

УДК [581.4 + 581.1]:633.521

В. В. ТИТОК¹, В. Н. ЛЕОНТЬЕВ², И. В. ЛАЙКОВСКАЯ², Е. В. ФЕСЬКОВА²,
И. М. ЖАРСКИЙ², академик Л. В. ХОТЫЛЕВА¹

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СОРТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО ПО СОДЕРЖАНИЮ ЛИГНАНОВ В СЕМЕНАХ

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск,²Белорусский государственный технологический университет, Минск

Поступило 04.06.2008

Введение. Растительные лигнаны – это комплексные полициклические соединения, обладающие фитоэстрогенной и, во многих случаях, значительной антиоксидантной активностью [1, 2]. Физиологическое действие лигнанов у растений проявляется в регуляции роста и развития, защите семян от вредных воздействий ультрафиолетового излучения и поражения растений грибными патогенами, в регуляции активности других вторичных метаболитов.

Основными биологически активными лигнанами семян являются секоизоларидезинола диглюкозид (SDG) (рис. 1), матаирезинол, ларидезинол, изоларидезинол, секоизоларидезинол [3].

Льняное семя – богатейший источник лигнанов. Содержание SDG у льна масличного может достигать 1,0–1,5% от массы семян и значительно превосходит его уровень у других масличных культур, зерновых злаков, бобовых культур, плодах и овощах [4]. Например, у ржи уровень SDG составляет около 0,001% от массы зерновки, в соевых бобах – 0,015% и в семечках тыквы – 0,05% [5].

Биологическая активность SDG в организме человека обусловлена его трансформацией микрофлорой кишечника до энтеродиола и энтеролактона. Эти соединения обладают выраженной антиоксидантной активностью за счет фенольных гидроксильных групп. Лигнаны связываются с рецепторами женского полового гормона – эстрадиола и таким образом влияют на секрецию половых гормонов. Благодаря этим свойствам SDG и другие лигнаны повышают иммунитет организма и обладают противоопухолевым действием. Вероятно, лигнаны могут ингибировать ферменты, вовлеченные в метаболизм половых гормонов, снижают доступность эстрогена, чем и нарушают рост опухолевых клеток половой сферы [6]. Лигнаны за счет снижения содержания холестерина в сыворотке крови обуславливают уменьшение риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и коронарная сердечная недостаточность, [7]. Влияние лигнанов на рецепцию эстрадиола может лежать в основе их антиаллергенного и противовоспалительного действия. Показано, что окислительный стресс является одной из причин диабета как типа 1, так и типа 2 [8]. Выявлено, что антиоксидантная активность SDG из семян льна масличного выше, чем у витамина Е [9], поэтому некоторые из клеточных и метаболических эффектов SDG на ожирение и диабет также могут осуществляться через опосредованные эстрогенные рецепторные механизмы [8].

Благодаря высокому содержанию биологически активных лигнанов, семена льна масличного могут быть использованы в качестве сырья для получения препаратов с профилактическими и лечебными свойствами. При создании фитопрепаратов нет необходимости выделять индивидуальные лигнаны, по-

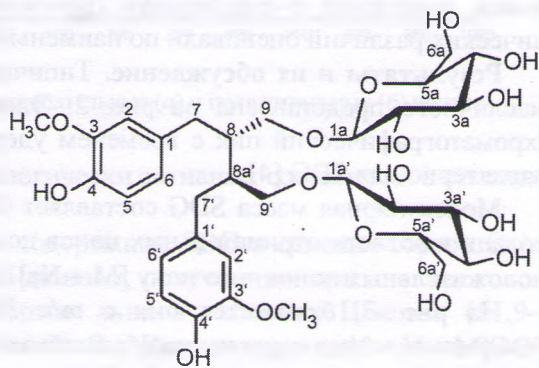


Рис. 1. Структура секоизоларидезинола диглюкозида (SDG; 2,3-bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-1,4-butane-diglucoside)

сколькx обнаружено их синергическое действие с другими биологически активными компонентами семян льна масличного, например, с ненасыщенными жирными кислотами [3, 10].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ биологически активных компонентов в семенах льна масличного для скрининга сортов с наибольшим удельным содержанием SDG и высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот.

