
ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЕМЯН *PUNICA GRANATUM L.* ИЗ ОТХОДОВ ОТ ПОЛУЧЕНИЯ ГРАНАТОВОГО СОКА*

С.В. Горяинов, А.С. Хомик, Г.А. Калабин,
В.В. Вандышев, Р.А. Абрамович

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 6/2, Москва, Россия, 117198

Одним из современных направлений фармацевтических исследований является поиск новых видов растительного сырья для расширения ассортимента жирных масел медицинского применения. Основным источником получения жирных масел являются семена и плоды масличных растений. В частности, семена граната являются источником жирного масла нетипичного химического состава, в котором нами ранее методом газовой хроматографии было установлено наличие 40—60% неидентифицированной кислоты. Учитывая данные литературы, наиболее вероятно считать эту кислоту конъюгированной. В этой работе представлены результаты изучения состава жирного масла семян граната методом хроматомасс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: масло граната, хроматомасс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, жирнокислотный состав, конъюгированные линоленовые кислоты.

Гранат (гранатник, гранатовое дерево) — *Punica granatum L.*, принадлежит к семейству Гранатовые — *Punicaceae*. Гранатник — кустарник или деревце до 5 м высоты. Листья ланцетовидные, темно-зеленые, до 8 см длиной и до 2 см шириной. Цветки ярко-красные или оранжево-красные, диморфные, кувшинообразной формы, обоеполые (длиннопестичные) или колокольчатой формы (короткопестичные). Плод — гранатина, ложный, ягодообразный, обычно округлой формы до 12—15 см в диаметре, окраска колеблется от беловатой до коричнево-красной, на верхушке имеются твердые лопасти остающейся чашечки. Стенка плода — корка — плотная, кожистая, сочная мякоть отсутствует. Гнезда между перепончатыми перегородками плода заполнены сочными, пурпурно-малинового цвета семенами (до 400—700 штук). Семена многочисленные округло-неправильногранистые, с сочной мясистой оболочкой — саркотестой — от белого до темно-красного цвета.

Кусты граната вступают в период плодоношения с трехлетнего возраста. С плодоносящего куста снимают до 30—40 кг плодов, максимальные урожаи могут достигать 200 кг/куст (до 800 плодов). Средняя масса плодов чаще составляет 200—250 г. Плоды способны храниться 4—6 мес. Растения граната живут 50—70 лет и более (до 100—150 лет) [3].

* Работа выполнена в рамках Государственного контракта от 13 октября 2011 г. № 16.552.12.7002 шифр 2011-5.2-552-005-002 по теме «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием для обеспечения комплексных исследований в области разработки биотехнологий получения инновационных лекарственных средств».

Дикорастущий гранат встречается в Южной Европе и в Западной Азии (до Гималаев). В пределах бывшего СССР дикорастущий гранат наиболее распространен в Восточном Закавказье. История возделывания граната насчитывает более 3000 лет [1].

Гранатовый сок, который получают при прессовании зрелых плодов, содержит сахара, органические кислоты [4], витамины С, В₂, В₆, В₉, В₁₅, флавоноиды, аминокислоты. Его применяют для возбуждения аппетита, улучшения пищеварения, используют как источник лимонной кислоты. Также сок из плодов гранатника применяется при химиотерапии больных раком предстательной железы. По данным литературы [6; 7; 11], он способствует более легкому течению заболевания и даже его предупреждению. Сообщается также об использовании сока граната при терапии больных ВИЧ [12]. Экстракт из семенной кожуры и сока, выделенный смесью ацетон—вода, ингибирует развитие карциномы легких и рост опухоли в экспериментах на мышах [10].

Ранее нами был изучен жирно-кислотный состав масла семян граната, плоды которого были куплены в торговой сети г. Москвы. В жирном масле установлено присутствие стеринов, жирных кислот с преобладанием конъюгированной кислоты (от 40 до 60% от суммы кислот). Наличие последней предложено использовать для установления подлинности гранатового масла [5]. Семена граната были признаны перспективным для изучения сырьем.

Целью данной работы было изучение жирно-кислотного состава семян граната, полученных из отходов от промышленного получения гранатового сока.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужил высушенный жом граната сорта «гюловша», взятого с завода по получению гранатового сока в Азербайджане. Семена, которые в жоме составляли 63%, от частей околоплодника отделяли путем предварительного измельчения жома. Цельные семена в измельченном жоме отсеивали от мелко измельченных частей околоплодника. Семена превращали в мелкий порошок. Липофильную фракцию из него выделяли с помощью аппарата Сокслета, растворителем служил *n*-гексан, экстракция продолжалась 4 ч. Полученное извлечение упаривали на вакуум-ротационном аппарате до удаления растворителя при остаточном давлении 0,2 атм. и температуре водяной бани 50 °С. Полученное масло помещали в сушильный шкаф и выдерживали при температуре 100—105 °С в течение 1 ч.

Анализ жирно-кислотного состава образца проводился на хромато-масс-спектрометре JMS GCmate II (JEOL, Япония), оснащенном газовым хроматографом Agilent 6890N (капиллярная колонка DB-5MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,32 мкм), газ-носитель — гелий, скорость газа-носителя 1,5 мл/мин). Режим работы хроматографа: температура инжектора 270 °С, начальная температура печи хроматографа — 40 °С, затем изотерма в течении 1 мин., после чего нагрев со скоростью 15 °С/мин. до 210 °С, затем до 280 °С со скоростью 5 °С/мин. Режим регистрации масс-спектров: энергия ионизации 70 эВ, температура источника 250 °С, сканирование в диапазоне 40—400 Да со скоростью 2,5 скан/с. Анализируемые вещества идентифицировались с помощью автоматиче-

ского программного комплекса TSS 2000 (Shrader Analytical and Consulting Laboratories, Inc.) с использованием масс-спектральной базы NIST'08.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , а также ^1H - ^1H COSY образца гранатового масла получены на ЯМР-спектрометре JNM ECA-600 (JEOL, Япония) с рабочей частотой для ^1H 600 МГц.

Получение метиловых эфиров жирных кислот масла граната. Реакцию метилирования проводили как в кислой (1,5 М $\text{CH}_3\text{COCl}/\text{CH}_3\text{OH}$), так и в щелочной среде (0,5 М $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$), варьируя время проведения реакции. Навеску образца массой 20 мг помещали в пузырек с завинчивающейся крышечкой, добавляли 1 мл смеси реагент/метанол и помещали в лабораторный нагреватель при 70 °С на различное время (10, 20 и 30 мин.). После охлаждения реакционной смеси добавляли 1 мл деионизированной воды, а затем 1 мл *n*-гексана и перемешивали. Верхний слой *n*-гексана, содержащий метиловые эфиры жирных кислот, отделяли, сушили с помощью прокаленного сульфата натрия.

Получение свободных жирных кислот масла граната для последующего изучения методом ЯМР ^{13}C . К 250 мг образца добавляли 5 мл 1 М раствора NaOH в этаноле, выдерживали 30 мин. при 80 °С. После охлаждения приливали 5 М HCl до pH 4—5 (контроль по универсальному индикатору), добавляли 100 мл деионизированной воды и экстрагировали *n*-гексаном 2 раза по 15 мл. Экстракты объединяли и упаривали под током азота до объема 1 мл.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения жирнокислотного состава образца масла граната представлены в табл. 1. Положение сопряженных двойных связей в конъюгированных линоленовых кислотах определено с помощью данных ЯМР-спектроскопии. При проведении метилирования в кислой среде отмечено протекание реакции изомеризации основного компонента масла граната — пуниковой кислоты (9cis, 11trans, 13cis) в конъюгированные линоленовые кислоты с другим геометрическим положением двойных связей (каталповая — 9trans, 11trans, 13cis, α -элеостеариновая — 9cis, 11trans, 13trans, β -элеостеариновая — 9trans, 11trans, 13trans).

Таблица 1

Жирнокислотный состав масла *Punica Granatum L.*

Название	$\text{CH}_3\text{COCl}/\text{CH}_3\text{OH}$		$\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$	
	Содержание*, %	Стандартное отклонение	Содержание*, %	Стандартное отклонение
Пальмитиновая к-та (C16:0)	7,34	0,11	7,65	0,11
Линолевая к-та (C18:2 ω 6, cis)	8,76	0,14	8,72	0,16
Олеиновая к-та (C18:1 ω 9, cis)	12,04	0,26	12,22	0,23
Линолеидиновая к-та (C18:2 ω 6, trans)	0,61	0,07	0,57	0,05
Стеариновая к-та (C18:0)	5,73	0,13	5,82	0,11
Пуниковая к-та (C18:3, 9cis, 11trans, 13cis)	39,87	0,44	44,57	0,39
α -Элеостеариновая к-та (C18:3, 9cis, 11trans, 13trans)	7,68	0,21	6,87	0,23
Каталповая к-та (C18:3, 9trans, 11trans, 13cis)	5,98	0,15	4,23	0,17

Название	CH ₃ COCl/CH ₃ OH		CH ₃ ONa/CH ₃ OH	
	Содержание*, %	Стандартное отклонение	Содержание*, %	Стандартное отклонение
β-Элеостеариновая к-та (C18:3, 9trans, 11trans, 13trans)	6,65	0,11	4,08	0,13
Эйкозеновая к-та (C20:1 ω9, cis)	1,98	0,16	1,87	0,14
Арахидоновая к-та (C20:0)	3,13	0,12	3,21	0,13
Лигноцериновая к-та (C24:0)	0,23	0,09	0,19	0,08
Конъюгированные линоленовые к-ты, всего	60,18	—	59,75	—

*Средний результат 5 измерений.

Данную кислоту можно использовать в качестве индикаторного компонента при определении аутентичности масла граната. Очевидно, что в кислой среде более интенсивно протекает процесс переконфигурации *цис*-связей в *транс*-связи, при этом общее количество конъюгированных линоленовых кислот остается постоянным. Степень изомеризации зависит от времени протекания реакции, увеличиваясь со временем. При использовании в качестве дериватизирующего агента метилата натрия изомеризация протекает в гораздо меньшей степени. Полученные данные согласуются с литературными [9; 13] и позволяют рекомендовать метилат натрия для получения производных и последующего прецизионного анализа подобных объектов методами ГХ и ГХ/МС. На рис. 1 показана хроматограмма по полному ионному току масла граната, приведено соотнесение сигналов.

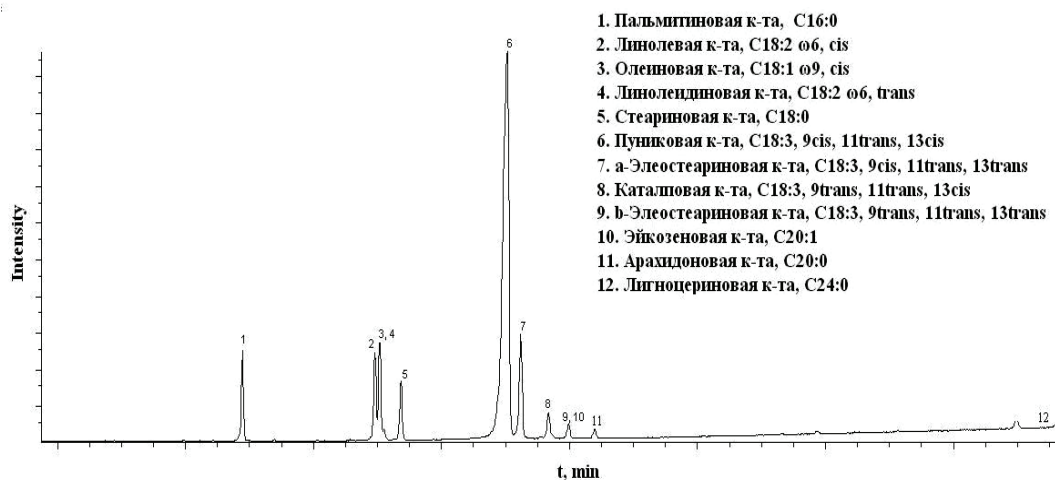


Рис. 1. Хроматограмма по полному ионному току метиловых эфиров жирных кислот, входящих в состав масла *Punica Granatum L.*

Спектроскопия ЯМР ¹³C широко используется для изучения состава и строения сложных водно-органических объектов [2], в том числе масел и жиров, являясь исключительно полезной для идентификации геометрических изомеров конъюгированных C18:3 кислот [8] по характеристическим сигналам углеродных атомов

олефиновой области спектра (126—136 м.д.). На рис. 2 представлен фрагмент спектра ЯМР ^{13}C свободных жирных кислот, полученных омылением образца, дано соотношение сигналов, соответствующих присутствующим в образце конъюгированным линоленовым кислотам. Видно, что в масле граната изначально присутствуют небольшие количества геометрических изомеров основного компонента — пуниковой кислоты.

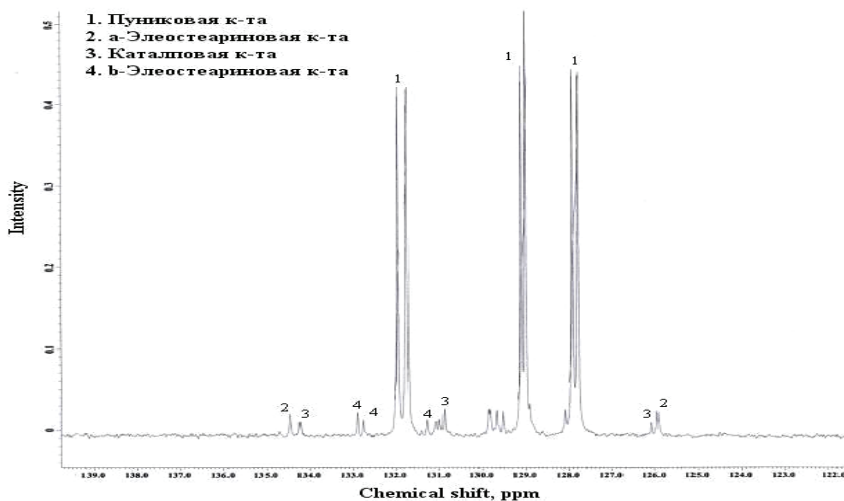


Рис. 2. Фрагмент спектра ЯМР ^{13}C (область олефиновых углеродных атомов).

Изучен жирнокислотный состав масла граната, полученного из отходов от промышленного получения гранатового сока. Масло состоит из триглицеридов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, в основном пуниковую кислоту, обладающую выраженным положительным биологическим эффектом на организм. Показано, что использование метода хроматомасс-спектрометрии в сочетании с получением производных метиловых эфиров кислот в щелочной среде для предотвращения изомеризации конъюгированных линоленовых кислот во время метилирования позволяет прецизионно определить состав подобных масел. Предложено использовать пуниковую кислоту в качестве индикаторного компонента аутентичности масла граната.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бахтеев Ф.Х. Важнейшие плодовые растения: Пособие для учителей. — М.: Просвещение, 1970.
- [2] Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. — М.: Химия, 2000.
- [3] Никитин А.А., Панкова И.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений. — Л.: Наука, 1982.
- [4] Нуралиев Ю. Лекарственные растения. — Изд. 2-е, исправленное. — Душанбе: МАОРИФ, 1989.

- [5] Пономарева С.Ю., Хомик А.С., Суслина С.Н., Вандышев В.В. Семена *Punica Granatum L.* — источник биологически активных веществ // Материалы IV Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов». — М.: ПАЕН, 2007. — С. 102—103.
- [6] Arshi Malik, Farrukh Afag, Sami Safaraz, Vagar M. Adhami, Deeba N. Syed, and Hasan Mukhtar. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer // PNAS. — 2005. — Vol. 102. — № 41. — P. 14813—14818.
- [7] Arshi Malik, Hasan Mukhtar. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit // Cell Cycle. — 2006. — Vol. 5. — № 4. — P. 371—373.
- [8] Gary Sassano, Paul Sanderson, Johan Franx, Pascal Groot, Jeroen van Straalen, Josep Bassaganya-Riera. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid // J. Sci. Food Agric. — 2009. — Vol. 89. — P. 1046—1052.
- [9] Jingnan Chen, Ying Cao, Hongli Gao, Lin Yang, Zhen-Yu Chen. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation // Chemistry and physics of lipids. — 2007. — Vol. 150. — P. 136—142.
- [10] Naghma Khan, Naghma Hadi, Farrukh Afag, Deeba N. Syed, Mee-Hyang Kweon and Hasan Mukhtar. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice // Carcinogenesis. — 2007. — Vol. 28. — № 1. — P. 163—173.
- [11] Navindra P. Seeram, William J. Aronson, Yanjun Zhang, Susanne M. Henning, Aune Moro, Ru-po Lee, Maryam Sartippour, Diane M. Harris, Matthew Rerrig, Marc A. Suchard, Allan J. Pantuck, Arie Beldegrun and David Heber. Pomegranate Ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland // Journal of Agricultural and food chemistry. — 2007. — Vol. 55. — P. 7732—7737.
- [12] Robert Neurath, Nathan Strick, Yun-Yao Li and Asim K Debnath. Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide // BMC Infection Diseases. — 2004. — Vol. 4. — P. 41.
- [13] Ying Cao, Lin Yang, Hong-Li Gao, Jing-Nan Chen, Zhen-Yu Chen, Qiu-Shi Ren. Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC-MS and NMR // Chemistry and physics of lipids. — 2007. — Vol. 145. — P. 128—133.

THE FATTY ACID PROFILE OF *PUNICA GRANATUM L.* SEED OIL

S.V. Goryainov, A.S. Khomik, G.A. Kalabin,
V.V. Vandyshov, R.A. Abramovich

People's Friendship University of Russia
Mikluho-Maklaya str., 6/2, Moscow, Russia, 117198

One of the modern trends of pharmaceutical research is the search for new types of plant materials to extend the range of fatty oils for medical application. The main source of fatty oils are oil seeds and fruits of plants. Pomegranate seeds are of interest as a source of fatty oils atypical chemical composition. In one of our earlier studies by gas chromatography it was established that 40—60% of an unidentified acid is presented in pomegranate seed oil. According to the literature, the most likely to consider it as conjugated linolenic acid. In this paper, we have continued to study the composition of pomegranate seed oil with using GC-MS and NMR spectroscopy methods.

Key words: pomegranate seed oil, gas chromatography / mass-spectrometry, NMR spectroscopy, fatty acid profile, conjugated linolenic acid.