

УДК 661.123

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА ДИГЛЮКОЗИДА ИЗ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко*, И.М. Жарский

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

** Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Введение

Новые биологически активные вещества, получаемые из растительного сырья, привлекают все большее внимание исследователей. Лигнаны являются примером таких соединений. Они обладают широким спектром биологической активности: являются мощными антиоксидантами, подавляют рост раковых клеток, проявляют бактерицидное и антивирусное действие [1]. Семена льна масличного являются наиболее богатым источником лигнанов. В них содержатся различные лигнановые компоненты: матаирезинол, изоларицирезинол, пинорезинол, ларицирезинол, секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ). Лигнан (+)-[2*R*,2'*R*]-бис[(4-гидрокси-3-метоксифенил)-метил]-1,4-бутандиил-бис(β-глюкопиранозид) или секоизоларицирезинола диглюкозид обнаруживается в семенах льна в наибольшем количестве по сравнению с другими минорными лигнанами [2]. В семенах некоторых сортов льна масличного удельное содержание СДГ составляет 1-2%, тогда как в семенах сои и зерновых культур его уровень не превышает 0,002% и 0,001%, соответственно [3].

Лигнан СДГ обладает уникальным набором биологических свойств. Большой интерес представляет собой мощный антиоксидантный потенциал данного соединения, превышающий потенциал таких традиционных антирадикальных средств как витамин Е в 5 раз. [4]. Более того, СДГ является фитоэстрогеном, т. е. при попадании в организм может связываться с эндогенными рецепторами млекопитающих. Совокупность вышеуказанных свойств обуславливает ингибирующее действие этого соединения на рост и образование злокачественных клеток [1].

Выделение лигнана СДГ из семян льна масличного в чистом виде дает возможность использовать эту субстанцию для создания лекарственного препарата или биологически активной добавки, обладающих антиоксидантными и противоопухолевыми свойствами.

Наиболее эффективным методом выделения СДГ из льняного семени является экстракционный способ, заключающийся в его переводе из растительного материала в раствор соответствующим растворителем. Так как лигнан СДГ присутствует в льняном семени в виде мономера биополимера, то для его высвобождения из связанного состояния необходимо прибегнуть к гидролизу. Полученный экстракт, содержит в себе кроме целевого вещества смесь других соединений, схожих по физико-химическим характеристикам (минорные лигнаны, *n*-кумаровая кислота, феруловая кислота, синаповая кислота, кофеиновая кислота и их глюкозиды), которые переходят в раствор применяемым растворителем. Для выделения интересующего лигнана в чистом виде обычно прибегают к разделению смеси с помощью препаративной хроматографии [3, 5-6].

Цель работы являлась разработка эффективного экологически безопасного способа выделения и очистки секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного.

Методы исследования

Получение лигнансодержащего экстракта. В качестве материала для выделения СДГ использовали семена льна масличного сорта Gold Flax. Льняное семя массой 16 г измельчали в электрической кофемолке, просеивали через сито с диаметром пор 1 мм и обезжиривали гексаном в течение 4 часов в аппарате Сокслета. Полученную массу разделяли на три равные части по 4 г каждая, которые использовались для разработки трех методов получения СДГ-содержащего экстракта.

К первой порции 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. Полученную суспензию окончательно обрабатывали микроволновым излучением в режиме, описанном выше.

Ко второй порции обезжиренных семян льна 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.

К третьей порции обезжиренного льняного семени 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.

Центрифугированием экстрагируемых суспензий получали супернатанты, которые подкисляли до pH=3-4 6 М раствором HCl и упаривали на роторном испарителе при пониженном давлении при температуре не превышающей 45°C.

Хроматографическое разделение экстракта. Перед разделением с помощью колоночной хроматографии пробу центрифугировали. Растворители перед элюированием дегазировали. Сорбент перед набивкой колонки дегазировали при пониженном давлении без нагревания. Определение оптической плотности растворов при 280 нм полученных фракций осуществляли на спектрофотометре СФ-26.

