

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ О.О БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему «Встановлення маркерів якості для надкритичних CO<sub>2</sub>  
екстрактів проса»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи В-1а  
(заочна форма навчання , друга вища освіта)  
напряму підготовки (спеціальності)  
226 « Фармація, промислова фармація »  
для другого (магістерського) рівня вищої освіти  
Хромова Н.А.  
Керівник: к.х.н. Сиротчук О.А  
Рецензент:

**Київ – 2023 рік**

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>РОЗДІЛ 1. Аналіз літературних джерел щодо обробки проса та відходів, фармакологічні властивості екстракту проса, особливостей складу та методів визначення відомих речовин в екстрактах проса</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>1.1 Вплив бробки зерен проса на якість і склад продукту. Переваги . Недоліки.</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>1.1.2 Подрібнення.</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>1.1.3. Солодування</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>1.1.4. Ферментація (бродіння).</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>1.1.5. Бланширування</b> .....	<b>- 10 -</b>
<b>1.1.6. Кислотний гідроліз.</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>1.2 Надкритична CO<sub>2</sub>-екстракція проса та вплив параметрів екстракції на хімічний склад продукту.</b> .....	<b>- 12 -</b>
<b>1.3. Огляд літературних джерел щодо визначення хімічного складу CO<sub>2</sub>-екстрактів проса.</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>2.1 Об'єкти аналізу:</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>2.2 Реактиви і стандартні речовини:</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>2.3 Обладнання:</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>2.4 Мірний посуд:</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>2.5 Методика проведення ідентифікації речовин в екстракті проса.</b> ..	<b>- 19 -</b>
<b>2.5.1 Умови хроматографування для визначення:</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>2.5.2 Підготовка зразків для проведення ідентифікації речовин в екстракті проса :</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>2.6 Методика визначення складу жирних кислот проса.</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>2.6.1 Умови хроматографування для визначення:</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>2.6.2 Підготовка зразків для проведення ідентифікації складу жирних кислот :</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>2.7 Методика кількісного визначення сквалену.</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>2.7.1 Умови хроматографування:</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>2.7.2 Підготовка зразків для кількісного визначення сквалену:</b> ....	<b>- 21 -</b>
<b>РОЗДІЛ 3</b> .....	<b>- 23 -</b>

Результати і обговорення .....	Error! Bookmark not defined.
<b>3.1 Ідентифікація речовин в екстракті проса.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>3.2. Визначення складу жирних кислот проса. ....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>3.3 Кількісне визначення сквалену .....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>3.3.1. Придатність хроматографічної системи. ....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>3.3.2 Визначення сквалену в зразках . ....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>- 42 -</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>- 48 -</b>

## ВСТУП

Просо (*Panicum miliaceum* L.) є важливою злаковою рослиною та цінним компонентом раціону людини. “Просо є другою за значимістю круп’яною культурою. Воно належить до дуже стародавніх культур. На думку багатьох дослідників, його культура відома понад 4 тисячі років” [1]. Завдяки невибагливим умовам вирощування у майбутньому прогнозують , що ця культура буде відігравати важливу роль у глобальній продовольчій безпеці в умовах змін клімату, оскільки дефіцит води є значущою загрозою для сільського господарства [2]. В 2050 році населення планети зросте до 9,3мільярда , це призведе до серйозних проблем з продовольчою безпекою [3]. Організація Об'єднаних Націй продовольства та сільського господарства (FAO) визначила просо як одну з майбутніх «розумних культур» двадцятого століття [4].

В першому розділі коротко розглянуто способи обробки зерна, відокремлення від основної маси продуктів лушення та утворення відходів : лушпиння, муки, дроблянки.

Вихід пшона та відходів: крупа – 69,5%, кормове подрібнення ( пшоняна мучка) – 3,1%, борошно – 6,7%, лушпиння – 16,7%, усушка – 0,5%, інші відходи – 3,5% [5]. Завдяки багатому вмісту цінних речовин проса вважається культурою без відходів .

Маленький розмір зерен ускладнює відділення жиромісткого зародка від ендосперму, що викликає проблеми під час зберігання пшона, особливо у формі борошна. Жири , що містяться в перикарпі та зародку після подрібнення контактують з киснем повітря . Це призводить до ліполізу та подальшого окиснення утворених диестерифікованих ненасичених жирних кислот. Ці хімічні зміни зазвичай проявляються у вигляді неприємних смаків під час зберігання, особливо при високій вологості та доступу кисню повітря [6].

CO<sub>2</sub> газова екстракція дає можливість отримати максимально якісні і кількісні характеристики цінних компонентів із відходів обробки проса.

Так як зерно і , відповідно, продукти його переробки містять велику кількість мінералів (P, Ca , Zn Fe), дієтичних волокон, поліфенолів, вітамінів (ніацин, вітаміни групи B та фолієва кислота), амінокислот (метіонін, цистеїн, лейцин та ізолейцин, лецитин) , ліпідів , жирних кислот, за якими слідують , сквален , міліацин , каротиноїди , токофероли, фітостероли, екстракти проса щироко використовуються в фармацевтичній промисловості, парфумерії та косметології . Також дуже популярне їх застосування у виробництві БАДів. Тому в цій роботі приділена увага розробці критеріїв оцінки якості CO<sub>2</sub> – надкритичних газових екстрактів проса, отриманих у різних виробників.

**Мета:** встановити склад екстрактів проса отриманих з різної сировини, розробити екобезпечну, селективну методику визначення сквалену в екстракті проса.

**Завдання:**

1. Провести ідентифікацію речовин, що містяться в екстрактах проса і запропонувати речовини або їх комбінацію вміст яких може вказувати на якість екстракту.
2. Провести визначення вмісту рослинних олій і їх жирно-кислотний склад, розглянути можливість застосування результатів для оцінки якості екстрактів.
3. Провести кількісне визначення сквалену, як потенційного маркеру якості екстрактів.
4. Ідентифікувати міліацин в екстрактах для встановлення якості екстрактів.

**Методи дослідження:** ідентифікація речовин в зразках CO<sub>2</sub>-екстрактів проса проводилась допомогою газової хроматографії з мас-детектуванням ГХ-МС на хроматографі Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra,

колонка DB –WAX 30м×0,32мм×0,25мкм. Визначення складу жирних кислот методом ГХ на хроматографі GC-2010AF Plus з полум'яно-іонізаційним детектором, колонка HP – INNOWAX 30м×0,53мм×1мкм за методикою монографії Європейської Фармакопеї 2.4.22 “Composition of fatty acids by gas chromatography”. Визначення сквалену методом ВЕРХ на рідинному хроматографі з спектрофотометричним детектором Shimadzu LC-30, колонка Symmetry C18 150×4,6 3,5 мкм.

**Новизна та значення одержаних результатів:** даній роботі приділена увага пошуку маркерів оцінки якості надкритичних CO<sub>2</sub>-екстрактів проса, встановлений жирокислотний кількісний та якісний склад зразків екстрактів, вмісту сквалену та головного маркеру проса – міліацину/германіколу. В подальших дослідження є необхідність в стандартизації сировини по кількісному вмісту міліацину/германіколу, що дасть можливість контролювати якість екстрактів.

**Апробація результатів дослідження:** Тези на науковопрактичній конференції “ Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку з міжнародною участю присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця 14-20.12.2023 року. Секція 4 : Сучасні підходи до стандартизації і методів контролю якості лікарських засобів, дієтичних добавок та засобів лікувальної косметики.

**Структура роботи:** дана робота включає 54 сторінки, 3 розділи та 51 використане джерело літератури.

## РОЗДІЛ 1.

### **Аналіз літературних джерел щодо обробки проса та відходів, фармакологічні властивості екстракту проса, особливостей складу та методів визначення відомих речовин в екстрактах проса .**

#### **1.1 Вплив бробки зерен проса на якість і склад продукту. Переваги . Недоліки.**

Поряд з поживними речовинами (*Panicum miliaceum* (L.)) містить також достатню кількість не харчових сполук , що є головним обмежуючим фактором його використання. Фітати, таніни, поліфеноли знижують біодоступність мінералів, утворюючи з ними хелатні комплекси, які не засвоюються в кишківнику . Високий рівень ліпазної активності суттєво скорочує терміни придатності сировини. Тому вивченню впливу різних методів обробки на склад поживних речовин і анти-харчових компонентів проса приділяється досить значуща увага.

Покращення терміну придатності борошна з проса та оброблених продуктів може бути досягнуто за допомогою численних технік, таких як лущення, подрібнення, солодування, бланширування, пропарка, кислотний гідроліз та термічна обробка [7] .

##### **1.1.1. Лущення.**

Це процес обробки ядра проса в результаті якого зерно звільняється від квіткових плівок, насінневих та плодових оболонок , частково алейронового шару та зародка.[8] В середньому, частина оболонки коливається від 1,5 до 29,3 % плоду [9].

Застосування різних машин і механізмів для лущення має свої переваги і недоліки , відповідно і відходи виробництва будуть мати різний склад . Так при застосуванні абразивних млинів [10] або дисків видаляється близько 12-30 відсотків зовнішньої поверхні зерна. Перевищування цього ліміту

призводить до значної втрати золи, жиру, мікроелементів, клітковини, білків та амінокислот, таких як лізин, гістидин та аргінін [11][12].

[13] Вивчали вплив ручного та механічного лушення на склад поживних речовин проса і порівнювали його з систематизованим методом абразивного дезоболонкування. У цьому дослідженні не було помічено значної різниці між цими традиційними методами лушення. Мінерали (залізо, цинк), вміст клітковини та фітинової кислоти значно зменшилися після традиційного лушення. Проте абразивна обробка зерна, виконана за допомогою тангенціального абразивного пристрою для лушення, призвела до вищих втрат цинку та жиру, можливо в результаті видалення зародку під час обробки.

### **1.1.2 Подрібнення.**

Перетворення зерна на борошно шляхом розтирання. Виконується в основному для максимального розділення ендосперму, оболонки та зародка та для зменшення розміру частинок ендосперму з метою полегшення виробництва дрібного борошна. Подрібнення доволі складний процес завдяки дрібним зернам і твердим зародком та ендоспермом. При подрібненні валковими млинами пошкоджуються гранули крохмалю, тим самим збільшуючи їхню схильність до ферментативного розщеплення [14].

Волога тепла обробка зерна з наступним висушуванням до вологості 10-12 відсотків, показали значне поліпшення процесу подрібнення завдяки високому вмісту борошнистого ендосперму. Таке борошно може зберігатися до трьох-чотирьох місяців із збереженням вмісту вільних жирних кислот нижче 10 відсотків протягом періоду зберігання [11].

[15] Досліджували, що роликові млини можна використовувати для виробництва низькожирних круп. Цей процес супроводжувався лушенням, замочуванням і подрібненням зерна через тонкі гофровані вали, що призвело до середньої виходу 61% крупи (із цілого зерна) і вмістом жиру 1,2%.



[16] Досліджували вплив подрібнення на склад не харчових домішок. Результати їхнього дослідження показали, що подрібнення з тепловою обробкою знизили рівні поліфенолів і фітинової кислоти, а також значно покращили засвоюваність білка та крохмалю.

Згідно з дослідженням, проведеним [17] показали, що різні сорти проса за однакових умов, однакових ступенях очищення і подрібнення мають різний відсоток інгібування всмоктування білків, тому танін не впливає на низьку засвоюваність білка та інші фактори, такі як взаємодія білків з небілковими компонентами, бо самі білки, можуть впливати на засвоюваність інших білкових молекул.

