаштановый | 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, G                             | 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, T <sub>ср</sub> | 20            | 24              | 25              | 25                 | 26                  |
| Амплитуда температуры °С, аТ                             | 38            | 35              | 36              | 37                 | 35                  |
| Сумма осадков, мм, W <sub>1</sub>                        | 515           | 332             | 128             | 123                | 59                  |
| Влажность воздуха, %, W <sub>2</sub>                     | 55            | 52              | 50              | 49                 | 45                  |
| Количество солнечных дней, S                             | 46            | 73              | 77              | 77                 | 68                  |
| Сумма активных температур, °С, ΣТ                        | 2173          | 2746            | 3005            | 3168               | 3111                |
| ГТК *  | 2.4           | 1.2             | 0.4             | 0.4                | 0.2                 |

ГТК\* – гидротермический коэффициент; Величина ГТК в пределах 1.0-1.4 характеризует оптимальные условия увлажнения, более 1.4 – избыточные, менее 1.0 – засушливые условия [154].

С увеличением высоты над уровнем моря ( $H$ ) места сбора РП уменьшается средняя дневная температура ( $T_{cp}$ ), количество солнечных дней ( $S$ ) и сумма активных температур ( $\Sigma T$ ), увеличивается влажность воздуха ( $W_2$ ), сумма осадков ( $W_1$ ) и гидротермический коэффициент (ГТК) [152, 153]. Кайтагский, С.-Стальский и Магарамкентский районы относятся к засушливым районам, гидротермический коэффициент составляет 0.2 и 0.4, что в разы меньше 1.0. Левашинский район имеет оптимальные условия увлажнения, гидротермический коэффициент составляет 1.2. Увлажнение в Кулинском районе избыточное, гидротермический коэффициент составляет 2.4, что превышает оптимальное увлажнение в более чем в полтора раза [154].

#### 1.6 Вывод к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Являясь инвазивным, неприхотливым сорняком, РП произрастает на территории Дагестана практически во всех природно-климатических зонах. Она образует обширные дикие заросли на заброшенных пахотных землях, необрабатываемых огородах, садах, по краям дорог и т.д. В зависимости от генотипических и фенотипических факторов: сорта, места произрастания, климатических и иных условий возделывания качественный состав БАВ и их количественное содержание в растительном сырье и в продуктах их переработки может меняться. Однако, к началу наших исследований в научной литературе отсутствовали сведения о химическом составе плодов РП, произрастающей в районах Дагестана отличающихся почвенно-климатическими условиями.

В связи с этим целью данной диссертационной работы являлась идентификация и количественное определение важнейших БАВ (масло, белки, флаволигнаны, витамины, углеводы, микро- и макроэлементы) в плодах РП, дикорастущей на территории Дагестана, применением современных инструментальных методов анализа.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- изучение и оптимизация условий экстракции жирного масла из плодов РП различными методами;

- установление числовых показателей и жирно-кислотного 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.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Ресурсы, аппаратура и методы

#### 2.1.1 Оборудование, реактивы и материалы

##### *Оборудование:*

- лабораторная экстракционная система модели SFE 1000M1-2-FMC 50 (Waters Corporation);
- газовый хроматограф Agilent Technologies 7820A GC System Maestro оснащенный масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 Series MSD с ионизацией электронным ударом, энергия ионизации 70 эВ, с кварцевой капиллярной колонкой с малополярной неподвижной фазой HP – 5ms 30 м × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм;
- хроматограф жидкостной LC-20AD Prominence производства фирмы Shimadzu, состоящий из насоса LC-20AD, дегазатора DGU-20A, инжектора для ручного ввода проб производства фирмы Rheodyne, спектрофотометрического детектора SPD-20A, системного контроллера CBM-20Alite, термостата колонок CTO-20A;
- хроматограф «LC 20 Prominence» (Shimadzu) (дегазатор DGU-20A5, насос LC20AD, автоматический дозатор SIL-20A, термостат колонок CTO-20AC, спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы SPD-M20A, масс-спектрометрический детектор LCMS-2010EV);
- колонка хроматографическая с привитой обращенной фазой C18 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, зернением 5 мкм с соответствующей предколонкой ZORBAX ODS производства фирмы Agilent Technologies, кат. № 880952-702;
- колонка Luna C18 100A 250×2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex) с предколонкой C18 4×2.0 мм (Phenomenex). Luna C18 100A 250 (длина)×2.0 (диаметр) мм, 5 мкм (зернение);
- колонка для ионообменной хроматографии 150×4.6 мм СТ/ДВБ, размер зерен 7 мкм, 10% Na<sup>+</sup>;
- система МВ минерализации «TOPware» (Analytik Jena);
- атомно-адсорбционный спектрометр contra «AA 700» (Analytik Jena);

- установка для разложения белка «Turbotherm» (Gerhardt);
- установка для перегонки аммиака «Vapodest» (Gerhardt);
- спектрофотометр «SPECORD 210 Plus BU» (Analytik Jena);
- лабораторная мельница «ЛМ-201» (Плаун);
- роторный испаритель «ИР-1М3» (ЛОИР);
- термореактор «Термион» (Люмекс);
- анализатор жидкости «Флюорат-02-5М» (Люмекс);
- прибор синхронного термического анализа «STA 449 F3 Jupiter» (NETZSCH);
- весы аналитические «HTR-220CE» (ViBRA);
- весы технические «Leki (MEDIORA OY)
- сушильный шкаф «МК СПУ» (Смоленское СКТБ СПУ);
- электроплитка бытовая EN – 901B (Energy);
- центрифуга «ЦЛМН-Р10-01» (Элекон);
- рН метр «150 МИ» (ООО «Измерительная техника»);
- механическая мешалка «ПЭ-610» (ЭКРОС);
- ультразвуковая ванна «Сапфир 5,7» (Сапфир);
- водяная баня «LB-140» (ЛОИР);
- рефрактометр «ИРФ-454Б2М» (КОМЗ);

*Реактивы:*

- вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- перекись водорода по ГОСТ 177, 30%, медицинский;
- муравьиная кислота по ГОСТ 5848 (ч.д.а.);
- кислота соляная 35%, ГОСТ 3118-77 (х.ч.);
- кислота сульфосалициловая 2-водная по ГОСТ 4478 (ч.д.а.);
- кислота серная по ГОСТ 420 (х.ч.);
- кислота ортофосфорная ГОСТ 6552-80 (х. ч.);
- кислота уксусная по ГОСТ 61-75 (х.ч.);
- кислота хлорная ГОСТ 6552-80 (х.ч.);
- азотная кислота ГОСТ 4461-77 (ч.д.а.);
- 2,2-тиодигликоль (тиодигликоль) (95 %);

- эфир петролейный ТУ 2631-074-44493179-01 (ч.);
- н-гексан ГОСТ 9832-2015 (х.ч.);
- азот в баллонах по ГОСТ 9293 (о.с.);
- аргон в баллонах по ГОСТ 10157-2016 (х.ч.);
- углекислый газ в баллонах ГОСТ 8050-85 (х.ч.);
- ацетилен в баллонах ГОСТ 2768-84 (х.ч.);
- пропан в баллонах ГОСТ 20448-90 (х.ч.);
- кислота цистеиновая;
- метионин сульфон;
- гидроокись натрия по ГОСТ 4328 (х.ч.);
- фенол ГОСТ 23519-93 (х.ч.);
- натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280 (ч.д.а.);
- натрий хлористый по ГОСТ 4233 (х.ч.);
- 1-октанол;
- натрия дисульфит ГОСТ 246-76 (т.);
- нингидрин (х.ч.);
- гидрохинон ГОСТ 19627-74 (т.);
- оксид фосфора (ч.);
- калий сернокислый по ГОСТ 4145-74 (ч.д.а.);
- медный купорос ГОСТ 19347-2014 (ч.д.а.);
- метиловой красный ТУ6-09-5169-84 (ч.д.а.);
- метиленовый синий ТУ 2463-044-05015207-97 (ч.д.а.);
- спирт этиловый (ректификованный, высшей очистки, 95–96%);
- натрий сернокислый безводный ГОСТ 4166-76 (ч.);
- натрий металлический ГОСТ 3273-75 (ч.);
- метанол ГОСТ 2222-95 (т.);
- гидроксид бария 8-водный ГОСТ 4107-78 (ч.д.а.);
- этаноламин (98%);
- 1,1,1-Трихлор-2-метил-2-пропанол;
- ЭДТА ГОСТ 10652-73 (ч.д.а.);



- 2.3 –диаминонафталин (95 %);
- селен металлический ГОСТ 10298-79 (о.с.ч.);
- ацетонитрил ТУ 2636-092-44493179-04 (х.ч.);
- стандартные образцы витаминов фирмы НПАЦ «Эколан»: тиамин хлорид (ч.д.а.), никотиновая кислота (ч.д.а.), никотинамид (ч.д.а.), пантотеновая кислота (ч.д.а.), цианокобаламин (ч.д.а.), фолиевая кислота (98%), биотин (ч.д.а.), пиридоксин (ч.д.а.) и рибофлавин (ч.д.а.);
- стандартный образец смеси АК фирмы «Sykam GmbH»: аспаргиновая кислота, аспаргин, треонин, серин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, аланин, цистеин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин, пролин;
- стандартный образец триптофан фирмы «Sykam GmbH»;
- стандартный образец синтетической аминокислоты норлейцин фирмы «Acros organics» (ч.д.а.)
- стандартный раствор смеси 37 метиловых эфиров жирных Supelco 37 Component FAME Mix;
- натрия гидрокарбонат 4201-79 (ч.д.а.);
- натрия карбонат ГОСТ 83-79 (х.ч.);
- глюкоза ГОСТ 6038-79 (х.ч.);
- кислота пикриновая ТУ 6-09-08-317-80 (ч.);
- дигидрофосфат натрия ГОСТ 245-76 (ч.д.а.);
- силибин (98 % HPLC);
- хлороформ по ГОСТ 20015 – 88 (х.ч.);
- калий йодистый по ГОСТ 4232 – 74 (х.ч.);
- натрия тиосульфат 5-водный ГОСТ 27068-86 (ч.д.а.);
- крахмал растворимый по ГОСТ 10163-76 (ч.д.а.);
- йодат калия ГОСТ 4202-75 (х.ч.);
- фенолфталеин ТУ 6-09-07-1610-87 (ч.д.а.);
- 2, 6 – дихлорфенолиндофенолят натрия ТУ 6-09-2808-77 (ч.);

– плоды расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn), собранные в Кайтагском, Сулейман-Стальском, Магарамкентском, Левашинском, Кулинском районах РД в 2017-2020 гг.

### 2.1.2 Приготовление рабочих растворов

*Приготовление раствора метилата натрия.* На аналитических весах в стеклянном стакане взвешивали 1 г металлического натрия. Приливали 50 см<sup>3</sup> метанола, после завершения реакции раствор фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводили до метки метанолом.

*Приготовление раствора 1 М соляной кислоты в метаноле.* Хлорид натрия массой 50 г помещали в колбу с двумя горловинами вместимостью 100 см<sup>3</sup>, смачивали соляной кислотой. По каплям прибавляли концентрированную серную кислоту из делительной воронки со скоростью 1 см<sup>3</sup>/мин. Образующийся газообразный хлороводород вводили в метиловый спирт, до увеличения массы на 4 %.

*Приготовление 0.1 % раствора метилового оранжевого в этиловом спирте.* В 50 см<sup>3</sup> 60 % этилового спирта, находящегося в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, помещали 0.1 г метилового оранжевого и тщательно перемешивали. После растворения объем раствора доводили до метки тем же растворителем.

*Приготовление 0.1 н раствора йода монохлорида.* В склянку с притертой пробкой помещали 11.06 г калия йодида и 7.10 г калия йодата, приливали по 50 см<sup>3</sup> воды и концентрированного раствора хлористоводородной кислоты. Склянку встряхивали с закрытой пробкой до полного растворения, образующегося при реакции йода. Полученный раствор переносили в делительную воронку. Приливали 10 см<sup>3</sup> хлороформа и взбалтывали. В зависимости от цвета хлороформного слоя приливали по каплям 1 % растворы йодата или йодида калия до окрашивания в бледно розовый цвет. После отделения органической фазы водный слой сливали в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> и доводили до метки дистиллированной водой. Раствор имел лимонно-желтый цвет.

*Приготовление 10 % раствора йодида калия.* В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещали около 10 г йодида калия и растворяли в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. После растворения доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

*Приготовление 0.1 н раствора натрия тиосульфата.* Навеску тиосульфата натрия массой 25 г помещали в колбу объемом 1000 см<sup>3</sup> и растворяли в 500 см<sup>3</sup> воды. После полного растворения объем доводили до метки тем же растворителем.

*Приготовление раствора крахмала.* Около 2 г крахмала растирали с 20 см<sup>3</sup> воды. Полученную кашицеобразную массу приливали к 100 см<sup>3</sup> кипящей дистиллированной воды, доводили до кипения. Охлажденный раствор разбавляли 100 см<sup>3</sup> воды.

*Приготовление 0.5 М раствора калия гидроксида.* В мерную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> помещали 3 г калия гидроксида и растворяли в 5 см<sup>3</sup> воды дистиллированной и доводили объем раствора до метки 96 % этиловым спиртом.

*Приготовление 0.5 раствора хлористоводородной кислоты.* В мерную колбу объемом 1000 см<sup>3</sup> наливали 43.5 см<sup>3</sup> концентрированной хлористоводородной кислоты и доводили водой до метки.

*Приготовление 1 % раствора фенолфталеина.* 1 г фенолфталеина помещали в колбу объемом 100 см<sup>3</sup> и растворяли в 96 % растворе этилового спирта. Доводили до метки тем же растворителем.

*Приготовление раствора 0.1 М раствора гидроксида натрия.* 2.1 г натрия гидроксида растворяли в 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и доводили до метки тем же растворителем в мерной колбе на 100 см<sup>3</sup>.

*Приготовление насыщенного раствора калия йодида.* Калия йодид массой 50–55 г растворяли в 50 см<sup>3</sup> воды дистиллированной.

*Приготовление элюента для хроматографии жирорастворимых витаминов.* В склянке вместимостью 1000 см<sup>3</sup> смешивали 500 см<sup>3</sup> изопропилового спирта, 420 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 80 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Полученный

раствор фильтровали через стеклянный фильтр в стеклянную емкость с притертой пробкой.

*Приготовление водно-спиртового раствора калия гидроксида.* Около 1 г калия гидроксида растворяли в смеси изопропилового спирта и воды в соотношении объемов 97:3.

*Приготовление стандартного раствора силибина для спектрофотометрии.* В мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> растворяли 0.02 г СО силибина в 80 см<sup>3</sup> 96 % этилового спирта, при нагревании. После растворения раствор охлаждали, доводили до метки тем же растворителем. Из полученного раствора отбирали 1.0 см<sup>3</sup> раствора, переносили в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> и доводили объем до метки 96 % этиловым спиртом.

*Приготовление стандартного раствора силибина для хроматографирования.* 0.01 г СО силибина растворяли в 50 см<sup>3</sup> ацетонитрила – головной раствор. Для градуировочной кривой готовили растворы концентрациями 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 5.0; 10.0 мкг/ см<sup>3</sup>, путем разбавления основного раствора 95 % спиртом. Последний получили путем двукратного разбавления головного раствора тем же растворителем.

*Приготовление раствора 1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюента В для ВЭЖХ-ДМД-МС).* В колбу на 500 см<sup>3</sup> приливали 500 мкл муравьиной кислоты и доводили раствор до метки дистиллированной водой.

*Приготовление раствора 1 % муравьиной кислоты в воде (элюента А для ВЭЖХ-ДМД-МС).* В мерной колбе вместимостью 500 см<sup>3</sup> растворяли 500 мкл муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

*Приготовление раствора борной кислоты массовой концентрации 40 г/л.* 40 г борной кислоты растворяли в 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды мерной колбе емкостью 1000 см<sup>3</sup>. После растворения объем раствора доводили до метки.

*Приготовление раствора смешанного индикатора.* В мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> растворяли 0.2 г метилового красного и 0.1 г метиленового синего в этиловом спирте, доводили до метки.

*Приготовление 6 M раствора хлористоводородной кислоты, содержащей 1 г фенола.* В мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup> помещали 1 г фенола, приливали 492 см<sup>3</sup> концентрированной хлористоводородной кислоты, растворяли и доводили раствор до метки.

*Приготовление 6 M раствора хлористоводородной кислоты.* В мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup> с 400 см<sup>3</sup> дистиллированной воды приливали 492 см<sup>3</sup> концентрированной хлористоводородной кислоты, перемешивали и доводили раствор до метки.

*Приготовление цитратного буфера.* Натрий лимоннокислый 5 водный массой 19.61 г растворяли в 800 см<sup>3</sup> воды, добавляли 5 см<sup>3</sup> тиодигликоля, 1 г фенола и 16.50 см<sup>3</sup> соляной кислоты. Доводили объем раствора в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> до метки.

*Приготовление цитратного буфера для элюирования 0.12 н, рН = 3.45.* Соль натрия цитрата 2 водного массой 11.8 г, лимонную кислоту массой 6 г растворяли в 800 см<sup>3</sup> воды, добавляли метанола 65 см<sup>3</sup>, 0.5 г фенола и 6.5 см<sup>3</sup> соляной кислоты (добавляли до доведения рН до 3.45). Доводили объем раствора в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> до метки.

*Приготовление цитратного буфера для элюирования 0.2 н, рН = 10.85.* Соль натрия цитрата 2 водного массой 19.6 г, борную кислоту массой 5 г растворяли в 800 см<sup>3</sup> воды, добавляли метанола 65 см<sup>3</sup> и 3.1 г натрия гидроокиси (добавляли до доведения рН до 10.85). Доводили объем раствора в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> до метки водой.

*Приготовление 7.5 M раствора гидроксида натрия.* 300 г гидроксида натрия растворяли в 800 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в мерной колбе на 1000 см<sup>3</sup> и доводили до метки.

*Приготовление 1 % раствора ортофосфорной кислоты.* К 84 см<sup>3</sup> дистиллированной воды приливали 1 см<sup>3</sup> 85 % ортофосфорной кислоты, перемешивали.

*Приготовление 0.6 % раствора ортофосфорной кислоты (элюент А для определения водорастворимых витаминов ВЭЖХ).* 7 см<sup>3</sup> 85 % ортофосфорной

кислоты растворяли в 80 см<sup>3</sup> воды в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> доводили раствор до метки.

*Приготовление стандартного раствора витаминов.* Навески тиамин хлорида, никотинамида, цианокобаламина, пиридоксина, никотиновой, пантотеновой кислот по 0.1 г, рибофлавина 0.03 помещали в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> приливали 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 1 см<sup>3</sup> ортофосфорной кислоты, подвергали действию ультразвука до полного растворения, следя за тем чтобы температура раствора не превышала 25 °С После растворения доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

*Приготовление 0.2 М раствора гидрокарбоната натрия.* В мерную колбу с 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды помещали 16.8 г гидрокарбоната натрия, перемешивали, доводили до метки после растворения.

*Приготовление стандартного раствора фолиевой кислоты и биотина.* Массы витаминов по 0.1 г помещали в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> приливали 2 см<sup>3</sup> 0.2 М раствора гидрокарбоната натрия, подвергали действию ультразвука периодически помешивая для растворения. После растворения полученный раствор доводили до метки.

*Приготовление раствора 0.001 М 2, 6 – дихлорфенолиндофенолята натрия.* Точную навеску массой 0.2200 г 2, 6 –дихлорфенолиндофенолята натрия помещали в химический стакан объемом 1000 см<sup>3</sup>. Приливали 500 см<sup>3</sup> свежeproкипяченной и остуженной дистиллированной воды, перемешивали. Через сутки раствор фильтровали в мерную колбу объемом 1000 см<sup>3</sup>, доводили раствор до метки дистиллированной водой. Раствор хранили не более недели.

*Приготовление 2 % раствора хлористоводородной кислоты.* Отбирали 1 мл 34.18 % раствора хлористоводородной кислоты с плотностью 1.117 г/см<sup>3</sup> в химический стакан с 16 см<sup>3</sup> воды. Перемешивали.

*Приготовление раствора тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.* 1.25 г тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты растворяли в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

*Приготовление 2, 3 – диаминонафталина 0.1 %.* Точную навеску 0.1 г 2, 3 – диаминонафталина отмеривали в химический стакан, растворяли в 80 см<sup>3</sup> 0.1 М растворе хлористоводородной кислоты при слабом нагревании (10 – 15 минут при температуре не выше 50 °С). Полученный раствор переносили в делительную воронку, трижды экстрагировали гексаном по 15 см<sup>3</sup>. Водный слой отделяли, фильтровали через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводили тем же растворителем до метки. Хранили под слоем гексана в холодильнике при температуре до 4 °С. Раствор готовили в день проведения анализа.

*Приготовление спиртового раствора пикриновой кислоты 1%.* 1 г пикриновой кислоты растворяли в 70 см<sup>3</sup> 95 % спирта этилового, фильтровали доводили до метки в мерной колбе до 100 см<sup>3</sup>.

*Приготовление 40 % раствора гидроксида натрия.* В химическом стакане отвешивали 40 г едкого натрия растворяли в 60 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

*Приготовление 20 % раствора карбоната натрия.* В химическом стакане растворяли 20 г карбоната натрия в 80 см<sup>3</sup> дистиллированной водой.

*Приготовление раствора глюкозы.* Глюкозу предварительно сушили до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С. Растворяли 0.05 г в воде в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводили объем до метки водой. Отбирали из полученного раствора 10 см<sup>3</sup> в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup>, доводили до метки тем же растворителем. Раствор готовили в день анализа.

## 2.2 Определение БАВ и минерального состава плодов, масла и шрота расторопши пятнистой

### *Подготовка плодов расторопши пятнистой к исследованию*

Материалом для исследования были плоды РП, заготовленные после созревания в 2017–2020 гг. в Сулейман Стальском, Кайтагском, Магарамкентском, Левашинском, Кулинском районах Дагестана. Выбор районов обусловлен различием высоты над уровнем моря, климатических условий и

почвенного состава (таблица 5) [152, 153]. Семена собирали ранним утром, пока корзинки не раскрылись полностью, что исключало их рассыпание. Очищенные от посторонних примесей, плоды сушили воздушно-теневым способом, в хорошо проветриваемом помещении, без попадания прямых солнечных лучей при комнатной температуре. Сухие плоды РП представляли собой зерна от коричневого с черными вкраплениями до полностью черного цвета длиной 5–7 мм, шириной от 2 до 4 мм, массой  $21 \pm 1$  мг. Основную массу плода составляли крупные семядоли. Перед экстракцией, образцы плодов РП сушили в термостатируемом шкафу при температуре  $50 \pm 2$  °С до влажности  $5 \pm 1$  %, измельчали на лабораторной мельнице ЛМ-201, просеивали через сито. Готовые пробы хранили в герметично укупоренной таре из темного стекла в холодильнике при температуре  $4$  °С $\pm 2$ .

### 2.2.1 Определение содержания жирного масла

Суммарное содержание БАВ (масла, флаволигнанов, углеводов, белков) в исследуемых образцах определяли по стандартным методикам, приведенным в ГФ РФ XIII издания [69]. Содержание масла определяли методом Рушковского в аппарате Сокслета исчерпывающей экстракцией н-гексаном. Для этого измельченные до размера 0.1–1.0 мм плоды засыпали в предварительно обезжиренный и высушенный до постоянной массы патрон из фильтровальной бумаги. Запечатанный патрон помещали в аппарат для экстракции. Аппарат Сокслета плотно присоединяли с круглодонной колбой со шлифом с одной стороны и с обратным холодильником, с другой стороны. Колбу помещали на водяную баню. Нагревание проводили постепенно до закипания, затем интенсивно кипятили с частотой сливов 8–10 сливов в час. Процесс продолжали до обесцвечивания извлечения в экстракторе. Это заняло около 16 часов непрерывного экстрагирования. Полученный экстракт перегоняли на роторном испарителе. Патрон с ЛРС помещали в сушильный шкаф при 50 °С, сушили до постоянной массы. Выход масла определяли по убыли массы патрона с измельченными плодами.



### 2.2.2 Определение суммарного содержания флаволигнанов

Суммарное содержание флаволигнанов в плодах РП определяли по методике, рекомендованной в частной фармакопейной статье «Плоды расторопши пятнистой» [69]. Для извлечения флаволигнанов отвешивали 0.5 г пробы и помещали в круглодонную колбу со шлифом, заливали 50 см<sup>3</sup> 95 % этилового спирта и кипятили с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента) в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>. К растительному сырью приливали 50 см<sup>3</sup> того же растворителя и повторяли процесс экстракции еще два раза. Отфильтрованные порции объединяли и доводили объем извлечения до метки тем же растворителем. Из полученного раствора отбирали 1 см<sup>3</sup> экстракта в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> доводили объем до метки этиловым спиртом той же концентрации. На спектрофотометре SPECORD 210 Plus BU (Analytik Jena, Германия) снимали спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн от 200 до 450 нм. В качестве раствора сравнения использовали стандартный раствор силибина.

На рисунке 2 приведены УФ спектры поглощения стандартного раствора силибина и спиртового извлечения плодов РП. Максимум поглощения для стандартного раствора силибина и спиртового извлечения из плодов РП наблюдался при длине волны 288 нм.

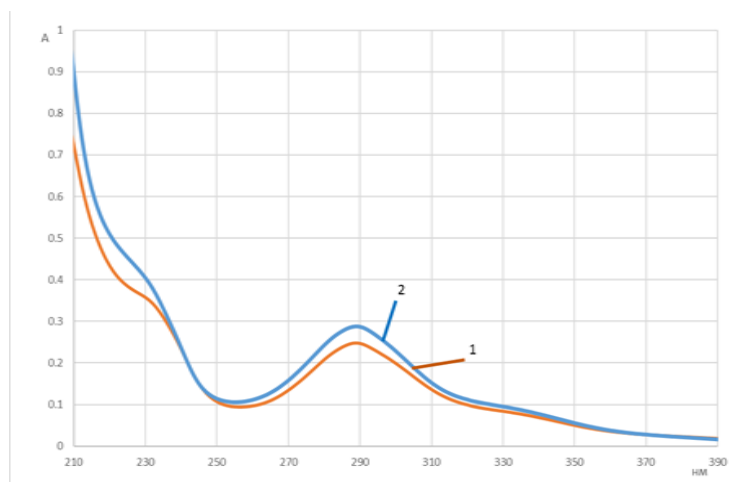


Рисунок 2 – УФ спектры спиртового раствора ГСО силибина (1) и спиртового извлечения плодов расторопши пятнистой (2).

### 2.2.3 Определение содержания углеводов

Для определения углеводов применяли модифицированный метод определения с пикриновой кислотой [155]. Навеску измельченного сырья массой 1.0 г (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 см<sup>3</sup>, приливали 80 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 8 см<sup>3</sup> концентрированной хлористоводородной кислоты, и присоединяли к обратному холодильнику. Нагревали на кипящей водяной бане в течение часа, затем охлаждали, процеживали через несколько слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Оставшееся сырье промывали 10 см<sup>3</sup> воды и объединяли с экстрактом. Объем полученного раствора доводили до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора отбирали 10 см<sup>3</sup> и помещали в колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>, приливали по каплям 40 % раствор гидроксида натрия до рН среды 4.0 – 4.5. Полученный раствор доводили до метки дистиллированной водой и фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента), при этом первые порции фильтрата отбрасывали. Из полученного раствора отбирали 5.0 см<sup>3</sup> в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup>, добавляли 2.5 см<sup>3</sup> 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты, 7 см<sup>3</sup> 20 % раствора карбоната натрия, перемешивали, нагревали в течение 10 минут на водяной бане. Охлаждали под струей холодной воды до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки водой. В качестве раствора сравнения использовали холостой раствор без добавления экстракта. Параллельно определяли оптическую плотность стандартного раствора глюкозы. Оптические плотности растворов снимали на спектрофотометре SPECORD 210 при длине волны 630 нм.

### 2.2.4 Определение общего содержания белка

Общее содержание белка определяли методом Кьельдаля, приведенного в ГФ РФ XIII [69]. Для минерализации пробы, точную навеску сырья (около 1 г) помещали в сосуд для минерализации, заливали 25 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. В качестве катализатора использовали сульфат натрия и сульфат меди. Нагревание проводили на установке для разложения белка Turbotherm

(Gerhardt) при температуре 200 °С – 5 мин, 300 °С – 10 мин, 420 °С – 40 мин. Прозрачный минерализат переносили в установку для перегонки аммиака Varodest (Gerhardt). Перегонку проводили с добавлением избытка 40 % раствора гидроксида натрия. В приемной колбе находилась борная кислота со смешанным индикатором (метиловый красный и метиленовый синий спиртовой раствор 2:1). Дистилляцию проводили до перехода цвета смеси индикаторов от красно-фиолетового до зеленого. Дистиллят титровали 0.1 М раствором серной кислоты до перехода окраски с зеленой в красно-фиолетовый.

### 2.2.5 Определение минерального состава

Для определения минерального состава пробы подвергали минерализации с помощью микроволновой системы минерализации TOPware (Analytik Jena). В фторопластовый сосуд отвешивали точную навеску 0.5 г измельченной пробы, заливали 7 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и 1 см<sup>3</sup> 30 % пероксида водорода и подвергали микроволновой обработке при температуре 190 °С в течение 30 мин. По истечении времени сосуд охлаждали до комнатной температуры. Минерализат отфильтровывали через бумажный фильтр (синяя лента) в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> и доводили до метки бидистиллированной водой. В полученных растворах макро- и микроэлементы определяли атомно-адсорбционным методом с использованием режима пламенной атомизации на приборе contra AA 700 (Analytik Jena Германия).

Для определения содержания селена минерализацию сырья проводили в терморекторе «Термион» (Люмекс). В термостойкие пробирки отвешивали около 0.05 г измельченной точной навески образцов, заливали по 1 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и 0.7 см<sup>3</sup> концентрированной хлорной кислоты, плотно закрывали. Нагревали пробирки с образцами сначала при 120 °С – 60 минут, затем при 150 °С – 30 минут. Затем охлаждали на водяной бане. После охлаждения пробирки открывали и капали по 2 – 3 капли 30 % перекиси водорода, для удаления паров азотной кислоты. Обрато закрывали пробирки и продолжали нагревание при 110 °С в течении 10 минут. Охлаждали и добавляли 1

см<sup>3</sup> 6 М раствора хлористоводородной кислоты и нагревали в течении 10 минут при температуре 110 °С, для восстановления шестивалентного селена до четырехвалентного. По истечении времени, пробы вынимали из термореактора и добавляли по 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Маскировку мешающих металлов проводили 0.5 см<sup>3</sup> раствором натриевой соли ЭДТА кислоты в присутствии 1 см<sup>3</sup> раствора аммиака. Для конденсации селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином быстро доводили рН до 1–1.5. К полученным растворам приливали по 1 см<sup>3</sup> раствора 2,3-диаминонафталина и выдерживали пробирки в темном месте 30 минут. После истечения времени комплекс 4,5-бензопиазоселенола экстрагировали из водного раствора н-гексаном в течение минуты. Величину флуоресценции органического экстракта измеряли на анализаторе жидкости «Флюорат-02-5М» при длине волны возбуждения 376 нм и эмиссии 519 нм [156].

На рисунке 3 приведен градуировочный график интенсивности флюоресценции комплекса 4,5-бензопиазоселенола в зависимости от концентрации селена.

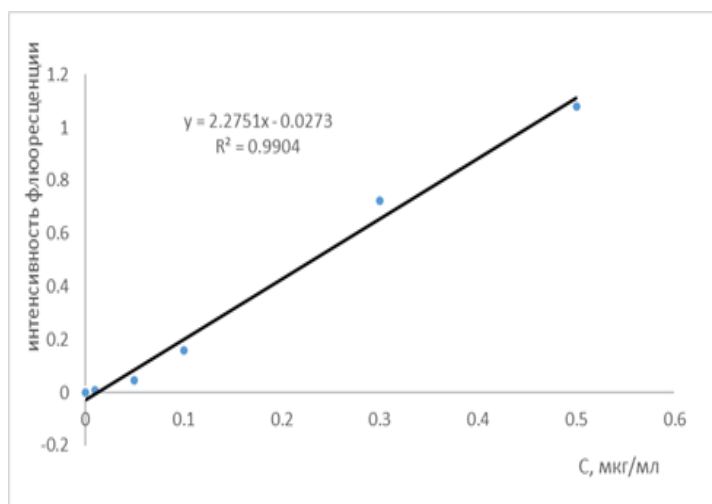


Рисунок 3 - Градуировочный график интенсивности флюоресценции комплекса 4,5-бензопиазоселенола в зависимости от концентрации селена.

### 2.3 Оптимизация условий экстракции жирного масла из плодов расторопши пятнистой

Для определения оптимальных условий экстракции масла из РП использовали плоды, собранные в окрестностях селения Хосрех Кулинского района Республики Дагестан (2066 м над уровнем моря) в июле 2019 года.

Для определения зависимости выхода масла плодов РП от степени измельчения провели СКФЭ-СО<sub>2</sub> разных фракций. Параллельно проводили исчерпывающую экстракцию масла в аппарате Сокслета [69]. Выход масла из плодов РП в зависимости от размера фракции определяли при давлении диоксида углерода 45.0 МПа; температуре 40 °С; скорости потока диоксида углерода 50 г/мин; продолжительности экстракции 60 минут. Процесс СКФЭ-СО<sub>2</sub> проводили с использованием лабораторной экстракционной системы: модель SFE 1000M1-2-FMC 50 производства компании «Water Corp.» [87].

Для математического описания процесса извлечения масла СКФЭ-СО<sub>2</sub> из фракции 0.1-1.0 мм плодов РП в зависимости от давления, температуры и времени составлен и реализован полнофакторный рототабельный униформ-план второго порядка [90, 91]. Для этого использован полином второго порядка (1). В таблице 6 приведены условия планирования эксперимента (основной, верхний и нижний уровни, интервал варьирования и звездные точки). Для расчета интервала варьирования факторов эксперимента использовали формулы 2, 3, 4. Значение факторов основного уровня (центра плана) рассчитывали по формулам 5, 6, 7. В качестве основного уровня давления (x), температуры (y) и времени (z) выбраны 25.0 МПа, 45 °С и 90 мин, при интервалах варьирования 10.0 МПа, 15 °С, 30 мин соответственно. Звездное плечо плана для трехфакторных экспериментов, согласно рекомендации составляет 1.682. При расчете звездных точек факторов давления, температуры и времени использовали формулы 8, 9, 10. В таблице 6 приведена матрица планирования эксперимента с факторами в натуральном и кодированном виде (давление x, температура y, время z) [90].

