

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНИЛПРОПАНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ И ЛЬНА МАСЛИЧНОГО**

**В.П. Курченко\*, А.С. Щекатикина\*, О.В. Стасевич\*\*, Е.В. Спиридович\*\*\***

*\*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

*\*\*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь*

*\*\*\*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

### **Введение**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения в долгосрочной перспективе здоровье людей будут подрывать хронические состояния, сенсорные и психические расстройства. В большей степени факторами риска для развивающихся стран являются помимо табака и алкоголя, низкая устойчивость организмов людей к изменяющимся условиям окружающей среды [1]. Создание лекарственных средств, обладающих адаптогенным действием, и применение их для профилактики и лечения различных заболеваний сможет повысить неспецифическую и специфическую сопротивляемость организма. Своевременный прием адаптогенов, позволяет восстановить суточные биоритмы, снизить развитие соматической патологии, вызванной психогенными факторами, улучшить качество жизни, смягчить в условиях дезадаптации отрицательное воздействие на организм человека стрессовых ситуаций, а также неблагоприятных экологических и производственных факторов. В этой связи особого внимания заслуживают лекарственные растения, проявляющие адаптогенные, тонизирующие, иммуномодулирующие, антиоксидантные и гепатопротекторные активности. В настоящее время доказано, что эти активности связаны с тем, что они содержат в качестве ведущей группы биологически активных соединений фенилпропаноиды [2]. Фенилпропаноиды широко распространены в растительном мире, однако лишь в последнее время они стали предметом пристального внимания исследователей в отношении поиска перспективных биологически активных соединений для создания на их основе лекарственных средств.

Среди перечисленных биологических активностей фенилпропаноидов, особого внимания заслуживает их участие в утилизации активных форм кислорода, которые способны повреждать клеточные структуры, а также в поддержании иммунной системы на определенном благоприятном для организма человека уровне.

В связи с этим представляется целесообразным вести поиск и изучение веществ фенилпропаноидной природы среди различных таксономических групп растений. Необходимо разрабатывать методы их выделения, анализа структурно-функциональных свойств и биологических активностей. В качестве объектов исследования нами были выбраны: расторопша пятнистая и лен масличный – хорошо известные источники природных лигнанов, обладающих гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами.

### **1 Общая характеристика фенилпропаноидных соединений**

Фенилпропаноиды – самостоятельный класс растительных органических соединений. По химической природе они представляют собой фенольные вещества, построенные из структурных фрагментов C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (фенилпропан). Эти соединения встречаются у широкого круга лекарственных растений, относящихся к различным таксономическим группам: расторопше пятнистой, родиоле розовой, эхинацеи пурпурной, мелиссе лекарственной, элеутерококке колючем, лимоннике китайском, иве, сирени. В настоящее время для ряда фенилпропаноидных соединений показаны нейротропная, адаптогенная, антиоксидантная, гепатопротекторная, иммуномодулирующая, тонизирующая и другие активности. Интенсивные исследования этих веществ привели к выделению большого количества новых соединений, что потребовало разработки их классификации.

### 1.1 Классификация фенолпропаноидов

В соответствии с классификацией, принятой в настоящее время в химии природных соединений, фенолпропаноиды целесообразно рассматривать как самостоятельный класс природных веществ, состоящий из следующих групп:

1. Простые фенолпропаноиды
  - а) коричные кислоты и их производные (сложные эфиры, гликозиды и другие производные);
  - б) циннамоиламиды;
  - в) коричные спирты и их производные (эфиры, гликозиды);
  - г) коричные альдегиды;
  - д) фенолпропаны.
2. Сложные фенолпропаноиды
  - а) фенолпропаноидные гликозиды на основе фенолэтанойдов;
  - б) продукты окислительного сочетания фенолпропаноидов (лигнаны):
    - лигнаны (димеры и олигомеры фенолпропаноидов);
    - флаволигнаны;
    - ксантонолигнаны;
    - кумаринолигнаны;
    - алкалоидолигнаны;
    - неолигнаны.
3. Биогенетически родственные фенолпропаноидам соединения (флавоноиды, кумарины и др.).

Представленная классификация фенолпропаноидов базируется на основе современных представлениях о биосинтезе фенольных соединений, в котором ключевую роль играют коричные спирты и коричные кислоты [3].

### 1.2 Биосинтез фенолпропаноидов

Биосинтез фенолпропаноидов, как и большинства фенольных соединений, берет начало от общего предшественника – шикимовой кислоты, в связи с этим говорят об общем шикиматном пути их биосинтеза. Сама же шикимовая кислота синтезируется из продуктов первичного метаболизма растений:

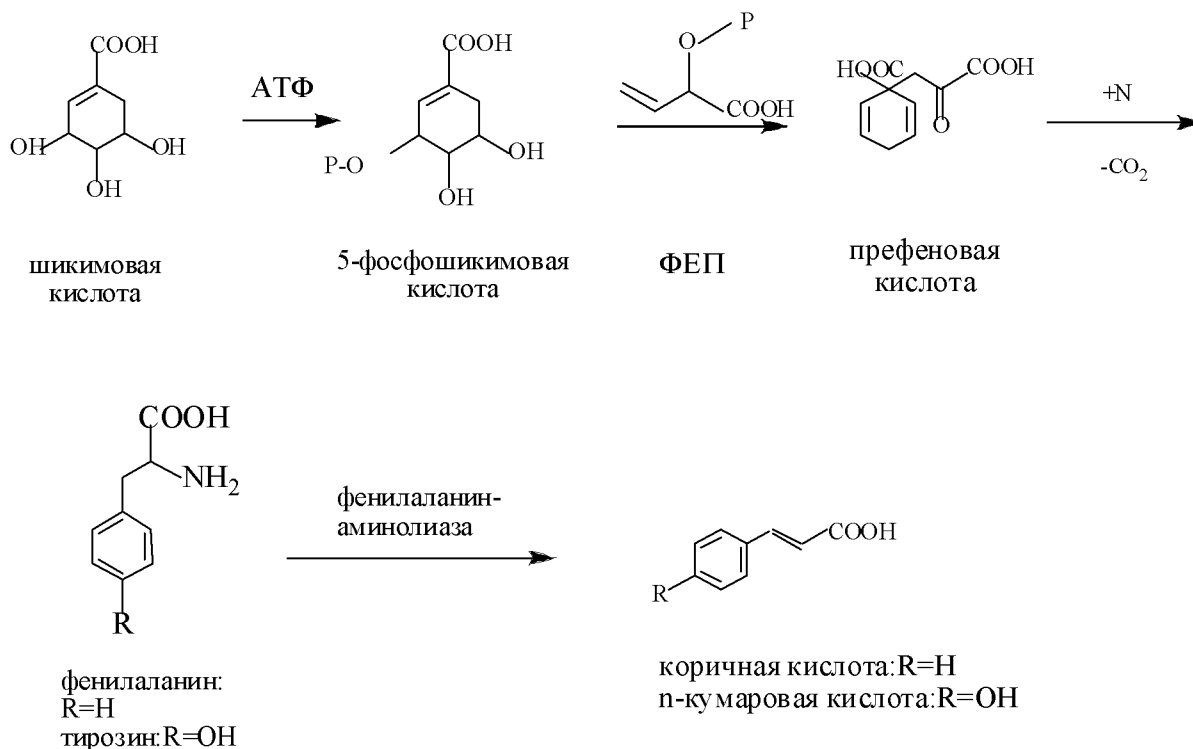


Рисунок 1 – Схема биосинтеза фенолпропаноидов

Фенилпропаноиды (особенно коричные спирты и кислоты) выступают как биогенетические предшественники для целого ряда самостоятельных классов и групп флавоноидов, кумаринов, лигнанов, хинонов, простых фенольных соединений, дубильных веществ [4]:

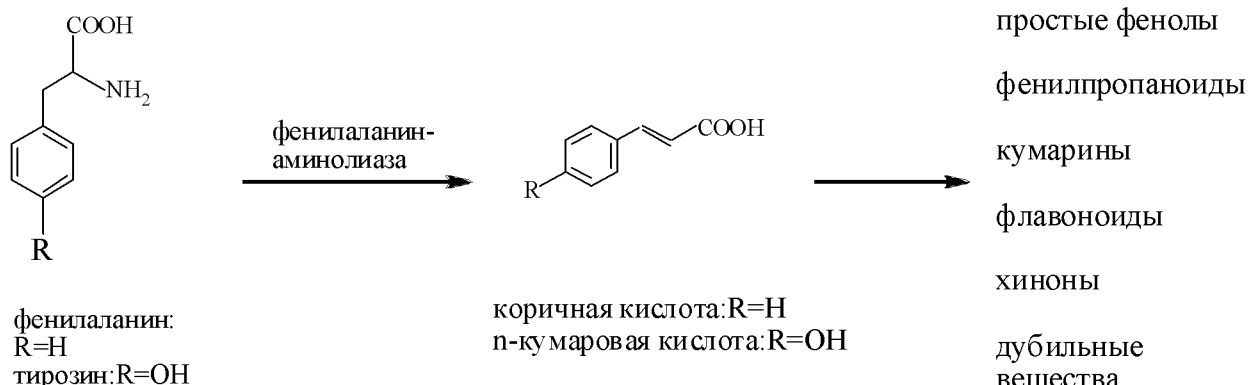


Рисунок 2 – Схема синтеза фенольных соединений

### 1.3 Распространение фенилпропаноидов в растительном мире

Фенилпропаноиды широко распространены в растительном мире. Богатыми источниками данных биологически активных соединений являются растения семейств сложноцветных или астровых (*Asteraceae*), толстянковых (*Crassulaceae*), аралиевых (*Araliaceae*), норичниковых (*Scrophulariaceae*), ивовых (*Salicaceae*), подорожниковых (*Plantaginaceae*), волчниковых (*Thymelaeaceae*), губоцветных, или яснотковых (*Lamiaceae*), маслинных (*Oleaceae*) и других [5, 6, 7].

### 2 Флаволигнаны из плодов расторопши пятнистой

Среди растений семейства сложноцветных (*Asteraceae*) как источник фенилпропаноидных соединений особый интерес вызывает расторопша пятнистая (*Silybum marianum* Gaertn.). Ее плоды содержат различные биологически активные вещества, но среди них первое место по количественному содержанию занимают флаволигнаны [8, 9, 10]. Согласно современной классификации фенилпропаноидов флаволигнаны представляют собой сложные фенилпропаноидные соединения, образующиеся в результате окислительного сочетания дигидрокверцетина и фенилпропаноида, обычно кониферилового спирта (рисунок 3).

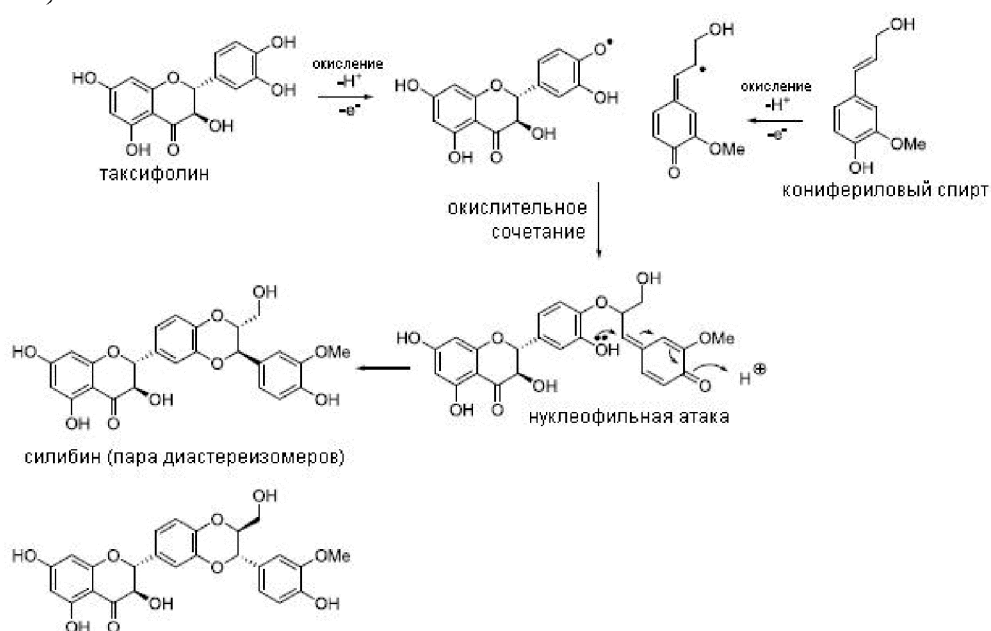


Рисунок 3 – Биосинтез флаволигнанов [8]

В комплекс флаволигнанов из расторопши пятнистой (салимарин) входят три изомерных соединения: силибин, силидианин и силикристин (рисунок 4). Они представляют наибольший интерес, так как обладают широким кругом фармакологической активности, включая гепатопротекторную, иммуномодулирующую и антиоксидантную.

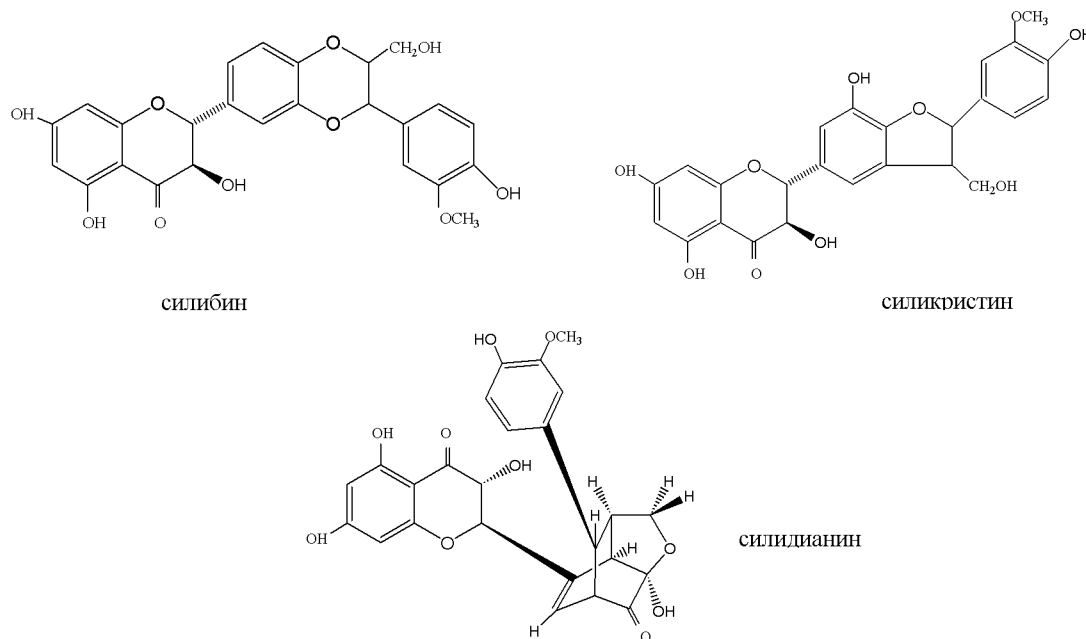
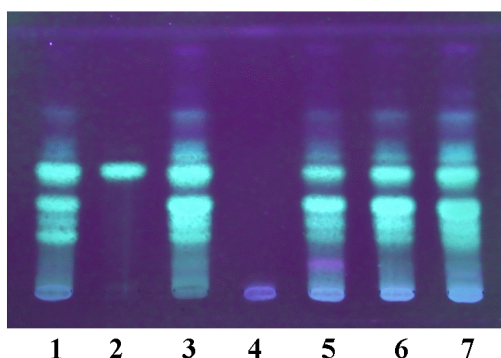


Рисунок 4 – Структура флаволигнанов

Максимальное количество флаволигнанов локализовано в плодах расторопши, где их содержание может колебаться от 1 до 6%, поэтому они служат сырьем для получения салимарина [8, 9, 11].

