

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ВЭЙДА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФИТИНА В ЭНДОСПЕРМЕ ОРЕХА

О. А. Землянухина¹, В. Н. Вепринцев², В. Н. Калаев¹, Ф. Р. Х. Аль-Хачами¹,
Е. А. Калаева¹, В. А. Славский³

¹ ФБГОУ ВО "Воронежский государственный университет»

² Федеральное агентство лесного хозяйства, ФБУ "Российский центр защиты леса",
Центр защиты леса Воронежской области

³ ФБГОУ ВО "Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова"

Поступила в редакцию 02.04.2018 г.

Аннотация. В регуляции метаболической активности процесса прорастания семян значительная роль принадлежит фитину (мио-инозитол-1, 2, 3, 4, 5, 6-гексаксидигидрофосфорной кислоте). Фитин является основным фосфорсодержащим компонентом растительной клетки и играет роль резервного энергетического субстрата в период прорастания семян, интенсивного роста и накопления биомассы растения. Фитин содержится в семенах злаковых, картофеля, подсолнечнике, бобовых и других культурах, в продуктах питания, не подвергшихся обработке, входит в состав клеточных мембран. Фитиновая кислота представляет интерес как компонент новых лекарственных средств, поскольку проявляет свойства регулятора метаболических процессов, в том числе нормализует кальций-фосфорный и другие виды ионного обмена, а также является экзогенным антиоксидантом. Для количественного определения содержания фитиновой кислоты и ее производных в биологическом материале применяют титриметрические, колориметрические, хроматографические методы. Спектрофотометрический метод Вэйда применяется для определения небольших количеств фитина в семенах, тогда как в пищевой промышленности используется метод жидкостной хроматографии. Целью работы явилось усовершенствование метода спектрофотометрического определения содержания фитина в семенах орехов за счет включения стадии очистки биологического материала от белков и липидов, а также оптимизации условий колориметрического анализа проб. Описанным способом определено содержание фитина в плодах 4 видов орехов (орех черный - 15.05±0.98 мг/г с.м.; орех серый - 14.75±0.32 мг/г с.м.; орех маньчжурский - 16.13±0.23 мг/г с.м.; орех сердцевидный - 17.45±0.24 мг/г с.м.). Модификация метода позволила получить для анализа более качественные образцы, очищенные от белковых и липидных примесей. За счет измерения интенсивности светопоглощения при 337 нм удалось добиться стабильности анализируемых оптических характеристик во времени, увеличить сходимость результатов отдельных измерений. Чувствительность метода при этом осталась достаточно высокой, так как возможно определять низкие (от 80 мкг/100 г с.м.) концентрации фитина. Предложенные дополнения позволили повысить качество анализа при сохранении чувствительности и могут применяться в лабораторной практике.

Ключевые слова: фитин, орех, спектрофотометрический анализ, концентрация.

В регуляции метаболической активности процесса прорастания семян значительная роль принадлежит фитину (мио-инозитол-1, 2, 3, 4, 5, 6-гексаксидигидрофосфорная кислота), являющемуся основным фосфорсодержащим компонентом клеток растений: до 60 - 90 % общего фосфора [1] присутствует в клетке в виде смеси кальциевых и магниевых солей инозитфосфорных кислот.

Фитиновая кислота $C_6H_{18}O_{24}P_6$ (рис. 1) имеет молекулярную массу 660.04 г/моль.

Сходными характеристиками обладают инозит и инозитол, которые объединяют с фитином под названием витамина B_8 и относят к группе витаминов В.

Фитин содержится в семенах злаковых, картофеля, подсолнечнике, бобовых и других культурах [2, 3], а также в продуктах питания, не подвергшихся обработке [4], входит в состав клеточных мембран. Считается, что содержание фитина в орехах наиболее высоко по сравнению с другими растениями: злаковыми, бобовыми и др. [5]. Содержание фитиновой кислоты в плодах даже од-

ного вида ореха может значительно колебаться. Например, для ореха грецкого содержание фитина (в г на 100 г сухого материала) изменяется в пределах 0.20 - 6.69; ореха бразильского – 0.29 - 0.34; ореха кешью – 0.19 - 4.98; ореха пекан – 0.18 - 4.52 [6].

