

УДК 549.544-414.6:547.91

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКВАЛЕНА В СЕМЕНАХ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *AMARANTHACEAE*

© Л.А. Дейнека*, В.И. Дейнека, И.А. Гостищев, В.Н. Сорокопудов, А.А. Сиротин

Белгородский государственный университет, ул. Победы, 85, Белгород,
308015 (Россия) E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе показано, что использование обращенно-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием позволяет при простой пробоподготовке: а) выполнять одновременное определение сквалена и триглицеридов в семенах растений; б) исследовать подлинность препаратов (по методам относительного анализа удерживания и «отпечатков пальцев»). Сопоставлено накопление сквалена в семенах ряда растений семейства амарантовых и установлено, что по уровню накопления сквалена в семенах щирица запрокинутая практически не уступает некоторым культурным сортам амаранта.

Ключевые слова: сквален, триглицериды, обращенно-фазовая ВЭЖХ, рефрактометрическое детектирование, определение, установление подлинности, семена растений, *Amaranthaceae*.

Введение

Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-тетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен) относится к очень важным биологически активным веществам. Это соединение было впервые обнаружено в печени акулы (название *сквален* происходит от *squalus* – акула) [1]. Оно содержится также в оливковом, хлопковом и льняном маслах, в масле из зародышей пшеницы, во множестве животных и растительных тканей. Биологическая активность сквалена достаточно разнопланова [2]: прежде всего, как предшественник стероидов он влияет на метаболизм стероидов, что может быть использовано в диетотерапии сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Опыты *in vitro* свидетельствовали о высокой антиоксидантной активности сквалена (по отношению к синглетному кислороду) в кожном покрове и в сетчатке глаз; существует также экспериментальное подтверждение способности сквалена выводить из организма липофильные ксенобиотики. Наконец, противораковый эффект оливкового масла связывают с относительно высоким содержанием в нем именно сквалена [4].

Для определения сквалена в сумме липидов известно использование газожидкостной хроматографии. Однако при этом необходимо предварительное омыление экстрактов тканей и плазмы человека с последующей экстракцией неомыляемых веществ и отделение стероидов при помощи колоночной хроматографии на Al_2O_3 [5]. При такой предварительной обработке газовая хроматография может быть заменена на обращенно-фазовую жидкостную хроматографию с УФ-детектированием; сообщается то, что при этом удастся добиться высокой чувствительности [6], несмотря на отсутствие в молекуле сквалена хромофоров с $\lambda_{max} > 190$ нм. Была показана возможность определения сквалена и с использованием рефрактометрического детектирования [7].

Уникальным источником сквалена являются семена растений семейства амарантовые (*Amaranthaceae*) или масла этих семян. Амарант – одна из древнейших зерновых культур, интерес к которой в настоящее время велик во всем мире благодаря накоплению в семенах высококачественного белка и сквалена. Употребление семян амаранта (или его масла) позволяет существенно (до 50% - в опытах на животных) снизить накопление холестерина в липопротеинах низкой плотности [8]. Однако хорошо известно, что накопление биологически активных веществ зависит (в том числе и в случае амарантов) от условий выращивания. Данная работа посвящена разработке метода определения сквалена без предварительного омыления липидной фракции и использования разработанного метода для исследованию накопления сквалена в семенах некоторых растений (семейства амарантовые), выращенных в условиях Белгородской области.

*Автор, с которым следует вести переписку.

Экспериментальная часть

В работе использовали жидкостной хроматограф, составленный из насоса высокого давления Altex 110A, крана дозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, рефрактометрического детектора RI-401 (Waters). Хроматограммы регистрировали и обрабатывали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографическая колонка 250×4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм. Для приготовления подвижных фаз использовали ацетон (имп., РЕАХИМ) и ацетонитрил (х.ч., компонент-реактив). В качестве стандартного образца использовали сквален (97 %, Alfa Aestar, Lancaster).