### 2.1 Локализация флаволигнанов в плодах

При более детальном морфологическом изучении плодов расторопши пятнистой были обнаружены различия в окраске эпидермиса семенных оболочек. Их цвет варьировал от черного до светло-кремового. Цвет эндоспермия, независимо от цвета семенных оболочек оставался неизменным светло-серым. Это может указывать на более вероятное нахождение фенольных соединений в семенной оболочке. Для изучения локализации флаволигнанов была проведена этанольная экстракция салимарина из эндоспермия и семенных оболочек плодов черного, темно-кремового и светло-кремового цветов и исследован их состав методом ТСХ (рисунок 5).



1 – салимарин (Sigma), 2 – силибин (Sigma)

спиртовые экстракты: 3 – семенных оболочек, 4 – эндоспермия, 5 – семенных оболочек светло-кремового цвета, 6 – семенных оболочек черного цвета, 7 – семенных оболочек темно-кремового цвета

Рисунок 5 – Хроматограмма флаволигнанов из плодов расторопши пятнистой

Как видно из рисунка (рисунок 5, дорожка 4) эндоспермий семян расторопши не содержит флаволигнанов. В то время как семенные оболочки различных морфологических групп плодов расторопши пятнистой (рисунок 5, дорожки 5, 6, 7) содержат флаволигнаны, близкие по содержанию. Вероятно, их наличие в наружном эпидермисе семенной оболочки играет важную роль в развитии растений и адаптации к внешним факторам среды.

## 2.2 Состав и соотношение индивидуальных флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, выращенной в различных регионах Европы

Силимарин, выделяемый из плодов расторопши пятнистой, используется как субстанция для производства гепатопротекторных препаратов. Вследствие этого многие фармацевтические компании осуществляют выпуск различных лекарственных форм на основе флаволигнанов этого лекарственного растения. При использовании сырья из различных растительных источников проблематичным является производство биоэквивалентных препаратов, которые будут оказывать одинаковый терапевтический эффект [12]. Поэтому актуальным является исследование состава стереоизомеров флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, выращенной в различных регионах Европы. Использование стандартной методики получения силимарина из плодов расторопши пятнистой и метода ВЭЖХ при анализе состава флаволигнанов в экстрактах, позволило дать оценку состава биологически активных веществ в семенах, предоставленных различными ботаническими садами Европы (таблица 1).

Таблица 1 – Выход флавоноидов и содержание таксифолина, силикристина, силидианина и силибина в силимарине, полученном из семян расторопши пятнистой различных ботанических садов Европы (% от общего содержания)

	выход	таксифолин	силикристин	силидианин	силибин
Гемания (Берлин)	3,44±0,16	3,73±0,15	25,41±0,83	3,7±0,06	67,15±1,62
Польша	3,5±0,15	5,27±0,2	25,54±0,98	4,14±0,16	65,06±1,4
Словения	2,93±0,12	6,16±0,25	26,51±0,5	3,32±0,11	64,0±1,55
Беларусь (ЦБС)	2,0±0,03	5,52±0,21	15,68±0,33	42,91±0,88	35,88±0,6
Швейцария	2,51±0,11	4,42±0,18	13,53±0,34	55,3±1,3	26,74±0,32
Франция	2,4±0,1	5,05±0,21	15,63±0,44	50,4±0,86	28,93±0,28
Бельгия	2,6±0,09	3,25±0,13	16,71±0,71	47,17±0,62	32,86±0,43
Германия (Дрезден)	1,69±0,05	6,39±0,28	17,46±0,65	44,59±0,59	31,55±0,51
Италия	2,9±0,1	6,65±0,31	14,69±0,7	52,6±0,79	26,05±0,27
Румыния	2,47±0,08	3,98±0,14	16,91±0,53	46,32±0,54	32,78±0,62
Франция (Париж)	2,45±0,11	7,21±0,19	17,26±0,42	41,16±0,47	34,37±0,7

С использованием экстракционного метода из исследованных семян (таблица 1) был получен силимарин, выход которого составил от 1,69±0,05% до 3,5±0,15%, что хорошо согласуется с данными литературы, в которой дается усредненная величина выхода флаволигнанов, составляющая около 3% [13]. Наибольшее содержание флавоноидов было обнаружено в семенах расторопши пятнистой из ботанических садов Польши (3,5±0,15%), Германии (Берлин) (3,44±0,16%), Словении (2,93±0,12%) и Италии (2,9±0,1%). Семена из этих ботанических садов могут быть использованы для промышленного выращивания расторопши пятнистой и повышения эффективности производства субстанции силимарин.

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что количественный состав флаволигнанов и таксифолина в плодах различается. Наибольшим содержанием таксифолина характеризуются семена из ботанических садов Франции (Париж) (7,21±0,19%), Италии (6,65±0,31%), Германии (Дрезден) (6,39±0,28%) и Словении (6,16±0,25%). Минимальное

количество таксифолина содержат семена из ботанических садов Бельгии ( $3,25 \pm 0,13\%$ ), Германии (Берлин) ( $3,73 \pm 0,15\%$ ) и Румынии ( $3,98 \pm 0,14\%$ ).

Сравнительный анализ основных флаволигнанов, входящих в силимарин показал, что по преимущественному содержанию силибина или силидианина все плоды можно разделить на две большие группы. В группу с преимущественным содержанием силибина вошли семена, полученные из ботанических садов Германии (Берлин), Польши и Словении, содержание которого колебалось от 64 до 67,15%. Характерной особенностью этих семян было не только высокое содержание силибина, но и силикристина (25,41–26,51%). Содержание силидианина (3,32–4,14%) было низким по сравнению со второй группой семян. Вторую группу составляют плоды, в составе которых доминирует силидианин от 41,16 до 55,3%. В семенах этих растений содержится меньше силибина (26,05–35,88%) и силикристина (13,53–17,46%) по сравнению с первой группой семян.

Таким образом, показанные нами различия в компонентном составе биологически активных веществ фенилпропаноидной природы плодов расторопши пятнистой, выращенных в различных географических регионах Европы может служить основой для последующей селекционной работы, которая приведет к разработке промышленных сортов данного растения с повышенным содержанием силимарина, а также позволит получать стандартизированное сырье для фармацевтической промышленности.

### **2.3 Получение силимарина и индивидуальных флаволигнанов из плодов расторопши пятнистой**

В качестве сырья для получения препаративных количеств силимарина нами были использованы плоды расторопши пятнистой, выращенные на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси. По компонентному составу эти плоды принадлежали к силидианиновой хеморасе (см. таблицу 1).

Для получения комплекса флаволигнанов из плодов используется метод экстракции различными органическими растворителями: ацетонитрилом, этанолом [14], этилацетатом или метанолом [15]. Для более полной экстракции силимарина, как правило, проводят предварительное обезжиривание плодов гексаном или петролейным эфиром [8]. Основными факторами, влияющими на скорость и полноту высвобождения комплекса биологически активных веществ из плодов расторопши пятнистой, являются тип экстрагента, соотношение сырье-экстрагент, температура экстракции, степень измельчения сырья, продолжительность экстрагирования и гидродинамические условия [14].

Для достижения исчерпывающей экстракции флаволигнанов из семян расторопши проводилась трехкратная спиртовая экстракция измельченных плодов при  $70^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании [10, 14]. Растительное сырье измельчали до размеров частиц не меньше 3 мм. Из измельченных семян 80% этиловым спиртом экстрагировали флаволигнаны. Экстракцию проводили при повышенной температуре с обратным холодильником и постоянном перемешивании. Процедуру экстракции проводили три раза для наиболее полного извлечения флаволигнанов из семенных оболочек плодов расторопши пятнистой. После экстракции элюэнт отделяли фильтрованием на бумажном фильтре, извлечения обезжиривали петролейным эфиром. Растворенные жирные кислоты вместе с петролейным эфиром отделяли от общего экстракта. Силимарин осаждали из спиртового раствора путем добавления соляной кислоты. Полученный осадок несколько раз промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и сушили при комнатной температуре. Выход флаволигнанов составил 2,91%. Согласно данным литературы нижний предел содержания суммы флаволигнанов для необезжиренных цельных и измельченных плодов составляет не менее 2,4% [14].

Полученный силимарин характеризовали с помощью спектральных и хроматографических методов. В качестве стандартов при идентификации соединений в исследуемом экстракте использовали коммерческие субстанции силимарина (Sigma), силибина (Sigma) и таксифолина (Flucka).

На рисунке 6 приведен УФ-спектр поглощения спиртового раствора полученного нами силимарина. По наличию характерного спектра в области 240–320 нм с максимумом при  $288 \pm 2$  нм и минимумом при  $257 \pm 3$  нм, можно сделать вывод о наличии в полученном экстракте соединений флаволигнановой природы [16, 17, 18].

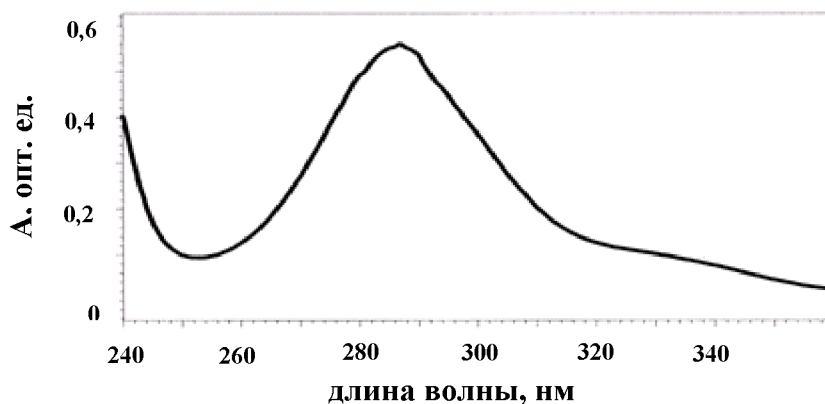


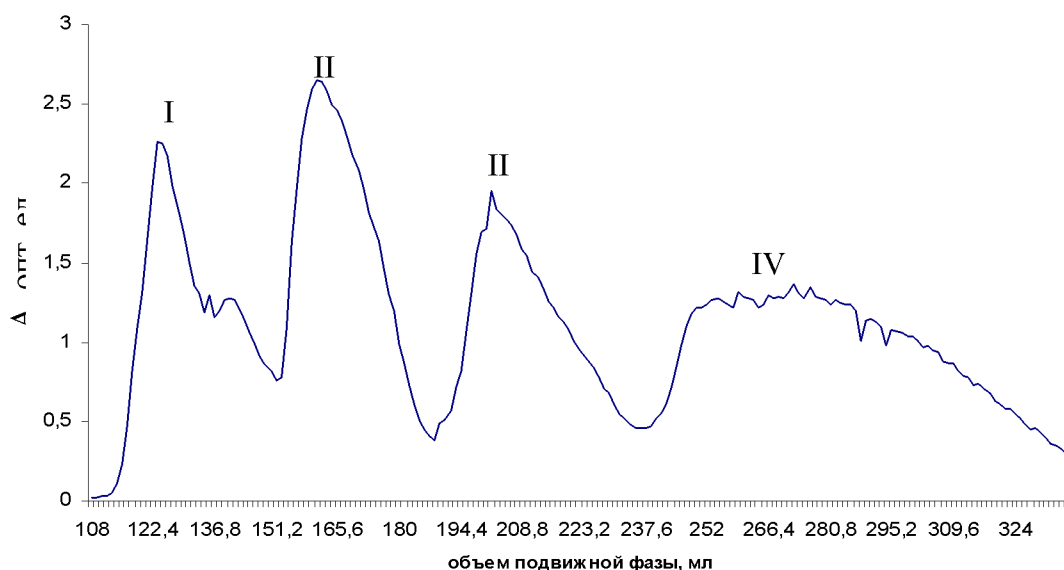
Рисунок 6 – УФ-спектр поглощения спиртового раствора силимарина

Использование ТСХ позволило доказать наличие силимарина в спиртовом извлечении плодов расторопши пятнистой. Выход силимарина составляет 2,5–3% от общей массы семян.

#### 2.4 Выделение флаволигнанов из силимарина хроматографическим методом

Для разделения и получения индивидуальных флаволигнанов в препаративных количествах из силимарина нами была использована жидкостная колоночная хроматография низкого давления. В качестве сорбента использовали Toyopearl HW-75. Разделение на нем смеси флаволигнанов основано на неспецифическом взаимодействии фенольных веществ с боковыми радикалами сорбента.