Материалы и методы. Объектом исследования служили 9 сортов льна масличного (*Linum usitatissimum* L., var. *humile* Mill.) из коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, которые различались по семенной продуктивности и имели различное эколого-географическое происхождение: Atalante (Франция); Blue Chip (Венгрия); Omega, (США); Somme, Raluca (Чехия), Cyan (Польша); K-2398 (Китай); McGregor и Gold Flax (Канада).

Для контроля и количественного определения SDG в льняном семени были разработаны несколько методов, базируемых главным образом на тонкослойной хроматографии (TLC), газовой хроматографии (GC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), хромато-масс-спектрометрии HPLC (HPLC-MS) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса HPLC (HPLC-NMR) [11]. Результаты этих исследований оказались несогласованными, вероятно вследствие различий в методологии, поскольку большинство из них использует сложную предобработку образцов.

Поскольку основная масса SDG локализована в оболочках семян [2], на первом этапе работы проведено отделение оболочек от семядолей для получения фракции, обогащенной SDG. Липиды из полученной фракции удаляли экстракцией гексаном в аппарате Сокслета. SDG присутствует в семенах льна в виде соединенного эфирными мостиками олигомера или в виде полимера, состоящего из SDG и гидроксиметилглутаровой кислоты [12]. Поэтому для получения свободного SDG обезжиренную фракцию оболочек семян подвергали щелочному гидролизу. Гидролизат нейтрализовали уксусной кислотой, а лигнаны экстрагировали смесью этиловый спирт : 1,4-диоксан (1 : 1).

Экстракт анализировали с использованием высокоэффективного жидкостного хромато-масс-спектрометра «Waters», оснащенного диодно-матричным детектором PDA 996 и масс детектором «Micromass ZQ-2000» (ионизация – ESI) на колонке «HYPERASIL C18» длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм. В качестве подвижной фазы использовали 5%-ный ацетонитрил в фосфатном буфере pH 2,8 (раствор А) и 100%-ный ацетонитрил (раствор В) в соотношении А/В: 0 мин – 100 : 0, 30 мин – 70 : 30 и 30 мин – 30 : 70, при скорости элюирования 1 мл/мин [13].

Для количественного определения SDG использовали калибровочный график, построенный по стандартным растворам этого препарата (ChromaDex, USA). Определение удельного содержания масла в семенах льна масличного проводили с использованием аппарата Сокслета, в основе которого лежит многократная экстракция липидов из измельченного материала. Экстракцию и определение жирных кислот осуществляли по модифицированному нами методу Welch методом газожидкостной хроматографии на приборе Hewlett-Packard 4890D, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,32 мм × 30 м [14]. Йодное число, характеризующее концентрацию ненасыщенных компонентов с двойными связями в общем пуле жирных кислот, оценивали по содержанию в пробах пальмитолеиновой, олеиновой, линолевой, α-линоленовой, эйкозеновой и эруковой кислот [15]. Достоверность генотипических различий оценивали по наименьшей существенной разнице при $P < 0,05$ (НСР₀₅).

Результаты и их обсуждение. Типичная хроматограмма экстракта лигнанов из семян льна масличного представлена на рис. 2. Электронный спектр поглощения целевого компонента (хроматографический пик с временем удержания 17,29 мин) имеет максимум при 280 нм, что характерно для SDG [4].

Молекулярная масса SDG составляет 686 Da, поэтому на хроматограммах его идентифицировали в области отрицательных ионов по молекулярному иону $[M-H]^-$ с m/z 685,9; в области положительных ионов – по иону $[M + Na]^+$ с m/z 709,7 (рис. 3, а).

