

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-535-542>

Поступила 05.09.2024

Поступила после рецензирования 28.10.2024

Принята в печать 01.11.2024

© Соболев Р. В., Соколов И. Е., Петров Н. А., Саркисян В. А., Кочеткова А. А., 2024



<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ, РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦИКЛИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.): ОБЗОР

Соболев Р. В.^{*}, Соколов И. Е., Петров Н. А., Саркисян В. А., Кочеткова А. А.

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

льняное масло,
циклолинопептиды,
выделение,
определение
содержания,
жидкостная
экстракция,
твердофазная
экстракция

Лен масличный (*Linum usitatissimum* L.) является ценнейшей культурой, характеризующейся высоким содержанием жиров, пищевых волокон, белка, а также различных биологически активных веществ, в частности циклических пептидов. Циклические пептиды — группа циклических гидрофобных пептидов, состоящих из восьми-десяти аминокислот с молекулярной массой в диапазоне 950–2300 Да. Масло и семена льна содержат в своем составе от 0,1 до 0,3% циклических пептидов, способных проявлять антиоксидантную, противовоспалительную, иммуносупрессивную, антигипертензивную и противоопухолевую активности. Цель настоящего обзора заключалась в систематизации и обобщении имеющихся литературных данных о методах экстракции, разделения и идентификации циклических пептидов из масла семян льна масличного. Установлено, что основными методами получения циклических пептидов являются экстракции типа «твердое вещество — жидкость», «жидкость — жидкость» или «твердофазная» экстракция. В качестве растворителей обычно применяют метанол, гексан, этилацетат, дихлорметан, ацетонитрил и деионизованную воду. Для очистки и концентрирования циклических пептидов используют препаративную флеш-хроматографию на силикагеле или полимерных адсорбентах, для получения индивидуальных стандартов — высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В качестве неподвижной фазы наиболее часто используют неполярные модифицированные сорбенты — октадецильные (C18) и фенилгексилные функциональные группы. Идентификацию проводят с использованием инструментальных методов анализа: ИК-спектроскопии, ЯМР, ВЭЖХ с детектором типа диодная матрица (HPLC-PDA/DAD), tandemной масс-спектрометрией высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ESI-HR-MS/MS). Для качественного и количественного определения циклических пептидов достаточным является осуществление метода ВЭЖХ с детектором типа диодная матрица на длине волны 214 нм. В свою очередь, масс-спектральные методы, в том числе tandemная масс-спектрометрия, позволяют подтвердить качественный состав и установить аминокислотную последовательность циклических пептидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена в рамках гранта Российского Научного Фонда (проект № 24-16-00171 «Циклические пептиды *Linum usitatissimum*. Особенности получения, биологическая активность и перспективы их пищевого применения»)

Received 05.09.2024

Accepted in revised 28.10.2024

Accepted for publication 01.11.2024

© Sobolev R. V., Sokolov I. E., Petrov N. A., Sarkisyan V. A., Kochetkova A. A., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

METHODS OF EXTRACTION, SEPARATION AND IDENTIFICATION OF CYCLIC PEPTIDES FROM FLAXSEED (*LINUM USITATISSIMUM* L.): A REVIEW

Roman V. Sobolev^{*}, Ilya E. Sokolov, Nikita A. Petrov, Varuzhan A. Sarkisyan, Alla A. Kochetkova

Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia

KEY WORDS:

Flaxseed oil,
cyclolinopeptides,
separation, content
analysis, liquid
extraction,
solid-phase extraction

ABSTRACT

Oilseed flax (*Linum usitatissimum* L.) is a valuable crop characterized by a high content of fats, dietary fiber, protein and various biologically active substances, in particular cyclopeptides. Cyclic peptides are a group of cyclic hydrophobic peptides consisting of eight to ten amino acids with a molecular weight in the range of 950–2300 Da. Flax oil and seeds contain from 0.1 to 0.3% cyclopeptides, which can exhibit antioxidant, anti-inflammatory, immunosuppressive, antihypertensive and antitumor activity. The aim of this review was to systematize and summarize the available literature data on methods of extraction, separation and identification of cyclopeptides from flaxseed oil. It was found that the main methods for obtaining cyclopeptides are solid-liquid, liquid-liquid or solid-phase extraction. Commonly used solvents include methanol, hexane, ethyl acetate, dichloromethane, acetonitrile and deionized water. Preparative flash chromatography on silica gel or polymer adsorbents is used to purify and concentrate cyclopeptides, and high-performance liquid chromatography (HPLC) is used to obtain individual standards. The most commonly used stationary phases are non-polar modified sorbents — octadecyl (C18) and phenylhexyl functional groups. Identification is carried out using instrumental methods of analysis: IR spectroscopy, NMR, HPLC with a diode array detector (HPLC-PDA/DAD), high-resolution tandem mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-HR-MS/MS). For the qualitative and quantitative determination of cyclopeptides, the HPLC with a diode array detector at a wavelength of 214 nm is sufficient. In turn, mass spectral methods, including tandem mass spectrometry, make it possible to confirm the qualitative composition and establish the amino acid sequence of cyclic peptides.