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_{12}x_1x_2+b_{13}x_1x_3+b_{23}x_2x_3+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{33}x_3^2 \quad (1)$$

$$\Delta P = \frac{P_{max} - P_{min}}{2} \quad (2)$$

$$\Delta T = \frac{T_{max} - T_{min}}{2} \quad (3)$$

$$\Delta \tau = \frac{\tau_{max} - \tau_{min}}{2} \quad (4)$$

$$P_{\text{ц}} = \frac{P_{max} + P_{min}}{2} \quad (5)$$

$$T_{\text{ц}} = \frac{T_{max} + T_{min}}{2} \quad (6)$$

$$\tau_{\text{ц}} = \frac{T_{max} + T_{min}}{2} \quad (7)$$

$$P_x = \frac{P - P_{\text{ц}}}{\Delta T} = \pm 1.682 \quad (8)$$

$$T_x = \frac{T - T_{\text{ц}}}{\Delta T} = \pm 1.682 \quad (9)$$

$$\tau_x = \frac{\tau - \tau_{\text{ц}}}{\Delta \tau} = \pm 1.682 \quad (10)$$

Таблица 6 – Условия планированного эксперимента для определения оптимальных условий экстракции жирного масла плодов расторопши пятнистой

| Уровни факторов       | Натуральные значения |                 |            |
|-----------------------|----------------------|-----------------|------------|
|                       | Давление, МПа        | Температура, °С | Время, мин |
| Основной уровень      | 25.0                 | 45              | 90         |
| Интервал варьирования | 10.0                 | 15              | 30         |
| Верхний уровень       | 35.0                 | 60              | 120        |
| Нижний уровень        | 15.0                 | 30              | 60         |
| Звездные точки        |                      |                 |            |
| (+1.682)              | 41.8                 | 70              | 40         |
| (-1.682)              | 8.2                  | 20              | 140        |

Пробу измельченных плодов массой 40.0 г помещали в автоклав объемом 200 см<sup>3</sup> и обрабатывали: при давлении 8.2–41.8 МПа; температуре 20–70 °С; в течение 40-140 минут при скорости потока диоксида углерода 50 г/мин. По истечении заданного времени, давление в приборе сбрасывали и извлекалась корзина со шротом. С приемника полученное масло сливали в заранее взвешенную пробирку. Каждый опыт при определенных условиях повторяли по

три раза. Массовый выход экстракта определяли по разнице массы сырья до и после экстракции. Полученное масло хранили в хорошо укупоренной таре при температуре 4 °С.

## 2.4 Анализ жирного масла плодов расторопши пятнистой

### 2.4.1 Определение числовых показателей качества

Физико-химическими показателями, характеризующими качество жирных масел, является плотность, показатель преломления, кислотное число, число омыления, перекисное число, эфирное число и йодное число.

Показатели масел РП полученных при разных методах экстракции и из плодов, собранных в разных районах Дагестана определяли по методикам, приведенным в ГФ РФ XIII [69].

#### *Определение плотности и показателя преломления*

Плотность полученных образцов масел определяли по (общей фармакопейной статье) ОФС.1.2.1.0014.15 с использованием пикнометра. Показатель преломления определяли по стандартной методике, приведенной в ОФС.1.2.1.0017.15 рефрактометром при комнатной температуре [69].

#### *Определение числа омыления*

Для определения числа омыления 0.3 г (точная навеска) анализируемого образца масла помещали в коническую колбу со шлифом, приливали 25 см<sup>3</sup> 0.5 М спиртового раствора гидроксида калия. Колбу присоединяли с обратным холодильником и кипятили в течение 30 мин. По истечении времени в колбу с горячим раствором приливали несколько капель фенолфталеина и титровали 0.5 М раствором соляной кислоты.

#### *Определение кислотного числа*

Для определения кислотного числа около 3 г (точная навеска) образца масла помещали в коническую колбу, растворяли в 50 см<sup>3</sup> спиртоэфирной смеси (1:1) и титровали в присутствии фенолфталеина 0.1 М раствором гидроксида калия до появления слабо розовой окраски.

#### *Определение йодного числа*

Для определения йодного числа, в сухой колбе со шлифом взвешивали точную навеску около 0.25 г образца. Приливали 3 см<sup>3</sup> хлороформа и 20 см<sup>3</sup> 0.1 М раствора йодмоноклорида, закрывали колбу пробкой, смоченной 10 % раствором калия йодида, осторожно встряхивали и выдерживали в темном месте в течение 1 часа. Приливали последовательно 10.0 см<sup>3</sup> калия йодида раствора 10 %, 50 см<sup>3</sup> воды и титровали раствором 0.1 М тиосульфата натрия при постоянном энергичном встряхивании до светло-желтой окраски раствора. Прибавляли 3 см<sup>3</sup> хлороформа, сильно встряхивали, затем прибавляли 1 см<sup>3</sup> раствора крахмала и продолжали титрование до обесцвечивания раствора.

#### *Определение перекисного числа*

Для определения перекисного числа, 5 г (точная навеска) масла помещали в коническую колбу с притертой пробкой, приливали 30 см<sup>3</sup> смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (3:2), 0.5 см<sup>3</sup> йодида калия. Встряхивали, колбу с закрытой пробкой до растворения навески. Титровали раствором 0.01 М тиосульфата натрия, до светло-желтого окрашивания. Прибавляли несколько капель раствора крахмала и титровали до обесцвечивания раствора.

#### 2.4.2 Идентификация и определение жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой методом ГХ МС

Для установления жирнокислотного состава образцы масел подвергали переэтерификации раствором метилата натрия в метаноле по ГОСТ Р 31665-2012 [124]. В круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 см<sup>3</sup> вводили 1г (точная навеска) масла, добавляли 10 см<sup>3</sup> 2 М раствора метилата натрия в метаноле и нагревали на водяной бане с обратным холодильником. По истечении 15 мин в реакционную смесь добавляли 13 см<sup>3</sup> метанольного 1 М раствора хлористого водорода и продолжали кипячение 10 мин. Охлажденный раствор разбавляли 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, переносили в делительную воронку и дважды экстрагировали н-гексаном по 10 см<sup>3</sup>. Объединенные экстракты промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции по метиловому красному. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия.



Определение метиловых эфиров жирных кислот осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 7820A GC System Maestro оснащенным масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 Series MSD с ионизацией электронным ударом, энергия ионизации 70 эВ. Для разделения метиловых эфиров жирных кислот использовали кварцевую капиллярную колонку с малополярной неподвижной фазой HP – 5ms 30 м × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм. Условия анализа: температура колонки 185 °С, температура детектора и интерфейса испарителя 250 °С, время анализа 50 мин (изотерма), газ носитель гелий, 1 см<sup>3</sup>/мин (постоянный расход); проба 0.5 мкл с делением потока (Split 1:40).

Идентификацию соединений осуществляли сравнением экспериментальных масс-спектров с библиотечными (Wiley275 и NIST14) масс-спектрами. Для градуировки прибора использовали стандартный раствор метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix. Количественное определение жирных кислот с C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> проводили методом внутренней нормализации площадей соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току [125].

#### 2.4.7 Идентификация и определение жирорастворимых витаминов

Для определения жирорастворимых витаминов проводили щелочной гидролиз экстракта и смеси стандартных образцов, согласно методике, приведенной в ГОСТ 32043–2012 [157]. В коническую колбу объемом 250 см<sup>3</sup> помещали около 10 г (точная навеска), добавляли 0.1 г гидрохинона, заливали 50 см<sup>3</sup> водно-спиртовым раствором гидроксида калия и подвергали омылению с обратным холодильником на водяной бане при температуре 82 – 85 °С в течение 30 мин. После охлаждения, добавляли по 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и н-гексана, тщательно перемешивали и отстаивали. Органический слой сливали в делительную воронку, экстракцию повторяли дважды. Объединённые экстракты промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Промытый экстракт пропускали через обеззоленный фильтр и сушили над безводным

сульфатом натрия. Отгоняли н-гексан на ротационном испарителе при температуре 70 °С, полученный сухой остаток растворяли в 3 см<sup>3</sup> н-гексана.

В качестве стандартных образцов использовали ретинола пальмитат ( $\geq 85$ ), эргокальциферол ( $\geq 98$ ), холекальциферол ( $\geq 99$ ) и токоферола ацетат ( $\geq 97$ ) компании Sigma–Aldrich.

Разделение компонентов проводили на жидкостном хроматографе LC – 20AD Prominence производства фирмы Shimadzu, на колонке C18 (250×4.8 мм, 5мкм) в режиме градиентного элюирования (элюент: А – вода, Б- метанол) (таблица 7), со скоростью потока 1.5 см<sup>3</sup>/мин, температурой термостатирования колонки 40°С и спектрофотометрическом детектировании при длинах волн 280 и 328 нм, проба 20 мкл.

Таблица 7 – Программа градиентного элюирования при определении жирорастворимых витаминов

| Время, мин | Объемная доля компонентов, % |             |
|------------|------------------------------|-------------|
|            | А– вода                      | Б – метанол |
| 0.01       | 8                            | 92          |
| 4.0        | 8                            | 92          |
| 16.0       | 0                            | 100         |
| 22.0       | 0                            | 100         |
| 22.5       | 8                            | 92          |
| 32.0       | 8                            | 92          |

Идентификацию витаминов в масле проводили сравнением времени выхода пиков на хроматограммах растворов смеси стандартных образцов витаминов компании Sigma-Aldrich и экстракта исследуемого образца в н-гексане. Содержание витаминов определяли по площадям соответствующих пиков на хроматограмме исследуемого образца относительно пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов.

#### 2.4.8 Изучение теплофизических свойств масла методом дифференциальной сканирующей калориметрии

Термический анализ образцов масел проводили на приборе синхронного термического анализа STA 449 F3 Jupiter® фирмы “NETZSCH” (Германия). Для анализа отбирали навески образцов масла массой 15–22 мг. Навеску в алюминиевом тигле, накрытым алюминиевой крышкой, помещали в прибор, выполняли взвешивание. Затем температуру навески увеличивали до 60 °С со скоростью 5 град/мин для полного расплавления образца и снятия “тепловой предыстории”. Теплофизические свойства определяли в диапазоне температур от –150 до +20 °С, скорость 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 см<sup>3</sup>/мин, расход защитного газа 10 см<sup>3</sup>/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 [136].

### 2.5 Идентификация и определение БАВ в плодах расторопши пятнистой

#### 2.5.1 Определение флаволигнанов методом ВЭЖХ

В методиках, приведенных в официальных документах, перед определением флаволигнанов, витаминов, аминокислот рекомендуется обезжиривание плодов РП. В связи с этим дальнейшие исследования проводили с обезжиренными плодами.

Для разделения и определения количества силибина, силикрстина и силидианина использовался метод ВЭЖХ [97]. Точную навеску пробы около 0.25 г помещали в колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> заливали 95 % спиртом, соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30

минут. Экстракт охлаждали, фильтровали. Процесс повторяли два раза. Объем в мерной колбе 100 см<sup>3</sup> доводили до метки 95 % спиртом [69].

В качестве стандарта использовали спиртовой раствор стандартного образца (СО) силибина производителя ООО «Фитопанацея» (чистота 98.57%). Хроматографическое определение компонентов осуществляли с помощью хроматографа «LC 20 Prominence» (Shimadzu, Япония) (дегазатор DGU–20A5, насос LC20AD, автоматический дозатор SIL–20A, термостат колонок CTO–20AC, спектрофотометрический детектор на основе диодной матрицы SPD–M20A, масс–спектрометрический детектор LCMS–2010EV). Разделение компонентов проводили на колонках Luna C18 100A 250×2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4×2.0 мм (Phenomenex, США). Luna C18 100A 250 (длина)×2.0 (диаметр) мм, 5 мкм (зернение).

Условия ВЭЖХ-ДМД-анализа. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил (А) и воду, содержащую 0.1 % муравьиной кислоты (В). Устанавливали градиентный режим элюирования, указанный в таблице 8. Скорость потока составляла 0.35 см<sup>3</sup>/мин, термостатирование колонки осуществлялась при 30 °С, объем инжектируемой пробы – 5 мкл. Сбор данных на диодно-матричном детекторе (ДМД) проводили в диапазоне 190–800 нм.

Параметры масс-спектрометрического (МС) детектора: напряжение интерфейса – 3.5 кВ, напряжение детектора – 2.0 кВ, температура линии десольватации – 200°С, скорость потока азота – 1.5 дм<sup>3</sup>/мин. МС-детектирование веществ осуществляли методом ионизации электрораспылением в режиме "negative". Спектры получали в режиме регистрации отрицательных ионов в диапазоне 120–700 m/z с частотой сканирования 2000 а.е.м./с. Сбор и последующую обработку данных осуществляли в программной среде LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Таблица 8 – Программа градиентного элюирования при определении флаволигнанов

| Время, мин | Объемная доля компонентов, % |                              |
|------------|------------------------------|------------------------------|
|            | А (вода-ацетонитрил)         | Б (0.1 % муравьиной кислоты) |
| 0-7        | 30-35                        | 70-65                        |
| 7-15       | 35-50                        | 65-50                        |
| 15-20      | 50-60                        | 50-40                        |
| 20-22      | 60-95                        | 40-5                         |
| 23-24      | 95-30                        | 5-70                         |
| 24-28      | 30                           | 70                           |

На рисунке 4 приведена градуировочная кривая зависимости площадей пиков от концентрации ГСО силибина.

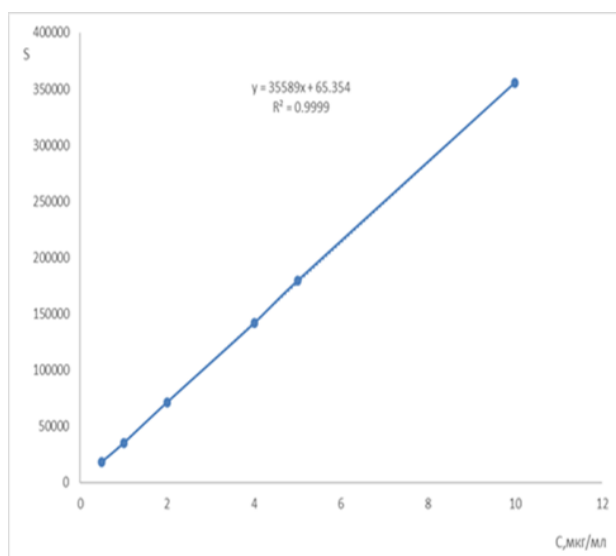


Рисунок 4 – Градуировочная кривая зависимости площадей пиков от концентрации ГСО силибина.

### 2.5.2 Определение аминокислотного состава

Аминокислотный состав белка обезжиренных плодов РП определяли методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином (ГОСТ 32195-2013) [104]. В ампулы для гидролиза помещали около 1 г (точные навески) образцов, вносили по 25 см<sup>3</sup> смеси 6 М хлористоводородной

кислоты и фенола (1 г/дм<sup>3</sup>). Гидролиз проводили в течение 24 часов при температуре 110 °С в термостате. Охлажденные гидролизаты с помощью цитратного буфера (с молярной концентрации ионов натрия 0.2 М) количественно переносили в круглодонные колбы. Раствором гидроксида натрия концентрацией 7.5 М доводили рН растворов до 2.2. Добавляли по две капли октанола-1 и выпаривали образцы на вакуумном роторном испарителе марки ИР-1МЗ при температуре 40 °С. Полученные сухие остатки растворяли в цитратном буфере объемом 200 см<sup>3</sup>. Перед хроматографированием образцы фильтровали через мембранный фильтр.

Для определения триптофана проводили щелочной гидролиз белка (ГОСТ 32201-2013) [105]. Брали 1 г (точная навеска) образца, помещали в колбу с 8.4 г гидроксидом бария, добавляли 10 см<sup>3</sup> воды, перемешивали магнитной мешалкой, промывали стенки колбы 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и плотно закрывали крышку. Нагревали колбу в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 20 ч. После остывания в колбу добавляли 30 см<sup>3</sup> воды. В охлажденный гидролизат добавляли 5 см<sup>3</sup> ортофосфорной кислоты (85 %). Поместив колбу с раствором на охлаждающую баню, нейтрализовали раствор с помощью соляной кислоты 6 М до значения рН=3. Добавляли 30 см<sup>3</sup> метанола и разбавляли водой. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр.

Разделение компонентов смеси аминокислот проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence со спектрофотометрическим детектором с использованием колонки для ионообменной хроматографии 150×4.6 мм СТ/ДВБ, размер зерен 7 мкм, 10% Na<sup>+</sup>. Для градиентного элюирования использовали цитратные буферные растворы (А – 0.12 н, рН = 3.75; Б – 0.2 н, рН = 10.85). Скорость потока составляла 0.45 см<sup>3</sup>/мин, термостатирование колонки осуществлялась при температуре 65 °С, объем пробы 50 мкл. Аддукты всех аминокислот с нингидрином фиолетового цвета регистрировали при 570 нм, кроме пролина, так как он образует с нингидрином желтый аддукт, его регистрировали при 440 нм. Идентификацию аминокислот в белке плодов РП проводили сравнением времен удерживания пиков на хроматограмме

стандартного образца аминокислот фирмы Sykam GmbH и на хроматограмме исследуемого образца. Содержание аминокислот рассчитывали по площадям соответствующих пиков на хроматограмме исследуемого образца белка относительно пиков на хроматограмме стандартного образца.

Для оценки биологической ценности белка плодов РП рассчитали аминокислотный скор (С); разбалансированность аминокислотного сора (РАС); коэффициент разбалансированности аминокислотного сора (КРАС); коэффициент утилитарности аминокислотного состава ( $a_j$ ); обобщающий коэффициент утилитарности аминокислотного состава (U); биологическую ценность (БЦ), индекс незаменимых аминокислот (ИНАК). Формулы для расчета этих показателей приведены далее (11–15) [158, 159].

$$C = \frac{A}{A_э}; \quad (11)$$

где А – содержание аминокислот в белке зерна изучаемого сорта, г/100 г белка;  $A_э$  – содержание аминокислот в идеальном белке, г/100 г белка.

$$КРАС = \frac{\sum_i^n РАС_i}{n}; \quad (12)$$

где  $\sum_i^n РАС_i$  – сумма разбалансированности аминокислотного сора всех незаменимых аминокислот, n- число незаменимых аминокислот.

$$a_j = \frac{C_{min}}{C_j}; \quad (13)$$

где  $C_{min}$  – минимальный аминокислотный скор;  $C_j$  – АК скор j-й незаменимой аминокислоты.

$$U = \frac{\sum_{j=1}^n a_j \times A_j}{\sum_{j=1}^n A_j}; \quad (14)$$

где  $a_j$  – коэффициент утилитарности;  $A_j$  – содержание незаменимой аминокислот в белке шрота РП, г/100г.

Для оценки биологической ценности также использовали другой метод, заключающийся в расчете индекса незаменимых аминокислот ИНАК [158, 159]:

$$ИНАК = \sqrt[n]{\prod_{j=1}^n \left(\frac{A_j}{A_{эj}}\right)}; \quad (15)$$

где  $A_j$  – содержание незаменимой аминокислот в белке шрота РП, г/100 г;  $A_{ej}$  - содержание незаменимой аминокислоты в идеальном белке, г/100 г.

### 2.5.3 Определение водорастворимых витаминов

Содержание водорастворимых витаминов определяли методом ВЭЖХ [112]. Для извлечения витаминов точную навеску измельченных образцов помещали в колбу объемом 50 см<sup>3</sup>, заливали 10 см<sup>3</sup> 1 % раствором фосфорной кислоты (рН 1.5) и обрабатывали ультразвуком частотой 35 кГц в течение часа при температуре 65 °С. Полученные извлечения фильтровали через фильтр разметом пор 0.45 мкм. Хроматографический профиль снимали на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с использованием колонки LUNA C 18 (2). Для разделения витаминов использован градиентный режим, предложенный авторами в работе [112]: элюент А – 0.6 % фосфорная кислота, элюент Б – ацетонитрил (таблица 9). Скорость потока элюента 0.8 см<sup>3</sup>/мин. Температура колонки 20 °С. Прибор был отградуирован по раствору стандартных образцов витаминов тиамин хлорида, никотиновой кислоты, никотинамида, пантотеновой кислоты, цианокобаламин, фолиевой кислоты, биотина, пиридоксина и рибофлавина фирмы «Эколан».

Таблица 9 – Программа градиентного элюирования при определении водорастворимых витаминов

| Время, мин | Объемная доля компонентов, % |                 |
|------------|------------------------------|-----------------|
|            | А – 0.6 % фосфорная кислота  | Б – ацетонитрил |
| 0–6        | 100                          | 0               |
| 6–15       | 100–82                       | 0–18            |
| 15–28      | 82                           | 18              |
| 28–29      | 82–50                        | 18–50           |
| 29–30      | 50–85                        | 50–15           |
| 30–31      | 85–100                       | 15–0            |



Идентификацию витаминов проводили сравнением времен удерживания на хроматограмме стандартного и анализируемых образцов. Определение содержания проводили по площадям пиков на хроматограмме исследуемого образца относительно пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов.

Витамин С определяли методом с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия, приведенным в ГФ РФ XIII [69] титрования. В фарфоровую ступку отбирали 20 г грубоизмельченной аналитической пробы сырья, добавляли 5 г стеклянного порошка и растирали с постепенным добавлением около 300 см<sup>3</sup> воды при комнатной температуре. Настаивали 10 мин. По истечении времени смесь перемешивали и фильтровали через фильтр марки «синяя лента». В коническую колбу для титрования вместимостью 100 см<sup>3</sup> отобрали 1 см<sup>3</sup> фильтрата, прибавили 1 см<sup>3</sup> 2 % раствора хлористоводородной кислоты 13 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, перемешали. Титрование проводили из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0.001 моль/ дм<sup>3</sup>), до появления розового цвета, который держался около 30–60 с. титрование продолжали не более двух минут.

### 3. Результаты и их обсуждение

#### 3.1 Содержания БАВ и минеральных компонентов в плодах дикорастущей расторопши пятнистой

В литературе отсутствовали данные о влиянии природно-климатических условий на накопление БАВ в плодах РП дикорастущей в Дагестане. В связи с этим целью исследования являлась изучение этого влияния на накопление БАВ в плодах РП, произрастающей на территории Дагестана.

Суммарное содержание БАВ в плодах РП произрастающей в Кулинском, Левашинском, Магарамкентском, Сулейман-Стальском, Кайтагском районах РД, климатические и почвенные условия которых приведены в таблице 5, определяли по методикам, приведенным в ГФ РФ XIII издания [69]. Содержание масла в плодах определяли извлечением гексаном по методу Рушковского в аппарате Сокслета, в течение 16 часов. Содержание флаволигнанов определяли спектрофотометрическим методом с предварительным извлечением 95 % этиловым спиртом. Общее содержание углеводов определяли измерением оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с пикриновой кислотой. Содержание общего протеина определяли методом Кьельдаля. В таблице 10 приведено суммарное содержание основных БАВ в плодах РП, произрастающей в разных районах Дагестана.

Таблица 10 – Содержание БАВ в плодах расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане (2020 г) (n=5, p=0.95)

| Район сбора         | Содержание, %             |                       |                          |                                  |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|
|                     | 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                          |
| Литературные данные | 15.5–35<br>[1–3, 22, 123] | 13.5–30.4<br>[34, 35] | 28.5–57.2<br>[34–37, 45] | 1.5–4 [1-3, 17-22,<br>25-27, 93] |

Во всех исследуемых образцах плодов РП, произрастающей в Дагестане, содержание БАВ сопоставимо с данными, приведёнными в источниках [1–3, 17, 22, 34–37, 46, 123, 160, 161].

Согласно [162–164], синтез масла в масличных растениях усиливается с уменьшением температуры воздуха, с ростом количества атмосферных осадков и влажности почвы. В соответствии с этими факторами наибольшее содержание масла обнаружено в плодах РП, собранных в Кулинском районе (29.7 %) и Левашинском (28.2 %), среднее в Магарамкентском (27.9 %) С.-Стальском (27.1 %) и наименьшее в плодах, собранных в Кайтагском районе (26.0 %) (таблица 10). В этих районах с повышением высоты над уровнем моря уменьшается средняя дневная температура и количество солнечных дней, растёт количество атмосферных осадков и гидротермический коэффициент (таблица 5).

Содержание углеводов в исследуемых образцах плодов РП находится в обратной зависимости от содержания масла, так как углеводы служат материалом для синтеза масла [165, 166].

Высокое содержание флаволигнанов обнаружено в образцах плодов РП, собранных в С. - Стальском (4.0 %), Магарамкентском (3.8 %) и Кайтагском (3.8 %) районах, где выпадает наименьшее количество осадков, среднее в Левашинском (3.6 %) и меньшее в Кулинском районе (3.4 %). В работе [35] отмечается, что дефицитное орошение культивируемых сортов РП приводит к увеличению в них содержания флаволигнанов.

Относительно малое содержание белка в плодах дикорастущей РП можно объяснить отсутствием искусственного орошения и удобрения почвы. В работах [167–169] показано, что с ростом количества осадков и суммы положительных температур выше 10 °С содержание белка в злаковых и бобовых культурах увеличивается. В нашем случае понижение температуры нивелируется повышением суммы атмосферных осадков. Этим объясняется, что в плодах, собранных в Кулинском районе содержание белка несколько выше (13.8 %), чем в плодах, собранных в Левашинском (13.4 %) районе, а в Кайтагском, С. –

Стальском и Магарамкентском районах наименьшее количество белка (12.5-12.8 %).

Минеральный состав лекарственных растений является важной характеристикой. С одной стороны, они служат источником макро- и микроэлементов, с другой могут оказаться причиной отравления или накопления токсичных элементов в организме человека. Содержание минеральных компонентов в лекарственном растительном сырье зависит от почвенно-климатических условий места произрастания, количества внесенных при культивировании удобрений. Минеральный состав плодов РП собранных в 2019-2020 гг. определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии [170, 171].

Таблица 11 – Минеральный состав плодов расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане (n=3, p=0.95)

| Элемент       | Содержание в плодах разных районов, мг/кг |             |                 |              |            |
|---------------|---|-------------|-----------------|--------------|------------|
|               | Кулинский                                 | Левашинский | Магарамкентский | С.-Стальский | Кайтагский |
| Натрий (Na)   | 900±5                                     | 400±6       | 240±8           | 89±6         | 650±4      |
| Калий (K)     | 3050±4                                    | 3300±8      | 3900±7          | 2452±5       | 4050±5     |
| Магний (Mg)   | 2750±3                                    | 3100±6      | 2650±4          | 2355±7       | 2450±2     |
| Кальций (Ca)  | 7000±5                                    | 7500±9      | 5500±6          | 5177±6       | 5000±5     |
| Литий (Li)    | 4.65±0.8                                  | 4.7±0.2     | 1.45±0.06       | 10±1         | 8.5±0.6    |
| Марганец (Mn) | 28±5                                      | 73±2        | 73±2            | 36±5         | 69±4       |
| Железо (Fe)   | 102±6                                     | 107±4       | 109±2           | 111±3        | 104±2      |
| Кобальт (Co)  | Не обн.                                   | Не обн.     | Не обн.         | 1.9±0.6      | Не обн.    |
| Никель (Ni)   | Не обн.                                   | 0.86±0.2    | Не обн.         | 0.50±0.04    | 0.57±0.08  |
| Медь (Cu)     | 12±3                                      | 12±2        | 9.6±0.1         | 8.9±0.2      | 25±5       |
| Цинк (Zn)     | 35±3                                      | 42±4        | 31±2            | 46±5         | 27±1       |
| Селен (Se)    | 80±8                                      | 55±3        | 50±4            | 50±6         | 55±4       |
| Стронций (Sr) | 65±6                                      | 20±2        | 25±3            | 37±4         | 31±2       |
| Кадмий (Cd)   | Не обн.                                   | Не обн.     | Не обн.         | Не обн.      | Не обн.    |
| Свинец (Pb)   | 0.4±0.2                                   | 1.0±0.2     | 1.0±0.1         | 0.9±0.1      | 0.4±0.1    |

В составе плодов РП из макроэлементов, как и следовало ожидать, преобладают кальций, калий, магний (таблица 11). Однако содержание калия и кальция в плодах РП, произрастающей в Дагестане, меньше примерно в 4 раза,

магния – в 2 раза, чем описано в [22, 56]. Относительно малое содержание кальция (5000–7500 мг/кг) в плодах дикорастущих популяций РП по сравнению с культивируемыми (11200 мг/кг) можно объяснить внесением в обрабатываемые почвы удобрений типа фосфорно-кальциевых подкормки. Из микроэлементов плоды РП накапливают железо, марганец, цинк, хром, стронций и медь. Причем их содержание на один-два порядка выше по сравнению с литературными данными [22, 56]. В [22, 56] отмечено, что РП наряду с медью концентрирует и селен. Наибольшее содержание селена обнаружено в плодах, собранных в Кулинском (80 мкг/кг), наименьшее в плодах, собранных в Сулейман Стальском и Магарамкентском районах 50-55 мкг/кг. Содержание селена в растениях семейства Астровых, произрастающих в Нечерноземной зоне Российской Федерации, колеблется в пределах 1-348 мкг/кг, средневзвешенное значение составляет 91 мкг/кг [172]. Относительно низкое содержание селена в плодах РП произрастающей в Дагестане можно объяснить, низким содержанием этого элемента в почвах республики [173]. Возрастание содержания селена в плодах от С. Стальского и Магарамкентского к Кулинскому району можно объяснить увеличением содержания гуминовых кислот и уменьшением кислотности почвы (таблица 5). Содержание высокотоксичных элементов – кадмия и свинца не превышает ПДК для лекарственно растительного сырья (1.0 и 6.0 мг/кг соответственно) [69]. Существенное отличие значений содержания макро- и микроэлементов в исследуемых плодах РП, по сравнению с литературными данными [22, 56], по-видимому, связано с каштановым, горно-каштановым типом почв и сухим, полусухим и умеренно континентальным климатом в низменном и предгорном Дагестане.

В рекламных проспектах часто отмечают, что в растительных маслах наряду с БАВ в терапевтических концентрациях содержатся и минеральные компоненты. В связи с чем изучено распределение макро- и микроэлементов в системе «плоды–масло–шрот» на примере плодов РП, собранных в С.–Стальском районе 2017 году (таблица12) [174].

Таблица 12 – Содержание макро- и микроэлементов в плодах, масле и шроте расторопши пятнистой, заготовленных в С.-Стальском районе Дагестана (n=3, p=0.95)

| Элемент       | Содержание, мг/кг |             |         |
|---------------|-------------------|-------------|---------|
|               | Плоды             | Масло       | Шрот    |
| Натрий (Na)   | 89±6              | 0.10±0.05   | 74±5    |
| Калий (K)     | 2452±5            | 13±2        | 2427±2  |
| Магний (Mg)   | 2355±7            | 0.10±0.05   | 2396±1  |
| Кальций (Ca)  | 5177±6            | 0.5±0.2     | 5399±6  |
| Литий (Li)    | 10±1              | 0.2±0.1     | 11±1    |
| Марганец (Mn) | 36±5              | 0.4±0.2     | 33±1    |
| Железо (Fe)   | 111±3             | 0.2±0.1     | 95±3    |
| Кобальт (Co)  | 1.9±0.6           | 0.03±0.01   | 1.5±0.2 |
| Никель (Ni)   | 0.50±0.04         | 0.02±0.01   | 1.1±0.1 |
| Медь (Cu)     | 8.9±0.2           | 0.010±0.005 | 9.9±0.3 |
| Цинк (Zn)     | 46±5              | 0.02±0.01   | 56±4    |
| Стронций (Sr) | 37±4              | 0.010±0.005 | 50±8    |
| Свинец (Pb)   | 0.9±0.1           | 0.010±0.005 | 1.2±0.2 |

Установлено, что в масло переходят не более 0.5 % натрия, калия, магния, кальция, хрома, железа и других элементов, содержащихся в плодах РП. В основном все минеральные компоненты практически полностью остаются в шроте, полученном после извлечения масла из плодов РП СКФЭ-СО<sub>2</sub>.

### 3.2 Экстракция жирного масла из плодов расторопши пятнистой

Наиболее перспективным способом получения масла из плодов РП является сверхкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода (СКФЭ-СО<sub>2</sub>), который позволяет получить натуральное масло в одну технологическую стадию за 1-2 часа.

Для оптимизации процесса извлечения масла из плодов РП СКФЭ-СО<sub>2</sub> использовали метод активного планирования эксперимента. Оптимизирующим параметром являлся выход масла, входными параметрами - давление, температура и продолжительность экстракции [176].

При измельчении плодов РП, предварительно высушенных до влажности  $5 \pm 1$  %, выход фракций 0.1-0.25, 0.25-0.5, 0.5-1.0, 0.1-1.0 мм составил 65.4, 19.9, 12.1 и 97.4 масс. % соответственно. При этом выход фракции меньше 0.1 мм составил 2.6 %. Фракции отличались не только по размеру, но и по составу. Относительно прочная кожура содержалась в основном во фракции 0.5-1.0 мм. Поэтому выход масла из этой фракции оказался минимальным, а из фракции 0.1-0.25 мм максимальным, так как она состоит из семядоли, в клетках которых содержится масло (таблица 13).

Таблица 13 - Выход масла из плодов расторопши пятнистой в зависимости от размера фракции: давление диоксида углерода 45 МПа; температура 40 °С; скорость потока диоксида углерода 50 г/минуту; продолжительность экстракции 60 минут (n=3, p=0.95)

| Метод извлечения | Выход масла, % в зависимости от размера фракции, мм |          |          |          |
|------------------|---|----------|----------|----------|
|                  | 0.1–0.25  | 0.25–0.5 | 0.5–1.0  | 0.1–1.0  |
| СКФЭ             | 30.8±1.0  | 22.8±0.9 | 12.2±0.8 | 26.7±0.9 |

Выход масла из фракции 0.1–1.0 мм плодов РП полученного при СКФЭ-СО<sub>2</sub> сравним со значением  $27 \pm 1$  масс. %, полученным исчерпывающей экстракцией н-гексаном с использованием аппарата Сокслета [177].

