



УДК 543.544.5.068.7

ВЭЖХ анализ лигнансодержащих экстрактов из семян льна масличного

Стасевич О.В., Михаленок С.Г.

Белорусский государственный технологический университет, Минск

Курченко В.П.

Белорусский государственный университет, Минск

Аннотация

В настоящей работе изучены некоторые способы экстракции лигнана секоизоларицезинола диглюкозида (СДГ) из семян льна масличного. Определены оптимальные условия проведения ВЭЖХ анализа полученных лигнансодержащих композиций. Выявлен наиболее эффективный способ экстракционного выделения СДГ, позволяющий получить экстракт с наибольшим содержанием целевого лигнана и с наименьшим содержанием примесей, что значительно упрощает задачу дальнейшей препаративной очистки СДГ.

Ключевые слова: ВЭЖХ, льняное семя, секоизоларицезинола диглюкозид, экстракт, лигнансодержащие композиции, оптимальные условия.

Several methods of extraction of lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG) from flaxseed have been studied in this work. The optimal conditions of HPLC analysis of lignan-containing compositions have been defined. The efficient extraction method with the maximal content of the target lignan and the minimal content of impurities have been found out. Due to these advantages this method simplifies the problem of further preparative purification of SDG.

Key words: HPLC, flaxseed, secoisolariciresinol diglucoside, extract, lignan-containing compositions, optimal conditions

Введение

Лигнаны являются одним из компонентов семян льна масличного (*Linum usitatissimum*) [1]. Эти соединения относятся к классу природных фенолов, что обуславливает их высокую антиоксидантную активность. Лигнаны также обладают антивирусным и бактерицидным действием. Именно благодаря совокупности этих свойств и в связи с выявленной способностью ингибировать ряд ферментов они проявляют себя как противоопухолевое средство, которое может применяться при профилактике и лечении онкологических заболеваний [2]. Все эти свойства делают актуальным выделение этих веществ, как в чистом виде, так и в виде обогащенных лигнанами композиций.

Наиболее простым способом получения биологически активных соединений из растительного материала является экстракционный. Так как основным лигнаном в семенах льна является секоизоларицезинола диглюкозид (СДГ) (его удельное

содержание составляет более 2%), то основным компонентом экстрактов из льняного семени является именно он [1]. Наряду с СДГ также экстрагируются другие вещества схожие по физико-химическим характеристикам: *n*-кумаровая, феруловая, синаповая, кофеиновая кислоты и их глюкозиды [3]. Другие минорные лигнаны (матаирезинол, изоларицирезинол, пинорезинол, ларицирезинол) экстрагируются в незначительных количествах.

Цель работы – выявление наиболее эффективного экстракционного способа получения СДГ из семян льна, а также разработка оптимальных условий проведения ВЭЖХ анализа полученных лигнансодержащих композиций.

Эксперимент

В качестве объектов исследования использовали предварительно измельченные и обезжиренные гексаном семена льна масличного сорта «Gold Flax». Экстракцию проводили тремя способами:

Способ 1: к 4 г анализируемого образца добавляли 80 мл 50%-ного водного этанола. Полученную суспензию обрабатывали микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин троекратно с перерывом в 1 мин, затем к экстракционной системе добавляли еще 3,2 мл 4 М водного раствора NaOH. Данную суспензию окончательно обрабатывали микроволновым излучением в режиме, описанном выше.

Способ 2: к порции обезжиренного льняного семени (4 г) добавляли 83,2 мл 0,3 М водного раствора NaOH и полученную суспензию обрабатывали микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин.

Способ 3: к образцу льняного семени, массой 4 г, добавляли 80 мл 50%-ного водного этанола и 3,2 мл 4 М водного раствора NaOH, суспензию подвергали обработке микроволновым излучением мощностью 150 Вт в течение 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин.

При центрифугировании обработанных суспензий получали супернатанты, которые подкислялись и концентрировались на роторном испарителе при пониженном давлении.

Количественное определение СДГ в экстракте и анализ состава экстрактов осуществляли методом ВЭЖХ при помощи хроматомасс-спектрометра «Waters Micromass ZQ 2000» с использованием колонки BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм, детекцию осуществляли диодно-матричным детектором при длине волны 280 нм и масс-детектором с электроспреей ионизацией (ESI). Объем пробы составлял 20 мкл. Смесь растворителей нужного состава готовили смешением по объему и пропускали через фильтр с порами диаметром 0,5 мкм, а затем дегазировали под вакуумом. Элюирование проводили в линейном градиенте при использовании системы состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1%-ным содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) (А : Б: 0-5 мин – 30 : 70, 20-30 мин – 70 : 30 и 50-65 мин – 100 : 0) и из ацетонитрила (раствор А) и 5%-ного раствора ацетонитрила в ацетатном буфере (раствор Б') (А : Б': 0 мин – 0 : 100, 30 мин – 30 : 70, 32 мин - 70 : 30) со скоростью потока 0,7 мл/мин [1, 4].

