

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННЫХ ФРАКЦИЙ ЛИГНАНА ДИГЛЮКОЗИДА СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА

In this work the mode of isolation of antioxidant and phytoestrogen secoisolariciresinol diglucoside (SDG) from flaxseed was performed. The process of isolation of this biological active compound includes sequential steps of receiving of SDG-reached extract and the separation of this extract using preparative column chromatography. In this work received SDG-reached extract was separated by gel permeation chromatography using gel TOYOPEARL HW-40 F column with 50% aqua's propanol-2 as eluent and using gel Sephadex LH-20 column with water as eluent. As a result the using of the gel Sephadex LH-20 achieves the higher purity of SDG-reached fractions and gives the opportunity to avoid using unsafe solvents for health and handling.

Введение. Наиболее перспективным направлением получения биологически активных веществ является их выделение из доступного растительного сырья. Это открывает возможность получения индивидуальных энантиомеров с применением доступных физико-химических методов, исключающих использование хроматографии с хиральными сорбентами.

Лигнаны представляют собой класс природных фенолов, обладающих широким спектром биологической активности. Эти соединения присутствуют в различных частях растений. Особенно богаты лигнанами семена льна масличного (*Linum usitatissimum*) – растения, широко культивируемого на территории Республики Беларусь.

Первые сообщения о выделении лигнана из льняного семени относятся к 1956 г. [1]. Этим соединением является (+)-[2*R*,2'*R*]-бис[(4-гидрокси-3-метоксифенил)метил]-1,4-бутандиол-бис(β-глюкопиранозид), или диглюкозид секоизоларицирезинола (SDG) Именно он обнаруживается в семенах льна в наибольшем количестве по сравнению с другими минорными лигнанами [2].

Лигнан диглюкозид секоизоларицирезинола обладает антиоксидантными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. В результате его действия повышается общий иммунитет, снижаются процессы воспаления. Известно, что лигнан SDG оказывает ингибирующее действие на вирусную обратную транскриптазу и обладает антигрибковым действием [3]. Мощный антиоксидантный потенциал SDG обусловлен наличием в его структуре агликоновой части, схожей со структурой ранее известного антиоксиданта нордигидрогуаретовой кислоты. SDG является фитоэстрогеном, так как его структура сходна с эндогенными эстрогенами млекопитающих. Указанные свойства позволяют ему «узнавать» эстрогенные рецепторы и связываться с ними.

Несмотря на то что льняное семя издавна считается источником здоровья и долголетия, необходимо помнить о присутствии в нем фитотоксичных веществ – цианогенных гликозидов (линамарин, линустатин, лотаустралин и

неолинустин). Более того при включении его в рацион питания возможны побочные эффекты, характеризующиеся проявлением льняного семени как слабительного средства, а высокая калорийность этого продукта, обусловленная наличием большого количества жиров, может привести к приобретению лишнего веса.

Очистка и выделение SDG из льняного семени даст возможность получать продукты, обладающие уникальными лечебными свойствами и не приводящие к нежелательным вышечисленным эффектам.

В связи с тем что в мире остро стоит проблема утилизации и производства различных органических растворителей, используемых в химической технологии для проведения процессов растворения, экстракции, хроматографии и т. д., наблюдается тенденция к минимальному использованию, а также к полной замене традиционных токсичных растворителей на более безопасные, такие как этанол и вода.

Основная часть. Цель данных исследований – разработка методики хроматографического разделения SDG-содержащих экстрактов из семян льна масличного с применением доступных сорбентов и использованием экологически безопасных растворителей.

Выделение SDG-обогащенного экстракта осуществляли по схеме, включающей в себя несколько стадий: обезжиривание измельченных оболочек льняного семени, их экстракцию, гидролиз с последующей нейтрализацией и концентрированием полученного экстракта. Наиболее важными стадиями являлись гидролиз и экстракция, так как именно они определяли выход экстракта и продолжительность процесса. Для выбора оптимальных условий проведения процесса экстракции были проанализированы ранее проведенные исследования в этом направлении [4–6]. Из ряда использованных экстракционных смесей мы выбрали водно-этанольную систему, обеспечивающую высокий выход экстрактивных веществ, а также безопасное проведение процесса. Более того эта система дает возможность избавиться уже на стадии экстракции от нежелательных цианогенных гликозидов, присутствующих в льняном семени.

