

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИГНАНОВ

В. Н. Леонтьев, С. И. Вакула*, О. В. Стасевич, И.В. Лайковская,
О. С. Игнатовец, В. В. Титок

УО «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск, Республика Беларусь,

*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Б», г. Минск, Республика Беларусь

Лигнаны (лат. *lignum* – дерево) – природные фенольные вещества, производные димеров фенилпропановых единиц, соединенных между собой β -углеродными атомами боковых цепей. Разнообразие соединений этой группы в природе, наличие активных гидроксильных групп и стереоизомерия делают их весьма важным источником биологически активных соединений. Физиологическая роль этих соединений заключается в регуляции процессов роста и размножения, защите растений от вредного действия ультрафиолетового излучения и поражения грибами, контроле действия других биологически активных соединений и т.п. Многие соединения этого класса обладают также антивирусными и бактерицидными свойствами. Лигнаны были найдены в наружном слое зерен пшеницы, ржи и риса, пищевых растительных волокнах, семенах льна, орехах, в некоторых ягодах, фруктах (вишне, яблоках) и овощах (чесноке, петрушке, моркови и др.). К настоящему времени идентифицировано несколько сотен природных лигнанов. Они встречаются как в свободной, так и связанной гликозидными связями с углеводами формах [1]. Удельное содержание лигнанов в растениях до сих пор точно не определено из-за сложных анализов различных лигнановых гликозидов, и данные, приведенные в литературе, сильно различаются (таблица 1).

Таблица 1- Содержание лигнанов в различных продуктах питания

Источник	Лигнаны	Содержание мг/кг	Ссылки
Льняное семя	Секоизоларицирезинол	2900 – 3700	/2/
	Матаирезинол	7–28,5	/3/
	Секоизоларицирезинола диглюкозид	11900 – 25900	/4/
Кунжут	Секоизоларицирезинол	293	/5/
	Матаирезинол	4,8	/5/
Злаковые	Секоизоларицирезинол	0,1 – 1,3	/6/
	Матаирезинол	0 – 1,7	/6/
Овощи	Секоизоларицирезинол	0,1 – 38,7	/5/
	Матаирезинол	следы – 0,2	/5/
Бобовые	Секоизоларицирезинол	0 – 15,9	/7/
	Матаирезинол	0–2,6	/7/
Фрукты	Секоизоларицирезинол	следы – 30,4	/8/
	Матаирезинол	0 – 0,2	/6/
Кофейные зерна	Секоизоларицирезинол	1,4 – 37,2	/9/
	Матаирезинол	0 – 0,8	/9/
Чай	Секоизоларицирезинол	15,9 – 81,9	/10/
	Матаирезинол	1,6 – 11,5	/10/

Химические структуры наиболее широко распространенных природных лигнанов представлены на рисунке 1.

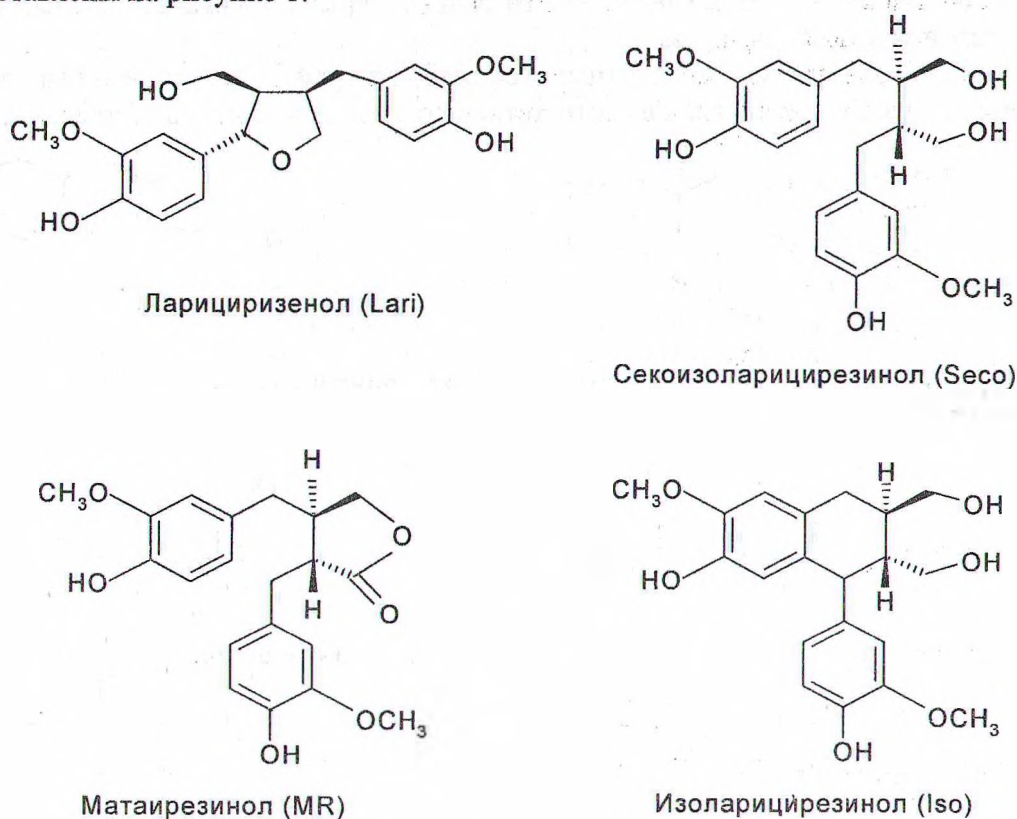


Рис. 1. Химические структуры природных лигнанов

Лигнаны относят к классу соединений называемых фитоэстрогенами т. е. веществ растительного происхождения, проявляющих гормоно-подобную (эстрогенную) активность в организме человека [11]. Эстрогенная активность этих соединений обусловлена их некоторым структурным сходством с женским половым гормоном эстрадиолом. Благодаря этому сходству, лигнаны связываются с рецепторами эстрадиола и таким образом влияют на секрецию половых гормонов, повышают иммунитет организма, обладают антиканцерогенным действием, в особенности в тех случаях, когда рак затрагивает половые сферы млекопитающих (рак простаты, рак молочной железы, рак шейки матки). Наличие фенольных гидроксильных групп делает эти соединения высокорекреакционными ингибиторами радикальных процессов в биологических тканях. Антиоксидантная активность лигнанов выше чем у таких соединений как α -токоферол и ионол [12]. Еще одним важным проявлением биологической активности лигнанами является защита от сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и коронарная сердечная недостаточность [13]. Причем, большинство авторов склоняются к тому, что эти активности обусловлены антиоксидантными свойствами лигнанов.

Льняное семя – один из богатейших источников лигнанов. Основными биологически активными лигнанами семян являются секоизоларицирезенола диглюкозид (SDG), матаирезинол, ларицирезенол, изоларицирезенол, секоизоларицирезенол 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 [13].

SDG или диглюкозид 2,3-бис(3-метокси-4-гидроксифенилен)бутан-1,4-диола был открыт в 1956 году [14]. Молекулярная брутто формула – $C_{32}H_{46}O_{16}$, его молекулярная

масса – 686,71. Концентрация SDG в семенах льна масличного разных сортов может варьировать от 1% до 2,6%. В пределах одного сорта содержание лигнанов зависит от места произрастания и условий выращивания [1, 15].

SDG под действием ферментных систем микрофлоры кишечника человека превращается в два других лигнана в соответствии со следующей схемой (рисунок 2):

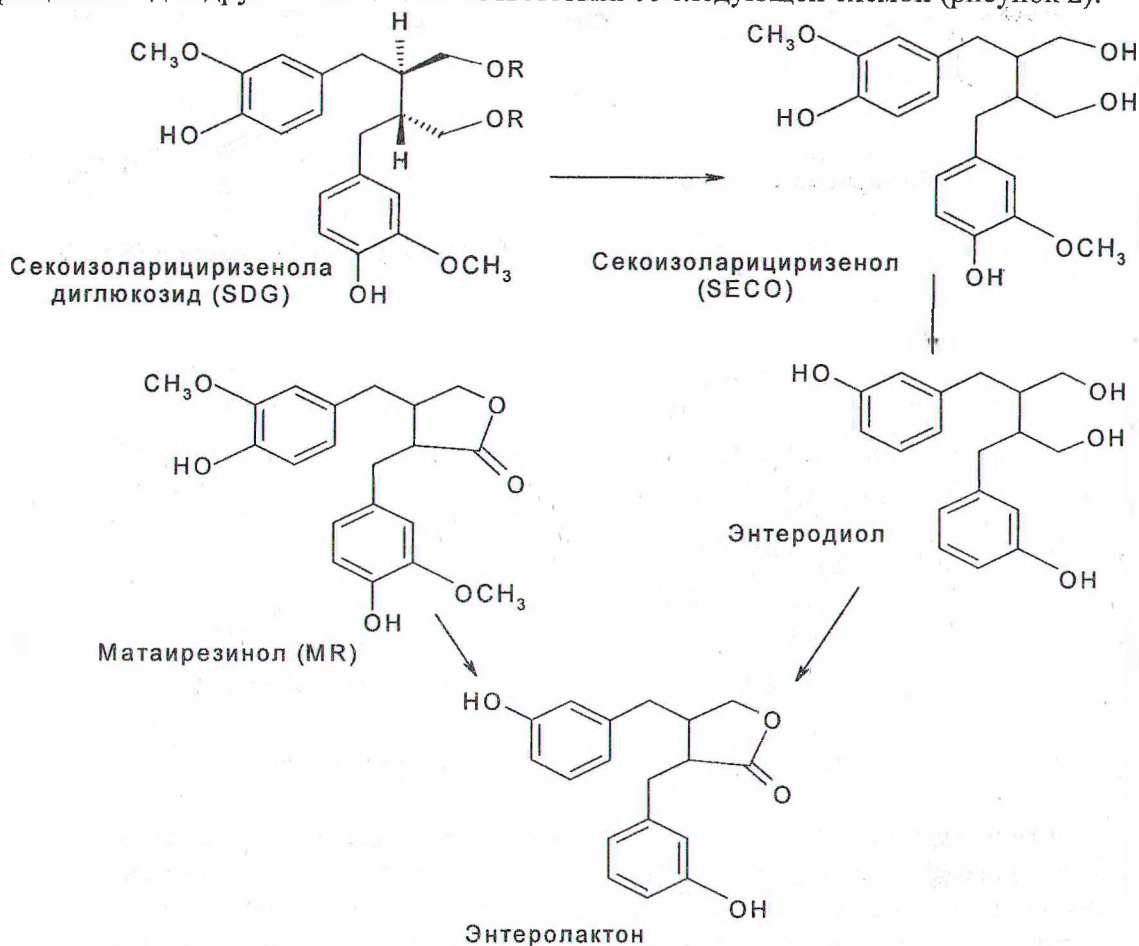


Рис. 2. Превращения растительных лигнанов в лигнаны млекопитающих микрофлорой кишечника

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

Настоящая работа посвящена анализу содержания SDG в семенах льна масличного различных сортов с целью разработки технологии получения отечественного фитопрепарата. Семена льна масличного урожая 2005 года коллекции ИГиЦ, 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), подвергали разрушению и отбирали фракции богатыми оболочками семян. Из полученных фракций с помощью экстракции гексаном в аппарате Сокслета удаляли липиды. Обезжиренные фракции подвергали щелочному гидролизу, гидролизаты нейтрализовали и лигнаны экстрагировали смесью этиловый спирт/1,4-диоксан (1:1). Полученные экстракты анализировали на колонке BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм, с диодно-матричным и масс-детекторами на хроматомасс-спектрометре «Waters Micromass ZQ 2000» с электроспреей ионизацией (ESI).