FUNDING: The work was performed within the framework of the grant of the Russian Science Foundation (project No. 24–16–00171 “Cyclic peptides from *Linum usitatissimum*. Features of production, biological activity and prospects for their food application”).

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Соболев, Р. В., Соколов, И. Е., Петров, Н. А., Саркисян, В. А., Кочеткова, А. А. (2024). Методы экстракции, разделения и идентификации циклических пептидов из льна масличного (*Linum usitatissimum* L.): Обзор. *Пищевые системы*, 7(4), 535–542. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-535-542>

FOR CITATION: Sobolev, R. V., Sokolov, I. E., Petrov, N. A., Sarkisyan, V. A., Kochetkova, A. A. (2024). Methods of extraction, separation and identification of cyclic peptides from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): A review. *Food Systems*, 7(4), 535–542. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-4-535-542>

1. Введение

Лен масличный (*Linum usitatissimum* L.) является одной из наиболее распространенных культур в Российской Федерации и с каждым годом находит все большее применение. Россия вошла в число крупнейших производителей и экспортеров льняного семени в мире, собрав в 2022 году свыше 1,7 млн тонн и обойдя Казахстан по объемам производства [1]. Семена льна отличаются высоким содержанием жиров (41%), пищевых волокон (28%) и белка (20%). Влажность семян составляет 7,7%, а зольность — 3,4% [2]. Лен масличный также богат цианогенными гликозидами, фенольными соединениями, лигнанами, слизью, минералами, витаминами и циклическими пептидами [2,3]. Большое разнообразие соединений, содержащихся в льняном семени, обеспечивает его высокую пищевую ценность, при этом некоторые из них обладают функциональными свойствами и могут быть использованы для разработки пищевых ингредиентов и специализированных пищевых продуктов [4,5].

Особый интерес к льняному семени обусловлен наличием в его составе таких биологических активных соединений, как циклические пептиды (ЦП, циклолинопептиды). ЦП представляют собой группу циклических гидрофобных пептидов, состоящих из восьми (октапептиды), девяти (нонапептиды) или реже десяти (декапептиды) аминокислот с молекулярной массой в диапазоне 950–2300 Да [6]. В данных соединениях присутствует кольцевая последовательность связей, в которой кольцевая структура образована посредством связи между одним концом пептидной связи и другим концом с амидной связью или любыми другими химически стабильными связями, такими как эфирная, тиоэфирная, лактонная и дисульфидная [7].

Характерное строение первого выделенного ЦП представлено на Рисунке 1.

Циклический пептид А (CLA), представленный на Рисунке 1, содержит 8 аминокислот: изолейцин, лейцин, валин, пролин, фенилаланин, фенилаланин, изолейцин (Иле-Лей-Вал-Про-Фен-Фен-Лей-Иле) [2]. Широкий диапазон свойств, характерных для ЦП льна (антиоксидантные, противовоспалительные, иммуносупрессивные, антигипертензивные и противоопухолевая активности), делает их перспективными натуральными компонентами из льняного семени с добавленной стоимостью [8–11].

Для широкого применения ЦП в промышленности возможны два пути их получения: химический синтез этих веществ и экстракция из растительного сырья. Синтетический подход малоэффективен с экономической точки зрения ввиду сложности необходимых реакций, их большого количества, значительной стоимости применяемых реагентов и неодинаковой эффективности каждой стадии синтеза. В связи с этим оптимальным подходом остается извлечение ЦП из растительного сырья как в индивидуальном виде, так и в составе смесей [12].

Льняное масло имеет характерный горький привкус. Согласно данным статьи [13], горький привкус масла положительно коррелирует с содержанием в его составе циклического пептида Е, при этом также известна связь горького привкуса с присутствием других окисленных метионином ЦП [14,15]. Согласно сведениям, представленным в работах [2,13,16], в льняном масле идентифицировано более 20 различных ЦП.

Учитывая высокую потенциальную биологическую ценность ЦП и их влияние на органолептические свойства масла, существует необходимость поиска эффективного способа их выделения. Выделение ЦП — прием технологической глубокой переработки сельскохозяйственного сырья, обеспечивающий новые возможности в производстве специализированных пищевых продуктов. ЦП

встречаются в льняном семени в низких концентрациях, поэтому выделение отдельных пептидов требует большого количества исходного материала [15]. Обычно ЦП получают из масла, выделяемого из льняного семени двумя основными способами: прессованием (преимущественно холодное) либо сочетанием прессования и экстракции. Учитывая широкое разнообразие ЦП, важно точно идентифицировать химический состав и структуру выделенных компонентов, в связи с чем разрабатывается множество методов определения их химического состава.