Раствор Б (0,1%-ный водный раствор муравьиной кислоты) готовили следующим образом: к 500 мл дистиллированной воды добавляли 0,5 мл концентрированной муравьиной кислоты.

Раствор Б' (5%-ный раствор ацетонитрила в ацетатном буфере) готовили следующим образом: 1,925 г $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ растворяли в 200 мл дистиллированной воды, доводили до $\text{pH} = 3$ уксусной кислотой, добавляли 25 мл ацетонитрила и доводили объем смеси дистиллированной водой до 500 мл.

Для количественного определения СДГ использовали калибровочный график (уравнение прямой: $y=213213x-156,39$; величина достоверности аппроксимации: $R^2=1$), построенный по стандартным растворам коммерческого препарата СДГ, любезно предоставленного доктором биологических наук В.В. Титком (ИГиЦ НАН Беларуси).

Обсуждение результатов

Для экстракционного выделения СДГ из семян льна были предложено три способа. При выборе условий экстракций исходили из критериев эффективности и экологической безопасности. Применение системы диоксан-этанол [1] и метанол-вода [5] позволяет получить в экстракте удовлетворительное содержание СДГ, но из-за высокой токсичности диоксана и метанола эти методы не достаточно безопасны для реализации, а также для дальнейшего использования полученных экстрактов в лечебных целях. Поэтому при выборе экстрагента предпочли наиболее экологически безопасные растворители – этанол и воду. Необходимо отметить, что для экстракционного выделения СДГ обязательно проведение стадии гидролиза, т. к. выделяемый лигнан находится в связанном олигомерном состоянии вместе с гидроксиметилглутаровой кислотой в льняном семени [1, 5]. Для высвобождения СДГ из связанного состояния применяли самый эффективный вид гидролиза – щелочной. Для повышения эффективности экстракционного выделения целевого лигнана использовали энергию кратковременного микроволнового воздействия, это дало возможность значительно сократить время на проведение процесса получения лигнансодержащих композиций и сохранить удовлетворительный выход СДГ.

Для проведения ВЭЖХ анализа лигнансодержащих экстрактов было апробировано разделение проб с помощью двух систем, в качестве подвижной фазы. При проведении элюирования системой состоящей из ацетонитрила (раствор А) и 5%-ного раствора ацетонитрила в ацетатном буфере (раствор Б') при скорости подвижной фазы 0,7 мл/мин наблюдалось нечеткое разделение компонентов смеси, а также были получены искаженные данные о количественном содержании этих компонентов из-за сильного отклонения нулевой линии и образования ложных пиков (рис. 1).

Секоизоларицирезинола диглюкозид в экстракте, идентифицировали с помощью метода ВЭЖХ по веществу со временем удержания 17,23 мин (рис. 1), которое совпадало со временем удержания коммерческого препарата СДГ при проведении элюирования системой А : Б'. Максимум поглощения для этого вещества в УФ спектре, приходится на 228,60 нм и 280,45 нм, что обуславливается наличием в его структуре гидрокси- и метоксизамещенного бензольного кольца. [4-6].

При элюировании системой состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1%-ным содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) со скоростью потока 0,7 мл/мин этих недостатков удалось избежать (рис. 2). При проведении ВЭЖХ анализа во втором режиме время удержания интересующего нас компонента немного уменьшилось, а разделение составляющих в экстракта было наиболее приемлемым.

В результате проведения экстракции водным этанолом с последующим гидролизом по первому способу, был получен экстракт с удовлетворительным содержанием СДГ. В нем можно выделить 10 основных компонентов и множество минорных (рис. 2).

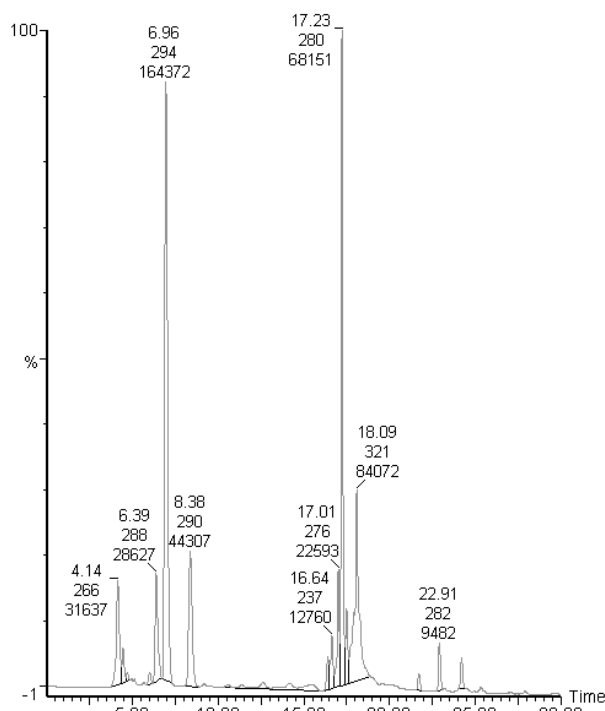


Рис. 1. Хроматограмма экстракта, полученного по 1-му способу. Элюирующая система (А : Б'). СДГ – вещество со временем удержания 17,23 мин