На рис. 3, б имеется пик с m/z 362,7, обусловленный протонированным агликоном SDG $[M + H - 2(\text{ангидрогексоза})]^+$. В области низких молекулярных масс наблюдается достаточно интенсивный сигнал с m/z 163,46, который можно отнести к протонированной ангидрогексозе $[\text{гексоза} + H - H_2O]^+$. Ион с m/z 137,31 соответствует гидроксиметокси-бензилиевому иону. В спектре отрицательных ионов сигнал с m/z 523,87 может быть отнесен к иону $[M - \text{ангидрогексоза}]^-$.

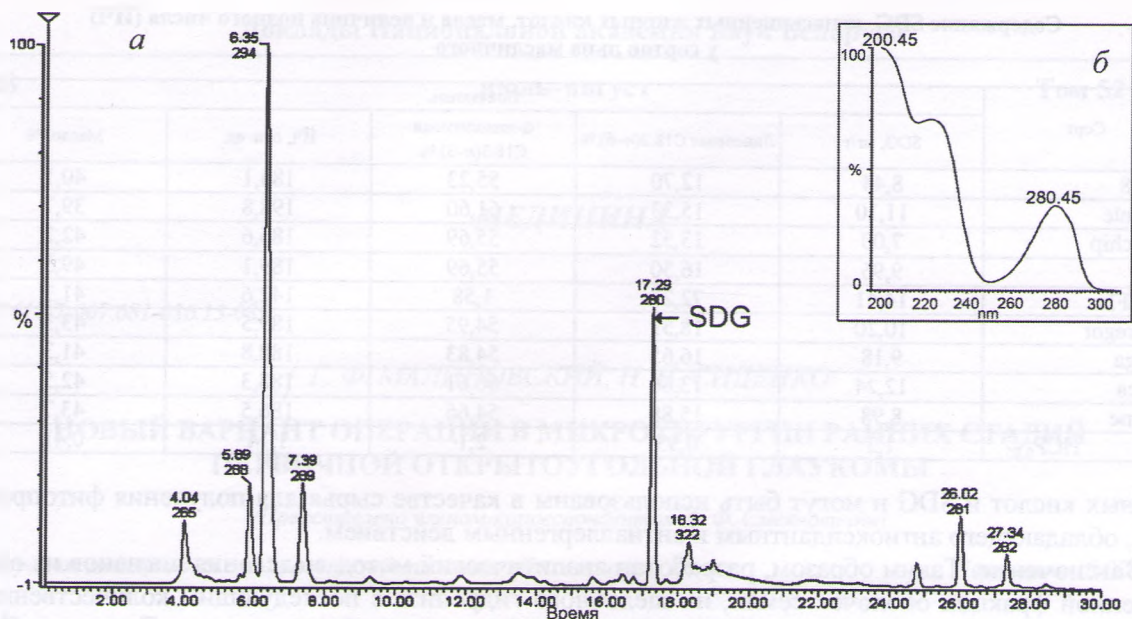


Рис. 2. Хроматограмма экстракта лигнанов из семян сорта Gold Flax (а) и электронный спектр SDG (б)