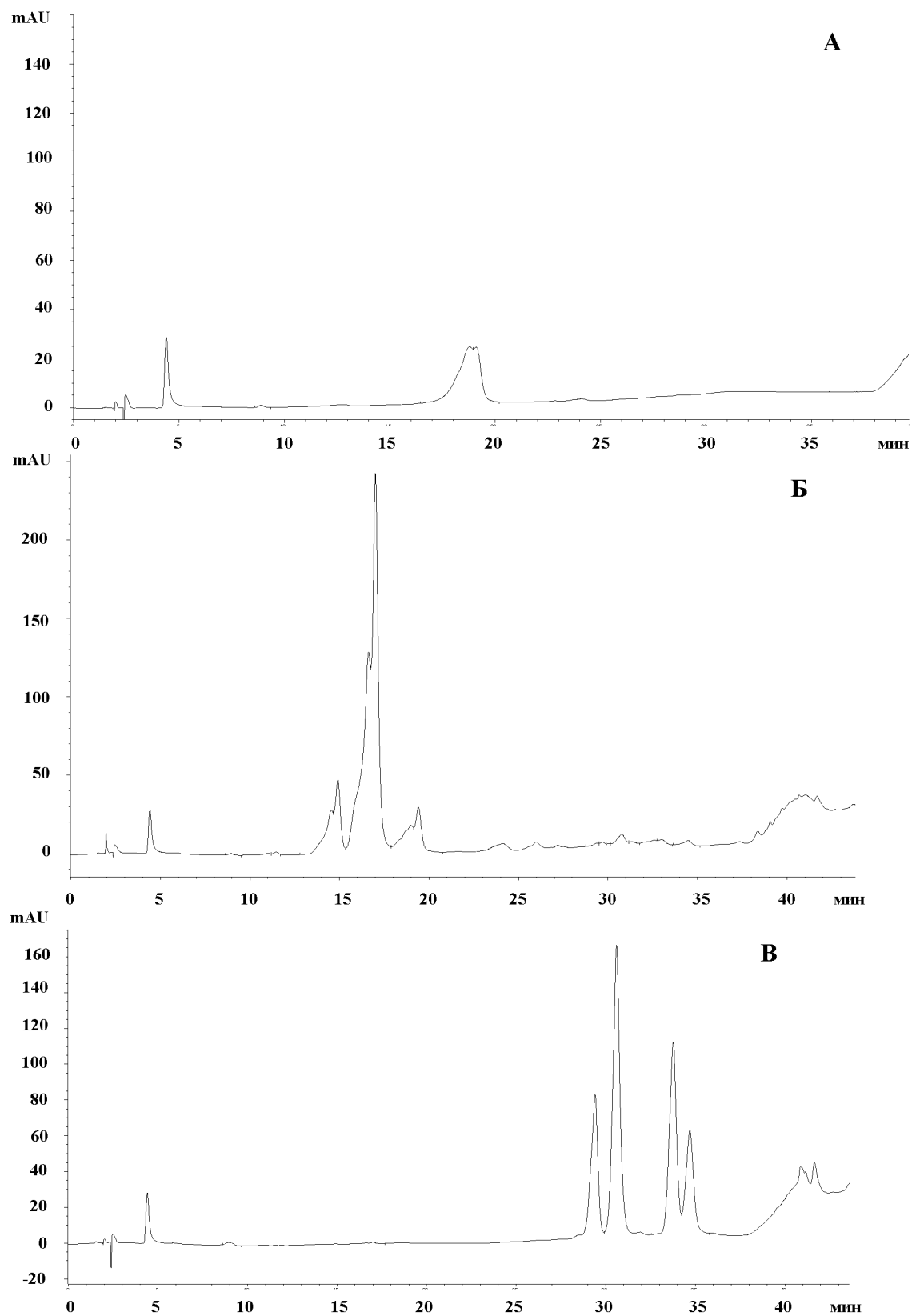
Результат разделения флаволигнанов методом препаративной колоночной хроматографии представлен на профиле элюции, приведенном на рисунке 7. На данном профиле можно увидеть четыре четко выраженных пика, соответствующих объемам подвижной фазы 128,4 мл (пик I), 160,8 мл (пик II), 201,6 мл (пик III), 278,4 (пик IV).



пик I (128,4 мл), пик II (160,8 мл), пик III (201,6 мл), пик IV (278,4 мл)

Рисунок 7 – Профиль элюции флаволигнанов из расторопши пятнистой, полученный в результате препаративной колоночной хроматографии (сорбент Toyopearl HW-75) (длина волны – 290 нм)

Для идентификации химических веществ, содержащихся в вышеуказанных фракциях, нами была использована обращенно-фазовая ВЭЖХ. На рисунке 8 А, Б и В изображены профили элюции ВЭЖХ фракций из пиков II, III и IV.



А – фракция II (силидианин); Б – фракция III (силикрестин); В – фракция IV (силибин)

Рисунок 8 – Профили элюции ВЭЖХ фракций пиков II, III и IV (рисунок 5)



Как видно из рисунка 8, использование колоночной хроматографии на сорбенте Toyopearl HW-75 позволяет получить изомеры флаволигнанов в достаточно чистом виде. С применением в качестве внутреннего стандарта таксифолина методом ВЭЖХ была установлена чистота выделенных флаволигнанов. Для силибина она составила 98,3%, для силидианина – 99,0% и для силикристина – 68,3%.

Таким образом, плоды расторопши пятнистой являются уникальным источником биологических активных веществ фенилпропаноидной природы. Основная масса флаволигнанов локализована в семенной оболочке, однако взаимной связи между цветом ее и содержанием силимарина обнаружено не было. Выход силимарина составил 2,91% от общей массы семян. Трехкратная экстракция этиловым спиртом при повышенной температуре с постоянным перемешиванием позволяет получить до 90% всех флаволигнанов, содержащихся в семенных оболочках плодов расторопши пятнистой. Обнаруженные различия в компонентном составе индивидуальных флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, выращенных в различных географических регионах Европы позволили установить наличие двух хеморас этого лекарственного растения – силибиновой и силидианиновой. Показана необходимость использования разработанного подхода обратно-фазной ВЭЖХ для достоверной оценки качественного и количественного состава лекарственного сырья для получения биоэквивалентных препаратов.

Применение колоночной хроматографии низкого давления на сорбенте Toyopearl HW-75 и 50% изопропилового спирта в качестве подвижной фазы позволяет наиболее полно разделить индивидуальные флаволигнаны и получить их в препаративном количестве с чистотой: силибин – 98,3%, силидианина – 99,0% и силикристина – 68,3%.

### **3 Получение и характеристика секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного**

#### **3.1 Лигнаны в природе: их структура и биосинтез**

Лигнанами называют олигомерные фенольные соединения фенилпропанового ряда. Эти вещества обнаруживаются в древесине, коре, плодах, листьях, корнях некоторых растений. К этому классу относятся продукты окислительного сочетания фенилпропаноидов: димеры и олигомеры, соединенные  $\beta$ - $\beta'$ -связью. Лигнаны могут присутствовать в растительном материале, как в форме агликонов, так и в гликозидированном виде. Данные по содержанию лигнанов с гваяцильным типом замещения в растениях и продуктах питания приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2 содержание лигнанов в продуктах питания и в растениях варьирует по различным данным, но с уверенностью можно сказать, что наибольшее количество этих соединений содержится в льняном семени и в древесине ели обыкновенной (*Picea abies*) и пихта белая европейская (*Abies alba*).

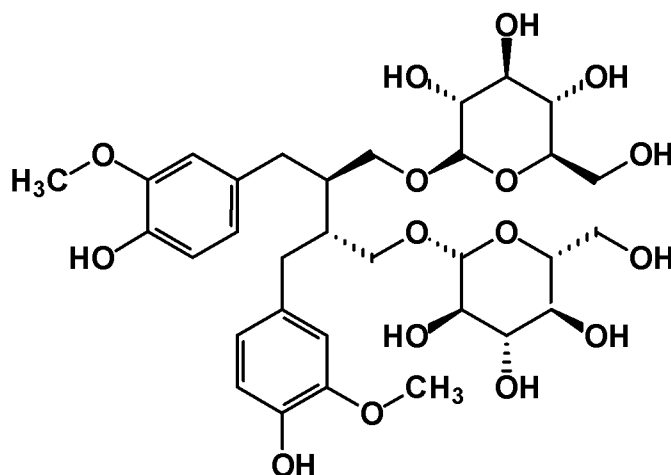
Семена льна масличного (*Linum usitatissimum*) в последние годы все шире используются в продовольственных, диетических и лечебных целях. Они содержат: 41% жиров, 28% диетической клетчатки, 21% протеина, 6% углеводов (сахара, ароматические кислоты, лигнин и гемицеллюлоза) и 4% золы [19]. Обнаружение в семенах льна таких уникальных компонентов как лигнанов делает его потенциальным сырьем для получения данных веществ в чистом виде или в виде обогащенных фракций.

Основным лигнаном семян льна является диглюкозид секоизоларицирезинола или (+)-[2*R*,2'*R*]-бис[(4-гидрокси-3-метоксифенил)-метил]-1,4-бутандиил-бис( $\beta$ -глюкопиранозид) **1** (рисунок 9) [20].

Таблица 2 – Количественное содержание лигнанов (мкг/г сухой массы) в различных растениях и продуктах питания [21, 22]

Наименование	СДГ	Матаи-резинол	Ларици-резинол	Пино-резинол
Льняное семя	3700	10,9	–	–
	2900	5,5	30,4	33,2
	12600	58,6	–	–
Семя сезамина	293	4,8	95	0,7
Ржаные отруби	1,3	1,7	–	–
Ржаная мука	7,2	1,7	–	–
Ржаной хлеб, черный	0,1	0,1	1,2	1,7
Кудрявая капуста	0,2	0,1	6,0	16,9
Капуста брокколи	4,1	0,2	–	–
	0,4	0	9,7	3,2
Чеснок	0,5	0	2,9	2,0
Клубника	15,0	0,8	–	–
	0	0	1,2	2,1
Оливковое масло	0	0	0	2,4
Черный чай	24,2	3,0	–	–
Зеленый чай	28,9	2,0	–	–
<i>Picea abies</i> сердцевина	3–370	10–520	17–370	10–20
<i>Picea abies</i> наросты	1400–6800	1700–5500	1000–2500	–
<i>Abies alba</i> сердцевина	140	250	180	20
<i>Abies alba</i> наросты	29000–36000	2500–2600	4600–10000	360–1000

В семенах льна также содержится многообразие минорных лигнанов с гваяцильным типом замещения в форме агликонов: изоларицирезинол **2**, пинорезинол **3**, ларицирезинол **4**, матаирезинол **5** (рисунок 10) [23].



Секоизоларицирезинола диглюкозид (1)

Рисунок 9 – Структура секоизоларицирезинола диглюкозида [20]

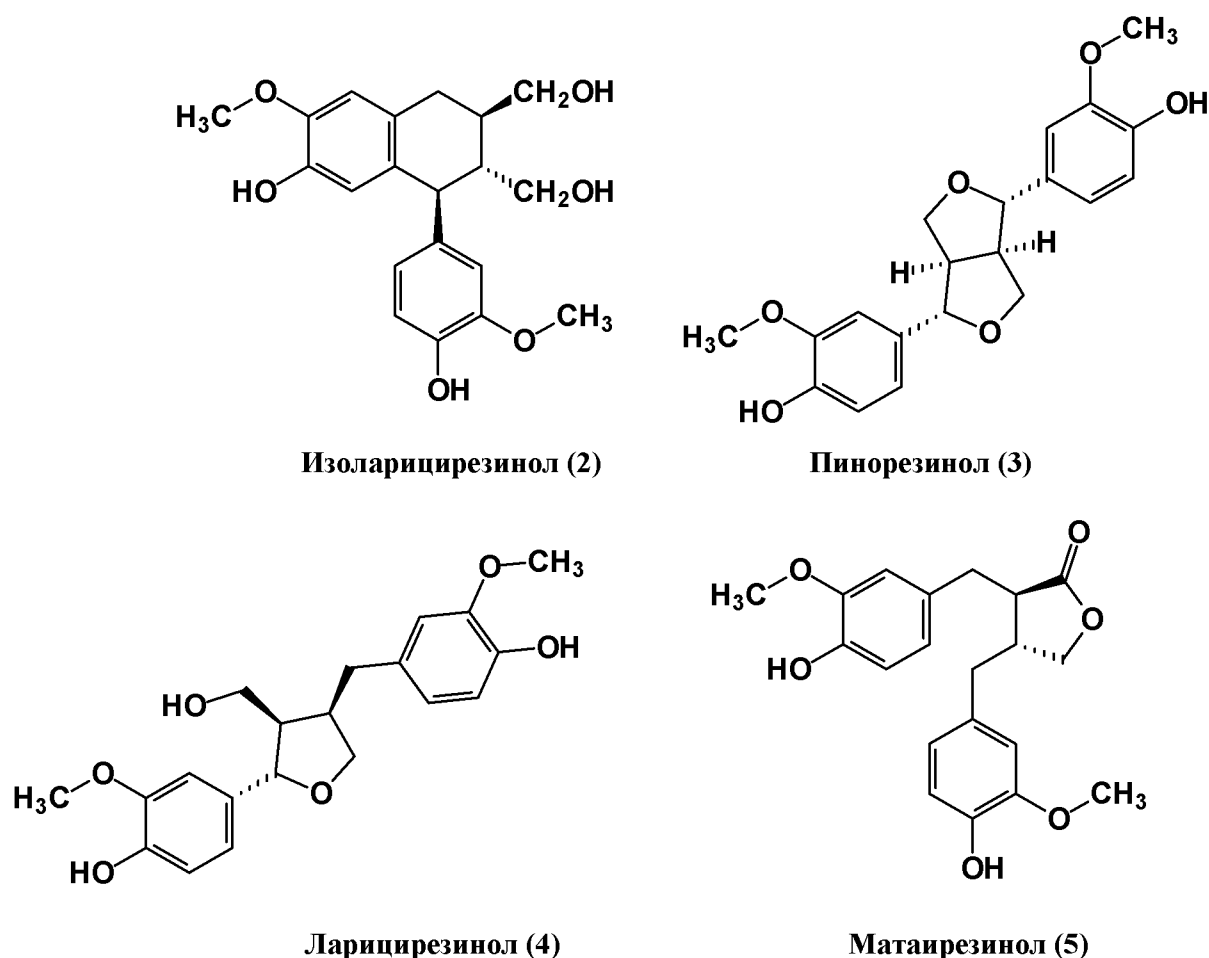


Рисунок 10 – Структуры минорных лигнанов льняного семени [23]

Известно, что биосинтез лигнанов проходит через стереоселективное соединение двух молекул кониферилового спирта **6**, образующего (+)-пинорезинол **3**. Фермент, отвечающий за стереоселективность этого процесса сам не способен осуществить окисление, поэтому требуется вспомогательный фермент (оксидаза). Последовательные стереоселективные превращения (+)-пинорезинола **3** приводят к образованию (+)-ларицирезинола **4** и затем к образованию (-)-секоизоларицирезинола (СЕКО) **7**. Две изофункциональные формы редуктазы катализируют последовательно НАДФН зависимые, стереоспецифические превращения (+)-пинорезинола **3** и (+)-ларицирезинола **4**. Стереоселективное дегидрирование (-)-секоизоларицирезинола **7** затем, приводит к образованию (-)-матаирезинола **5**, который является исходным субстратом для синтеза других важных групп лигнанов (рисунок 11) [24].

Биологическая ценность СДГ для млекопитающих обусловлена его метаболизмом в кишечнике до энтеродиола **8** и энтеролактона **9**, называемых лигнанами млекопитающих или энтеролигнанами. Данные соединения обладают ярко выраженной антиоксидантной активностью за счет фенольных гидроксильных групп. Кроме этого, эти лигнаны могут связываться с рецепторами половых гормонов (эстрадиола) и, таким образом, влиять на гормонозависимые процессы в организме [25].

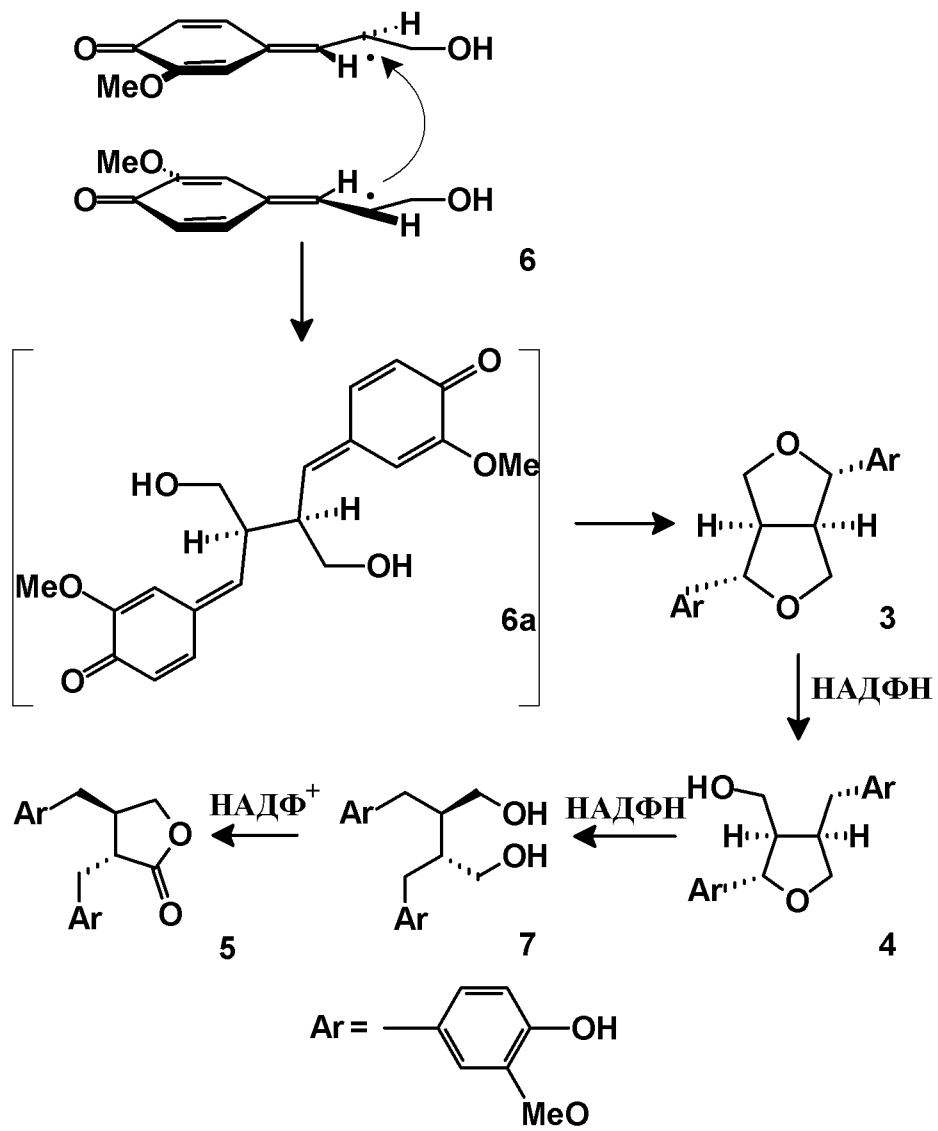


Рисунок 11 – Биосинтез лигнанов в растениях [24]

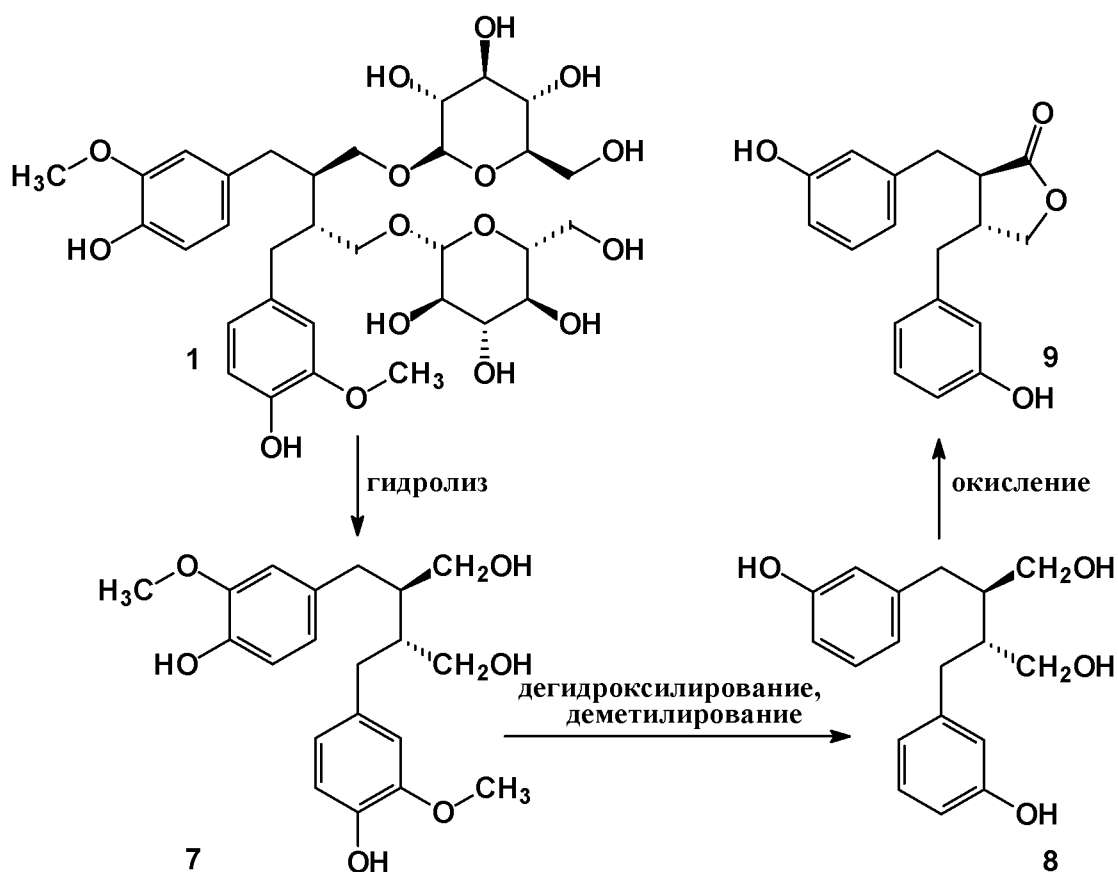


Рисунок 12 – Схема метаболического превращения лигнанов в организме млекопитающих [26]

Энтеродиол может поступать в кровяное русло или далее окисляться безвозвратно в энтеролактон (ЭЛ) **9** (*транс*-2,3-бис(3-гидроксифенил)метил]- $\gamma$ -бутиролактон). Однако, обнаружение секоизоларицирезинола и матаирезинола в моче дает предположение, что превращение растительных лигнанов в энтеролигнаны происходит не всегда.

Лигнаны млекопитающих во время абсорбции в кишечнике могут соединяться с глюкуроновой кислотой и поступать в кровяное русло, как в свободном, так и в конъюгированном состоянии. Часть энтеролигнанов также поступает в печень, где они соединяются в основном с глюкуроновой кислотой и в меньшей степени превращаются в сульфаты при помощи ферментов глюкоронидазы и сульфатазы и после конъюгации выделяются с мочой и желчью. В основном лигнаны обнаруживаются в моче в виде моноглюкоронидов и в меньшей степени в виде диглюкоронидов и сульфатов. Было установлено, что возрастание концентрации энтеролигнанов в плазме и моче млекопитающих, зависело от количества употребляемого ими богатого лигнанами льняного семени [27].

### 3.2 Выделение секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного

#### 3.2.1 Получение лигнансодержащего экстракта

Процесс выделения СДГ из семян льна масличного включает в себя экстракционное получение СДГ из семян льна и его дальнейшую очистку. Мы придерживались традиционной схемы получения лигнансодержащего экстракта, которая включает в себя стадии измельчения семян, их обезжиривания, экстракцию и гидролиз обезжиренной массы, нейтрализацию и концентрирования полученного экстракта [28]. Наиболее важными стадиями являются гидролиз и экстракция, так как именно они определяют выход

экстрактивных веществ, в которые входит СДГ. В таблице 3 обобщены методики, в которых достигается наибольший выход СДГ в экстракте.

Таблица 3 – Сравнение способов получения СДГ-содержащего экстракта

Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл	Условия проведения процесса			Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г	Литературная ссылка
	Экстракция		Щелочной гидролиз (время, pH, температура процесса)		
	параметры проведения (время, температура)	экстрагирующий агент			
1:8	48 ч, 60°C	Диоксан:95% водный этанол (1:1)	Водный NaOH, 48 ч, pH=10, 25°C	11,7	[28]
1:20	3 ч, 60°C	Вода:метанол (3:7)	Водный NaOH, 3 ч, pH=10, 25°C	12,9	[29]
1:6	24 ч, 25°C	Вода:этанол (3:7)	Водный NaOH, 4 ч, pH=10, 50°C	20,0	[30]
1:50	Водный NaOH, 1 ч, pH = 10, 25°C			11,8	[31]

Применение системы диоксан-этанол и метанол–вода позволяет получить в экстракте удовлетворительное содержание СДГ, но из-за высокой токсичности диоксана и метанола эти методы не достаточно безопасны для реализации [28, 29]. Поэтому при выборе экстрагента предпочтение было отдано наиболее экологически безопасному растворителю водному этанолу, кроме того, водно-спиртовая система дает возможность избавиться уже на стадии экстракции от нежелательных цианогенных гликозидов, присутствующих в льняном семени [30].

Способ экстракции, в котором в качестве экстрагента используется водная щелочь, позволяет получать фракции с высоким содержанием СДГ [31]. Недостатки этого способа – большие затраты времени и большой расход растворителя по отношению к сырью, что также увеличивает продолжительность и энергоемкость процесса на стадии концентрирования экстракта [31].

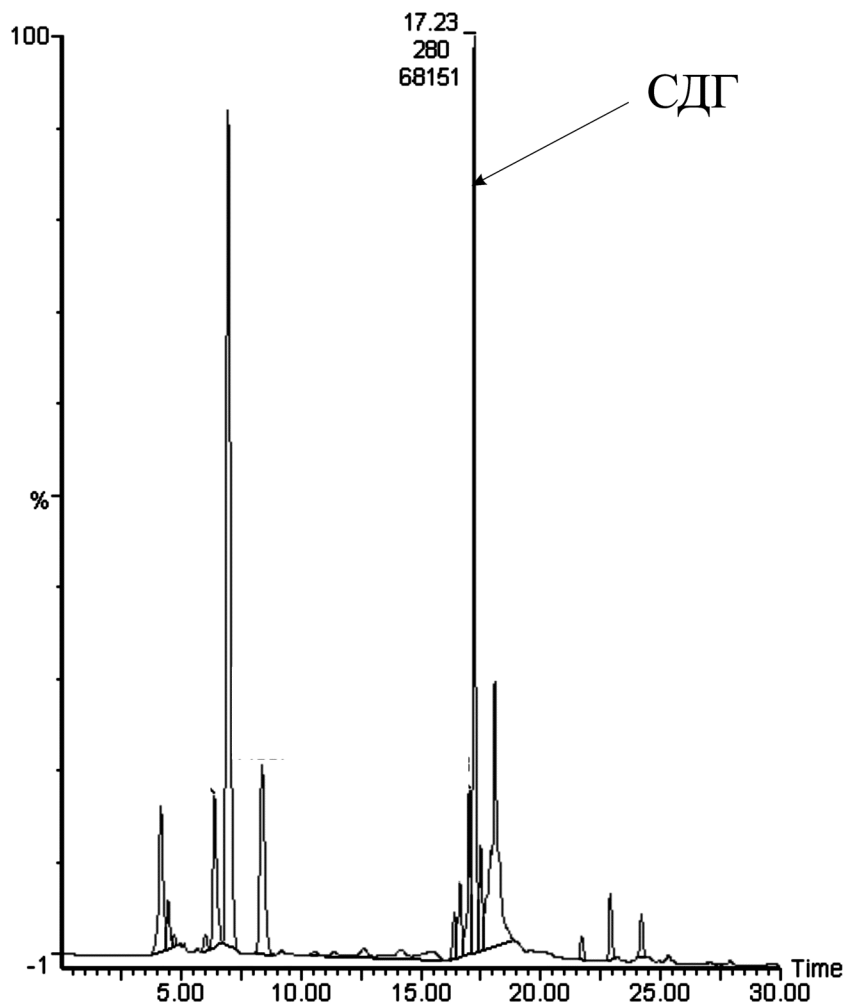
Особый интерес, с точки зрения решения проблемы повышения эффективности экстракции биологически активных веществ из растительного сырья, представляют методы с использованием микроволнового излучения [32]. Использование микроволновой энергии дает возможность сократить расход экстрагента, а также продолжительность процесса за счет быстрого нагрева, разрыхления межмолекулярных связей полимеров и соответственно большей доступностью компонентов экстрагируемого материала растворителю [33]. Несмотря на то, что СДГ достаточно термостабилен при кратковременном воздействии температуры [34], его выход значительно снижается при продолжительном времени проведения микроволнового воздействия, из-за процессов каталитической деструкции, имеющих место в растительном материале [34], поэтому наиболее оптимальным способом микроволновой обработки является способ кратковременного микроволнового воздействия [34].

Ранее было показано, что необходимое соотношение растительного сырья и экстрагента для эффективной экстракции СДГ в раствор составляет 1:20 [34].

В соответствии с вышеприведенным анализом методов выделения СДГ (таблица 3) нами было предложено и апробировано три способа получения СДГ-содержащего экстракта (таблица 4).

Количественное определение и идентификацию СДГ в полученных экстрактах осуществляли методом ВЭЖХ.

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% 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 (рисунок 13).

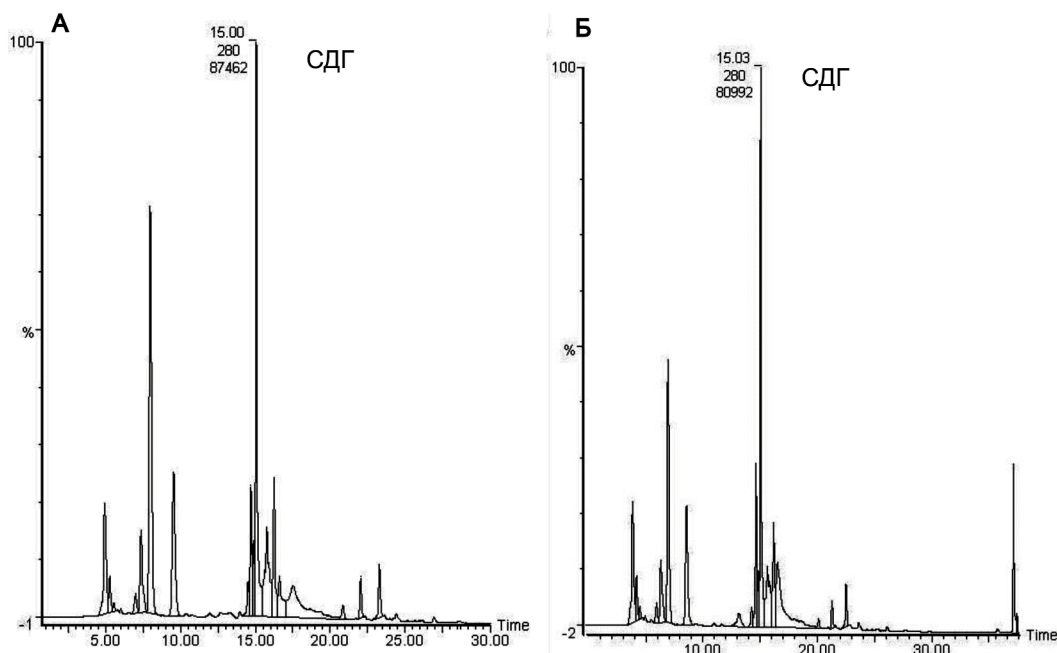


Элюирующая система (А:Б')

Рисунок 13 – Хроматограмма экстракта, полученного по 1-му способу

При элюировании системой состоящей из ацетонитрила (раствор А) и воды с 0,1% содержанием муравьиной кислоты (раствор Б) со скоростью протока 0,7 мл/мин этих недостатков удалось избежать (рисунок 14). При проведении ВЭЖХ анализа во втором режиме время удержания интересующего нас компонента немного уменьшилось, но разделение составляющих экстракта было наиболее приемлемым [35].