Для математического описания процесса извлечения масла СКФЭ-СО<sub>2</sub> из фракции 0.1–1.0 мм плодов РП в зависимости от давления, температуры и продолжительности экстракции составлен и реализован полнофакторный рототабельный униформ-план второго порядка, условия и результаты которого приведены в таблице 14 [176].

В процессе реализации эксперимента проведено 20 опытов, из них 8 в ядре и 6 в центре плана. Число звездных точек 6. Выход масла в зависимости от условий опыта варьировалось от 12.93 до 22.48 %. Дисперсия параллельных опытов в центре плана составила 0.13, что соответствует высокой сходимости результатов. По методу t-статистики [178] рассчитана относительная ошибка

определения выхода экстракта и ошибка проведения процесса экстракции, она составила 0.72 %. Обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы MS Excel. В таблице 15 приведена матрица расчета коэффициентов для полинома второго порядка (1). Коэффициенты рассчитывали по формулам 16–19 [90].

$$b_0 = C_1 \sum_{u=1}^N w_u - C_2 \sum_{i=1}^K \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 w_u \quad (16)$$

$$b_i = C_3 \sum_{u=1}^N x_{iu} w_u \quad (17)$$

$$b_{ij} = C_4 \sum_{u=1}^N (x_i w_j)_u w_u \quad (18)$$

$$b_{ii} = C_5 \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 w_u + C_6 \sum_{i=1}^K \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 w_u - C_2 \sum_{u=1}^N w_u \quad (19);$$

где  $C_1$ – $C_6$  – вспомогательные константы для рототабальных планов, взятые из литературных источников [90], принимают значения 0.16635, 0.0568, 0.07322, 0.125, 0.0625, 0.00689.  $w$ - выход экстракта, %.

Для проверки достоверности полученных коэффициентов рассчитывали дисперсии и их доверительные интервалы по формулам 20 и 21.

$$S_{b_0} = C_7 S_y; \quad S_{b_i} = C_8 S_y; \quad (20)$$

$$S_{b_{ij}} = C_9 S_y; \quad S_{b_{ii}} = C_{10} S_y;$$

$$\Delta b_i = t_{\alpha;f} S_{b_i}; \quad (21)$$

где  $S_{b_i}$ –среднеквадратичная ошибка в определении коэффициента регрессии,  $t_{\alpha;f}$  – критерий Стьюдента, со степенями свободы 5 и 11,  $C_7$ – $C_{10}$ - вспомогательные константы для рототабальных планов, взятые из литературных источников [90], принимают значения 0.40786, 0.27059, 0.35355, 0.26342 соответственно (таблица 16).



Таблица 14 - Матрица планирования и результаты эксперимента

| №           | Величина фактора в натуральном масштабе |       |        | Величина фактора в безразмерной системе координат |        |        | Выход экстракта, %         |            |       |
|-------------|---|-------|--------|---|--------|--------|----------------------------|------------|-------|
|             | P, МПа                                  | T, °C | t, мин | X   | Y      | Z      | Практический (n=3, p=0.95) | по модели  |       |
| Ядро плана  | 1                                       | 15.0  | 30     | 60  | -1     | -1     | -1                         | 14.90±0.09 | 13.93 |
|             | 2                                       | 35.0  | 30     | 60  | +1     | -1     | -1                         | 18.00±0.07 | 17.39 |
|             | 3                                       | 15.0  | 60     | 60  | -1     | +1     | -1                         | 15.03±0.05 | 14.51 |
|             | 4                                       | 35.0  | 60     | 60  | +1     | +1     | -1                         | 22.03±0.06 | 21.81 |
|             | 5                                       | 15.0  | 30     | 120   | -1     | -1     | +1                         | 16.88±0.08 | 16.73 |
|             | 6                                       | 35.0  | 30     | 120   | +1     | -1     | +1                         | 20.30±0.09 | 20.19 |
|             | 7                                       | 15.0  | 60     | 120   | -1     | +1     | +1                         | 15.22±0.09 | 15.43 |
|             | 8                                       | 35.0  | 60     | 120   | +1     | +1     | +1                         | 22.40±0.05 | 22.73 |
| Звездные    | 9                                       | 8.2   | 45     | 90  | -1.682 | 0      | 0                          | 12.93±0.07 | 13.03 |
|             | 10                                      | 41.8  | 45     | 90  | +1.682 | 0      | 0                          | 22.43±0.08 | 22.08 |
|             | 11                                      | 25.0  | 20     | 90  | 0      | -1.682 | 0                          | 16.38±0.05 | 16.75 |
|             | 12                                      | 25.0  | 70     | 90  | 0      | +1.682 | 0                          | 19.98±0.04 | 19.38 |
|             | 13                                      | 25.0  | 45     | 40  | 0      | 0      | -1.682                     | 16.60±0.08 | 16.44 |
|             | 14                                      | 25.0  | 45     | 140   | 0      | 0      | +1.682                     | 21.45±0.03 | 19.57 |
| Центр плана | 15                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.85±0.04 | 18.46 |
|             | 16                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.00±0.06 | 18.46 |
|             | 17                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.30±0.05 | 18.46 |
|             | 18                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.57±0.09 | 18.46 |
|             | 19                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.28±0.08 | 18.46 |
|             | 20                                      | 25.0  | 45     | 90  | 0      | 0      | 0                          | 18.74±0.06 | 18.46 |

Таблица 15 – Матрица расчета коэффициентов полинома второй степени

| №  | x      | y      | z      | x*<br>y | x*<br>z | y*z | x <sup>2</sup> | y <sup>2</sup> | z <sup>2</sup> | W     | x <sup>2</sup> *W | y <sup>2</sup> *W | z <sup>2</sup> *y | x*W   | y*W   | z*W   | x*y*<br>W |
|----|--------|--------|--------|---------|---------|-----|----------------|----------------|----------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------|-----------|
| 1  | -1     | -1     | -1     | 1       | 1       | 1   | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 14.88 | -14.88            | -14.88            | -14.88            | 14.88 | 14.88 | 14.88 | 14.88     |
| 2  | 1      | -1     | -1     | -1      | -1      | 1   | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 18    | 18                | -18               | -18               | 18    | 18    | 18    | -18       |
| 3  | -1     | 1      | -1     | -1      | 1       | -1  | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 15.03 | -15.03            | 15.03             | -15.03            | 15.03 | 15.03 | 15.03 | -15.03    |
| 4  | 1      | 1      | -1     | 1       | -1      | -1  | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 22.03 | 22.03             | 22.03             | -22.03            | 22.03 | 22.03 | 22.03 | 22.03     |
| 5  | -1     | -1     | 1      | 1       | -1      | -1  | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 16.88 | -16.88            | -16.88            | 16.88             | 16.88 | 16.88 | 16.88 | 16.88     |
| 6  | 1      | -1     | 1      | -1      | 1       | -1  | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 20.3  | 20.3              | -20.3             | 20.3              | 20.3  | 20.3  | 20.3  | -20.3     |
| 7  | -1     | 1      | 1      | -1      | -1      | 1   | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 15.22 | -15.22            | 15.22             | 15.22             | 15.22 | 15.22 | 15.22 | -15.22    |
| 8  | 1      | 1      | 1      | 1       | 1       | 1   | 1.00           | 1.00           | 1.00           | 22.4  | 22.4              | 22.4              | 22.4              | 22.4  | 22.4  | 22.4  | 22.4      |
| 9  | -1.682 | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 2.83           | 0.00           | 0.00           | 12.93 | -21.75            | 0                 | 0                 | 36.58 | 0     | 0     | 0         |
| 10 | 1.682  | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 2.83           | 0.00           | 0.00           | 22.43 | 37.73             | 0                 | 0                 | 63.46 | 0     | 0     | 0         |
| 11 | 0      | -1.682 | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 2.83           | 0.00           | 16.38 | 0                 | -27.55            | 0                 | 0     | 46.34 | 0     | 0         |
| 12 | 0      | 1.682  | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 2.83           | 0.00           | 19.98 | 0                 | 33.60             | 0                 | 0     | 56.53 | 0     | 0         |
| 13 | 0      | 0      | -1.682 | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 2.83           | 16.6  | 0                 | 0                 | -27.92            | 0     | 0     | 46.96 | 0         |
| 14 | 0      | 0      | 1.682  | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 2.83           | 21.45 | 0                 | 0                 | 36.08             | 0     | 0     | 60.68 | 0         |
| 15 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18.85 | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |
| 16 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18    | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |
| 17 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18.3  | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |
| 18 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18.57 | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |
| 19 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18.88 | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |
| 20 | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0   | 0.00           | 0.00           | 0.00           | 18.74 | 0                 | 0                 | 0                 | 0     | 0     | 0     | 0         |

x, y, z - величины факторов в безразмерной системе координат, w – вход продукта при заданных условиях.

Таблица 16 – Дисперсии и доверительные интервалы коэффициентов полинома второй степени

| Коэффициент | Значение | Среднеквадратическая ошибка в определении коэффициентов регрессии |      | Доверительные интервалы |
|-------------|----------|---|------|-------------------------|
| $b_0$       | 18.46    | $S_{b_0}$   | 0.13 | $ \Delta b_0 =0.27$     |
| $b_1$       | 2.69     | $S_{b_1}$   | 0.08 | $ \Delta b_1 =0.16$     |
| $b_2$       | 0.78     | $S_{b_2}$   |      |                         |
| $b_3$       | 0.95     | $S_{b_3}$   |      |                         |
| $b_{12}$    | 0.96     | $S_{b_{12}}$  | 0.10 | $ \Delta b_{12} =0.20$  |
| $b_{13}$    | 0.06     | $S_{b_{13}}$  |      |                         |
| $b_{23}$    | -0.47    | $S_{b_{23}}$  |      |                         |
| $b_1^2$     | -0.32    | $S_{b_1^2}$   | 0.08 | $ \Delta b_1^2 =0.13$   |
| $b_2^2$     | -0.14    | $S_{b_2^2}$   |      | $ \Delta b_2^2 =0.13$   |
| $b_3^2$     | 0.16     | $S_{b_3^2}$   |      | $ \Delta b_3^2 =0.13$   |

Коэффициентами, абсолютное значение которых меньше доверительного интервала пренебрегали.

Получена математическая модель (22) адекватно описывающая зависимость выхода ( $W$ ) масла из плодов РП от трех факторов (давление, температура, время). Расчетное значение критерия Фишера составило 2.96, табличное - 4.68 при степенях свободы 5 и 11. Средняя относительная ошибка аппроксимации экспериментальных данных составила 5.6 %, коэффициент корреляции ( $R$ ) при этом равен 0.9961.

$$W = 18.46 + 2.69x + 0.78y + 0.95z + 0.96xy - 0.47yz - 0.32x^2 - 0.14y^2 + 0.16z^2. \quad (22)$$

С помощью программы Wolfram Mathematica [179] проведен анализ полученного регрессионного уравнения и определены оптимальные значения факторов: давление 41.8 МПа, температура 70 °С, время 140 мин, соответствующих максимальному выходу масла из плодов РП 26.4 %. При проведении подтверждающего эксперимента выход составил 26.0 %. Относительная ошибка модели составила 1.5 %. На рисунке 5 представлена поверхность отклика функции выход масла ( $W$ ) на изменение давления и температуры при продолжительности экстракции 140 мин.

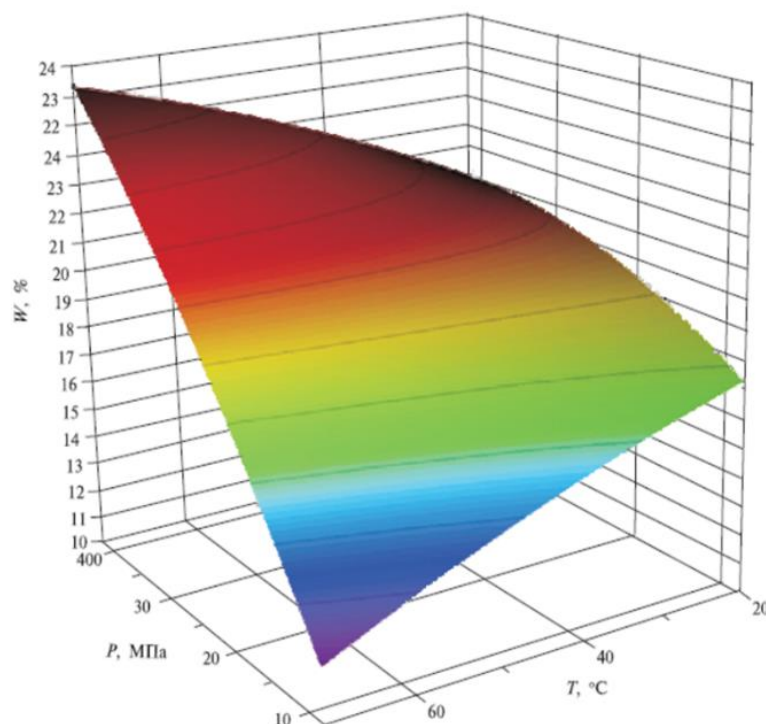


Рисунок 5 – Поверхность отклика функции выход масла (W) из плодов расторопши пятнистой на изменение давления и температуры (продолжительность экстракции 140 мин).

Из анализа поверхности отклика следует, что в области малых давлений с ростом температуры, выход экстракта уменьшается, в области высоких давлений с ростом температуры выхода экстракта увеличивается [176].

### 3.3 Идентификация и определение БАВ в жирном масле плодов расторопши пятнистой

Числовые показатели масел определяли по методикам, приведенным в ГФ XIII [69]. В таблице 17 приведены числовые показатели жирных масел плодов РП собранных в разных районах РД в 2020 г, полученных СКФЭ CO<sub>2</sub>.

С увеличением количества осадков и уменьшением суммы активных температур при переходе с предгорного Кайтагского в высокогорный Кулинский район (таблица 10) выход масла увеличивается с 26 до 30 %, но йодное число (таблица 17) и, соответственно, общее содержание ненасыщенных жирных кислот в образцах масел РП уменьшается.

Таблица 17 – Числовые показатели масел расторопши пятнистой произрастающей в разных районах Дагестана (2020 г) (n=3, p=0.95)

| Наименование показателя                   | Район сбора       |                   |                   |                   |                   |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|   | Кайтагский        | С.-Стальский      | Магарамкентский   | Левашинский       | Кулинский         |
| Плотность, г/см <sup>3</sup>              | 0.9228±<br>0.0008 | 0.9225±<br>0.0006 | 0.9219±<br>0.0007 | 0.9219±<br>0.0006 | 0.9218±<br>0.0009 |
| Показатель преломления                    | 1.4704±<br>0.0003 | 1.4704±<br>0.0002 | 1.4703±<br>0.0002 | 1.4703±<br>0.0004 | 1.4698±<br>0.0005 |
| Число омыления, мгКОН/г                   | 188±1             | 186±2             | 187±2             | 186±4             | 196±1             |
| Кислотное число, мгКОН/г                  | 4.2±0.3           | 3.2±0.1           | 3.5±0.1           | 3.5±0.1           | 3.7±0.2           |
| Йодное число, гI <sub>2</sub> /100г       | 115±2             | 114±4             | 114±2             | 112±1             | 110±2             |
| Перекисное число, ммольO <sub>2</sub> /кг | 2.5±0.1           | 2.0±0.1           | 2.1±0.2           | 2.0±0.2           | 2.6±0.2           |

Уменьшение общего содержания ненасыщенных жирных кислот в образцах масел РП подтверждают также результаты определения плотности и показателя преломления этих масел [180]. По общему содержанию ненасыщенных жирных кислот, как и йодному числу, масло, полученное из Дагестанских образцов сравнимо с маслами из плодов РП, произрастающей в Азербайджане, Индии и других странах с жарким климатом [5, 8, 122,]; значительно отличается от масла, полученного из плодов РП, культивируемой в Самарской области [123].

В таблице 18 приведены результаты определения органолептических и физико-химических показателей масел, полученных СКФЭ-СО<sub>2</sub> и традиционной экстракцией гексаном, на примере образца масла, полученного из плодов, собранных в Кулинском районе в 2019 г. Масло, полученное СКФЭ-СО<sub>2</sub> отличается от масла, полученного экстракцией н-гексаном по органолептическим и числовым показателям. Имеет приятный характерный насыщенный запах, повышенное содержание ненасыщенных жирных кислот, о чем свидетельствует относительно высокое йодное число, низкие перекисное и кислотное числа [174, 175,181].

Таблица 18 – Показатели качества образцов масел расторопши пятнистой полученных СКФЭ-СО<sub>2</sub> и экстракцией н-гексаном, Кулинский район (2019 г) (n=5, p=0.95)

| Наименование показателя      | СКФЭ–СО <sub>2</sub>   | Экстракция н–гексаном      |
|------------------------------|--|----------------------------|
| Внешний вид                  | Прозрачная маслянистая жидкость желтого цвета  |                            |
| Запах                        | Специфический запах, характерный маслу расторопши  | Присутствует запах гексана |
| Растворимость                | Растворим в органических растворителях (хлороформе, бензоле, ацетоне, петролейном и диэтиловом эфирах); плохо растворим в 95 % этиловом спирте; практически нерастворим в воде |                            |
| Плотность, г/см <sup>3</sup> | 0.9229±0.0006  | 0.9218±0.0005              |
| Показатель преломления       | 1.4704±0.0008  | 1.4698±0.009               |
| Число омыления               | 196±2  | 193±1                      |
| Кислотное число              | 3.7±0.2  | 4.5±0.2                    |
| Йодное число                 | 112±1  | 110±1                      |
| Перекисное число             | 2.6±0.1  | 3.4±0.2                    |
| Эфирное число                | 192±2  | 188±1                      |
| Выход масла, масс. %         | 26±1   | 27±1                       |

Определение метиловых эфиров жирных кислот осуществляли методом газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Для градуировки прибора использовали стандартный раствор метиловых эфиров жирных кислот «Supelco 37 Component FAME Mix» (рисунок 6) [182].

На рисунке 7 приведена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла РП, полученного из плодов, собранных в Кулинском районе Дагестана.

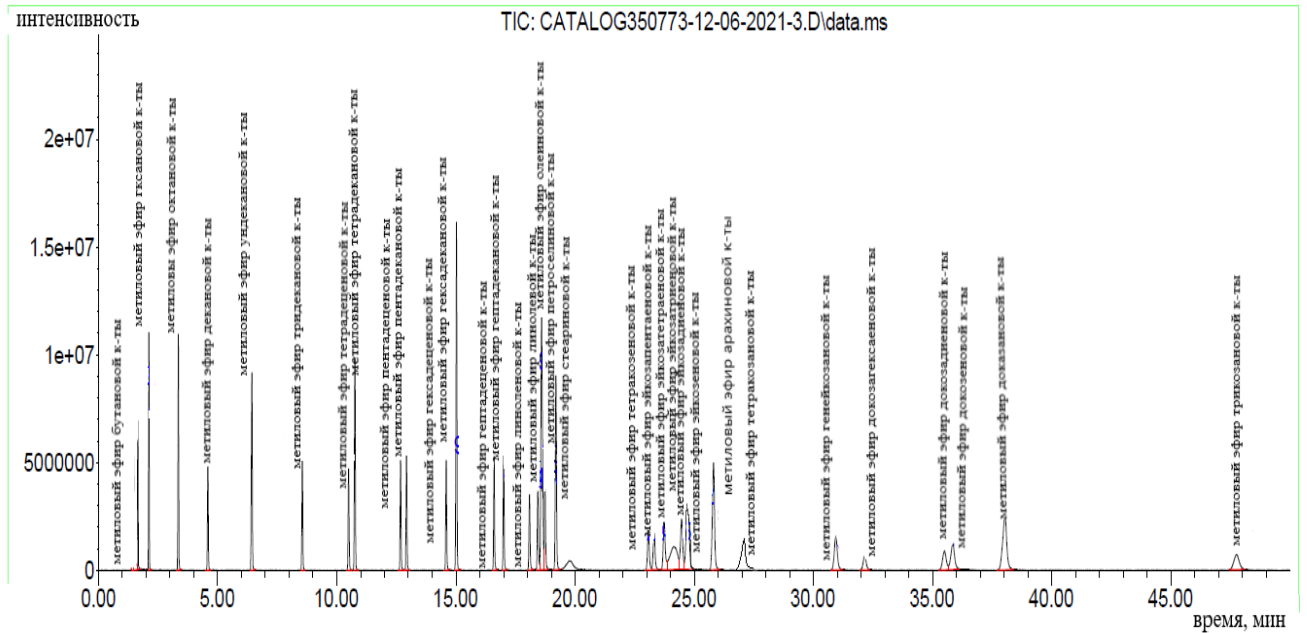


Рисунок 6 – Хроматограмма смеси метиловых эфиров жирных кислот стандартного образца.

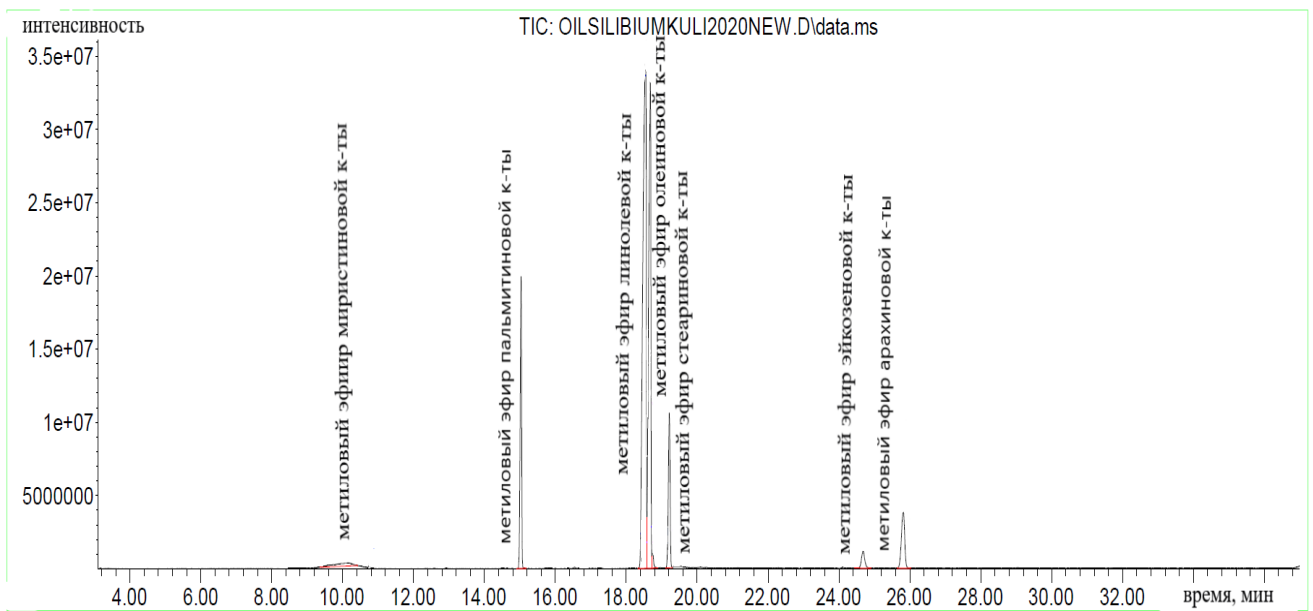


Рисунок 7 – Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла рапсорпши пятнистой, полученного СКФЭ–СО<sub>2</sub> из плодов, собранных в Кулинском районе Дагестана.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот осуществляли сравнением экспериментальных масс-спектров с библиотечными (Wiley275 и NIST14) масс-спектрами (таблица 20). В таблице 19 представлена информация о

10 наиболее интенсивных линиях, нормированных на 1000, в масс-спектрах метиловых эфиров жирных кислот, идентифицированных в исследуемых образцах масел. Количественное определение жирных кислот с C14–C20 проводили методом внутренней нормализации площадей соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току [175, 176, 180-182].

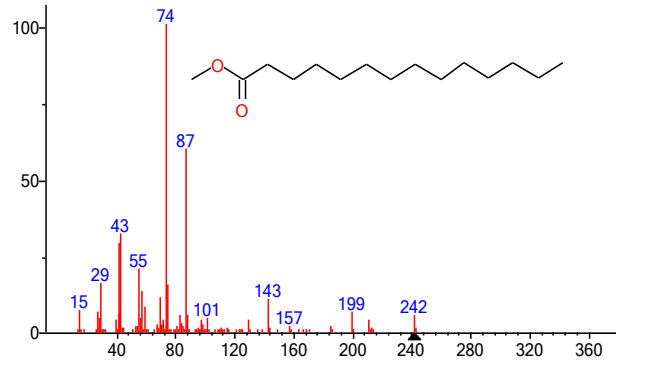
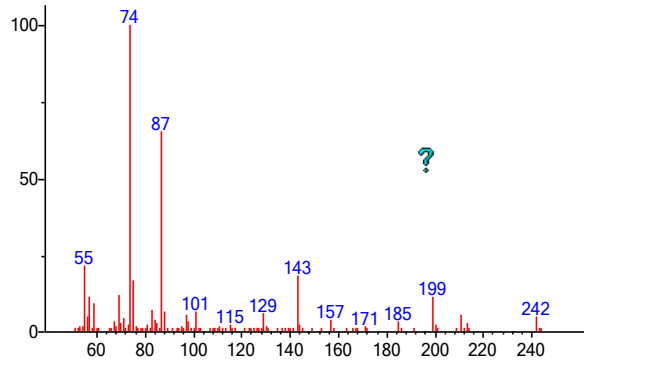
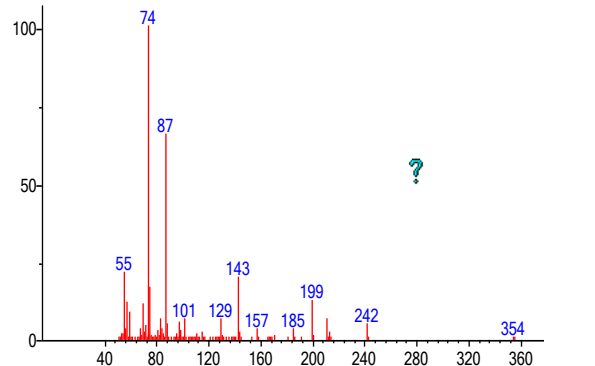
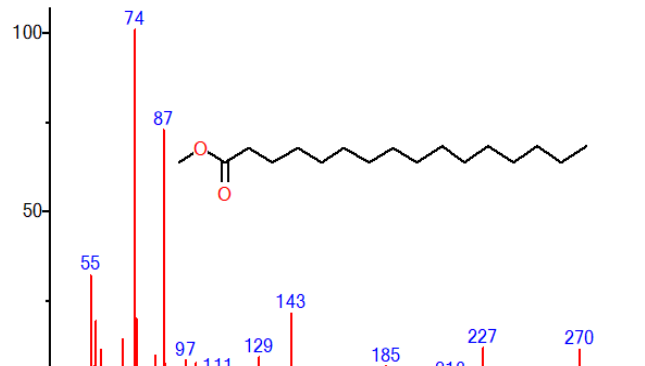
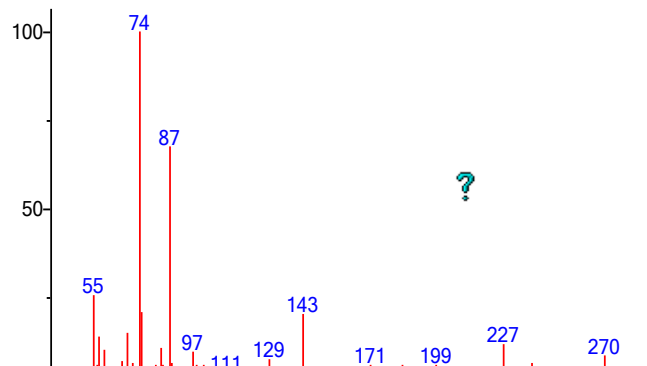
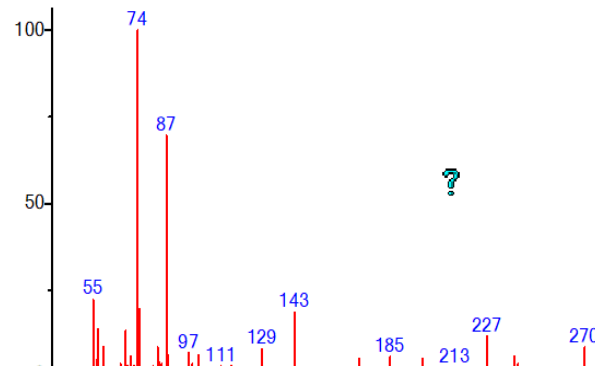
Таблица 19 – Масс-спектральные данные о метиловых эфирах жирных кислот, идентифицированных в образце масла, полученного из плодов расторопши пятнистой СКФЭ-СО<sub>2</sub>

| 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 |

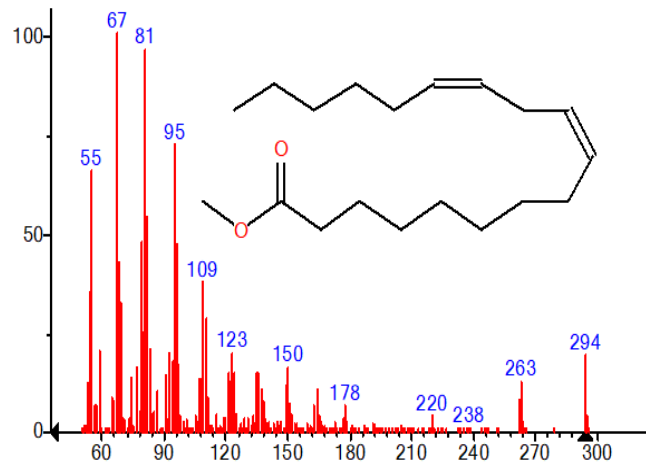
В таблице 21 приведен жирнокислотный состав масел расторопши пятнистой полученных СКФЭ-СО<sub>2</sub> и экстракцией н-гексаном из плодов, собранных в Кулинском районе в 2019 году [176].