Таким образом, цель настоящего обзора заключалась в систематизации и обобщении имеющихся литературных данных о методах экстракции, разделения и идентификации циклических пептидов из масла семян льна масличного (*Linum usitatissimum* L.).

2. Объекты и методы

Объектами исследования являлись научные публикации, посвященные изучению экстракции, разделения и идентификации циклических пептидов из льна масличного (*Linum usitatissimum* L.) и продуктов его переработки.

2.1. Методы поиска литературы

Систематический поиск научной литературы был проведен с использованием поисковых систем PubMed, Scopus, Web of Science и Google Scholar по ключевым фразам с включением операторов «и» и «или»: «flaxseed cyclic peptides», «cyclolinopeptides», «extraction of cyclic peptides from flaxseed», «flaxseed orbitides», «linusorbs», «identification of cyclic peptides from flaxseed».

2.2. Критерии включения/исключения

Исследования были сгруппированы по тематическим областям обзора, статьи исключались на основании предварительного анализа названия и аннотации.

Критерии включения:

- 1) опубликованные научные статьи;
- 2) проиндексированный источник;
- 3) тематика статей — исследование экстракции, разделения и идентификации циклических пептидов льна;
- 4) включение статей, опубликованных ранее 2015 г., возможно в случае отсутствия новых источников по заданным критериям поиска;
- 5) преимущественно зарубежные источники.

Критерии исключения:

- 1) статьи, опубликованные ранее 2001 г., за исключением общепризнанных;
- 2) тезисы докладов конференций.

Были рассмотрены полные тексты статей, соответствующих критериям поиска. Авторы независимо друг от друга провели анализ отобранных источников на предмет соответствия исследований критериям включения/исключения. Большинство используемых источников было опубликовано не ранее 2015 года.

3. Результаты и обсуждение

В исследовании [17] растительные циклические пептиды на основе их структуры и распределения в растениях были систематизированы в структурную классификацию, включающую два класса, пять подклассов и восемь типов (Рисунок 2).

Согласно исследованию [2], ЦП льняного масла были классифицированы как представители «гомомоноциклопептиды VI типа растений семейства Гвоздичные». Циклические пептиды из льняного семени нумеруют по дате их открытия, при этом каждому вновь открытому пептиду приписывалась следующая буква алфавита, например CLA (1), CLB (2), CLC (3) и т. д. Первый ЦП из льняного масла был выделен в 1959 году [18]. С тех пор подходы к экстракции ЦП из льна и продуктов его переработки модифицировались и развивались. Основные ЦП, обнаруженные в льняном масле, представлены в Таблице 1 [2].

3.1. Методы экстракции и разделения циклических пептидов

Благодаря широкому разнообразию свойств, присущих ЦП, они могут использоваться в качестве физиологически функциональных пищевых ингредиентов. Для этого необходимы экономически эффективные и безопасные методы экстракции. Многие проведенные исследования были сосредоточены на анализе биологической активности и характеристике ЦП, при этом процесс их экстракции, в частности безопасными растворителями, зачастую игнорируется. Экстракция и разделение ЦП остаются сложной задачей, особенно из-за неустойчивости большинства соединений [9]. Химический состав и биологическая активность ЦП, полученных разными способами,

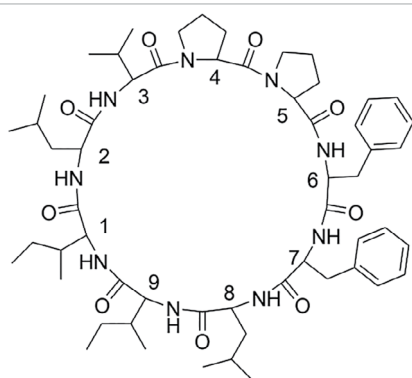


Рисунок 1. Структура циклического пептида А (CLA)

Figure 1. Structure of cyclic peptide A (CLA)