Разделение лигнансодержащего экстракта на ионообменном сорбенте Diaion HP-20. Экстракт – 15 г растворяли в 125 мл воды и вносили на колонку с ионообменником Diaion HP-20 (46×2,5 см). После промывания 300 мл воды элюирование проводили ступенчатым градиентом водного этанола (10%, 15%, 20%, 40%) при скорости потока 5 мл/мин. Фракции собирали по 10 мл.

Секоизоларицирезинола диглюкозид элюированный 40% этанолом, собирали, концентрировали и подвергали рехроматографии. Повторное разделение осуществляли на колонке 40×1,15 см, заполненной тем же ионообменным сорбентом с использованием аналогичного ступенчатого градиента.

При промывании колонки 20% этанолом элюировались наиболее чистые фракции, содержащие СДГ, которые собирали, концентрировали и подвергали дальнейшей очистке на обращенно-фазном силикагеле C₁₈.

Очистка на обращенно-фазном силикагеле C₁₈. В качестве элюирующей системы при окончательной очистке на обращенно-фазном силикагеле C₁₈ (колонка 45×2 см) использовали также возрастающий ступенчатый градиент водного этанола (10% – 50 мл, 25% – 75 мл, 50% – 25 мл). Масса вносимого образца, растворенного в 4 мл воды, составляла 0,8 г. СДГ-содержащие фракции с чистотой 95% элюировались 25% этанолом.

Качественный анализ состава фракций, полученных после проведения колоночных хроматографий осуществляли методом ТСХ на пластинах «Kieselgel 60 F254» (Merck, США). В качестве подвижной фазы использовали систему вода : пропанол-2 : водный аммиак (1:8:1). При использовании этой подвижной фазы наблюдалось четкое разделение компонентов системы, а также при УФ-облучении фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флюоресценцию пятна, принадлежащего именно СДГ, что дало возможность четко идентифицировать данный лигнан в полученной смеси.

Количественное определение СДГ в экстракте и анализ состава СДГ-содержащих фракций осуществляли методом ВЭЖХ при помощи хроматомасс-спектрометра «Waters Micromass ZQ 2000» (Waters, США) 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. Элюирование проводили в линейном градиенте при использовании системы состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1%-м содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) (А : Б: 0-5 мин – 30 : 70, 20-30 мин – 70 : 30 и 50-65 мин – 100 : 0) со скоростью потока 0,7 мл/мин [7].

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 (Fluka, Германия).

Для подтверждения структуры очищенного препарата СДГ был записан спектр ЯМР ^1H на спектрометре BRUKER AVANCE (400 МГц). Растворитель – D_2O , внутренний эталон – ацетонитрил (CH_3CN $\delta=2.06$ м.д.). Использованные в работе химические реактивы имели квалификацию «ч», «чда», «хч».

Результаты и их обсуждение

Общая схема выделения СДГ из семян льна масличного включает в себя следующие стадии: измельчение семян, их просеивание, обезжиривание, экстракция и гидролиз обезжиренной массы, нейтрализация и концентрирование полученного экстракта и разделение его с помощью препаративной хроматографии [3, 5-6].

Наиболее важными стадиями являются гидролиз и экстракция, так как именно они определяют выход экстрактивных веществ, в которые входит СДГ. Проведение стадии гидролиза необходимо и обязательно, т. к. секоизолярицирезинола диглюкозид находится в связанном олигомерном состоянии вместе с гидроксиметилглутаровой кислотой в льняном семени. Для высвобождения СДГ из связанного состояния применяют различные методы гидролиза: кислотный, ферментативный и щелочной. Самым эффективным способом проведения стадии гидролиза является щелочной [3, 5-6, 8-10].

Применение системы диоксан-этанол [3] и метанол-вода [8] ацетон-вода [11] позволяет получить в экстракте удовлетворительное содержание СДГ, но из-за высокой токсичности диоксана, метанола и ацетона эти методы не достаточно безопасны для реализации. Поэтому при выборе экстрагента предпочли наиболее экологически безопасный растворитель водный этанол, кроме того, водно-спиртовая система дает возможность избавиться уже на стадии экстракции от нежелательных цианогенных гликозидов, присутствующих в льняном семени [9].

Способ экстракции, в котором в качестве экстрагента используется водная щелочь, позволяет получать фракции с высоким содержанием СДГ [10]. Недостатки этого способа – большие затраты времени и большой избыток растворителя по отношению к сырью, что также увеличивает продолжительность и энергоемкость процесса на стадии концентрировании экстракта [10].

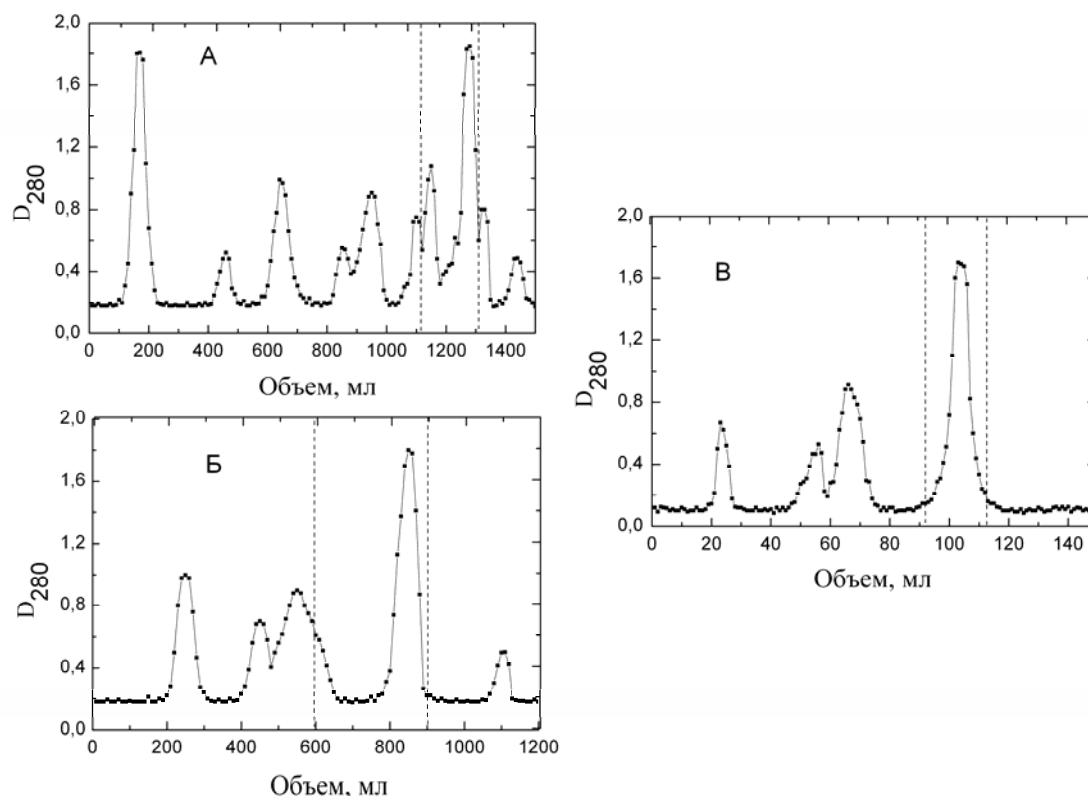
Особый интерес, с точки зрения решения проблемы повышения эффективности экстракции биологически активных веществ из растительного сырья, представляют методы с использованием микроволнового излучения [12]. Использование микроволновой энергии дает возможность сократить расход экстрагента, а также продолжительность процесса за счет быстрого нагрева, разрыхления межмолекулярных связей полимеров и соответственно большей доступностью компонентов экстрагируемого материала растворителю [13]. Несмотря на то, что СДГ достаточно термостабилен при кратковременном воздействии температуры, его выход значительно снижается при продолжительном времени проведения микроволнового воздействия, из-за процессов каталитической деструкции, имеющих место в растительном материале [12], поэтому наиболее оптимальным способом микроволновой обработки является способ кратковременного микроволнового воздействия [13].

Ранее было показано, что необходимое соотношение растительного сырья и экстрагента для эффективной экстракции СДГ в раствор составляет 1:20 [14].

В соответствии с вышеприведенным анализом методов выделения СДГ нами было предложено и апробировано 3 способа получения СДГ-содержащего экстракта (табл.). В результате проведения эксперимента, было установлено, что выход экстракта с наибольшим содержанием в нем СДГ достигается при совмещении процессов гидролиза и экстракции водно-этанольной смесью, т. е. по второму способу (табл.). При проведении экстракции водным этанолом с последующим гидролизом по первому способу, также получен экстракт с

Таблица – Влияние условий экстракции, гидролиза и микроволнового воздействия на содержание СДГ в экстрактах из семян льна масличного

Метод экстракции	Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл	Условия проведения процесса				Выход экстрактивных веществ на обезжиренное сырье, %	Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г
		Экстракция		Гидролиз			
		Время проведения опыта, мощность микроволнового излучения	Экстрагирующий агент	Гидролизующий агент	Время проведения опыта, мощность микроволнового излучения		
1	1 : 20	2 мин трехкратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	50%-ный водный этанол	Водный NaOH, pH = 10	2 мин трехкратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	20,6	9,7
Экстракция совместно с гидролизом							
2	1 : 20	Водный NaOH, 50% водный этанол, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				23,2	14,2
3	1 : 20	Водный NaOH, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				18,8	7,9

Рисунок 1 – Профили элюции разделения лигнансодержащего экстракта на сорбенте Diaion HP-20 (а,б) и силикагеле С₁₈ (в).

Пунктирными линиями обозначены зоны, соответствующие СДГ-содержащим фракциям

Чистота СДГ-содержащих фракций определялась методом ВЭЖХ.

Окончательная очистка на обращенно-фазном силикагеле позволила получить СДГ с чистотой 95% (рис.2).

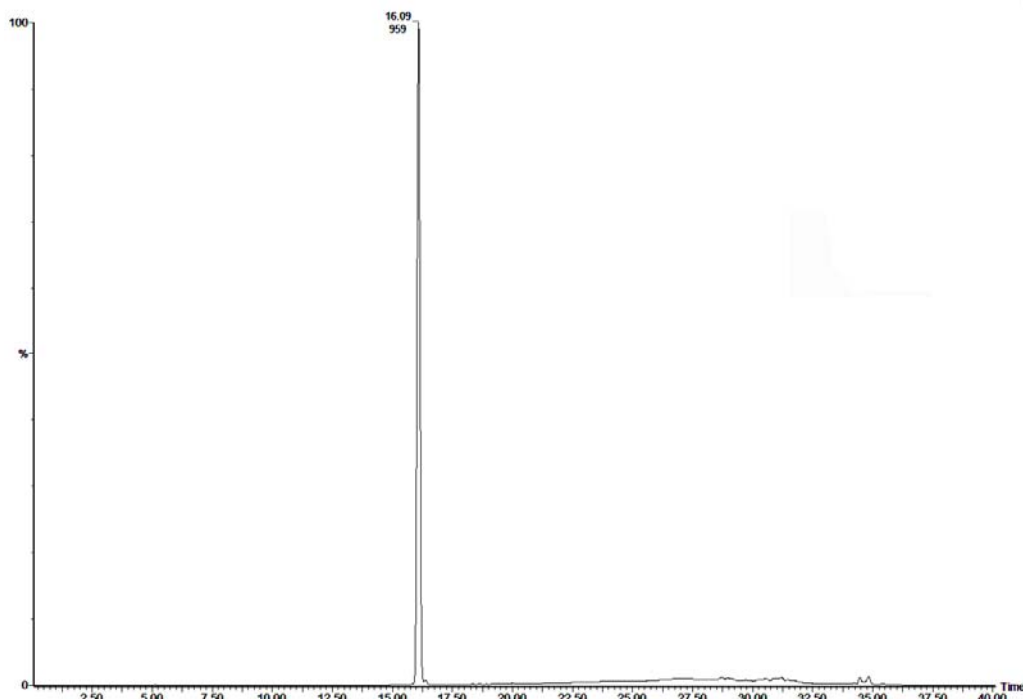


Рисунок 2 – ВЭЖХ хроматограмма полученного препарата СДГ

Структура полученного очищенного препарата была подтверждена методом спектроскопии ЯМР ^1H (МГц, D_2O , м.д.): 1.99 (2H, м, H-2); 2.40 (2H, дд, $J=11.5, 10.5$ Гц, H-1б'); 3.28 (2H, дд, $J=14.7, 3.9$ Гц, H-1а'); 3.25-3.53 (8H, м, H-2''', H-3''', H-4''', H-5'''); 3.55 (2H, дд, $J=8.1, 6.2$ Гц, H-1б); 3.65 (6H, с, OCH_3); 3.72 (2H, дд, $J=11.8, 2.1$ Гц, H-6а''); 3.76 (2H, дд, $J=11.8, 4.2$ Гц, H-6б''); 4.08 (2H, дд, $J=10.2, 3.1$ Гц, H-1а); 4.35 (2H, д, $J=7.8$ Гц, H-1'''); 6.49 (2H, с, H-2''); 6.61 (2H, д, $J=7.8$ Гц, H-6''); 6.78 (2H, д, $J=7.8$ Гц, H-5'). Полученные результаты по установлению структуры (рис. 3) хорошо согласуются с литературными данными [15].

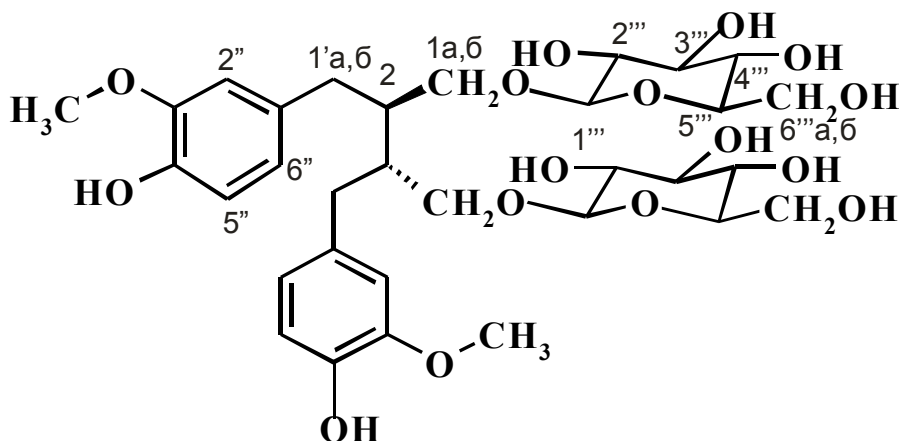


Рисунок 3 – Структура секоизоларицирезинола диглюкозида (СДГ) [15].

Таким образом, наиболее эффективным и быстрым способом получения лигнансодержащего экстракта является способ, включающий в себя стадию совмещенного процесса экстракции и гидролиза обезжиренного льняного семени при воздействии

микроволнового излучения. Предложенный способ позволяет добиться высокого выхода экстрактивных веществ – 23,2% с высоким содержанием в них СДГ – 14,2 мг/г в расчете на обезжиренное сырье. Дальнейшее препаративное разделение данного экстракта на ионообменном сорбенте Dianion HP-20 и обращенно-фазном силикагеле С₁₈ позволяет получить СДГ с чистотой 95% и выходом 0,24% по отношению к обезжиренной массе льняного семени.

Литература

1. Westcott, N.D. Flaxseed lignan in decrease prevention and health promotion / D.N. Westcott, A.D. Muir // *Phytochemistry Revies.* – 2003. – Vol. 2. – P. 401–417.
2. Struijs, K. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls / K. Struijs [et al.] // *Phytochemistry.* – 2007. – Vol. 68. – P. 1227–1235.
3. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds / P. Johnsson [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48. – P. 5216–5219.
4. Prasad, K. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone / K. Prasad // *Int. J. Angiol.* – 2000. – Vol. 9, № 4. – P. 220–225.
5. Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolaricerisenol diglucoside in flaxseed / S.E. Rickard [et al.] // *J. Nutr.* – 1996. – Vol. 126. – P. 2012–2019.
6. Dietary secoisolariciresinol diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats / J. Frank [et al.] // *British J. Nutr.* – 2004. – Vol. 92. – P. 169–176.
7. Coran, S.A. High-performance thin-layer chromatographic-densitometric determination of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed / S.A. Coran, V. Giannellini, M. Bambagiotti-Alberti // *J. Chromatogr. A.* 2004. – Vol. 1045. – P. 217–222.
8. A dry mechanical method for concentrating the lignan secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed / B. Madhusudhan [et al.] // *Lebensm.-Wiss. u. – Technol.* – 2000. – Vol. 33. – P. 268–275.
9. Process for extracting lignans from flaxseed US 005705618A C07G 1/00, C08L 97/00 / Neil D. Westcott, Alister D. Muir; assignee Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada – Appl. № 415,050; filed 31.03.1995; pub. date 06.01.1998.
10. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction / C. Eliasson [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – Vol. 1012. – P. 151–159.
11. A process for recovering secoisolaricerisinol diglycoside from defatted flaxseed WO 03/084974 A1 C07H 1/08 / Thomas A. Dobbins, David B. Wiley, Wiley Organics, Inc. – Appl. № PCT/US03/10047; filed 02. 04. 2003; pub. date 16. 10. 2003.
12. Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental design / A. Egizabal [et al.] // *Analyst.* – 1998. – Vol. 123. – P. 1679–1684.
13. Zang, W. Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull / W. Zang, S. Xu // *J. Sci. Food Agric.* – Vol. 87. – P. 1455–1462.
14. Zhang, W. Purification of secoisolariciresinol diglucoside with column chromatography on a Sephadex LH-20 / W. Zang, S. Xu // *J. Chrom. Sci.* – 2007. – Vol. 45. – P. 177–182.
15. On-line liquid-chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry coupling for the separation and characterization of secoisolariciresinol diglucoside isomers in flaxseed / J. Fritsche [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – Vol. 972. – P. 195–203.

**THE ISOLATION AND PURIFICATION OF SECOISOLARICIRE SINOL
DIGLUCOSIDE FROM FLAXSEED**

O.V. Stasevich, S.G. Mikhalyonok, V.P. Kurchenko*, I.M. Zharsky

Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

**Belarusian State University, Minsk, Belarus*

The effective ecological safely method of isolation of lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG) from flaxseed is performed in this article. This method includes sequential steps of receiving of lignancontaining extract with use of microwave-assisted extraction with the ethanol-water system as extractant and separation of this extract. At first the separation is carried out using the anion-exchanged sorbent Diaion HP-20 and after that on reversed-phase silica gel C₁₈ with aqueous ethanol as mobile phase. This method gives the opportunity to obtain SDG fractions with the 95% purity and the yield 0,24% from defatted flaxseed.