Механічні операції, які є основним етапом обробки пшона, виявилися сприятливими для подовження його терміну зберігання, але цей процес пов'язаний із втратою важливих частин зерна, включаючи більшість мікро- і макроелементів.[6]

### **1.1.3. Солодування .**

Пророшування зерна з наступним висушуванням. Після гомогенізації та автоклавування пророщеної суспензії крохмаль гідролізує на низькомолекулярні вуглеводи (оліго- та дисахариди) під дією амілазних ферментів та виділенням більшого вмісту розчинних цукрів[18]. Подрібнені зерна пророщеної сировини зменшують здатність утримувати воду та мають високу енергетичну цінність, що підвищує їх потенціал у виробництві дитячих продуктів, першого прикорму немовлят та ентеральних продуктів.[19]

Солодування перед подрібненням помітно покращує колір, вітамінну доступність *in vitro* разом з зменшенням вмісту поліфенолів і вільних жирних кислот в зернах проса. Зменшення поліфенолів після проростання може бути пов'язано з наявністю поліфенолоксидази або виникнути внаслідок гідролізу танінового білка і комплексів танін-фермент, що сприяють видаленню таніну або поліфенолів. Крім того, зниження рівня

фітинової кислоти після замочування та проростання може бути наслідком вимивання водою під впливом градієнту концентрації.

Дані досліджень [20] свідчать, що зменшуються анти-харчові фактори, покращується екстрагованість мінералів (Ca, Fe, Zn, P, I, Cu та Mn) Це може бути наслідком виробництва фітази під час процесу проростання, що призводить до розпаду фітинової кислоти, яка зв'язує мінерали, роблячи їх не доступними для організму. [21] Підвищується засвоєння протеїнів у середовищі *in vitro* після процесу проростання. Біодоступність поживних речовин також значно поліпшується завдяки розкладанню білків протеазними ферментами[22].

#### **1.1.4. Ферментація (бродиння).**

Біологічний процес, під час якого мікроорганізми, такі як бактерії, дріжджі або гриби, перетворюють органічні речовини, такі як цукри або крохмаль, без доступу повітря.

Просяне борошно зерна, що піддавалось молочнокислій ферментації (при температурі 20, 40 та 50 °C) протягом 72 годин або більше, практично повністю позбавлене вмісту фітинової кислоти, а також з підвищеним вмістом екстрагованого фосфору. Це може бути наслідком гідролізу фітинової кислоти ферментами фітази, які природно містяться в зернових [23]. Зменшення фітинової кислоти може бути наслідком її гідролізу, спричиненого фітазою проса та мікрофлорою ферментаційного середовища. Крім того, зниження поліфенолів після ферментації може бути наслідком діяльності поліфенолоксидази та мікрофлори ферментів .

[24] Описали, що природна ферментація проса значно покращила вміст жиру та тіаміну, не суттєво впливаючи на вміст білка. Вищий вміст жирів

після ферментації може бути наслідком виробництва жиру дріжджовими штамами.

Зменшений вмісту крохмалю після ферментації [18] може бути пов'язаний з амілолітичною дією мікроорганізмів у ферментуючій суміші.

[11], [25] Вивчали вплив традиційної ферментації на точний склад, розчинні цукри, амінокислоти, активність інгібіторів ферментів, профіль фітинової кислоти та танінів у борошні проса. Результати показали відсутність значних відмінностей між вмістом білка, жиру та золи, за винятком складу вуглеводів, який був значно зменшений після ферментації. Крім того було виявлено значне зниження рівнів інгібіторів ферментів та вмісту фітинової кислоти. Однак у цьому дослідженні також був зафіксований збільшений профіль танінів, що може негативно вплинути на харчовий склад продуктів.

Отже, ферментація та пророщування, значно покращують поживну цінність зерен проса та збільшують термін зберігання борошна. Ці обробки можуть бути корисними, коли борошно використовують для приготування різних продуктів. [6]

### **1.1.5. Бланширування**

Досягається шляхом кип'ятіння води при температурі 98°C, після чого зерна занурюються в киплячу воду (співвідношення насіння до киплячої води 1:5) на 30 секунд, а потім висушують при температурі 50°C протягом 60 хвилин [26]. Це найефективніша техніка підвищення тривалості зберігання борошна, яка сповільнює ферментативну активність, не маючи значного впливу на її харчовий склад. Бланширування призводить до того, що продукт має три-чотириразово менший вміст жирних кислот, кислотне число та вміст вільних жирних кислот в порівнянні з незобробленим зразком [27]. [28] Повідомляють, що перлова пшениця, яка була бланширована при 98°C

протягом 30 секунд, показала значне зниження вмісту поліфенолів та фітинової кислоти що може бути пов'язано з вививанням поліфенолів та фітат-іонів в зовнішнє середовище під впливом градієнта концентрації. [29] Зазначають вищий вміст мікроелементів у продуктах . приготованих на борошні після бланширування.

Таким чином, харчова якість та тривалість зберігання борошна успішно підвищуються за допомогою відповідних методів бланширування.

#### **1.1.6. Кислотний гідроліз.**

Обробка лущеного насіння різними органічними кислотами, такими як оцтова, фумарова, винна кислота, або іноді природними кислими матеріалами, такими як тамаринд[11].

Вплив кислотного гідролізу компоненти проса вивчали різні дослідники довгий час. Порівняно з іншими кислими розчинами, такими як лимонна кислота, оцтова кислота, розведена соляна кислота виявилася більш ефективною під час депігментації всього зерна перед подрібненням [29]. [30] Дійшли висновку, попередній гідроліз в розчині HCl сприяє значному покращенню екстрагованості фосфору, кальцію та заліза зі збільшенням тривалості замочування в кислоті. Це покращення екстрагованості HCl супроводжувалось підвищенням біодоступності мінералів. [31] Повідомляють, що зерна проса після гідролізу мають менший вміст поліфенолів та вільних жирних кислот, підвищується засвоєння заліза *in vitro* , однак знижується його вміст, що може бути пов'язано з вилугуванням мінералів, які були присутні у оболонці насіння.

Комбінація кислотного гідролізу та сухого нагрівання також показала значне зниження кислотного числа , вмісту вільних жирних кислот та активності ліпази в борошні протягом періоду зберігання .

[33] Повідомляли, що цілі зерна проса, коли їх піддавали сухій тепловій обробці, показали значне зниження поліфенолів і танінів. Зниження вмісту

вільних жирних кислот після сухого нагрівання може бути наслідком приглушення активності ліпази при високій температурі.

[34] Зазначили про значне зниження фітинової кислоти після замочування та пропарювання, що можна пояснити розпадом фітинової кислоти, спричиненим тепловою обробкою. Крім того, парове оброблення під високим тиском подовжило термін зберігання шляхом повного приглушення активності ліпази. Крім того, борошно оброблене мікрохвилями, має значно більший термін зберігання.

Проте втрата мінералів (фосфору, заліза і кальцію), виявлена під час обробки, може бути пов'язана з руйнуванням мінералів внаслідок нагрівання [32].

Термічна обробка, суха чи гідротермальна, широко використовуються для інактивації ліпаз та покращення стійкості зберігання проса. Проте відомо, що ці процеси призводять до певних фізичних і функціональних змін у борошні, які можуть впливати на харчову цінність. Тому важливо впроваджувати в обробку проса вдосконалені теплові та нетеплові методи. [6]

## **1.2 Надкритична CO<sub>2</sub>-екстракція проса та вплив параметрів екстракції на хімічний склад продукту.**

Приведені вище методи обробки не дають досконалого способу збереження подрібнених зерен проса. Тому екстракція жирних олій, тригліцеридів, фосфоліпідів із борошна - один з найбільш ефективних методів. Відповідно і самі екстракти досить цінна сировина і об'єкт для досліджень.

Альтернативним методом обробки є "supercritical" СК-газова екстракція. В якості розчинника використовується вуглекислий газ (CO<sub>2</sub>), оскільки він має низьку критичну температуру (31,1°C) і тиск (7,28 МПа), що робить його ідеальним розчинником для видобутку термолабільних речовин.

Крім того, CO<sub>2</sub> нетоксичний, негорючий і має низьку вартість. Продукти, отримані за допомогою СК-екстракції, не містять залишків розчинника. Однак СК-газова екстракція має серйозний недолік у великих капіталовкладеннях, пов'язаних з високотисковими операціями. Таким чином, незважаючи на те, що перелік потенційних застосувань цієї технології великий, існує лише декілька прикладів комерційних процесів СК-газу, та нашою хує недоброчесних виробників на розведення отриманих екстрактів або реалізації фальсифікованої продукції .

Були проведені дослідження в лабораторних умовах екстракції олії з оболонки проса СК-газом: вплив числа експериментальних параметрів, таких як тиск, температура, потік і чистота CO<sub>2</sub>, час екстракції, висушування та подрібнення сировини, на видобуток олії та її якість . Порівнювалась якість олії, отриманої за оптимальних умов СК-газом, з якістю олії, екстрагованої апаратом Сокслета з використанням петролейного ефіру. [35]

Швидкість видобутку СК-газом може значно збільшуватися за допомогою підвищення тиску рідини до 900 бар [36] На практиці робота з тисками вище 300-400 бар практично не можлива (дуже великі інвестиційні витрати), тому екстракцію ліпідів зазвичай проходить при тисках 300-400 бар . Але чим вищий тиск, тим вища кінетика масового переносу олії під час періоду промивання.

Вплив температури досліджувався в діапазоні від 40 до 60°C .Спостерігалось зменшення кінетики масового переносу олії при підвищенні температури. Між 300 і 350 барами видобуток сприяється при нижчих температурах Це важливо для повного видобутку олії з сировини і також для екстракції незапасних речовин, таких як стероли [37]

Також досліджувалося вплив конкретного потоку розчинника (потік розчинника / маса сировини,  $\text{кг} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1} = \text{год}^{-1}$ ) в діапазоні від 1 до 20 год. Низький конкретний потік розчинника відповідає тривалому перебуванню

розчинника в екстракційному апараті, що сприяє масовому переносу олії зі зразка в розчинник. Відповідно покращує ефективність екстракції.

Підсумовуючи, оптимальні параметри процесу для видобутку олії з оболонки проса з використанням інструменту Separex SFE-500 (максимальний робочий тиск: 300 бар) включали в себе тиск 300 бар, температуру 40°C і конкретний потік розчинника 2-10 год-1. За таких умов можливо повністю видалити олію з оболонки проса протягом 200 і 500 хвилин і з використанням 20-30 кг CO<sub>2</sub>/кг сировини .

Вологість та розмір частинок є основними характеристиками сировини, що впливають на видобуток СК-CO<sub>2</sub> олії з рослинного матеріалу [38]. Максимальна екстракція олії була досягнута в гранулах, вологістю близько 8%, . Розмелювання гранул покращило продуктивність SCCO<sub>2</sub> екстракції,. Ймовірно, це пов'язано з руйнуванням структури клітин, що містять олію [39, 40]. Однак подрібнення зерен має практичні недоліки, такі як складності при завантаженні та нестабільність тиску під час екстракції.

Склад олії, отриманої за описаною вище методикою СК-O<sub>2</sub> екстракції порівнювався із складом олії, отриманої за допомогою екстракції апаратом Сокслета із використанням петролейного ефіру, при температурі 40-60°C. Аналіз нейтральних жирів методом ВЕТШХ показав, крім ацилгліцеридів, наявність стеролів, восків, стеролових ефірів та вуглеводнів у обох оліях. Окрім меншого вмісту восків у СК-CO<sub>2</sub>- екстрактах та відсутності фосфоліпідів [35] .