Для количественного определения SDG использовали калибровочный график построенный по стандартным растворам коммерческого препарата ChromaDct. В связи с тем, что молекулярная масса SDG составляет 686 Da его на хроматограммах идентифицировали в области отрицательных ионов по молекулярному иону $[M-H]^-$ с m/z 685,9 и в области

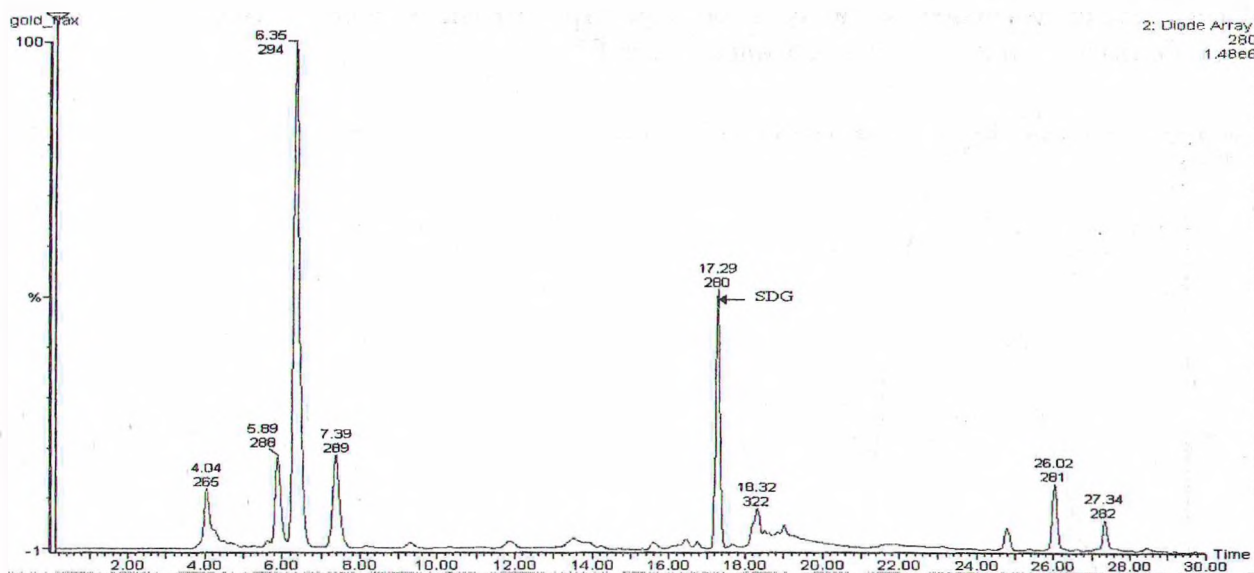


Рис. 3. Хроматограмма образца Gold Flax

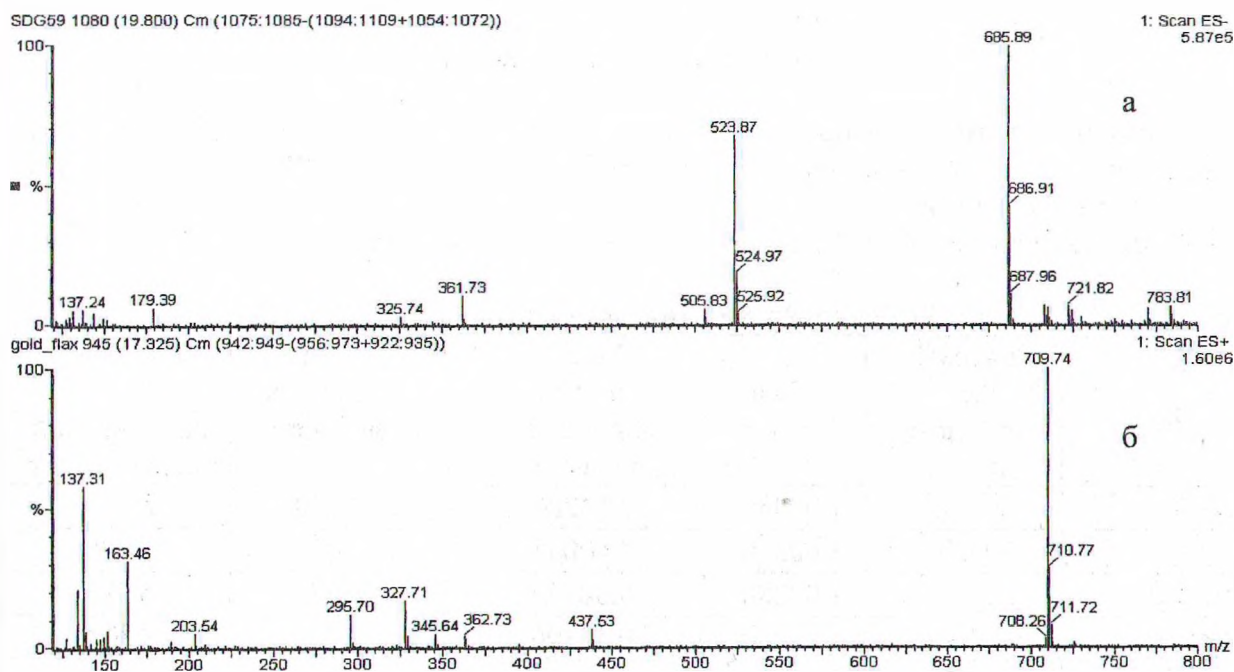


Рис.4. Масс-спектры SDG, зарегистрированные в области отрицательных (а), и положительных (б) ионов

положительных ионов – по иону $[M+Na]^+$ с m/z 709,7. Типичная хроматограмма представлена на рис.3, а масс- и электронный спектры на рисунках 4 и 5 соответственно.

На рисунке 4б 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 гидроксиметоксибензилиевому иону. В спектре отрицательных ионов сигнал с m/z 523,87 может быть отнесен к иону $[M-\text{ангидрогексоза}]^-$.

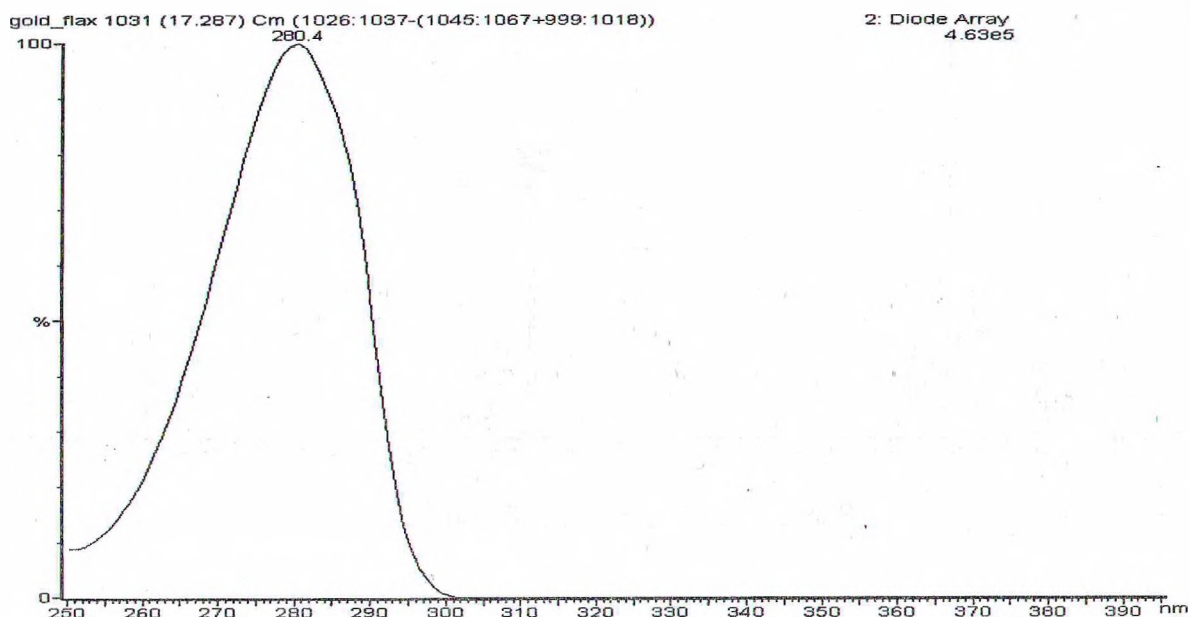


Рис. 5. Электронный спектр SDG

Полученные нами результаты хорошо согласуются с [16], и могут быть корректно использованы для идентификации и количественного определения SDG в семенах льна масличного разных сортов.