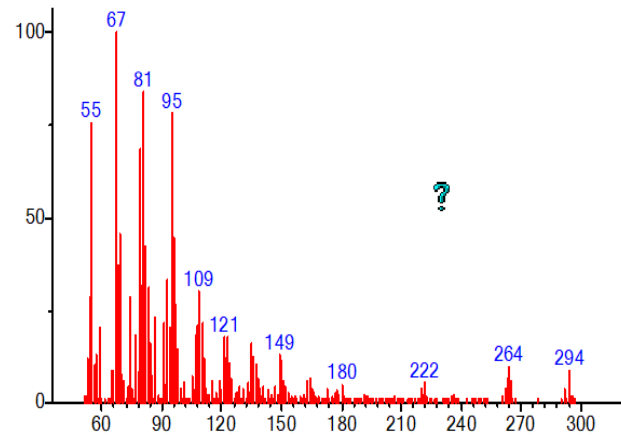
Таблица 19 – Масс-спектры метиловых эфиров основных жирных кислот масла расторопши пятнистой

| Библиотечный масс-спектр  | Стандартный образец   | Масло расторопши пятнистой   |
|---|---|--|
| <b>Метиловый эфир миристиновой кислоты</b>  |   |  |
|  <p>(replib) Methyl tetradecanoate</p>             |  <p>(Text File) Scan 1605 (10.721 min): CATALOG350773-12-06-2021.D\data.ms</p>  |  <p>(Text File) Scan 1342 (10.766 min): OILSILIBIUMKULI2022NEW2.D\data.ms</p> |
| <b>Метиловый эфир пальмитиновой кислоты</b>   |   |  |
|  <p>(mainlib) Hexadecanoic acid, methyl ester</p> |  <p>(Text File) Scan 2371 (15.104 min): CATALOG350773-12-06-2021.D\data.ms</p> |  <p>(Text File) Scan 2083 (15.006 min): 250-20-90(2).D\data.ms</p>           |

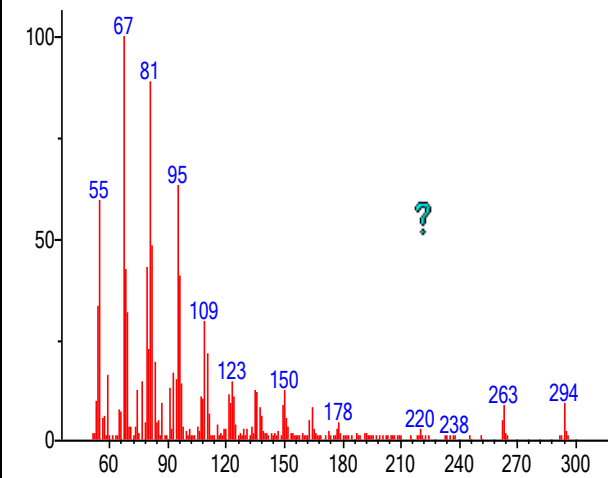
### Метилловый эфир линолевой кислоты



(mainlib) 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester

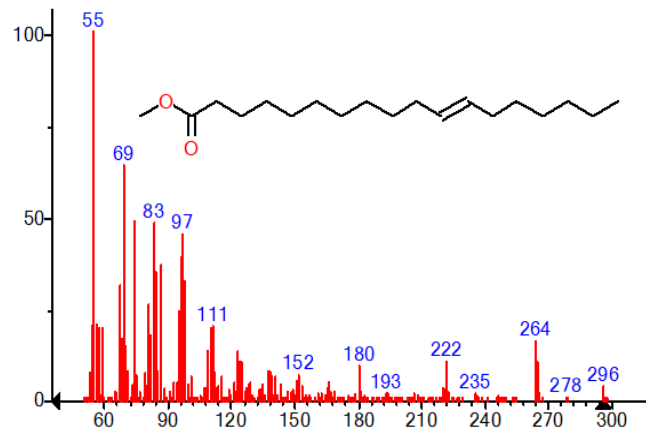


(Text File) Scan 2987 (18.628 min); CATALOG350773-12-06-2021.D\data.ms

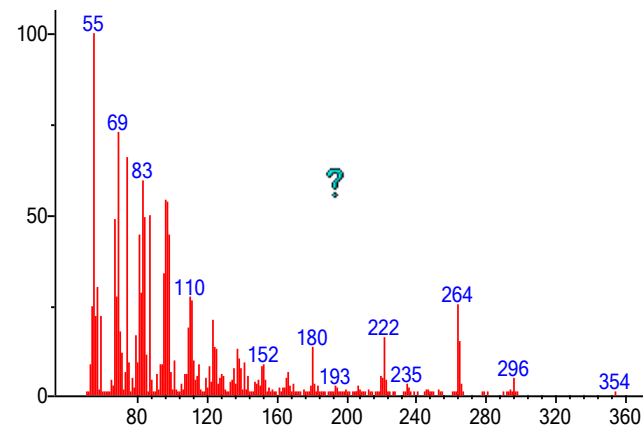


(Text File) Scan 2682 (18.433 min); 250-20-90(2).D\data.ms

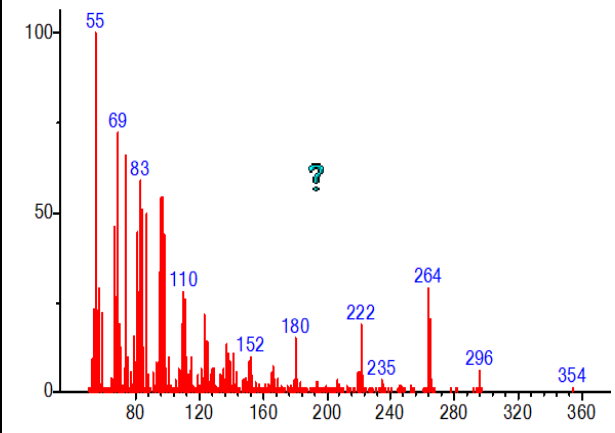
### Метилловый эфир олеиновой кислоты



(replib) 11-Octadecenoic acid, methyl ester

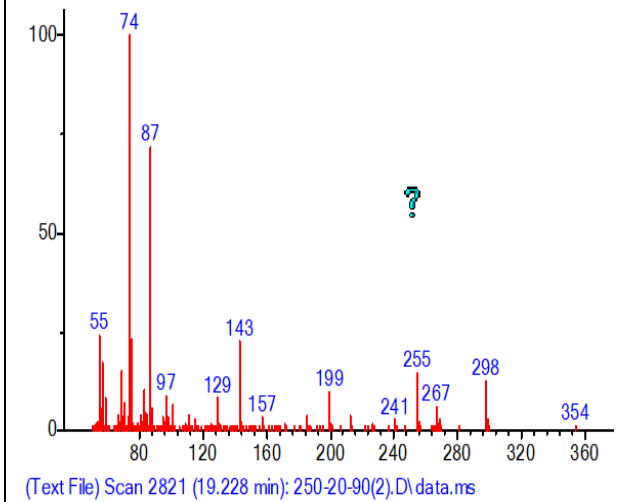
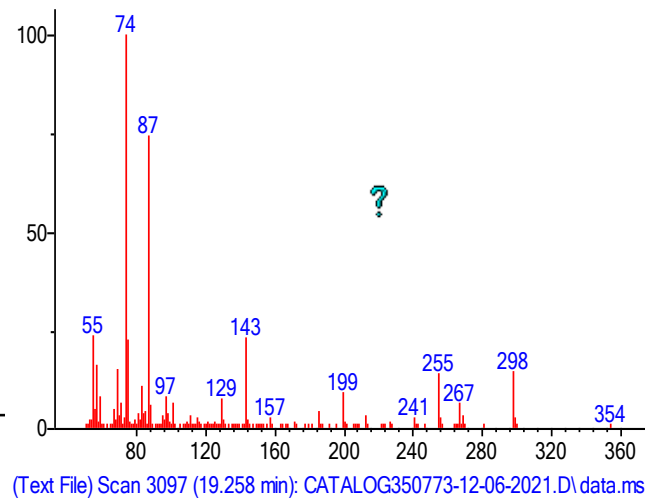
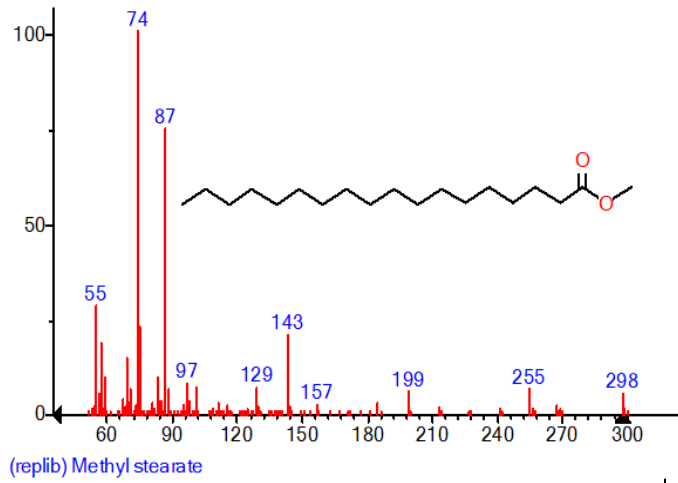


(Text File) Scan 3004 (18.726 min); CATALOG350773-12-06-2021.D\data.ms

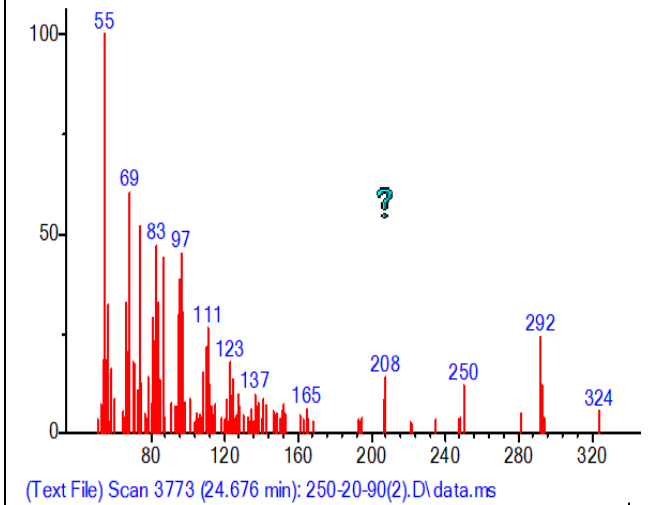
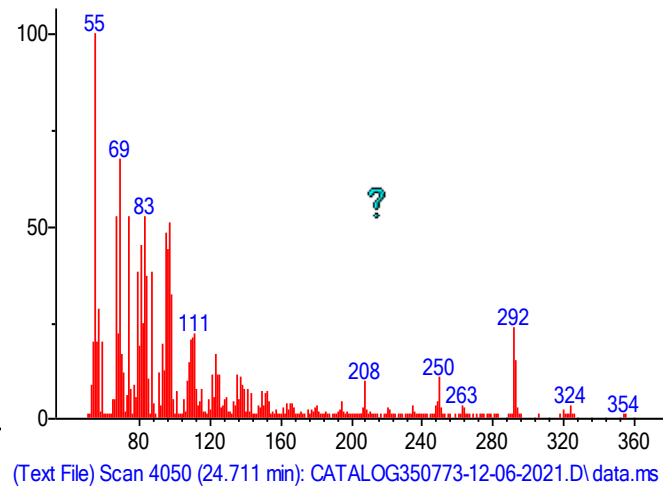
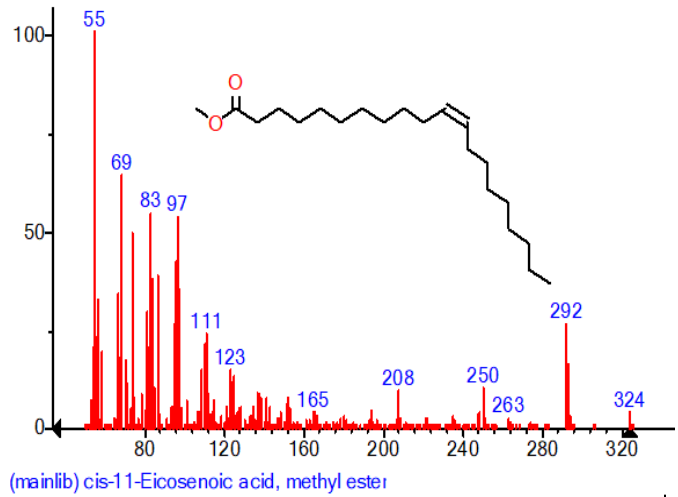


(Text File) Scan 2715 (18.622 min); 250-45-90(2).D\data.ms

### Метилловый эфир стеариновой кислоты



### Метилловый эфир эйкозеновой кислоты



## Метилловый эфир арахиновой кислоты

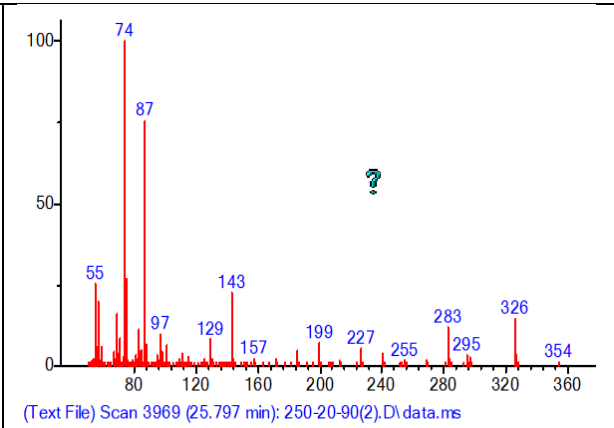
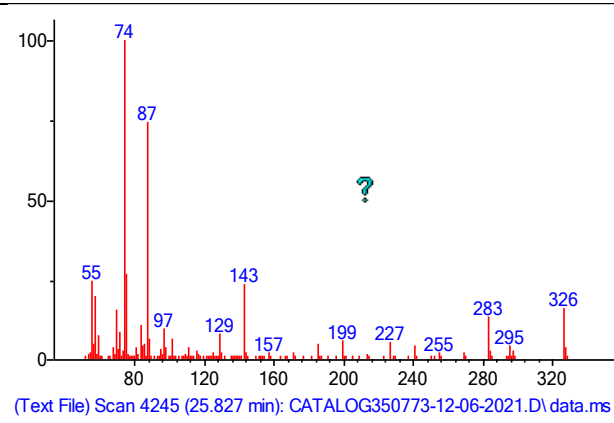
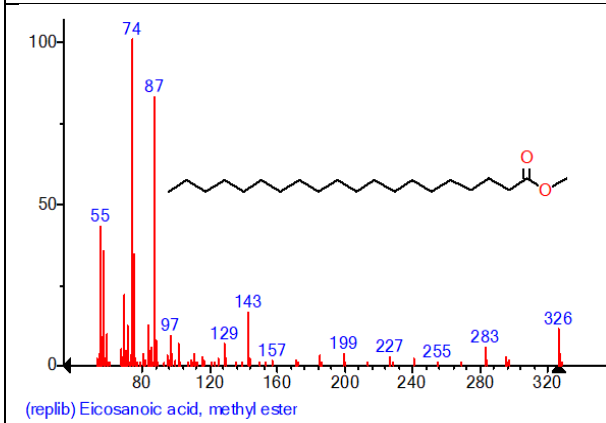


Таблица 21 – Состав образцов масел расторопши пятнистой полученных СКФЭ-СО<sub>2</sub> и экстракцией н-гексаном (Кулинский район 2019 г) (n=3, p=0.95)

| Метод экстракции      | СКФЭ-СО <sub>2</sub> | Экстракция н-гексаном |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Наименование кислоты  | Содержание, %        |                       |
| 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 (20:1)    | 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                  |

Основными компонентами масла из плодов РП, произрастающей в Дагестане, являются незаменимые ненасыщенные жирные кислоты: линолевая (омега-6) и олеиновая (омега-9), на долю которых в образце, полученном СКФЭ-СО<sub>2</sub> приходится более 86 % от общей суммы идентифицированных жирных кислот [176]. Суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот в масле РП произрастающей в Дагестане, значительно выше, чем в масле плодов РП, культивируемой в Самарской области [123], по физико-химическим показателям оно сравнимо с маслом плодов РП произрастающей в Тунисе [10]. Масло, полученное СКФЭ-СО<sub>2</sub>, является натуральным продуктом, отличающимся от масла, полученного экстракцией н-гексаном, по органолептическим и числовым показателям: имеет приятный характерный насыщенный запах и цвет, повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот.

Для установления влияния параметров СКФЭ-СО<sub>2</sub> (давления диоксида углерода, температуры, времени) на состав экстракта определен жирнокислотный состав масел из плодов РП, произрастающей в Кулинском районе (таблица 22). Изменение условий экстракции сказывается в основном на содержании линолевой и олеиновой кислот, которые колеблется в пределах 41.67 – 47.18 % и 36.03 –

40.62 % соответственно. Изменение в содержания других кислот не превышает 2 %.

В научной литературе встречаются разные мнения о влиянии количества осадков, влажности почвы и суммы активных температур на образование масла в семенах масличных растений и накопление в нем ненасыщенных жирных кислот [162-164]. Исследуя процесс образования масла в различных растениях, Иванов С. Л. [162] пришел к выводу, что из климатических факторов наибольшее влияние на процесс образования масла и накопление ненасыщенных жирных в период созревания семян оказывает влажность почвы. Степень ненасыщенности масла в семенах снижается при уменьшении количества осадков и увеличении суммы температур в течение вегетационного периода [162]. В работе [164] подтверждается положительное влияние количества осадков и низких среднесуточных температур на накопление масла в семенах льна масличного. Однако отмечается отрицательное влияние этих факторов на содержание ненасыщенных жирных кислот в масле льна.

Из данных приведенных в таблице 23 видно, что с увеличением количества осадков и уменьшением суммы активных температур при переходе с предгорного Кайтагского в высокогорный Кулинский район общее содержание ненасыщенных жирных кислот в образцах масел РП уменьшается. Уменьшение общего содержания ненасыщенных жирных кислот в образцах масел РП подтверждают также результаты определения плотностей и показателей преломления этих масел (таблица 17). По-видимому, уменьшение значений этих показателей образцов масел связано в основном с уменьшением в них содержания линолевой кислоты (рисунок 8) [180].

Таблица 22 – Содержание жирных кислот в масле полученной СКФЭ в зависимости от условий экстракций (n=3, p=0.95)

| №  | Условия СКФЭ CO <sub>2</sub> |       |        | Содержание жирной кислоты*, % |           |           |             |             |              |
|----|------------------------------|-------|--------|-------------------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------------|
|    | Р, МПа                       | T, °C | t, мин | Пальмитиновая                 | Линолевая | Олеиновая | Стеариновая | Эйкозеновая | Арахидиновая |
| 1  | 15.0                         | 30    | 60     | 9.27                          | 45.49     | 38.95     | 5.75        | 0.33        | 2.26         |
| 2  | 35.0                         | 30    | 60     | 9.25                          | 45.19     | 39.99     | 5.57        | 0.31        | 2.26         |
| 3  | 15.0                         | 60    | 60     | 9.29                          | 45.77     | 39.14     | 5.81        | 0.24        | 1.88         |
| 4  | 35.0                         | 60    | 60     | 8.83                          | 46.21     | 37.84     | 5.84        | 0.34        | 2.65         |
| 5  | 15.0                         | 30    | 120    | 9.10                          | 44.39     | 40.62     | 5.74        | 0.29        | 2.31         |
| 6  | 35.0                         | 30    | 120    | 9.73                          | 41.67     | 40.56     | 5.38        | 0.31        | 2.18         |
| 7  | 15.0                         | 60    | 120    | 9.46                          | 46.34     | 38.43     | 5.77        | 0.43        | 2.12         |
| 8  | 35.0                         | 60    | 120    | 9.39                          | 44.15     | 38.15     | 6.00        | 0.40        | 2.56         |
| 9  | 8.2                          | 45    | 90     | 8.97                          | 46.79     | 37.14     | 5.86        | 0.40        | 2.61         |
| 10 | 41.8                         | 45    | 90     | 8.79                          | 46.56     | 36.55     | 5.74        | 0.44        | 2.56         |
| 11 | 25.0                         | 20    | 90     | 9.07                          | 46.65     | 36.03     | 5.81        | 0.39        | 2.53         |
| 12 | 25.0                         | 70    | 90     | 8.84                          | 46.49     | 36.70     | 5.71        | 0.45        | 2.72         |
| 13 | 25.0                         | 45    | 40     | 8.87                          | 47.18     | 38.18     | 5.77        | 0.52        | 3.02         |
| 14 | 25.0                         | 45    | 140    | 8.78                          | 45.95     | 36.16     | 6.15        | 0.37        | 2.44         |
| 15 | 25.0                         | 45    | 90     | 8.92                          | 46.63     | 36.54     | 5.67        | 0.39        | 2.33         |

\*Среднее значение трех определений.

Таблица 23 – Содержание жирных кислот в масле плодов расторопши пятнистой (%)\*, произрастающей в разных районах Дагестана (2020 г) (n=3, p=0.95)

| Наименование показателя | Район сбора |             |                 |              |            | Литературные данные [8, 47, 117, 118, 127] |
|-------------------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|------------|--|
|                         | Кулинский   | Левашинский | Магарамкентский | С. Стальский | Кайтагский |  |
| Миристиновая (C14:0)    | 0.20        | 0.20        | -               | -            | следы      | 0.09-0.17                                  |
| Пальмитиновая(C16:0)    | 10.2        | 8.5         | 8.9             | 9.5          | 9.7        | 8.0-9.9                                    |
| Линолевая (C18:2)       | 47.2        | 52.7        | 54.9            | 56.9         | 57.3       | 35-57                                      |
| Олеиновая (C18:1)       | 29.0        | 29.2        | 26.4            | 24.7         | 24.7       | 21-33                                      |
| Стеариновая (C18:0)     | 7.2         | 5.7         | 5.8             | 5.5          | 5.6        | 2.86-11                                    |
| Эйкозеновая (C20:1)     | 1.4         | 0.3         | 0.9             | 1.2          | 0.9        | 1.6  |
| Арахидиновая (20:0)     | 4.8         | 3.4         | 3.1             | 2.2          | 1.8        | 2.7-6.9                                    |
| Σ ненасыщенных          | 77.6        | 82.2        | 82.2            | 82.8         | 82.9       | 76.2-77.9                                  |
| Σ насыщенных            | 22.4        | 17.8        | 17.8            | 17.2         | 17.1       | 22.1-22.5                                  |

\*Среднее значение трех определений.



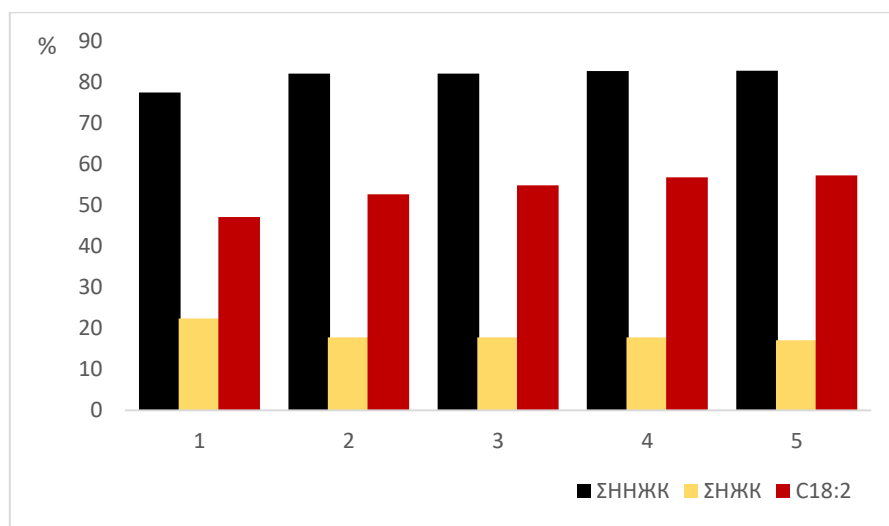


Рисунок 8 – Соотношения сумм, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и линолевой кислоты (C18:2) в плодах расторопши пятнистой: 1 – Кулинский район, 2 – Левашинский район; 3 – Магарамкентский район, 4 – С.-Стальский район, 5 –Кайтагский район.

Определение жирорастворимых витаминов проводили ВЭЖХ после щелочного гидролиза образцов масел. Идентификацию витаминов в масле проводили сравнением времен выхода пиков на хроматограммах растворов смеси стандартных образцов витаминов компании Sigma-Aldrich и витаминов исследуемого образца масла в н-гексане. Содержание витаминов определяли по площадям соответствующих пиков на хроматограмме исследуемого образца масла относительно пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов.

На рисунках 9 и 10 приведены хроматограммы гексановых растворов стандартных образцов витаминов А, D, Е и жирорастворимых витаминов плодов масла РП. На хроматограмме образца масла выделяется только пик токоферола (витамина Е) (рисунок 10). В таблице 24 приведено содержание жирорастворимых витаминов в масле плодов РП произрастающей на территории Кулинского района Дагестана.

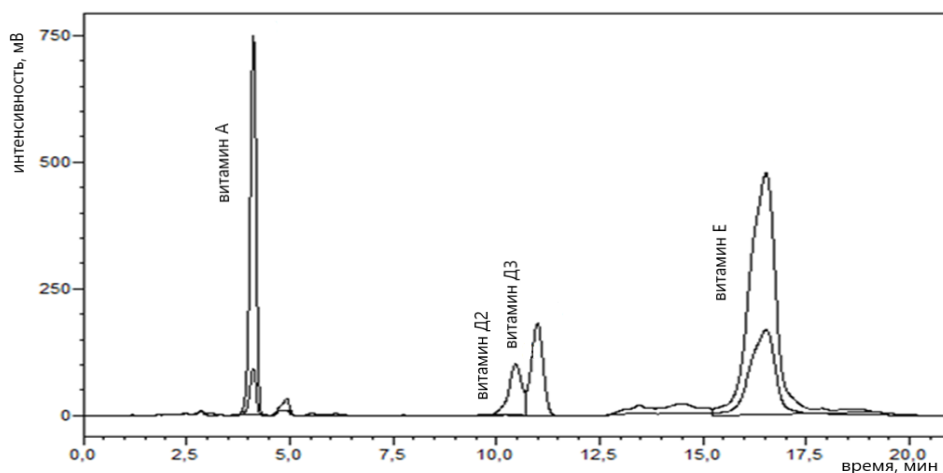


Рисунок 9 – Хроматограмма стандартного раствора витаминов А, D, Е.

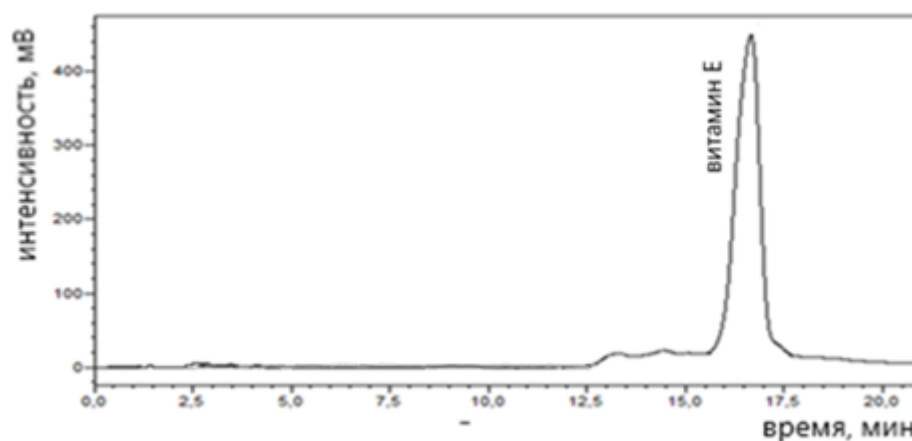


Рисунок 10 – Хроматограмма образца масла плодов расторопши пятнистой, произрастающей на территории Кулинского района республики Дагестан.

Таблица 24 – Содержание жирорастворимых витаминов в масле плодов расторопши пятнистой произрастающей на территории Кулинского района республики Дагестан (n=3, p=0.95)

| Содержание<br>витамина, мг/кг | Метод экстракции |           | Литературные<br>данные [10] |
|-------------------------------|------------------|-----------|-----------------------------|
|                               | СКФЭ             | н-гексан  |                             |
| Е                             | 53±3             | 49±2      | 49.6                        |
| А                             | менее 0.5        | менее 0.5 | -                           |
| Д                             | менее 0.5        | менее 0.5 | -                           |

Содержание витамина Е в масле, извлеченном СКФЭ-СО<sub>2</sub> несколько выше чем в масле, извлеченном н-гексаном [175] и сопоставимо с данными приведенными в [10].

### 3.4 Теплофизические свойства жирного масла расторопши пятнистой

Одним из эффективных методов контроля качества и подлинности растительных масел и животных жиров становится дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) [136]. Методом ДСК изучили теплофизические свойства масла дикорастущей РП из разных районов Дагестана. 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.11).

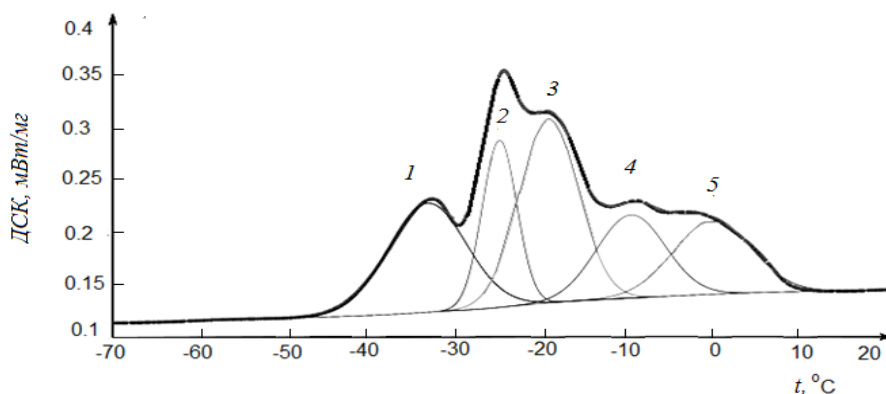


Рисунок 11 - Профиль плавления расторопши пятнистой с программно-разделенными пиками, полученный методом дифференциальной сканирующей калориметрии (Кулинский район) 1–5 – эндотермические максимумы.

Жирные кислоты, характерные для масла РП, образуют около 20 разнообразных триацилглицеринов (ТАГ), которые в химической технологии подразделяют на четыре фракции по степени ненасыщенности: триненасыщенные (содержат три остатка ненасыщенных жирных кислот) ТАГ – UUU (U –

unsaturated); диненасыщенные, мононасыщенные – UUS (S – saturated); мононенасыщенные, динасыщенные – USS; тринасыщенные ТАГ – SSS.

Максимум при  $T_1$  отнесен к фракции триненасыщенных триацилглицеринов (UUU), имеющих самые низкие  $T_{пл}$ . Наиболее выраженные максимумы при  $T_2$  и  $T_3$  формируются смесью фракций триненасыщенных (UUU, U – unsaturated) и диненасыщенных, мононасыщенных триацилглицеринов (UUS, S – saturated). Максимумы при  $T_4$  и  $T_5$  образуются при плавлении фракций мононенасыщенных и тринасыщенных триацилглицеринов (USS и SSS). Анализ серии образцов подлинного масла дикорастущей РП позволил экспериментально установить диапазоны варьирования его теплофизических параметров (рисунок 12).

Триацилглицерины, образованные преимущественно ненасыщенными жирными кислотами (UUU, UUS), имеют отрицательные температуры плавления, SSS – положительные [136, 137]. В результате взаимной растворимости ТАГ из-за наличия эвтектик, различных фазовых переходов кривые ДСК плавления жиров (смесей ТАГ) имеют несколько максимумов и экстремумов, уникальных для различных жиров. Для кривых плавления масла РП можно выделить пять характерных эндотермических максимумов (рисунок 12), которые характеризуют свойства не индивидуальных ТАГ, а интегральные характеристики их фракций, ТАГ в которых имеют близкие теплофизические свойства. Для определения  $T_i$  слабо выраженных термических эффектов, так называемых “плеч” на основных пиках, применяли вторые производные от ДСК по времени (рисунок 12 з) [183, 184].

В таблице 25 приведены установленные величины теплофизических характеристик, исследуемых образцов –  $T_i$  и площади  $S_i$ , найденные в результате программного разделения перекрывающихся пиков [184].  $T_i$  – максимумы эндотермических пиков,  $S_i$  – площади эндотермических пиков.

В работах [134-136] показано, что жидкие растительные масла, содержащие >60% UUU и >17% UUS, например, оливковое, имеет на кривых плавления ДСК наиболее ярко выраженный эндотермический пик в области от  $-42$  до  $+6^\circ\text{C}$ , на плечах которого слева и справа проявляются как минимум еще два-три пика.

Основные тепловые эффекты в исследуемых нами образцах масла РП наблюдались в более узком диапазоне температур [183].

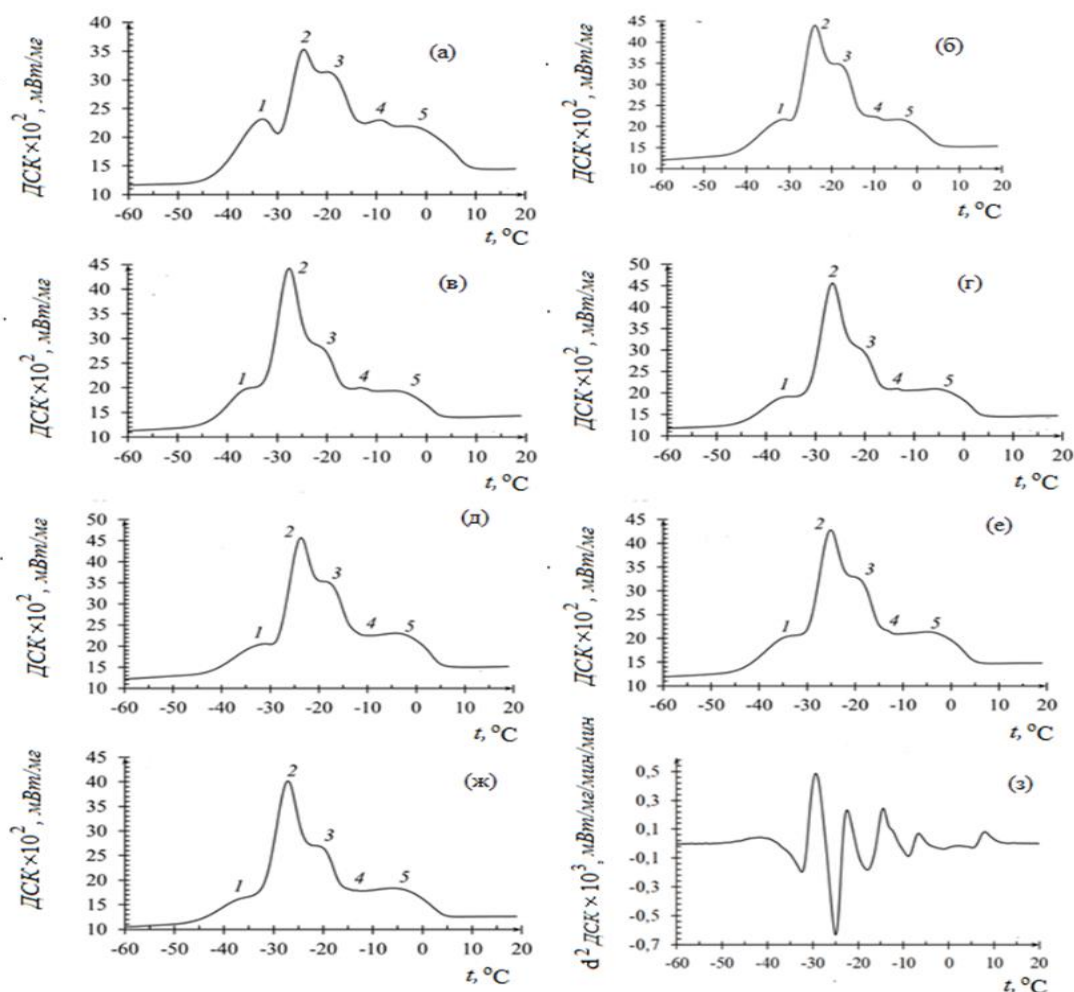


Рисунок 12 – Кривые плавления масла рапоропши пятнистой.

Таблица 25 – Значения температур максимумов эндотермических пиков  $T_i$ , их площадей  $S_i$  для образцов масла рапоропши пятнистой, произрастающей в Дагестане

| Район сбор      | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $T_4$ | $T_5$ | $S_1$ | $S_2$ | $S_3$ | $S_4$ | $S_5$ |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Кулинский       | -32.4 | -25.0 | -18.3 | -8.9  | -1.2  | 23.3  | 15.8  | 29.7  | 15.6  | 15.6  |
| Левашинский     | -31.5 | -24.1 | -16.4 | -9.3  | -3.0  | 20.6  | 26    | 33.0  | 5.3   | 15.1  |
| С. Стальский    | -37.0 | -27.6 | -19.9 | -13.1 | -4.4  | 18.6  | 34.3  | 23.8  | 12.2  | 11.1  |
| Кайтагский      | -37.2 | -26.7 | -19.6 | -13.5 | -4.7  | 16.7  | 36.3  | 16.1  | 21.8  | 9.1   |
| Магарамкентский | -31.1 | -23.8 | -16.6 | -12.1 | -2.6  | 15.3  | 29.4  | 26.3  | 20.5  | 8.5   |
| Смесь образцов  | -35.3 | -25.2 | -18.2 | -13.1 | -3.6  | 19.4  | 30.2  | 23.1  | 19.1  | 8.1   |

*Максимум при  $T_1$ .* Как видно из таблицы 25, максимум пика при  $T_1$  слабо варьирует от  $-37.6$  до  $-31.1$  °С. Этот пик можно отнести, прежде всего, к фракции ТАГ UUU с наименьшими температурами плавления, в частности, он формируется за счет наличия L3.

*Максимум при  $T_2$ .* Второй пик с максимумом при  $T_2$  от  $-27.6$  до  $-23.8$  °С имеет наибольшую площадь. Его формирует смесь фракций ТАГ UUU и UUS, в которых присутствуют остатки линолевой кислоты – L<sub>3</sub>, L<sub>2</sub>O, LOP, при этом возрастание доли ТАГ типа LOP, LOS, как показано в работе, приводит к смещению максимума пика в область более высоких температур за счет включения в состав ТАГ остатков пальмитиновой, стеариновой и других насыщенных жирных кислот.