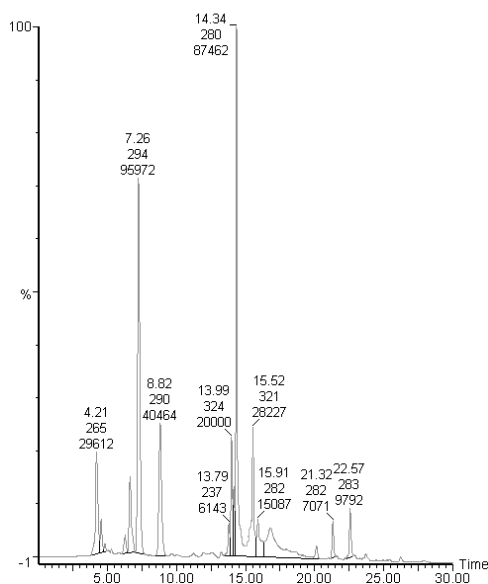


Рис. 2. Рис. 1. Хроматограмма экстракта, полученного по 1-му способу. Элюирующая система (А : Б). СДГ – вещество со временем удержания 14,34 мин

При проведении экстракции по второму способу (в случае экстракции водной щелочью) получен экстракт с наименьшим содержанием СДГ (табл. 1). Хроматограмма этого экстракта (рис. 3) состоит из 9 основных пиков и из множества маленьких пиков. Более того, данный экстракт отличался гелеобразной структурой

из-за наличия перешедшего в раствор соединения (последний пик (рис. 3)), что значительно затрудняет процесс внесения пробы в случае проведения дальнейшего препаративного хроматографического разделения полученного экстракта.

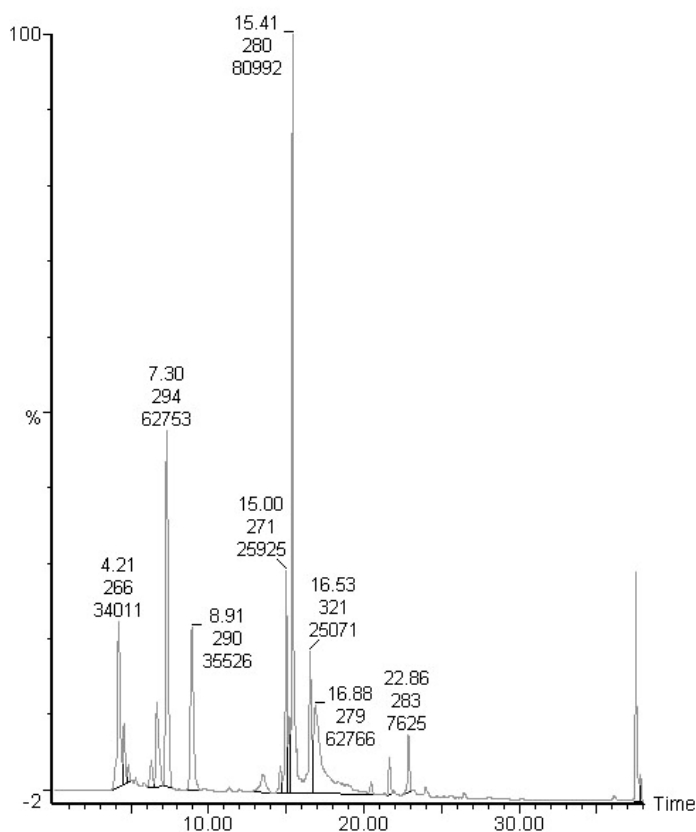


Рис. 3. Хроматограмма экстракта, полученного по 2-му способу. Элюирующая система (А : Б). СДГ – вещество со временем удержания 15,41 мин

По данным ВЭЖХ анализа в экстракте, полученном по третьему способу (рис. 4), наблюдалось наличие 7-ми основных компонентов и небольшое количество минорных составляющих. Более того, этим способом достигалось наибольшее содержание СДГ (табл. 1).

