



УДК 577.112.3:543.544:581.91

## Хроматографический анализ состава белков плодов расторопши пятнистой, произрастающей в Республике Дагестан

© 2021 Рамазанов А.Ш.<sup>1,2</sup>, Балаева Ш.А.<sup>1</sup>, Рудаков О.Б.<sup>3</sup>, Селеменев В.Ф.<sup>4</sup><sup>1</sup>Дагестанский государственный университет, Махачкала<sup>2</sup>Институт проблем геотермии и возобновляемой энергетики, филиал ОИВТ РАН, Махачкала<sup>3</sup>Воронежский государственный технический университет, Воронеж<sup>4</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 07.07.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3776

Работа посвящена изучению аминокислотного состава белков плодов расторопши пятнистой, произрастающей в нескольких районах Республики Дагестан, отличающихся друг от друга природно-климатическими условиями: Сулейман Стальский, Кайтагский, Магарамкентский, Левашинский и Кулинский районы Дагестана. Эти местности расположены на разной высоте над уровнем моря, для них характерны разные состав почв, количество солнечных дней, объемы осадков, влажность воздуха, средние дневные температуры и др. Эти фенотипические факторы не могли не отразиться на аминокислотном составе дикорастущей расторопши пятнистой. Для определения состава аминокислот использовали стандартизованный метод ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином и спектрофотометрическим детектированием фиолетовых аддуктов аминокислот при 570 нм и желтого аддукта пролина при 440 нм. Установлена вариативность содержания аминокислот в белках расторопши пятнистой в зависимости от условий произрастания. Статистический анализ массива данных по аминокислотному составу белков расторопши пятнистой показал наличие не только значимых симбатных и асимбатных корреляций типа  $Y=aX+b$  (коэффициент парной корреляции  $|R|\geq 0.55$ ), но и тесных природных корреляций ( $|R|\geq 0.80$ ) между содержанием некоторых заменимых и незаменимых аминокислот, между их содержанием в белке и отдельными фенотипическими факторами. Выявленные показатели пищевой ценности белка расторопши пятнистой, выросшей в разных районах Дагестана и установленные фенотипические тренды в составе аминокислот белков расторопши пятнистой могут быть использованы в дальнейших биологических, биохимических и диетологических исследованиях.

**Ключевые слова:** расторопша пятнистая, белки, аминокислотный анализ, фенотипическая изменчивость, ионообменная хроматография.

### Введение

Расторопша пятнистая [*Silybum marianum* (L.) Gaertn] (далее РП) является уникальным представителем семейства сложноцветных, благодаря содержанию целого клада биологически активных веществ. В первую очередь она является источником ценных флаволигнанов, единственных природных гепатопротекторов [1]. Ценным компонентом РП является жирное масло, которое нашло широкое

применение в дерматологии и косметологии как ранозаживляющее, регенерирующее лекарственное средство [2]. Шрот, полученный после извлечения жирного масла и флаволигнанов из плодов РП, может явиться источником незаменимых аминокислот (АК), минеральных веществ и пищевых волокон [3, 4]. Являясь неприхотливым сорняком, РП произрастает на территории Республики Дагестан (далее Дагестан) практически во всех природно-климатических зонах, кроме высокого-

рья. Она образует дикие заросли на заброшенных пахотных землях, необрабатываемых огородах, садах, по краям дорог и т.д.

Как известно, аминокислоты – нелетучие цвиттер-ионы, некоторые из них не имеют функциональных групп, пригодных для детектирования, поэтому практически во всех случаях анализируются не сами АК, а их производные, полученные перед или после хроматографического разделения. Так, ионообменная хроматография основана на химическом взаимодействии активных групп неподвижной фазы с ионами разделяемых соединений. Перед аминокислотным анализом белки полностью гидролизуют. После их гидролиза процесс аминокислотного анализа может быть таким же, как и для свободных АК. В качестве детектора в ВЭЖХ обычно используют спектрофотометрический детектор в видимой области или флуориметрический детектор в зависимости от используемого метода дериватизации. Ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией с нингидрином является наиболее распространенным методом для количественного аминокислотного анализа [5].