Обозначения: Лн – α-линоленовая; Л – линолевая; О – олеиновая, П – пальмитиновая и С – стеариновая кислоты; пример обозначения триглицеридов: Л₂О – триглицерид, в котором содержится два радикала линолевой и один – олеиновой кислот.

Семена амарантов и целозий были собраны с растений, выращенных в 2006–2007 гг. в Белгороде, или были предоставлены фермером Л.В. Лагоденко (Белгородская область).

Методика определения сквалена в семенах. Навеску семян (0,20–0,35 г) растирают в фарфоровой ступке с 0,2–0,3 г кварцевого песка, просеянного через сито с диаметром отверстий 0,25 мм до визуальной гомогенности порошка. Полученный порошок переносят в колбу вместимостью 10 см³ и настаивают при периодическом перемешивании в течение 30 мин. После оседания основной части твердой фазы раствор фильтруют через тефлоновый фильтр МФФКГ-3 в фильтрующем патроне и хроматографируют порциями 20 мкл.

Подвижная фаза: в мерную колбу вместимостью 250 мл добавляют 25 мл ацетонитрила и раствор доводят до метки ацетоном при перемешивании. Скорость подачи: 1 мл/мин. Остальные условия см. выше. Для градуировки отклика детектора готовят растворы сквалена в элюенте с концентрацией в диапазоне 0,075÷0,200 мг/мл. Полученные растворы хроматографируют, как и исследуемые образцы.

Обсуждение результатов

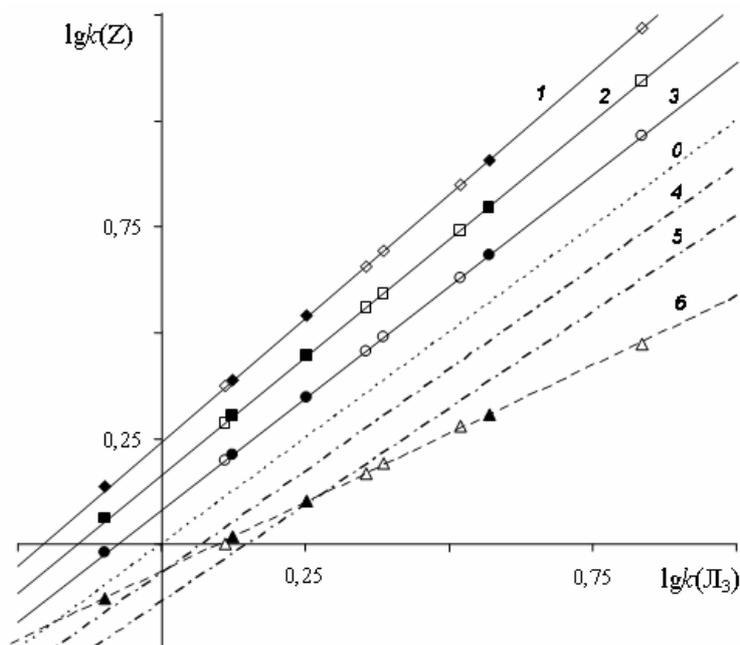
Жидкостная хроматография широко используется в качестве аналитического метода при фармакопейном анализе многокомпонентных смесей. При этом в фармакопейных статьях имеется раздел, определяющий методы установления подлинности препаратов. В случае использования хроматографических методов этот вопрос решается сопоставлением времени удерживания компонентов разделяемой смеси с временем удерживания стандартных веществ. Это позволяет компенсировать непостоянство времен удерживания веществ при смене хроматографических колонок, заполненных стационарными фазами даже одного и того же производителя, а также вследствие возможных различий в составах подвижных фаз или иных условий хроматографирования (например температуры). Поэтому практически при каждой новой серии измерений необходимо приготовление растворов стандартных образцов (СО), если эти вещества относятся к нестабильным соединениям. При труднодоступности СО возрастает стоимость анализов и время, требуемое на их выполнение.

Недавно разработанный метод относительного анализа удерживания [9] позволяет предложить альтернативный вариант установления подлинности препаратов. В соответствии с этим методом относительное удерживание веществ в координатах $\lg k(i)$ vs $\lg k(A)$, где сопоставляются логарифмы факторов удерживания, а A – вещество сравнения, является линейной функцией. Для определения аналитического вида такой зависимости измерения проводят в нескольких различных составах подвижной фазы. При этом в принципе, достаточно двух точек, т.е. данных, полученных для двух различных составов подвижных фаз. На рисунке 1 показано удерживание некоторых триглицеридов и сквалена относительно трилинолеата, Л₃. Кроме важного момента – линейности, имеется еще одна закономерность – для относительно малополярных веществ полученная прямолинейная зависимость мало изменяется при смене стационарных фаз. На рисунке 1 точки, полученные для одинаковых сорбатов, укладываются на общую прямую линию для двух стационарных фаз различных производителей: Диасфер-110-C18 (БиоХимМак, Москва) и Сепарон-130-C18 SGX (Чехия). Для сквалена, например, получена следующая функциональная зависимость:

$$\lg k(\text{сквален}) = -0,0638 + 0,6466 \cdot \lg k(L_3) .$$

Различия в свойствах двух использованных стационарных фаз весьма велики, если в качестве критерия такого различия использовать изменение логарифмов факторов удерживания сорбатов на сопоставляемых фазах (порядка 0,25) для одного и того же элюента.

Рис. 1. Удерживание триглицеридов и сквалена относительно удерживания трилинолеата. Z = триолеат (1), линолеат-диолеат (2); дилинолеат-олеат (3); (α -)линоленоат-дилинолеат (4); ди(α -линоленоат)-линолеат (5); сквален (6). θ – координатная биссектриса. Незаполненные знаки – стационарная фаза Диасфер-110-C18; заполненные знаки: Сепарон-130-C18 SGX



По нашему опыту, эта функциональная зависимость сохранится в течение длительного времени (до потери эффективности) использования колонки. А это позволяет использовать и ретроанализ: в нашем случае были переоценены хроматограммы множества масел (более 300) семян, записанные в течение 5-летнего исследования растительных масел. При этом только в случае масел семян растений семейства *Amaranthaceae* (в частности, злейшего сорняка нашего региона – щирицы) подтверждено присутствие сквалена. Отметим, что по ходу прямых линий на рисунке 1 можно сделать вывод о том, что пик сквалена может совпадать с пиками триглицеридов, содержащих радикалы триеновых кислот (но при этом всегда существует возможность изменением состава подвижной фазы, чтобы добиться разделения таких пиков). Вероятно, это послужило причиной заблуждения авторов работы [10], которые пришли к выводу о том, что в состав масла семян амаранта входит ди(α -линоленоат)-линолеат, LnLnL, причем не только в качестве одного из основных компонентов триглицеридного комплекса, но и единственного триглицерида, содержащего радикалы триеновой кислоты. А на хроматограмме масла амаранта, приведенной в работе [11] по детальному изучению профиля масла амаранта, большой пик перед группой триглицеридов не удостоен внимания. Но положение этого пика в относительных координатах (рис. 1) совпадает с линией для сквалена, в то время как сквален в цитируемой работе определяли по сложной многостадийной процедуре с конечным определением методом капиллярной газовой хроматографии.

Следовательно, метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием прост и удобен не только для определения сквалена в экстрактах семян амарантов, но и для одновременного контроля триглицеридного состава экстрагируемого со скваленом масла. Триглицеридный состав масла легко рассчитывается с использованием инкрементного подхода [12]. При этом масла семян нескольких сортов и видов амарантов (и целозий) легко идентифицируются по хроматографическому профилю (рис. 2–3), поскольку они отличаются специфично высоким содержанием триглицеридов с радикалами пальмитиновой кислоты.

Следовательно, для таких масел возможно применение широко развиваемого в настоящее время в хроматографии метода «отпечатков пальцев», позволяющего по качественному соотношению пиков идентифицировать препараты, обнаруживать их фальсификацию и т.д. Так, например, по хроматограммам, представленным на рисунке 3, можно утверждать следующее:

- масло под названием «Роз-Амарант», приобретенное в киоске (Белгород), специализирующемся на продаже БАД, оказалось трудно отличимым от торговых марок пищевого кукурузного масла;
- амарантовое масло производства одной из частных фирм (Воронеж) действительно содержало и сквален и амарантовое масло, но в смеси с маслом типа подсолнечного.

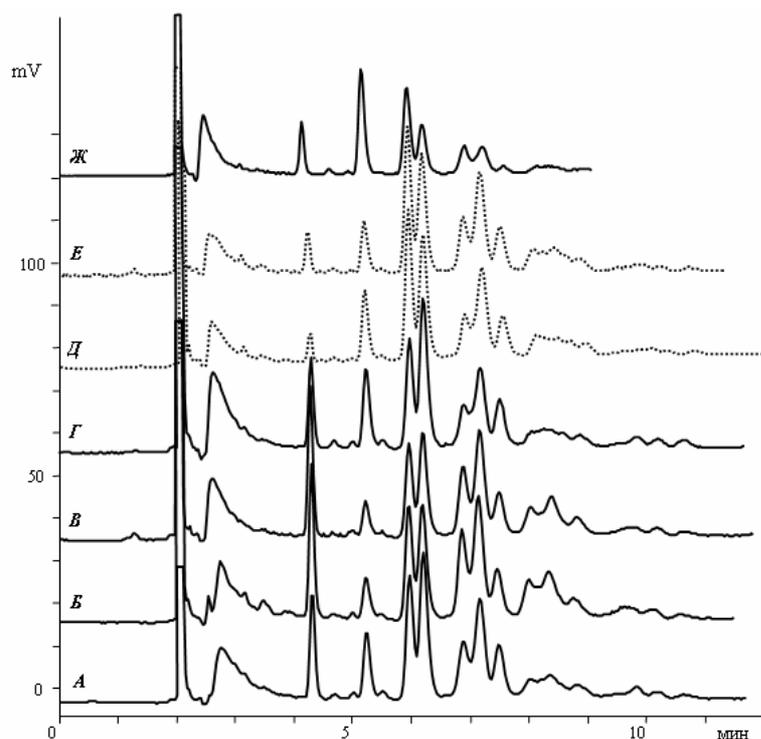


Рис. 2. Хроматограммы масел семян некоторых растений семейства амарантовые. Сорта амаранта: А – Зеленая сосулька; Б – Сэм; В – Крепыш; Г – Валентина; Д – *Celosia argentea f. plumosa* (агрофирма «АЭЛИТА»), Е – *C. cristata* (Сортсемовощ); Ж – *A. retroflexus*

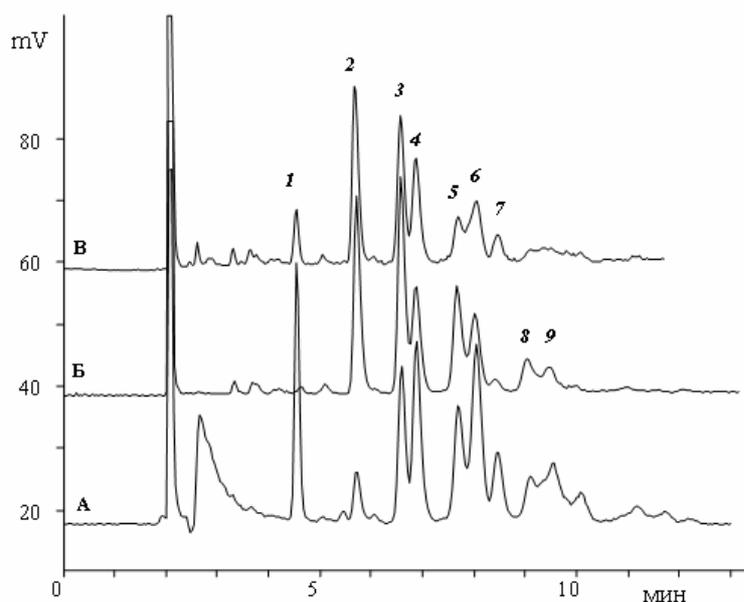


Рис. 3. Хроматографический профиль некоторых масел: А – экстракт семян амаранта сорта «Кизлярец», Б – масло под названием «Роз-Амарант», В – амарантовое масло частного производства (Воронеж). 1 – сквален, 2 – Л₃, 3 – Л₂О, 4 – Л₂П, 5 – ЛО₂, 6 – Л₂С + ЛОП, 7 – ЛП₂, 8 – О₃, 9 – ЛОС + О₂П

Поскольку в масле семян амаранта невелико содержание триглицеридов, содержащих радикалы октадекатриеновых кислот, то выбор состава элюента для определения сквалена на фоне сопутствующих триглицеридов довольно прост – можно воспользоваться элюентами с небольшой (порядка 10 об.%) добавкой ацетонитрила к ацетону.

По изложенной выше методике сквален экстрагируют из семян ацетоном. Сквален не содержит полярных функциональных групп, поэтому ацетон является достаточно сильным элюентом для экстракции этого углеводорода с любой полярной матрицы. Возможность неполярного удерживания сквалена исходной матрицей также исключается благодаря полной растворимости масла, содержащегося в семенах, в добавляемом ацетоне при выполнении указанного в методике соотношения между массой семян и объемом ацетона. Действительно, как показали исследования, площадь пика сквалена была прямо пропорциональна массе использованных семян с нулевым интерсептом. При увеличении массы семян до 0.450 г получено заметное уменьшение (до 15%) выхода сквалена, что, по всей вероятности, связано с неполной экстракцией высоко насыщенных триглицеридов при увеличении навески семян. Наиболее критичной стадией в методике является способ измельчения семян. При измельчении без добавок кварцевого песка нами было обнаружено уменьшение выхода сквалена на 20–

30%. Растворы сквалена, использовавшиеся для градуировки, оставались стабильными при хранении без особых мер предосторожности (вне прямого доступа солнечного света) в течение по крайней мере 6 ч.

Результаты исследования семян некоторых растений семейства амарантовые, выполненные в данной работе, представлены в таблицах 1–2. Эти данные в среднем соответствуют уровню накопления сквалена в семенах *Amaranthus cruentus* L., выращенных в Испании [11] и Китае [1]. Наиболее высокое содержание сквалена было найдено для сортов Крепыш и Кизлярец. Отметим, что известно более высокое накопление сквалена в семенах видов *A. hypochondricus* (до 0,73%) и *A. pumilus* (до 1,32%) [13], что может быть использовано для селекции новых сортов. В семенах единственного вида амарантов, естественно произрастающего в Белгородском регионе, – щирицы запрокинутой, *A. retroflexus*, также найдено довольно высокое содержание сквалена (0,42–0,48%), причем его содержание увеличивается в случае семян щириц с багряной окраской стеблей. Появление таких растений, вероятнее всего, стало следствием широкого использования в декоративном садоводстве Белгорода амарантов с багряной окраской всего растения и естественной гибридизации их с дикорастущими видами.

Триглицеридный состав масел семян амарантов, найденный в настоящей работе, принципиально совпадает с известными литературными данными. Но в масле щирицы доля радикалов линолевой кислоты настолько велика, что хроматографический профиль масла уже нельзя отнести к специфичным. Следовательно, масло семян щирицы напоминает многие линолевые масла (ближе всего – масло семян тыквы) и остается только одна особенность – значительный пик сквалена.

Указанное изменение жирнокислотного состава для вида, характерного для нашей климатической зоны, соответствует известной тенденции к росту ненасыщенности при снижении среднегодовой температуры региона произрастания [14].

Таблица 1. Содержание сквалена и масел (масс.%) в семенах растений сем. *Amaranthaceae*

| ω, % ± 0,02 0,40 | <i>Celosia</i> | | Сортовые амаранты (сезон 2006 г.) | | | | | | | <i>A. retroflexus</i> | |
|---------------------------|----------------|-------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----------------------|------|
| | <i>crist.</i> | <i>arg.</i> | МФ | Кз | В | В* | Кр | С | У | б | з |
| <i>сквален</i> | 0,35 | 0,20 | 0,64 | 0,64 | 0,32 | 0,34 | 0,64 | 0,53 | 0,41 | 0,48 | 0,42 |
| <i>масло</i> | 1,93 | 1,33 | 4,20 | 8,14 | 3,56 | н/о | 7,55 | 5,84 | 5,11 | н/о | н/о |

Crist. – *cristata*; *arg.* – *argente*; МФ – Магический фотан; Кз – Кизлярец; В – Валентина; Кр – Крепыш; С – Сэм; У – Ультра; ЗС – Зеленая сосулька; * – сезон 2007 г. б – с багровыми пятнами; з – зеленая. н/о – не определяли.

Таблица 2. Триглицеридный и жирокислотный состав масел семян

| ω, моль % | <i>Celosia</i> | | Сортовые амаранты | | | | | | Щирица (з.) | |
|------------------------------------|----------------|-------------|-------------------|------|------|------|------|------|----------------|--|
| | <i>crist.</i> | <i>arg.</i> | МФ | Кз | В | Кр | С | У | | |
| Триацилглицеролы (моль %, ± 0,5 %) | | | | | | | | | | |
| Л ₃ | 6,6 | 8,7 | 8,7 | 5,1 | 10,3 | 4,6 | 5,4 | 10,9 | 27,5 | |
| Л ₂ О | 17,1 | 17,9 | 13,9 | 12,8 | 14,1 | 13,2 | 12,5 | 13,3 | 27,7 | |
| Л ₂ П | 17,3 | 18,8 | 17,6 | 16,9 | 21,6 | 16,2 | 14,3 | 19,2 | 18,7 | |
| Л ₂ С | 1,9 | 1,7 | 4,5 | 4,4 | 3,4 | 4,6 | 3,9 | 5,1 | 1,7 | |
| ЛО ₂ | 8,9 | 7,3 | 9,7 | 11,7 | 7,7 | 11,9 | 12,1 | 8,6 | 10,5 | |
| ЛОП | 16,9 | 17,1 | 12,5 | 15,8 | 12,5 | 15,3 | 15,0 | 11,6 | 10,7 | |
| ЛОС | 3,2 | 2,7 | 3,1 | 2,6 | 3,0 | 2,7 | 3,6 | 3,8 | <0,5 | |
| ЛП ₂ | 8,7 | 8,6 | 8,8 | 7,7 | 9,2 | 7,6 | 7,8 | 8,5 | 1,6 | |
| ЛПС | <0,5 | <0,5 | 1,3 | 3,2 | 2,6 | 2,1 | 2,5 | 4,2 | 0,2 | |
| О ₃ | 4,3 | 7,4 | 4,8 | 5,0 | 3,0 | 5,3 | 6,1 | 4,3 | 0,9 | |
| О ₂ П | 6,7 | 3,8 | 5,2 | 7,5 | 3,1 | 6,9 | 6,7 | 4,2 | 0,5 | |
| О ₂ С | 3,6 | 0,9 | 4,2 | 1,6 | 4,0 | 2,4 | 2,9 | 2,7 | <0,5 | |
| ОП ₂ | 3,1 | 3,6 | 4,2 | 3,9 | 3,0 | 5,0 | 4,0 | 2,9 | <0,5 | |
| ОПС | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,6 | 2,3 | 2,1 | 3,0 | 0,7 | <0,5 | |
| Жирные кислоты (моль %, ± 1,5 %) | | | | | | | | | | |
| Лн | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | <0,5 | |
| Л | 43,2 | 46,2 | 44,5 | 41,4 | 47,8 | 40,3 | 39,5 | 48,0 | 67,1 | |
| О | 31,0 | 29,7 | 29,2 | 31,1 | 24,7 | 32,1 | 33,1 | 25,3 | 20,9 | |
| П | 21,8 | 21,6 | 21,2 | 22,5 | 22,2 | 22,5 | 21,7 | 20,8 | 11,1 | |
| С | 3,6 | 2,2 | 4,7 | 4,8 | 5,1 | 4,6 | 5,3 | 5,5 | 0,6 | |