Проведение процесса гидролиза мы совместили с процессом экстракции, что привело к сокращению продолжительности процесса до 1 ч при 60°C и до 15 мин при использовании микроволновой энергии.

Преобладающим методом для хроматографического разделения SDG-содержащего экстракта является использование различных видов силикагеля. Несмотря на то что чистота и выход SDG при использовании этих сорбентов удовлетворительные, существует проблема безопасности применения летучих токсичных растворителей, таких как метанол и хлороформ, поэтому при выборе сорбентов, на которых планировалось производить очистку SDG, мы исходили из необходимости избежать использования вышеуказанных растворителей.

Так как в случае применения силикагеля в качестве сорбента разделение компонентов системы основывалось на их различном сродстве к носителю и подвижной фазе, то мы подошли к разделению составляющих компонентов экстракта в соответствии с различием их молекулярных масс и за счет специфической сорбции компонентов разделяемой системы.

Таким образом, разделение экстракта проводили с применением гель-хроматографии. В качестве сорбентов использовали гидроксिलированный метакриловый полимерный гель TOYOPEARL HW-40 F и гидроксипропилированный декстрановый гель Sephadex LH-20.

При выборе подвижной фазы для разделения SDG-содержащего экстракта на указанных гелях мы придерживались критерия безопасности и эффективности разделения.

Разделение лигнансодержащего экстракта на колонке, заполненной гелем TOYOPEARL HW-40 F, проводили элюирующими системами, содержащими этанол и пропанол-2. Водно-этанольные системы не давали достаточно хорошего разделения, более того, способствовали повышению гидростатического давления в колонке, что заставляло вносить пробу в объеме, меньшем требуемого. Было апробировано разделение элюирующими системами, содержащими нетоксичный растворитель пропанол-2 в 100%-ной, 50%-ной концентрациях и водой. В результате использования каждой из систем были построены кривые элюирования, которые свидетельствовали о характере и качестве разделения (рис. 1).

Кривые элюирования показали, что при соотношении вода : пропанол-2 (1 : 1) в подвижной фазе, фракции, содержащие SDG, отделялись лучше, чем фракции, содержащие другие компоненты. При замене подвижной фазы на 100%-ный пропанол-2 наблюдалось менее четкое разделение SDG-содержащих фракций, а при использовании воды, в качестве подвижной фазы, разделения не наблюда-

лось. Такой результат обусловлен изменением вязкости и полярности элюирующей системы, в зависимости от концентрации пропанол-2 в подвижной фазе.