Целью данной работы является определение общего содержания и аминокислотного состава белков плодов РП, произрастающей в Дагестане, и статистический анализ массива хроматографических данных об аминокислотном составе этих белков. Представлялось интересным установить наиболее характерные фенотипические соотношения для протеиногенных аминокислот РП, выяснить, как изменяется биологическая ценность белка дикорастущей РП, выросшей в разных природно-климатических условиях.

Выявленные природные корреляции в составе АК могут служить одним из способов идентификации растительного сырья, определения его подлинности, биологической ценности. Аналогичные исследования в работе [5] были проведены для животных белков и белков соевого

изолята, были установлены некоторые генотипические и фенотипические зависимости и природные корреляции в составе АК белков.

### Экспериментальная часть

Объектами исследования являлись плоды РП, заготовленные в 2019 г. в Сулейман Стальском, Кайтагском, Магарамкентском, Левашинском, Кулинском районах Дагестана. Плоды представляли собой зерновки от коричневого с черными вкраплениями до полностью черного цвета длиной 5-7 мм, шириной от 2 до 4 мм, массой  $21 \pm 1$  мг, шрот представлял собой порошок серого цвета с коричневыми вкраплениями, с размером частиц 0.1-1.0 мм. Перед определением содержания белка и аминокислотного состава из плодов было извлечено жирное масло сверхкритической флюидной экстракцией диоксидом углерода [6].

Для определения общего содержания белка в образцах использовали метод Кьельдаля (ГОСТ 32044.1-2012), заключающийся в минерализации органического сырья, подщелачивании полученного минерализата, отгонке и титровании аммиака. Для минерализации пробы около 1 г сырья (точная навеска) помещали в длинногорловую колбу Кьельдаля, заливали  $25 \text{ см}^3$  концентрированной серной кислоты. В качестве катализатора использовали сульфат натрия и медный купорос. Нагревание проводили на установке для разложения белка Turbotherm (Gerhardt). Нагревание до появления и исчезновения пены проводили вначале медленно, затем интенсивно. Прозрачный минерализат переливали в установку для перегонки аммиака Varopdest (Gerhardt). В приемной колбе находилась борная кислота со смешанным индикатором. Окончание дистилляции проверяли с помощью универсальной индикаторной бумаги. Дистиллят титровали 0.1 М раствором гидроксида натрия до перехода окраски с фиолетовой до зеленой.

Аминокислотный состав белка обезжиренных плодов РП определяли методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией нингидрином (ГОСТ 32195-2013). 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°C в термостате. В охлажденные гидролизаты добавляли цитратный буфер (с молярной концентрации ионов натрия 0.2 моль/дм<sup>3</sup>) и количественно переносили смесь в круглодонные колбы. Раствором гидроксида натрия с 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°C. Полученные сухие остатки растворяли в растворах цитратного буфера (V=200 см<sup>3</sup>). Перед хроматографированием образцы фильтровали через мембранный фильтр.

Для определения триптофана проводили щелочной гидролиз белка (ГОСТ 32201-2013). 1.0000 г обезжиренного образца растворяли в воде, помещали в полипропиленовую колбу и добавляли 8.4 г гидроксидом бария. Нагревали колбу в сушильном шкафу при температуре 110°C в течение 20 ч. После охлаждения

раствора добавляли 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 5 см<sup>3</sup> раствора ортофосфорной кислоты (85%). Далее нейтрализовали раствор 6 М раствором соляной кислоты до значения рН=3. Добавляли 30 см<sup>3</sup> метанола и разбавляли водой. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр.

