

О. В. Стасевич, аспирант; С. Г. Михаленок, доцент

### ЭКСТРАКЦИОННЫЕ СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИГНАНСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИЦИЙ ИЗ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО

Three methods of receiving of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) extract from flaxseed using microwave-assisted extraction were performed. The first method included the using of 50% aqua's ethanol as a solvent for extraction with sequential alkaline hydrolysis. The second one included the using of 50% aqua's ethanol as a solvent for extraction witch was grouped with simultaneous alkaline hydrolysis. The third method included the extraction in the aqua's environment during simultaneous alkaline hydrolysis. The microwave treatment was spent during 5 minutes with the 150 W power of energy. The best results were achieved by the using of second method. The yield of SDG extract achieved by this method was 23,2%, the content of SDG in defatted seeds was 24,5 mg/g. The conditions for subjecting the received extract thin-layer chromatography analysis were worked out.

**Введение.** 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 [1]. Каждый из указанных компонентов влияет на пищевую, диетическую, лечебную и иную ценность льняного семени. В последнее время интерес к льняному семени возрос благодаря обнаружению в нем новых биологически активных соединений – лигнанов, обширной группы фенольных соединений растительного происхождения. Лигнан (+)-[2*R*,2'*R*]-бис-[(4-гидрокси-3-метоксифенил)-метил]-1,4-бутандиол-бис(β-глюкопиранозид), или диглюкозид секоизоларицирезинола (SDG) (рис. 1), обнаруживается в семенах льна в наибольшем количестве по сравнению с другими минорными лигнанами [2]. Причем, в семенах некоторых сортов льна масличного удельное содержание SDG составляет 1–2%, тогда как в семенах сои и зерновых культур его уровень не превышает 0,002 и 0,001% соответственно. В пределах одного сорта содержание лигнанов также сильно зависит от места произрастания и условий выращивания [3].

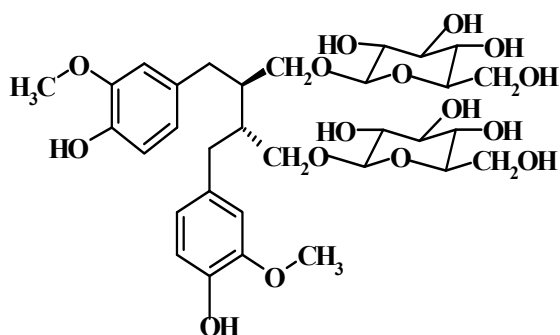


Рис. 1. Структура диглюкозида секоизоларицирезинола (SDG)

Установлено, что физиологическое значение лигнана для самого растения заключается в защите от вредного воздействия ультрафиоле-

тового излучения, поражения грибами и другими паразитами, поэтому максимальное содержание этого вещества в семенах приходится на оболочку. SDG также обладает антивирусным и бактерицидным действием. Именно благодаря совокупности этих свойств и в связи с выявленной способностью ингибировать ряд ферментов он проявляет себя как противоопухолевое средство, которое может применяться при профилактике и лечении онкологических заболеваний. В первую очередь это относится к заболеваниям, затрагивающим половую сферу (рак молочной железы, рак шейки матки, рак простаты) [4].

**Основная часть.** Цель данного исследования – разработать экстракционный способ получения SDG-содержащего экстракта из семян льна масличного. Общая схема, которой мы придерживались, включает в себя до 5 стадий [3]:

- 1) обезжиривание (семян/оболочек семян);
- 2) экстракция;
- 3) гидролиз;
- 4) нейтрализация;
- 5) концентрирование экстракта.

Так как основная масса SDG локализована в оболочках семян, то в первую очередь было проведено их отделение от семядолей и механическое измельчение. Полученную фракцию обезжиривали гексаном в течение 4 ч. Затем обезжиренные оболочки подвергались стадиям экстракции и гидролиза. Именно качество проведения этих стадий наибольшим образом влияет на выход экстракта и на содержание SDG в нем. Поэтому прежде чем разработать наиболее эффективный способ проведения экстракции и гидролиза, были проанализированы ранее проведенные исследования в этом направлении [3, 5–9].

В табл. 1 обобщены методики, в которых достигалось наибольшее содержание SDG в экстракте на обезжиренное сырье. Применение систем диоксан – этанол и метанол – вода позволяет достигнуть удовлетворительного содержания SDG в экстракте, но из-за высокой токсичности диоксана и метанола эти методы не достаточно безопасны для реализации.