Обозначения см. табл. 1

Предварительные исследования семян еще одного вида растений семейства *Amaranthaceae* – гомфрены (*Gomphrena*), показали, что по триглицеридному составу масло семян этого растения напоминает масло семян амарантов, но ярко выраженного пика сквалена на хроматограмме обнаружено не было.

Выводы

В работе предложена методика определения сквалена в семенах растений с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием. Определен уровень накопления сквалена в семенах некоторых растений семейства амарантовые. Показано, что по уровню накопления сквалена в семенах щирица запрокинутая практически не уступает некоторым культурным сортам амаранта.

Список литературы

1. He H.-P., Cai Y., Sun M., Corke H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. P. 368–372.
2. Kelly G.S. Squalene and its potential clinical uses // *Altern Med Rev.* 1999. V. 4. P. 29–36.
3. Применение масла амаранта в диетотерапии сердечно-сосудистых заболеваний / под ред. В.А. Тутельяна. М., 2006. 32 с.
4. Newmark H.L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis // *Cancer Epidem. Biomark. Prevent.* 1997. V. 6. P. 1101–1103.
5. Liu G.C.K., Ahrens E.H., Jr., Schreiberman P.H., Crouse J.R. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application // *J. Lipid Res.* 1976. V. 17. P. 38–45.
6. Spangord R.J., Sun M., Lim P., Ellis W.Y. Enhancement of an analytical method for the determination of squalene in anthrax vaccine adsorbed formulations // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. V. 42. P. 494–499.
7. Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M., Katzogiannos E. Analysis of minor components in olive oil. // *J. Biochem. Biophys.* 2004. V. 61(1-2). P. 155–160.
8. Berger A. et al Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2003. V. 73(1). P. 39–47.
9. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // *Журнал физической химии.* 2006. Т. 80. №3. С. 511–516.
10. Dhellot J.R., Matouba E., Maloumbi M.G., Nzikou J.M. et al. Extraction, chemical composition and nutritional characterization of vegetable oils: Case of *Amaranthus hybridus* (var 1 and 2) of Congo Brazzaville // *African J. Biotechnol.* 2006. V. 5(11). P. 1095–1101.
11. Leon-Camacho M., Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile // *Eur. Food Res. Technol.* 2001. V. 213. P. 349–355.
12. Дейнека В.И., Староверов В.М., Фофанов Г.М., Балятинская Л.Н. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов // *Химико-фармацевтический журнал.* 2002. Т. 36. №7. С. 44–47.
13. Marcone M.F. First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth) // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 378–382.
14. Linder C.R. Adaptive evolution of seed oils in plants: Accounting for the biogeographic distribution of saturated and unsaturated fatty acids in seed oils // *Amer. Naturalist.* 2000. V. 156. №4. P. 442–458.

Поступило в редакцию 25 февраля 2008 г.

После переработки 26 марта 2008 г.