

**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS
Volume LIV, Issue 1
Plovdiv, October 19-20, 2007**

НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И
ТЕХНОЛОГИИ 2007”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND
TECHNOLOGIES 2007’**

НАУЧНИ ТРУДОВЕ

Том LIV, Свитък 1

Пловдив, 19 - 20 октомври 2007



Фенольные вещества семян рапса:

состав и антилиполитическая активность

Черно Наталия, Крусир Галина, Мочуляк Вероника

Phenol compounds of rape seed: their content and antilipolytic activity

Cherno N.K., Krusir G.V., Mochulyak V.V.

Rape seeds' samples as prospective components of food supplements, which can be used in cases of different dysfunctions, accompanied with lipolytic enzymes' high activity were investigated. Chemical content of rape seed phenol compounds was studied. Fractioning and determination of antilipolytic activity was conducted for the purpose of determination of a substance, which has an inhibitory activity concerning lipases.

Метаболизм липидов представляет собой тонкий баланс между синтезом и деградацией жиров, в частности триглицеридов. Нарушение этого баланса приводит к возникновению многих патологических состояний, приводящих к развитию опасных заболеваний, таких как атеросклероз, гипертензия, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания и др. [1,2].

Ключевым ферментом липидного обмена в организме является панкреатическая липаза, которая расщепляет в кишечнике пищевые триглицериды, переводя их в усваиваемую организмом форму [1]. Возможность влиять на панкреатическую липазу с целью угнетения ее активности, имеющая значение при атеросклерозе, ожирении, остром панкреатите и др., используется при создании лечебных средств и БАД, поэтому поиск и исследование ингибиторов липолитических ферментов растительного происхождения с целью включения их в состав БАД являются актуальными задачами.

В настоящее время в Украине работы многих ученых посвящены изучению липазотропной активности (способности влиять на активность липазы) различных биологически активных веществ [2-5]. Подобные исследования проводятся также японскими, китайскими, индийскими учеными [7,8]. Биологически активными веществами, проявляющими липазотропную активность, являются фенольные соединения [1,6-9]. Они могут быть безопасными и эффективными компонентами медицинских препаратов и биологически активных добавок.

Известно, что фенольные соединения рапса имеют высокую антиоксидантную и антибактериальную активность, способны ингибировать клетки меланомы и раковые клетки молочной железы, простаты, толстого кишечника, легких. Основными фенольными компонентами семян рапса являются фенольные кислоты и их производные [10], растворимые и нерастворимые танины [11,12]. Фенольные кислоты рапса являются производными бензойной и циннаминовой кислот и присутствуют в семенах рапса в свободной, эстерифицированной, гликозидной и

нерастворимо-связанной формах. В семенах рапса также содержатся растворимые и нерастворимые танины, которые обычно относят к полифенольным соединениям.

Цель исследования — изучение содержания основных фенольных соединений в семенах рапса ярового (*Brassica napus* var. *oleifera*) сорта "Галицкий" и определение их ингибиторной активности по отношению к панкреатической липазе. В статье приводятся данные относительно фракционирования фенольных соединений с помощью колоночной хроматографии (количественный анализ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ) (качественный анализ), выделения и идентификации полифенолов, а также определения ингибиторной активности фенольного комплекса семян рапса и его отдельных фракций по отношению к панкреатической липазе.

Объект исследования — семена рапса урожая 2005–2006 гг., выращенные на юге Украины. Для получения комплекса фенольных соединений измельченные семена рапса предварительно исчерпывающе экстрагировали гексаном в аппарате Сокслета для удаления липофильных веществ. Полученную муку высушивали при 40 °С под вакуумом до полного удаления растворителя. Затем ее экстрагировали 95 %-м этанолом в объемном соотношении (10:1) при комнатной температуре с использованием гомогенизатора (60 °С, 5000 об/мин). Центрифугировали (10 мин, 6000хg), супернатанты собирали, объединяли, выпаривали при 40 °С под вакуумом до полного удаления растворителя. Содержание фенольных соединений оценивали, используя метод Фолина–Дениса [13]. Общее содержание фенольных компонентов, *C*, в миллиграмм-эквивалентах *транс*-синаповой кислоты на 1 г обезжиренной муки (мг ЭСК/г семян рапса), рассчитывали по формуле:

$$C = k(0.1721A_{725} - 0.0124)$$

где *k* — коэффициент разведения, колеблющийся от 3000 до 10000, *A*₇₂₅ — оптическая плотность при 725 нм.

Были исследованы низкомолекулярные фенольные соединения семян рапса. Разделение фенольных компонентов экстрактов семян рапса на отдельные фракции осуществляли с помощью хроматографии на стационарной колонке с Sephadex LH-20. В качестве подвижной фазы использовали метанол. Абсорбцию элюатов измеряли при длине волны 326 нм, контур хроматограммы определяли, основываясь на абсорбции отдельных фракций в сравнении с метанолом, на спектрофотометре СФ-26 [14].

Для определения качественного состава полученные фракции переносили на пластины ТСХ. В качестве подвижной фазы была использована смесь бензен–метанол–кислота уксусная (90:16:9), которая является оптимальной для препаративной ТСХ, поскольку обеспечивает максимальное разделение компонентов [15,16]. Фенольные компоненты проявляли с использованием водного раствора хлорида железа и ферроцианида калия [17]. Отдельные фенольные соединения идентифицировали по значениям их *R*_f и стандартным веществами.

Танины, являясь полимерными веществами, на хроматограммах проявляются в виде темных пятен, поэтому их хроматографическое обнаружение затруднено. Для количественного и качественного анализа танинов применяли следующие методики. Проводили предварительную обработку семян органическими растворителями для удаления липофильных веществ — хлороформом, этилацетатом. Затем выделяли танины 95%-м этанолом. Для разделения на конденсированные и неконденсированные танины использовали следующие осадочные реакции: а) при

воздействию свинца ацетатом в уксуснокислой среде осаждаются гидролизуемые танины, а конденсированные остаются в растворе; б) при обработке бромной водой осаждаются конденсированные, а гидролизуемые остаются в растворе. Количественно общие, гидролизуемые и конденсированные определяли методом Левенталья, в основе которого лежит способность танинов окисляться калия перманганатом в слабокислой среде в присутствии индикатора индигосульфокислоты (ГФ XI) [18].

Антилиполитическую активность фенольных соединений определяли по их способности тормозить активность липазы. Уровень активности липазы оценивали в условных единицах по разнице в количестве щелочи, пошедшей на титрование опытной и контрольной проб при гидролизе 40%-й эмульсии оливкового масла.

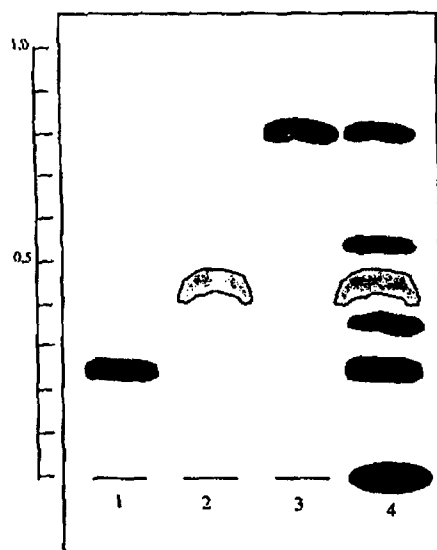


Рисунок 1. Распределение фенольных компонентов муки рапса на ТСХ-пластине. 1—гликопиранозилсинапат, 2—синаповая кислота, 3—синапин

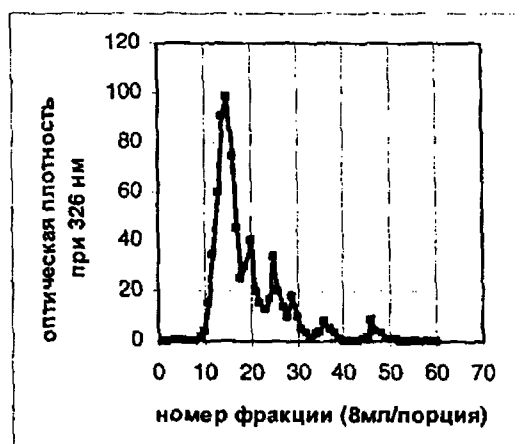


Рисунок 2. Исходящая кривая хроматографии фенольных соединений семян рапса на Sephadex LH-20

Общее содержание фенольных соединений (танинов, фенольных кислот и их производных) в обезжиренных семенах рапса составило 0.0112 г/г сырья (11 200 $\mu\text{g/g}$ ЕСК). Изучение фракционного состава фенольных соединений семян рапса с помощью тонкослойной хроматографии (рис. 1) позволило заключить, что основными его компонентами являются гликопиранозилсинапат, синаповая кислота и синапин. Из представленных на рис. 2 результатов хроматографического исследования на сефадексе LH-20 следует, что диаграмма распределения фенольных компонентов семян рапса характеризуется одним большим, двумя меньшими и тремя незначительными пиками. Результаты хроматографического анализа с помощью ТСХ свидетельствуют, что первые три наиболее значительных пика соответствуют синапину, синаповой кислоте и гликопиранозилсинапату соответственно, что подтверждает вывод о том, что преобладающими компонентами фенольных соединений семян рапса являются синапин (основной компонент),

синаповая кислота и гликопиранозилсинапат. Таким образом результаты колоночной хроматографии с использованием сефадекса LH-20 согласуются с данными, полученными при использовании ТСХ.

Следующим этапом работы явилось определение количественного содержания фенольных соединений семян рапса и изучение их ингибиторной активности по отношению к панкреатической липазе (табл. 1). Из представленных данных следует, что синапин является преобладающим компонентом фенольного комплекса семян рапса и составляет 45% от общего содержания фенольных соединений. Полифенольные соединения, представленные гидролизуемыми и конденсированными танинами, составляют значительную часть фенольных соединений семян рапса. Их содержание в комплексе фенольных соединений соответствует 40.2% от общего количества последних. При этом количество конденсированных приблизительно соответствует количеству гидролизуемых танинов.

Таблица 1 – Состав фенольных соединений семян рапса и их ингибиторная активность по отношению к панкреатической липазе

Образец	Содержание		Ингибиторная активность, ИЕ/г фенольных соединений
	г/г семян рапса	мг ЭСК/г семян рапса	
Фенольные соединения рапса, в т.ч.	0.0112	11 200	8875.0
синапин	0.00505	5 050	18811.9
синаповая кислота	0.00045	450	9777.8
полифенольные соединения (танины)	0.0045	4 500	13333.3
-гидролизуемые танины	0.0021	2 100	18541.4
-конденсированные танины	0.0024	2 400	8750.0

Из представленных в таблице 1 экспериментальных данных можно также заключить, что наибольшей ингибиторной активностью по отношению к липазе обладают синапин и гидролизуемые танины, ингибиторная активность которых составляет 18811.9 ИЕ/г и 18541.4 ИЕ/г соответственно. Таким образом, значительной способностью тормозить действие панкреатической липазы обладают как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные фенольные соединения семян рапса.

Фенольный комплекс семян рапса в целом обладает значительным ингибиторным действием на панкреатическую липазу, сравнимым с таковым фармакопейного препарата "Ксеникал" (9700 ИЕ/г).

Таким образом, наличие значительной ингибиторной активности, наряду с высокими антиоксидантной и антибактериальной активностями, позволяет рассматривать фенольные соединения муки из семян рапса как ингибиторы панкреатической липазы в составе биологически активных добавок широкого спектра действия и в составе продуктов функционального назначения как средства, угнетающего действие липолитических ферментов.

Список литературы

1. Яиченко П.С., Ковальова А.М., Георгіївський Г.В., Комісаренко А.М. Виділення та вивчення деяких кумаринів і хромонів із рослин родин бобові та селерові та їх ліпазотропна активність // *Фармаком* – 2-2004. – С. 66–74.
2. Черно Н.К., Крусір Г.В., Яшкіна В.В. Вивчення інгібіторної активності насіння арахісу і рапсу // Тез. Доп. Міжвузівської наук.- практ. Конф. "Проблеми техніки і технології харчових виробництв", Полтава.- 2004.- С.237-239
3. Черно Н.К., Крусір Г.В., Яшкіна В.В. Перспективы использования некоторых видов растительного сырья, как ингибиторов липаз // *Зернові продукти і комбікорми.*- № 3.- 2004.- С.15-17
4. Черно Н.К., Крусір Г.В., Яшкіна В.В. Характеристика ингибиторов липаз из семян рапса, арахиса и горчицы // Тез. Докл. IV междунар. Науч.- практ. Конф. "Пища. Экология. Качество", Новосибирск.- 2004.- С.206 – 209
5. Черно Н.К., Яшкіна В.В., Лось О.А. Масличные культуры как источники ингибиторов пищеварительных ферментов // Тези доп. 9 Міжнар. наук.-техн. конф. „Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості сьогодення і перспективи” 17–19 жовт. 2005 р., Київ, 2005, с. 10–11.
6. Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase // *Nature*. – #343 (6260). – P.771–774.
7. Ji-Eun Shin, Myung Joo Han, Myoung-Chong Song et al. 5-Hydroxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanon: A pancreatic lipase inhibitor isolated from *Alpinia officinarum* // *Biol. Pharm. Bull.* – 2004. – Vol.27, #1. – P.138-140
8. Ji-Eun Shin, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* Inhibits pancreatic lipase // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol.26, #6. – p.854-857.
9. Маслова Н.Ф., Діхтярьов С.І., Любецька Ж.А., Кузнецова І.В. та ін. Перспективи розробки оригінальних лікарських засобів на основі рослинних інгібіторів ферментів // *Клінічна фармація*. – 1999. – Т.3, №2. – С.141-144.
10. Krygier K., F.W.Sosulski. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acid in rapeseed flours and hulls, *J. Agric Food Chem.* 30:334–336 (1982).
11. Naczki M, T.Nikhols, D.Pink, F.Sosulski. Condensed Tannins in canola hulls, *Ibid* 42:2196–2200 (1994).
12. Naczki M, R.Amarowicz, A.Sullivan, F.Shahidi. Current developments on polyphenolics of rapeseed/canola: A review, *Food Chem.* 62: 489–502 (1998).
13. Методы биохимического исследования растений /А.И.Ермаков, В.В.Арасимович, Н.П.Ярош и др.; Под ред. А.И.Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 430с.
14. U.Wanasundara, R.Amarowicz, F.Shahidi. Chromatography analysis of phenol compounds from rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1285 (1994).
15. R. Amarowicz, H. Kozłowska, M. Shimoyamada and K.Okubo, Thin layer chromatography in identification of polyphenol compounds. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 1, 89 [1992].
16. R. Amarowicz, M. Karamac, B. Rudnicka, E. Ciska. TLC separation of glucopyranosyl sinapate and other phenolic compounds from rapeseed // *Fett Wiss. Technol.* 1995. 97, #9, p.330-333.
17. G. M. Barton, R. S. Evans and J. A. F. Gardner, TLC separation of phenol compounds from rapeseed. *Nature* V170 – 1952.– P. 249
18. Государственная Фармакопея СССР: Вып.1. Общие методы анализа / МЗ ССР. – 11-е изд. доп. – М.: Медицина. – 1987. – 336с.