Сравнение способов получения SDG-содержащего экстракта

| Соотношение количества сырья и экстрагента, г/мл | Условия проведения процесса               |                                  |                      |   | Содержание SDG в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г |
|--|---|----------------------------------|----------------------|---|--|
|  | Экстракция                                |                                  | Гидролиз             |   |  |
|  | Параметры проведения (время, температура) | Экстрагирующий агент             | Гидролизующий агент  | Параметры проведения (время, температура) |  |
| 1 : 8  | 48 ч, 60°С                                | Диоксан : 95%-ный этанол (1 : 1) | Водный NaOH, pH = 10 | 48 ч, 25°С                                | 11,7   |
| 1 : 20   | 3 ч, 60°С                                 | 70%-ный водный метанол           | Водный NaOH, pH = 10 | 3 ч, 25°С                                 | 12,9   |
| 1 : 6  | 24 ч, 25°С                                | 70%-ный водный этанол            | Водный NaOH, pH = 10 | 4 ч, 50°С                                 | 20,0   |
| Экстракция совместно с гидролизом                |   |                                  |                      |   |  |
| 1 : 10   | NaOH 50%-ный водный этанол, pH = 10       |                                  | 1 ч, 50°С            |   | 30   |
| 1 : 50   | Водный NaOH, pH = 10                      |                                  | 1 ч, 25°С            |   | 11,8   |
| 1 : 4  | Водный NaOH, pH = 10                      |                                  | 19 ч, 25°С           |   | 45,8   |

Поэтому при выборе экстрагента мы предпочли наиболее экологически безопасный растворитель водный этанол; кроме того, водно-спиртовая система дает возможность избавиться уже на стадии экстракции от нежелательных цианогенных гликозидов, присутствующих в льняном семени. Выбор 50%-ного водного этанола также обосновывается большим содержанием SDG в полученном экстракте по сравнению с использованием 70%-ного этанола. Способы экстракции, в которых в качестве экстрагента используется водная щелочь, также позволяют получать фракции с высоким содержанием SDG, но они требуют либо больших затрат времени, либо большого избытка растворителя по отношению к сырью, что увеличивает продолжительность и энергоемкость процесса на стадии концентрирования экстракта.

Особый интерес, с точки зрения решения проблемы повышения эффективности экстракции биологически активных веществ из растительного сырья, представляют методы с использованием микроволнового излучения. Использование микроволновой энергии дает возможность сократить расход экстрагента, а также продолжительность процесса за счет быстрого нагрева, разрыхления межмолекулярных связей полимеров и соответственно большей доступности компонентов экстрагируемого материала молекулам растворителя [10].

В соответствии с проведенным анализом нами было предложено и апробировано три способа получения SDG-содержащего экстракта:

1) экстракция 50%-ным водным этанолом в течение 15 мин при воздействии микроволно-

вого излучения с мощностью 150 Вт с последующим щелочным гидролизом;

2) экстракция 50%-ным водным этанолом в течение 15 мин при воздействии микроволнового излучения мощностью 150 Вт с совмещенным процессом щелочного гидролиза.

3) экстракция в водной среде в течение 15 мин при воздействии микроволнового излучения мощностью 150 Вт с совмещенным процессом щелочного гидролиза.

Время и мощность микроволнового воздействия также определялись в соответствии с тем, чтобы избежать разложения SDG.

Несмотря на то что SDG достаточно термостабилен при кратковременном воздействии температуры [11], его выход значительно снижается при продолжительном времени проведения микроволновой экстракции из-за процессов каталитической деструкции, имеющих место в растительном матрикс [12].

Результаты проведения экстракции различными методами приведены в табл. 2.

Из представленных данных видно, что наибольший выход экстракта, а также наибольшее содержание в нем SDG достигается при совмещении процессов гидролиза и экстракции водно-этанольной смесью.

При проведении экстракции водным этанолом с последующим гидролизом также получен экстракт с высоким содержанием SDG и удовлетворительным выходом экстрактивных веществ, что делает этот способ приемлемым для использования.

В случае экстракции, совмещенной с гидролизом в водной среде, был получен экстракт с наименьшим содержанием SDG.

Результаты проведения экстракции при использовании микроволнового излучения

| Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл | Условия проведения процесса                               |                       |                      |   | Выход экстрактивных веществ на обезжиренное сырье, % | Содержание SDG 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 : 10  | 7,5 мин, 150 Вт   | 50%-ный водный этанол | Водный NaOH, pH = 10 | 7,5 мин, 150 Вт   | 18,6   | 8,9  |
| Экстракция совместно с гидролизом               |   |                       |                      |   |  |  |
| 1 : 10  | NaOH 50%-ный водный этанол, pH = 10, 15 мин, 150 Вт       |                       |                      |   | 20,2   | 10,2   |
| 1 : 10  | Водный NaOH, pH = 10, 15 мин, 150 Вт                      |                       |                      |   | 16,7   | 7,8  |

Данные результаты можно объяснить тем, что выход SDG при проведении экстракции, сопровождаемой облучением микроволновой энергией, в большой степени зависит от концентрации этанола в воде. Ранее было показано [13], что наибольший выход SDG в экстракте наблюдается, когда в экстракционной смеси концентрация этанола находится в пределах от 40 до 50%. Это можно объяснить сольватационной способностью и диэлектрическими свойствами растворителя. И этанол, и вода – хорошие экстрагенты для SDG, тогда как вода является еще и отличным абсорбером микроволновой энергии.