*Максимум при  $T_3$*  смещается от  $-19.9$  до  $-14.4$  °С, он формируется смесью, содержащей преимущественно ТАГ UUS с примесью UUU и USS. Увеличение доли олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот и суммы USS смещает максимум пика в область более высоких температур [136].

*Максимум при  $T_4$ .* Этот нечеткий пик, скорее всего, образуют ТАГ из фракции USS.

*Максимум при  $T_5$*  от  $-4.7$  до  $-1.2$  °С обусловлен наличием смеси ТАГ типа USS и SSS. Этот пик находится в области отрицательных температур, а значит, из-за небольшого количества ТАГ SSS, содержащих пальмитиновую, стеариновую, арахидовую и бегеновую кислоты, на термограммах исследуемых масел РП отсутствует пик, характеризующий “чистую” фракцию SSS.

В таблице 26 представлены результаты корреляционного анализа выборки образцов масла, полученного из дикорастущей РП из разных районов Дагестана, которые отличаются климатическими условиями (таблица 5).

Таблица 26 – Значимые линейные корреляции между максимумами температуры, площадями эндотермических пиков ( $T_i$ ,  $S_i$ ) кривых ДСК-плавления масла дикорастущей расторопши пятнистой при варьировании условий произрастания, Дагестан

| X/Y                                | aX + b             | R            | X/Y                            | aX + b             | R            |
|------------------------------------|--------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub></b> | <b>0.5X – 8.4</b>  | <b>0.93</b>  | T <sub>5</sub> /H              | 450X + 2580        | 0.74         |
| <b>T<sub>1</sub>/T<sub>3</sub></b> | <b>0.5X – 1.6</b>  | <b>0.92</b>  | T <sub>5</sub> /NI             | 108.1 – 1.1X       | –0.51        |
| T <sub>1</sub> /T <sub>4</sub>     | 0.6X + 7.2         | 0.75         | T <sub>5</sub> /G              | 0.5X + 7.0         | 0.71         |
| <b>T<sub>1</sub>/T<sub>5</sub></b> | <b>0.4X + 9.6</b>  | <b>0.81</b>  | S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub> | 68.6 – 2.1X        | –0.78        |
| T <sub>1</sub> /H                  | 170X + 6770        | 0.58         | S <sub>1</sub> /S <sub>3</sub> | 1.2X + 1.2         | 0.59         |
| T <sub>1</sub> /G                  | 0.2X + 12.0        | 0.60         | S <sub>1</sub> /S <sub>4</sub> | 38.3 – 1.2X        | –0.54        |
| T <sub>1</sub> /S                  | 19.6 – 4.1X        | –0.57        | S <sub>1</sub> /S <sub>5</sub> | 1.0X – 8.0         | 0.80         |
| <b>T<sub>1</sub>/NI</b>            | <b>84.2 – 0.8X</b> | <b>–0.81</b> | S <sub>2</sub> /S <sub>3</sub> | 42.7 – 0.6X        | –0.76        |
| <b>T<sub>2</sub>/T<sub>3</sub></b> | <b>1.0X + 5.9</b>  | <b>0.96</b>  | S <sub>2</sub> /S <sub>5</sub> | 21.4 – 0.4X        | –0.77        |
| T <sub>2</sub> /T <sub>4</sub>     | 0.8X + 8.6         | 0.58         | S <sub>2</sub> /H              | <b>5814 – 94X</b>  | <b>–0.88</b> |
| T <sub>2</sub> /T <sub>5</sub>     | 0.6X + 11.9        | 0.69         | S <sub>2</sub> /G              | 8.3 – 0.1X         | –0.84        |
| T <sub>2</sub> /H                  | 270X + 7910        | 0.51         | S <sub>2</sub> /W <sub>2</sub> | 845 – 15X          | –0.72        |
| T <sub>2</sub> /G                  | 0.3X + 13.9        | 0.56         | S <sub>3</sub> /S <sub>4</sub> | 35.2 – 0.8X        | –0.75        |
| <b>T<sub>2</sub>/NI</b>            | <b>67.0 – 1.8X</b> | <b>–0.95</b> | S <sub>3</sub> /S <sub>5</sub> | 0.4X – 0.3         | 0.76         |
| T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>     | 0.8X + 2.5         | 0.56         | S <sub>3</sub> /H              | 106X – 1578        | 0.79         |
| T <sub>3</sub> /T <sub>5</sub>     | 0.5X + 5.7         | 0.56         | S <sub>3</sub> /G              | 0.1X + 2.5         | 0.75         |
| T <sub>3</sub> /G                  | 0.3X + 11.0        | 0.51         | S <sub>3</sub> /S              | 2.3X + 177.8       | 0.67         |
| <b>T<sub>3</sub>/NI</b>            | <b>80.7 – 1.7X</b> | <b>–0.91</b> | S <sub>4</sub> /S <sub>5</sub> | 17.6 – 0.4X        | –0.75        |
| <b>T<sub>4</sub>/T<sub>5</sub></b> | <b>0.5X + 2.8</b>  | <b>0.82</b>  | S <sub>4</sub> /H              | 2277 – 74X         | –0.59        |
| <b>T<sub>4</sub>/H</b>             | <b>354X + 5240</b> | <b>0.92</b>  | S <sub>4</sub> /G              | 6.6 – 0.1X         | –0.54        |
| T <sub>4</sub> /W <sub>2</sub>     | 46X + 960          | 0.63         | <b>S<sub>5</sub>/H</b>         | <b>199X – 1122</b> | <b>0.85</b>  |
| T <sub>5</sub> /W <sub>2</sub>     | 60X + 630          | 0.54         | S <sub>5</sub> /G              | 0.2X + 3.0         | 0.81         |
| T <sub>5</sub> /S                  | 93 – 8X            | –0.52        | S <sub>5</sub> /W <sub>2</sub> | 28X + 105          | 0.63         |

Примечание:  $Y = aX + b$  ( $n = 6$ ,  $P = 0.95$ );  $H$  – высота над уровнем моря;  $G$  – среднее содержание гумуса в почве, %;  $S$  – количество солнечных дней в году;  $W_2$  – суммарное количество осадков в году;  $NI$  – йодное число.

Изучение дикорастущей РП одного региона позволяет исключить генотипические различия и оценить, как на кривые ДСК влияют фенотипические факторы. Как видно из таблицы 26, для образцов масла РП характерны не только значимые (абсолютное значение коэффициента парной корреляции  $|R| > 0.50$ ), но и тесные корреляции ( $|R| \geq 0.80$ ) как между температурами максимумов пиков  $T_i$  или между величинами  $S_i$ , так и между ними и отдельными климатическими условиями – высотой над уровнем моря ( $H$ ), средним содержанием гумуса в почве ( $G$ ), количеством солнечных дней ( $S$ ) и осадков ( $W_2$ ) в году. Так, с повышением высоты над уровнем моря все значения  $T_i$  смещаются в сторону увеличения, что говорит о снижении степени ненасыщенности ТАГ в этом сырье. Об этом же говорят асимбатные корреляции между  $T_i$  и йодным числом  $NI$ . Чем сильнее наблюдаемое смещение  $T_i$  в сторону положительных температур на кривых ДСК, тем меньше йодное число образца масла. Аналогичная тенденция для  $T_i$  наблюдается с увеличением содержания гумуса в почве. Вместе с тем площади этих пиков  $S_i$  ведут себя по-разному. Так, площадь пика  $S_2$  уменьшается, а площади  $S_3$  и  $S_5$  растут при смещении  $T_i$  в более положительную область, что указывает на увеличение доли ТАГ с меньшим числом двойных связей. Величины  $T_4$  и  $T_5$ , обусловленные ТАГ USS и SSS, симбатно растут в масле при увеличении количества осадков. В то же время чем больше солнечных дней в зоне произрастания РП, тем более низкие значения  $T_1$  и  $T_5$  наблюдаются на кривых плавления, что указывает на увеличение степени ненасыщенности ТАГ, при этом заметно увеличивается площадь пика  $S_3$ , а значит, растет содержание в масле ТАГ типа UUU и UUS. Всего установлено 46 корреляций. Таким образом, проверка образцов масла РП, растущей в Дагестане, по корреляциям позволяет установить условия созревания данного растительного сырья и с большой долей вероятности место произрастания [184].



Выявлено, 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). Показана возможность контроля методом ДСК подлинности масла РП и его происхождения.

Получена и охарактеризована выборка данных по теплофизическим показателям масла дикорастущей РП из различных районов Дагестана с применением метода ДСК, установлен диапазон варьирования этих показателей, показан алгоритм установления подлинности масла РП по данным термического анализа. 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 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 [183–186].

### 3.5 Идентификация и определение флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой

Идентификацию изомеров флаволигнанов проводили методом ВЭЖХ. На рисунках 13 и 14 приведены хроматографические профили спиртового извлечения плодов и спиртового раствора ГСО силибина соответственно; на рисунках 15 и 16 УФ-спектры и масс-спектры соответственно. При сравнении времени удерживания силибина на хроматографическом профиле стандартного образца (9.546 мин) и экспериментального образца (9.605 мин), видно, что второй пик принадлежит силибину. Относительное время удержания силикрстина и силидианина относительно силибина равно 0.57 и 1.11 соответственно. При

сопоставлении полученных хроматографических профилей с профилями, приведенными в [21], можно сделать вывод, что первый большой пик принадлежит силикрину, третий, идущий за пиком силибина, – силидианину.

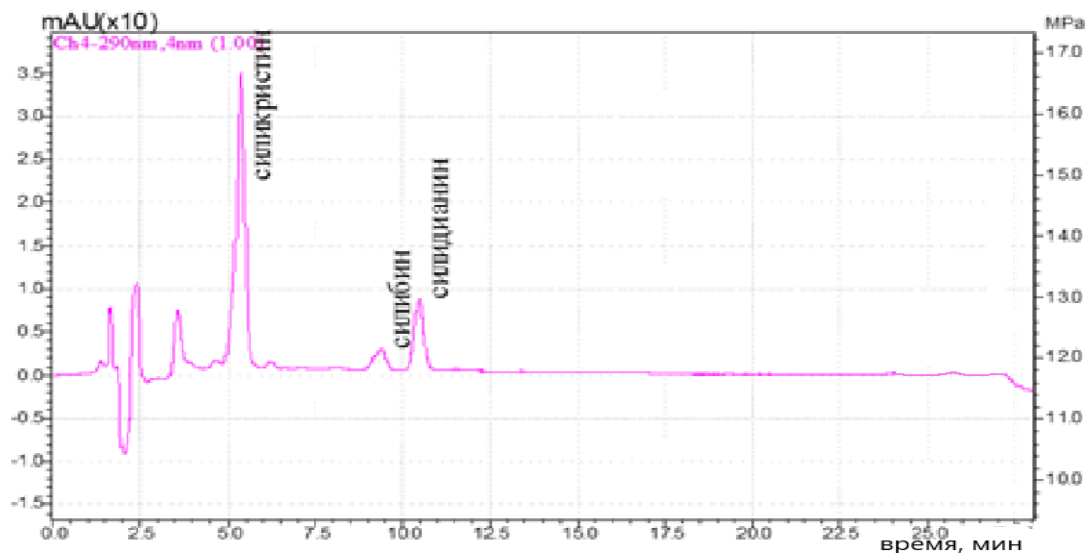


Рисунок 13 – Хроматографический профиль спиртового извлечения из плодов расторопши пятнистой.

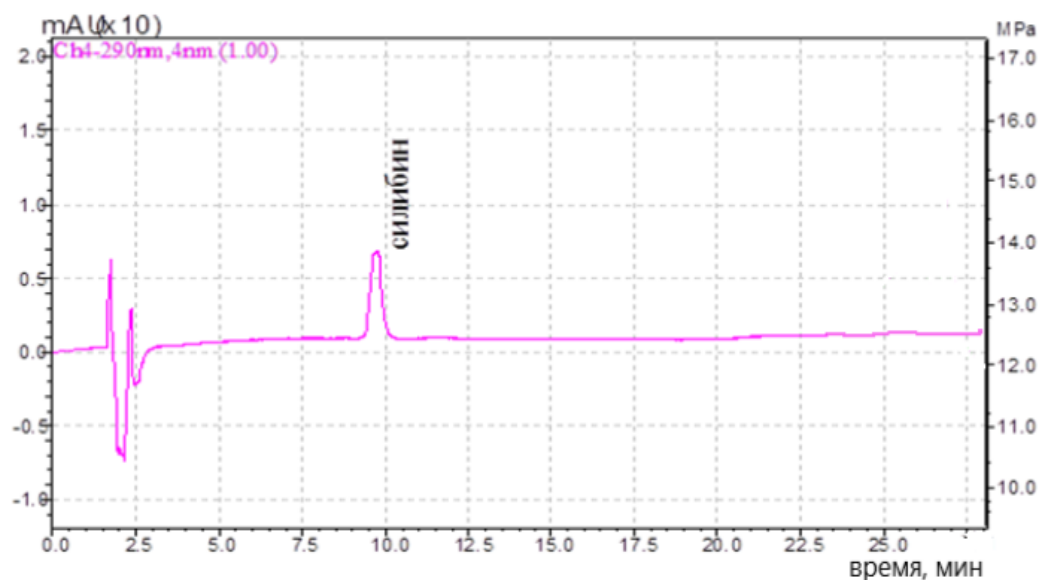


Рисунок 14 – Хроматографический профиль спиртового раствора СО силибина.

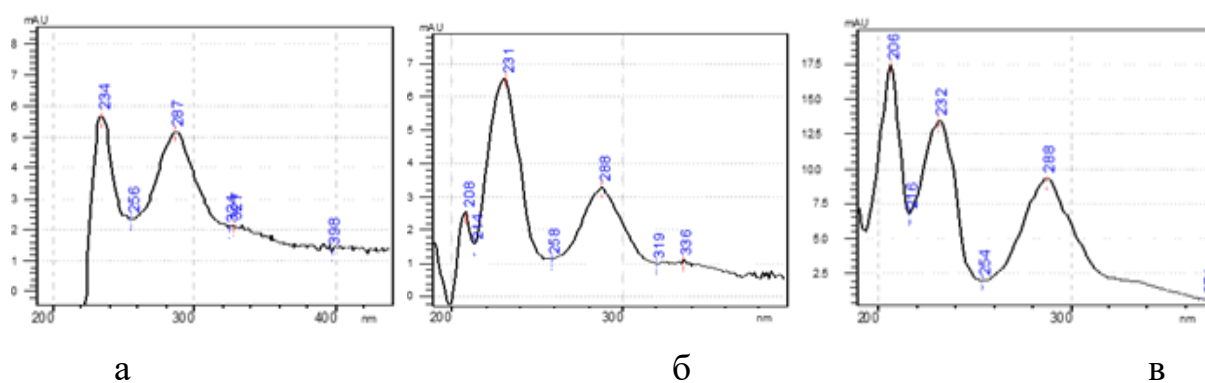


Рисунок 15 –УФ спектры силибина (а), силикрстина (б) и силидианина (в).

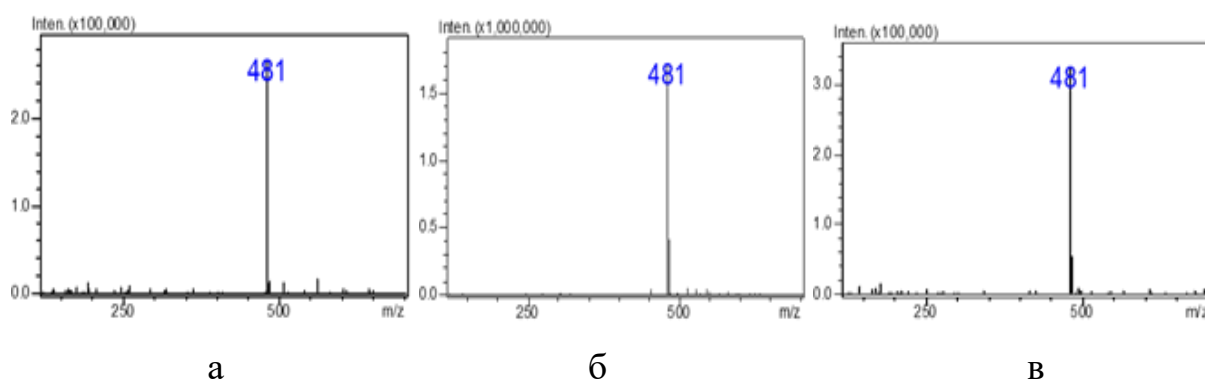


Рисунок 16 – Масс-спектры силибина (а), силикрстина (б) и силидианина (в).

Таблица 27 - Содержание изомеров флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой (n=3, p=0.95)

| Флаволигнаны, % | РД        | [1, 2, 62, 75] |
|-----------------|-----------|----------------|
| Силикрстин      | 1.7±0.1   | 1.24-2.62      |
| Силибин         | 0.17±0.05 | 0.64-1.97      |
| Силидианин      | 0.5±0.1   | 0.38-1.24      |

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

В таблице 27 приведено содержание силидианина, силикрстина и силибина в плодах РП собранных в С.–Стальском районе Дагестана. Суммарное содержание флаволигнанов в плодах РП дикорастущей на территории С.–Стальского района Дагестана составляет 4.0 % (таблица 10), что соответствует

требованиям ГФ XIII. Это значение лежит в пределах среднестатистического значения содержания флаволигнанов в плодах РП культивируемой в других областях России [18, 22, 34, 56]. Из них суммарное содержание силикрстина, силибина, силидианина составило 2.36 %. Оставшаяся часть (1.64 %) приходится на другие изомеры флаволигнанов и таксифолин. Содержание силидианина более чем в два раза выше содержания силибина. Следует отметить также высокое содержание изомера силикрстина. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что РП, произрастающая в Сулейман Стальском районе Дагестана относится к силидианиновой расе.

### 3.6 Идентификация и определение аминокислот в белке плодов расторопши пятнистой

Одним из важнейших биохимических критериев пищевой ценности продуктов питания является общее содержание белка и незаменимых аминокислот, от качества и количества, которых зависит биологическая ценность продуктов питания. Известно, что в зависимости от хеморасы, места произрастания и агроклиматических условий возделывания качественный состав и количественное содержание белка в растительном сырье и в продуктах их переработки может меняться.

Содержание аминокислот в белке плодов РП определяли методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином (ГОСТ 32195-2013).

На рисунках 17 и 18 приведены хроматографические профили стандартного образца фирмы Sykam GmbH и пробы с Кулинского района Дагестана. Так как триптофан подвергался щелочным гидролизом, идентификацию и определение проводили отдельно. На рисунках 19 и 20 приведены хроматограммы стандартного образца триптофана и анализируемого образца. Содержание аминокислот рассчитывали по площадям соответствующих пиков на хроматограмме исследуемого образца белка относительно пиков на хроматограмме стандартного образца.

В составе белка плодов РП идентифицированы и количественно определены 18 аминокислот (таблицы 28 и 29), в том числе: триптофан, цистеин и пролин, информация о которых нет в работах [6, 9, 14, 187, 188].

Общее содержание белка в плодах колеблется от 17.6 до 19.6% в сухом веществе. Минимальное количество белка обнаружено в плодах РП, произрастающей на территории Сулейман Стальского и Магарамкентского районов, максимальное – Кулинского района. Это может быть связано с различием высоты над уровнем моря и суммарных годовых осадков (таблица 5).

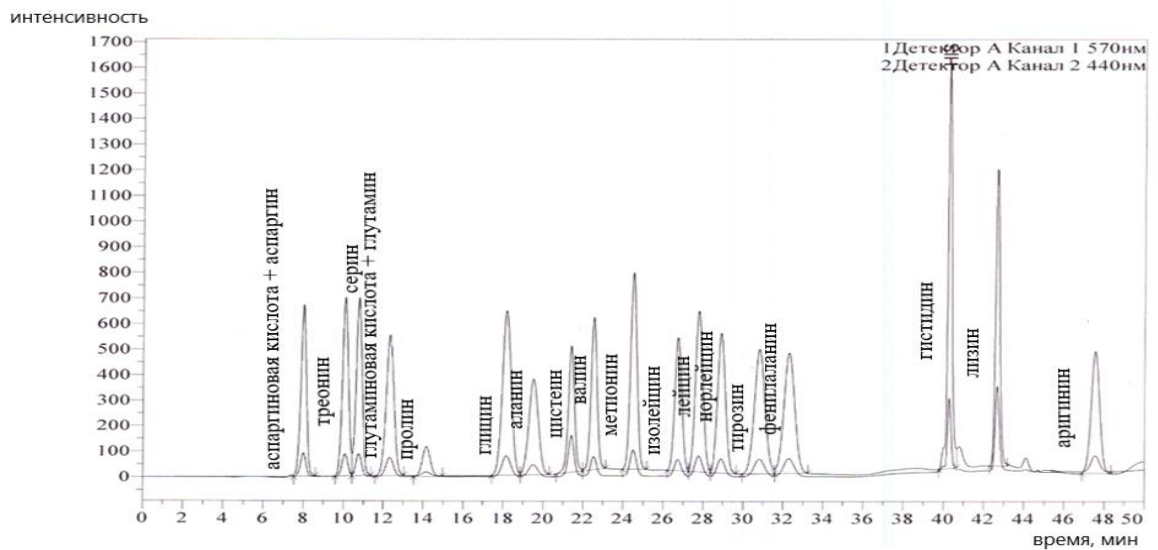


Рисунок 17 – Хроматограмма стандартного образца смесей аминокислот.

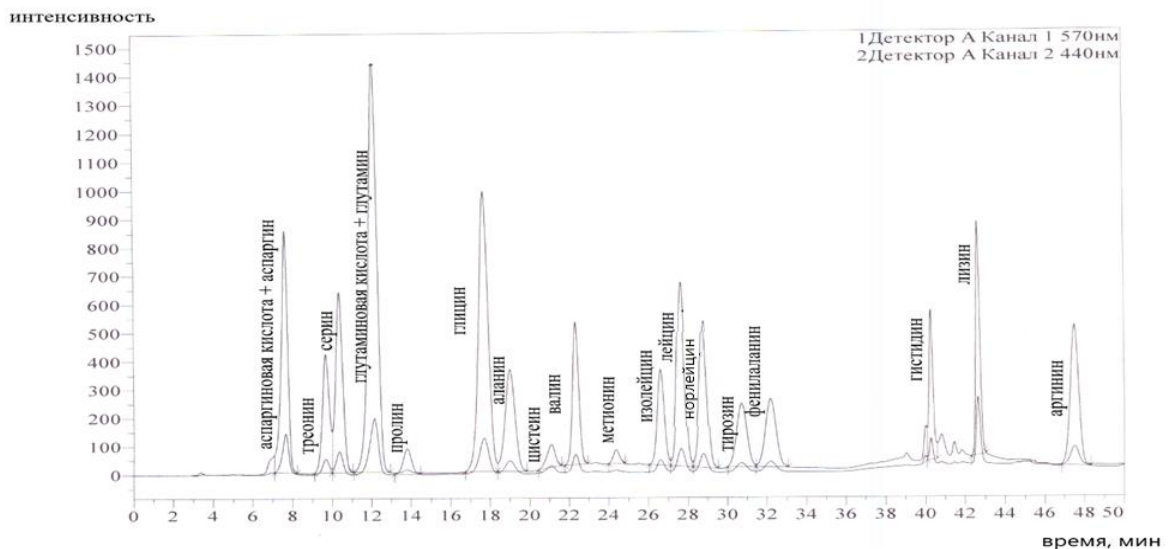


Рисунок 18 – Хроматограмма аминокислот образца плодов расторопши пятнистой, произрастающей на территории Кулинского района Дагестана.

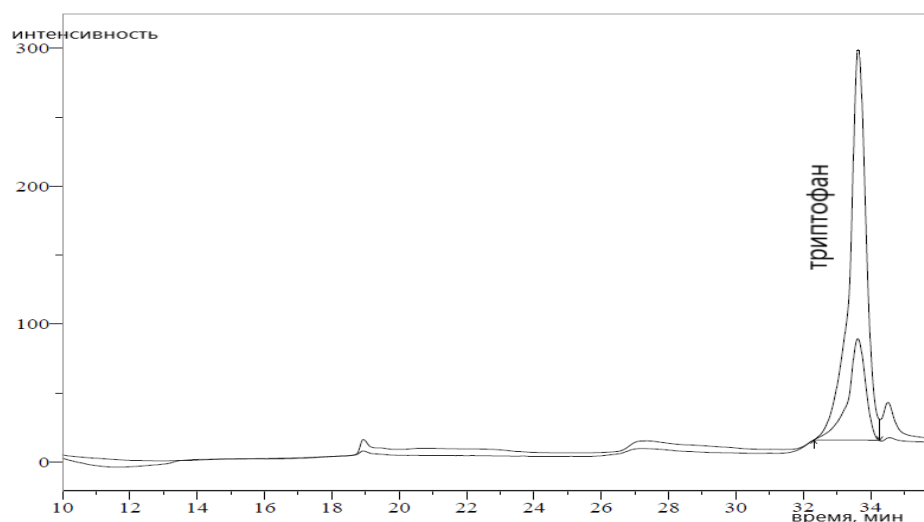


Рисунок 19 – Хроматограмма стандартного раствора триптофана.

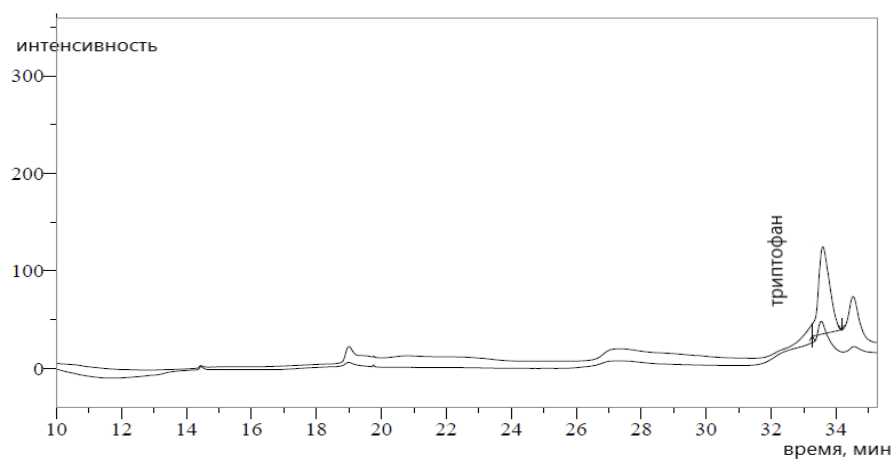


Рисунок 20 – Хроматограмма триптофана в образце плодов расторопши пятнистой произрастающей на территории Левашинского района Дагестана

Статистический анализ хроматографических данных показал, что в составе белков РП наблюдается вариативность, обусловленная фенотипическими факторами, отраженными в таблице 5 [188]. Имеются симбатные и асимбатные изменения аминокислотного состава в белках в зависимости от природно-климатических условий произрастания РП. Найденные значимые корреляции ( $|R| \geq 0.55$ ) приведены в таблице 31. Наиболее тесные корреляции ( $|R| \geq 0.80$ ) выделены жирным шрифтом.

Таблица 28 - Массовая доля аминокислот (%) в обезжиренных плодах расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане (n=3, p=0.95)

| Название кислоты                      | Район сбора образцов РП |             |                 |              |            |                    |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|--------------|------------|--------------------|
|                                       | Кулинский               | Левашинский | Магарамкентский | С. Стальский | Кайтагский | Смесь из 5 районов |
| Аспаргиновая кислота + аспаргин (Asp) | 2.10±0.20               | 1.89±0.50   | 1.97±0.40       | 1.94±0.60    | 2.12±0.50  | 1.94±0.70          |
| Треонин (Thr)                         | 0.87±0.04               | 0.81±0.06   | 0.81±0.06       | 0.80±0.09    | 0.87±0.02  | 0.79±0.20          |
| Серин (Ser)                           | 1.19±0.09               | 1.10±0.02   | 1.01±0.05       | 1.10±0.04    | 1.19±0.06  | 1.08±0.10          |
| Глутаминовая кислота + глутамин (Glu) | 4.63±0.08               | 4.23±0.09   | 4.11±0.08       | 4.24±0.06    | 4.67±0.09  | 4.14±0.08          |
| Глицин (Gly)                          | 1.32±0.09               | 1.23±0.06   | 1.22±0.03       | 1.17±0.05    | 1.29±0.06  | 1.16±0.08          |
| Аланин (Ala)                          | 0.95±0.04               | 0.85±0.08   | 0.87±0.02       | 0.83±0.08    | 0.93±0.07  | 0.83±0.05          |
| Цистеин (Cys)                         | 0.27±0.02               | 0.32±0.02   | 0.22±0.04       | 0.28±0.04    | 0.32±0.04  | 0.25±0.04          |
| Валин (Val)                           | 1.06±0.03               | 0.96±0.07   | 0.95±0.09       | 0.95±0.08    | 1.06±0.08  | 0.95±0.09          |
| Метионин (Met)                        | 0.10±0.02               | 0.25±0.06   | 0.05±0.01       | 0.11±0.08    | 0.19±0.06  | 0.09±0.02          |
| Изолейцин (Ileu)                      | 0.91±0.03               | 0.81±0.09   | 0.81±0.05       | 0.80±0.04    | 0.89±0.05  | 0.81±0.03          |
| Лейцин (Leu)                          | 1.41±0.06               | 1.29±0.08   | 1.31±0.09       | 1.29±0.08    | 1.43±0.09  | 1.28±0.09          |
| Тирозин (Tyr)                         | 0.85±0.02               | 0.87±0.06   | 0.79±0.06       | 0.79±0.05    | 0.87±0.07  | 0.80±0.06          |
| Фенилаланин (Phe)                     | 0.90±0.04               | 0.82±0.04   | 0.83±0.08       | 0.80±0.07    | 0.92±0.06  | 0.82±0.08          |
| Гистидин (His)                        | 0.54±0.06               | 0.48±0.03   | 0.49±0.03       | 0.48±0.09    | 0.52±0.08  | 0.46±0.06          |
| Лизин (Lys)                           | 1.03±0.01               | 1.04±0.02   | 0.98±0.05       | 1.01±0.06    | 1.02±0.05  | 0.94±0.06          |
| Аргинин (Arg)                         | 1.91±0.08               | 1.73±0.07   | 1.68±0.08       | 1.83±0.09    | 2.06±0.08  | 1.72±0.08          |
| Пролин (Pro)                          | 0.97±0.06               | 0.90±0.04   | 0.89±0.07       | 0.89±0.03    | 0.94±0.03  | 0.87±0.09          |
| Триптофан (Trp)                       | 0.13±0.02               | 0.12±0.02   | 0.11±0.03       | 0.11±0.01    | 0.13±0.02  | 0.10±0.02          |
| Общее содержание белка (WP)           | 19.6±0.5                | 18.7±0.5    | 17.3±0.5        | 17.6±0.5     | 17.3±0.5   | 17.6±0.5           |

Таблица 29 - Содержание аминокислот (%) в белке расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане (n=3, p=0.95)

| Название кислоты                      | Массовая доля в белке, % |             |                 |              |            |                                  |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------|-----------------|--------------|------------|----------------------------------|
|                                       | Кулинский                | Левашинский | Магарамкентский | С. Стальский | Кайтагский | Литературные данные [35, 37, 39] |
| Аспаргиновая кислота + аспаргин (Asp) | 9.92±0.05                | 9.60±0.05   | 10.00±0.04      | 9.90±0.05    | 10.30±0.02 | 6.91-11.3                        |
| Треонин (Thr)                         | 4.10±0.02                | 4.13±0.03   | 4.14±0.05       | 4.05±0.05    | 4.21±0.03  | 3.31-5.12                        |
| Серин (Ser)                           | 5.61±0.03                | 5.63±0.03   | 5.69±0.02       | 5.56±0.03    | 5.73±0.02  | 4.05-19.8                        |
| Глутаминовая кислота + глутамин (Glu) | 21.90±0.03               | 21.50±0.02  | 21.80±0.01      | 21.82±0.02   | 21.41±0.04 | 3.8-29.62                        |
| Глицин (Gly)                          | 6.23±0.02                | 6.24±0.02   | 6.01±0.05       | 6.03±0.07    | 6.36±0.02  | 4.2-8.27                         |
| Аланин (Ala)                          | 4.48±0.05                | 4.31±0.04   | 4.30±0.01       | 4.32±0.03    | 4.54±0.02  | 2.87-6.69                        |
| Цистеин (Cys)                         | 1.30±0.01                | 1.61±0.04   | 1.45±0.06       | 1.50±0.03    | 1.14±0.05  | 0.8-2.16                         |
| Валин (Val)                           | 5.00±0.02                | 4.88±0.03   | 4.88±0.02       | 4.96±0.05    | 4.97±0.03  | 3.79-7.97                        |
| Метионин (Met)                        | 0.46±0.05                | 1.27±0.03   | 0.58±0.05       | 0.86±0.08    | 0.27±0.05  | 0.85-2.46                        |
| Изолейцин (Ileu)                      | 4.27±0.02                | 4.10±0.01   | 4.12±0.02       | 4.13±0.01    | 4.24±0.02  | 2.98-8.9                         |
| Лейцин (Leu)                          | 6.87±0.03                | 6.54±0.05   | 6.62±0.02       | 6.69±0.06    | 6.81±0.03  | 5.62-9.84                        |
| Тирозин (Tyr)                         | 4.03±0.01                | 4.43±0.02   | 4.08±0.06       | 4.07±0.02    | 4.11±0.05  | 3.6-5.41                         |
| Фенилаланин (Phe)                     | 4.25±0.02                | 4.17±0.03   | 4.12±0.01       | 4.29±0.01    | 4.30±0.02  | 0.61-6.1                         |
| Гистидин (His)                        | 2.54±0.03                | 2.43±0.04   | 2.45±0.06       | 2.43±0.02    | 2.55±0.05  | 2.8-3.45                         |
| Лизин (Lys)                           | 4.86±0.02                | 5.26±0.05   | 5.19±0.04       | 4.78±0.05    | 5.13±0.08  | 4.4-7.38                         |
| Аргинин (Arg)                         | 9.03±0.02                | 8.77±0.06   | 9.42±0.08       | 9.60±0.07    | 8.75±0.05  | 7.06-12.59                       |
| Пролин (Pro)                          | 4.56±0.02                | 4.58±0.04   | 4.56±0.01       | 4.40±0.02    | 4.61±0.03  | 5.8-7.28                         |
| Триптофан (Trp)                       | 0.63±0.01                | 0.61±0.01   | 0.58±0.02       | 0.62±0.01    | 0.59±0.02  | -                                |