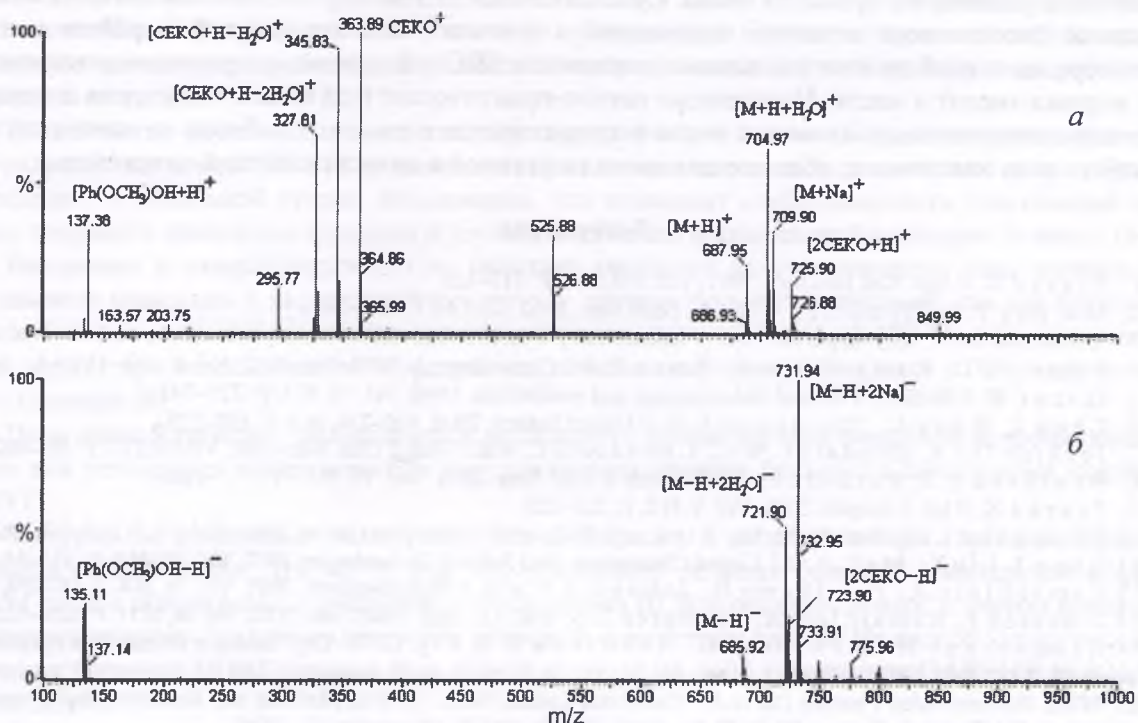


Рис. 3. Масс-спектры SDG, зарегистрированные в области отрицательных (а) и положительных (б) ионов

Результаты анализа содержания SDG и других биологически активных соединений в семенах сортов льна масличного представлены в таблице.

Анализ материала свидетельствует о наибольшем содержании SDG в семенах сортов Gold Flax, Суан и Raluca, что соответствует литературным данным, полученным при анализе генотипической вариабельности содержания SDG у сортов льна в условиях Швеции (11,9–24,3 мг/г) [4] и Китая (5,7–13,0 мг/г) [11]. В масле семян исследованных нами сортов льна выявлена широкая гетерогенность по содержанию ненасыщенных жирных кислот – линолевой C18:2 (12,7–72,2%), α -линоленовой C18:3 (1,6–61,6%) и, соответственно, величине йодного числа (142,6–198,8). Семена сортов Atalante и Raluca обладают оптимальным соотношением ненасыщенных

**Содержание SDG, ненасыщенных жирных кислот, масла и величина йодного числа (ЙЧ)
у сортов льна масличного**

| Сорт | Показатель | | | | |
|---------------------|------------|------------------------|----------------------------|--------------|----------|
| | SDG, мг/г | Линолевая C18:2(n-6),% | α-линоленовая C18:3(n-3),% | ЙЧ, отн. ед. | Масло, % |
| K2398 | 8,44 | 12,70 | 55,23 | 184,1 | 40,1 |
| Atalante | 11,10 | 15,33 | 61,60 | 198,8 | 39,7 |
| Blue chip | 7,00 | 13,52 | 55,69 | 186,6 | 42,2 |
| Cyan | 9,96 | 16,30 | 55,69 | 189,1 | 49,5 |
| Gold Flax | 14,41 | 72,23 | 1,58 | 142,6 | 41,3 |
| McGregor | 10,20 | 18,59 | 54,95 | 189,5 | 43,3 |
| Omega | 9,18 | 16,65 | 54,83 | 188,8 | 41,3 |
| Raluca | 12,24 | 13,66 | 56,61 | 188,3 | 42,5 |
| Somme | 8,98 | 15,88 | 54,66 | 186,5 | 43,7 |
| HCP _{0,05} | 1,3 | 0,93 | 2,1 | 1,14 | 0,41 |

жирных кислот и SDG и могут быть использованы в качестве сырья для получения фитопрепарата, обладающего антиоксидантным и антиаллергенным действием.