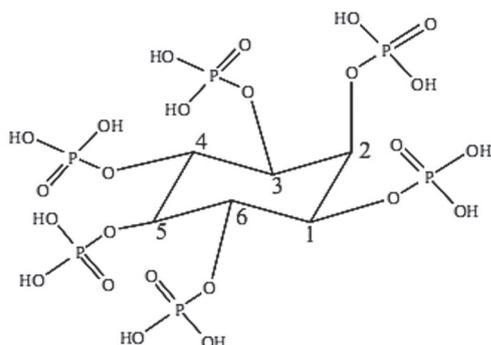


Рис. 1. Структурная формула фитиновой кислоты

При прорастании семян под действием фермента 6-фитазы (КФ 3.1.3.26) происходит гидролиз фитина с дефосфорилированием, что способствует интенсивному росту растения и накоплению биомассы [7, 8]. Чем больше содержание фитина в сухих семенах, тем выше энергия их прорастания.

Концентрация фитина в семенах имеет большое значение при определении гетерозиготности гибридов растений и, соответственно, их селекционной ценности [9]: продуктивности, «плюсовости», высоты прямого участка ствола, бессучковой зоны, определенного типа кроны, урожайности [10].

Фитиновая кислота представляет интерес как компонент новых лекарственных средств, поскольку проявляет свойства регулятора метаболических процессов, в том числе нормализует кальций-фосфорный и другие виды ионного обмена, а также является экзогенным антиоксидантом [11; 12]. Доказаны антиоксидантная и противоопухолевая активность фитиновой кислоты в экспериментах на животных при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, молочной и предстательной желез [13], ингибирование перекисного окисления липидов при поражении клеток кишечника и печени и регулирование действия ксантиноксидазы [14].

Основной проблемой выделения фитина из биоматериала является его плохая растворимость как в полярных (этиловом спирте), так и в неполярных (серном эфире) растворителях и в воде. Методы выделения и очистки фитина представ-

ляют собой многостадийные процессы, в ходе которых экстракцию исследуемого вещества из растительного сырья проводят минеральными кислотами, ультрафильтрацией на анизотропных мембранах, осаждением гидроксидами металлов [15, 16]. Так, из рисовых отходов в производстве получают соли фитиновой кислоты путем их обработки 1 % раствором азотной кислоты, затем проводят осаждение 10 % известковым молоком с последующей фильтрацией на прессе. Полученный технический фитин перекристаллизовывают 10 % азотной кислотой, осаждают и высушивают [15]. Еще одним методом выделения и очистки фитина является экстракция азотной кислотой с последующим осаждением раствором аммиака [17]. Однако эти процедуры приводят к большим потерям целевого продукта и загрязнению исследуемых образцов различными примесями. Балластные вещества мешают точному количественному определению фитина. Кроме того, существует необходимость проводить все работы на холоде для исключения активирования фитазы [16].

Для количественного определения содержания фитиновой кислоты и ее производных в биологическом материале применяют титрометрические [18], колориметрические [4], хроматографические [6] методы. На протяжении нескольких десятилетий титрометрический метод был наиболее распространенным, активно разрабатывался и совершенствовался; позже были разработаны спектральные методы анализа.

Спектрофотометрическое определение содержания фитиновой кислоты в образцах основано на ее способности конкурентно связывать ионы металлов в составе окрашенных комплексов, вследствие чего интенсивность поглощения комплексов в определенном диапазоне длин волн ослабевает. Таким образом, по снижению оптической плотности образца можно определить наличие и установить количественное содержание фитиновой кислоты. Существует множество цветных реакций на фитиновую кислоту, одна из них основана на применении железосульфосалицилатного комплекса, или реактива Вэйда (Wade's reagent) [19]. Именно этот метод применяется в настоящее время для определения небольших количеств фитина в семенах, тогда как в пищевой промышленности используется метод жидкостной хроматографии.

Реактив Вэйда представляет собой раствор 0.324 г сульфосалициловой кислоты в 100 мл воды, смешанный с 0.0324 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, растворенного в 100 мл воды. Метод определения кон-

центрации фитина с реактивом Вэйда имеет ряд недостатков: низкую сходимост (значительный разброс) результатов измерения, вследствие чего возникает необходимость увеличения числа повторностей до 12 и более; нестойкость окраски анализируемой смеси во времени (не более 1-2 минут) и ее зависимость от рН среды (поэтому измерения проводят при разных длинах волн (416, 510 или 580 нм)); влияние посторонних примесей на результаты анализа.

В связи с изложенным выше целью настоящей работы явилось усовершенствование метода спектрофотометрического определения содержания фитина в образцах семян орехов за счет включения стадии очистки биологического материала от белков и липидов, а также оптимизации условий колориметрического анализа проб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили плоды четырех видов орехов, произрастающих на территории ботанического сада им. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета: 1) орех черный *Juglans nigra L.*; 2) орех серый *Juglans cinerea L.*; 3) орех маньчжурский *Juglans mandshurica Maxim.*; 4) орех сердцевидный *Juglans cordiformis Maxim.*

Орехи урожая 2016 г. хранили в холодильнике при 0°C. Перед анализом скорлупу удаляли, для определения содержания фитина использовали эндосперм орехов.

Для предварительной подготовки материала использовали метод удаления белковой и липидной фракций, сходный с таковым, применяемым при выделении ДНК из растительных тканей.

Навеску растительного материала (200 - 300 мг) растирали в 2 мл 0.5 моль/л раствора HCl (раствор № 1) с битым стеклом. К 1.5 мл гомогената добавляли 0.5 мл раствора изоамилового спирта с хлороформом (1 : 24, v : v) (раствор № 2), переносили в эппендорфы. Смесь встряхивали в течение 1 мин, затем центрифугировали в течение 3 мин при 20000 g на микроцентрифуге CM50 ELMi (Латвия). Полученные в результате предварительной очистки образцы были абсолютно прозрачны, что позволило повысить качество получаемых результатов.

К 1 мл надосадочной жидкости добавляли 1.5 мл индикативного кислого раствора роданида аммония NH₄SCN (0.03 %) в 6 % HCl (раствор № 3), затем вносили 50 мкл кислого конкурентного раствора хлорида железа FeCl₃ (III) (раствор № 4). Раствор хлорида железа готовили из соли FeCl₃,

высушенной в эксикаторе с концентрированной серной кислотой. Раствор содержал 0.860 % ± 0.002 % FeCl₃ и 0.2 % HCl. В качестве контроля использовали смесь растворов № 3 и № 4 в тех же пропорциях, что и для опытных образцов, заменяя объем опытной пробы равным объемом воды. Зная соотношение взаимодействующих компонентов реакции (4 Fe : 1 фитинат), можно определить концентрацию фитиновой кислоты по концентрации остаточного железа в растворе.

Для выявления оптимальной длины волны для количественного определения концентрации фитина в биологическом материале проводили регистрацию электронных спектров поглощения образцов тиоцианата в смеси растворов № 3 и № 4 на нанофотометре IMPLIN P 330 (Германия). Образцы экстрактов фитина колориметрировали при длине волны 337 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм.

Все работы проводили при комнатной температуре.

Содержание фитина в анализируемых образцах рассчитывали по калибровочному графику, используя в качестве стандарта водный раствор натриевой соли фитиновой кислоты («Sigma-Aldrich», США).

Дополнительное снижение погрешности измерения и повышение сходимости результатов достигалось использованием свежих реактивов одной партии класса не ниже ЧДА.

Измерения осуществляли в четырех биологических повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ "Stadia". Процедура группировки данных и их обработка изложены в нашей работе [20]. Влияние фактора "видовая принадлежность" на содержание фитина в эндосперме орехов определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Силу влияния фактора вычисляли по Снедекору (%). Парные сравнения проводили с использованием критерия Шеффе. Вычисляли коэффициент вариации (Cv) согласно рекомендациям Лакина [21]. Низким считали Cv, значение которого не превышало 10%, средним – 10 - 25 %, высоким – более 25 %. Сравнение дисперсий осуществляли с использованием F-критерия Фишера.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На электронных спектрах поглощения раствора тиоцианата были обнаружены максимумы при 240 и 337 нм (рис. 2).

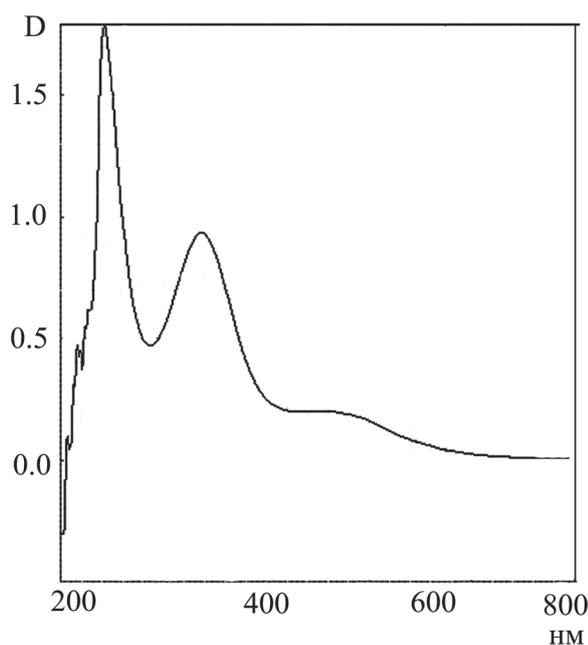


Рис. 2. Электронный спектр поглощения раствора тиоцианата

Таким образом, при определении содержания фитина в исследуемых образцах в качестве аналитических можно использовать длины волн 240 и 337 нм. Измерения при 240 нм представлялись более предпочтительными, т.к. интенсивность данного пика заметно выше, что позволило бы повысить чувствительность анализа. Однако при длине волны $\lambda=337$ нм стабильность значений оптической плотности анализируемых растворов сохранялась, по крайней мере, в течение 10 минут, тогда как при длине волны 240 нм они были стабильны лишь в течение 1 - 2 мин [22]. Кроме того, вклад в формирование полосы поглощения при 240 нм могут вносить не удаленные в ходе предварительной очистки белковые, нуклеотидные и липидные примеси. Поглощение при 337 нм представляется более специфичным для тиоцианата, поэтому предпочтение было отдано измерениям при данной длине волны.

Было установлено, что линейная зависимость оптической плотности от концентрации наблюдалась в диапазоне 0.08 - 4.00 мг фитината/г сухого вещества. При концентрациях фитината более 4.00 и менее 0.08 мг/г были выявлены отклонения от линейной зависимости.

Необходимо отметить, что примеси двух- и трехвалентных катионов металлов могут вносить погрешность в результаты измерений в связи с большим их сродством к фитиновой кислоте, чем у катиона железа (III). В связи с этим необходимо

следить за чистотой используемых реактивов (использовать реактивы класса ЧДА), посуды и воды.

Результаты определения содержания фитина в эндосперме четырех видов орехов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Содержание фитина в эндосперме четырех видов орехов

Образец	Содержание фитина, мг/г с.м.	Cv, %
Орех серый (<i>Juglans cinerea</i> L.)	14.75±0.32	4.3
Орех черный (<i>Juglans nigra</i> L.)	15.05±0.98	11.9
Орех маньчжурский (<i>Juglans mandshurica</i> Maxim.)	16.13±0.23	2.8
Орех сердцевидный (<i>Juglans cordiformis</i> Maxim.)	17.45±0.24*	2.8

Примечание:* - различия с орехом серым достоверны (P<0.05)

Показано, что фактор "видовая принадлежность" оказывал небольшое (сила влияния - 5.9 %), но статистически достоверное (P<0.05) воздействие на содержание фитина в плодах 4 изученных нами видов ореха. Максимальное содержание фитина отмечено в эндосперме ореха сердцевидного (17.45±0.24 мг/г с.м. (различия с орехом серым достоверны (P<0.05))). Среди исследованных видов орех сердцевидный характеризуется максимальной скоростью роста на начальных этапах онтогенеза [23]. Было установлено, что наименьшее количество фитина содержали плоды ореха серого (14.75±0.32 мг/г с.м.), у ореха черного и ореха маньчжурского содержание фитина было несколько выше (15.05±0.98 мг/г с.м. и 16.13±0.23 мг/г с.м., соответственно). Содержание фитина слабо варьировало в эндосперме орехов 3 видов (Cv ниже 5.0 %), лишь у ореха черного варьирование этого показателя можно было оценить как среднее (11.9 %) (различия достоверны (P<0.05)). Таким образом, содержание фитина в плодах у различных видов орехов характеризовалось незначительной вариабельностью, что указывало на стабильность исследуемого признака у потомства указанных растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты противоречат данным литературы [6] о значительных колебаниях содержания соединений фитина в орехах даже в пределах одного вида. Возможно, что именно предлагаемая модификация метода определения концентрации фитина позволила добиться сниже-

ния дисперсии исследуемого признака и повышения сходимости результатов исследования.

Таким образом, модификация метода спектрофотометрического определения содержания фитина с реактивом Вэйда позволила получить для анализа более качественные образцы, очищенные от белковых и липидных примесей. За счет измерения интенсивности светопоглощения образцов при 337 нм удалось добиться стабильности анализируемых оптических характеристик во времени, увеличить сходимость результатов отдельных измерений. Чувствительность метода при этом осталась достаточно высокой, так как возможно определять низкие (от 80 мкг/100 г с.м.) концентрации фитина. Таким образом, предложенные нами модификации метода Вэйда повысили качество анализа при сохранении чувствительности и могут применяться в лабораторной практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Stefano C., Giuffre O., Milea D., Sammartano S. // J. Chemical Speciation and Bioavailability. 2003. Vol. 15 (2). pp. 29–36.
2. Вепринцев В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко Н.А., Жужжалова Т.П. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. 2012. Вып. 14. С. 43–47.
3. Хотылева Л.В., Титок В.В. // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 3. С. 92–96.
4. Xu P., Price J., Agget P.J. // Prog. Food Nutr. Sci. 1992. Vol. 16. pp. 245–262.
5. Food Phytates / Ed. N.R. Reddy, S.K. Sathe. London, New York, Washington, 2001. 43 p.
6. Benešová K., Běláková S., Mikulíková R., Svoboda Z. // Kvasny Prum. 2013. Vol. 59. № 5. pp. 127–133.
7. Loewus F.A., Murthy P.N. // Plant Sci. 2000. Vol. 150. № 1. pp. 1–19.
8. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. Москва, Фирма «Слово», 2006. 556 с.
9. Титок В.В. // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2003. Т. 47. № 4. С. 84–89.
10. Царев А.П., Погиба С.П., Тренин В.В. Селекция и репродукция лесных древесных пород / Под ред. А.П. Царева. Москва, Логос, 2003. 520 с.
11. Hawkins Ph.T., Poyner D.R., Jackson T.R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R. F. // J. Biochem. 1993. Vol. 294. pp. 929–934.
12. Lee K.-M., Kang H.-S., Yun C.-H., Kwak H.-S. // Biomol. Ther. (Seoul). 2012. Vol. 20 (5). pp. 492–498.
13. Shamsuddin A.M. // Intern. J. of Food Sci. and Technol. 2002. Vol. 37 (7). pp. 769–782.
14. Muraoka S., Miura T. // Life Sci. 2004. Vol. 74. pp. 1691–1700.
15. Бабаходжаева С.А., Ризаев Н.У., Хаги М.С., Сабиров К.А., Мирзакаримов Р.М. Патент СССР, № 245998, 1969.
16. Анчиков Э.В. // Сельскохозяйственная биология. 2008. Вып. 4. С. 3–14.
17. Колзунова Л.Г., Земнухова Л.А., Сергиенко В.И. Патент РФ, N 2171808, 2000.
18. Garcia-Villanova R., Garcia-Villanova R.J., Ruiz de Lope C. // Analyst. 1982. Vol. 107. pp. 1503–1506.
19. Latta M., Eskin M. // J. Agric. Food Chem. 1980. Vol. 28. pp. 1313–1315.
20. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2016. 284 с.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва, Высшая школа, 1990. 352 с.
22. Романов Н.А., Варчук С.С., Мирось В.В., Федотов И.Г. Патент СССР, № 1432399, 1988.
23. Славский В.А., Николаев Е.А., Калаев В.Н. Интродукция, селекция и культивирование орехов рода в Центральном Черноземье / Под редакцией В.Н. Попова, А.И. Сиволапова. Воронеж, Роза ветров, 2013. 262 с.

*Воронежский государственный университет
Землянухина О. А., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Тел.: +7 905 050-95-02
E-mail: oz54@mail.ru*

*Калаев В. Н., докт. биол. наук, профессор кафедры генетики, цитологии и биоинженерии
Тел.: +7 473 220-88-76
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru*

*Voronezh State University
Zemlyanukhina O. A., PhD (biology), Leading Research Scientist
Ph.: +7 905 050-95-02
E-mail: oz54@mail.ru*

*Kalaev V. N., PhD., DSci., professor of the Genetic, Cytology and Bioengineering department,
Ph.: +7 473 220-88-76
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru*

Землянухина О. А., Вепринцев В. Н., Калаев В. Н., Аль-Хачами Ф. Р. Х., Калаева Е. А., Славский В. А.