Таблица 30 – Линейные тренды для аминокислот белков дикорастущей расторопши пятнистой  $Y=aX+b$  и степени парной корреляции R

| Аминокислоты<br>X/Y | R            | $aX+b$           | Аминокислоты<br>X/Y | R            | $aX+b$            |
|---------------------|--------------|------------------|---------------------|--------------|-------------------|
| glu/gly             | -0.67        | 16.5-0.5X        | cys/val             | -0.70        | 5.2-0.2X          |
| glu/thr             | -0.57        | 14-0.4X          | <b>cys/met</b>      | <b>0.93</b>  | <b>2.0X-2.1</b>   |
| glu/lys             | -0.63        | 18.8-0.6X        | <b>cys/ileu</b>     | <b>0.87</b>  | <b>4.7-0.4X</b>   |
| glu/arg             | 0.72         | 1.3X-18.4        | <b>cys/leu</b>      | <b>-0.85</b> | <b>7.6-0.6X</b>   |
| glu/pH              | -0.79        | 62.6-2.6X        | cys/phe             | -0.60        | 4.6-0.3X          |
| glu/T <sub>cp</sub> | -0.59        | 162-6X           | cys/his             | -0.76        | 2.8-0.3X          |
| <b>glu/aT</b>       | <b>0.90</b>  | <b>5.4X-81.4</b> | <b>cys/WP</b>       | <b>-0.84</b> | <b>25.0-4.6X</b>  |
| glu/W <sub>1</sub>  | 0.63         | 11X-183          | val/met             | -0.63        | 22.4-4.4X         |
| gly/ala             | 0.78         | 0.6X+0.9         | <b>val/ileu</b>     | <b>0.87</b>  | <b>1.3X-2.1</b>   |
| gly/his             | 0.72         | 0.3X+0.6         | <b>val/leu</b>      | <b>0.91</b>  | <b>2.1X-3.9</b>   |
| <b>gly/arg</b>      | <b>-0.88</b> | <b>22.6-2.2X</b> | <b>val/phe</b>      | <b>0.87</b>  | <b>1.3X-2.1</b>   |
| gly/pro             | 0.64         | 0.3X+2.5         | val/lys             | -0.78        | 19.4-2.9X         |
| <b>gly/WP</b>       | <b>0.81</b>  | <b>5.4X-14.6</b> | val/WP              | 0.77         | 14X-51            |
| <b>ala/cys</b>      | <b>-0.88</b> | <b>7.9-1.5X</b>  | val/aT              | 0.60         | 14X-34            |
| ala/val             | 0.69         | 0.4X+3.4         | val/S               | -0.69        | 877-164X          |
| ala/met             | -0.71        | 11.8-2.5X        | <b>met/ileu</b>     | <b>-0.80</b> | <b>4.3-0.2X</b>   |
| <b>ala/ileu</b>     | <b>0.81</b>  | <b>0.6X+1.5</b>  | <b>met/leu</b>      | <b>-0.81</b> | <b>6.9-0.3X</b>   |
| <b>ala/leu</b>      | <b>0.85</b>  | <b>1.0X+2.2</b>  | met/thr             | -0.69        | 4.0-0.3X          |
| ala/phe             | 0.56         | 0.4X+2.4         | met/his             | -0.65        | 2.5-0.1X          |
| <b>ala/his</b>      | <b>0.93</b>  | <b>0.5X+0.1</b>  | met/WP              | -0.66        | 20-2X             |
| <b>ala/WP</b>       | <b>0.97</b>  | <b>8.7X-19.6</b> | <b>ileu/leu</b>     | <b>0.92</b>  | <b>1.5X+0.6</b>   |
| aka/S               | -0.66        | 404-76X          | ileu/phe            | 0.66         | 0.7X+1.5          |
| asp/thr             | 0.59         | 0.14X+2.7        | <b>thr/ser</b>      | <b>0.96</b>  | <b>1.1X+1.1</b>   |
| asp/ser             | 0.68         | 0.17X+3.9        | thr/glu             | -0.68        | 31.6-2.4X         |
| <b>asp/cys</b>      | <b>-0.88</b> | <b>7.3-0.6X</b>  | thr/cys             | -0.62        | 9.2-1.9X          |
| <b>asp/met</b>      | <b>-0.90</b> | <b>13.7-1.3X</b> | thr/lys             | 0.57         | 2.0X-3.3          |
| asp/ileu            | 0.64         | 0.20X+2.2        | thr/arg             | -0.68        | 26.7-4.2X         |
| asp/leu             | 0.60         | 0.29X+3.8        | <b>thr/pro</b>      | <b>0.84</b>  | <b>1.1X-0.10</b>  |
| asp/phe             | 0.55         | 0.17X+2.6        | thr/tyr             | -0.64        | 2.2-0.4X          |
| asp/trp             | -0.60        | 1.4-0.08X        | <b>thr/pH</b>       | <b>0.89</b>  | <b>10.7X-37.6</b> |
| asp/H               | -0.61        | 19344-1843X      | thr/aT              | -0.71        | 101-16X           |
| asp/G               | 0.59         | 27.2-2.2X        | ser/met             | -0.57        | 19.3-3.3X         |
| asp/W <sub>1</sub>  | -0.58        | 4549-434X        | ser/lis             | 0.57         | 1.8X-5.1          |
| asp/W <sub>2</sub>  | -0.71        | 154-10.5X        | ser/pro             | 0.78         | 0.9X-0.7          |
| ser/chs             | -0.60        | 10.5-1.6X        | ser/trp             | -0.70        | 2.6-0.4X          |

|                    |              |                  |                     |              |                 |
|--------------------|--------------|------------------|---------------------|--------------|-----------------|
| <b>ser/pH</b>      | <b>0.84</b>  | <b>8.8X-43.3</b> | ser/aT              | -0.64        | 107-12.5X       |
| ser/W <sub>2</sub> | -0.55        | 220-30X          | trp/W <sub>2</sub>  | 0.63         | 113X-18         |
| ileu/his           | 0.67         | 0.5X+0.4         | trp/ΣT              | -0.60        | 10000-11800X    |
| <b>ileu/WP</b>     | <b>0.96</b>  | <b>12X-33</b>    | trp/ГТК             | 0.72         | 31.6X-18.2      |
| <b>ileu/S</b>      | <b>-0.84</b> | <b>656-141X</b>  | trp/H               | 0.67         | 24600X-13900    |
| leu/tyr            | -0.67        | 9.7-0.8X         | trp/pH              | -0.68        | 21-24X          |
| leu/phe            | 0.67         | 0.4X+1.4         | trp/T <sub>cp</sub> | -0.72        | 73-81X          |
| leu/his            | 0.79         | 0.40X-0.02       | trip/aT             | 0.68         | 43X+10          |
| <b>leu/WP</b>      | <b>0.87</b>  | <b>6.4X-24.4</b> | trp/W <sub>1</sub>  | 0.71         | 6470X-3690      |
| leu/lys            | -0.58        | 11.3-0.9X        | trp/S               | -0.57        | 285-358X        |
| leu/S              | -0.77        | 561-73X          | lys/pro             | 0.68         | 0.3X-3.2        |
| tyr/aT             | -0.65        | 58-5X            | <b>lys/pH</b>       | <b>0.94</b>  | <b>3.1X-9.3</b> |
| phe/lys            | -0.67        | 12.2-1.7X        | <b>lys/aT</b>       | <b>0.85</b>  | <b>63-5X</b>    |
| phe/WR             | 0.60         | 7.6X-13.6        | <b>arg/pro</b>      | <b>-0.82</b> | <b>6.1-0.2X</b> |
| <b>his/WP</b>      | <b>0.96</b>  | <b>16X-21</b>    | arg/WP              | -0.61        | 33.0-1.6X       |
| his/S              | -0.60        | 463-159X         | arg/G               | 0.62         | 19.2-1.5X       |
| <b>pro/pH</b>      | <b>0.84</b>  | <b>7.2X-26.3</b> | arg/pH              | -0.71        | 18.4-1.6X       |

Наличие неслучайного, взаимосвязанного изменения соотношений между аминокислотами X/Y прослеживается для белков сои [189], однако для белка РП характерны другие пропорции, другие численные значения эмпирических коэффициентов *a* и *b*. Для тесных трендов отметим, что симбатно изменяются соотношения в парах аланин – лейцин, аланин – изолейцин, аланин – гистидин, треонин – серин, треонин – пролин, валин – лейцин и изолейцин, валин – фенилаланин, изолейцин – лейцин. Асимбатно изменяется содержание в белке в парах метионин – лейцин и изолейцин, цистеин – изолейцин. Прослеживаются прямые и обратные корреляции между содержанием отдельных аминокислот и общим содержанием белка (WP) в плодах. При его увеличении растет доля аланина, гистидина, изолейцина и лейцина, при этом сокращается содержание в белке цистеина и аргинина. Некоторые аминокислоты весьма чувствительны к климатическим условиям. Так, для РП выросшей на более кислых почвах в белке увеличивается содержание глутаминовой кислоты, аспарагина и триптофана, уменьшается доля треонина, лизина, пролина и серина. На температурный фактор (таблицы 5 и 30) реагирует содержание глутаминовой кислоты, валина, серина, треонина, лизина и триптофана. Фактор освещённости влияет асимбатно на

содержание в белке аланина, лейцина, изолейцина и гистидина – чем больше солнечных дней (S), тем ниже в белке содержание этих кислот. Высота над уровнем моря (H), содержание гумуса (G) как самостоятельные факторы слабо влияют на аминокислотный состав, отмечены только отдельные тренды, а вот факторы влажности и наличие осадков ( $W_1$  и  $W_2$ ) имеют значение для таких аминокислот, как триптофан, глутаминовая кислота (симбатные тренды), аспарагин, серин (асимбатные тренды). Интересно отметить, что наиболее чувствителен буквально ко всем фенотипическим факторам триптофан, его содержание либо прямо, либо обратно пропорционально колеблется при влиянии того или иного климатического воздействия (таблица 30). Что касается содержания белка в плодах РП, то оно достаточно тесно коррелирует только с количеством солнечных дней ( $Y=260-10X$ ,  $R=-0.80$ ), т.е. при произрастании в условиях повышенной облачности в РП образуется более высокое количество белка [188].

Статистический анализ массива данных по аминокислотному составу белков дикорастущей расторопши пятнистой показал наличие значимых природных корреляций между содержанием некоторых заменимых и незаменимых аминокислот.

Для оценки биологической ценности белка применены компьютерные технологии расчета математических зависимостей широко применяемых показателей [158, 159]. В таблице 31 приведены оценки биологической ценности белка плодов РП аминокислотный скор (С); разбалансированность аминокислотного скора (РАС); коэффициент разбалансированности аминокислотного скора (КРАС); коэффициент утилитарности аминокислотного состава (а<sub>j</sub>); обобщающий коэффициент утилитарности аминокислотного состава (U); биологическую ценность (БЦ), индекс незаменимых аминокислот (ИНАК) [187, 188].

Суммарное содержание незаменимых аминокислот во всех образцах превышает содержание в идеальном белке [42] за счет высокого содержания треонина, валина, изолейцина, лейцина и лизина. Белок плодов РП уступает

идеальному белку только по содержанию триптофана. По суммарному содержанию фенилаланина и тирозина белок РП превышает содержание идеального белка более чем в 2 раза. По содержанию метионина и цистеина идеальному белку уступают белки плодов, собранных в Магарамкентском, Кулинском и Сулейман Стальском районах.

Таблица 31 – Биологическая ценность белка расторопши пятнистой, произрастающей в разных районах Дагестана

| Незаменимая аминокислота | Содержание, г/100 г в образцах белка |             |                 |              |            |                |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------|-----------------|--------------|------------|----------------|
|                          | Кулинский                            | Левашинский | Магарамкентский | С. Стальский | Кайтагский | Идеальный [42] |
| 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 + тирозин    | 8.3                                  | 8.6         | 8.4             | 8.2          | 8.4        | 4.1            |
| 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.

По суммарному содержанию незаменимых аминокислот лидируют плоды, собранные в Левашинском районе (37 г в 100 г белка). В остальных плодах суммарное содержание незаменимых аминокислот составляет около 36 г в 100 г белка. По общепринятым коэффициентам биологической ценности белка – коэффициенту разбалансированности аминокислотного скора (КРАС); обобщающему коэффициенту утилитарности аминокислотного состава (U); биологической ценности (БЦ) и индексу незаменимых аминокислот (ИНАК) лучшими является плоды РП, произрастающей на территории Кайтагского района

РД. По этим показателям всем образцам из других районов уступают плоды РП, собранные в Магарамкентском районе.

Выявленные показатели пищевой ценности белка расторопши, выросшей в разных районах Дагестана по природно-климатическим условиям и установленные фенотипические тренды в аминокислотном составе белков расторопши пятнистой могут быть использованы в дальнейших биологических, биохимических и диетологических исследованиях [188].

### 3.7 Идентификация и определение водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой

Содержание водорастворимых витаминов группы В определяли ВЭЖХ, аскорбиновую кислоту определяли титриметрическим методом с использованием в качестве титранта 2,6-дихлориндофенолятом натрия [69].

На рисунках 21 и 22 приведены хроматографические профили раствора стандартных образцов водорастворимых витаминов и водного извлечения из плодов расторопши пятнистой, регистрируемые при 260 и 280 нм. В таблице 32 приведено содержание водорастворимых витаминов в образцах плодов РП произрастающих в разных почвенно-климатических условиях на территории Дагестана. Хроматограммы проб, собранных в Кулинском, Левашинском, С.-Стальском, Кайтагском районах РД приведены в приложении.

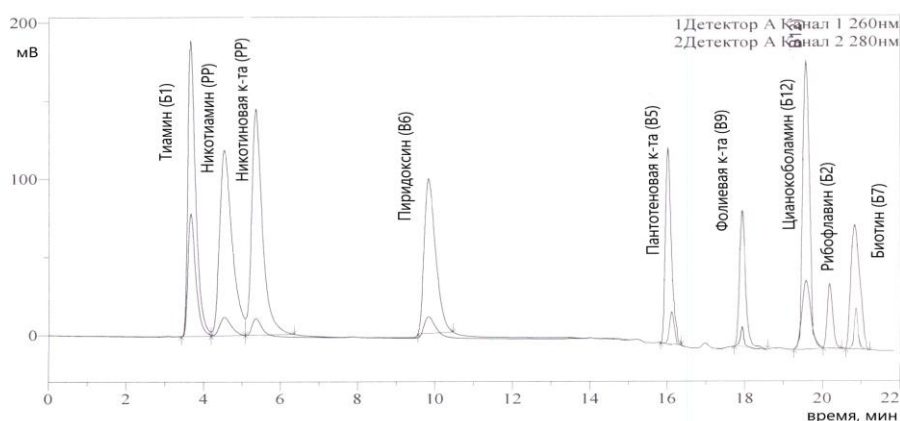


Рисунок 21 – Хроматографический профиль раствора стандартных образцов водорастворимых витаминов.

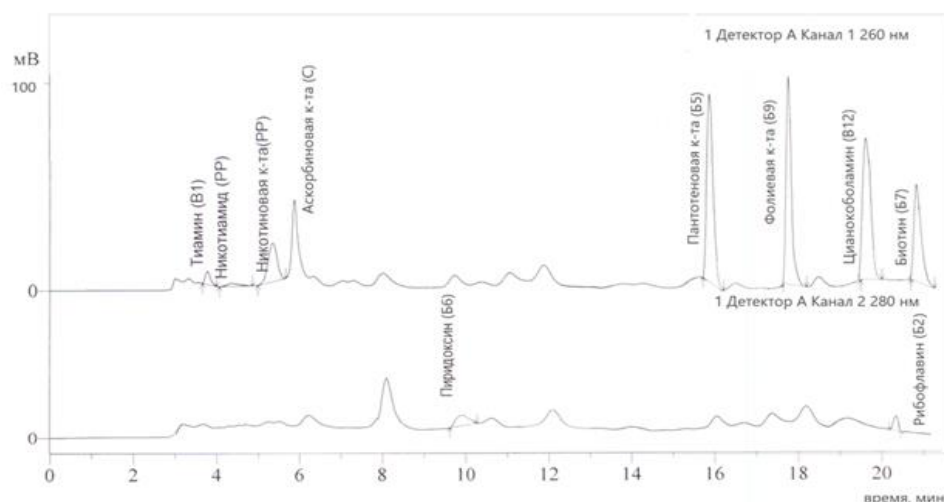


Рисунок 22 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения плодов расторопши пятнистой, собранных в Кулинском районе.

В плодах РП обнаружено 9 витаминов группы В и аскорбиновая кислота. В наибольшем количестве во всех пробах обнаружены: аскорбиновая кислота, фолиевая кислота, пантотеновая кислота и биотин, содержание которых может обеспечить суточную потребность взрослого человека при потреблении в пищу 100 г шрота плодов РП. Этот продукт может послужить дополнительным источником тиамин, рибофлавина, пиридоксина, никотиновой кислоты и никотинамида [190, 191]. С ростом суммы активных температур и уменьшением суммы осадков, суммарное содержание водорастворимых витаминов в образцах уменьшается.

Статистический анализ хроматографических данных показал, что в витаминном составе плодов РП наблюдается вариативность, обусловленная фенотипическими факторами, отраженными в таблице 5. Имеются симбатные и асимбатные изменения состава водорастворимых витаминов в плодах РП в зависимости от природно-климатических условий произрастания РП. Найденные значимые корреляции ( $|R| \geq 0.55$ ) приведены в таблице 33. Наиболее тесные корреляции ( $|R| \geq 0.80$ ) выделены жирным шрифтом.

Таблица 32 - Содержание водорастворимых витаминов в плодах расторопши пятнистой произрастающей в разных районах Дагестана (2020 г) (n=3, p=0.95)

| Витамин                  | Содержание в образцах, мг/ 100 г |             |                 |              |            | Суточная потребность, мг |
|--------------------------|----------------------------------|-------------|-----------------|--------------|------------|--------------------------|
|                          | Кулинский                        | Левашинский | Магарамкентский | С.-Стальский | Кайтагский |                          |
| Аскорбиновая кислота (С) | 80±5                             | 78 ±6       | 65±3            | 60 ±5        | 62±6       | 50-100                   |
| Тиамин (В1)              | 0.7±0.2                          | 0.7±0.2     | 0.6±0.1         | 0.4±0.1      | 0.5±0.1    | 2-3                      |
| Рибофлавин (В2)          | 0.5±0.1                          | 0.5±0.1     | 0.9±0.2         | 1.0 ±0.1     | 2.5±0.2    | 2-4                      |
| Пантотеновая к-та (В5)   | 23±2                             | 21±1        | 20±1            | 15.4±0.3     | 15±1       | 10-15                    |
| Пиридоксин (В6)          | 0.2±0.1                          | 0.6±0.2     | 0.9±0.2         | 0.2±0.1      | 0.4±0.2    | 10-15                    |
| Биотин (В7)              | 8±2                              | 10±3        | 11±2            | 13±1         | 18±3       | 10                       |
| Фолиевая к-та (В9)       | 18±1                             | 20±3        | 21±1            | 21±1         | 22±2       | 0.2                      |
| Цианокобаламин (В12)     | 3.1±0.2                          | 2.9±0.2     | 2.8±0.2         | 2.6±0.1      | 2.1±0.1    | 2.4                      |
| Никотиновая к-та (РР)    | 2.5±0.2                          | 3.5±0.4     | 2.9±0.5         | 1.4±0.1      | 1.9±0.3    | 15-25                    |
| Никотинамид (РР)         | 0.2±0.1                          | 0.2±0.1     | 0.3±0.1         | 0.2±0.1      | 0.2±0.1    |                          |
| Сумма (SS)               | 137±11                           | 137±12      | 116±10          | 116±9        | 125±13     |                          |

Таблица 33 – Значимые линейные тренды для водорастворимых витаминов плодов дикорастущей расторопши пятнистой  $Y=aX+b$  и степени парной корреляции R

| Витамины X/Y                       | R            | $aX+b$              | Витамины X/Y                        | R            | $aX+b$              |
|------------------------------------|--------------|---------------------|-------------------------------------|--------------|---------------------|
| <b>C/H</b>                         | <b>0.95</b>  | <b>137X - 6274</b>  | <b>B<sub>5</sub>/W<sub>1</sub></b>  | <b>0.89</b>  | <b>1.4X + 30.5</b>  |
| <b>C/T<sub>cp</sub></b>            | <b>-0.83</b> | <b>34 - 0.4X</b>    | <b>B<sub>5</sub>/B<sub>7</sub></b>  | <b>-0.90</b> | <b>23 - X</b>       |
| <b>C/G</b>                         | <b>0.96</b>  | <b>0.2X - 3.6</b>   | <b>B<sub>5</sub>/B<sub>9</sub></b>  | <b>-0.97</b> | <b>22.1 - 0.55X</b> |
| <b>C/W<sub>2</sub></b>             | <b>0.92</b>  | <b>33X - 1525</b>   | <b>B<sub>5</sub>/B<sub>12</sub></b> | <b>0.89</b>  | <b>0.1X + 0.8</b>   |
| <b>C/S</b>                         | -0.72        | 163 - 1.8X          | <b>B<sub>5</sub>/PP</b>             | <b>0.92</b>  | <b>0.2X - 1.3</b>   |
| <b>C/ΣT</b>                        | <b>-0.93</b> | <b>6678 - 72X</b>   | B <sub>5</sub> /SS                  | 0.79         | 2X + 73             |
| <b>C/ГТК</b>                       | <b>0.90</b>  | <b>0.2X - 7.4</b>   | B <sub>6</sub> /pH                  | 0.67         | 2.5X + 6            |
| <b>C/W<sub>1</sub></b>             | <b>0.82</b>  | <b>0.6X + 20</b>    | B <sub>6</sub> /aT                  | -0.59        | 37 - 4X             |
| <b>C/B<sub>1</sub></b>             | <b>0.94</b>  | <b>0.01X - 0.36</b> | B <sub>7</sub> /H                   | -0.79        | 2867 - 214X         |
| <b>C/B<sub>5</sub></b>             | <b>0.94</b>  | <b>0.4X - 8.5</b>   | <b>B<sub>7</sub>/T<sub>cp</sub></b> | <b>0.80</b>  | <b>0.7X + 18</b>    |
| <b>C/B<sub>7</sub></b>             | -0.75        | 30 - 0.4X           | B <sub>7</sub> /G                   | -0.68        | 7.5 - 0.2X          |
| <b>C/B<sub>9</sub></b>             | <b>-0.98</b> | <b>28 - 0.2X</b>    | <b>B<sub>7</sub>/W<sub>2</sub></b>  | <b>-0.84</b> | <b>716 - 56X</b>    |
| <b>C/B<sub>12</sub></b>            | 0.75         | 0.03X + 0.2         | B <sub>7</sub> /ΣT                  | 0.77         | 111X + 1882         |
| <b>C/PP</b>                        | <b>0.87</b>  | <b>0.1X - 3.5</b>   | B <sub>7</sub> /ГТК                 | -0.79        | 3 - 0.3X            |
| <b>C/SS</b>                        | <b>0.90</b>  | <b>0.9X + 50</b>    | <b>B<sub>7</sub>/W<sub>1</sub></b>  | <b>-0.98</b> | <b>61 - 1.3X</b>    |
| <b>B<sub>1</sub>/H</b>             | <b>0.80</b>  | <b>7333X - 2108</b> | <b>B<sub>7</sub>/B<sub>9</sub></b>  | <b>0.87</b>  | <b>0.4X + 11</b>    |
| B <sub>1</sub> /T <sub>cp</sub>    | -0.60        | 31 - 17X            | <b>B<sub>7</sub>/B<sub>12</sub></b> | <b>-0.99</b> | <b>2.7 - 0.1x</b>   |
| <b>B<sub>1</sub>/G</b>             | <b>0.92</b>  | <b>10X + 1.1</b>    | B <sub>7</sub> /PP                  | -0.68        | 3.3 - 0.2X          |
| B <sub>1</sub> /W <sub>2</sub>     | 0.66         | 1677X - 483         | <b>B<sub>9</sub>/H</b>              | <b>-0.96</b> | <b>9332 - 562X</b>  |
| B <sub>1</sub> /ΣT                 | -0.77        | 4451 - 3780X        | <b>B<sub>9</sub>/T<sub>cp</sub></b> | <b>0.90</b>  | <b>1.6X - 0.1</b>   |
| B <sub>1</sub> /ГТК                | 0.70         | 7.7X - 2.4          | <b>B<sub>9</sub>/G</b>              | <b>-0.92</b> | <b>15.3 - 0.7X</b>  |
| B <sub>1</sub> /W <sub>1</sub>     | 0.63         | 28X + 38            | <b>B<sub>9</sub>/W<sub>2</sub></b>  | <b>-0.96</b> | <b>2296 - 142X</b>  |
| <b>B<sub>1</sub>/B<sub>5</sub></b> | <b>0.88</b>  | <b>24X + 2.9</b>    | B <sub>9</sub> /S                   | 0.71         | 7X - 37             |
| B <sub>1</sub> /B <sub>7</sub>     | -0.60        | 17 - 20X            | <b>B<sub>9</sub>/ΣT</b>             | <b>0.96</b>  | <b>298X - 1572</b>  |
| <b>B<sub>1</sub>/B<sub>9</sub></b> | <b>-0.86</b> | <b>21 - 14X</b>     | <b>B<sub>9</sub>/ГТК</b>            | <b>-0.94</b> | <b>11 - 0.6X</b>    |
| B <sub>1</sub> /B <sub>12</sub>    | 0.60         | 1.6X + 1.3          | <b>B<sub>9</sub>/W<sub>1</sub></b>  | <b>-0.91</b> | <b>98 - 2.6X</b>    |
| <b>B<sub>1</sub>/PP</b>            | <b>0.95</b>  | <b>7.2X - 1.1</b>   | <b>B<sub>9</sub>/B<sub>12</sub></b> | <b>-0.86</b> | <b>4.2 - 0.2X</b>   |
| <b>B<sub>1</sub>/SS</b>            | <b>0.97</b>  | <b>58X + 70</b>     | <b>B<sub>9</sub>/PP</b>             | <b>-0.82</b> | <b>7.9 - 0.4X</b>   |
| B <sub>2</sub> /H                  | -0.61        | 1607 - 640X         | <b>B<sub>9</sub>/SS</b>             | <b>-0.80</b> | <b>141- 3X</b>      |
| B <sub>2</sub> /T <sub>cp</sub>    | 0.59         | 2.2X + 22           | <b>B<sub>12</sub>/H</b>             | <b>0.80</b>  | <b>2662X - 4203</b> |
| B <sub>2</sub> /W <sub>2</sub>     | -0.66        | 389 - 197X          | B <sub>12</sub> /T <sub>cp</sub>    | -0.79        | 40 - 8X             |



|                          |              |                    |                          |             |                    |
|--------------------------|--------------|--------------------|--------------------------|-------------|--------------------|
| $B_2/\Gamma\text{TK}$    | -0.58        | 1.6 - 0.8X         | $B_{12}/G$               | 0.70        | 2.8X + 0.1         |
| $B_2/W_1$                | <b>-0.88</b> | <b>54 - 5X</b>     | $B_{12}/W_2$             | <b>0.84</b> | <b>691X - 1123</b> |
| $B_2/B_5$                | -0.73        | 15.5 - 2.7X        | $B_{12}/\Sigma\Gamma$    | -0.76       | 5465 - 1339X       |
| $B_2/B_7$                | <b>0.94</b>  | <b>4.2X + 5.4</b>  | $B_{12}/\Gamma\text{TK}$ | 0.79        | 3.1X - 5.2         |
| $B_2/B_9$                | 0.67         | 1.4X + 13.7        | $B_{12}/W_1$             | <b>0.98</b> | <b>16X + 19</b>    |
| $B_2/B_{12}$             | <b>-0.95</b> | <b>2.2 - 0.3X</b>  | $B_{12}/PP$              | <b>0.67</b> | <b>1.8X - 1.6</b>  |
| $B_5/H$                  | <b>0.87</b>  | <b>288X - 2845</b> | PP/H                     | 0.70        | 852X - 669         |
| $B_5/\Gamma_{\text{cp}}$ | <b>-0.79</b> | <b>34 - 0.8X</b>   | $PP/G$                   | <b>0.83</b> | <b>2.2X + 3.0</b>  |
| $B_5/G$                  | <b>0.87</b>  | <b>0.4X + 0.76</b> | PP/ $W_2$                | 0.65        | 196X - 160         |
| $B_5/W_2$                | <b>0.87</b>  | <b>71X - 723</b>   | PP/ $\Sigma\Gamma$       | -0.66       | 3698 - 428X        |
| $B_5/\Sigma\Gamma$       | <b>-0.86</b> | <b>4877 - 152X</b> | PP/ $W_1$                | 0.66        | 3.9X + 42          |
| $B_5/\Gamma\text{TK}$    | <b>0.83</b>  | <b>0.3X - 3.5</b>  | PP/SS                    | 0.87        | 7X + 82            |

Прослеживается наличие неслучайного, взаимосвязанного изменения соотношений между водорастворимыми витаминами X/Y. Для тесных трендов симбатно изменяются соотношения в парах аскорбиновая кислота (C) – тиамин ( $B_1$ ), аскорбиновая кислота (C) – пантотеновая кислота ( $B_5$ ), аскорбиновая кислота (C) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ), аскорбиновая кислота (C) – сумма никотинамида и никотиновой кислоты (PP), тиамин ( $B_1$ ) – пантотеновая кислота ( $B_5$ ), тиамин ( $B_1$ ) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ), тиамин ( $B_1$ ) – сумма никотиновой кислоты и никотинамида (PP), рибофлавин ( $B_2$ ) – биотин ( $B_7$ ), рибофлавин ( $B_2$ ) – фолиевая кислота ( $B_9$ ), пантотеновая кислота ( $B_5$ ) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ), пантотеновая кислота ( $B_5$ ) – сумма никотинамида и никотиновой кислоты (PP), биотин ( $B_7$ ) – фолиевая кислота ( $B_9$ ). Асимбатно изменяется соотношение в парах аскорбиновая кислота (C) – фолиевая кислота ( $B_9$ ), аскорбиновая кислота (C) – фолиевая кислота ( $B_9$ ), тиамин ( $B_1$ ) – биотин ( $B_7$ ), тиамин ( $B_1$ ) – фолиевая кислота ( $B_9$ ), рибофлавин ( $B_2$ ) – пантотеновая кислота ( $B_5$ ), рибофлавин ( $B_2$ ) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ), пантотеновая кислота ( $B_5$ ) – биотин ( $B_7$ ), пантотеновая кислота ( $B_5$ ) – фолиевая кислота ( $B_9$ ), биотин ( $B_7$ ) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ), биотин ( $B_7$ ) – сумма никотинамида и никотиновой кислоты (PP), фолиевая кислота ( $B_9$ ) – цианокобаламин ( $B_{12}$ ) фолиевая кислота ( $B_9$ ) – сумма никотинамида и никотиновой кислоты (PP). Прослеживаются прямые и обратные корреляции

между содержанием и суммой витаминов (SS) в плодах. При его увеличении растёт доля аскорбиновой кислоты (С), тиамина (В<sub>1</sub>), пантотеновой кислоты (В<sub>5</sub>), никотиамида и никотиновой кислоты (РР), при этом содержание фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>) сокращается. Некоторые водорастворимые витамины чувствительны к почвенно-климатическим условиям. Так, в плодах РП выросших в более теплом климате увеличивается содержание рибофлавина (В<sub>2</sub>), биотина (В<sub>7</sub>), фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>), уменьшается доля аскорбиновой (С), пантотеновой (В<sub>5</sub>), никотиновой кислоты, никотиамида (РР) и цианокобаламина (В<sub>12</sub>). Факторы влажности (W<sub>1</sub> – сумма осадков и W<sub>2</sub> – влажность воздуха) влияют асимбатно на содержание в плодах рибофлавина (В<sub>2</sub>), биотина (В<sub>7</sub>), фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>) – чем больше сумма осадков и влажность воздуха, тем ниже содержание этих витаминов в плодах. Эти же факторы влияют симбатно на содержание тиамина (В<sub>1</sub>), цианокобаламина (В<sub>12</sub>), сумму никотиамида и никотиновой кислоты (РР), пантотеновой (В<sub>5</sub>) и аскорбиновой кислот (С). Прослеживается прямая пропорциональная зависимость между содержанием гумуса в почве (G) и содержанием тиамина (В<sub>1</sub>), цианокобаламина (В<sub>12</sub>), никотиамида и никотиновой кислоты (РР), пантотеновой (В<sub>5</sub>), аскорбиновой кислот (С) и обратная зависимость содержания биотина (В<sub>7</sub>) и фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>) в плодах РП. На фактор высоты над уровнем моря (H) асимбатно реагирует содержание рибофлавина (В<sub>2</sub>), биотина (В<sub>7</sub>) и фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>), симбатно – тиамина (В<sub>1</sub>), цианокобаламина (В<sub>12</sub>), аскорбиновой (С), пантотеновой (В<sub>5</sub>), никотиновой кислот и никотиамида (РР). Необходимо отметить содержание практически всех водорастворимых витаминов достаточно тесно коррелируют с гидротермическим коэффициентом (ГТК). Среднее число солнечных дней (S), амплитуда суточной температуры (aT) и рН почвы как самостоятельные факторы слабо влияют на витаминный состав плодов РП, отмечены только отдельные тренды.