Основними жирними кислотами, присутніми в обох оліях, були лінолева (64%), олеїнова (23%) та пальмітинова кислота (7%), що відповідає попередньому дослідженню [41].

Було зазначено, що видобуток токоферолу під час екстракції КС-CO<sub>2</sub> критично зменшується при збільшенні температури [42, 43]. Проте при

низьких температурах кількість токоферолів була подібною, або навіть вищою, ніж в оліях, видобутих традиційно [42, 43, 44, 46].

Крім того, очищення СК-CO<sub>2</sub>-олійних екстрактів набагато простіше, ніж очищення олій від домішок традиційного розчинника

### **1.3. Огляд літературних джерел щодо визначення хімічного складу CO<sub>2</sub>-екстрактів проса.**

[46] Вивчалася ідентифікація та порівнювався повний хімічний склад різних сортів проса та частини рослини за допомогою аналізу екстрактів ГХ-МС.

Загалом, вегетативні частини рослини (коріння, стебла та листки) простого проса в основному склалися з сахаридів і жирних кислот, за якими слідували амінокислоти.

В насінні простого проса було ідентифіковано найбільше сахаридів і жирних кислот, за якими слідують фітостероли, сквален, міліацин, каротиноїди, токофероли.

Найбільший вміст сахаридів виявлено в стеблах, за якими слідували коріння, листки та насіння.

Фітостероли, зокрема бета-фітостерол, кампестерол та стигмастерол, були знайдені в усіх частинах рослини проса. Ці речовини мають корисні властивостями для здоров'я завдяки їх антизапальній, антиоксидантній та антиканцерогенній дії. Ці фітостероли також проявляють різноманітний кількісний вміст між сортами проса, підкреслюючи можливу користь для здоров'я в залежності від сорту.

Також ідентифіковано малонову кислоту в коренях та листях проса та насінні.



Вміст ліпідів в очищеному просі коливався від 3,5% до 6,7%. ВЖК виявлені в насінні : олеїнова, пальмітинова , ліолева та інші види насичених та ненасичених жирних кислот.

Германікол - пентациклічний терпеноїд, ідентифікувався в листках з площею піку  $1,31 \pm 0,167$  та в насіннях з площею піку  $0,19 \pm 0,214$ . Це важливо через його можливе застосування, навіть якщо виявлені кількості були відносно невеликі.

Міліацин – інший пентациклічний терпен найпоширеніший в насінні , за ними слідували листя, коріння та стебла.

Важливо відзначити різницю в наявності амірину, міліацину та фітостеролів в різних частинах рослин проса та між сортами. Ці сполуки мають різноманітні застосування в медицині, харчовій промисловості та косметичі, і така різниця має важливе значення для потенційного застосування в різних галузях.[46]

Прояне зерно відоме своїм високим вмістом каротиноїдів в своєму складі. Кім та інші [47] визначили концентрацію бета-каротину в насінні проса в діапазоні від 0,04 до 0,06 мкг/г сухої речовини в залежності від сорту. Це, ймовірно, є першими даними про наявність ретиналю , де ретиналь був ідентифікований в усіх вегетативних частинах рослини , з найбільшою площею піку в коренях. Було припущено, що сортова варіабельність вмісту ретиналю, залежить від стійкості сорту до умов навколишнього середовища. Однак це припущення повинно бути підтвержене експериментально.

Токоферолі включають чотири ізомери ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  та  $\delta$ ), які разом з токотрієнолами утворюють сім'ю вітаміну Е. [48] Виявили всі ізомери токоферолів в насіннях проса за допомогою ВЕРХ, і гамма-токоферол був найпоширеніший ( $3,00 \pm 0,03$  мг/100 г сухої речовини).

Сквален (  $C_{30}H_{50}$  : 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен ) – ациклічний природний тритерпен з шістьма подвійними зв'язками . Належить до групи каротиноїдів. Його широко використовують в фармацевтичній промисловості , парфумерії та косметології . Сквален є проміжною ланкою при біотрансформації холестерину у вітамін D та відноситься до біогенних сполук шкіри . Сприяє нормалізації процесів тканинного дихання , метаболізму, має антиканцерогенний та протипухлинний вплив, підвищує стійкість організму до різнотипних інфекцій та впливу радіаційного випромінювання [49]. У чистому вигляді сквален отримують з печінки глибоководних акул (назва сквален походить від *squalus* – акула), що впливає на його високу собівартість . Також сквален відомий як природний антиоксидант в деяких рослинах, таких як амарант чи гречка [50]. На відміну від гречки, де сквален ідентифікували в вегетативних частинах рослини, окрім насіння, наявність сквалену в просі ідентифіковано лише в насінні. Присутність сквалену в зернах проса також була підтверджена Раяном та іншими [56], які визначили вміст сквалену в насінні на рівні 8,8 мг/100 г використовуючи ВЕРХ.

Ці висновки підкреслюють складний хімічний вміст проса в залежності від конкретної частини рослини та сорту. Додаткові дослідження можуть допомогти з'ясувати наслідки таких варіацій для застосування в різних галузях

## РОЗДІЛ 2.

### Експериментальна частина

#### 2.1 Об'єкти аналізу:

1. CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт борошна проса отриманий в ДУ Інститут Геохімії мінералогії і рудоутворення
2. CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт крупи проса отриманий в ДУ Інститут Геохімії мінералогії і рудоутворення
3. CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт мучки проса отриманий в ДУ Інститут Геохімії мінералогії і рудоутворення
4. CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт проса отриманий : країна-виробник Німеччина, <https://milosvet.com.ua/uk/>
5. CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт проса отриманий : Україна  
<https://www.abcdef.com.ua/>

#### 2.2 Реактиви і стандартні речовини:

Стандартні речовини: олія насіння льону 3001538 Kusum Healthcare Pvt Ltd. , сквален Sigma S3626  $\geq 98\%$  , гептан,  $\geq 99\%$ , Honeywell, кат. 34873; калій гідроксид ( KOH)  $\geq 85\%$ , Sigma-Aldrich, кат. 30603; метанол,  $\geq 99,8\%$  , Gradient grade, VWR BDH Chemical, кат.20864.320; 2-пропанол,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, кат. 34863.

Реактиви : вода для хроматографії, отримана на системі Simplicity UV, Millipore, USA;

газ-носій – гелій ( He).

#### 2.3 Обладнання:

Газовий хроматограф Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

Газовий хроматограф Shimadzu GC-2010AF Plus (ПД)

Рідинний хроматограф Shimadzu LC-30A(CDD)

Ваги аналітичні AUW220D Shimadzu

## **2.4 Мірний посуд:**

клас А

Колби 10 мл, 20 мл, 25 мл, 50 мл, 200 мл.

Піпетки волюметричні 5 мл, 10 мл, 3 мл . 2 мл,

мікропіпетки фіксованого об'єму 1000 мкл, 10000 мкл

шприц-фільтри – нейлон, діаметр мембрани 13 мм, розмір пор 0,45 мм,  
виробник STL, Чехія

## **2.5 Методика проведення ідентифікації речовин в екстракті проса.**

### **2.5.1 Умови хроматографування для визначення:**

Прилад: Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

Колонка: DB –WAX 30м\*0,32мм\*0,25мкм

Температурна програма: початкова 80 °С, потім + 10°C/хв до 240°C, 20  
хв при 240°C

Газ-носії : гелій

Температура інжектора: 220°C

Поділ потоку: split ratio 20:1, швидкість потоку 5,00 мл/хв.

Об'єм інжекції: 0.5 мкл

Параметри мас-детектора термоіонний

Температура джерела іонів: 230°C

Температура : 250 °С

## **2.5.2 Підготовка зразків для проведення ідентифікації речовин в екстракті проса :**

Наважки 0,1г ( точна наважка ) CO<sub>2</sub>- надкритичних екстрактів кожного зразка ( всього 5 зразків ) та стандартного зразка олії насіння льону поміщали в колбу на 20 мл . Додавали 5 мл гептану та 10 мл розчину калію гідроксиду в метанолі. Струшували протягом 3 хв. Відстоювали розчин . Для хроматографування використовували верхній шар.

Омилення проводили розчином гідроксиду калію гідроксиду в метанолі :

38 г КОН поміщали в колбу на 200 мл. Додали 100 мл метанолу. Обробляли ультразвуком до повного розчинення. Охолоджували до кімнатної температури . Доводили до мітки метанолом.

Хроматографували по 500 мкл холостого розчину, стандартного розчину – 6 хроматограм та розчинів зразків по 2 хроматограм

## **2.6 Методика визначення складу жирних кислот проса.**

### **2.6.1 Умови хроматографування для визначення:**

Прилад: GC-2010AF Plus з полум'яно-іонізаційним детектором

Колонка: HP – INNOWAX 30м\*0,53мм\*1мкм

Температурна програма: початкова 170 °С , потім + 3°С/хв до 230°С

Газ-носії : гелій

Температура інжектора: 250 °С

Поділ потоку: Split 50:1, швидкість потоку 5,44 мл/хв.

Об'єм інжекції: 0,5 мкл

Параметри ПІД-детектора:

Температура детектора: 250 °C

## **2.6.2 Підготовка зразків для проведення ідентифікації складу жирних кислот :**

*Використовувалися зразки приготовані в розділі 2.1.*

## **2.7 Методика кількісного визначення сквалену.**

### **2.7.1 Умови хроматографування:**

Прилад: Рідинний хроматограф з спектрофотометричним детектором Shimadzu LC-30

Колонка: Symmetry C18 150\*4.6 3.5 мкм

Рухома фаза : етанол 96 об %.

Температура колонки: 40°C

Об'єм інжекції: 2 мкл

Швидкість потоку рухомої фази: 1,0 мл/хв

### **2.7.2 Підготовка зразків для кількісного визначення сквалену:**

Наважки 0.2 г ( точні наважки ) п'яти CO<sub>2</sub>-надкритичних екстрактів по три зразки кожного розчиняли в невеликій кількості розчинника ( ізопропанового спирту ) та доводились розчинником до мітки колби об'ємом 10 мл . Всього 15 зразків.

Наважки стандартної речовини сквалену 0, 1 г ( точна наважка) 2-ох зразків розчиняли в невеликій кількості розчинника ( ізопропанового спирту ) та доводились розчинником до мітки колби об'ємом 50 мл , що відповідає концентрації стандарту сквалену 0.2 мг/мл.

Для калібрування графіку та перевірки придатності хроматографічної системи

додатково було приготовано ще 6 розведень вище вказаного розчину стандарту сквалену . Для цього відбирались відповідні аліквотні частини та доводились до мітки у різних за об'ємом колбах згідно потрібних концентрації. Табл .2.7.2.1

**Табл.2.7.2.1. Розведення стандартних зразків сквалену для калібровки графіку та перевірки придатності хроматографічної системи.**

Концентрація %	Об'єм мірної колби, мл	Об'єм аліквоти, мл	Вміст сквалену, мг / мл
150	20	3	0,03
120	25	3	0,024
100	50	5	0,02
80	25	2	0,016
60	50	3	0,012
40	50	2	0,008

Після перемішування розчини відфільтровувались через нейлонові шприц- фільтри з діаметром пор 0,45 мм. Для хроматографування відбиралось по 800 мкл кожного розчину .