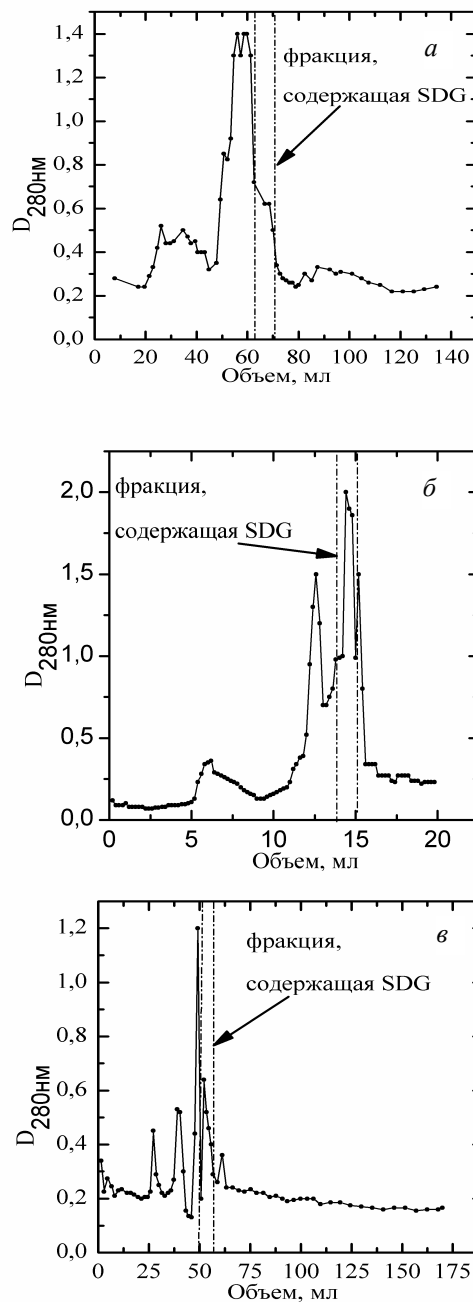


Рис. 1. Профили элюирования на геле TOYOPEARL HW-40 F при использовании в качестве подвижной фазы пропанол-2 (а), воды (б), 50%-ного водного пропанол-2 (в)

Качественный состав SDG-содержащих фракций анализировали с помощью метода тонкослойной хроматографии (рис. 2).

Разделение лигнансодержащего экстракта на колонке, заполненной гелем Sephadex LH-20, также проводили тремя элюирующими системами: этанол, 50%-ный водный этанол, вода. В результате хроматографического разделения

были построены кривые элюирования, которые показали, что наилучшее разделение достигалось при использовании в качестве подвижной фазы воды (рис. 3).

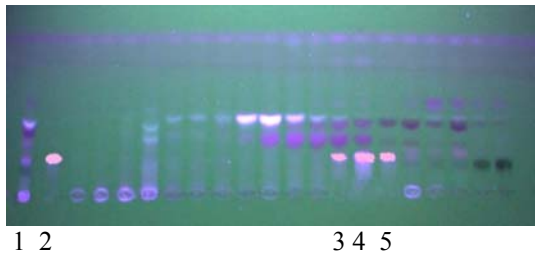


Рис. 2. Хроматограмма фракций, полученных при разделении на колонке с гелем TOYOPEARL HW-40 F (подвижная фаза – 50%-ный водный пропанол-2): 1 – SDG-содержащий экстракт; 2 – SDG; 3, 4, 5 – SDG-содержащие фракции

Фракции, соответствующие пикам на профиле элюирования, представленном на рис. 3, были проанализированы методом ТСХ (рис. 4).

Для количественной оценки разделения лигнансодержащих фракций был проведен ВЭЖХ анализ (рис. 5, 6). Параметры проведения хроматографии на этих сорбентах представлены в таблице.

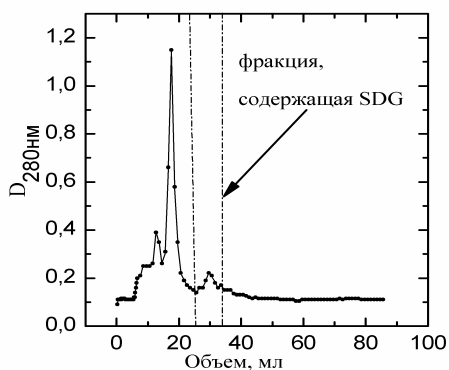


Рис. 3. Профиль элюирования на геле Sephadex LH-20 (подвижная фаза – вода)

Из приведенных рисунков видно, что в исходном образце содержится около 30 примесей. В очищенной фракции их значительно меньше и они присутствуют в малых концентрациях, что свидетельствует о высоком качестве разделения. В экстракте также присутствуют другие минорные лигнаны: пинорезинол, изоларицирезинол, пинорезинол, ларицирезинол. 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 SDG-содержащем экстракте флавоноидов диглюкозида хербатицина и диглюкозида каемферола.

Процентное содержание глюкозида кумаровой кислоты в экстракте в пересчете на обезжиренные семена составляет 0,95%, глюкозида феруловой кислоты и флавоноида диглюкозида хербатицина – около 0,6%, при том что содержание SDG в экстракте значительно превышает содержание описанных глюкозидов и составляет около 3%.