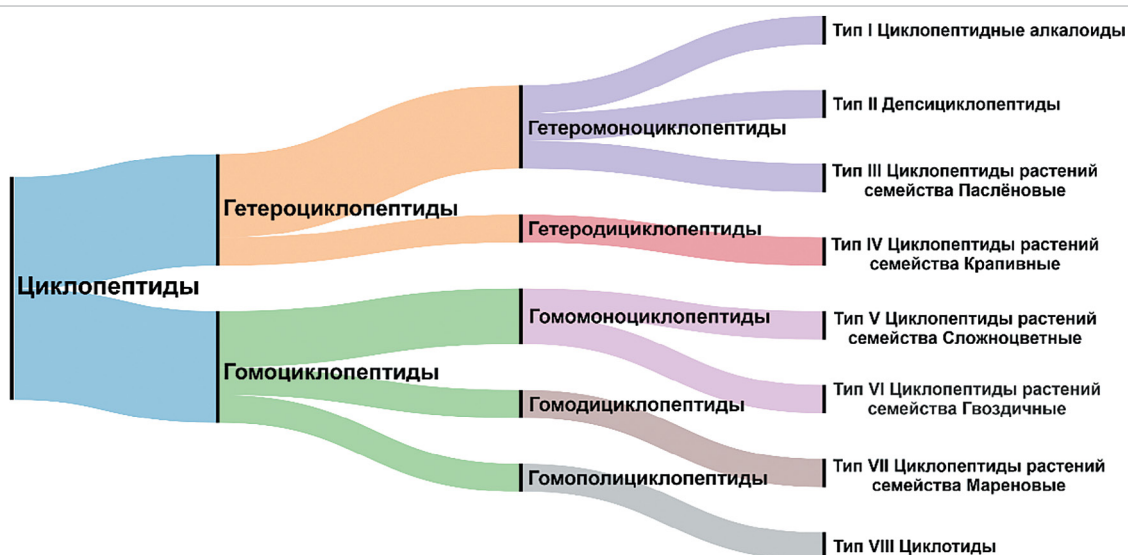


Рисунок 2. Классификация растительных циклических пептидов.

Воспроизведено (адаптировано) с разрешения [17]. Авторские права (2006) Американского химического общества
 Figure 2. Classification of plant cyclopeptides. Reprinted (adapted) with permission from [17]. Copyright (2006) American Chemical Society

Таблица 1. Общая номенклатура ЦП, содержащихся в льняном семени и продуктах его переработки

Table 1. General nomenclature of CLPs contained in flaxseed and its processed products

Порядок	Новое обозначение	Первое название	Последовательность аминокислот	Молекулярная масса (Да)	Источник
1	[1-9-NαC]-CLA	CLA	Иле-Лей-Вал-Про-Фен-Фен-Лей-Иле	1040,34	[18,19]
2	[1-9-NαC]-CLB	CLB	Мет-Лей-Иле-Про-Про-Фен-Фен-Вал-Иле	1058,38	[20,21]
3	[1-9-NαC], [1-MetO]-CLB	CLC	Мсо-Лей-Иле-Про-Про-Фен-Фен-Вал-Иле	1074,38	[21]
4	[1-9-NαC], [1-MetO ₂]-CLB	CLK	Мсн-Лей-Иле-Про-Про-Фен-Фен-Вал-Иле	1090,38	[22,23]
5	[1-8-NαC]-CLD	CLD', CLK, CLO	Мет-Лей-Лей-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1048,34	[15,24,25]
6	[1-8-NαC], [1-MetO]-CLD	CLD	Мсо-Лей-Лей-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1064,34	[21]
7	[1-8-NαC], [1-MetO ₂]-CLD	1-Msn-CLD	Мсн-Лей-Лей-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1084,34	[22]
8	[1-8-NαC]-CLE	CLE', CLJ, CLP	Мет-Лей-Вал-Фен-Про-Лей-Фен-Иле	961,26	[15,24,25]
9	[1-8-NαC], [1-MetO]-CLE	CLE	Мсо-Лей-Вал-Фен-Про-Лей-Фен-Иле	977,26	[21,26]
10	[1-8-NαC], [1-MetO ₂]-CLE	CLJ	Мсн-Лей-Вал-Фен-Про-Лей-Фен-Иле	993,26	[23]
11	[1-8-NαC]-CLF	CLF, CLL	Мет-Лей-Мет-Про-Фен-Фен-Три-Вал	1051,50	[24,25]
12	[1-8-NαC], [3-MetO]-CLF	CLI	Мет-Лей-Мсо-Про-Фен-Фен-Три-Вал	1068,35	[23]
13	[1-8-NαC], [1-MetO]-CLF	(Mso)- CLP-3	Мсо-Лей-Мет-Про-Фен-Фен-Три-Вал	1068,35	[27]
14	[1-8-NαC], [1,3-MetO]-CLF	CLF	Мсо-Лей-Мсо-Про-Фен-Фен-Три-Вал	1084,35	[26]
15	[1-8-NαC]-CLG	CLG, CLM	Мет-Лей-Мет-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1066,38	[24–26]
16	[1-8-NαC], [3-MetO]-CLG	CLN	Мет-Лей-Мсо-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1082,38	[24]
17	[1-8-NαC], [1-MetO]-CLG	CLH	Мсо-Лей-Мет-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1082,38	[23]
18	[1-8-NαC], [1,3-MetO]-CLG	CLG	Мсо-Лей-Мсо-Про-Фен-Фен-Три-Иле	1098,38	[23]
19	[1-9-NαC]-CLQ	[1-9-NαC]-CLQ	Мет-Лей-Лиз-Про-Фен-Фен-Фен-Три-Иле	1210,53	[15]
20	[1-9-NαC], [1-MetO]-CLQ	[1-9-NαC], [1-MetO]-CLQ	Мсо-Лей-Лиз-Про-Фен-Фен-Фен-Три-Иле	1226,52	[15]
21	[1-9-NαC]-CLR	[1-9-NαC]-CLS	Гли-Иле-Про-Про-Фен-Три-Лей-Тре-Лей	1025,24	[15]

Примечание: Мет — метионин, Лей — лейцин, Иле — Изолейцин, Фен — фенилаланин, Три — триптофан, Вал — Валин, Про — пролин, Гли — глицин, Тре — Треонин, Мсо — S-оксид метионина, Мсн — S-S-диоксид метионина.

могут значительно различаться. Это связано с возможным разрушением или окислением компонентов, например, метионина. В этой связи множество авторов стремилось не только экстрагировать как можно больше ЦП из льна и его компонентов (масла, семян, жмыха и т. д.), но и разделить их между собой. Существующие методы экстракции и разделения ЦП представлены в Таблице 2.

Рассматриваемые методы применяются в основном для дальнейшей идентификации ЦП в составе исследуемых образцов, а также для извлечения отдельных соединений и их использования в качестве стандартов. В большинстве случаев на первом этапе проводят экстракцию, однако в данных экстрактах могут содержаться триглицериды и другие компоненты, поэтому дополнительно проводят

хроматографическое разделение. Примечательно, что в качестве растворителей обычно используют непивевые элюенты, например, метанол и ацетонитрил.

В исследовании [24] проводили экстракцию из льняного семени с помощью ацетона. Льняное семя измельчали и экстрагировали в ацетоне (1:50). Экстракт выпаривали под вакуумом, полученное масло растворяли в метаноле, содержащем гидроксид натрия, и оставляли на 1 час для гидролиза большей части липидов. Метанольную смесь дважды экстрагировали гексаном и выпаривали под вакуумом. Остаток распределяли между водой и этилацетатом, слой органики смывали водой и выпаривали. Осадок использовали в дальнейших экспериментах.

Таблица 2. Методы экстракции и разделения ЦП
Table 2. Methods of extraction and separation of CLPs

Цель	Растворители и реактивы	Метод	Адсорбент	Источник
Экстракция	Гексан, этилацетат, этанол, метанол, гидрокарбонат натрия, дихлорметан	Твердофазная экстракция	Силикагель 60 (размер частиц 40–63 мкм)	[28]
	Ацетон, гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан	Твердофазная экстракция	Силикагель 60 (размер частиц 40–63 мкм, 230–400 меш)	[29]
	Гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан	Твердофазная экстракция	Силикагель (500 мг)	[30]
	Этилацетат	Твердофазная экстракция	Силикагель 60	[31]
	Ацетон, метанол, гексан, деионизованная вода, этилацетат, гидроксид натрия	Экстракция в системе твердое вещество — жидкость, жидкостная экстракция	—	[24]
	Метанол	Экстракция в системе твердое вещество — жидкость (с ультразвуком)	—	[32]
	Метанол, деионизованная вода	Экстракция в системе твердое вещество — жидкость	—	[15]
	Метанол, деионизованная вода	Экстракция в системе твердое вещество — жидкость	—	[33]
	Метанол, этанол, деионизованная вода	Жидкостная экстракция (с ультразвуком)	—	[9]
	Ацетон, петролейный эфир, этанол, метанол, гексан, деионизованная вода	Экстракция в системе твердое вещество — жидкость, жидкостная экстракция	—	[34]
	Этанол, деионизованная вода	Жидкостная экстракция	—	[31]
	Гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан	Препаративная флеш-хроматография	Силикагель (300–400 меш)	[35]
	Метанол, вода, хлороформ, ацетонитрил	Препаративная флеш-хроматография	Полимерный адсорбент (неполярный сополимер стирол-дивинил-бензольной адсорбирующей смолы, сферические частицы 0,5 мм)	[23]
Разделение	Этилацетат, гексан, метанол, дихлорметан, деионизованная вода, ацетонитрил	Препаративная флеш-хроматография	Силикагель (300–400 меш)	[36]
	Деионизованная вода, ацетонитрил	ВЭЖХ	Силикагель с привитыми C18 группами, размер частиц 5 мкм)	[37]
	Гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан, раствор бикарбоната натрия, соляной раствор	Препаративная флеш-хроматография	Силикагель 60 (размер частиц 40–63 мкм)	[12]
	Ацетонитрил, изопропанол, метанол, диизопропиловый эфир, гексан, ацетон	Твердофазная экстракция, Препаративная флеш-хроматография; ВЭЖХ	Силикагель 60 (70–230 меш); силикагель с привитыми C18 группами (размер частиц 4 и 1,9 мкм)	[32]
	Метанол, хлороформ, деионизированная вода, ацетонитрил	Препаративная флеш-хроматография; ВЭЖХ	Полимерный адсорбент (неполярный сополимер стирол-дивинил-бензольной адсорбирующей смолы, сферические частицы 0,5 мм); силикагель; силикагель с привитыми C18 группами (размер частиц 10 мкм)	[38]
	Метанол, деионизированная вода	ВЭЖХ	Силикагель с привитыми C18 группами (размер частиц 5 мкм, 300 Å; 3 мкм, 110 Å; 5 мкм, 100 Å; 2,6 мкм, 100 Å)	[9]
	Этиловый эфир уксусной кислоты, н-гептан, диэтиловый эфир, петролейный эфир, деионизированная вода, ацетонитрил	Твердофазная экстракция; ВЭЖХ	Силикагель, силикагель с привитыми C18 группами	[39]
	Гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан, деионизированная вода, ацетонитрил	Препаративная флеш-хроматография; ВЭЖХ	Силикагель 60 (200–400 меш); силикагель с привитыми фенилгексил группами (размер частиц 2,6 и 5 мкм)	[40]
	Гексан, этилацетат, метанол, дихлорметан, деионизированная вода, ацетонитрил	Твердофазная экстракция; ВЭЖХ	Силикагель; силикагель с привитыми C18 группами (размер частиц 5 мкм)	[30]

Автором Ванг [31] показана возможность экстракции ЦП масла, сорбированных на силикагеле, охлажденным этилацетатом. Для проведения экстракции свежееотжатое масло смешивали с силикагелем (25:1) и перемешивали. После отстаивания масло декантировали, а силикагель загружали в воронку Бюхнера и под вакуумом из полученной суспензии (силикагель: масло) удаляли остатки масла. Силикагель последовательно четыре раза промывали охлажденным этилацетатом (фракции 1–4) и дважды этанолом, для извлечения всех оставшихся ЦП (фракции 5 и 6). Все собранные фракции упаривали в вакууме. К маслосодержащим остаткам 1 и 2 фракций добавляли ме-

танол для извлечения ЦП. Полученные два образца затем выпаривали в вакууме и восстанавливали в метаноле. Остатки всех остальных четырех фракций растворяли в метаноле после удаления растворителя. Первые две фракции (смытые этилацетатом) содержали наибольшее количество слабо полярных пептидов. Чтобы до конца смыть сорбированные на силикагеле пептиды, использовали этанол как более полярный по сравнению с этилацетатом растворитель. Наибольший процент выхода ЦП выявлен для фракции 6 (первый смыв этанолом) и составляет 31%, далее идет фракция 1 (первый смыв этилацетатом), выход которой составил 23% от общего выхода ЦП на все 6 фракций.

Бернетт с соавторами [28] экстрагировали ЦП из льняного масла путем адсорбции масла на силикагеле с последующим элюированием полярными растворителями. В частности, льняное масло смешивали с силикагелем и после отстаивания декантировали. Взвесь остатка силикагеля, содержащего ЦП, смешивали с н-гексаном и переносили в воронку из спеченного стекла для удаления растворителя путем фильтрации. Извлеченный твердый остаток дополнительно экстрагировали н-гексаном, чтобы удалить как можно больше масла из силикагеля, содержащего ЦП. Безмасляный остаток последовательно экстрагировали 50% смесью (об./об.) этилацетата в н-гексане и этанолом. Аликвоту каждого фильтрата концентрировали в вакууме, ресуспендировали в метаноле и фильтровали для анализа на ВЭЖХ с диодно-матричным детектором. В том же направлении двигались и авторы работы [12], использовавшие силикагель с предварительно посаженными ЦП и экстракцию н-гексаном при перемешивании. Суспензию растворителя и силикагеля помещали в фильтрующую воронку и удаляли растворитель под вакуумом. Полученный твердый остаток дополнительно экстрагировали н-гексаном, чтобы удалить как можно больше масла из силикагеля, содержащего ЦП. Затем обезжиренный остаток последовательно экстрагировали 50% (об./об.) этилацетатом в н-гексане и 10% (об./об.) метанолом в дихлорметане. Полученный экстракт содержал 5 ЦП, растворитель удаляли выпариванием на роторном испарителе для получения сырого экстракта, который растворяли в этилацетате и последовательно экстрагировали насыщенным раствором бикарбоната натрия и соляным раствором. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, затем фильтровали и концентрировали для получения очищенного от растворителя экстракта ЦП.

В работе авторов [30] льняное семя измельчали и пропускали через сито. Молотые семена льна смешивали с н-гексаном, а затем перемешивали блендером. После экстракции смесь центрифугировали. Супернатант выпаривали при 40 °С с использованием роторного испарителя для получения образца масла. Остаток снова экстрагировали, как указано выше. До проведения анализа пробы хранили в герметичной стеклянной посуде при температуре минус 20 °С. Колонку для твердофазной экстракции с силикагелем использовали для выделения ЦП из экстрагированного гексаном масла. Колонку уравнивали гексаном, после чего навеску масла смешивали с гексаном и загружали. Колонку элюировали при обычном давлении по методу [29] с небольшой модификацией. Пять элюентов возрастающей полярности представляли собой 100% гексан, 20% этилацетата в гексане, 50% этилацетата в гексане, 100% этилацетата и 10% метанола в дихлорметане. Две обогащенные пептидами фракции (100% этилацетат и 10% метанол в дихлорметане) объединяли и удаляли растворитель на роторном испарителе при 40 °С. Остаток повторно растворяли в метаноле и фильтровали перед анализом.

В исследовании [40] получали «грубый» экстракт ЦП. Авторы смешивали масло с силикагелем (5:1) и наносили на стеклянную колонку, в которой в качестве сорбента использовали силикагель (100 см³). Фракция, не содержащая пептиды (в основном триакилглицерины), была элюирована под действием гравитационных сил. Далее применяли флэш-хроматографию, элюируя образец несколькими типами растворителей: 100% гексан, 20% этилацетата в гексане, 50% этилацетата в гексане, 100% этилацетат (фракция А) и 10% метанола в дихлорметане (фракция Б). Фракции А и Б, содержащие ЦП, объединяли и концентрировали на роторном испарителе при 40 °С. Полученную сухую смесь растворяли в метаноле и центрифугировали. Отбирали супернатант, концентрировали и хранили для дальнейшей хроматографической очистки. Установлено, что с помощью данного метода из 500 мл масла можно получить до 550 мг фракции, обогащенной ЦП. Согласно полученным данным, наиболее эффективным растворителем является метанол, увеличивший выход фракции ЦП с 10 до 90 мг/мл. Отмечается, что эффективным методом извлечения ЦП является поэтапный смыв сорбированных на силикагеле компонентов элюентами возрастающей полярности (до пяти стадий). Такой подход позволяет элюировать практически все ЦП, присутствующие в масле, однако может привести к снижению общего выхода конечного продукта.

В работе [36] ЦП экстрагировали из масла согласно следующей методике: навеску льняного масла помещали в пробирку и растворяли в гексане (1:10). Затем добавляли 70% смесь метанол/вода и перемешивали на вортке в течение 30 минут для экстракции пептидов. После экстракции смесь центрифугировали и отбирали супернатант. Затем повторяли экстракцию, собранные супернатанты объединяли, выпаривали, после чего растворяли в метаноле для последующего анализа.

Бернетт с соавторами [33] для выделения ЦП использовали следующую методику: семена взвешивали и измельчали, после чего выдерживали с метанолом и водой (70:30, об./об.) при соотношении семян к растворителю 1:10 (об./об.). После 2 часов термостатирования при 60 °С образец кратковременно встряхивали, а затем центрифугировали. Полученные супернатанты фильтровали перед анализом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором (HPLC DAD). Одновременно исследовали влияние степени измельчения и температуры на эффективность экстракции ЦП. Семена дегуммировали (удаляли нецеллюлозные ткани) в соотношении семя: вода 1:10 (мас./об.), часть семян измельчали, а вторую часть оставляли в неизменном виде. Измельченные и цельные семена экстрагировали, как указано выше, используя два условия экстракции: термостатирование в течение 2 часов, либо при температуре окружающей среды, либо при 60 °С, после чего экстракты обрабатывали и анализировали.

Известно об экстракции ЦП напрямую из льняного семени [15]. Семена замораживали с помощью жидкого азота и измельчали. Экстракцию ЦП из измельченных семян осуществляли 70% метанолом при 60 °С, после чего экстракт фильтровали и анализировали. В полученном экстракте было идентифицировано 19 ЦП.

Авторы работы [32] использовали ультразвук для экстракции ЦП из масла и шрота льна. Льняное масло или шрот взвешивали в пробирке, добавляли метанол (1:10) и перемешивали на вортке с последующей обработкой ультразвуком. Полученную смесь центрифугировали, отбирали супернатант и затем анализировали методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией (HPLC–MS). Метанольная экстракция с дополнительной обработкой смеси ультразвуком обеспечила выход ЦП на уровне более 90%. Авторы показали, что используемый метод не вызывал окисления ЦП. Установлено, что метод с применением ультразвука показал хорошую точность и воспроизводимость с извлечением от 90 до 102%.