Закключение. Таким образом, разработан аналитический метод выделения лигнанов из обезжиренной фракции оболочек семян, их щелочного гидролиза с последующим количественным определением SDG при помощи высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Выявлена генотипическая гетерогенность по содержанию SDG в оболочках семян у сортов льна масличного различного происхождения. Сравнительный анализ сортов льна масличного по содержанию биологически активных соединений в семенах позволил идентифицировать и отобрать образцы с наибольшим удельным содержанием SDG и высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в масле. Полученные научно-практические результаты могут лечь в основу целенаправленного создания новых видов фитопрепаратов и пищевых добавок на основе лигнанов семян льна масличного, обладающих антиаллергенной и антиоксидантной активностью.

Литература

1. Prasad K. // Mol. Cell Biochem. 1997. Vol. 168, N 1. P. 117–123.
2. Murphy P. A., Hendrich S. // Adv. Food Nutr. 2002. Res. 44. P. 195–246.
3. Rickard S. E., Thompson L. U. // Inform. 1997. Vol. 8. P. 860–865.
4. Eliasson C., Kamal-Eldin A., Aman P. // J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 1012, N 1. P. 151–159.
5. Mazur W. // Baillière's clinical endocrinology and metabolism. 1998. Vol. 12, N 4. P. 729–742.
6. Chen J., Wang L., Thompson L. U. // Cancer Letters. 2006. Vol. 234, N 2. P. 168–175.
7. Jenkins D. J. A., Kendall C. W. C., Cunnane S. C. et al. // Am. J. Clin. Nutr. 1999. Vol. 69, N 3. P. 395–402.
8. Bhathena S. J., Velasquez M. T. // Am. J. Clin. Nutr. 2002. Vol. 76, N 6. P. 1191–1201.
9. Prasad K. // Int. J. Angiol. 2000. Vol. 9, N 2. P. 220–225.
10. Thompson L. U., Seidl M. M., Rickard S. E. et al. // Nutrition Cancer. 1996. Vol. 26, N 2. P. 159–165.
11. Chen J. Liu X.; Ma C.-Y. // J. Liquid Chromatogr. And Related Technologies. 2007. Vol. 30, N 4. P. 533–544.
12. Kamal-Eldin A., Peerlkamp N., Johnsson P. et al. // Phytochemistry. 2001. Vol. 58, N 4. P. 587–590.
13. Johnsson P., Kamal-Eldin A., Lundgren L. N. et al. // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48, N 11. P. 5216–5219.
14. Лайковская И. В., Титок В. В., Леонтьев В. Н. // Тр. БГТУ. Сер. химии и технологии органических веществ. 2004. Вып. XII. С. 179–183.
15. AOCS Recommended Practice Cd 1c-85. Calculated Iodine Value. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. Ed. by D. Firestone. 5th edn. AOCS. Champaign. IL. 1998.

TITOK V. V., LEONTIEV V. N., LAIKOVSKAYA I. V., FESKOVA E. V., ZHARSKY I. M., KHOTYLEVA L. V.

v.titok@igc.bas-net.by

HETEROGENEITY OF LINSEED CULTIVARS FOR THE LIGNAN CONTENT IN SEEDS

Summary

An analytical method for isolating lignans from a degreased fraction of seed coat, for their alkane hydrolysis followed by the quantification of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) was developed by high-effective liquid chromat-mass spectrometry (HPLC-MS). Genotypic heterogeneity was revealed for the SDG content in seed coats of linseed cultivars of different origin. Linseed cultivars with the highest specific content of SDG and a high content of unsaturated fatty acids in oil were selected during investigation. They are planned to be used as raw materials for producing a phytoagent exhibiting an antiallergenic and antioxidant activity.