Хроматографический профиль смеси АК регистрировали 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>. Идентификацию АК в белке шрота плодов РП проводили сравнением времени удерживания пиков на хроматограмме стандартного образца АК фирмы Sykam GmbH и на хроматограмме исследуемого образца. Все аминокислоты идентифицировали по хроматограмме, полученной при 570 нм (фиолетовые комплексы) кроме пролина, так как он образует с нингидрином желтый комплекс, его идентифицировали при 440 нм. На рис. 1 и 2 приведены хроматографические профили стандартного образца фирмы Sykam GmbH и пробы с Кулинского района Дагестана. Содержание АК рассчитывали по площадям соответствующих пиков на хроматограмме

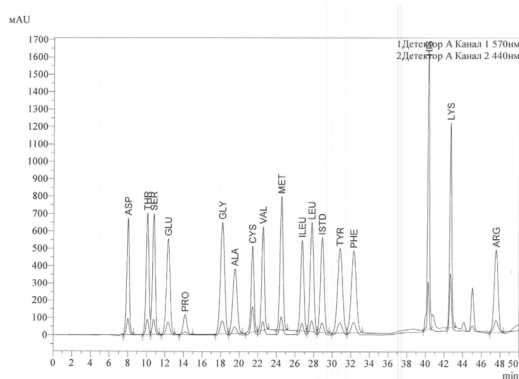


Рис. 1. Хроматограмма стандартного образца смесей аминокислот

Fig. 1. Chromatogram of a standard sample of amino acid mixtures

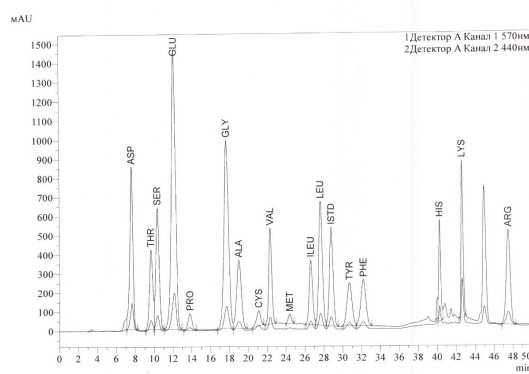


Рис. 2. Хроматограмма аминокислот образца плодов расторопши пятнистой, произрастающей на территории Кулинского района Дагестана

Fig. 2. Chromatogram of amino acids of a fruit sample of milk thistle growing in the Kulinsky District of Dagestan

исследуемого образца белка относительно пиков на хроматограмме стандартного образца.

Для оценки биологической ценности белка частично обезжиренных плодов РП по полученным данным 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) по формулам, приведенным в [7] и индекс незаменимых аминокислот (ИНАК) по [8].

## Обсуждение результатов

В табл. 1 приведены высота над уровнем моря, климатические (среднегодовые температуры, амплитуда температур, количество осадков, количество солнечных дней в 2019 г., гидротермический коэффициент) и почвенные условия, при которых произрастали образцы РП.

Места произрастания образцов отличаются высотой над уровнем моря. Три образца плодов РП собраны в предгорных районах (Кайтагский, Магарамкентский, Сулейман Стальский), по одному в горном (Левашинский) и высокогорном (Кулинский) районах. По среднедневной температуре относительно холодным является Кулинский район, самым жарким – Кайтагский. Наибольшее количество

Таблица 1. Условия прорастания плодов расторопши пятнистой в Дагестане  
Table 1. Growth conditions for milk thistle fruits in Dagestan