Результаты количественных анализов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - 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
К 2398	296.83	1.00085	0.55280	0.35170	8.440
Atalante	300.46	1.00300	0.40035	0.27075	11.097
Blue chip	248.54	1.00280	0.58120	0.35525	6.996
Суан	334.84	0.99980	0.52300	0.33605	9.964
Gold Flax	483.23	1.00170	0.49515	0.33525	14.414
McGregor	432.54	1.00100	0.66440	0.42410	10.199
Omega	297.62	1.00190	0.49420	0.32430	9.177
Raluca	392.15	1.00215	0.49765	0.32035	12.241
Somme	331.21	1.00095	0.58420	0.36890	8.978

Проведенные исследования показали, что наибольшее удельное содержание SDG наблюдается у сорта Gold Flax. Семена этого сорта льна масличного планируется использовать для получения фитопрепарата, обладающего антиоксидантным и антиаллергенным действием.

Литература

1. Ward R.S., Stud. // Nat. Products Chem. 24, 2003 P 739.
2. Mazur W., Fotsis T., Ojala S., A. Salakka, H. Adlercreutz // Anal. Biochem. 233, 1996, p 169.
3. Kraushofer, T. and Sontag, G.. Determination of matairesinol in flax seed by HPLC with coulometric electrode array detection. // Journal of chromatography B, 777: 2002, p 61-66.
4. Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Aman, P. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction // Journal of chromatography A, 1012: 2003. p 151-159.
5. Milder I.E.J., Arts I.C.W., van de Putte B., Venema D.P., Hollman P.C.H., Br. J. Nutr. 93, 2005 P 393.
6. Mazur, W. and Adlercreutz, H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment, naturally occurring oestrogens in food. // Pure and applied chemistry, 70: 1998, p 1759-1776.
7. Mazur, W., Duke, J.A., Wahala, K., Rasku, S., Adlercreutz, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. // Nutritional biochemistry, 9: 1998 p 193-200.
8. Mazur, W.. Phytoestrogen content in foods. // Bailliere's clinical endocrinology and metabolism, 12: 1998, p 729-742.
9. Mazur, W., Uehara, M., Wahala, K., Adlercreutz, H. Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. // British journal of nutrition, 83: 2000 p 381-387.
10. Mazur, W., Wahala, K., Salakka, A., Hase, T., Adlercreutz, H. Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. // British journal of nutrition, 79: 1998, p 37-45.
11. Ayres D.C., Loike J.D. Lignans. Chemical, biological and clinical properties. // Chemistry & Pharmacology of Natural Products. Ed.:Phillipson J.D., Ayres D.C., Baxter H. // Cambridge University Press. 1990; P 402.
12. Kitts D.D., Yuan Y.V., Wijewickreme1 A.N. and Thompson L.U. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. // Molecular and Cellular Biochemistry 202: 1999, p 91-100.
13. Rickard, S. E. and Thompson, L. U. Health effects of flaxseed mucilage, lignans. Inform, 8, 1997, P. 860-865.
14. Bakke J.E., Klosterman H.J. A new diglucoside from flaxseed. // Proc. North Dakota Acad. Sci. 10: 1956 p 18-22.
15. Thompson, L.U., Seidl, M.M., Rickard, S.E., Orcheson, L.J., Fong, H.S. Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. // Nutrition and cancer, 26: 1996 p 159-165.
16. M. Bambagiotti-Alberti, S.A. Coran, C. Ghiara, V. Giannellini. Revealing the mammalian lignan precursor secoisolariciresinol diglucoside in flax seed by ionspray mass spectrometry. // Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994, Vol. 8, P. 595-598