Для качественного и количественного анализа полученных экстрактов использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ). ВЭЖХ является дорогостоящим методом, поэтому для многократных и рутинных определений качественного состава экстракта был выбран метод тонкослойной хроматографии. Качественный анализ состава экстракта осуществляли методом ТСХ на пластинах «Kieselgel 60 F254». Для этого был произведен подбор элюирующей системы, которая позволяла бы четко разделять компоненты системы, а также с точностью идентифицировать наличие SDG в смеси (экстракте).

Были подобраны и проанализированы следующие системы:

1. Хлороформ : этанол : вода (6 : 7 : 0,5) – при использовании этой системы имело место нечеткое разделение компонентов системы (дистанция между компонентами системы была недостаточной для их идентификации).

2. Этилацетат : этанол : муравьиная кислота : вода (77 : 13 : 5 : 10) – при использовании

этой системы имело место удовлетворительное разделение компонентов системы, но пятна компонентов были размыты, что не дало возможность их четко идентифицировать.

3. Вода : пропанол-2 : водный аммиак (1 : 8 : 1) – при использовании этой системы наблюдалось четкое разделение компонентов системы, а также при УФ-облучении фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флюоресценцию пятна, принадлежащего именно диглюкозиду секоизолярицирезинола, что дало возможность четко идентифицировать данный лигнан.

4. С применением элюирующих систем хлороформ : ацетон : муравьиная кислота (75 : 16,5 : 8,5), хлороформ : метанол (9 : 1), хлороформ : ацетон (65 : 35) разделение компонентов вообще не наблюдалось.

Результаты подбора элюирующей системы и  $R_f$  значения для SDG в различных условиях представлены в табл. 3 и на рис. 2.

Таблица 3

Условия и результаты проведения тонкослойной хроматографии

| Элюирующая система  | Окраска пятна SDG при УФ-облучении  | $R_f$ (SDG) |
|---|-------------------------------------|-------------|
| А. Вода : пропанол-2 : водный аммиак (1 : 8 : 1)                      | Бриллиантово-синяя с флюоресценцией | 0,24        |
| Б. Хлороформ : этанол : вода (6 : 7 : 0,5)                            | Фиолетовая без флюоресценции        | 0,23        |
| В. Этилацетат : этанол : муравьиная кислота : вода (77 : 13 : 5 : 10) | Фиолетовая без флюоресценции        | 0,12        |

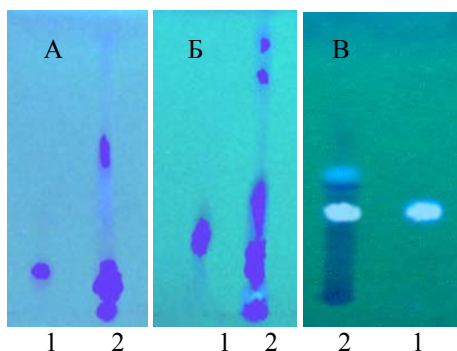


Рис. 2. ТСХ-хроматограммы экстракта и SDG в различных элюирующих системах:

- А – вода : пропанол-2 : водный аммиак (1 : 8 : 1);  
 Б – хлороформ : этанол : вода (6 : 7 : 0,5);  
 В – этилацетат : этанол : муравьиная кислота : вода (77 : 13 : 5 : 10); 1 – стандарт SDG;  
 2 – полученный SDG содержащий экстракт

**Заключение.** Таким образом, был разработан эффективный способ экологически безопасного получения SDG-содержащего экстракта с высоким содержанием в нем SDG, а также разработана методика для проведения качественного анализа SDG-содержащих экстрактов методом тонкослойной хроматографии.

#### Литература

1. Зубцов, В. А. Льняное семя, его состав и свойства / В. А. Зубцов, Л. Л. Осипова, Т. И. Лебедева // Журн. Рос. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. – 2002. – № 2. – С. 14–16.
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. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds / P. Johnsson [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 5216–5219.
4. Flaxseed lignan in decrease prevention and health promotion / Neil D. Westcott [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2003. – Vol. 2. – P. 401–417.
5. A Dry Mechanical Method for Concentrating the Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside in Flaxseed / B. Madhusudhan [et al.] // Lebensm.-Wiss. u. – Technol. – 2000. – Vol. 33. – P. 268–275.
6. Process for producing sdg and foods and drinks containing the same pat. US 20050158435A1 A23P 1/00 // Keiichi Abe, Taeko Iino, Wataru Fujii, Yoshinide Suwa; assignee Suntory Limited, Osaka (JP). – Appl. № 10/507,127; filed 11.03.2003; pub. date 27.07.2005.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs / A. Egizabal [et al.] // Analyst. – 1998. – Vol. 123. – P. 1679–1684.
11. Westcott, Neil D. Quantitation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal / Neil D. Westcott, Alister D. Muir // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 4048–4052.
12. Letellier, M. Microwave-assisted extraction of organic compounds / M. Letellier, H Budzinski // Analyst – 1999. – Vol. 27. – P. 259–271.
13. Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed / V. Beejmohun [et al.] // Phytochem. Anal. – 2004. – Vol. 92. – P. 169–176.