Условия произрастания	Район (населенный пункт)				
	Кулинский (Хосрех)	Левашинский (Кутиша)	Магарамкентский (Куйсун)	Сулейман Стальский (Гереханово)	Кайтагский (Маджалис)
Высота, м н.у.м, [9], Н	2066	1593	532	480	408
Тип почвы [10]	Горно-луговой	Горно-каштановый	Бурый-лесной	Горно-луговой	Аллювиально-луговой
Содержание гумуса в почве [10], G	6.5	6.5	5	4.5	5
рН почв [10]	6.0-6.1	7.0-7.3	6.5-7.0	5.4-6.0	7.0-7.5
Средняя дневная температура воздуха, °С [11], $T_{cp}$	20	24	25	25	26
Амплитуда температуры °С [11], $aT$	38	35	36	37	35
Сумма осадков, мм [11, 12], $W_1$	515	332	128	123	59
Количество солнечных дней [11], S	46	73	77	77	68
Влажность воздуха, % [11], $W_2$	55	52	50	49	45
Сумма активных температур, °С [11], $\Sigma T$	2173	2746	3005	3168	3111
ГТК [13]	2.4	1.2	0.4	0.4	0.2

осадков за период вегетации выпадает в высокогорном Кулинском районе (515 мм), минимальное – в Кайтагском районе (59 мм). Наибольшее количество солнечных дней наблюдалось в Сулейман Стальском и Магарамкентском районах (77), наименьшее – в Кулинском (46). Приведенный в табл. 1 гидротермический коэффициент (ГТК) в пределах 1.0-1.4 характеризует оптимальные условия

увлажнения, более 1.4 – избыточные, менее 1.0 – засушливые условия.

На рис. 1 и 2 представлены хроматографические профили стандартного образца АК и образца аминокислот шрота РП, произрастающей на территории Кулинского района Дагестана.

В табл. 2 приведены результаты определения содержания общего белка в образцах шрота РП и их аминокислотного

Таблица 2. Массовая доля аминокислот (%) в плодах расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане

Table 2. Mass fraction of amino acids (%) in milk thistle fruits growing in Dagestan

Название кислоты	Район сбора образцов РП					
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	Сулейман Стальский	Кайтагский	Смесь из 5 районов
Аспаргиновая кислота + аспаргин (Asp)	2.10	1.89	1.97	1.94	2.12	1.94
Треонин (Thr)	0.87	0.81	0.81	0.80	0.87	0.79
Серин (Ser)	1.19	1.10	1.01	1.10	1.19	1.08
Глутаминовая кислота + глутамин (Glu)	4.63	4.23	4.11	4.24	4.67	4.14
Глицин (Gly)	1.32	1.23	1.22	1.17	1.29	1.16
Аланин (Ala)	0.95	0.85	0.87	0.83	0.93	0.83
Цистеин (Cys)	0.27	0.32	0.22	0.28	0.32	0.25
Валин (Val)	1.06	0.96	0.95	0.95	1.06	0.95
Метионин (Met)	0.10	0.25	0.05	0.11	0.19	0.09
Изолейцин (Ileu)	0.91	0.81	0.81	0.80	0.89	0.81
Лейцин (Leu)	1.41	1.29	1.31	1.29	1.43	1.28
Тирозин (Tyr)	0.85	0.87	0.79	0.79	0.87	0.80
Фенилаланин (Phe)	0.90	0.82	0.83	0.80	0.92	0.82
Гистидин (His)	0.54	0.48	0.49	0.48	0.52	0.46
Лизин (Lys)	1.03	1.04	0.98	1.01	1.02	0.94
Аргинин (Arg)	1.91	1.73	1.68	1.83	2.06	1.72
Пролин (Pro)	0.97	0.90	0.89	0.89	0.94	0.87

состава. Во всех образцах плодов РП обнаружено 18 аминокислот.

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

В табл. 3 приведено содержание аминокислот в белке плодов РП, произрастающей в разных районах РД.

Статистический анализ хроматографических данных показал, что в составе белков РП наблюдается вариативность, обусловленная фенотипическими факторами, отраженными в табл. 1. Имеются симбатные и асимбатные изменения состава АК в белках в зависимости от природно-климатических условий произрас-

тания РП. Найденные значимые корреляции ( $|R| \geq 0.55$ ) приведены в табл. 4. Наиболее тесные корреляции ( $|R| \geq 0.80$ ) выделены жирным шрифтом.

Наличие неслучайного, взаимосвязанного изменения соотношений между аминокислотами X/Y прослеживается, как и для белков сои [5], 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 АК и общим содержанием белка в плодах. При его увеличении растет доля

Таблица 3. Содержание аминокислот (%) в белке плодов расторопши пятнистой, произрастающей в Дагестане

Table 3. Amino acid content (%) in the protein of milk thistle fruits growing in Dagestan

Название кислоты	Массовая доля в белке, %					
	Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	Сулейман Стальский	Кайтагский	Смесь из 5 районов
Аспаргиновая кислота + аспаргин (Asp)	9.9	9.6	10.0	9.9	10.3	10.2
Треонин (Thr)	4.10	4.13	4.14	4.05	4.21	4.17
Серин (Ser)	5.61	5.63	5.69	5.56	5.73	5.69
Глутаминовая кислота + глутамин (Glu)	21.9	21.5	21.8	21.8	21.4	21.7
Глицин (Gly)	6.23	6.24	6.01	6.03	6.36	6.09
Аланин (Ala)	4.48	4.31	4.30	4.32	4.54	4.37
Цистеин (Cys)	1.30	1.61	1.45	1.50	1.14	1.30
Валин (Val)	5.00	4.88	4.88	4.96	4.97	4.98
Метионин (Met)	0.46	1.27	0.58	0.86	0.27	0.45
Изолейцин (Ileu)	4.27	4.10	4.12	4.13	4.24	4.25
Лейцин (Leu)	6.87	6.54	6.62	6.69	6.81	6.74
Тирозин (Tyr)	4.03	4.43	4.08	4.07	4.11	4.22
Фенилаланин (Phe)	4.25	4.17	4.12	4.29	4.30	4.30
Гистидин (His)	2.54	2.43	2.45	2.43	2.55	2.43
Лизин (Lys)	4.86	5.26	5.19	4.78	5.13	4.93
Аргинин (Arg)	9.03	8.77	9.42	9.60	8.75	9.04
Пролин (Pro)	4.56	4.58	4.56	4.40	4.61	4.56
Триптофан (Trp)	0.63	0.61	0.58	0.62	0.59	0.54

Таблица 4. Линейные тренды для аминокислот белков дикорастущей расторопши пятнистой  $Y=aX+b$  и степени парной корреляции R

Table 4. Linear trends for amino acids in the proteins of wild milk thistle  $Y=aX+b$  and the degree of R pair correlation.

Аминокислоты X/Y	R	$aX+b$	Аминокислоты 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>4.7X-0.4</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
ser/pH	0.84	8.8X-43.3	ser/aT	-0.64	107-12.5X

Таблица 4. (продолжение)

Аминокислоты X/Y	R	$aX+b$	Аминокислоты X/Y	R	$aX+b$
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/Тср	-0.72	73-81X
leu/his	0.79	0.40X-0.02	trip/aT	0.68	43X+10
leu/WP	0.87	6.4X-24.4	trp/W1	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	lys/pH	0.94	3.1X-9.3
phe/lys	-0.67	12.2-1.7X	lys/aT	0.85	63-5X
phe/WR	0.60	7.6X-13.6	arg/pro	-0.82	6.1-0.2X
his/WP	0.96	16X-21	arg/WP	-0.61	33.0-1.6X
his/S	-0.60	463-159X	arg/G	0.62	19.2-1.5X
pro/pH	0.84	7.2X-26.3	arg/pH	-0.71	18.4-1.6X

цина, при этом сокращается содержание в белке цистеина и аргинина. Некоторые АК весьма чувствительны к климатическим условиям. Так, для РП выросших на более кислых почвах в белке увеличивается содержание глутаминовой кислоты, аспарагина и триптофана, уменьшается доля треонина, лизина, пролина и серина. На температурные факторы (см. табл. 1, табл. 4) реагирует содержание глутаминовой кислоты, валина, серина, треонина, лизина и триптофана. Факторы освещённости влияют 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 состав АК, отмечены только отдельные тренды, а вот факторы влажности и наличие осадков (W<sub>1</sub> и W<sub>2</sub>) имеют значение для таких АК как триптофан, глутаминовая кислота (симбатные тренды), аспарагин, серин (асимбатные тренды). Интересно отме-

тить, что наиболее чувствителен буквально ко всем фенотипическим факторам триптофан, его содержание либо прямо, либо обратно пропорционально колеблется при влиянии того или иного климатического воздействия (табл. 4). 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.