В результате проведения экстракции водным этанолом с последующим гидролизом по первому способу, был получен экстракт с удовлетворительным содержанием СДГ (таблица 4). В нем можно выделить 10 основных компонентов и множество минорных (рисунок 14А).



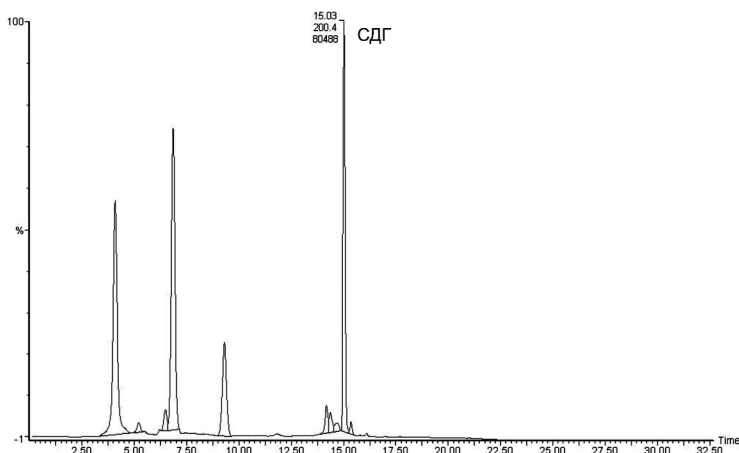
Элюирующая система (А:Б)

Рисунок 14 – Хроматограммы экстрактов, полученных по 1-му (А) и 3-му (Б) способам

Хроматограмма экстракта, полученного по третьему способу, состоит из 9 основных пиков и из множества мелких пиков (рисунок 14Б), при этом содержание СДГ было наименьшим (таблица 4). Более того, данный экстракт отличался гелеобразной структурой, что значительно затрудняло процесс внесения пробы в случае проведения дальнейшего препаративного хроматографического разделения.

По данным ВЭЖХ анализа в экстракте, полученном по второму способу (рисунок 15), наблюдалось наличие 7-ми основных компонентов и небольшое количество минорных составляющих. Более того, этим способом достигался выход экстракта с наибольшим содержанием в нем СДГ (таблица 4).

Секоизоларицирезинола диглюкозид в экстракте идентифицировали с помощью метода ВЭЖХ по веществу со временем удержания 15,03 мин (рисунок 15), которое совпадало со временем удержания коммерческого препарата СДГ [35].



Элюирующая система (А:Б)

Рисунок 15 – Хроматограмма экстракта, полученного по 2-му способу



При проведении ВЭЖХ-анализа детекция осуществлялась диодно-матричным детектором и масс-детектором с электроспреей ионизацией. В масс-спектре, зарегистрированном в области отрицательных ионов (рисунок 16А), наблюдается сигнал с  $m/z$  685,82, соответствующий иону  $[M-H]^-$  для соединения с молекулярной формулой  $C_{32}H_{46}O_{16}$ , т.е. СДГ.

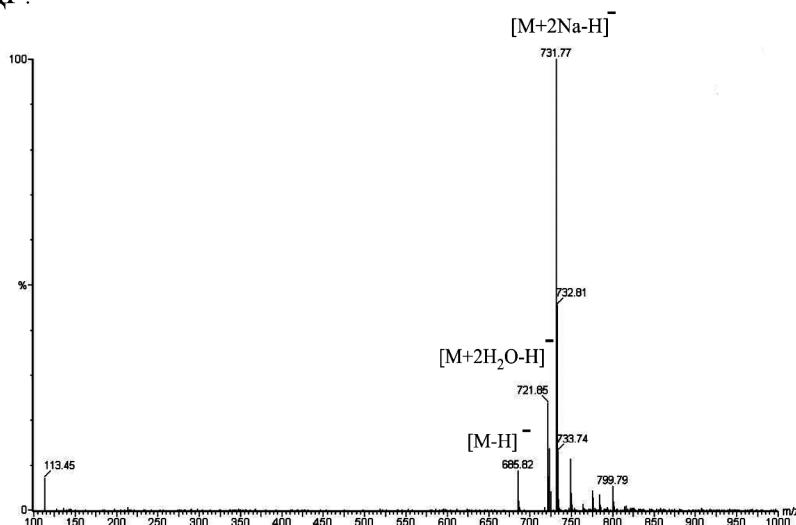


Рисунок 16А – Масс-спектр СДГ в области отрицательных ионов

Наиболее интенсивные пики принадлежали ионам  $[M+2Na-H]^-$  с  $m/z$  731,77 и  $[M+2H_2O-H]^-$  с  $m/z$  721,85, которые образовались из молекулярного иона при присоединении двух атомов натрия и двух молекул воды, соответственно. Характерной особенностью масс-спектра (рисунок 16Б) СДГ является ион с  $m/z$  709,78  $[M+Na]^+$ . Присоединение молекулы воды и иона  $H^+$  дает более интенсивный пик, соответствующий иону с  $m/z$  704,83  $[M+H_2O+H]^+$ , а присоединение только иона водорода приводит к формированию иона с  $m/z$  687,84  $[M+H]^+$ . Наиболее интенсивные сигналы в спектре положительных ионов принадлежат ионам с  $m/z$  345,77  $[M-2Glu+H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  363,79  $[M-2Glu+2H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  327,77  $[M-2Glu+H]^+$ ,  $m/z$  525,81  $[M-Glu+H_2O+H]^+$ . Они генерировались путем отщепления одного или двух остатков глюкозы и присоединения одной или двух молекул воды. Эти характеристики полученных масс-спектров соответствуют литературным данным [35].

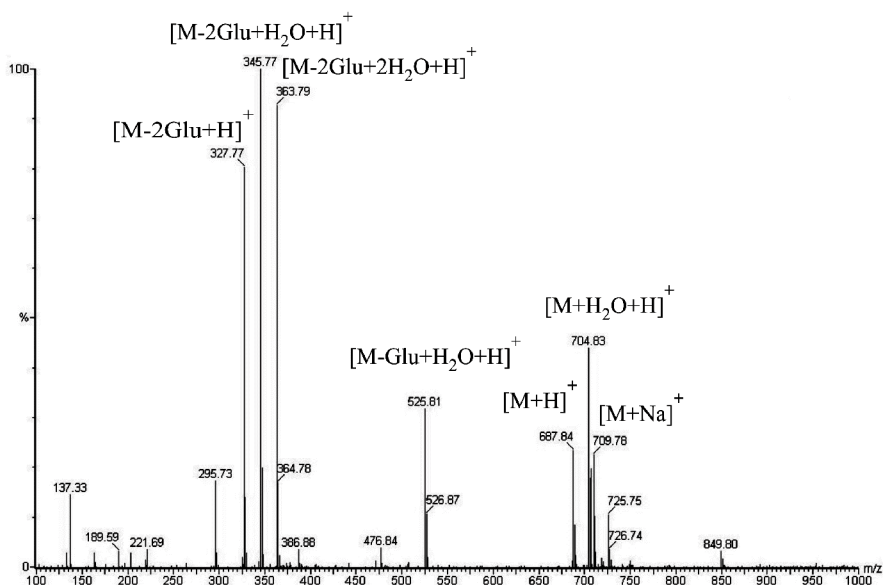


Рисунок 16Б – Масс-спектр СДГ в области положительных ионов

Результаты количественного определения трех экстрактов и содержание в них СДГ приведены в таблице 4.

Полученные результаты можно объяснить тем, что выход СДГ при проведении экстракции, сопровождаемой микроволновым облучением, в большой 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 более эффективный переход СДГ в растворитель [35].

Таблица 4 – 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 троекратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	50% водный этанол	Водный NaOH, pH = 10	2 мин троекратно 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

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. Именно этот способ использовался для получения лигнансодержащего экстракта в больших количествах в целях дальнейшего препаративного разделения [35].

### 3.2.2 Выделение секоизоларицирезинола диглюкозида из лигнансодержащего экстракта

#### 3.2.2.1 Применение гель-хроматографии для разделения лигнансодержащего экстракта

Как указывалось ранее, для разделения лигнансодержащего экстракта часто использовали силикагель в качестве сорбента [28]. Несмотря на удовлетворительный выход СДГ этим методом недостатком этого вида хроматографии является использование такого летучего небезопасного растворителя как хлороформ. Использование метанола как компонента подвижной фазы для разделения на силикагеле также является большим недостатком при реализации этого способа, т.к. метанол относится к группе особо опасных

ядов и находится на строгом контроле и учете. При выборе сорбентов, на которых планировалось производить очистку СДГ, мы исходили из необходимости избежать использования вышеуказанных растворителей. Вначале разделение лигнансодержащего экстракта проводили с применением эксклюзионной хроматографии.

В качестве сорбента использовали гидроксильированный метакриловый полимерный гель Тоуорpearl HW-40F, в соответствии с тем, что схожие гликозидные структуры разделяли ранее при использовании данного геля [36].

Растворители, применяемые в эксклюзионной хроматографии, должны удовлетворять следующим основным требованиям [37]:

- 1) полностью растворять образец при температуре разделения;
- 2) смачивать поверхность сорбента и не ухудшать эффективность колонки;
- 3) предотвращать адсорбцию (и другие взаимодействия) разделяемых веществ с поверхностью сорбента;
- 4) обеспечивать максимально высокую чувствительность детектирования;
- 5) иметь низкую вязкость и токсичность.

При выборе подвижной фазы для разделения СДГ-содержащего экстракта на геле Тоуорpearl HW-40F придерживались вышеуказанных критериев. Поэтому вначале осуществляли разделение водной системой. Так как при использовании воды в качестве подвижной фазы четкого разделения практически не наблюдалось, было решено использовать в качестве элюента системы, содержащие этанол. При замене подвижной фазы на 100% этанол и 50% водный этанол разделения практически не наблюдалось. Более того, этанолсодержащие системы способствовали повышению гидростатического давления в колонке, что заставляло вносить пробу в объеме, меньшем требуемого. Чтобы избежать этого и добиться более эффективного разделения на геле Тоуорpearl HW-40F прибегли к применению систем содержащих пропанол-2. Этот спирт также как и этанол оказывает вредное влияние на центральную нервную систему и токсичнее этанола приблизительно в 2 раза [38], но он является менее опасным, чем хлороформ или метанол.

Было апробировано разделение элюирующими системами, содержащими пропанол-2 в 100% и 50% концентрациях. В результате использования каждой из систем были построены кривые элюции, которые свидетельствовали о характере и качестве разделения (рисунок 17, 18).

Кривые элюции показали, что при соотношении вода:пропанол-2 (1:1) в подвижной фазе, фракции, содержащие СДГ, отделялись лучше, чем фракции, содержащие другие компоненты. При замене подвижной фазы на 100% пропанол-2 наблюдалось менее четкое разделение СДГ-содержащих фракций. Такой результат обусловлен изменением вязкости и диэлектрической проницаемости элюирующих систем, в зависимости от концентрации пропанола-2 в подвижной фазе. Динамический коэффициент вязкости является одной из ключевых физико-химических величин, характеризующих свойство жидкостей оказывать сопротивление перемещению одного ее слоя относительно другого. Диэлектрическая проницаемость оказывает влияние на качество разделения, потому что это один из критериев полярности растворителей. Следует отметить, что для бинарных систем диэлектрическая проницаемость является величиной неаддитивной и поэтому сложно проследить корреляцию между этой величиной и составом бинарной системы [37].

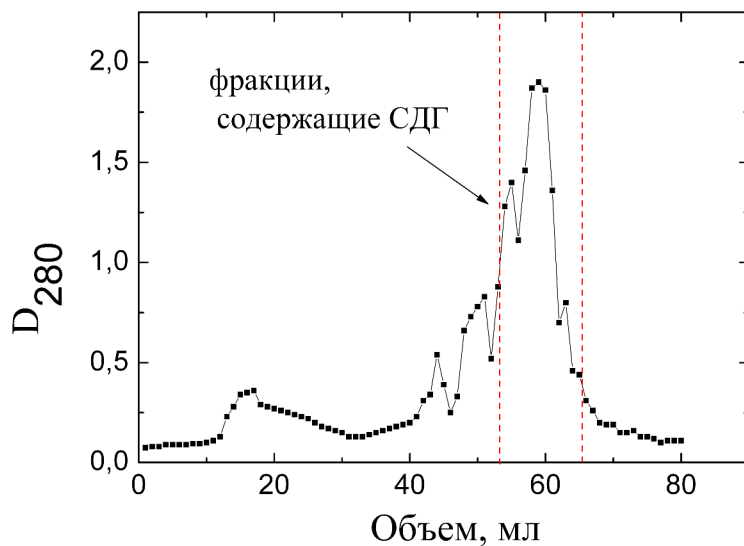


Рисунок 17 – Профиль элюции на геле Toyopearl HW-40F при использовании в качестве подвижной фазы пропанола-2

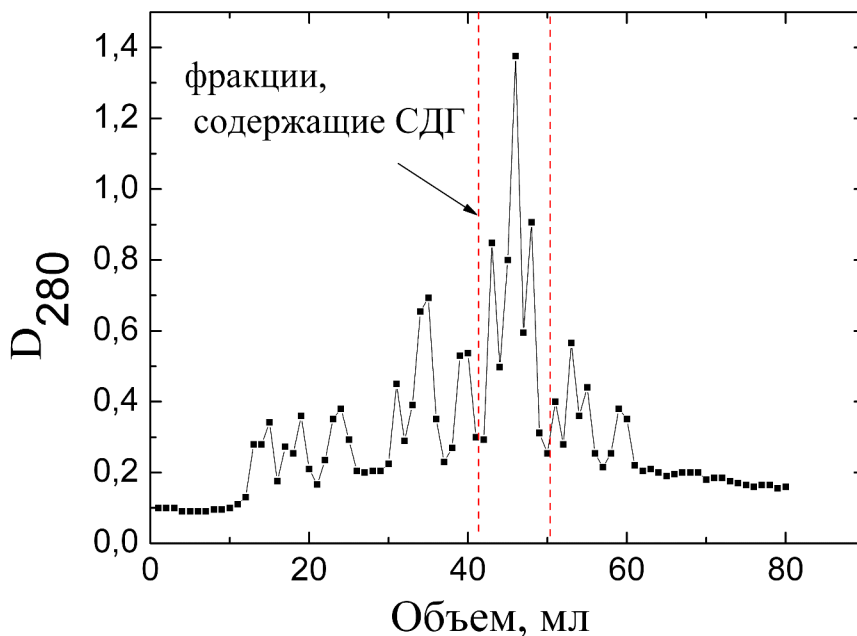


Рисунок 18 – Профиль элюции на геле Toyopearl HW-40F при использовании в качестве подвижной фазы 50% водного пропанола-2

Как видно, (рисунок 18) СДГ-содержащие фракции выходили с колонки при элюировании растворителем объемом 41–50,5 мл. Результаты ВЭЖХ анализа исходного экстракта и очищенной фракции приведены на рисунке 19.

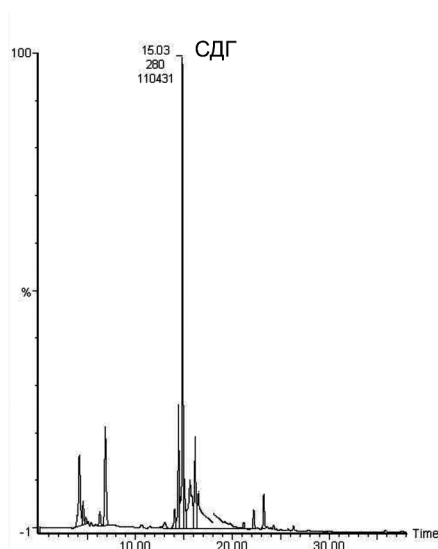


Рисунок 19 – ВЭЖХ хроматограмма СДГ-содержащей фракции после разделения на геле Toyopearl HW-40F

Из приведенных данных видно, что в очищенной фракции значительно меньше примесей, чем в исходном образце (см. рисунок 15), и они присутствуют в меньших концентрациях, что свидетельствует об удовлетворительном качестве разделения. Чистота полученной СДГ-обогащенной фракции составила 41% [35]. Среди примесей, присутствующих в экстракте много других фенольных соединений, таких как: *n*-кумаровая кислота, феруловая кислота, синаповая кислота, кофеиновая кислота и их глюкозиды. Также было обнаружено присутствие в СДГ-содержащем экстракте флавоноидов диглюкозида гербатыцина и диглюкозида кемферола [39].

Наличие большого количества вышеуказанных примесей усложняет задачу выделения СДГ в чистом виде. Более того, в основном примеси, присутствующие в экстракте схожи по молекулярным массам, а также их структуры характеризуются наличием фенольного кольца и глюкозидного остатка. Этот фактор лимитирует возможность получения фракций с высоким содержанием СДГ на геле Toyopearl HW-40F, так как принцип разделения на этом сорбенте основан лишь на разделении веществ в соответствии с размерами их молекулярных масс.

С целью более качественного разделения экстракта, было апробировано разделение на гидроксипропилированном декстрановом геле Sephadex LH-20, так как ранее сообщалось, что некоторые гликозиды фенольных соединений выделяли, используя данный сорбент [40]. При разделении лигнансодержащего экстракта на геле Sephadex LH-20 в качестве подвижной фазы использовали экологически безопасный и наиболее дешевый растворитель – воду. В результате разделения была построена кривая элюирования, характеризующая качество разделения (рисунок 20).

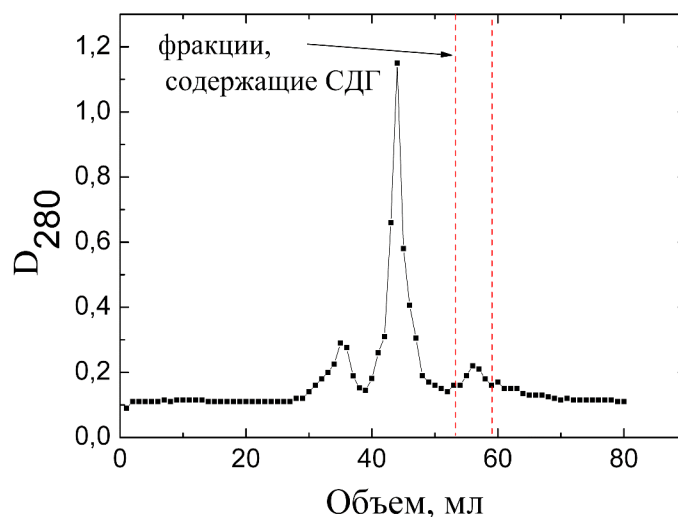


Рисунок 20 – Профиль элюции на геле Sephadex LH-20 при использовании в качестве подвижной фазы воды

Как видно, СДГ-содержащие фракции выходили с колонки при элюировании водой объемом 53–59 мл. Их собирали, упаривали и подвергали ВЭЖХ-анализу. Результаты анализа представлены на рисунке 21.

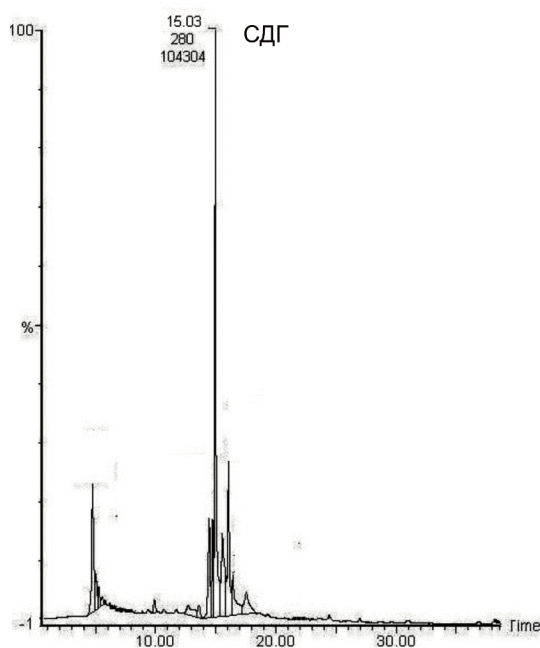


Рисунок 21 – ВЭЖХ хроматограмма СДГ-содержащей фракции после разделения на геле Sephadex LH-20

При разделении на геле Sephadex LH-20 получали СДГ-содержащую фракцию с чистотой 56% [35]. Характеристика процесса очистки лигнансодержащих фракций при использовании эксклюзионной хроматографии приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние условий проведения эксклюзионной хроматографии на чистоту и выход лигнанобогатых фракций

Сорбент	Объем сорбента, мл	Масса, г / объем, мл вводимой пробы	Элюент	Скорость элюирования, мл/мин	Продолжительность процесса, ч	Выход СДГ-содержащей фракции по отношению к введенному экстракту, %	Чистота СДГ-содержащей фракции, %
Тоуорpearl HW-40F	146	0,02/3	вод-ый про-панол-2	0,1	30	0,03	41
Sephadex LH-20	30	0,03/3	вода	0,4	10	0,1	56

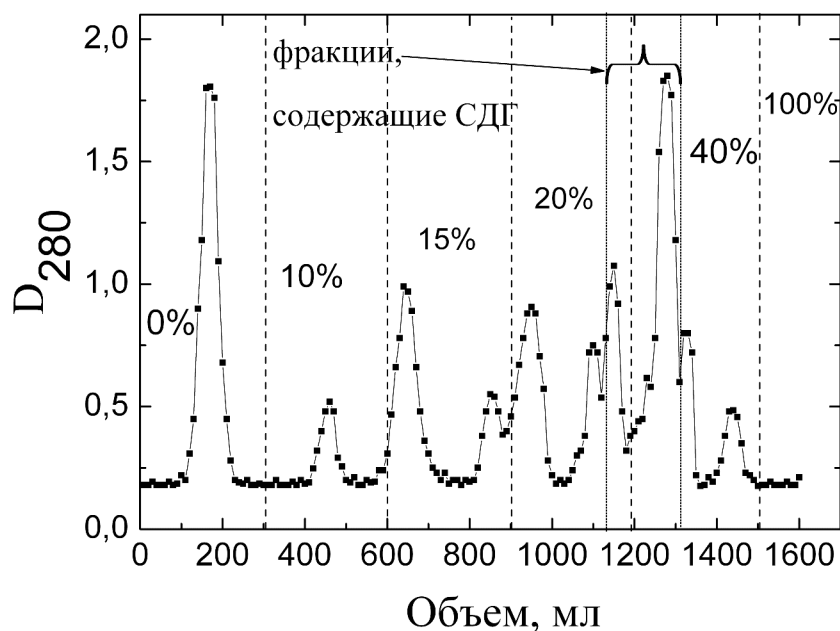
Как видно из таблицы 5 разделение на геле Sephadex LH-20 дало возможность получить более чистую лигнансодержащую фракцию. Это связано с тем, в данном случае наряду с гель-хроматографией происходит также разделение за счет неспецифической сорбции углеводсодержащих молекул. Так как многие из компонентов системы также содержат в своей структуре углеводы, разделение на сорбенте Sephadex LH-20 позволило получить СДГ-содержащую фракцию только с чистотой 56%. Разделение на геле Sephadex LH-20 технологически более выгодно, чем разделение на геле Тоуорpearl HW-40F, так как позволяет внести пробу в большем количестве, провести процесс в 3 раза быстрее, а также получить фракции с большей чистотой.

Несмотря на то, что выход очищенной фракции на геле Sephadex LH-20 оказался большим по сравнению с гелем Тоуорpearl HW-40F, он является недостаточным для накопления требуемого количества СДГ [35].

### 3.2.2.2 Разделение экстракта на сорбенте Diaion HP-20

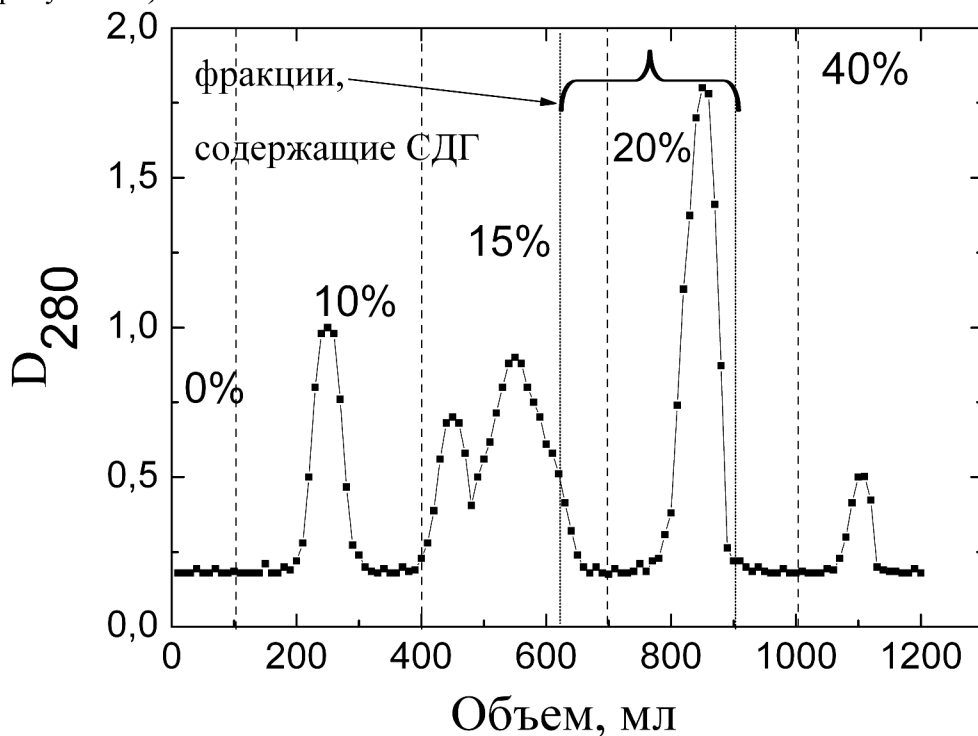
Для повышения выхода очищенной фракции и основываясь на том, что СДГ, а также другие фенольные соединения компоненты выделяемой смеси могут присутствовать в виде солевых форм, и соответственно являются заряженными частицами, было апробировано разделение компонентов смеси на сорбенте Diaion HP-20 [41]. Так как это ионообменный сорбент, то разделение на нем основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворённым соединением и сорбентом.

В качестве подвижной фазы использовали водный этанол в различных концентрациях. В результате первого разделения на ионообменнике Diaion HP-20 была построена кривая элюирования (рисунок 22).



0%, 10%, 15%, 20%, 40%, 100% – концентрация этанола в водной подвижной фазе  
 Рисунок 22 – Профиль элюции первого разделения лигнансодержащего экстракта на сорбенте Diaion HP-20

Из рисунка 22 видно, что по сравнению с применением гель-хроматографии происходит более качественное разделение экстракта. По результатам последующего ТСХ-анализа СДГ-содержащие фракции элюировались 20% водным этанолом. Общий объем фракций составлял 180 мл. Их собирали вместе, концентрировали и подвергали вторичной очистке на том же сорбенте (рисунок 23).



0%, 10%, 15%, 20%, 40% – концентрация этанола в водной подвижной фазе  
 Рисунок 23 – Профиль элюции второго разделения лигнансодержащего экстракта на сорбенте Diaion HP-20



Фракции, соответствующие пикам профиля элюции (рисунок 24), анализировали с помощью ТСХ-анализа. В результате было выяснено, что СДГ начинал выходить с колонки при элюировании 15% водным этанолом и заканчивал вымываться 20% этанолом. При этом объем СДГ-содержащих фракций составлял 280 мл.

Чистота и выход СДГ-содержащих фракций после первого и второго разделения определялась методом ВЭЖХ (рисунок 24).

По данным ВЭЖХ анализа первое разделение лигнансодержащего экстракта на сорбенте Diaion HP-20 дало возможность получить СДГ-содержащую с чистотой 31% и 17,2% выходом по отношению к введенному экстракту. После двукратного разделение на том же сорбенте получали СДГ-содержащую фракцию с чистотой 65% и 3,4% по отношению к введенному экстракту.

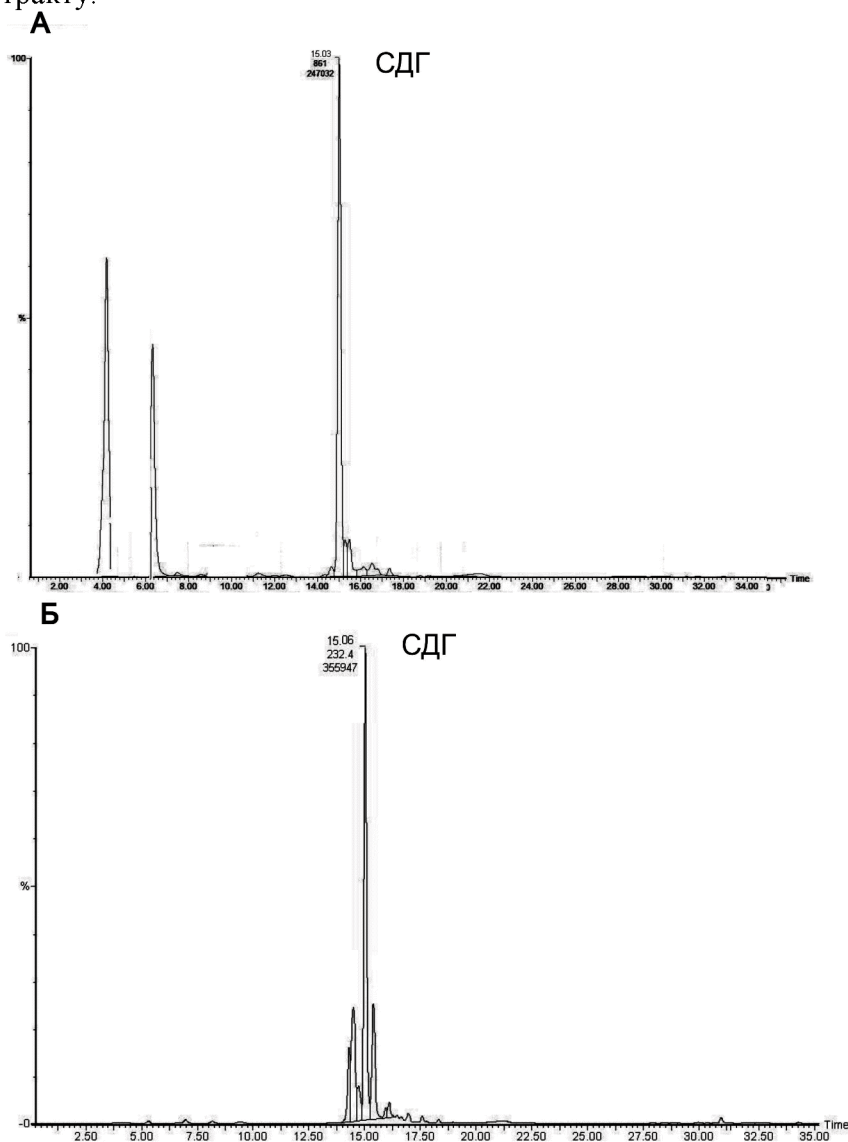
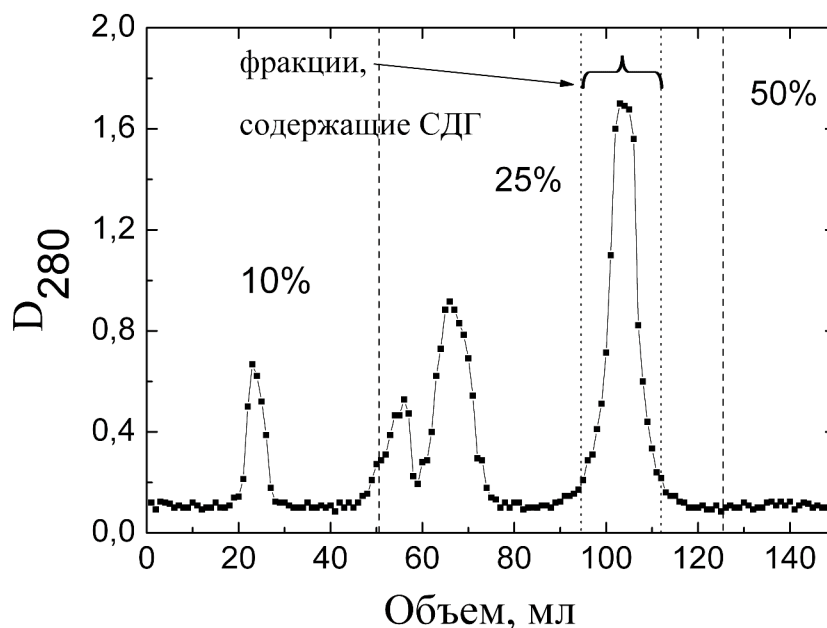


Рисунок 24 – ВЭЖХ хроматограммы СДГ-содержащих фракций полученных после первого (А) и второго (Б) разделения экстракта, вносимого на сорбент Diaion HP-20

Как видно из приведенных данных, двукратное разделение на ионообменном сорбенте дало возможность получить СДГ-содержащую фракцию с удовлетворительной по отношению к введенному экстракту [35]. Ее подвергали дальнейшей очистке.

Окончательную очистку лигнанобогащенной фракции осуществляли на обращенно-фазном силикагеле С18. Это сорбент с привитыми неполярными длинными алкильными и алкилсилильными группами. В качестве подвижной фазы использовали водный этанол в различных концентрациях (рисунок 25).



10%, 25%, 50% – концентрация этанола в водной подвижной фазе  
 Рисунок 25 – Профиль элюции разделения лигнансодержащей фракции на обращенно-фазном силикагеле С18

Из рисунка 25 видно, что разделение на этом сорбенте было четким. СДГ вымывался из колонки 25% раствором водного этанола. Объем фракций составил 16 мл. Качество разделения подтверждено методом ВЭЖХ (рисунок 26).

Окончательная очистка на обращенно-фазном силикагеле позволяет отделить СДГ от остальных примесей и обеспечивает получение препарата СДГ с чистотой 95,3% [35].

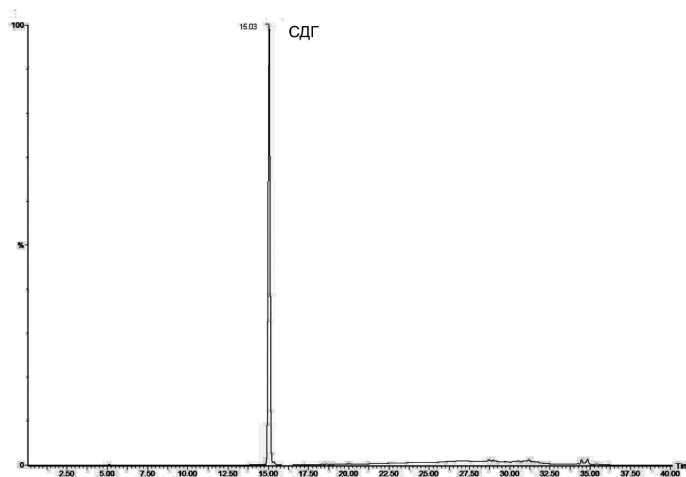


Рисунок 26 – ВЭЖХ хроматограмма выделенного СДГ

Причиной сорбции, которая имела место в данном процессе разделения на сорбенте С18, являются диполь-дипольные взаимодействия полярных молекул подвижной фазы, их сильное притяжение одна к другой. Это приводит к сольвофобному вытеснению менее полярных молекул из полярной среды элюента к неполярной поверхности сорбента. Роль поверхности неподвижной фазы – выступить акцептором молекул сорбата, ориентированных к ней гидрофобным фрагментом, и удерживать его слабыми дисперсионными силами. Наиболее существенными факторами удерживания сорбатов являются размеры их молекул, дипольный момент, поляризуемость и способность к гидрофобным взаимодействиям

неполярной части молекулы, обеспечивающая уменьшение площади неполярной поверхности при сорбции.

Данные по выходам и чистоте на каждом этапе выделения СДГ из лигнансодержащего экстракта последовательно на ионообменном и обращенно-фазном сорбентах приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Этапы выделения СДГ из лигнансодержащего экстракта семян льна масличного

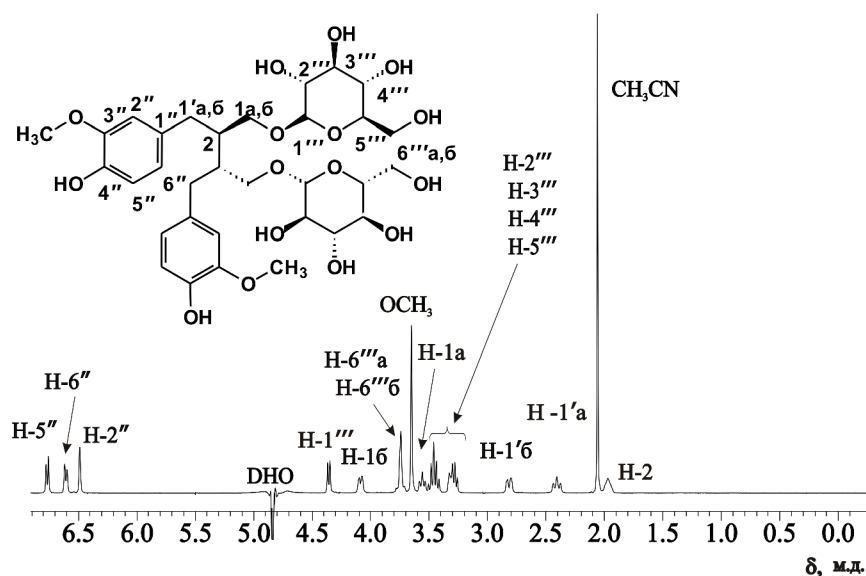
Стадии очистки СДГ-содержащего экстракта	Масса образца, г	Выход образца по отношению к экстракту, %	Чистота образца, %
СДГ-содержащий экстракт	23,2	100	6,2
СДГ-содержащая фракция после очистки на Diaion HP-20	4	17,2	31,0
СДГ-содержащая фракция после двукратной очистки на Diaion HP-20	0,8	3,4	65,0
СДГ-содержащая фракция после очистки на обращенно-фазном силикагеле С18	0,24	1,03	95,3

Проведение хроматографии на сорбенте Diaion HP-20 дает возможность разделить достаточно большое количество экстракта, отделить соли и полимеры от глюкозидов и получить удовлетворительный выход СДГ-обогащенной фракции, для ее последующей окончательной очистки на обращенно-фазном силикагеле С18.

Предложенный способ очистки дает возможность получить лигнан СДГ с чистотой 95,3% и выходом 1,03% по отношению к введенному экстракту [35].

### 3.3 Подтверждение структуры лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида, выделенного из семян льна масличного

Наряду с данными масс-спектрометрии, приведенными в пункте 3.2.1. Строение выделенного лигнана было подтверждено методом  $^1\text{H}$  ЯМР- и ИК-спектроскопии. В  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре полученного СДГ (рисунок 27) наблюдаются три сигнала в области 6,49–6,78 м.д., характерных для протонов 1,3,4-тризамещенного бензольного кольца с электродонорными заместителями. Синглетный сигнал при 3,65 м.д. принадлежит протонам метоксигруппы в ароматическом кольце.

Рисунок 27 –  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр СДГ

Также в спектре присутствуют сигналы алифатической части агликонового фрагмента. Мультиплетный сигнал принадлежит метиновому протону. Метиленовые протоны бензильной группы (Н-1'а, Н-1'б) проявляются в виде двух дублет дублетов при 2,40, 3,28 м.д., соответственно. Сигналы при 3,55 и 4,08 м.д. соответствуют метиленовым протонам Н-1а и Н-1б соседних с глюкозным остатком.

Наличие дублетного сигнала при 4,35 м.д., принадлежащего протону при первом атоме углерода глюкозы с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) 7,8 Гц, свидетельствует о  $\beta$ -конфигурации данного глюкозида [42].

Метиленовые протоны у шестого атома углерода глюкозы присутствуют в спектре в виде очень близкорасположенных дублет дублетов при 3,72, 3,76 м.д. Остальные сигналы протонов глюкозы Н-2''', Н-3''', Н-4''', Н-5''' проявляются в виде двух мультиплетов в области 3,25–3,53 м.д. В таблице 7 приведены сравнительные данные о результатах  $^1\text{H}$  ЯМР анализа СДГ.

Таблица 7 – Сравнение полученных данных  $^1\text{H}$  ЯМР анализа с литературными

Атом водо- рода	Химический сдвиг $\delta$ , м.д.						
	получен- ные данные (в $\text{D}_2\text{O}$ )	данные в литературе					
		[43] (в $\text{CD}_3\text{OD}$ )	[44] (в $\text{CD}_3\text{OD}$ )	[45] (в $\text{CD}_3\text{OD}$ )	[46] (в $\text{D}_2\text{O}+$ $\text{CH}_3\text{CN}$ )	[47] (в $\text{CD}_3\text{OD}$ )	[39] (в $\text{CD}_3\text{OD}$ )
Н-2	1,99	2,12	–	2,13	–	2,12	2,12
Н-1'а	2,40	2,59	2,60	2,62	2,34	2,60	2,61
Н-1'б	3,28	2,64	2,68	2,69	2,62	2,70	2,69
Н-2'''	3,25–3,53	3,21	–	3,21	3,09–3,60	3,19	3,215
Н-3'''		3,34	3,18–3,38	3,35		–	3,34
Н-4'''		3,29		3,30		–	3,30
Н-5'''		3,24	–	3,24		3,25	3,25
Н-1а	3,55	3,46	3,46	3,48	3,39	3,47	3,47
$\text{OCH}_3$	3,65	3,71	3,72	3,74	3,53	3,72	3,73
Н-6'''а	3,72	3,69	3,68	3,68	3,09–3,60	3,85	3,85
Н-6'''б	3,76	3,84	3,85	3,86	3,09–3,60	4,08	3,69
Н-1б	4,08	4,05	4,07	4,08	3,90	–	4,08
Н-1'''	4,35	4,22	4,23	4,24	4,16	4,24	4,24
Н-2''	6,49	6,62	6,57	6,59	6,41	6,58	6,58
Н-6''	6,61	6,57	6,55	6,57	6,60	6,56	6,56
Н-5''	6,78	6,64	6,64	6,64	6,46	6,64	6,65

*Примечание 1.* – «а» – Диастереотопный протон, соответствующей метиленовой группы, имеющий сильнополюсный сигнал.

*Примечание 2.* – «б» – Диастереотопный протон, соответствующей метиленовой группы, который имеет слабополюсный сигнал.

Как видно из таблицы 7, химические сдвиги хорошо согласуются с ранее установленными, а небольшое отличие объясняется различными системами растворителей, применяемыми при проведении анализа. В спектре также присутствует в результате неполного подавления сигнал при 4,83 м.д., относящийся к протону в ДНО (как примесь в используемом растворителе  $\text{D}_2\text{O}$ ). Сигнал при 2,06 м.д. принадлежит протонам ацетонитрила, который был применен в данном эксперименте в качестве внутреннего стандарта [48].

ИК-спектр также подтверждает структуру СДГ (рисунок 28).