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Ідентифікація речовин в екстракті проса

Для того щоб встановити речовини, які могли б стати маркерами якості CO<sub>2</sub>-екстрактів проса необхідно ідентифікувати які саме речовини містять такі екстракти. Це зроблено за допомогою методу ГХ-МС і бібліотеки мас-спектрів. Результати див. табл. 3.1.1 та 3.1.2.

**Табл. 3.1.1. Ідентифікація жирних кислот в зразках екстрактів за бібліотеками даних мас-спектрів.**

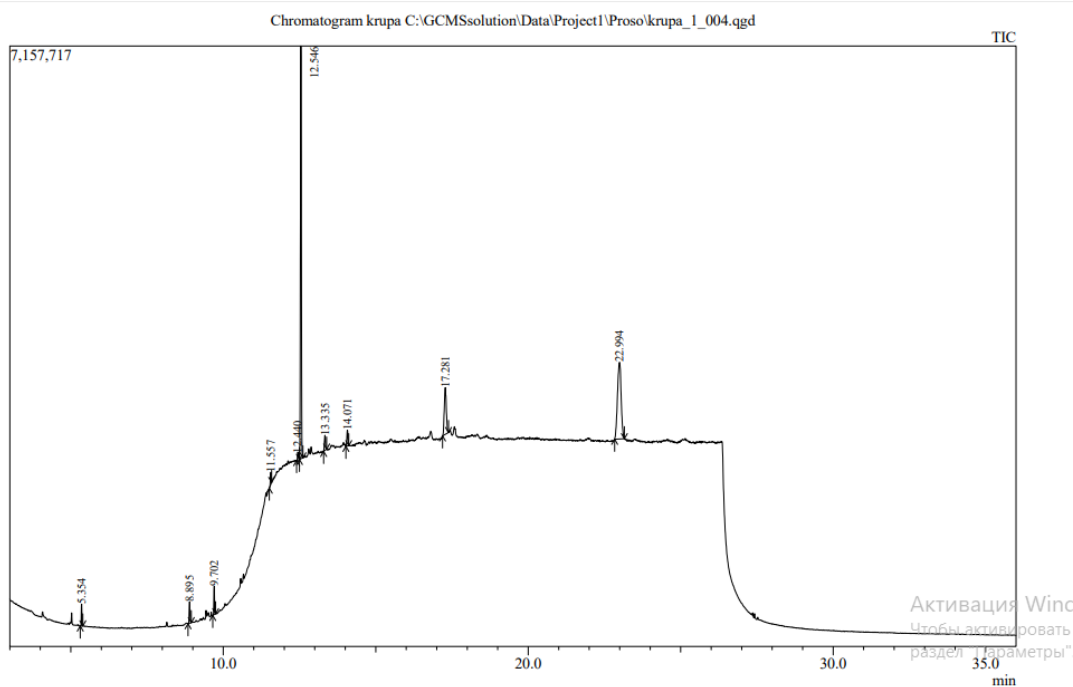
Ідентифікація Час утримання	Площа піків у зразках					
	Стандарт насіння льону	Борош но	Крупа	Мучка	МилоСв іт	Magasal Area
1.C16H32O2 RT=7,37 хв. Palmitic acid	139874	8674	177156	64190	90641	89748
2. C18H36O2 RT= 11,16 хв. Stearic acid	153200	2397	70562	11094	17764	46101
3.C18H34O2 Oleic acid RT=11,67	153200	38342	532646	225161	378460	873987
4. C18H34O2 cis-13-Oleic acid RT=11,81	2153	-	-	6231	-	4980
5.C18H32O2 Linoleic acid RT=12,74	317196	108414	1574379	606619	1104068	467952
6. C18H30O2 Linolenic acid RT=14,27	992494	-	14271	5356	12022	43935
7.C20H40O2 Eicosanoic acid RT=15,62	8547	-	21053	4831	8067	6991
8.C20H38O2 cis-13-eicosanoic acid RT=14,18	6457	-	8599	-	8610	14805



**Табл. 3.1.2. Ідентифікація сквалену та міліацину/германіколу в зразках екстрактів за часом утримання та площею піків.**

Ідентифікація Час утримання	Площа піків у зразках				
	Борошно	Крупа	Мучка	Мило Світ	Magasa I Ariya
squalene RT= 12.54 хв.	14950789	10176209	13483629	3399270	-
miliacin/germanicol RT= 22.99 хв.	10998277	7614586	11295586	20751609	-

На прикладі хроматограм рис. 3.1.1. та на рис. 3.1.2. ми можемо бачити наявність або відсутність сквалену та міліацину / германіколу в зразках екстрактів.



**Рис.3.1.1. Хроматограма ідентифікації сквалену та міліацину/германіколу в зразку екстракту крупи.**

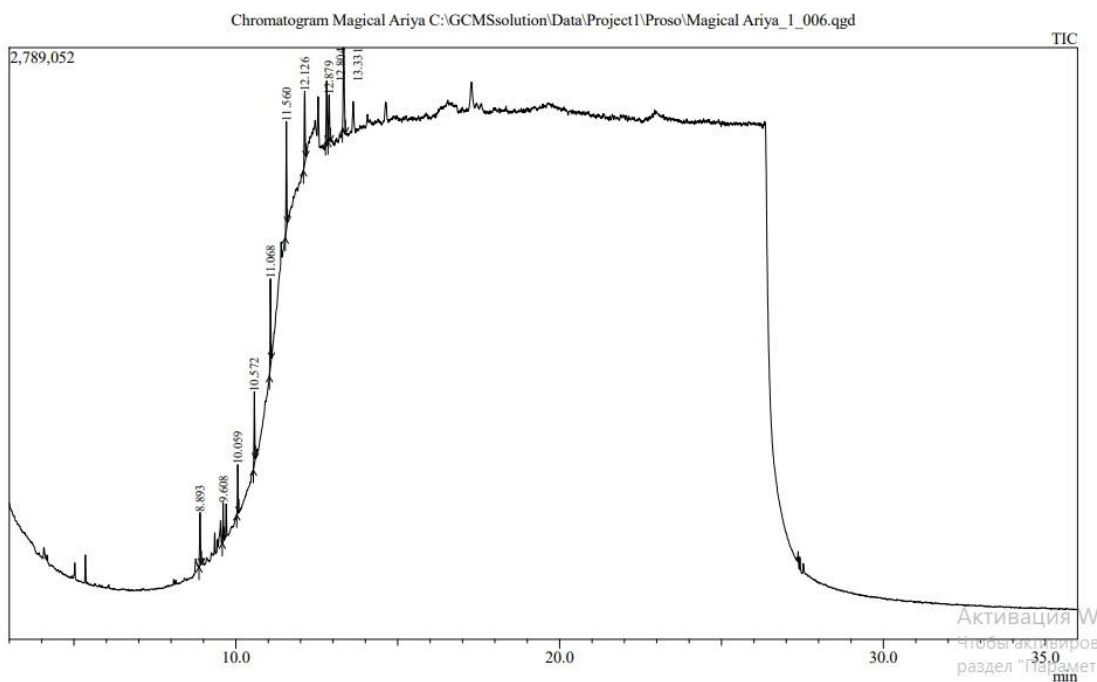


Рис. 3.1.2. Хроматограма ідентифікації сквалену та міліацину/германіколу в зразку екстракту Magical Ariya.

Відсутність германіколу/міліацину вказують на те, що екстракт Magical Ariya може бути фальсифікованим.

### 3.2. Визначення складу жирних кислот проса.

Для визначення складу жирних кислот використано методіку монографії Європейської Фрмакопеї 2.4.22 “Composition of fatty acids by gas chromatography”. Задачею даного дослідження було встановити вміст кожної з жирних кислот від сумарного вмісту жирних кислот і оцінити вміст жирних кислот шляхом порівняння зі стандартним зразком лляної олії. На хроматограмі лляної олії, рис. 3.2.1. було ідентифіковано пальмітинову, стеаринову, олеїнову, лінолеву і ліноленову кислоти.

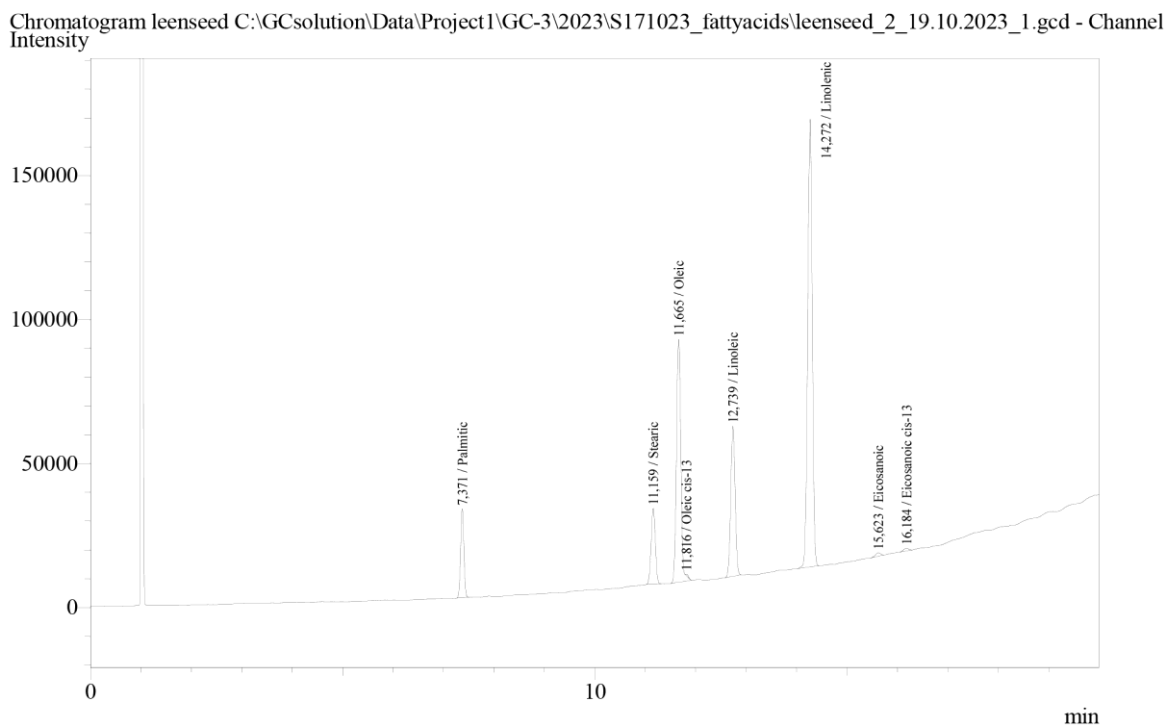


Рис.3.2.1.Хроматограма стандартного зразку олії насіння льону.

Отримано наступний вміст жирних кислот в лляній олії (табл.3.2.1) і далі розраховано вміст кожного компоненту в екстрактах проса.

**Табл. 3.2.1. Сумарний вміст жирних кислот в стандартному зразку олії насіння льону**

Ляна олія		Наважка 103.8 мг	
	Площа піку	% (нормалізація)	
Пальмітинова кислота	139874	6.6	
Стеаринова кислота	153200	7.2	
Олеїнова кислота	517153	24.4	
Лінолева кислота	317196	15.0	
Ліноленова кислота	992494	46.8	
<b>Сума площ кислот</b>	<b>2119917</b>		

Розрахунок вмісту жирної кислоти у кожному екстракті проса розраховано за наступною формулою

$$\text{Вміст, \%} = (S_{\text{fatty acid}} / S_{\text{leenseed sum}}) * (m_{\text{leenseed}} / m_{\text{extract}}) * 100$$

Де :

$S_{\text{fatty acid}}$  – площа відповідної жирної кислоти в екстракті

$S_{\text{leenseed sum}}$  – сума площ жирних кислот в лляній олії

$m_{\text{extract}}$  – наважка досліджуваного екстракту, мг

$m_{\text{leenseed}}$  – наважка стандартного зразку лляної олії

Відносний вміст кожної кислоти від загального вмісту кислот в певному екстракті розраховано за формулою

$$\%(\text{нормалізація}) = S_{\text{fatty acid}} / S_{\text{fatty acid sum}} * 100$$

$S_{\text{fatty acid}}$  – площа відповідної жирної кислоти в екстракті

$S_{\text{fatty acid sum}}$  – сума площ жирних кислот в екстракті

Отримано вміст жирних кислот в екстракті близько 7,6%, а це означає що в борошні небагато тригліцеридів жирних кислот. Цей екстракт також і на вигляд мав найтемніший колір і перебував в твердому стані за кімнатної температури. Див. табл 3.2.2.

Отримано вміст жирних кислот в екстракті крупи проса 105%, а це означає що в екстракті крупи більшість речовини становлять тригліцериди жирних кислот. Цей екстракт також і на вигляд мав світлий колір і перебував в рідкому стані за кімнатної температури. див табл. 3.2.3.

Отримано вміст жирних кислот в екстракті мучки 43,6%, а це означає що в екстракті крупи майже половина речовини становлять тригліцериди жирних кислот. Цей екстракт на вигляд мав темний колір і перебував в рідкому стані з твердою фракцією за кімнатної температури див табл. 3.2.4.

**Табл.3.2.2. Сумарний вміст жирних кислот в зразку екстракту борошна.**

СО <sub>2</sub> -екстракт борошна проса	Наважка 102.3 мг		
	%		
	Area	(нормалізація)	Вміст,%
Пальмітинова кислота	8674	5.5	0.42
Стеаринова кислота	2397	1.5	0.11
Олеїнова кислота	38342	24.3	1.84
Лінолева кислота	108414	68.7	5.19
Ліноленова кислота	0	0.0	0.00
Сума площ кислот	157827	Сумарний вміст кислот	7.55

**Табл.3.2.3. Сумарний вміст жирних кислот в зразку екстракту крупи.**

СО <sub>2</sub> -екстракт крупи проса	Наважка 110,5 мг		
	%		
	Area	(нормалізація)	Вміст,%
Пальмітинова кислота	177156	7.5	7.85
Стеаринова кислота	70562	3.0	3.13
Олеїнова кислота	532646	22.5	23.60
Лінолева кислота	1574379	66.5	69.76
Ліноленова кислота	14271	0.6	0.63
Сума площ кислот	2369014	Сумарний вміст кислот	104.97

**Табл. 3.2.4. Сумарний вміст жирних кислот в зразку екстракту мучки**

CO <sub>2</sub> -екстракт мучки	Наважка 102.4 мг		
	Area	% (нормалізація)	Вміст, %
Пальмітинова кислота	64190	7.0	3.07
Стеаринова кислота	11094	1.2	0.53
Олеїнова кислота	225161	24.7	10.77
Лінолева кислота	606619	66.5	29.01
Ліноленова кислота	5356	0.6	0.26
Сума площ кислот	912420	Сумарний вміст кислот	43.63

**Табл. 3.2.4. Сумарний вміст жирних кислот в зразку екстракту Милосвіт.**

CO <sub>2</sub> -екстракт Милосвіт	Наважка 103.6 мг		
	Area	% (нормалізація)	Вміст, %
Пальмітинова кислота	90641	5.7	4.28
Стеаринова кислота	17764	1.1	0.84
Олеїнова кислота	378460	23.6	17.89
Лінолева кислота	1104068	68.9	52.18
Ліноленова кислота	12022	0.7	0.57
Сума площ кислот	1602955	Сумарний вміст кислот	75.76

Для порівняння з екстрактами отриманими з сировини проса, отриманими в інституті Геохімії, було придбано два екстракти в інтернет магазинах. В екстракті Милосвіт вміст жирних кислот становив близько 76% (табл. 3.2.4.), а в екстракті проса Magical Ariya вміст олії складає близько 73%(табл. 3.2.5.),, що є середнім значенням від вмісту жирних кислот в екстракті мучки і проса.

**Табл. 3.2.5. Сумарний вміст жирних кислот в зразку екстракту Magical Ariya**

Magical Ariya	Наважка 101.5 мг		
	Area	% (нормалізація)	Вміст,%
Пальмітинова кислота	89748	5.9	4.33
Стеаринова кислота	46101	3.0	2.22
Олеїнова кислота	873987	57.4	42.16
Лінолева кислота	467952	30.8	22.57
Ліноленова кислота	43935	2.9	2.12
Сума площ кислот	1521723	Сумарний вміст кислот	73.41

Оскільки вміст олійної фракції в різних екстрактах може істотно відрізнятися в залежності від того яку сировину використали для екстрагування, то цей показник не може бути маркером для перевірки якості екстракта. Але при цьому можна побачити, що вміст олеїнової і лінолевої кислоти в перших чотирьох екстрактах мало відрізняються, тому вміст цих кислот або їх співвідношення може бути маркером для розпізнавання чи є цей екстракт отриманим із проса. Так в табл.3.2.6. можна побачити, що вміст олеїнової кислоти знаходиться в діапазоні 22,5-24,7%, а вміст ліноленової кислоти 66,5-68,9%. При цьому співвідношення цих кислот в перших

чотирьох екстрактах знаходиться в діапазоні 2,69-2,96. На відміну від перших чотирьох екстрактів останній, з назвою Magical Ariya, мав вміст олеїнової кислоти вдвічі вищих ніж ліноленої, тобто їх співвідношення менше одиниці, і становить 0,54.

**Табл. 3.2.6. Співвідношення вмісту олеїнової та ліноленої кислот в екстрактах.**

	екстракт борошна проса	екстракт крупи проса	екстракт мучки	Мило світ	Magical Ariya
Олеїнова кислота	24.3	22.5	24.7	23.6	57.4
Лінолева кислота	68.7	66.5	66.5	68.9	30.8
Співвідношення	2.83	2.96	2.69	2.92	0.54

Згідно Codex Stan 210-1999 було відібрано які олії містять олеїнову кислоту як основний компонент

- арахісова 35-69% олеїнової, ліноленова відсутня
- олія насіння ріпаку з низьким вмістом ерукової кислоти 51-70% олеїнової,  
ліноленої 5-14%
- соняшникова з високим вмістом олеїнової кислоти 70-84 олеїнової кислоти, ліноленова відсутня
- оливкова олія 55-83% олеїнової кислоти

Тобто можна припустити, що екстракт міг бути розбавленим однією з цих олій. Але в цілому співвідношення жирних кислот не може бути кінцевим критерієм відповідно до якого варто приймати рішення про якість продукту, оскільки якісний склад жирних кислот екстрактів не є унікальним і є подібним до інших жирних олій.



### 3.3 Кількісне визначення сквалену

#### 3.3.1. Придатність хроматографічної системи.

Хроматографічну систему вважають придатною, якщо на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи виконуються такі умови:

1. RSD, % площ піків 6-ти послідовних інжекцій стандартного зразку (0,2 мг/мл) не більше 1,0%.

2. RSD, % часів утримування 6-ти послідовних інжекцій стандартного зразку (0,2 мг/мл) не більше 0,5%.

Результати проведених розрахунків відносного стандартного відхилення площ піків та часів утримання 6-ти послідовних інжекцій стандартного зразку з концентрації 0,2 мг/мл наведено в таблиці 3.3.1.1.

**Таблиця 3.3.1.1. Відносне стандартне відхилення (BCB) площ піків та часів утримання**

№	S, mAU*s	RT, хв.
1	1432851	5.55
2	1431813	5.543
BCB,%	0.05	0.09

3. Ефективність піку сквалену на хроматограмі розчину для перевірки придатності не менше 2000 теоретичних тарілок.

Отримано 10271 теоретичних тарілок.

4. Розділення сквалену з альфа-токоферолом ацетат не менше 1.5 на хроматограмі розчину для перевірки придатності. Отримано 7,8.

5. Симетрія піку сквалену на хроматограмі стандартного розчину має бути в межах 0,8-2,0. Отримано 1,24.

Для встановлення залежності площі піку від концентрації приготовано 6 розчинів шляхом розведення з вихідного розчину з концентраціями 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 150% від номінальної концентрації 0,2 мг/мл. проведено в діапазоні 0,08-0,3 мг/мл. Отримано рівняння залежності  $y=6898543,5 \times x + 28500,2$ . Стандартне квадратичне відхилення для вільного члена рівняння становила  $SD(a)=3636,0$ , а стандартне відхилення для коефіцієнта  $b$  (тангенса кута нахилу прямої)  $SD(b)=17876,35$ . Коефіцієнт регресії прямої  $r^2=1,000$ , що відповідає вимогам до коефіцієнту кореляції які становлять не менше 0,998.

Вільний член  $a$  є практично незначущим, оскільки його сигнал становить 2,0% від сигналу стандартного зразку з концентрацією 100% (0,2 мг/мл)

В таблиці 3.3.1.2. наведені дані згідно з яких проведено розрахунки для калібрувальної прямої, а також розраховані концентрації для кожної точки концентрації і розраховано відхилення розрахованої концентрації від теоретичної. Максимальне відхилення становить 0,6%, що свідчить про високу якість виконання калібрувальної кривої.

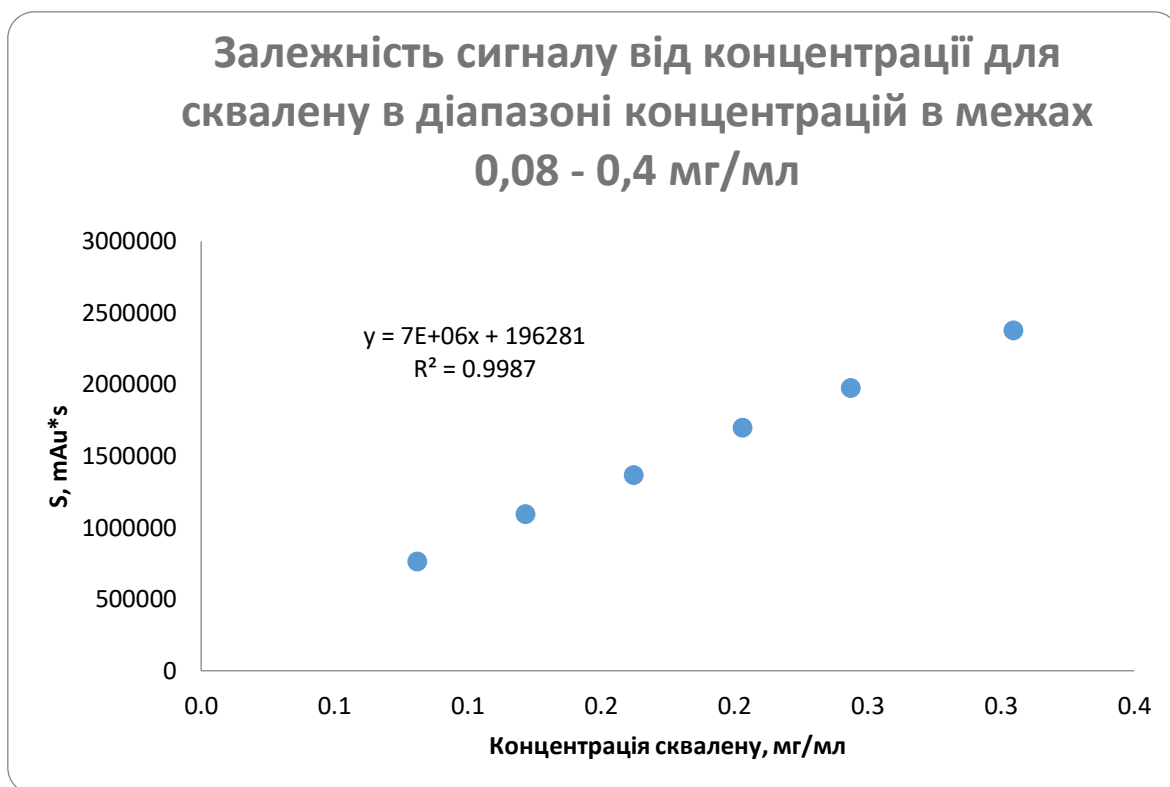


Рис.3.3.1.1. Графічне зображення залежності площі піку сквалену від концентрації

**Табл. 3.3.1.2. Дані калібрувальної кривої і розраховані відхилення концентрації кожної точки від номінальної виражені в процентах.**

Концентрація $S_t$ мкг/мл	Площа піку сквалену S, mAu*s	Концентрація розрахована з рівняння прямої	Відхилення, %
0.081	761426.5	0.081	-0.6
0.122	1089807.0	0.123	0.5
0.163	1365399.0	0.162	0.0
0.203	1694938.0	0.203	0.1
0.244	1972114.0	0.243	-0.2
0.305	2375093.0	0.305	0.0

Перевірку правильності калібрувальної прямої також перевірено по незалежному стандартному зразку з концентрацією 100% від номінальної.

На хроматограмі стандарту від наважки сквалену 101,6 мг отримано площу 1694938, а для стандарту масою 108,7 мг отримано площу 1541278.

Сходимість стандартів за параметром співвідношення сигнал/маса становила 99,4 %, що свідчить про те, що результати калібрування отримані надійні.

### 3.3.2 Визначення сквалену в зразках .

Сквален є речовиною, що ідентифікується в значній кількості в амарантовій і оливковій олії, але практично відсутній в переважній більшості природніх олій, тому є більш унікальним і може бути додатковим маркером якості надкритичних CO<sub>2</sub>-екстрактів. Визначення сквалену проведено методом рідинної хроматографії, на рис.3.3.2.1-3.3.2.6 приведено відповідні хроматограми.

#### <Chromatogram>

mV

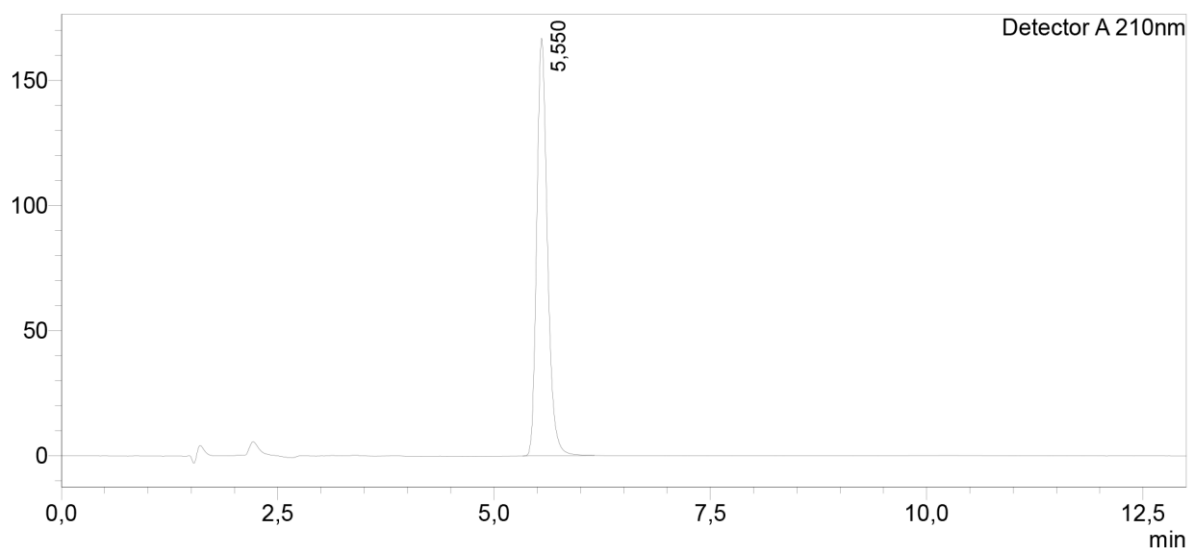


Рис.3.3.2.1. Хроматограма розчину стандарту сквалену з концентрацією 0,2 мг/мл

<Chromatogram>

mV

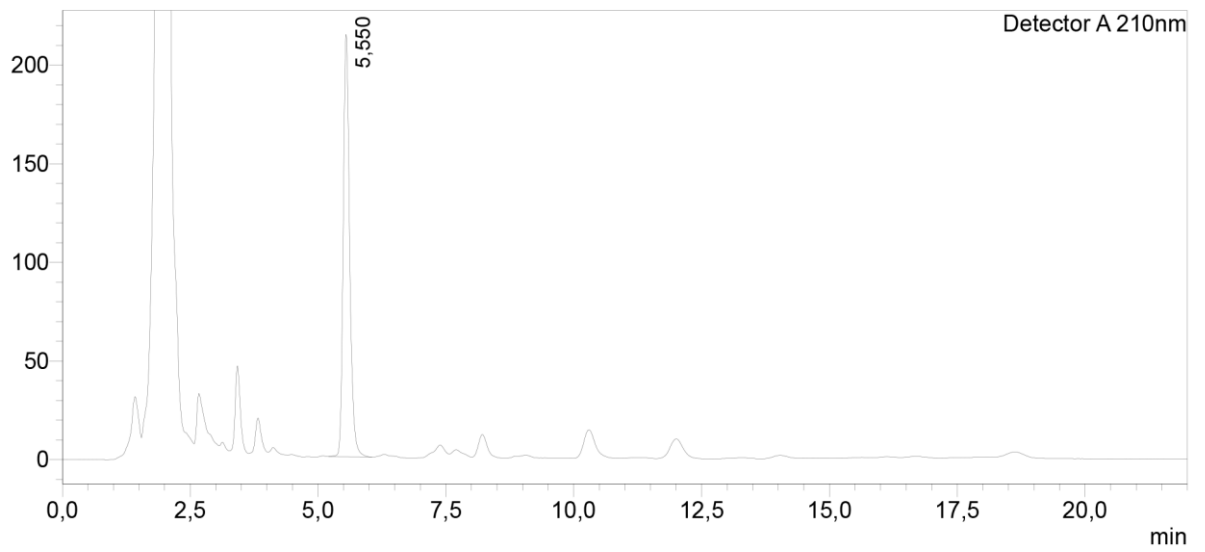


Рис.3.3.2.2 Хроматограма розчину CO<sub>2</sub>-екстракту борошна

<Chromatogram>

mV

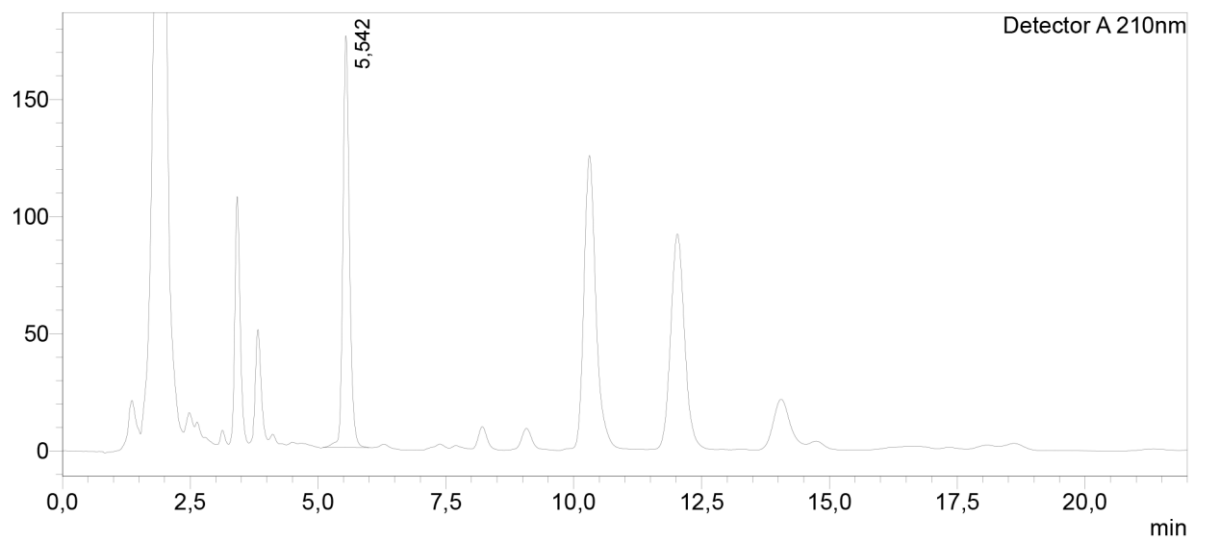


Рис.3.3.2.3. Хроматограма розчину CO<sub>2</sub>-екстракту мучки

<Chromatogram>

mV

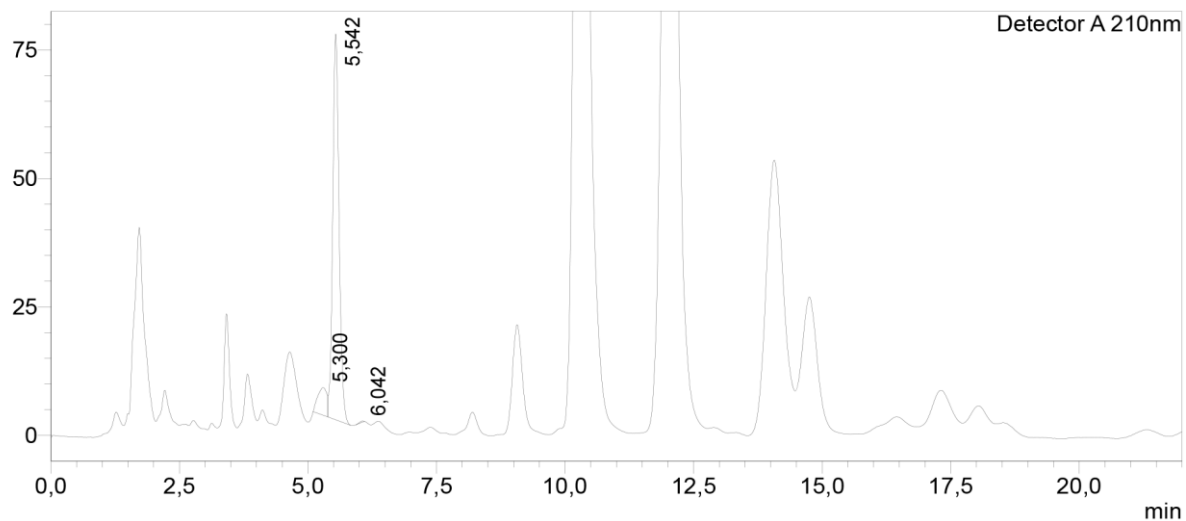


Рис.3.3.2.4. Хроматограма розчину CO<sub>2</sub>-екстракту крупи

<Chromatogram>

mV

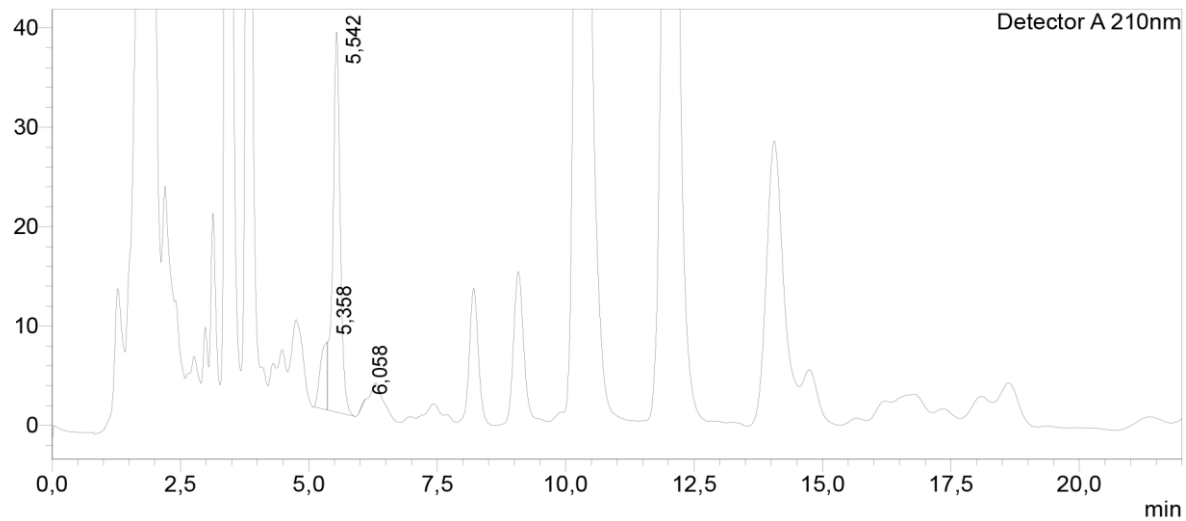


Рис.3.3.2.5. Хроматограма розчину CO<sub>2</sub>-екстракту Милосвіт

### <Chromatogram>

mV

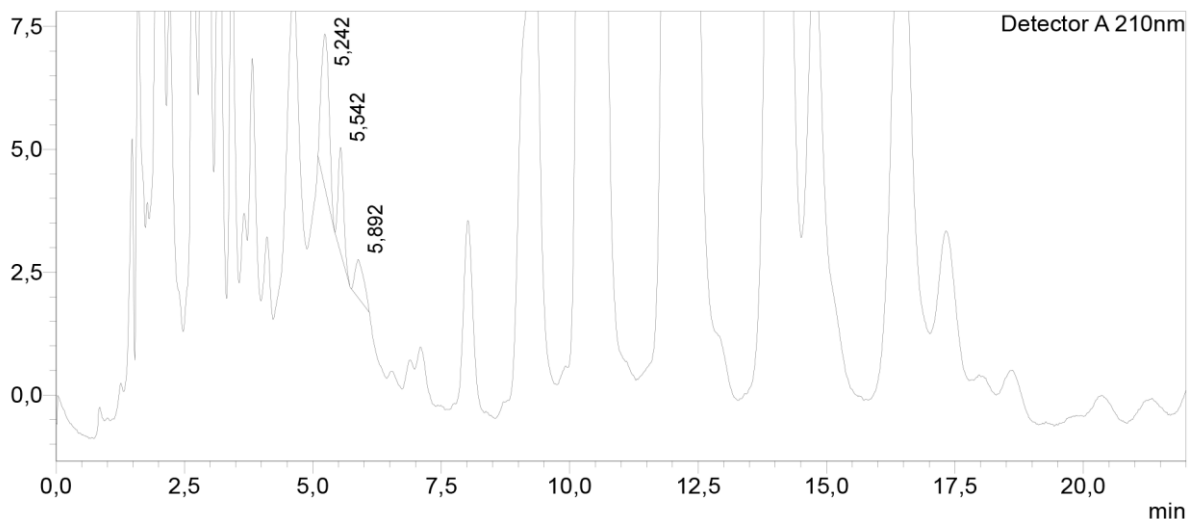


Рис.3.3.2.6. Хроматограма розчину CO<sub>2</sub>-екстракту Magical Ajiya

Визначення сквалену проведено методом рідинної хроматографії і отримано наступні результати, які представлено в табл.3.3.2.1-3.3.2.5

**Табл.3.3.2.1 Кількісний вміст сквалену в екстракті борошна.**

Борошно		
	S,mAu*s	м./м., %
1	1870862	1.04
	1865098	
2	1529951	1.06
	1529348	
3	1718222	1.05
	1716848	
Середнє значення, %		1.05
Невизначеність, %		0.03

**Табл.3.3.2.2 Кількісний вміст сквалену в екстракті мучки.**

Мучка		
	S,mAu*s	м./м., %
1	1560383	1.01
	1547829	
2	1559285	1.02
	1553790	
3	1478874	1.01
	1479203	
Середнє значення, %		1.01
Невизначеність, %		0.013





**Табл. 3.3.2.3 Кількісний вміст сквалену в екстракті крупи**

Крупа		
	S,mAu*s	м./м., %
1	647403	0.46
	643921	
2	664853	0.45
	667265	
3	678586	0.45
	678151	
Середнє значення, %		0.45
Невизначеність, %		0.012

**Табл 3.3.2.4 Кількісний вміст сквалену в екстракті МилоСвіт**

Милосвіт		
	S,mAu*s	м./м., %
1	381618	0.25
2	384339	0.24
Середнє значення, %		0.25

**Табл. 3.3.2.5 Кількісний вміст сквалену в екстракті Magical Ariya**

Magical Ariya		
	S,mAu*s	м./м., %
1	15862	-0.01
2	16395	-0.01
Середнє значення, %		-0.01

Отже, в екстрактах проса має міститися сквален, тому ці результати підтверджують підозру про фальсифікацію екстракту Magical Ariya, в якому сквалену не виявлено.

## ВИСНОВКИ

1. За допомогою бібліотеки спектрів було ідентифіковано наступні речовини: пальмітинову, стеаринову, олеїнову, лінолеву і ліноленову жирні кислоти, а також сквален та германікол/міліацин.
2. Було встановлено, що надкритичні CO<sub>2</sub>-екстракти містять різну кількість олій: екстракт борошна близько 8%, екстракт крупи проса близько 100%, екстракт мучки близько 44%, екстракт Милосвіт близько 76%, а екстракт Magical Ariya близько 73%. Склад жирних кислот натомість є більш стабільним для більшості екстрактів. Так вміст олеїнової кислоти знаходиться в діапазоні 22,5-24,7%, а вміст ліноленової кислоти 66,5-68,9% для всіх екстрактів окрім Magical ariya. При цьому співвідношення лінолевої і олеїнової кислоти знаходиться в діапазоні 2,69-2,96.
3. Визначення сквалену проведено методом рідинної хроматографії і отримано наступні результати: CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт борошна – 1,05%; CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт мучки – 1,01%; CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт крупи – 0,45%; CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт Милосвіт – 0,25%; CO<sub>2</sub>-надкритичний екстракт Magical Ariya – виявлено слідові кількості сквалену.
4. За результатами дослідження виявлено, що міліацин/германікол міститься в усіх екстрактах, окрім Magical Ariya, що остаточно підтверджує низьку якість екстракту Magical Ariya.

Таким чином встановлено, що маркерами для визначення якості екстрактів проса можуть бути жирнокислотний склад екстракту, наявність і вміст сквалену, а також присутність головного маркеру проса – міліацину/германіколу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] <http://www.economy.nayka.com.ua/?op=1&z=3731>
- [2] Das, S.; Khound, R.; Santra, M.; Santra, D.K. Beyond bird feed: Proso millet for human health and environment. *Agriculture* 2019, 9, 64. [CrossRef]
- [3] Gerland, P.; Raftery, A.E.; Ševčíková, H.; Li, N.; Gu, D.; Spoorenberg, T.; Alkema, L.; Fosdick, B.K.; Chunn, J.; Lalic, N. World population stabilization unlikely this century. *Science* 2014, 346, 234–237. [CrossRef] [PubMed]
- [4] Li, X.; Siddique, K.H.M. Future Smart Food- Rediscovering Hidden Treasures of Neglected and Underutilized Species for Zero Hunger in Asia; FAO: Bangkok, Thailand, 2018; pp. 12–194
- [5] <https://agrosep mash.ua/uk/texnologiya-virobnictva-ta-pererobki-prosa/>
- [6] N.U. Sruthi , Pavuluri Srinivasa Rao “Effect of processing on storage stability of millet flour: A review” *Trends in Food Science & Technology* Volume 112, June 2021, Pages 58-74.
- [7] Singh, N.B. and Saini, R.S. (2012), “Products, diversification, marketing and price discovery of pearl millet in India”, Documentation, National Rainfed Area Authority, Todapur Village, Pusa.
- [8] <https://agrosep mash.ua/uk/texnologiya-virobnictva-ta-pererobki-prosa/>
- [9] Jaybhaye, R.V., Pardeshi, I.L., Vengaiah, P.C. and Srivastav, P.P. (2014), “Processing and technology for millet based food products: a review”, *Journal of Ready to Eat Food*, Vol. 1 No. 2, pp. 32-48.
- [10] Ayo, J.A. and Olawale, O. (2003), “Effect of defatted groundnut concentrate on the physico-chemical and sensory quality of fura”, *Nutrition & Food Science*, Vol. 33 No. 4, pp. 173-176

[11] Rai, K.N., Gowda, C.L.L., Reddy, B.V.S. and Sehgal, S. (2008), "Adaptation and potential uses of sorghum and pearl millet in alternative and health

[12] Devisetti, R., Yadahally, S.N. and Bhattacharya, S. (2014), "Nutrients and antinutrients in foxtail and proso millet milled fractions: evaluation of their flour functionality", *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 59 No. 2, pp. 889-895.

[13] Hama, F., Icard-Vernière, C., Guyot, J.P., Picq, C., Diawara, B. and Mouquet-Rivier, C. (2011), "Changes in micro and macronutrient composition of pearl millet and white sorghum during in field versus laboratory decortication", *Journal of Cereal Science*, Vol. 54 No. 3, pp. 425-433.

[14] Singh, P. and Raghuvanshi, R.S. (2012), "Finger millet for food and nutritional security", *African Journal of Food Science*, Vol. 6 No. 4, pp. 77-84

[15] Abdelrahman, A., Hoseney, R.C. and Varriano-Marston, E. (1983), "Milling process to produce low-fat grits from pearl millet", *Cereal Chemistry*, Vol. 60 No. 3, pp. 189-191.

[16] Chowdhury, S. and Punia, D. (1997), "Nutrient and antinutrient composition of pearl millet grains as affected by milling and baking", *Food/Nahrung*, Vol. 41 No. 2, pp. 105-107.

[17] Pushparaj, F.S. and Urooj, A. (2011), "Influence of processing on dietary fibre, tannin and in vitro protein digestibility of pearl millet", *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 2 No. 8, pp. 895-900.

[18] Khetarpaul, N. and Chauhan, B.M. (1990), "Effect of germination and fermentation on available carbohydrate content of pearl millet", *Food Chemistry*, Vol. 38 No. 1, pp. 21-26

[19] Pelembe, L.A.M., Dewar, J., Taylor, J.R.N. and Brew, J.I. (2004), "Effect of germination moisture and time on pearl millet malt quality with respect

to its opaque and lager beer brewing potential”, *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 110 No. 4, pp. 320-325.

[20] Badau, M.H., Nkama, I. and Jideani, I.A. (2005), “Phytic acid content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet as affected by germination time and cultivar”, *Food Chemistry*, Vol. 92 No. 3, pp. 425-435.

[21] Singh, A.K., Rehal, J., Kaur, A. and Jyot, G. (2015), “Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: a review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 55 No. 11, pp. 1575-1589

[22] Mahajan, S. and Chauhan, B.M. (1987), “Phytic acid and extractable phosphorus of pearl millet flour as affected by natural lactic acid fermentation”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 41 No. 4, pp. 381-386.

[23] Khetarpaul, N. and Chauhan, B.M. (1989), “Effect of fermentation on protein, fat, minerals and thiamine content of pearl millet”, *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 39 No. 2, pp. 169-177.

[24] Chavan, U.D., Chavan, J.K. and Kadam, S.S. (1988), “Effect of fermentation on soluble proteins and in vitro protein digestibility of sorghum, green gram and gram blends”, *Journal of Food Science*, Vol. 53 No. 5, pp. 1574-1575.

[25] Osman, M.A. (2011), “Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of lohoh”, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Vol. 10 No. 1, pp. 1-6

[26] Kadlag, R.V., Chavan, J.K. and Kachare, D.P. (1995), “Effects of seed treatments and storage on the changes in lipids of pearl millet meal”, *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, Vol. 47 No. 4, pp. 279-285.

[27] Archana, S.S. and Kawatra, A. (1998), “Reduction of polyphenol and phytic acid content of pearl millet grains by malting and blanching”, *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol. 53 No. 2, pp. 93-98.

[28] Singh, G., Sehgal, S., Kawatra, A. and Preeti (2006), “Mineral profile, anti-nutrients and in vitro digestibility of biscuit prepared from blanched and malted pearl millet flour”, *Nutrition & Food Science*, Vol. 36 No. 4, pp. 231-239.

[29] Naikare, S.M., Chavan, J.K. and Kadam, S.S. (1986), “Depigmentation and utilization of pearl millet in the preparation of cookies and biscuits”, *Journal of Maharashtra Agriculture University*, Vol. 11, pp. 90-93.

[30] Arora, P., Sehgal, S. and Kawatra, A. (2003), “Content and HCl-extractability of minerals as affected by acid treatment of pearl millet”, *Food Chemistry*, Vol. 80 No. 1, pp. 141-144.

[31] Bhati, D., Bhatnagar, V. and Acharya, V. (2016), “Effect of pre-milling processing techniques on pearl millet grains with special reference to in-vitro iron availability”, *Asian Journal of Dairy and Food Research*, Vol. 35 No. 1, pp. 76-80.

[32] Arora, P., Sehgal, S. and Kawatra, A. (2002), “The role of dry heat treatment in improving the shelf life of pearl millet flour”, *Nutrition and Health*, Vol. 16 No. 4, pp. 331-336.

[33] Nithya, K.S., Ramachandramurthy, B. and Krishnamoorthy, V.V. (2007), “Effect of processing methods on nutritional and anti-nutritional qualities of hybrid (COHCU-8) and traditional (CO7) pearl millet varieties of India”, *Journal of Biological Sciences*, Vol. 7 No. 4, pp. 643-647

[34] Yadav, D.N., Balasubramanian, S., Kaur, J., Anand, T. and Singh, A.K. (2011), “Optimization and shelflife evaluation of pearl millet based halwa dry mix”, *Journal of Food Science and Engineering*, Vol. 1, pp. 313-322

[35] C. Devittori, D. Gumy, A. Kusy, L. Colarow, C. Bertoli, P. Lambelet “Supercritical fluid extraction of oil from millet bran” *Journal of the American Oil Chemists' Society* , 01 June 2000.

[36] Brannolte, H-D., H.K. Mangold, and E. Stahl, Effects of Pressure and Temperature of Supercritical Carbon Dioxide on the Extraction of Triacylglycerols from Plant Tissue, *Chem. Phys. Lipids* 33:297–299 (1983).

[37] Wilp, C., and R. Eggers, Hochdruckextraktion mit mehrstufiger fraktionierender Separation zur schonenden Gewinnung von Keimölen mit hochverdicht

[38] Eggers, R., Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Oilseeds/Lipids in Natural Products, in *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, edited by J.W. King and G.R. List, AOCS Press, Champaign, IL, 1996, pp. 35–64

[39] Snyder, J.M., J.P. Friedrich, and D.D. Christianson, Effect of Moisture and Particle Size on the Extractability of Oils from Seeds with Supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:1851–1856 (1984).

[40] Eggers, R., U. Sievers, and W. Stein, High Pressure Extraction of Oil Seed, *Ibid.* 62:1222–1230 (1985).

[41] Serna-Saldivar, S., and L.W. Rooney, Structure and Chemistry of Sorghum and Millets, in *Sorghum and Millets. Chemistry and Technology*, edited by D.A.V. Dendy, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, 1995, pp. 69–124

[42] List, G.R., J.P. Friedrich, and D.D. Christianson, Properties and Processing of Corn Oils Obtained by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:1849–1851 (1984)

[43] Wilp, C., and R. Eggers, Hochdruckextraktion mit mehrstufiger fraktionierender Separation zur schonenden Gewinnung von Keimölen mit hochverdichtetem Kohlendioxid, *Fat Sci. Technol.* 93:348–354 (1991)

[44] List, G.R., and J.P. Friedrich, Oxidative Stability of Seed Oils Extracted with Supercritical Carbon Dioxide, *Ibid.* 66:98–101 (1989).

[45] Calvo, L., M.J. Cocero, and J.M. Diez, Oxidative Stability of Sunflower Oil Extracted with Supercritical Carbon Dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:1251–1254 (1994).

[46] Dr. Jana Kalinova, Jan Tríska , Karel Hořejší “Comparison of the Main Constituents in Two Varieties of Proso Millet Using GC–MS” Special Issue "Cereal and Pseudocereal Grains for Nutrition and Health", Published: 7 June 2023.

[47] Kim, Y.B.; Kim, J.K.; Uddin, M.R.; Park, C.H.; Kim, H.H.; Chung, E.; Lee, J.H.; Park, S.U. Carotenoid contents in different millets cultivars collected from China and Korea. *Asian J. Chem.* 2014, 26, 464. [CrossRef]

[48] List, G.R., J.P. Friedrich, and D.D. Christianson, Properties and Processing of Corn Oils Obtained by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:1849–1851 (1984)

[49] H. P. Extraction and purification of squalene from amaranthus grain / H. P. He, Y. Cai, M. Sun, H. Gorke // *J. Agric. Food Chem.*, 2002. – V.50. – P. 368 – 37

[50] Calvo, L., M.J. Cocero, and J.M. Diez, Oxidative Stability of Sunflower Oil Extracted with Supercritical Carbon Dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:1251–1254 (1994).

[51] Kalinova, J.; Triska, J.; Vrchotova, N. Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Aric. Food Chem.* 2006, 54, 5330–5335. [CrossRef]



## SUMMARY

**Khromova Nataliia**

### ESTABLISHMENT OF QUALITY MARKERS FOR SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> MILET EXTRACTS

**Department of Medicinal Chemistry and Toxicology**

**Scientific supervisor:** Syrotchuk Oleksandr

**Keywords:** Millet co<sub>2</sub>-extraction, squalene, miliacin, fatty acids

**Introduction.** Millet extracts find wide applications in the pharmaceutical industry, perfumery, and cosmetics. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction offers the ability to extract fatty compounds, improving the flour properties for long-term storage. It also enables the extraction of valuable substances from millet processing waste practically at room temperature, preserving all valuable components such as lipids, triglycerides of fatty acids, squalene, miliacin. This work is focuses on developing criteria for assessing the quality of CO<sub>2</sub> supercritical fluid extracts from millet obtained from different raw materials.

**Materials and methods.** 1) millet flour CO<sub>2</sub> extract , 2) millet groats CO<sub>2</sub> extract 3) millet bran CO<sub>2</sub> extract. The commercially available extracts are: 4) CO<sub>2</sub> extract from Milosvit millet 5) CO<sub>2</sub> extract Magical Ariya. GC-MS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) equipped with a DB-WAX column (30m × 0.32mm × 0.25µm). GC-FID (GC-2010AF Plus) employing an HP-INNOWAX column (30m × 0.53mm × 1µm). HPLC-UV (Shimadzu LC-30) equipped with a Symmetry C18 column (150×4.6 3.5 µm).

**Results.** The following substances were identified using a spectral library: palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic fatty acids, as well as squalene and germanicol/miliacin. The methodology of the European Pharmacopoeia 2.4.22 "Composition of fatty acids by gas chromatography" was used to determine the fatty acid composition. It was found that supercritical CO<sub>2</sub> extracts contain varying amounts of oil: flour extract about 8%, groats extract about 100%, bran extract about 44%, Milosvit extract about 76%, and Magical Ariya extract about 73%. This implies that the absolute oil content in millet extracts may vary depending on the raw material used for its extraction and cannot be a quality marker for this product. On the other hand, **the fatty acid composition** is more stable for most extracts. The oleic acid content ranges from 22.5% to 24.7%, and the linolenic acid

content ranges from 66.5% to 68.9% for all extracts except Magical Ariya. The ratio of linoleic to oleic acid is in the range of 2.69-2.96. Magical Ariya extract had twice as much oleic acid as linolenic acid, with a ratio of 0.54. Therefore, the content of oleic and linolenic acid, as well as their ratio, can be quality markers for supercritical CO<sub>2</sub> extracts. From these considerations, the Magical Ariya extract is suspected of adulteration, but this parameter alone cannot establish this, as oleic and linoleic acid are not unique substances and are present in other natural oils.

**Squalene** determination was conducted using liquid chromatography, and the following results were obtained: CO<sub>2</sub>-supercritical flour extract – 1.05%, CO<sub>2</sub>-supercritical bran extract – 1.01%, CO<sub>2</sub>-supercritical groats extract – 0.45%, CO<sub>2</sub>-supercritical Milosvit extract – 0.25%, CO<sub>2</sub>-supercritical Magical Ariya extract – traces of squalene. Thus, squalene should be present in millet extracts, confirming the previous suspicion of adulteration of the Magical Ariya extract.

**Miliacin** is considered a marker for the presence of millet in human culture, and its residues are used to determine whether millet was part of the diet in ancient times. The research results revealed that miliacin/germanicol is present in all extracts except Magical Ariya, definitively confirming the low quality of the Magical Ariya extract.

**Conclusions** The results indicate that millet extracts obtained through supercritical CO<sub>2</sub> extraction may contain varying amounts of active substances. It has been demonstrated that the content of triglycerides of fatty acids can vary from 8% to almost 100%. However, the fatty acid composition of these oils remains constant among extracts, serving as one of the indicators to distinguish millet extracts from other lipid-containing extracts. The squalene content in millet extracts also indicates the quality of the extract, ranging from 0.25% to 1.05%. Its absence in the composition of the extract raises suspicions regarding the authenticity of the product. A characteristic substance for millet extracts is miliacin/germanicol, which definitively indicates whether the extract is adulterated or diluted. Thus, it is established that markers for determining the quality of millet extracts include the fatty acid composition of the extract, the presence and content of squalene, as well as the presence of the main millet marker – miliacin/germanicol.