Для оценки биологической ценности белка плодов РП рассчитаны аминокислотный скор (С); разбалансированность аминокислотного сора (РАС); коэффициент разбалансированности аминокислотного сора (КРАС); коэффициент утилитарности аминокислотного состава (а<sub>ж</sub>); обобщающий коэффициент утилитарности аминокислотного состава (U); биологическую ценность (БЦ), индекс незаменимых аминокислот (ИНАК), результаты приведены в табл. 5.



Таблица 5. Биологическая ценность белка плодов расторопши пятнистой, произрастающей в разных районах Дагестана

Table 5. The biological value of the protein of milk thistle fruits growing in different regions of Dagestan

Незаменимые аминокислоты	ФАО/ВОЗ 2013 [12]	Содержание незаменимых аминокислот г/100 г в образцах					
		Кулинский	Левашинский	Магарамкентский	Сулейман Стальский	Кайтагский	Смесь со всех районов
Треонин	2.5	4.1	4.1	4.2	4.1	4.1	4.17
Валин	4.0	5.0	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0
Метионин+цистеин	2.3	1.8	2.9	1.4	2.0	2.4	1.8
Изолейцин	3.0	4.3	4.1	4.2	4.1	4.1	4.2
Лейцин	6.1	6.8	6.5	6.8	6.6	6.7	6.7
*Триптофан	0.66	0.63	0.61	0.59	0.58	0.62	0.60
Фенилаланин + тирозин	4.1	8.3	8.6	8.4	8.2	8.4	8.5
Лизин	4.8	4.9	5.3	5.1	5.2	4.8	4.9
Суммарно	27.5	35.7	37.0	35.8	35.8	36.0	35.9
КРАС	-	51	41	65	40	36	50
БЦ	100	49	59	35	60	64	50
U	1	0.6	0.7	0.5	0.7	0.7	0.6
ИНАК	1	1.2	1.3	1.2	1.2	1.3	1.2

\*лимитирующая аминокислота; \*limiting amino acid

Суммарное содержание незаменимых АК во всех образцах превышает содержание в идеальном белке [12] 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 суммарному содержанию метионина и цистеина уступает идеальному белку только белок плодов, собранных в Магарамкентском, Кулинском и Сулейман Стальском районах. По суммарному содержанию незаменимых аминокислот лидируют плоды, собранные в Левашинском районе (37 г в 100 г белка). В остальных плодах суммарное содержание незаменимых АК составляет около 36 г в 100 г белка. По общепринятым коэффициентам биологической ценности белка – коэффициенту разбалансированности аминокислотного состава (КРАС); обобщаю-

щему коэффициенту утилитарности аминокислотного состава (U); биологической ценности (БЦ) и индексу незаменимых аминокислот (ИНАК) лучшими является плоды РП, произрастающие на территории Кайтагского района РД. По этим показателям всем образцам из других районов уступают плоды РП, собранные в Магарамкентском районе.

### Заключение

Статистический анализ массива данных по аминокислотному составу белков дикорастущей расторопши пятнистой показал наличие значимых природных корреляций между содержанием некоторых заменимых и незаменимых аминокислот. Выявленные показатели пищевой ценности белка расторопши пятнистой, выросшей в разных районах Дагестана по природно-климатическим условиям и установленные фенотипические тренды в составе аминокислот белков расторопши пятнистой могут быть использованы в

дальнейших биологических, биохимических и диетологических исследованиях.

*Часть экспериментальных исследований проводили на базе Коллективного исследовательского центра им. проф. Ю. М. Борисова Воронежского государственного технического университета, который частично поддерживается Министерством науки и образования Российской Федерации, Проект № 2021-2296-512-0001-060.*

### Список литературы

1. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Рыжов В.М. и др. Расторопша пятнистая. Самара: ООО «Офорт». ГОУ ВПО «СамГМУ». 2010. 118 с.
2. Цаприлова С.В., Родионова Р.А. // *Вестник фармации*. 2008. № 3(41). С. 92-104.
3. Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А., Шахбанов К.Ш. // *Химия растительного сырья*. 2019. №2. С.113-118.
4. Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А. // *Химия растительного сырья*. 2020. №3. С. 215-223.
5. Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Букша М.С. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2020. Т. 20. № 1. С. 8-21.
6. Рамазанов А.Ш., Балаева Ш.А. // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. 2020. № 4. Т.15. С. 49-58.
7. Лисин П.А., Молибога Е.А., Канушина Ю.А., Смирнова Н.А. // *Аграрный вестник Урала*. 2012. № 3. С. 26-28.
8. Лисицын А.Б., Никитина М.А., Сусь Е.Б. // *Пищевая промышленность*. 2016. № 1. С. 26-29.
9. Атлас Республики Дагестан / под ред. Исмаилова Ш.И. Федеральная служба геодезии и картографии России. М. 1999. 65 с.
10. Залибеков З.Г. Почвы Дагестана. Махачкала. Прикаспийский институт биологических ресурсов. 2010. 241 с.
11. Электронный ресурс сайт «Ну и погода» <https://nuipogoda.ru/> (дата обращения 07.07.2021)
12. Юшков С. // *Бизнес пищевых ингредиентов*. 2018. № 1. С. 22-27.
13. Янчук Т.В., Макаркина М.А. // *Современное садоводство*. 2014. № 2 (10). С. 63-69.

## Chromatographic analysis of the protein composition of milk thistle fruits growing in the Republic of Dagestan

© 2021 Ramazanov A.Sh.<sup>1,2</sup>, Balaeva Sh.A.<sup>1</sup>, Rudakov O.B.<sup>3</sup>, Selemenev V.F.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dagestan State University, Makhachkala

<sup>2</sup>Institute of Geothermal and Renewable Energy Problems, Branch of the Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala

<sup>3</sup>Voronezh State Technical University, Voronezh

<sup>4</sup>Voronezh State University, Voronezh

The article is devoted to the study of the composition of amino acids in the proteins of milk thistle fruits (*silybum marianum*) growing in several regions of the Republic of Dagestan: Suleiman-Stalsky, Kaytagzsky, Magaramkentsky, Levashinsky, and Kulinsky Districts. These regions have different environmental and climatic conditions. These areas are located at different altitudes and are characterised by different soil compositions, number of sunny days, precipitation, air humidity, average daytime temperatures, etc. These phenotypic factors could not but affect the amino acid composition of wild milk thistle. To determine the amino acid composition, we used a standardised ion exchange chromatography method with post-column derivatisation with ninhydrin and spectrophotometric detection of purple amino acid adducts at 570 nm and yellow proline adduct at 440 nm. We observed the variability of the amino acid content in milk thistle proteins depending on the growth conditions. Statistical analysis of the data set on the amino acid composition of milk thistle proteins demonstrated not only the presence of significant symbatic and antibatic correlations of the  $Y=aX+b$  type (pair correlation coefficient was  $|R|\geq 0.55$ ), but also close natural correlations ( $|R|\geq 0.80$ ) between the content of some essential and non-essential amino acids, between their content in protein and some individual phenotypic factors. The determined parameters of the nutritional value of milk thistle proteins from different regions of Dagestan and the phenotypic trends in the amino acid composition of milk thistle proteins can be used in further biological, biochemical, and nutritional studies.

**Keywords:** milk thistle (*silybum marianum*), amino acid analysis, phenotypic variation, ion exchange chromatography.

## References

1. Kurkin V.A., Zapesochnaya G.G., Avdeeva E.V., Ryzhov V.M. et al. Rastoropsha pyatnistaya, Samara, ООО «Ofort», 2010, 118 p.
2. Caprilova S.V., Rodionova R.A., *Vestnik farmacii*, 2008, No 3(41), pp. 92-104.
3. Ramazanov A.Sh., Balaeva Sh.A., Shakhbanov K.Sh., *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, No 2, pp. 113-118. DOI:10.14258/jcprm.2019024441.
4. Ramazanov A.Sh., Balaeva Sh.A., *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, No 3, pp. 215-223. DOI: 10.14258/jcprm.2020036434.
5. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Buksha M.S., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2020, Vol. 20, No 1, pp. 8-21. DOI 10.17308/sorpchrom.2020.20/2375.
6. Ramazanov A.Sh., Balaeva Sh.A., *Cverhkriticheskie flyuidy: teoriya i praktika*, 2020, No 4, Vol. 15, pp. 49-58.
7. Lisin P.A., Moliboga E.A., Kanushina Yu.A., Smirnova N.A., *Agrarnyj vestnik Urala*, 2012, No 3, pp. 26-28.
8. Lisicyn A.B., Nikitina M.A., Sus' E.B., *Pishchevaya promyshlennost'*, 2016, No 1, pp. 26-29.
9. Atlas Respubliki Dagestan, pod red. Ismailova Sh.I. Federal'naya sluzhba geodezii i kartografii Rossii, M., 1999, 65 p.
10. Zalibekov Z.G., Pochvy Dagestana. Makhachkala, izd. Prikaspijskij institut biologicheskikh resursov, 2010, 241 p.
11. Elektronnyj resurs sajta «Nu i pogoda» <https://nuipogoda.ru/> (data obrashcheniya 07.07.2021)
12. Yushkov S., *Biznes pishchevykh ingredientov*, 2018, No 1, pp. 22-27.
13. Yanchuk T.V., Makarkina M.A., *Sovremennoe sadovodstvo*, 2014, No 2 (10), pp. 63-69.

**Рамазанов Арсен Шамсудинович** – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой аналитической и фармацевтической химии, Дагестанский государственный университет, заведующий лабораторией, Институт проблем геотермии и возобновляемой энергетики филиала ОИВТ РАН, Махачкала

**Балаева Шамсият Абдулмеджидовна** – старший лаборант кафедры аналитической и фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, Республика Дагестан

**Рудаков Олег Борисович** – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и химической технологии материалов, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический университет», Воронеж

**Селеменев Владимир Федорович** – д.х.н., профессор, кафедра аналитической химии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

**Ramazanov Arsen Sh.** – Dr. Sci. (Chemistry), professor, Head of department of Analytical and pharmaceutical Chemistry, Dagestan State University. Head of the laboratory, Institute for Geothermal and Renewable Energy Problems, Branch of IIHT RAS. Makhachkala, e-mail: [a\\_ramazanov@mail.ru](mailto:a_ramazanov@mail.ru)

**Balaeva Shamsiyat A.** – assistant, Department of analytical and pharmaceutical chemistry, Dagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, e-mail: [balashamsiyat@mail.ru](mailto:balashamsiyat@mail.ru)

**Rudakov Oleg B.** – Dr. Sci. (Chemistry), professor, head of the Department of Chemistry and Chemical Technology of Materials, Voronezh State Technical University, e-mail: [robi57@mail.ru](mailto:robi57@mail.ru)

**Selemenev Vladimir F.** – Dr. Sci. (Chemistry), professor, Department of analytical chemistry, Voronezh State University, e-mail: [common@chem.vsu.ru](mailto:common@chem.vsu.ru)