

УДК 543.544:547.913

ЭФИРНОЕ МАСЛО ОРЕГАНО КАК ИНГИБИТОР ОКИСЛЕНИЯ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2011 г. М. Б. Теренина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова, Е. С. Алинкина,
Л. Д. Фаткулина, А. К. Воробьева

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.10.2010 г.

Исследовано ингибирование окисления метиловых эфиров жирных кислот эфирным маслом орегано методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии. Смесь жирных кислот была выделена из мозга мышей и содержала насыщенные, моно-, ди- и полиненасыщенные кислоты с числом атомов углерода от 16 до 24. Изучено изменение состава гексанового раствора эфиров в присутствии масла орегано и без него при автоокислении на свету в течение 1 года. Установлено, что скорость окисления ненасыщенных жирных кислот возрастала с увеличением степени их ненасыщенности. Эфирное масло орегано ингибировало процесс окисления. Антиоксидантная активность масла увеличивалась с увеличением его концентрации. Показано, что карвакрол и тимол являлись основными антиоксидантными компонентами эфирного масла орегано.

Природные антиоксиданты как альтернатива синтетическим в последние годы находят широкое применение в пищевой промышленности, косметологии, фармацевтике, медицине. Их используют для ингибирования процессов окисления в сложных биологических системах, содержащих липиды [1–3]. Известно, что эфирные масла обладают биологической активностью, в том числе и антиоксидантной [4, 5]. В ряде исследований найдено, что высокую антиоксидантную активность (АОА), сравнимую с активностью α -токоферола, проявляют масла пряных растений: гвоздика, орегано, тимьян, розмарин, базилик [4–9].

Антиоксидантная активность эфирных масел в значительной степени зависит от их состава. Они представляют собой сложные смеси, содержащие несколько десятков органических соединений. Основными компонентами масел являются терпеновые углеводороды, функциональные производные терпенов, секвитерпены, бензольные производные. Исследование их АОА показало, что наиболее сильными антиоксидантами являются фенольные соединения. Тимол и карвакрол, основные компоненты ряда эфирных масел, по способности ингибировать окисление близки к α -токоферолу [10, 11]. АОА масел различных видов орегано и чабреца увеличивалась с увеличением концентрации этих соединений в их составе [12]. Высокую АОА проявляли монотерпеновые углеводороды, терпинолен, α - и γ -терпинены [10, 11]. Как правило, АОА эфирных масел выше, чем активность индивидуальных компонентов, что указывает на наличие синергетического эффекта за счет сложного многокомпонентного состава масел [11–13].

Антиоксидантные свойства эфирных масел зависят не только от состава тестируемых систем, но и от метода оценки, поэтому результаты, полученные разными методами, невозможно сопоставить [11, 14, 15]. Одним из простых и информативных методов являлось ингибирование автоокисления низшего альдегида в присутствии антиоксиданта, который использовался успешно для определения АОА эфирных масел [16–19].

Наибольший интерес вызывает использование эфирных масел для предотвращения окисления высших жирных кислот (ЖК), особенно в живых системах. В опытах на животных было показано, что уменьшающийся с возрастом уровень полиненасыщенных жирных кислот можно стабилизировать добавлением в пищу лабораторным животным растительных эфирных масел, обладающих антиоксидантной активностью [20–22]. Эфирные масла активно ингибировали окисление полиненасыщенных ЖК в модельных экспериментах [10, 23–26]. Проявление антиоксидантной или прооксидантной активности эфирных масел по отношению к жирным кислотам полностью зависит от состава и концентрации тестируемых систем. Ранее нами обнаружено, что однократное и десятикратное масла лимона, отличающиеся только количественным составом основных компонентов из-за различных методов выделения, обладали различной АОА [26]. Однократное масло лимона, содержащее большее количество лимонена и γ -терпинена, ингибировало окисление метиллинолеата и метилолеината, а десятикратное — ускоряло этот процесс, т.е. проявляло прооксидантную активность [26]. В последнем случае метиловые эфиры полиненасыщенных ЖК являлись антиоксиданта-

ми по отношению к отдельным компонентам десятикратного эфирного масла лимона. В работе [25] показано, что высокой АОА обладали полиненасыщенные ЖК с числом атомов углерода в цепи от 16 до 24. Способность компонентов эфирных масел конкурировать с полиненасыщенными жирными кислотами за окисляющие агенты является химической основой их АОА. В настоящее время доказано, что АОА определяется составом всей изучаемой системы, поэтому важно определять свойства антиоксидантов в реальных продуктах или модельных системах, максимально воспроизводящих такие продукты [14, 27].

Цель работы — изучение влияния структуры полиненасыщенных ЖК на степень ингибирования их автоокисления в системе, содержащей эфирное масло орегано и сложную смесь метиловых эфиров жирных кислот, выделенную из мозга мышей.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования выбрана смесь жирных кислот, выделенных из мозга мышей линии BALB в возрасте 6 мес. Мозг гомогенизировали вручную в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. К 1 г гомогената, помещенного в стеклянную пробирку с герметично завинчивающейся пробкой добавляли 25 мл метанола и оставляли в холодильнике на 1 ч, затем при охлаждении и интенсивном перемешивании добавляли 1 мл ацетилхлорида и кипятили на водяной бане 1 ч. К образцу добавляли 25 мл 6%-ного водного раствора K_2CO_3 и встряхивали. Полученные метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали 10 мл гексана. Гексановый раствор отделяли после центрифугирования в течение 5 мин при 970 g и сушили над безводным сульфатом натрия. После добавления 2 мкл тетрадекана (внутренний стандарт) раствор МЭЖК разделяли на 3 пробы по 2.5 мл, которые помещали в пробирки объемом 5 мл. В растворы 2 и 3 добавляли 0.005 и 0.5 мкл эфирного масла орегано, что соответствовало 0.1 и 10% по отношению суммарному количеству МЭЖК, так как в образцах 1–3 содержалось по 5 г/смесь МЭЖК. В контрольный раствор 1 масло не добавляли. Образцы в закрытых пробками пробирках хранили на свету при комнатной температуре в течение 12 мес. Каждую неделю пробирки открывали и продували 10 мл воздуха с помощью пипетки. Количественное содержание веществ в образцах определяли методом капиллярной газовой хроматографии в течение 2 мес каждые 2 нед, а затем через каждый месяц хранения.

Газохроматографический анализ (ГЖХ) образцов проводили на хроматографе Кристалл 2000 М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (50 м × 0.32 мм, слой фазы 0.25 мкм, фирма “Supelco”, США) при программировании температуры колонки от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин и температуре инжек-

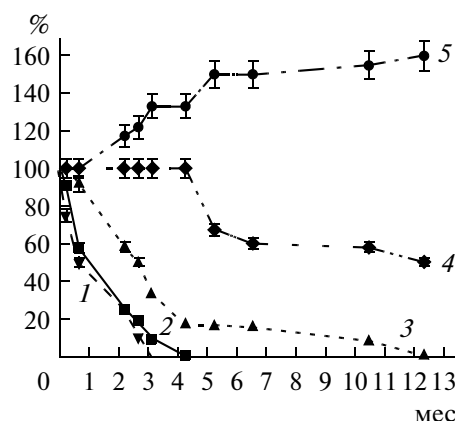


Рис. 1. Изменение содержания (%) тимола (1), карвакрола (2), γ -терпинена (3), линалоола (4) и п-цимена (5) в образце 3 с увеличением длительности хранения (мес).

тора и детектора 250°C. Скорость газа-носителя—гелия через колонку составляла 2 мл/мин. Анализировали по 2 мкл гексановых растворов. Количественное содержание веществ в растворах образцов рассчитывали по отношению площадей пиков, соответствующих веществам и внутреннему стандарту. Степень окисления МЭЖК и компонентов эфирных масел (%) определяли по отношению к их содержанию в исходных образцах.

Идентификацию компонентов в образцах осуществляли на основе величин индексов удерживания и масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных ГЖХ, на приборе HP 5890/5980 (“Hewlett Packard”, США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основными компонентами выбранного для исследования масла орегано являлись (%): карвакрол — 64.2, п-цимен — 17.4, γ -терпинен — 11.3, тимол — 3.0, линалоол — 2.9. Исследования показали, что в процессе хранения происходили значительные изменения в составе эфирного масла (рис. 1). Наиболее сильному окислению подвергались фенольные соединения, которые, как известно, являлись очень активными антиоксидантами [10–12]. Окисление карвакрола, тимола и γ -терпинена начиналось уже через 1 нед хранения. Карвакрол и тимол полностью исчезали через 12 и 14 нед хранения соответственно. В меньшей степени наблюдалось окисление γ -терпинена. За 18 нед его количество уменьшилось в 6 раз, к концу эксперимента оставалось 8% γ -терпинена по отношению к исходному количеству. Окисление линалоола начиналось после 18 нед и через 1 год хранения 67% спирта оставалось неокисленным. Как видно из рис. 1, в про-

Состав МЭЖК, выделенных из мозга мышей (отн. %)

№	Индекс удерживания	МЭЖК	Кислота	Отн. %
1	1883	16 : 1 ω 9* 16 : 1 ω 7	7-гексадеценовая 9- гексадеценовая	0.35
2	1912	16 : 0	Гексадекановая (пальмитиновая)	21.61
3	2011	17 : 0	Гептадекановая (маргариновая)	0.10
4	2075	18 : 2 ω 6	9,12-октадекадиеновая (линолевая)	0.66
5	2080	18 : 1 ω 9	9-октадеценовая (олеиновая)	16.19
6	2087	18 : 1 ω 7	11-октадеценовая	4.15
7	2113	18 : 0	Октадекановая (стеариновая)	23.28
8	2235	20 : 4 ω 6	5,8,11,14-эйкозатетраеновая (арахидоновая)	8.86
9	2253	20 : 3 ω 6, 20 : 3 ω 9	8,11,14-эйкозатриеновая 5,8,9-эйкозатриеновая	0.40
10	2265	20 : 2 ω 9	8,11-эйкозациеновая	0.10
11	2273	20 : 2 ω 6	11,14-эйкозациеновая	0.15
12	2281	20 : 1 ω 9	11-эйкозеновая	2.28
13	2287	20 : 1 ω 7	13-эйкозеновая	0.35
14	2311	20 : 0	Эйкозановая (арахиновая)	0.66
15	2418	22 : 5 ω 6	4,7,10,13,16-докозапентаеновая	0.35
16	2423	22 : 6 ω 3	4, 7,10,13,16,19-докозагексаеновая	12.25
17	2431	22 : 4 ω 6	7,10,13,16-докозатетраеновая	3.04
18	2482	22 : 1 ω 9	13-докозеновая	0,25
19	2487	22 : 1 ω 7	15-докозеновая	0.25
20	2515	22 : 0,	Докозановая (бегеновая)	0.76
21	2616	23 : 0	Трикозановая	0.25
22	2690	24 : 1 ω 9, 24 : 1 ω 7	15-тетракозеновая 17-тетракозеновая	2.43
23	2718	24 : 0	Тетракозановая	1.26

* Первая цифра в обозначении кислоты показывает число атомов углерода в цепи, вторая — количество метиленпрерывающихся двойных связей, величина ω показывает номер углеродного атома (считая от конца цепи), у которого расположена первая двойная связь.

цессе хранения в 1.6 раза увеличивалось количество п-цимена. Это связано с тем, что γ -терпинен окислялся до п-цимена. Такое поведение было обнаружено ранее при хранении эфирных масел [28]. Механизм этой реакции и антиоксидантная активность терпиненов изучена в работе [29].

В таблице представлен состав жирных кислот, выделенных из мозга мышей. Как видно, смесь содержала насыщенные, моно- и полиненасыщенные кислоты с числом атомов углерода в цепи от 16 до 24. Суммарное количество насыщенных кислот состав-

ляло почти 45%. Остальная часть — это ненасыщенные кислоты, содержащие от 1 до 6 двойных связей, в том числе наиболее чувствительные к окислению кислоты, такие, как 20:4 ω 6, 22:6 ω 3, 22:4 ω 6.

Результаты исследования показали, что в условиях эксперимента при хранении в течение 1 г. в образцах с маслом орегано и без него не происходило окисление метиловых эфиров насыщенных жирных кислот. Также не подвергались окислению мононенасыщенные МЭЖК с числом атомов углерода 16, 20, 22 и 24. Несколько иная картина наблюдалась в

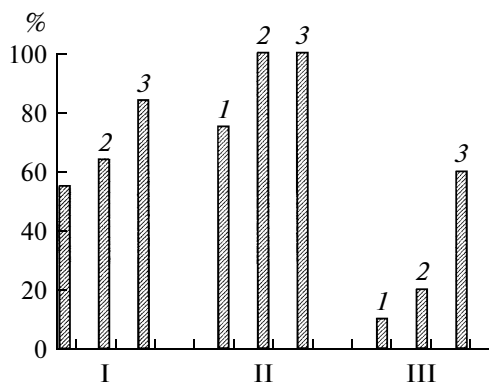


Рис. 2. Содержание (%) метиловых эфиров кислот 18:1ω9 (I), 18:1ω7 (II) и 18:2ω6 (III) в образцах 1 (контроль), 2 и 3 через 12 мес автоокисления.

случае ненасыщенных кислот С-18. Незначительное окисление метиловых эфиров олеиновой и 11-октадеценовой кислот начиналось после 4 мес в контрольном образце (1) и в образце с меньшей концентрацией эфирного масла (2). На рис. 2 представлены данные по изменению содержания метиловых эфиров С-18 моно- и диненасыщенных кислот в системах, хранившихся 1 г. Как видно, добавление в смесь масла орегано замедляло процесс окисления этих соединений, причем увеличение концентрации эфирного масла усиливало его активность. Обнаружено, что степень окисления зависела от положения двойной связи. Эфир кислоты 18:1ω7 более устойчив к окислению по сравнению с 18:1ω9. После 1 г автоокисления в образце 3 оставалось 84% МЭ олеиновой кислоты, 100% МЭ 11-октадеценовой кислоты. Линолевая кислота, содержащая 2 двойных связи, более чувствительна к окислению. Уже через 4 мес начиналось активное окисление метиллинолеата в образцах 1 и 2, однако скорость этого процесса в смеси с орегано была в 2 раза меньше. Увеличение концентрации эфирного масла в 100 раз значительно ингибировало окисление метиллинолеата. Так, к концу эксперимента в смесях 1, 2 и 3

оставалось 10, 20 и 60% метиллинолеата соответственно.

С увеличением числа двойных связей степень окисления МЭЖК увеличивалась. Особенно легко окислялись наиболее важные тетра- и гексаненасыщенные кислоты. На рис. 3 представлено изменение содержания МЭ кислот 20:4ω6, 22:4ω6 и 22:6ω3 в процессе автоокисления. Найдено, что в контрольном образце и в образце 2 наблюдалось окисление этих кислот уже через 1 мес. Наличие в смеси 0.002 мкг/мл эфирного масла орегано (образец 2) ингибировало процесс окисления на 15–20%. Так, через 2.5 мес в контрольном образце оставалось 41% эфира кислоты 20:4ω6, 46% – 22:4ω6 и только 22% – 22:6ω3, а в образце 2 их содержание было несколько больше: 56, 64 и 41% соответственно. Через 6.5 мес в контрольном образце и в образце 2 полностью окислялись МЭ 20:4ω6 и 22:4ω6, а эфир более активной 22:6ω3 исчезал уже к 5 мес автоокисления.

Увеличение концентрации масла орегано в 100 раз значительно замедляло окисление МЭ полиненасыщенных кислот. Сравнение данных рис. 1 и 3 показало, что в течение 4 мес процесс активного окисления тимола, карвакрола, γ-терпинена полностью ингибировал окисление МЭ кислот 20:4ω6, 22:4ω6 и 22:6ω3. После полного исчезновения фенольных соединений в качестве антиоксиданта продолжал действовать γ-терпинен и стали проявлять антиоксидантные свойства линалоол и другие минорные компоненты эфирного масла. Действие этих соединений не предотвратило дальнейшее окисление МЭЖК, но значительно замедлило этот процесс. К 12 мес хранения в образце 3 оставалось 15% эфира арахидоновой кислоты, но полностью окислялись эфиры полиненасыщенных кислот с 22 атомами углерода.

Таким образом, установлено, что эфирное масло орегано является эффективным антиоксидантом в системах, содержащих полиненасыщенные высшие жирные кислоты. Карвакрол и тимол – основные компоненты масла с антиоксидантным действием. Эфирные масла, содержащие фенольные производ-

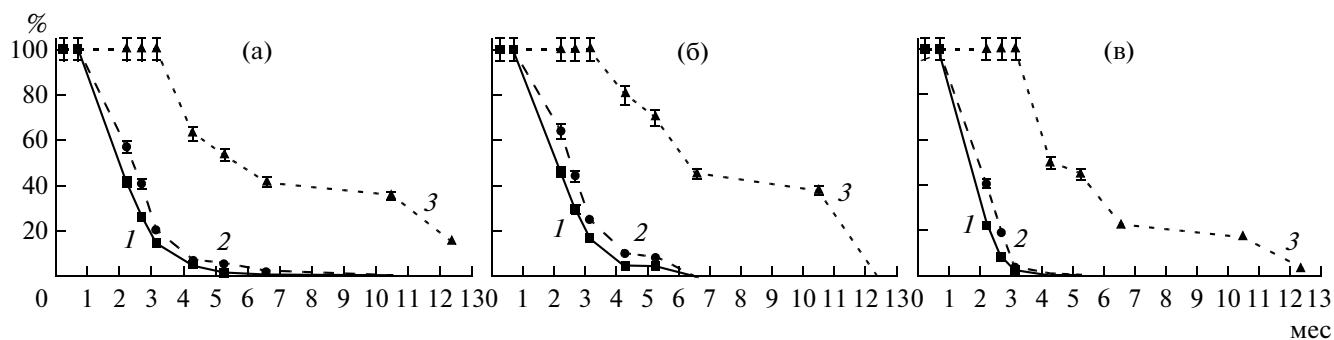


Рис. 3. Изменение содержания (%) метиловых эфиров кислот 20:4ω6 (а), 22:4ω6 (б) и 22:6ω3 (в) в образцах 1, 2 и 3 с увеличением длительности хранения (мес).

ные, могут быть с успехом использованы в качестве природных антиоксидантов в различных липидсодержащих пищевых продуктах, фармакологических препаратах и других объектах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Отделения химии и наук о материалах РАН 10-ОХНМ “Медицинская и биомолекулярная химия”, проект 01-РАН-01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shahidi F., Ho Ch.-T.* Antioxidant Measurement and Applications. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2007. V. 956. V. 4, P. 2–7.
2. *Shahidi F., Zhog Y.* Antioxidant Measurement and Applications. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2007. V. 956. P. 36–66.
3. *Boyd L.C.* Omega-3 Fatty Acids. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2001. V. 788. P. 258–279.
4. *Koroch A.R., Juliani H.R., Zygodlo J.A.* Bioactivity of essential oils and components. Flavour and Fragrances. / Ed. R.G. Berger. New York: Springer, 2007. P. 87–115.
5. *Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barosso J.G., Ruberto G.* // Flavour and Fragrance J. 1998. V. 13. P. 235–244.
6. *Wei A., Shibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 5. P. 1737–1742.
7. *Lee K.G., Shibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 15. P. 4947–4952.
8. *Jirovetz L., Buchbauer G., Stollova I., Stoyanova A., Krasnov A., Schmidt E.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 17. P. 6303–6307.
9. *Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro V., De Pascuale A., Saija A.* // Food Chem. 2005. V. 89. P. 549–554.
10. *Ruberto G., Baratta M.T.* // Food Chem. 2000. V. 69. P. 167–174.
11. *Kulusic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M.* // Food Chem. 2004. V. 85. P. 633–640.
12. *Hazzit M., Baalioamer A., Faleiro M.L., Miguel M.G.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 17. P. 6314–6321.
13. *Cabrera A.C., Prieto J.M.* // Food Chem. 2010. V. 118. P. 141–146.
14. *Huang D., Ou B., Prior R.L.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
15. *Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцев Е.В.* // Химия растит. сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
16. *Yanagimoto K., Ouchi K., Lee K.G., Sibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 3. P. 592–596.
17. *Мишарина Т.А., Поликов А.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 693–702.
18. *Мишарина Т.А., Самусенко А.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 3. С. 353–358.
19. *Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Калининченко* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 710–716.
20. *Recsan Z., Pagliuca G., Piretti M.V., Penzes L.G., Youdim K.A., Noble R.C., Deans S.G.* // J. Essent. Oil Res. 1997. V. 9. P. 53–56.
21. *Deans S.G., Noble R.C., Penzes L., Imre S.G.* // Age. 1993. V. 16. P. 71–74.
22. *Youdim K.A., Deans S.G.* // British J. Nutr. 2000. V. 83. p. 87–93.
23. *Farag R.S., Badei A., Hewedi F.M., Elbaroty G.S.A.* // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989. V. 66. № 3. P. 792–799.
24. *Yanishlieva N.V., Mariniva E.M., Gordon M.H., Raneva V.G.* // Food Chem. 1999. V. 64. P. 59–66.
25. *Henry G.E., Momin R.A., Nair M.G., Dewitt D.L.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 8. P. 2231–2234.
26. *Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Медведева И.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 599–604.
27. *Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P.* // Progr. Lip. Res. 2007. V. 46. P. 244–282.
28. *Мишарина Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 6. С. 726–732.
29. *Foti M.C., Ingold K.U.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 9. P. 2758–2765.

Oregano Essential Oil as an Inhibitor of Higher Fatty Acid Oxidation

M. B. Terenina, T. A. Misharina, N. I. Krikunova, E. S. Alinkina,
L. D. Fatkulina, and A. K. Vorob'yova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

e-mail: tmish@rambler.ru

Received October 8, 2010

Abstract—Inhibition of the oxidation of fatty acids methyl esters by oregano essential oil was studied using capillary gas chromatography. A mixture of fatty acids which contained saturated, mono-, di-, and polyunsaturated acids with 16–24 carbon atoms was extracted from mice brain. Changes in the composition of esters in hexane solutions both in the presence of oregano essential oil and without it were examined during their autooxidation in light for 1 year. It was found that the oxidation rate of unsaturated fatty acids increases with increasing degree of their unsaturation. Oregano essential oil inhibited the oxidation process. Antioxidant activity of the oil increased with increase of its concentration. It was shown that carvacrol and thymol are the main antioxidant components of oregano oil.