## 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, силикрин и силидианин, которые составили  $0.17 \pm 0.05$ ,  $1.7 \pm 0.1$  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 ( $B_1$ ), рибофлавин ( $B_2$ ), пиридоксин ( $B_6$ ), биотин ( $B_7$ ), цианокоболамин ( $B_{12}$ ), никотиновая кислота и никотинамид (PP), пантотеновая ( $B_5$ ), фолиевая ( $B_9$ ), аскорбиновая (C) 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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Куркин, В.А. Расторопша пятнистая: монография / В. А. Куркин. - Самара: ООО «Офорт» ГОУ ВПО «СамГМУ», 2010. – 118 с.
2. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / С. В. Цаприлова, Р. А. Родионова // Вестник фармации. – 2008. № 3(41). – С. 92-104.
3. Мнацакян, В.А. Сравнительное изучение содержания жирного масла и флаволигнанов в семенах расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn. почвенного и гидропонического происхождения / В.А. Мнацакян, Г.С. Ананикян, М.А. Бабаханян, [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12-8. – С. 1445-1447.
4. Ismaili, S.A. Chemical composition of two non-conventional oils in Morocco: *Melia azadirachta* and *Silybum marianum* (L.) / S.A. Ismaili, H. Harhar, S. Gharby, [et al.] // Journal of Material and Environmental Science. - 2016. - V. 7(6). - P. 2208–2213.
5. EMA/HMPC/294188/2013 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Assessment report on *Silybum marianum* (L.) Gaertn, fructus. - 2018. – P.
6. Куркин, В.А. Сравнительное исследование состава жирных кислот масла расторопши и подсолнечного масла / В.А. Куркин, Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // Медицинский альманах. - 2017. - № 1 (46). - С. 99–102.
7. Fathi-Achachlouei, B. Milk thistle seed oil constituents from different varieties grown in Iran / B. Fathi-Achachlouei, S. Azadmard-Damirchi // Journal of the American oil chemists' society. – 2009. – Т. 86. – №. 7. – С. 643-649.
8. Bahl, J.R. Properties of the seed oil of a dwarf cultivar of the pharmaceutical silymarin producing plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Developed in India / J.R. Bahl, R.P. Bansal, G. Richa [et al.] // Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR) [Formerly Natural Product Radiance (NPR)]. - 2015. - V. 6(2). -P. 127–133.

9. Ismaili, S.A. Chemical analysis and anti-oxidation activities of the Moroccan Milk Thistle / S.A. Ismaili, I. Marmouzi, K. Sayah, [et al.] // Moroccan Journal of Chemistry. – 2016. – Т. 4. – №. 3. – С. 695-702.
10. Meddeb, W. Tunisian milk thistle: An investigation of the chemical composition and the characterization of its cold-pressed seed oils / W. Meddeb, L. Rezig, M. Abderrabba, [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Т. 18. – №. 12. – С. 2582.
11. Сулайманова, Г.В., Гепатопротекторное действие масла расторопши / Г.В. Сулайманова, Н.В. Донкова // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2016. – №. 12. – С. 33-38.
12. AbouZid, S. F. Silybum marianum pericarp yields enhanced silymarin products / S.F. AbouZid, S.N. Chen, J.B. McAlpine, [et al.] // Fitoterapia. – 2016. – Т. 112. – С.136-143.
13. Yang, B.  $\omega$ -6 Polyunsaturated fatty acids (linoleic acid) activate both autophagy and antioxidation in a synergistic feedback loop via TOR-dependent and TOR-independent signaling pathways / B. Yang, Y. Zhou, M. Wu, [et al.] // Cell Death Dis. - 2020. - № 11. (607). <https://www.nature.com/articles/s41419-020-02750-0>
14. Козлова, В.В. Применение масла расторопши пятнистой для коррекции метаболических нарушений, вызванных хроническим поражением формалином в эксперименте / В.В., Козлова, А.А. Кузнецова // Современная фармация: проблемы и перспективы развития. – 2015. – С. 407-409.
15. Meddeb, W. Cytoprotective activities of milk thistle seed oil used in traditional Tunisian medicine on 7-ketocholesterol and 24S-hydroxycholesterol-induced toxicity on 158N murine oligodendrocytes / W. Meddeb, L. Rezig, A. Zarrouk, [et al.] //Antioxidants. – 2018. – Т. 7. – №. 7. – С. 95.
16. Мякишева, Ю. В. Влияние масла расторопши на обменные процессы в организме и функциональное состояние кожи: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Мякишева Юлия Валерьевна; Самарский государственный университет. – Самара, 2002. – 137 с.

17. Чубарова, А. С. Вторичные метаболиты растений как маркеры внутривидового разнообразия растений / А. С. Чубарова, М. А. Капустин, В. П. Курченко // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной науч.- конф., посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. – Минск, Беларусь: Медисонт, - 2017. – С. 351-354.
18. Куркин, В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) / В.А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 4. – С. 27-41.
19. Куркин, В.А., Флаволигнаны и другие природные лигнаны. Проблемы структурного анализа / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная // Химия природных соединений. – 1987. – № 1. – С. 11-35.
20. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин // Самара: СамГМУ, 1996. – 80 с.
21. Рыжов, В.М. Перспективы использования ВЭЖХ для стандартизации гепатопротекторного лекарственного средства «Силимар» / В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Н.Д. Лужнов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 7. – С. 26-29.
22. Питкевич, Э. С. Расторопша пятнистая - *Silybum marianum* (L) / Э. С. Питкевич, А. Н. Лызиков, С. В. Цаприлова // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. – № 4(18). – С. 119-126.
23. Егоров, В. А. Современные тенденции в области создания и использовании гепатопротекторных препаратов на основе сырья расторопши пятнистой: Методические рекомендации для врачей, провизоров и студентов медицинских и фармацевтических вузов / В. А. Егоров, Л. В. Мошкова, В. А. Куркин [и др.]; Самарский государственный медицинский университет. - Самара: 2000. – 52 с.
24. Брель, Ю. И. Препараты расторопши: механизмы действия и применение при заболеваниях печени / Ю. И. Брель, А. Н. Лызиков, Э. С. Питкевич // Проблемы здоровья и экологии. - 2009. - №4(22). - С. 36- 42.

25. Кароматов, И.Д., Флаволигнан расторопши силибинин (силибин) / И.Д. Кароматов, М.Д. Ярашова // Биология и интегративная медицина. - 2018. - №10. – С. 147-165.
26. Щекатихина, А.С. Генопротекторные свойства флаволигнанов из семян Расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) / А.С. Щекатихина // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4. – №. 1. – С. 141-148. – 2009.
27. Щекатихина, А.С. Получение биологически активных веществ из семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.)) / А.С. Щекатихина, Т.М. Власова, В.П. Курченко // Труды БГУ - 2008. – Т. 3. – Ч.1. - С.218-228.
28. Матвеев, А.В. Гепатопротективные свойства силимарина / А.В. Матвеев, Е.И. Коняева, В.П. Курченко, А.С. Щекатихина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2011. - № 2. - С. 130-137.
29. Кароматов, И.Д. Противоопухолевые свойства расторопши пятнистой / И.Д. Кароматов, М.Д. Ярашова // Биология и интегративная медицина. - 2018. - №10. – С. 56-69.
30. Волоцуева, А.В. Фитохимическое исследование по созданию гепатопротекторных лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой: дис. к. фарм.наук: 15.00.02 / Волоцуева Алла Валериевна. – Пермь, 2004. – 140 с.
31. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.
32. Щекатихина, А. С. Оценка содержания изомеров флаволигнанов расторопши пятнистой в гепатопротекторных препаратах / А.С. Щекатихина, Гавриленко Н.М., Курченко В. П. // Вестник БГУ. – 2010. – №2. – С. 73-78.
33. Росихин, Д. В. Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum Marianum* (L.)



Gaertn.): дис. к. фарм. наук: 14.04.02 / Росихин Даниил Владимирович. – Самара, 2018. –165 с.

34. Воронова, И.А. Агрэкологические аспекты возделывания расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) в условиях лесостепи среднего Поволжья / И.А. Воронова // Нива Поволжья. - 2014. - №1 (30). – С. 23-29.

35. Keshavarz A.R., Interactive effect of deficit irrigation and soil organic amendments on seed yield and flavonolignan production of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) / R. Keshavarz, M.R. Chaichi, M.H. Assareh, [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – V. 58. - 2014. – P.166-172.

36. Zhang Z.S. Constituents and thermal properties of milk thistle seed oils extracted with three methods / Z.S. Zhang, S. Wang, H. Liu, [et al.] // *LWT – Food science and technologies*. – 2020. – Т. 126. – С.109-282.

37. Apostol, L. Nutrient composition of partially defatted milk thistle seeds / L. Apostol, C. Iorga S., Mosoiu, [et al.] // *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. – 2017. – Т. 21. – С.165-172.

38. Пащенко, Л.П. Шрот расторопши пятнистой в хлебобулочных изделиях / Л.П. Пащенко, Т.В. Санина, В.Л. Пащенко, [и др.] // *Современные наукоемкие технологии*. - 2007. - № 7. - С. 15-21.

39. Юрова, И.С. Повышение содержания аминокислот в составе кондитерских изделий путём внесения в мучные композитные смеси расторопши / И.С. Юрова, А.А. Дерканосова, Ю.Н. Борисова // *Актуальная биотехнология*. - 2012. - № 2. - С. 19-22.

40. Белокурова, Е.В. Пищевые сухие композитные смеси в производстве мучных кулинарных и хлебобулочных изделий функционального назначения / Е.В. Белокурова, А.А. Дерканосова // *Вестник ВГУИТ*. - 2013. - № 2. - С. 119-124.

41. Шматкова, Н.Н. Обоснование использования семян расторопши пятнистой в производстве хлебобулочных изделий / Н.Н. Шматкова // *Инновационная техника и технология*. - 2015. - № 4. - С. 15-21.

42. Юшков, С. Разработка комплексного состава растительных белков, имеющего полноценный набор аминокислот / С. Юшков // Бизнес пищевых ингредиентов. - 2018. - № 1. - С.22-27.
43. Sadowska, K. Effect of weather and agrotechnical conditions on the content of nutrients in the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) / K. Sadowska, J. Andrzejewska, M. Woropaj-Janczak // *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. - 2011. - N10 (3). - P. 197-207.
44. Denev, P.N. Chemical composition and antioxidant activity of partially defatted milk thistle seeds / P.N. Denev, M.H. Ognyanov, Y.N. Georgiev, [et al.] // *Bulgarian Chemical Communications*. - 2020. - Vol.52. - P.182.
45. Темираев, Р.Б. Использование шрота расторопши в рецептуре макаронных изделий для повышения их протекторных свойств / Р.Б. Темираев, Б.З. Темболатовна, В.Л. Александровна, В.Р. Эриковна // Наука, техника и образование. - 2014. - №1 (1). - С. 27-29.
46. Глаголева, Л.Э. Определение сорбционных характеристик растительных полисахаридных комплексов в различных технологических средах / Л.Э. Глаголева, О.С. Корнеева, Н.С. Родионова, Г.П. Шуваева // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – №. 1. – С. 214-214.
47. Москвичева, Е.В., Использование муки из семян расторопши в производстве безглютеновой продукции / Е.В. Москвичева, Э.Э. Сафонова, И.А. Тимошенкова // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2017. – №. 8-3 (62). – С. 214-220.
48. Панкратьева, Н.А. Моделирование рецептуры хлеба с повышенной пищевой ценностью и улучшенными реологическими свойствами / Н.А. Панкратьева, Н.В. Заворохина // *АПК России*. – 2017. – Т. 24. – № 5. – С. 1227-1233.
49. Родионова, Н.С. Сравнительная оценка сорбционной активности биологически активных объектов / Н.С. Родионова, Л.Э. Глаголева // *Биотехнология и биомедицинская инженерия: Сборник научных трудов по материалам X Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием, посвященной 25-летию биотехнологического факультета и 20-летию кафедры*

биологической и химической технологии Курск: Курский государственный медицинский университет. - 2017. – С. 147-150.

50. Донцова, С.С. Исследование муки из семян расторопши / С.С. Донцова, Е.В. Москвичева, И.А. Тимошенкова // Неделя науки СПбПУ. – 2017. – С. 109-112.

51. Клейменова, Н.Л. Жирнокислотный состав масла семян расторопши пятнистой, полученного методом холодного прессования / Н.Л. Клейменова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2020. – Т. 82. – №. 4. – С. 102-106.

52. Пестова, Н.Ю. Хроматографическое определение витаминного состава расторопши пятнистой (*Silybum Marianum* L.) / Н.Ю. Пестова, С.Н. Опарина // Восточно-европейский научный журнал. – 2018. – №. 3-2 (31). – С. 65-68.

53. Кшникаткина, А.Н. Влияние комплексных серосодержащих микроэлементных удобрений на урожайность и качество расторопши пятнистой (*Silibum Magianum*) в условиях лесостепи Среднего Поволжья / А.Н. Кшникаткина, С.А. Кшникаткин, П.Г. Аленин [и др.] // Нива Поволжья. – 2019. – №. 2. – С. 28-34.

54. Патент № 2499600 Российская федерация МПК А23L1/30 (2006.01) Биологически активная пищевая добавка: № 2011116430/13: заявл. 26.04.2011: опубл. 10.05.2012 / С.В. Иванов, В.Д. Бубело, Г.Г. Барсегян, А.Г. Барсегян, М.С. Рябцева; заявитель: Открытое акционерное общество "Московское производственное химико-фармацевтическое объединение им. Н.А. Семашко" (RU). – 12 с.

55. Сочинева, О.Г. Совершенствование технологии возделывания расторопши пятнистой в лесостепи Среднего Поволжья: диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук / Сочинева Ольга Григорьевна; Пензинская государственная сельскохозяйственная академия. – Пенза, 2004. – 130 с.

56. Гончарова, Т.А. Энциклопедия лекарственных растений: (лечение травами). В 2 т. Т. 1. / Т.А. Гончарова. – Москва: Дом МСП, 1997. - 560 с.

57. Айрапетян, А.В. Перспективы использования шрота расторопши в технологии продуктов питания / А.В. Айрапетян // Сборник трудов II Всероссийского конгресса молодых ученых. – 2013. – С. 6.
58. Вайс, Р.Ф. Фитотерапия. // Р.Ф. Вайс, Ф. Финтельманн / Руководство: Пер. с нем. – М.: Медицина, 2004. – 552 с.
59. Луценко, С.В. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал / С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, Е.В. Луценко, В.А. Быков. – Москва, 2006. – 235 с.
60. Рыжов, В.М. Исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.)]: дис. к. фарм.наук: 15.00.02 / Рыжов Виталий Михайлович. – Курск, 2009. – 159 с.
61. Dordevic, S. The influence of the extraction method on the content of silymarin in *Silybi mariani fructus* / S. Dordevic, T. Jankovic, M. Mihailovic // *Lekovite sirovine*. – 2018. – №. 38. – С. 5-8.
62. Авдеева, Е.В. Получение галеновых препаратов из плодов расторопши пятнистой / Е.В. Авдеева // *Фармация*. – 2006. – № 6. – С. 43-45.
63. Цаприлова, С.В. Спектрофотометрическое определение количественного содержания биологически активных веществ плодов расторопши пятнистой / С.В. Цаприлова, Р.А. Родионова // *Вестник фармации*. - №. – 2008. – Т. 3. – №. 41. – С.90-92.
64. Wianowska, D. Silymarin Extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner / D. Wianowska, M. Gil // *Water Extraction of Bioactive Compounds*. – Elsevier. 2017. – С. 385-397.
65. Celik, H.T. Extraction of oil and silybin compounds from milk thistle seeds using supercritical carbon dioxide / H.T. Celik, M. Gürü // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2015. – Т. 100. – С.105 -109.
66. Rahal N.B. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells / N.B. Rahal, [F.J. Barba](#), D. Barth, [I. Chevalot](#) [et al.]// *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – Т. 83. – С.275-282.

67. Куркин, В.А. Сравнительное изучение состава жирных кислот масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла / В. А. Куркин, Д. В. Росихин, Т. К. Рязанова // Фармация. - 2017. - Т. 66, №6. - С. 25-29.
68. Патент № 2129873 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/28, А61Р 17/02, С11В 1/10. Способ получения масла расторопши пятнистой, обладающего ранозаживляющей активностью: № 97120389/14: заявл. 10.12.1997: опубл. 10.05.1999 / Ахтемиров Е.В., Куркин В.А., Лебедев А.А., Лебедев П.А.; заявитель: Ахтемиров Е.В., Куркин В.А., Лебедев А.А., Лебедев П.А. – 5с.
69. Федеральная электронная медицинская библиотека. – URL: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0035-15-rastoropshi-pyatnistoj-plody//> Федеральная электронная медицинская библиотека (дата обращения 20.05.2021).
70. Бойко, Н.Н. Изучение процесса экстракции липофильных веществ из плодов расторопши пятнистой с помощью фреона R141b / Н.Н. Бойко, Е.Т. Жиликова, З.Е. Цветкова, [и др.] // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2019. – Т. 21. – № 10. – С. 94-98.
71. Сывороткин, В.Л. Экологические угрозы Монреальского протокола / В.Л. Сывороткин // Пространство и Время. – 2014. – № 4(18). – С. 211-221.
72. Бабакин, Б.С. Хладагенты и их воздействие на окружающую среду / Б.С. Бабакин, М.И. Воронин, А.Г. Белозеров, [и др.] // Молочная промышленность. – 2016. – № 6. – С. 12-14.
73. Fathi-Achachlouei, V. Microwave pretreatment as a promising strategy for increment of nutraceutical content and extraction yield of oil from milk thistle seed / V. Fathi-Achachlouei, S. Azadmard-Damirchi, Y. Zahedi, [et al.] // Industrial crops and products. – 2019. – Т. 128. – С.527-533.
74. Мельник, Г.Е. Сверхкритический диоксид углерода: возможности применения в производстве растительного масла / Г.Е. Мельник, С.М. Волков, А.В. Федоров // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2016. – №. 1. – С. 3-4.

75. Боголицын, К.Г. Перспективы применения Сверхкритических флюидных технологий в химии растительного сырья / К. Г. Боголицын // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2007. – Т. 2. – № 1. – С. 16-27.
76. Селиванова, Н.Б. Состав и антимикробная активность эфирного масла и сверхкритических экстрактов древесной зелени *pinus sylvestris* / Н.Б. Селиванова, А.А. Красикова, М.А. Гусакова [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2020. – Т. 15. – № 2. – С. 42-58.
77. Попова, А.С. Сверхкритическая флюидная экстракция хлорофиллов и каротиноидов багульника болотного (*Ledum palustre*) / А.С. Попова, А.Д. Ивахнов, Т.Э. Скребец, К.Г. Боголицын // Химия растительного сырья. – 2018. – № 1. – С. 61-66. – DOI 10.14258/jcprm.2018012994.
78. Красикова, А.А. Анализ фенольных компонентов в сверхкритических экстрактах древесины *Juniperus Communis L.* методом ВЭЖХ / А.А. Красикова, К. Г. Боголицын, М. А. Гусакова [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 41-49.
79. Arumugham, T. Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications—A review / T. Arumugham, K. Rambabu, Sw. Hasan [et al.] // Chemosphere. – 2021. – С.129525-129525.
80. Mendes, R.L. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae / R.L. Mendes, B.P. Nobre, M.T. Cardoso, [et al.] // Inorganica Chimica Acta. – 2003. – Т. 356. – С.328-334.
81. Ozkal, S.G. Supercritical carbon dioxide extraction of hazelnut oil / S.G. Ozkal, U. Salgın, M.E. Yener // Journal of food engineering. – 2005. – Т. 69. – №. 2. – С. 217-223.
82. Ahmadian-Kouchaksaraie, Z. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from *Crocus staves* petals of saffron industry residues: Optimization using response surface methodology / Z. Ahmadian-Kouchaksaraie, R. Niazmand // The Journal of Supercritical Fluids. – 2017. – Т. 121. – С.19-31.

83. Cheikhyoussef, N. The Application of Supercritical Carbon Dioxide in the Extraction of Biomolecules / N. Cheikhyoussef, // *Advanced Nanotechnology and Application of Supercritical Fluids*. Springer, Cham. - 2020. – С.141-164.
84. Рамазанов, А.Ш. Исследование масла из косточек винограда, получаемого экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода / А.Ш. Рамазанов, К.Ш. Шахбанов // *Химия растительного сырья*. – 2018. – №. 1. – С. 75-81.
85. Ивахнов, А.Д. Получение масла из ягод морозики экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода / А.Д. Ивахнов, К.С. Садкова, А.С. Собашникова // *Химия растительного сырья*. – 2019. – №. 2. – С. 91-97.
86. Рудь, Н. К. Выбор параметров технологии производства фармацевтической субстанции из семян чернушки посевной // Н.К. Рудь *Инновации в здоровье нации: сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 14–15 ноября 2018 года*. – 2018. – С. 302-304.
87. Рамазанов, А.Ш. Сверхкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода масла и воска из косточек винограда / А.Ш. Рамазанов, К.Ш. Шахбанов // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С.28-35.
88. Ивахнов, А.Д. Получение рапсового масла экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода / А.Д. Ивахнов, Т.Э. Скребец, М.В. Богданов, К.Г. Боголицын // *Химия растительного сырья*. – 2013. – № 3. – С. 137-141.
89. Пономарева, Е.И. Оценка эффективности сверхкритической углекислотной экстракции эфирного масла из герани душистой (*Pelargonium graveolens* L'her) / Е.И. Пономарева, Е.И. Молохова // *Сверхкритические флюиды: Теория и практика*. - 2017. – Т. 12, №2. - С. 26-34.
90. Моргунов, А. П., Планирование и анализ результатов эксперимента: учеб. пособие / А. П. Моргунов, И. В. Ревина; Минобрнауки России, ОмГТУ. 2014. интернет ресурс <https://omgtu.ru/> - дата обращения 22.01.2020.
91. Юдин, Ю.В. Организация и математическое планирование эксперимента: учебное пособие / Ю.В. Юдин, М.В. Майсурадзе, Ф.В. Водолазский; Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2018. - 124 с.

92. Бойцова Т. А. и др. Оптимизация процесса СКФ-экстракции усниновой кислоты из лишайника *Usnea subfloridana* //Сверхкритические флюиды: Теория и практика. – 2019. – Т. 14. – №. 4. – С. 9-18.
93. Буркуш, С.А. Сравнительное исследование методов стандартизации плодов расторопши *Silybum marianum* / С.А. Буркуш, С.В. Чижов, Н.В. Фистова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2016. – №. 4 (40). – С.30-39.
94. Жилякова, Е. Т. Качественный анализ флаволигнанового комплекса методом тонкослойной хроматографии / Е. Т. Жилякова, З. Е. Цветкова, Д. И. Писарев // Фармакология живых систем: 6 лет пассионарного развития: Сборник материалов Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием, – Белгород, - 2018. – С. 69-72.
95. Куркин, В. А. Расторопша пятнистая - источник лекарственных средств (обзор) / В. А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – № 4. – С. 27-41.
96. Никитченко, Н.В. Экстракционно-хроматографическое определение качества лекарственного растительного сырья «Расторопша пятнистая» / Н.В. Никитченко, И.А. Платонов, Л.А. Онучак [и др.] // Аналитика и контроль. - 2012.№ 2. – 2012. – С. 169-173.
97. Росихин, Д.В. ВЭЖХ-анализ лекарственного препарата "силимар" / Д. В. Росихин, В. А. Куркин, В. М. Рыжов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 558- 566.
98. Denev, P.N. Chemical composition and antioxidant activity of partially defatted milk thistle (*Silybum marianum* L.) seeds / P. Denev, M. Ognyanov, Y. Georgiev // Bulg Chem Commun. – 2020. – V. 52. – P. 182-187.
99. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 Т. Т. 3. Контроль качества фармацевтических субстанций / Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2009. – 728 с.



100. European Pharmacopoeia [Text]. – 8.4-th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2015.
101. Ugli, K. Amino Acid Analysis of Dry Extract of Milk Thistle Fruit *Silybum Marianum* Gaertn L. Growing in Uzbekistan / K. Ugli, O. Ugli, J. Mamarasulovich // Journal NX. – Т. 7. – №. 1. – С. 198-203.
102. Волнин А.А. Исследование аминокислотного состава кормовой добавки методом ионообменной хроматографии / А.А. Волнин, А.В. Мищуров, А.А. Михина [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2018. – Т. 80. – №. 1 (75).- С.199-205.
103. Санжеев А.П. Существующие проблемы и пути их решения при анализе аминокислотного состава / А.П. Санжеев, А.А. Михина, Д.А. Севко, [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2018. – Т. 80. – №. 4 (78). – С.185-189.
104. ГОСТ 32195-2013. Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. – Москва: Стандартинформ, 2014. – 24 с.
105. ГОСТ 32201-2013. Корма, комбикорма. Метод определения содержания триптофана. – Москва: Стандартинформ, 2014. – 16 с.
106. Мигунов А.М. Влияние удобрений на продукционные показатели расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) в условиях города Благовещенска / А.М. Мигунов // Молодежный вестник дальневосточной аграрной науки. – 2019. – С. 78-82.
107. Сафина Н.В. Расторопша пятнистая на полях среднего Поволжья / Н.В. Сафина, Т.В. Кильянова // Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений. – 2019. – С. 140-145.
108. Шемуранова, Н.А. Растения как основа для создания экологически безопасных высокофункциональных биодобавок для животных (обзор) / Н.А. Шемуранова, Н.А. Гарифуллина // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2020. – Т. 21. – №. 5.- С.483-502.

109. Патент № 2530620 С1 Российская Федерация, МПК G01N 30/90, G01N 33/15, G01N 33/02. Способ определения жирорастворимых витаминов А, D2, е и в-каротина при совместном присутствии методом тонкослойной хроматографии: № 2013117180/15: заявл. 30.07.2013: опубл. 10.10.2014 / О. В. Тринеева, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин; заявитель: ФГБОУ ВПО "ВГУ". – 13 с.: ил.
110. Чиркин, В.А. Определение жирорастворимых витаминов в пищевых продуктах, витаминно-минеральных комплексах, комбикормах, премиксах и сыворотке крови методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.А. Чиркин, С.И. Карпов, В.Ф. Селеменев, Н.И. Шумский // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68, № 8. – С.820 – 825.
111. Руденко, А.О. Определение водорастворимых витаминов группы В и витамина С в комбикормах, премиксах и биологически-активных добавках методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / А.О. Руденко, Л.А. Карцова // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т. 65, №. 1. – С. 73-78.
112. Бендрышев, А.А. Определение водорастворимых витаминов в витаминных премиксах, биологически-активных добавках и фармацевтических препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием / А.А. Бендрышев, Е.Б. Пашков, А.Б. Пирогов, [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2010. – Т. 51. – №. 4. – С.315-324.
113. Определение следовых количеств элементов. Методики микроволновой минерализации: Методические указания. - М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. -15 с.
114. Sobir, O. Mineral Analysis of Dry Extracts from the seeds of the plant *Silybum Marianum* (L. Gaertner) Introduced in Uzbekistan / O. Sobir, F. Qayumovet, F. Taxtayev [ et al.] // International Journal on Integrated Education. 2020. – Т. 3, №. 8. – С. 235-237.
115. Восканян, О. С. Разработка и исследование жировой основы эмульсионных продуктов питания функционального назначения с применением традиционных и нетрадиционных ингредиентов / О. С. Восканян, И. А. Никитин, Д. А. Гусева // Пищевая промышленность. – 2016. – № 3. – С. 10-15.

116. ГОСТ 31933-2012. Масла растительные. Методы определения кислотного числа. – М.: Стандартинформ, 2012, 14 с.
117. ГОСТ 5475-69. Масла растительные. Методы определения йодного числа. – М.: Стандартинформ, 1970, 6 с.
118. ГОСТ 5478-2014. Масла растительные и натуральные жирные. Метод определения числа омыления. – М.: Стандартинформ, 2018, 67с.
119. ГОСТ 26593-85. Масла растительные. Метод определения перекисного числа. – М.: Гос. ком. СССР по стандартам, 1986. – 5 с.
120. Duran D., Ötleş S., Karasulu E. Determination Amount of Silymarin and Pharmaceutical Products from Milk Thistle Waste Obtained from Cold Press //ACTA Pharmaceutica Scientia. – 2019. – Т. 57. – №. 1.
121. Ahmad T. et al. Characteristics of Silybum marianum as a potential source of dietary oil and protein //Biological Sciences-PJSIR. – 2007. – Т. 50. – №. 1. – С. 36-40.
122. Гасымова, Ш.А. Изучение химического состава жирного масла из семян *Silybum marianum* (L.) Gaertn / Ш.А. Гасымова, Э.Н. Новрузов, Н.П. Мехтиева // Химия растительного сырья. – 2017. – №. 3. – С.107-111.
123. Куркин, В.А. Жирнокислотный состав масла плодов расторопши пятнистой, культивируемой в Самарской области / В.А. Куркин, О.В. Сазонов, Д.В. Росихин // Химия растительного сырья. – 2017. – №. 3. – С. 101-105.
124. ГОСТ 31665-2012. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. - М.: Стандартинформ, 2012, 11 с.
125. ГОСТ 30418-96. Масла растительные животные. Метод определения жирнокислотного состава. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1996, 7 с.
126. Дейнека, В.И. Анализ растительных масел с использованием ВЭЖХ / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, Н.Г. Габрук, [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2003. – Т. 58. – № 12. – С.1294-1300.
127. Туртыгин, А. В. Скрининг и определение состава триацилглицеринов в растительных маслах и животных жирах в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ:

диссертация на соискание степени кандидата химических наук / Туртыгин Александр Владимирович. – Белгород, 2020. - 208 с.

128. Туртыгин, А.В. Определение состава триацилглицеринов в маслах семян граната методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрии / А.В. Туртыгин, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68. – № 6. – С. 619.

129. Зеленков, В.Н. Жирнокислотный состав масла семян нуга абиссинского отечественной селекции / В.Н. Зеленков, В.В. Карпачев, Т.Г. Белоножкина, [и др.] // Актуальные и новые направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур: сборник материалов науч.-практ. конф., Горский государственный аграрный университет. Владикавказ – 2017. – С. 93-95.

130. Мубинов, А.Р. Изучение жирнокислотного состава масла чёрного тмина / А.Р. Мубинов, Т.К. Рязанов, В.А. Куркин [и др.] // Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства" по направлению" Метаболомика и качество жизни: сборник трудов международной науч. конф. – Москва, – 2019. – С. 181-186.

131. Волкович, А.Н. Состав жирных кислот семян рапса, сои, люпина / Н.А. Волкович, С.А. Ламотина, И.И. Глоба // Труды БГТУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2010. Т.1, №4.- С.31-33.

132. Шадыро, О.И. Химический состав и окислительная стабильность масел из семян льна, расторопши пятнистой и их композиций / О.И. Шадыро, А.А. Сосновская, И.П. Едимечева // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2017. – № 2(36). – С.60-68.

133. Chatziantoniou, S.E. Traceability monitoring of Greek extra virgin olive oil by Differential Scanning Calorimetry / S.E. Chatziantoniou, D.J. Triantafillou, P.D. Karayannakidis, E. Diamantopoulos // Thermochimica Acta. - 2014. - V. 576. - P. 9-17.

134. Саранов, И.А. Дифференциальная сканирующая калориметрия жидких растительных масел / И. А. Саранов, О. Б. Рудаков, К. К. Полянский [и др.] // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 157-164.

135. Рудаков, О.Б. Контроль содержания пальмового масла в смесях с молочным жиром методом ДСК / О.Б. Рудаков, И.А. Саранов, К.К. Полянский // Аналитика и контроль. - 2019. - Т. 23, № 1. - С. 127-135.
136. Рудаков, О.Б. Дифференциальная сканирующая калориметрия как метод контроля подлинности растительных масел / О.Б. Рудаков, И.А. Саранов, Н. В. Ань, [и др.] // Журнал Аналитической химии. - 2021. - Т. 76, № 2. - С. 183-192.
137. Tan, C.P. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition / C.P. Tan, Y.B. Cheman // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2000. – Т. 77. – №. 2. – С. 143-155.
138. Tomaszewska-Gras, J. Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique / J. Tomaszewska-Gras // Food Control. - 2016. - V.60, № 2. - P. 629-635.
139. Верещагин А.Л., Термический анализ в исследовании качества шоколада и кондитерских изделий / А.Л. Верещагин, И.Ю. Резниченко, Н.В. Бычин // Техника и технология пищевых производств. -2019. - Т. 49, № 2. - С.289 - 300.
140. Van Wetten, I.A. Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry / I.A. Van Wetten, A.W. Van Herwaarden, R. Splinter, [et al.] // Thermochimica Acta. - 2015. - V. 603. - P.237-243.
141. Harrabi, S. Fatty acid and triacylglycerol compositions of milk thistle seeds growing wild in Tunisia (*Silybum marianum* L.) / S. Harrabi, H. Romdhane, M. Daassa, [et al.] // Acta Alimentaria. - 2015. - Т. 44, №. 2. - P. 304-310.
142. Лекция № 5. Рельеф Дагестана <https://www.researchgate.net/publication>
143. Баламирзоев, М.А. Принципы почвенно-агроэкологического районирования территорий горных областей на примере Дагестана / М. А. Баламирзоев, Э. М. Р. Мирзоев, Р. З. Усманов // Почвоведение. – 2008. – № 6. – С. 668-678.
144. Акаев, Б.А. Физическая география Дагестана: учебное пособие / Б.А. Акаев, Б.С. Атаев, Б.С. [и др.] М: Школа, 1996. -384 с.
145. Магомедова, А.З. Региональные физико-географические различия предгорного Дагестана / А.З. Магомедова, З.В. Атаев // Молодой ученый. — 2013. — № 5 (52). — С. 212-215.