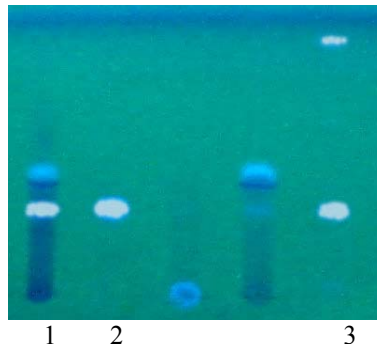


Рис. 4. Хроматограмма фракций, полученных при разделении на колонке с гелем Sephadex LH-20 (подвижная фаза – вода): 1 – SDG-содержащий экстракт; 2 – SDG; 3 – SDG-содержащая фракция

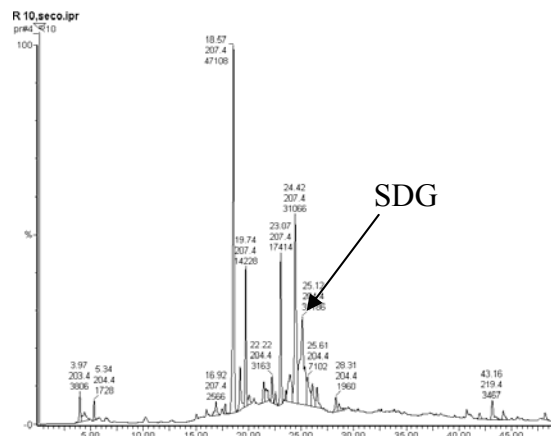


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма лигнансодержащей фракции



Рис. 6. ВЭЖХ-хроматограмма чистой фракции, полученной при разделении экстракта на геле Sephadex LH-20

Условия проведения и результаты хроматографии

Сорбент	TOYOPEARL HW-40 F	Sephadex LH-20
Объем сорбента, мл	146	30
Масса образца, г	0,02	0,03
Объем пробы, мл	3	3
Элюент	50%-ный водный пропанол-2	Вода
Продолжительность хроматографирования, ч	30	10
Выход SDG-содержащей фракции по отношению к введенному экстракту, %	0,03	0,1
Чистота SDG-содержащей фракции, %	41	56

Более того в экстракте могут присутствовать непрогидролизованные остатки олигомера, в состав которого SDG входит вместе с гидроксиметилглутаровой кислотой, и аминокислоты, образовавшиеся также в процессе гидролиза.

Наличие большого количества примесей усложняет задачу выделения SDG в чистом виде. Более того в основном примеси, присутствующие в экстракте, схожи по молекулярным массам, а их структуры характеризуются наличием фенольного кольца и глюкозидного остатка. Этот фактор может объяснять невозможность достижения высокого разделения на геле TOYOPEARL HW-40 F, так как принцип разделения на этом сорбенте был основан лишь на разделении веществ в соответствии с размерами их молекулярных масс. На геле же Sephadex LH-20 наряду с гель-хроматографией происходит также разделение за счет специфической сорбции углеводсодержащих молекул. Но так как многие из компонентов системы также содержат в своей структуре углеводы, разделение на сорбенте Sephadex LH-20 позволило получить SDG-содержащую фракцию только с чистотой 56%. Разделение на геле Sephadex LH-20 технологически более выгодно, так как позволяет внести пробу в большем количестве, провести процесс в 3 раза быстрее и получить фракции с большей чистотой и большим выходом по отношению к введенному экстракту.

Заключение. Таким образом, использование геля Sephadex LH-20 показало наилучшие результаты для разделения лигнансодержащих

компонентов по сравнению с другими сорбентами, применяемыми в гель-хроматографии в водно-спиртовых системах. Этим способом достигаются удовлетворительные чистота и выход SDG-содержащей фракции с применением экологически безопасного растворителя – воды.

Литература

1. Bakke, J. E. A new diglucoside from flaxseed / J. E. Bakke, H. J. Klosterman // Proc. North Dakota Acad. Sci. – 1956. – Vol. 10. – P. 18–21.
2. 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.] // Journal of Chromatography A. – 2002. – Vol. 972. – P. 195–203.
3. Flaxseed lignan in decrease prevention and health promotion / D. Neil [et al.] // Phytochemistry Reviews – 2003. – Vol. 2. – P. 401–417.
4. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds / Pernilla Johnsson [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 5216–5219.
5. Dietary secoisolariciresinol diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats / J. Frank [et al.] // British Journal of Nutrition. – 2004. – Vol. 92. – P. 169–176.
6. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction / C. Eliasson [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 1012. – P. 151–159.