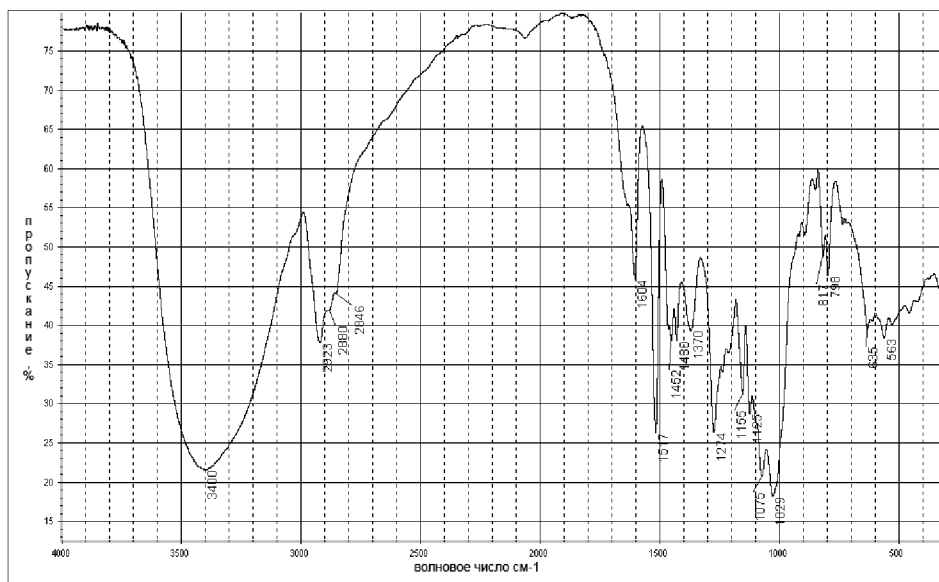


Рисунок 28 – ИК-спектр СДГ

Одна из наиболее характерных полос в ИК-спектре СДГ находится в области  $3400\text{ см}^{-1}$  и вызвана валентными колебаниями гидроксильных групп в данном соединении. Интенсивной полосой в области  $2846\text{ см}^{-1}$  также проявляются валентные колебания С-Н связей метильной группы фрагмента  $\text{CH}_3\text{-O-Ag}$ . Валентные и деформационные колебания С-С-связей бензольного кольца дают полосы умеренной интенсивности при  $1517$ ,  $1614$  и  $817$ ,  $885\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Полосе средней интенсивности при  $1370\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентные колебания связи  $\text{C}_{\text{Ag}}\text{-O}$ , несколько интенсивнее проявляются колебания в области  $1075\text{ см}^{-1}$ , соответствующие С-О-С-связи в глюкозидной части исследуемого соединения.

Приведенные данные полностью подтверждают структуры выделенного СДГ.

Таким образом, был разработан эффективный способ выделения диглюкозида секоизолярицирезинола из семян льна масличного, при котором проводят обезжиривание измельченного льняного семени, обезжиренную массу подвергают экстракции 50% водным раствором этанола, которая совмещена со щелочным гидролизом, при воздействии микроволнового излучения мощностью 150 Вт в течение 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин. Очистка экстракта включает в себя предварительное двукратное разделение лигнансодержащего экстракта на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 с использованием в качестве подвижной фазы водного раствора этанола со ступенчато возрастающим градиентом концентрации и очистку с применением обращенно-фазного сорбента силикагеля С18. Предложенный способ дает возможность выделить лигнан СДГ с чистотой 95.3% и выходом 0.24% по отношению к обезжиренному льняному семени, при этом используются экологически безопасные растворители. Разработаны также методики идентификации СДГ с помощью ТСХ и ВЭЖХ анализа, позволившие осуществить быструю качественную детекцию, а также количественную оценку лигнана.

#### Список литературы

1. [Электронный ресурс]. – ВОЗ, 2010. – Режим доступа: <http://www.who.int/ru/> – Дата доступа: 18.12.2010.
2. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity / V.A. Kurkin // Chemistry of Natural Compounds. – 2003. – Vol. 39, № 2. – С. 123–153.
3. Фенилпропаноиды как самостоятельный класс биологически активных соединений (учебное пособие) / В.А. Куркин [и др.] – Самара: Самарский ГМУ, 2005. – 130 с..
4. Куркин, В.А. Фармакогнозия / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», 2004. – 1180 с.

5. Противовоспалительные и репаративные свойства представителей семейства вересковые флоры Сибири и Дальнего Востока / М.В. Белоусов [и др.] // Бюллетень СО РАСМ. – 2001. – № 3. – С. 28–31.
6. Краснов, Е.А. Растения семейства толстянковых / Е.А. Краснов, А.С. Саратиков, Ю.Л. Суров. – Томск: Изд-во Томского университета, 1979. – 208 с.
7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
8. Corchete, P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin / P. Corchete // Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer Berlin Heidelberg, 2008. – P. 123–148.
9. Nyiredy, Sz. New components from *Silybum marianum* L. fruits: a theory comes true / Sz. Nyiredy [et al.] // Chromatographia. – 2008. – Vol. 68. – P. 5–11.
10. Сокольская, Т.А. Комплексная переработка плодов расторопши пятнистой и создание на ее основе препарата «силимар» / Т.А. Сокольская // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Том 34, №9. – С. 27–30.
11. *Silybum marianum* in vitro-flavolignan production / L. Tumova [et al.] // Plant Soil Environ. – 2006. – Vol. 52, № 10. – P. 454–458.
12. Щекатихина, А.С. Оценка содержания изомеров флаволигнанов расторопши пятнистой в гепатопротекторных препаратах / А.С. Щекатихина, Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко // Вестник БГУ. Серия 2. – 2010. – № 2. – С. 73–78.
13. Сокольская, Т.А. Создание лекарственных средств из плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества): дис. на соискание уч. степ. доктора фарм. наук: 15.00.02 / Т.А. Сокольская; Моск. мед. академ. им. И.М. Сеченова. – М., 2000. – 79 л.
14. Авдеева, Е.В. Лекарственные растения, содержащие фенилпропаноиды, как источник получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов: автореф. дис. на соискание уч. степ. доктора фарм. наук: 15.00.02 / Е.В. Авдеева; Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию. – Пятигорск, 2007. – 49 л.
15. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / С.В. Цаприлова, Р.А. Родионова // Вестник фармации. – 2008. – № 3, вып. 41. – С. 92–104.
16. Щекатихина, А.С. Получение биологически активных веществ из семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum*) / А.С. Щекатихина, Т.М. Власова, В.П. Курченко // Труды Белорус. гос. ун-та. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008. – Т.3. – С.202–209.
17. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды как биологически активные соединения и Стандартные образцы лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов / В.А. Куркин [и др.] // II Всероссийский съезд фармацевтических работников: Материалы съезда. – Сочи, 2005. – С. 93–95.
18. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений (монография) / В.А. Куркин [и др.] // Самара: ООО «Офорт», 2005. – 120 с.
19. Зубцов, В.А. Льняное семя, его состав и свойства / В.А. Зубцов, Л.Л. Осипова, Т.И. Лебедева // Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. – 2002. – Т. 46, № 2. – С. 14–16.
20. 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, № 2. – P. 195–203.
21. Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods / I.E. Milder [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 15. – P. 4643–4651.

22. Mazur, W. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health / W. Mazur, H. Adlercreutz // *Nutrition*. – 2000. – Vol. 16, № 7/8. – P. 654–658.
23. Dietary secoisolariciresinol diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats / J. Frank [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2004. – Vol. 92, № 1. – P. 169–176.
24. Pinoresinol–lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds / C. Hano [et al.] // *Planta*. – 2006. – Vol. 224, № 6. – P. 1291–1301.
25. Intestinal metabolism of rye lignans in pigs / L.V. Glitso [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2000. – Vol. 84, № 4. – P. 429–437.
26. Johnsson, P. Phenolic compounds in flaxseed. Chromatographic and spectroscopic analyses of glucosidic conjugates: Licentiate thesis / P. Johnsson; Swedish University of Agricultural Sciences. – Uppsala, 2004. – 36 p.
27. Determination of mammalian lignans in biological samples by modified gas chromatography/mass spectrometry / A. Bommarreddy [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2007. – Vol. 90, № 3. – P. 641–646.
28. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds / P. Johnsson [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48, № 11. – P. 5216–5219.
29. A dry mechanical method for concentrating the lignan secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed / B. Madhusudhan [et al.] // *LWT – Food Science and Technology*. – 2000. – Vol. 33, № 4. – P. 268–275.
30. 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.
31. 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, № 2. – P. 151–159.
32. Camel, V. Recent extraction techniques for solid matrices – supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls / V. Camel // *Analyst*. – 2001. – Vol. 126, № 8. – P. 1182–1193.
33. Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs / A. Egizabal [et al.] // *Analyst*. – 1998. – Vol. 123, № 8. – P. 1679–1684.
34. Zang, W. Microwave-assisted extraction of secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed hull / W. Zang, S. Xu // *J. Sci. Food Agric.* – 2007. – Vol. 87, № 8. – P. 1455–1462.
35. Стасевич, О.В. Получение и биологическая активность лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных: автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. хим. наук: 02.00.10 / О.В. Стасевич; Белорусский государственный технологический университет. – Минск, 2010. – 25 л.
36. Feng, W.S. A new stilbene glycoside from *Dryopteris sublaeta* / W.S. Feng [et al.] // *Yao Xue Xue Bao*. – 2005. – Vol. 40, № 12. – P. 1131–1134.
37. Рудаков, О.Б. Спутник хроматографиста / О.Б. Рудаков. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.
38. Полякова, З.П. Изопропиловый спирт / З.П. Полякова // *Химическая промышленность за рубежом*. – 1980. – № 4. – С. 54–68.
39. Struijs, K. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls / K. Struijs [et al.] // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68, № 10. – P. 1227–1235.
40. A new dihydrochalcone glucoside from Longdan Xiegan decoction / Y. Wang [et al.] // *Chinese Journal of Natural Medicines*. – 2008. – Vol. 6, № 4. – P. 259–261.

41. Glucosylation of caffeic acid with *Bacillus subtilis* X-23  $\alpha$ -amylase and a description of the glucoside / T. Nishimura [et al.] // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1995. – Vol. 80, № 1. – P. 18–23.
42. Brito-Arias, M. Synthesis and characterization of glycosides / M. Brito-Arias – Springer Science & Business Media, LLC, 2007. – 351 p.
43. Zhang, W. Purification of secoisolariciresinol diglucoside with column chromatography on a Sephadex LH-20 / W. Zang, S. Xu // *J. Chromatogr. Sci.* – 2007. – Vol. 45, № 4. – P. 177–182.
44. Isolation and characterization of flaxseed (*Linum usitatissimum*) constituents / S.H. Qui [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 1999. – Vol. 37, № 1. – P. 1–7.
45. Chimini, S. Complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of secoisolariciresinol diglucoside, a mammalian lignan precursor isolated from *Linum usitatissimum* / S. Chimini [et al.] // *Magn. Reson. Chem.* – 1999. – Vol. 37, № 12. – P. 860–863.
46. 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, № 2. – P. 195–203.
47. Degenhardt, A. Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography / A. Degenhardt, S. Habben, P. Winterhalter // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – Vol. 943, № 2. – P. 299–302.
48. Gottlieb, H.G. NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities / H.G. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman // *J. Org. Chem.* – 1997. – Vol. 62, № 21. – P. 7512–7515.

#### **EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PHENYLPROPANOIDS FROM MILK THISTLE AND FLAXSEED**

**V.P. Kurchenko\*, A.S. Schekatihina\*, O.V. Stasevich\*\*, E.V. Spiridovich\*\*\***

*\*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

*\*\*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus*

*\*\*\*Central Botanical Garden of the NAS, Minsk, Belarus*

In this article is shown that milk thistle and flaxseed is a unique source of phenylpropanoids. The developed isolation and purification methods are performed and shown physical and chemical characteristics of these substances. Established that the three-time ethanol extraction at high temperature with constant stirring allows up to 90% of all flavolignans contained in the milk thistle seeds. The differences in the component composition of individual flavolignans in milk thistle fruit, grown in different geographical regions of Europe enabled to distinguish two hemorases this medicinal plant. The necessity of applying the proposed approach, reverse phase HPLC for a reliable assessment of quantitative and qualitative composition of medicinal raw materials for drugs.

The effective isolation method of lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG) from flaxseed flax is performed. The proposed method of extraction and purification makes it possible to extract lignan SDG with a purity of 95,3% and yield 0,24% versus defatted flaxseed. Developed the methods for the identification of SDG by TLC and HPLC analysis, which allowed to carry out rapid qualitative detection and quantification of lignan.



## РЕФЕРАТЫ

УДК 581.522.4:581.9(476)

**Решетников В.Н., Гапанович В.Н., Володько И.К.** Государственная народнохозяйственная программа развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 годы «Фитопрепараты» – инновации в действии // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5, ч. 2. – С. 10–15.

В статье изложена роль и значение лекарственных и пряно-ароматических растений в медицинской практике и в питании человека. Освещены основные результаты выполнения Государственной народнохозяйственной программы развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 годы «Фитопрепараты», отражена роль науки в достижении важнейших параметров программы.

Библиогр. – 2 назв.

УДК 581.19+541.67

**Скаковский Е.Д., Киселев В.П., Тычинская Л.Ю., Шутова А.Г., Гончарова Л.В., Спиридович Е.В., Ламоткин С.А., Бовдей Н.А., Киселев П.А.** Разработка подхода для экспресс-анализа подлинности и качества эфирных масел на базе ЯМР-спектроскопии высокого разрешения // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5, ч. 2. – С. 16–26.

На базе <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии разработан подход, позволяющий проведение экспресс-анализа подлинности и качества эфирных масел. Для этой цели в качестве объекта исследования использованы образцы эфирных масел многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey) O.Kuntze), собранного в разные годы и разные фазы развития. Данные ЯМР-спектроскопии сопоставлены с результатами анализа образцов методом газо-жидкостной хроматографии.

Табл. 3. Ил. 2. Библиогр. – 14 назв.

УДК 547.913:543.544.32

**Коваленко Н.А., Супиченко Г.Н., Леонтьев В.Н., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Кухарева Л.В.** Динамика накопления и компонентный состав эфирных масел некоторых видов рода *Salvia* L. // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5, ч. 2. – С. 27–33.

Представлены результаты исследования динамики накопления эфирных масел *Salvia officinalis* L. и *Salvia sclarea* L. из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Показано, что главными компонентами эфирного масла *Salvia officinalis* L. являются β-пинен, 1,8-цинеол, α- и β-туйоны, линалоол, линалилацетат, борнилацетат и α-гумулен, причем соотношение α-/β-туйон, характеризующее хемотип *Salvia officinalis* L. из коллекции ЦБС, равно 10:1. Главными компонентами эфирного масла *Salvia sclarea* L. являются линалилацетат, линалоол, α-туйон, камфора, терпинолен.

Табл. 1. Ил. 4. Библиогр. – 17 назв.

УДК 547.9

**Подберезкин В.С., Червяковский Е.М., Янцевич А.В., Булыко С.Е., Гаранович И.М., Спиридович Е.В., Курченко В.П.** Хроматографическое определение сирингина в коре сирени различной видовой принадлежности // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5, ч. 2. – С. 34–39.

Сирингин – биологически активное соединение, проявляющее иммуномодулирующие, противоаллергические и противовоспалительные свойства. Его определение в растительном сырье представляет важную задачу с точки зрения современной фармакогнозии. В данной работе проведена характеристика спиртовых экстрактов коры сирени различной видовой принадлежности по содержанию сирингина методами ТСХ и ВЭЖХ. Показано, что в