Результаты количественного определения СДГ в экстрактах методом ВЭЖХ, полученных по разным способам, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние различных условий проведения экстракции на содержание СДГ в лигнансодержащих композициях

Способ экстракции	Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г
1	9,7
2	7,9
3	14,2

Полученные результаты можно объяснить тем, что выход СДГ при проведении экстракции, сопровождаемой микроволновым облучением, в большей степени зависит от концентрации этанола в воде. Этанол, как и вода хорошие экстрагенты для СДГ, тогда как вода является еще и отличным абсорбером микроволновой энергии. Более того, совместное проведение процесса экстракции и

гидролиза обеспечивает наибольшую степень извлечения СДГ из растительного сырья.

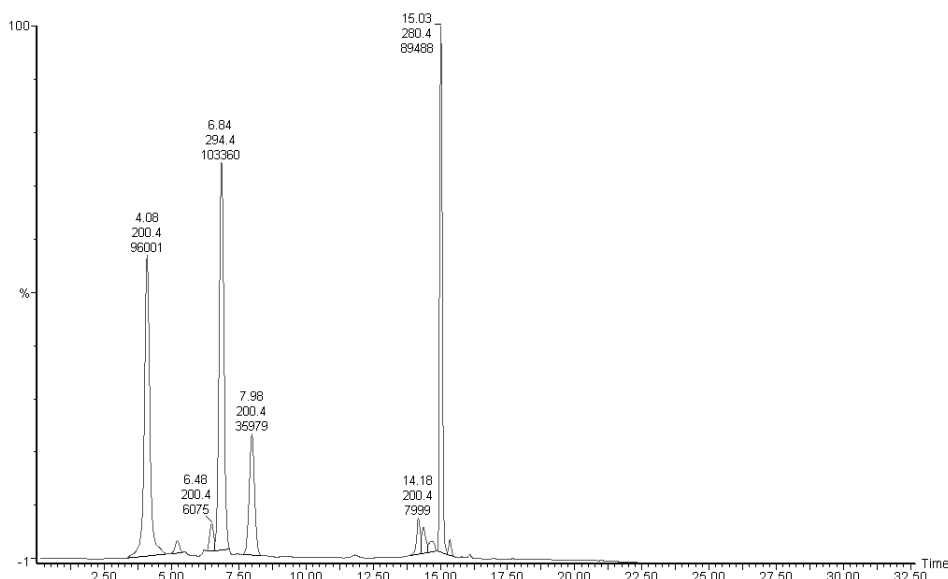


Рис. 4. Хроматограмма экстракта, полученного по 3-му способу. Элюирующая система (А : Б). СДГ – вещество со временем удержания 15,03 мин.

Благодаря подобранным оптимальным условиям проведения ВЭЖХ анализа лигнансодержащих экстрактов, можно сделать вывод, что третий экстракционный способ выделения СДГ из семян льна является наиболее эффективным. По этому методу достигается наибольшее содержание данного лигнана в экстракте (14,2 мг/г) с наименьшим содержанием других примесей, что значительно упрощает задачу дальнейшей препаративной очистки СДГ.

Список литературы

1. Johnsson P., Kamal-Eldin A., Lundgren L.N., Aman P. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000. Vol. 48. P. 5216–5219.
2. Westcott D.N., Muir A.D. Flax seed lignan in disease prevention and health promotion // Phytochemistry Reviews. 2003. Vol. 2. P. 401–417.
3. Liggins J., Grimwood R., Bingham S.A. Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples // Analytical Biochemistry. 2000 Vol. 287. P. 102–109.
4. Degenhardt A., Habben S., Winterhalter P. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography // Journal of Chromatography A. 2002. Vol. 943. P. 299–302.
5. Fritsche J., Angoelal R., Dachtler M. On-line liquid-chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry coupling for the separation and characterization of secoisolariciresinol diglucoside isomers in flaxseed // Journal of Chromatography A. 2002. Vol. 972. P. 195–203.
6. Coran S.A., Giannellini V., Bambagiotti-Alberti M. High-performance thin-layer chromatographic-densitometric determination of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed // Journal of Chromatography A. 2004. Vol. 1045. P. 217–222.

Стасевич Ольга Викторовна – аспирант кафедры органической химии Белорусского государственного технологического университета, Минск

Михаленок Сергей Георгиевич – к.х.н., доцент кафедры органической химии Белорусского государственного технологического университета, Минск, тел. +375(17)227-63-54

Курченко Владимир Петрович – к.б.н., зав. лабораторией прикладных проблем биохимии Белорусского государственного технологического университета, Минск, тел. +375(17)209-58-52

Stasevich Olga V. – postgraduate student of Department of Organic chemistry, Belarusian State Technological University, Minsk, e-mail: ostas83@mail.ru

Mikhalyonok Sergei G. – Ph. D. in organic chemistry, the lecturer of Department of Organic chemistry, Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus.

Kurchenko Vladimir P. – Ph. D. in biochemistry, the head of Laboratory of Applied Problems of Biochemistry, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus.