

В. Н. Леонтьев, доцент; В. В. Титок, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;  
И. В. Лайковская, мл. науч. сотрудник; С. Г. Михаленок, ст. преподаватель;  
О. В. Стасевич, аспирант; Е. В. Феськова, аспирант

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА ДИГЛЮКОЗИДА В ОБОЛОЧКАХ СЕМЯН ЛЬНА МАСЛИЧНОГО РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ

Flaxseed of 2005 year's harvest from the collection of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academic of Sciences of the Republic Belarus: Atalante (France); Blue Chip (Hungary); Omega (the USA); McGregor, Somme, Raluca, Cyan (Poland); K-2398 (China); Gold Flax (Canada). The method of isolation and analysis of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) are developed. For isolation of SDG the method of consecutive alkaline hydrolysis of defatted flaxseed hulls and extraction with ethyl alcohol and dioxane were used. The analysis of extracts was carried out with the aid high pressure liquid chromatography-mass spectrometry using «Waters» device applied with the diode-array detector PDA 996 and mass-detector «Micromass ZQ-2000» on the column «HY-PERSIL C<sub>18</sub>» (250 mm × 4,6 mm i. d.). During the research the content of SDG in flaxseed hulls of different cultivars was determined and the cultivars of flaxseed with the most specific content were chosen.

**Введение.** Льняное семя – один из богатейших источников лигнанов. Основными биологически активными лигнанами семян являются секоизоларицирезинола диглюкозид (SDG), матаирезинол, ларицирезинол, изоларицирезинол, секоизоларицирезинол и др. Наиболее ценным с точки зрения биологической активности, а также удельного содержания в семенах является SDG, причем его содержание в семенах льна масличного достигает аномально высокого уровня по сравнению с семенами других видов растений [1].

SDG, или диглюкозид 2,3-бис(3-метокси-4-гидроксифенил)бутан-1,4-диола (рис. 1), был идентифицирован в семенах льна в 1956 г. [2]. Молекулярная брутто-формула – C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>O<sub>16</sub>, его молекулярная масса – 686,71. Концентрация SDG в семенах льна масличного разных сортов может варьироваться от 1 до 2,6%. В пределах одного сорта содержание лигнанов зависит от места произрастания и условий выращивания [3, 4].

Под действием ферментных систем микрофлоры кишечника человека SDG превращается в два других лигнана в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2.

Энтеродиол и энтеролактон, также как и SDG, обладают широким спектром биологической активности.

Настоящая работа посвящена разработке методов выделения и хроматографического анализа SDG в семенах льна масличного различных сортов с целью определения сорта с наибольшим содержанием этого компонента.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования служили семена льна масличного урожая 2005 г. 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); McGregor, Somme, Raluca, Cyan (Польша); K-2398 (Китай); Gold Flax (Канада). Из литературных данных известно, что основная масса SDG локализована в оболочках семян [5]. Поэтому на первом этапе работы было проведено отделение оболочек от семядолей для получения фракций, обогащенных SDG. Из полученных фракций с помощью экстракции гексаном в аппарате Сокслета удаляли липиды. Обезжиренные фракции подвергали щелочному гидролизу.

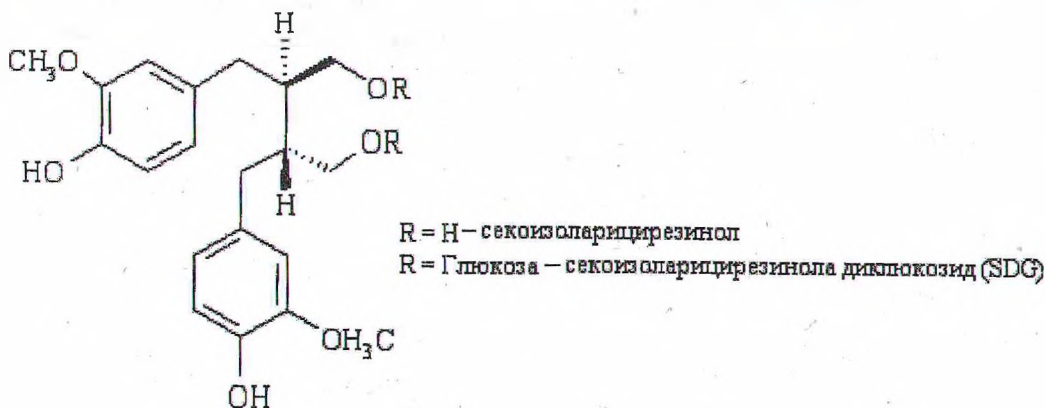


Рис. 1. Структура секоизоларицирезинола диглюкозида

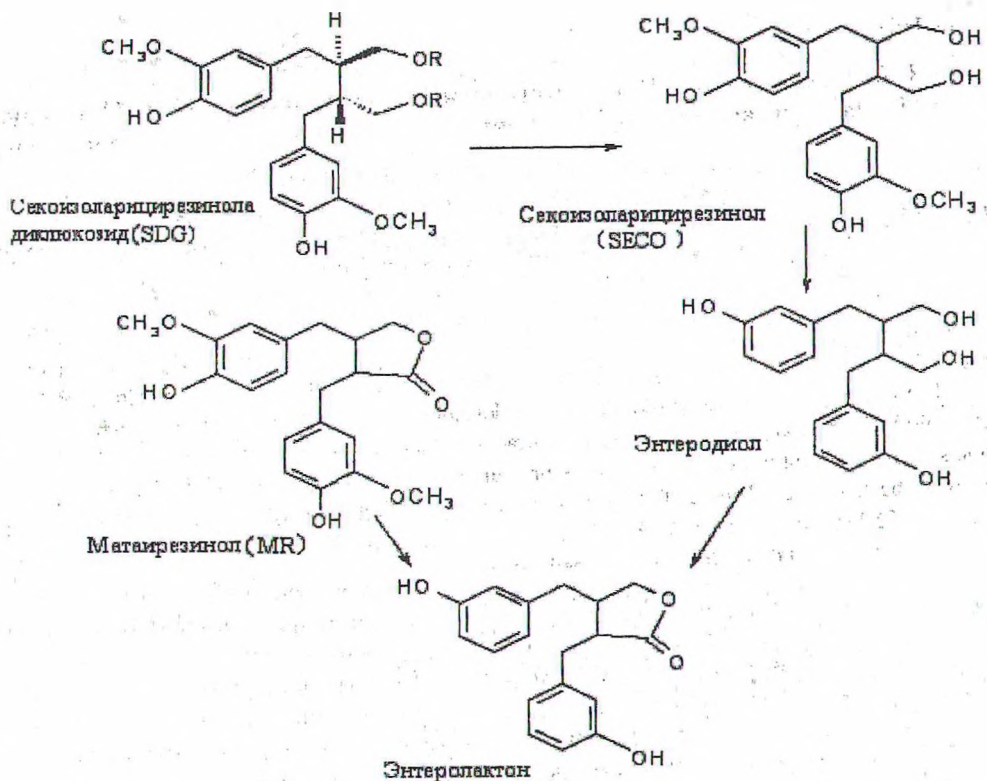


Рис. 2. Превращения растительных лигнанов в лигнаны млекопитающих микрофлорой кишечника

Гидролиз экстрактов необходим, так как большая часть SDG входит в состав полимерных гликозидов. При проведении кислотного гидролиза образуются посторонние вещества, осложняющие хроматографический анализ [6]. Хорошие результаты для выделения и анализа SDG дает ферментативный гидролиз, требующий для своего осуществления высокоочищенных ферментов. В связи с этим был выбран щелочной гидролиз в мягких условиях, который дает воспроизводимые результаты [7]. Полученные гидролизаты нейтрализовали уксусной кислотой, а лигнаны экстрагировали смесью этиловый спирт : 1,4-диоксан (1 : 1).

**Результаты и их обсуждение.** Полученные экстракты 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 C<sub>18</sub>» 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 ацетонитрил (раствор В) в соотношении А/В: 0 мин – 100 : 0, 30 мин – 70 : 30 и 30 мин – 30 : 70, при скорости потока 1 мл/мин [7].

Для количественного определения SDG использовали калибровочный график (рис. 3), построенный по стандартным растворам коммерческого препарата SDG (ChromaDct).

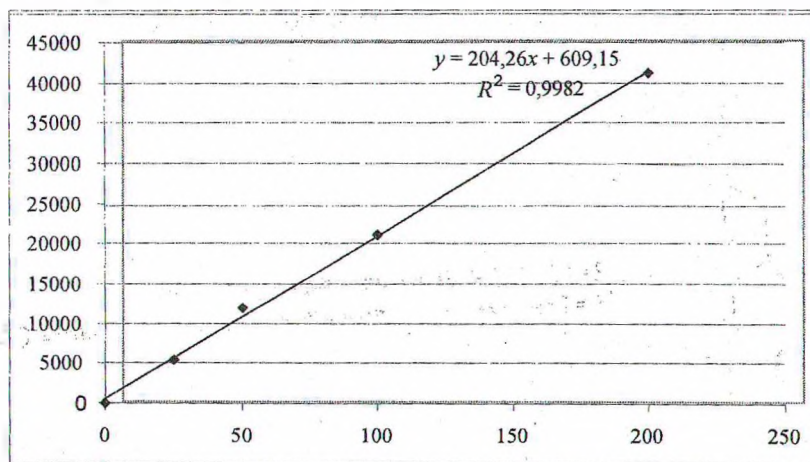


Рис. 3. Калибровочный график

В связи с тем что молекулярная масса SDG составляет 686, Да на хроматограммах идентифицировали его в области отрицательных ионов по молекулярному иону  $[M-H]^-$  с  $m/z = 685,9$  и в области положительных ионов – по иону  $[M+Na]^+$  с  $m/z = 709,7$ . Типичная хроматограмма представлена на рис. 4, масс-спектр – на рис. 5, а электронный спектр, полученный с помощью диодно-матричного детектора, – на рис. 6.

На рис. 5, 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  $[M-\text{ангидрогексоза}]^-$ .

Результаты количественных исследований по содержанию SDG в семенах льна масличного различных сортов представлены в таблице.

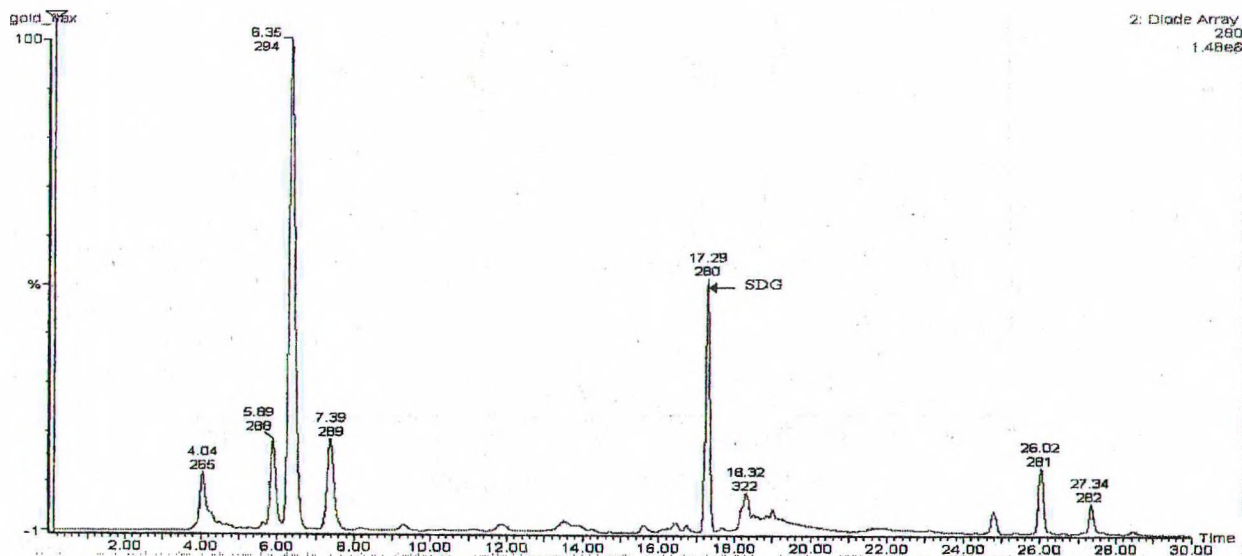


Рис. 4. Хроматограмма сорта Gold Flax

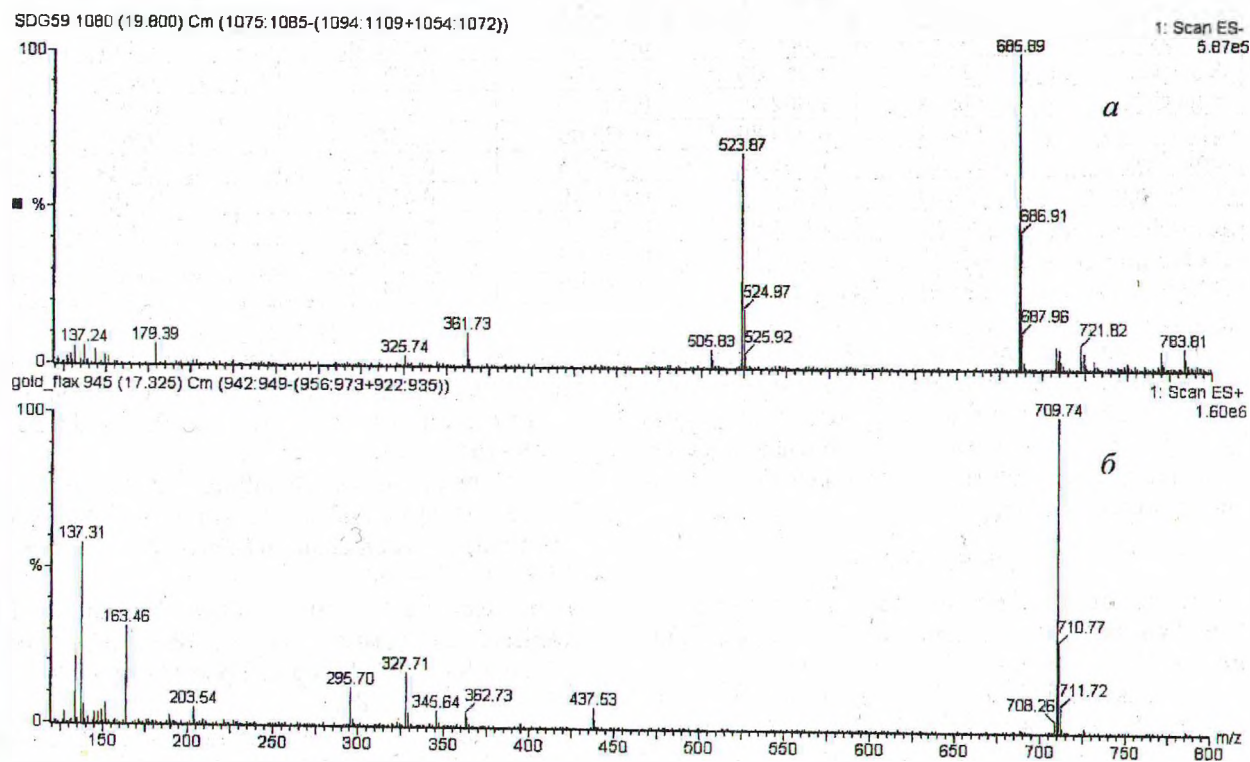


Рис. 5. Масс-спектры SDG, зарегистрированные в области отрицательных (а) и положительных (б) ионов

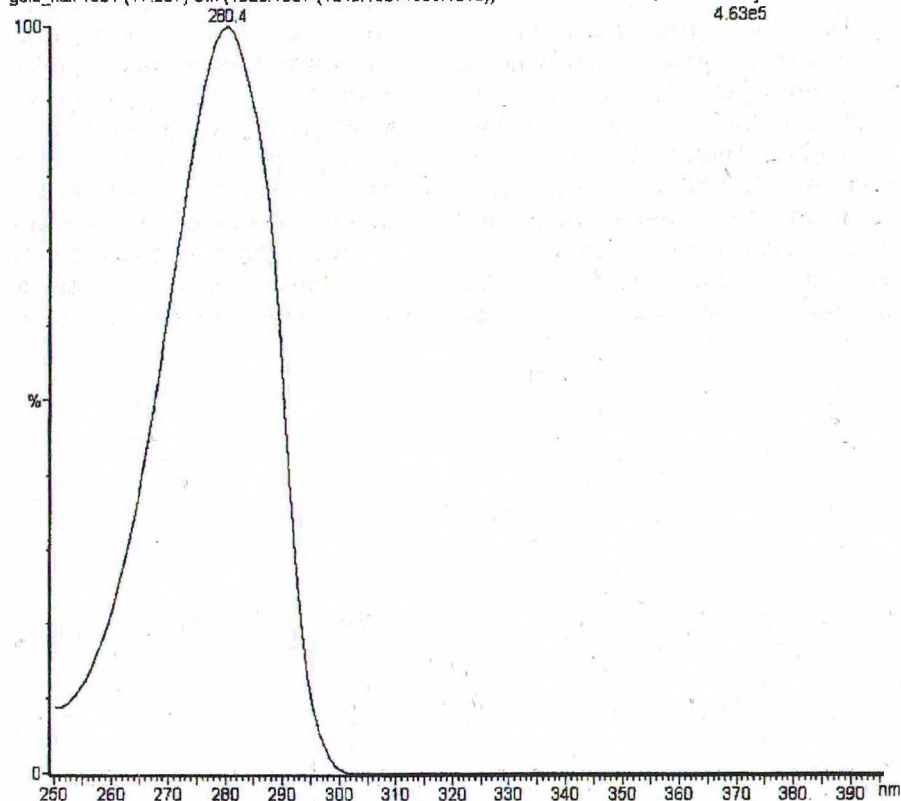


Рис. 6. Электронный спектр SDG

Таблица

## Содержание SDG в семенах сортов льна масличного

Сорт	Содержание в экстракте, мкг/мл	Масса семян, г	Масса фракции, обогащенной оболочками, г	Масса обезжиренной фракции, г	Содержание SDG в обезжиренной фракции, мг/г
K-2398	296,83	1,000 85	0,552 80	0,351 70	8,440
Atalante	300,46	1,003 00	0,400 35	0,270 75	1,097
Blue chip	248,54	1,002 80	0,581 20	0,355 25	6,996
Cyan	334,84	0,999 80	0,523 00	0,336 05	9,964
Gold Flax	483,23	1,001 70	0,495 15	0,335 25	14,414
McGregor	432,54	1,001 00	0,664 40	0,424 10	10,199
Omega	297,62	1,001 90	0,494 20	0,324 30	9,177
Raluca	392,15	1,002 15	0,497 65	0,320 35	12,241
Somme	331,21	1,000 95	0,584 20	0,368 90	8,978

Как видно из таблицы, наибольшая концентрация SDG обнаруживается в семенах льна сортов Gold Flax, Cyan, Raluca. Семена этих сортов планируется использовать для получения фитопрепарата, обладающего антиоксидантным и антиаллергенным действием.

## Литература

1. Rickard, S. E. Health effects of flaxseed mucilage, lignans / S. E. Rickard, L. U. Thompson // Inform. – 1997. – № 8. – P. 860–865.
2. Bakke, J. E. A new diglucoside from flaxseed / J. E. Bakke, H. J. Klosterman // Proc. North Dakota Acad. Sci. – 1956. – № 10. – P. 18–22.
3. Ward, R. S. // Nat. Products Chem. – 2003. – № 24. – P. 739.

4. Antitumorogenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed / L. U. Thompson [et al.] // Nutrition and cancer. – 1996. – № 26. – P. 159–165.

5. Oomah, B. D. Dehulling characteristics of flaxseed / B. D. Oomah, G. Mazza, E. O. Kenashuk // Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. – 1996. – № 29. – P. 245–250.

6. Identification and Stereochemical Characterization of Lignans in Flaxseed and Pumpkin Seeds / T. Sicilia [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2003. – № 51. – P. 1181–1188.

7. HPLC Method for Analysis of Secoisolariciresinol Diglucoside in Flaxseeds / P. Johnson [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – № 48. – P. 5216.