146. Атаев, З.В. Климатические особенности ландшафтов предгорной полосы Северо-Восточного Кавказа / З.В. Атаева, З.М. Гаджимурадова // Молодой ученый. - 2011. - № 10. - С. 108–111.
147. Атаев, З.В. Географические особенности котловинных ландшафтов Внутригорного Дагестана / З.В. Атаев, К.А. Абдулаев, А.З. Магомедова // Юг России: экология, развитие. – 2015. – Т. 3, №. 2. – С. 122-126.
148. Атаев, З.В. Ландшафты высокогорного Дагестана и их современное состояние / З.В. Атаев // Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки. – 2007. – № 1(1). – С. 90-99.
149. Алиев, Х.У. Таксономический анализ флоры Янгиюртовского заказника (Низменный Дагестан) / Х.У. Алиев // Социально-экономические проблемы развития курортов России: сборник научных трудов конф. Сочи, 2015. С. 109–117.
150. Мамалиева, М.М. Особенности внутри- и межпопуляционной изменчивости морфологических признаков расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn во флоре Дагестана / М.М. Мамалиева, Ф.А. Вагабова, А.М. Мусаева // Биоразнообразии и рациональное использование природных ресурсов: материалы докладов науч. практ. конф. Махачкала, 2015. - С. 20–23.
151. Гамидова, Н.Х. Распространение сорных растений на обрабатываемых землях равнинной подзоны южного Дагестана / Н.Х. Гамидова, У.М. Магомедов, З.Ш. Тажудинова, [и др.] // Известия ДГПУ. - 2015. - №4. - С. 47–52.
152. Залибеков, З.Г. Почвы Дагестана / З.Г. Залибеков. - Махачкала: изд. Прикаспийский институт биологических ресурсов, 2010. - 241 с.
153. Электронный ресурс сайт «Ну и погода» <https://nuipogoda.ru/>
154. Янчук, Т.В., Влияние метеорологических условий вегетационного периода на накопление сахаров и органических кислот в ягодах смородины черной / Т.В. Янчук, М.А. Макаркина // Современное садоводство. - 2014. - № 2(10). – С.63-69.
155. Тринеева, О.В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Вестник

Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – №. 1. – С. 164-169.

156. Методы контроля. Химические факторы. Определение селена в продуктах питания: МУК от 24.07.1995 № 4.1.033–95: постановление Госкомсанэпиднадзора России от 24.07.1995. М., 1995.

157. ГОСТ 32043-2012. Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е. - Москва: Стандартинформ, 2018, 16 с.

158. Лисин, П.А., Оценка аминокислотного состава рецептурной смеси пищевых продуктов / П.А. Лисин, Е.А. Молибога, Ю.А. Канушина, [и др.] // Аграрный вестник Урала. - 2012. - № 3. - С.26-28.

159. Лисицын, А.Б. Оценка качества белка с использованием компьютерных технологий / А.Б. Лисицын, М.А. Никитина, Е.Б. Сусь // Пищевая промышленность. - 2016. - № 1.- С.26-29.

160. 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.

161. 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.

162. Климатическая теория образования органических веществ. - С.Л. Иванов. - Москва: Изд.-во АН СССР, 1961. - 88 с.

163. Бражников, В.Н. Влияние агроклиматических условий на продуктивность и жирнокислотный состав масла льна масличного / В.Н. Бражников, О.Ф. Бражникова, Д.В. Бражников // Таврический вестник аграрной науки. - 2019. - № 4. - С. 6-15.

164. Галицкий, Д.Н. Влияние условий окружающей среды на накопление масла в семенах льна масличного и его качество / Д.Н. Галицкий, В.П. Шаманин // Вестник НГАУ. - 2016. - № 2. - С.18-24.
165. Лаксаева, Е.А. Влияние некоторых факторов внешней среды на накопление биологически активных веществ в плодах Ирги обыкновенной / Е.А. Лаксаева, И.А. Сычев // Российский медико-биологический вестник имени академика ИП Павлова. - 2009. - № 4. - С.137-142.
166. Гусейнова, Б.М. Экологические аспекты формирования биокомплекса в плодах дикорастущих ежевики и терна / Б.М. Гусейнова, Т.И. Даудова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2010. - Т.12, № 1-3. - С.675-678.
167. Кондратенко, Е.П. Влияние гидротермического режима на содержание белка и витаминов в зерне пшеницы в степной зоне Кемеровской области / Е.П. Кондратенко, Е.А. Егушова, Д.В. Сандрыкин, [и др.] // Достижения науки и техники АПК. - 2013.- № 6.- С.29-32.
168. Таланов, И.П. Формирование белка в зерне сортов ячменя, возделываемых в Татарстане / И.П. Таланов, Г.В. Вильданова, В.И. Блохин // Вестник Казанского государственного аграрного университета. - 2016. -Т. 11, № 1.- С.10-15.
169. Пономарева, С.В. Оценка сортов полевого гороха (*Pisum Arvense* L.) на содержание белка в зерне: взаимосвязи хозяйственно полезных признаков с погодно-климатическими условиями / С.В. Пономарева // Зерновое хозяйство России. - 2020. - № 2. - С.13-17.
170. 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.
171. 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.

172. Селенсодержащие удобрения. <https://universityagro.ru/> (дата обращения 04.04.2020)

173. Луганова, С.Г. Содержание селена в почвах пастбищ горного Дагестана как фактор биогеоценотической патологии овец / С.Г. Луганова, Ш.К. Салихов, Г.И. Гиреев // Вестник ТГУ. - 2014. - Т.19, Вып.5. - С.1696-1699.

174. 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.

175. 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.

176. 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.

177. Метрологические основы аналитической химии / А. В. Гармаш, Н. М. Сорокина. — Москва: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2005. - 34 с.

178. База знаний и вычислительных алгоритмов, вопросно-ответная система Wolfram|Alpha - <https://www.wolframalpha.com/>

179. Рамазанов, А.Ш. 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.

180. 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. – С.567-569.

181. 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. – С. 146.

182. 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.

183. 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.208-216.

184. 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. – С.260-263.

185. Саранов, И.А. Разделение фракций триглицеридов 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. – С.131.

186. 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.

187. Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А., Рудаков О.Б., Селеменов В.Ф. Определение белковой ценности плодов расторопши пятнистой, произрастающей в Республике Дагестан // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2021. Т. 21. № 5. С. 697-707.
188. Рудаков, О.Б. Генотипическая изменчивость аминокислотного состава белков животного и растительного происхождения / О.Б. Рудаков, Л.В Рудакова, М.С. Букша // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2020. - Т.20, № 1. - С. 8-21.
189. 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. – С.195.
190. 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. С.22-26.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

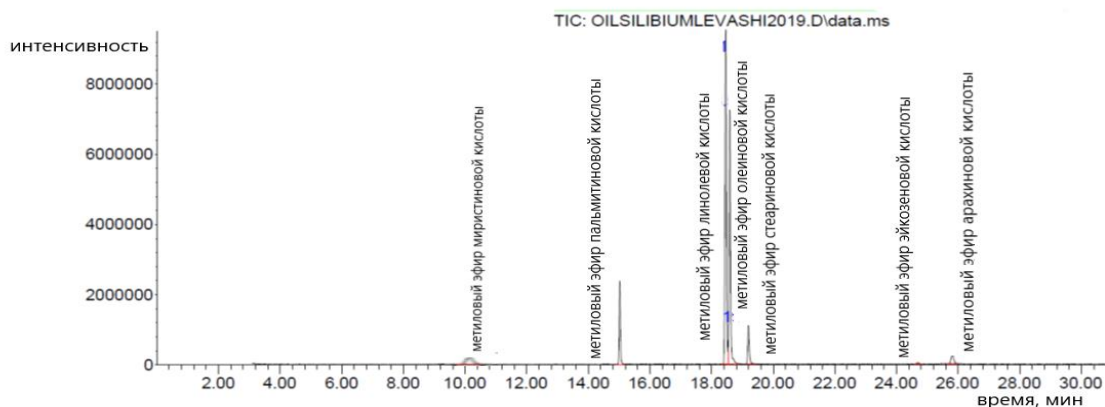


Рисунок 1 – Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой, полученного СКФЭ-СО<sub>2</sub> из плодов, собранных в Левашинском районе.

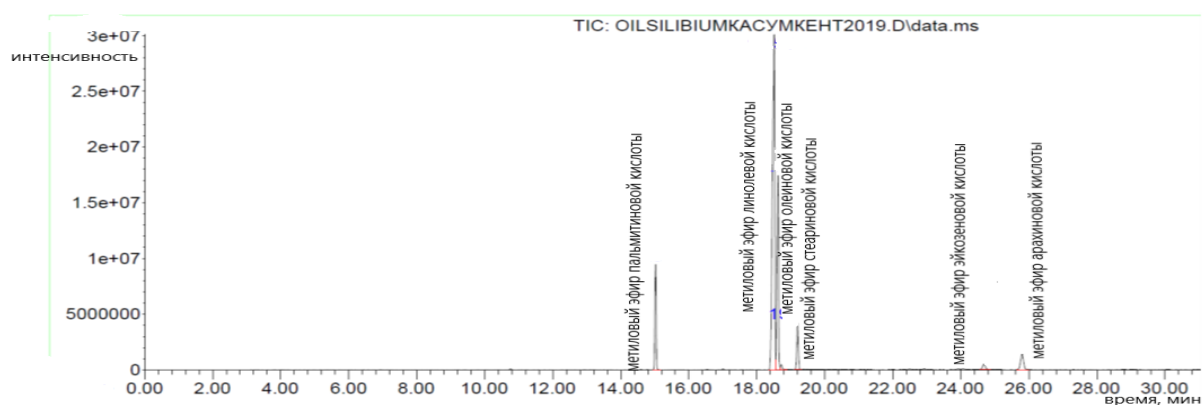


Рисунок 2 – Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой, полученного СКФЭ-СО<sub>2</sub> из плодов, собранных в Сулейман Стальском районе.

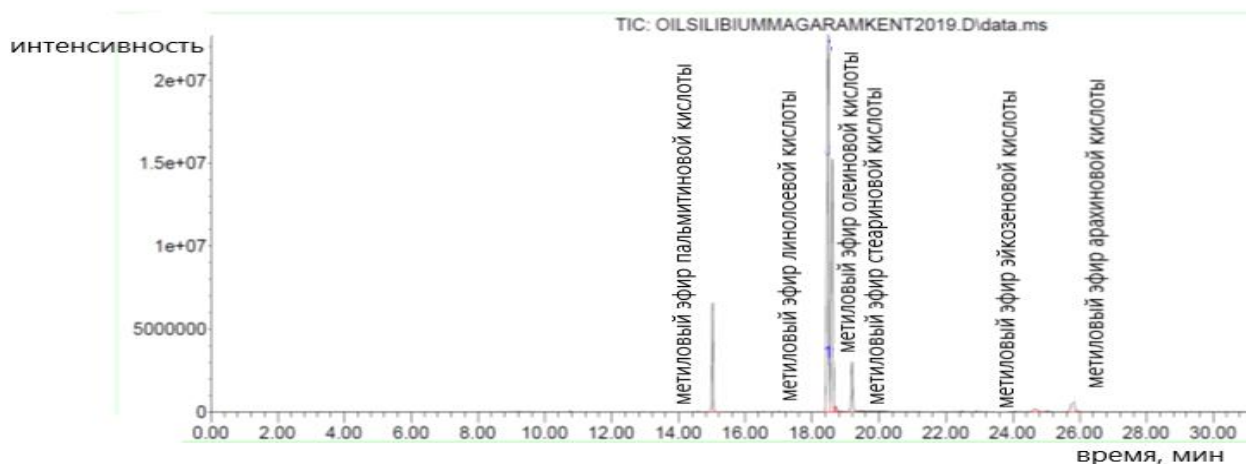


Рисунок 3 – Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой, полученного СКФЭ-СО<sub>2</sub> из плодов, собранных в Магарамкентском районе.

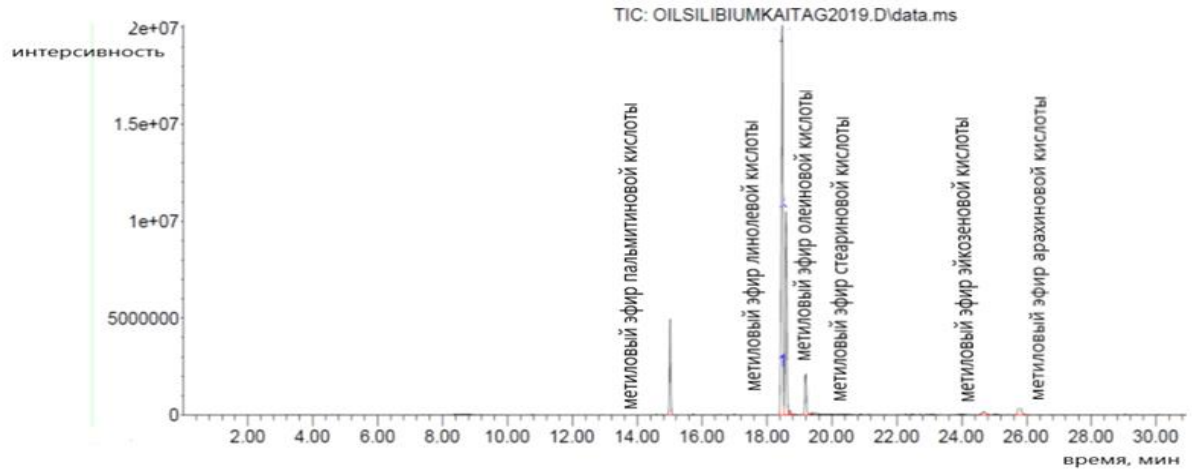


Рисунок 4 –Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот масла расторопши пятнистой, полученного СКФЭ-СО<sub>2</sub> из плодов, собранных в Кайтагском районе.

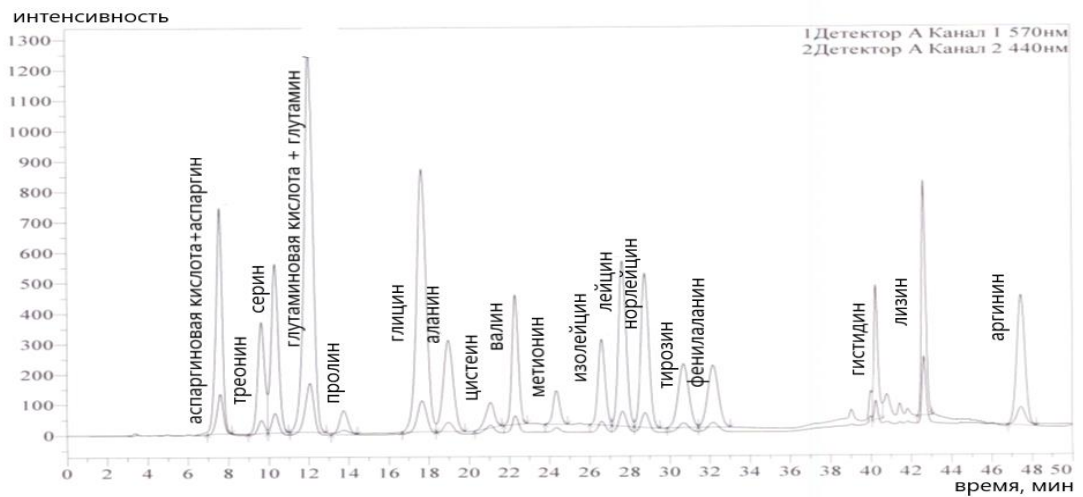


Рисунок 5 – Хроматограмма аминокислот белка расторопши пятнистой произрастающей в Левашинском районе.

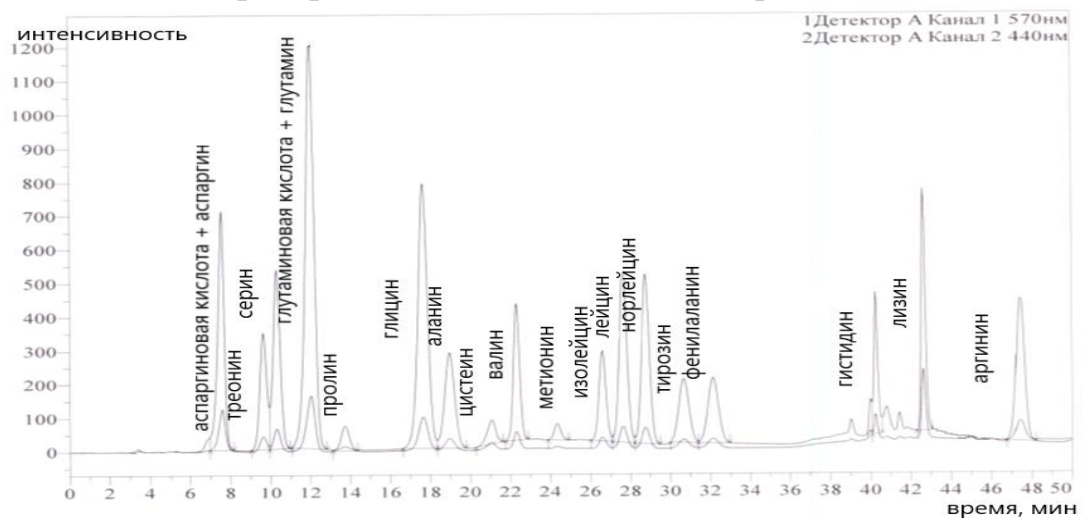


Рисунок 6 – Хроматограмма аминокислот белка расторопши пятнистой произрастающей в Сулейман Стальском районе.

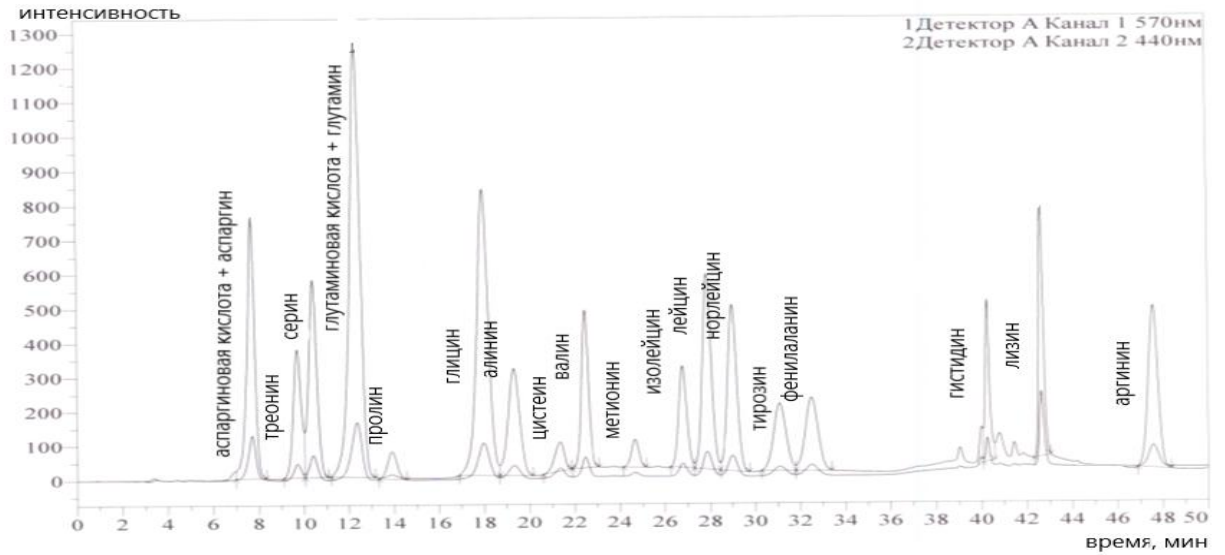


Рисунок 7 – Хроматограмма аминокислот белка расторопши пятнистой произрастающей в Кайтагском районе.

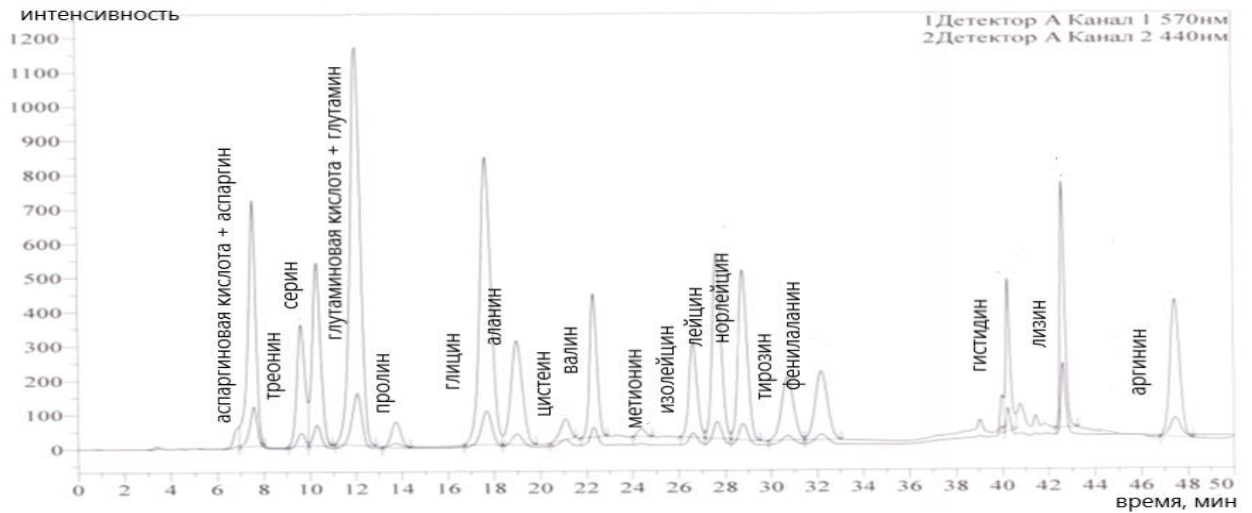


Рисунок 8 – Хроматограмма аминокислот белка расторопши пятнистой произрастающей в Магарамкентском районе

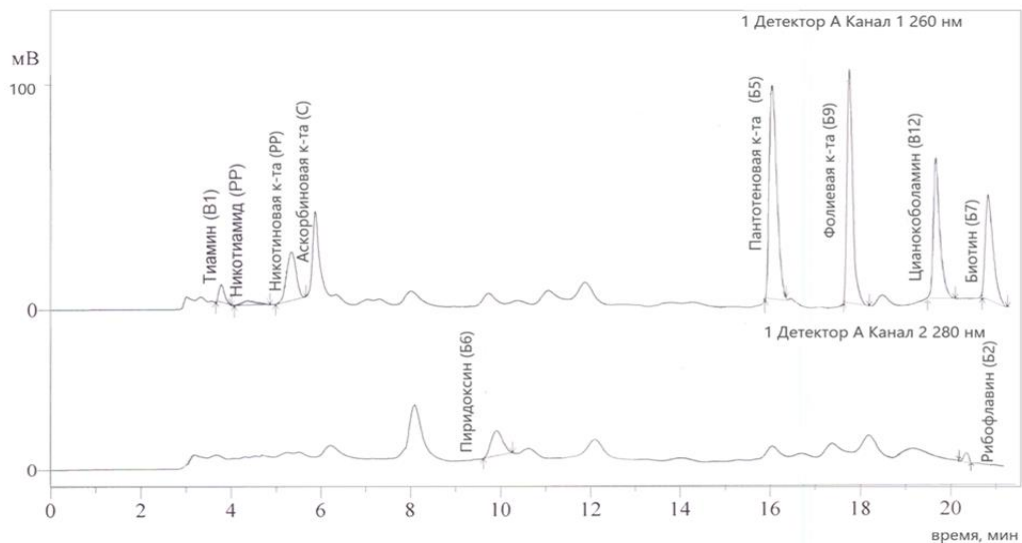


Рисунок 9 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения расторопши пятнистой произрастающей в Левашинском районе.

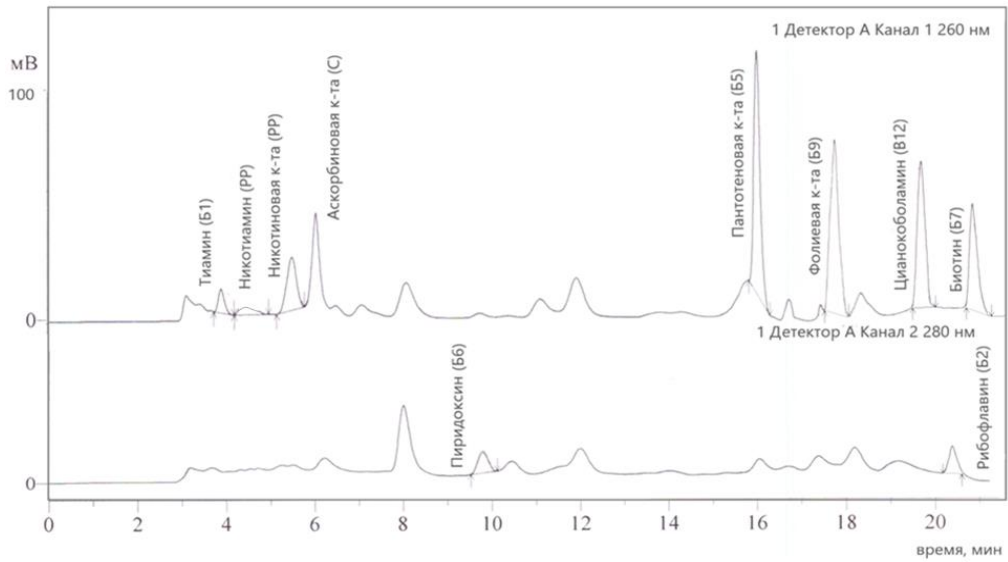


Рисунок 10 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения расторопши пятнистой произрастающей в Магарамкентском районе.

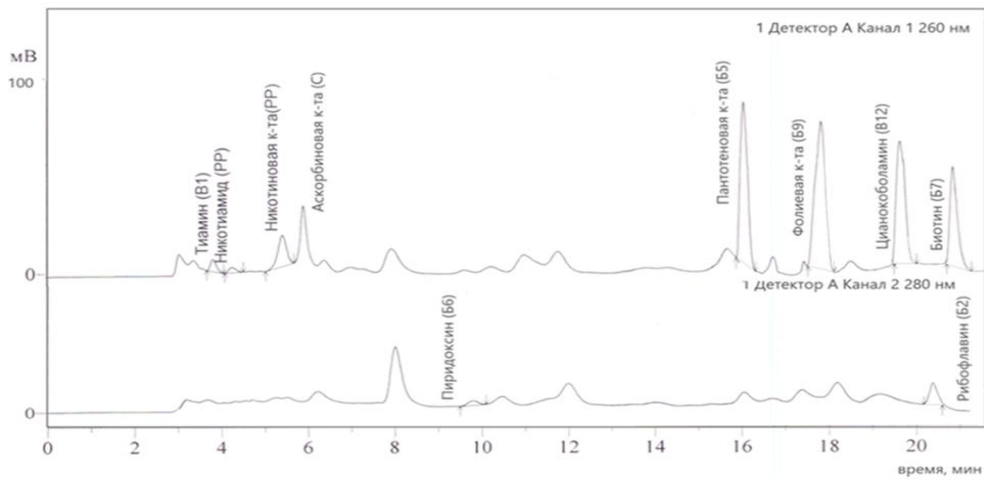


Рисунок 11 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения расторопши пятнистой произрастающей в Сулейман Стальском районе.

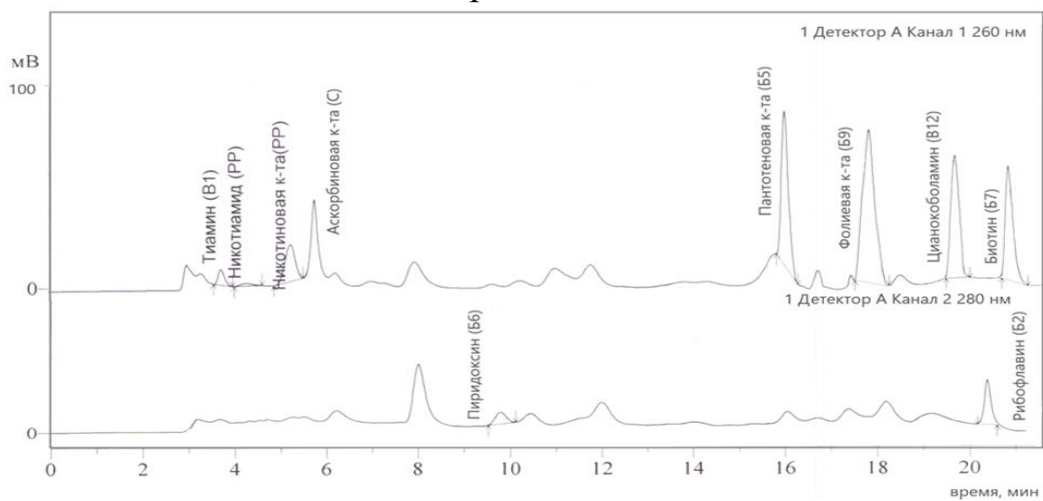


Рисунок 12 – Хроматографический профиль водорастворимых витаминов водного извлечения расторопши пятнистой произрастающей в Кайтагском районе.

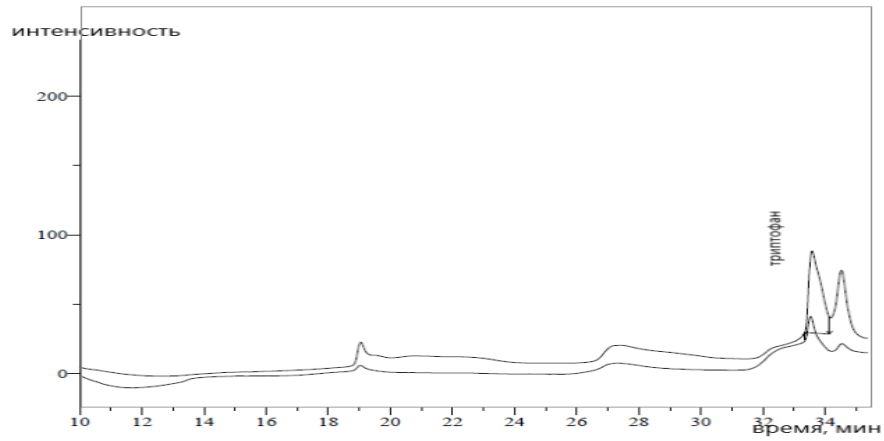


Рисунок 13 - Хроматографический профиль триптофана расторопши пятнистой произрастающей в Кулинском районе.

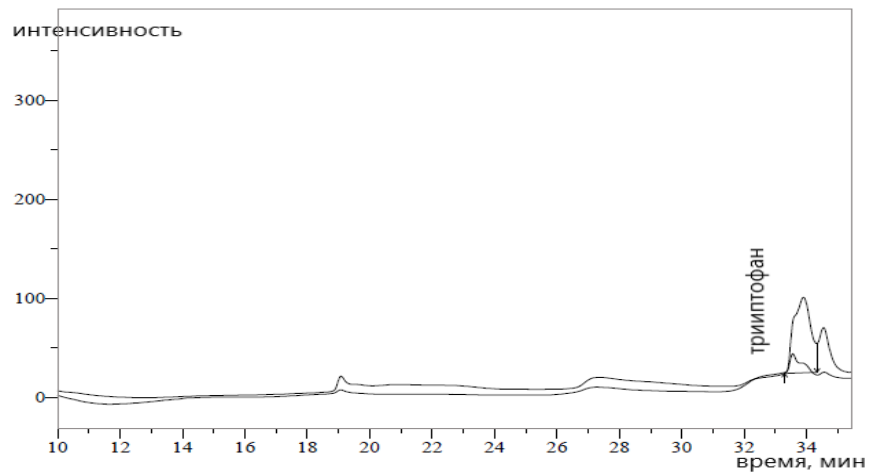


Рисунок 14 - Хроматографический профиль триптофана расторопши пятнистой произрастающей в Магарамкентском районе.

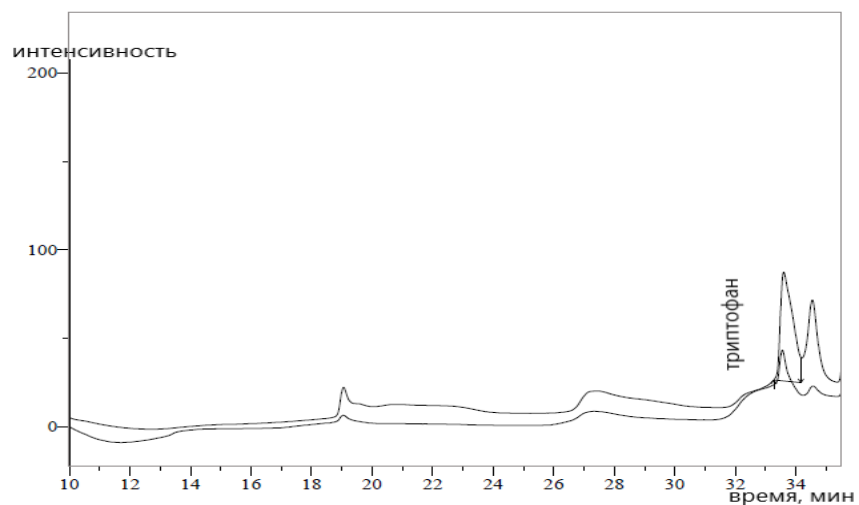


Рисунок 15 - Хроматографический профиль триптофана расторопши пятнистой произрастающей в Сулейман Стальском районе.



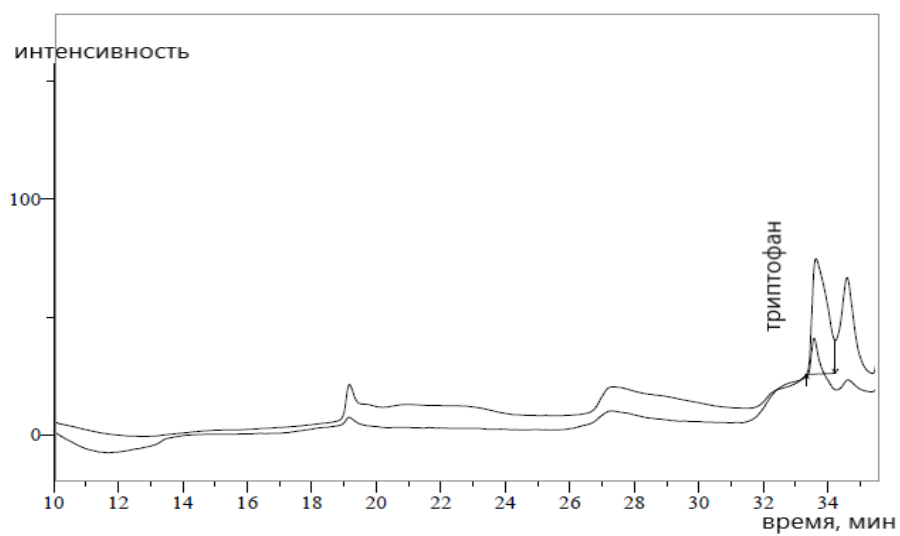


Рисунок 17 - Хроматографический профиль триптофана расторопши пятнистой произрастающей в Кайтагском районе.