Аль-Хачами Ф. Р. Х., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии
Тел.: +7 473 220-88-76

Al-Khachami F. R. H., post-graduate student of the Genetic, Cytology and Bioengineering department,
Ph.: +7 473 220-88-76

Калаева Е. А., кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии
Тел.: +7 473 220-85-86
E-mail: kalaevae@gmail.com

Kalaeva E. A., PhD(biology), assistant professor, Biophysics and Biotechnology department
Ph.: +7 473 220-85-86
E-mail: kalaevae@gmail.com

ФБУ "Российский центр защиты леса"
Вепринцев В. Н., инженер
Тел.: +7 920 467-78-27
E-mail: veprintsev-vn@yandex.ru

FBU "Russian Forest Protection Center"
Veprintsev V. N., engineer
Ph.: +7 920 467-78-27
E-mail: veprintsev-vn@yandex.ru

Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова
Славский В. А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесоводства, лесной таксации и лесоустройства
E-mail: slavskiyva@yandex.ru

Voronezh State Forestry University named by G.F. Morozov
Slavsky V. A., PhD (agriculture), assistant professor, Department of Forestry, Forest Inventory and Forest Management
E-mail: slavskiyva@yandex.ru

MODIFICATION OF WAID METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHYTIN CONTENT IN NUT ENDOSPERME

O. A. Zemlyanukhina¹, V. N. Veprintsev², V. N. Kalaev¹, F. R. H. Al-Hachami¹, E. A. Kalaeva¹, V. A. Slavskiy³

¹ Voronezh State University

² Federal Forestry Agency, FBU "Russian Forest Protection Center",
Forest Protection Center of the Voronezh Region

³ Voronezh State Forestry University named by G.F. Morozov

Abstract. In the regulation of the metabolic activity of the seed germination process, significant role belongs to phytin (myo-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexadihydrophosphoric acid). Phytin is the main phosphorus-containing component of the plant cell and plays the role of reserve energy substrate during the germination of seeds, intensive growth and the accumulation of plant biomass. Phytin is found in seeds of cereals, potatoes, sunflower, legumes and other crops, in foods not treated, is part of the cell membranes. Phytic acid is of interest as a component of new drugs, because it exhibits the properties of a regulator of metabolic processes, including normalizes calcium-phosphorus and other types of ion exchange, and is also an exogenous antioxidant. To quantify the content of phytic acid and its derivatives in biological material, titrimetric, colorimetric, chromatographic methods are used. Wade's spectrophotometric method is used to determine small amounts of phytin in seeds, while in the food industry the liquid chromatography method is used. The aim of the work was the improvement of the method of spectrophotometric determination of the content of phytin in the seeds of nuts by including the stage of purification of biological material from proteins and lipids, as well as optimization of the conditions for colorimetric analysis of samples. The described method was used to determine the content of phytin in the 4 species of nuts (*Juglans nigra* - 15.05±0.98 mg/g dried mass, *Juglans cinerea* L. - 14.75±0.32 mg/g dried mass, *Juglans mandshurica* Maxim. - 16.13±0.23 mg/g dried mass, *Juglans cordiformis* Maxim.- 17.45±0.24 mg/g dried mass). The modification of the method allowed obtaining more qualitative samples for the analysis, purified from protein and lipid impurities. By measuring the intensity of light absorption at 337 nm, it was possible to achieve stability of the analyzed optical characteristics in time, to increase the convergence of the results of individual measurements. The

sensitivity of the method remained high enough, it was possible to determine low concentrations (from 80 mg/100 g dried mass) of phytin. The proposed additions have allowed improving the quality of the analysis while maintaining sensitivity and can be used in laboratory practice.

Keywords: phytin, nut, spectrophotometric analysis, concentration.

REFERENCES

- De Stefano C., Giuffre O., Milea D., Sammartano S., J. Chemical Speciation and Bioavailability, 2002, Vol. 15 (2), pp. 29–36. DOI: 10.3184/095422903782775235. Available at: https://www.researchgate.net/publication/233666480_Speciation_of_phytate_ion_in_aqueous_solution_Non_covalent_interactions_with_biogenic_polyamines (accessed 28.09.2018).
- Veprintsev V.N., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko I.Yu., Karpechenko N.A., Zhuzhzhlova T.P., Organization and regulation of physiological and biochemical processes, 2012, No. 14, pp. 43–47.
- Khotyleva L.V., Titok V.V., Plant Physiology, 1994, Vol. 41, № 3, pp. 92–96.
- Xu P., Price J., Agget P.J., Prog. Food Nutr. Sci., 1992, Vol. 16, pp. 245–262. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438809> (accessed 25.09.2018).
- Food Phytates / Ed. N.R. Reddy, S.K. Sathe. London, New York, Washington, 2001, 43 p.
- Benešová K., Běláková S., Mikulíková R., Svoboda Z., Kvasny Prum, 2013, Vol. 59, № 2. pp. 127–133. Available at: <http://kvasnyprumysl.org/en/journal/2013/5/> (accessed 21.09.2018).
- Loewus F.A., Murthy P.N. // Plant Sci. 2000. Vol. 150. № 1. pp. 1–19. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.7150&rep=rep1&type=pdf> (accessed 29.09.2018).
- Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. Okislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty. Moscow, «Slovo» Publ., 2006, 556 p.
- Titok V.V., Reports of the National Academy of Sciences of Belarus, 2003, Vol. 47, № 4, pp. 84–89.
- Tsarev A.P., Pogiba S.P., Trenin V.V. Seleksiya i reproduktsiya lesnykh drevesnykh porod / Ed. A.P. Tsarev. Moscow, Logos Publ., 2003, 520 p.
- Hawkins Ph.T., Poyner D.R., Jackson T.R., Letcher A.J., Lander D.A., Irvine R. F., Biochem. J., 1993, Vol. 294, pp. 929–934. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/2382/51adbc986c614bf67b20bea11791f0b74f3.pdf> (accessed 30.09.2018).
- Lee K.-M., Kang H.-S., Yun C.-H., Kwak H.-S., Biomol. Ther. (Seoul), 2012, Vol. 20 (5), pp. 492–498. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.5.492. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3762280/> (accessed 26.09.2018).
- Shamsuddin A.M., Intern. J. of Food Sci. and Technol., 2002, Vol. 37 (7), pp. 769–782. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x> (accessed 23.09.2018).
- Muraoka S., Miura T., Life Sci., 2004, Vol. 74, pp. 1691–1700. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.040. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503010592?via%3Dihub> (accessed 22.09.2018).
- Babakhodzaeva S.A., Rizaev N.U., Khagi M.S., Sabirov K.A., Mirzakarimov R.M. Patent USSR, no 245998, 1969.
- Anchikov E.V., Agricultural Biology, 2008, Vol. 4, pp. 3–14.
- Kolzunova L.G., Zemnukhova L.A., Sergienko V.I. Patent RF, no 2171808, 2000.
- Garcia-Villanova R., Garcia-Villanova R.J., Ruiz de Lope C., Analyst., 1982, Vol. 107, pp. 1503–1506. Available at: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1982/an/an9820701503#!divAbstract> (accessed 30.09.2018).
- Latta M., Eskin M., J. Agric. Food Chem., 1980, Vol. 28, pp. 1313–1315. DOI: 10.1021/jf60232a049. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60232a049> (accessed 27.09.2018).
- Kalaeva E.A., Artyukhov V.G., Kalaev V.N. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye matematicheskoi statistiki v biologicheskikh issledovaniyakh i obrazovanii. Voronezh, Izdatel'skii dom VGU, 2016, 284 p.
- Lakin G.F. Biometriya. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990, 352 p.
- Romanov N.A., Varchuk S.S., Miros' V.V., Fedotov I.G. Patent USSR, no 1432399, 1988.
- Slavskii V.A., Nikolaev E.A., Kalaev V.N. Introduktsiya, selektsiya i kul'tivirovaniye orekhov roda Juglans v Tsentral'nom Chernozem'e / Eds. V.N. Popov, A.I. Sivolapov. Voronezh, Roza vetrov Publ., 2013, 262 p.