В исследовании [9] ЦП выделяли из льняного масла с помощью жидкостной экстракции, либо за счет экстракции метанолом с ультразвуковой обработкой. Жидкостную экстракцию проводили путем смешивания льняного масла со смесью метанол/этанол + вода (1:1) с последующим перемешиванием на вортке и центрифугированием. Отбирали супернатант для дальнейшего анализа. Авторы также применяли экстракцию метанолом при обработке ультразвуком. Льняное масло добавляли к метанолу (1:1), перемешивали на вортке и обрабатывали ультразвуком. Полученную смесь центрифугировали, отбирали супернатант и анализировали. Согласно результатам исследования, наиболее эффективным способом экстракции была жидкостная экстракция смесью метанол-вода.

Кай с соавторами [34] предложили двухстадийный метод экстракции ЦП из жмыха льняного семени. В кожуре льняного семени содержится всего 18,8% от общего количества ЦП, содержащихся в семени. Это указывает на то, что большая часть ЦП концентрируется в семядоле. Измельченный и просеянный жмых экстрагировали 95% этанолом. Этанол удаляли вакуумной фильтрацией с использованием роторного испарителя. Далее смесь растворяли в н-гексане и водном растворе метанола (60%). Смесь перемешивали на вортке и центрифугировали. Затем нижний слой (метанольную фракцию) отбирали, к верхнему слою повторно добавляли водный раствор метанола и повторяли процедуру экстракции еще два раза. Отобранные метанольные фракции объединяли и концентрировали. Метанольный экстракт переносили в центрифужную емкость и добавляли дистиллированную воду в соотношении 5:1 (по весу). Смесь перемешивали на вортке и центрифугировали. Супернатант, который содержал в основном фосфолипиды, удаляли, полученный осадок считали очищенным экстрактом ЦП. Установлено, что при использовании 95% этанола для предварительной экстракции выход ЦП в конечном экстракте составлял более 70%.

В представленных исследованиях полученные экстракты, содержащие смесь циклических пептидов, либо высушивали для дальнейшего использования, либо проводили последующее разделение/очистку с помощью хроматографии.

Для разделения ЦП Матсумото с соавторами [23] наносили предварительно подготовленный метанольный экстракт на хроматографическую колонку Dianon HP-20 (полимерный адсорбент), используя градиентную систему вода-метанол (0:1–1:0). Фракцию, смывную метанолом, наносили на хроматографическую колонку с силикагелем в градиентной системе хлороформ-метанол (1:0–0:1). С применением ВЭЖХ с обращенной фазой (HPLC ODS) 15% метанольную фракцию смывали с колонки 40–60% ацетонитрилом и получали экстракты ЦП: CLF (0,0008%), CLG (0,0024%), CLH (0,0002%) и CLI (0,00007%). Для того чтобы выделить отдельный циклический пептид (CLF), аналитическим методом воспользовались авторы работы [38], в которой

метанольный экстракт был фракционирован с помощью колонки HP-20, содержащей полимерный адсорбент. Фракция, элюированная 100% метанолом, была в дальнейшем фракционирована на HPLC ODS с помощью колонки с силикагелем. Очистку ЦП (CLF) проводили путем рекристаллизации (степень чистоты более 97%).

В работе [12] экстракт, полученный по методике, описанной ранее, подвергали колоночной флеш-хроматографии и проводили последовательное элюирование системой растворителей: (а) 80% этилацетат в гексане; (б) 100% этилацетат; (в) 2,5% метанола в дихлорметане; (г) 5% метанола в дихлорметане; (д) 7,5% метанола в дихлорметане и (е) 10% метанола в дихлорметане. В результате разделения получали три основные фракции, содержащие ЦП. Масса конечной фракции колебалась от 2,40 г до 4,32 г.

Авторы [36] проводили разделение в препаративном жидкостном хроматографе низкого давления путем последовательного элюирования пятью растворителями с возрастающей полярностью. Используемые элюенты: 100% гексан (фракция А), 20% этилацетат в гексане (фракция В), 50% этилацетат в гексане (фракция С), 100% этилацетат (фракция D) и 10% метанол в дихлорметане (фракция Е). Фракции D и Е объединяли и удаляли растворитель с помощью роторного вакуумного испарителя с образованием светло-желтого порошка (1,20 г). Смесь ЦП далее разделяли с помощью препаративной жидкостной хроматографии высокого давления с использованием колонки C18. Подвижная фаза состояла из деионизированной воды и ацетонитрила. Фракции отбирали и концентрировали с удалением растворителя.

В исследовании [30] проведено разделение ЦП с помощью ВЭЖХ, оснащенной диодно-матричным детектором (HPLC-DAD) и колонкой C18. Подвижная фаза состояла из деионизированной воды и ацетонитрила. Проведенная количественная оценка наличия ЦП в 13 сортах льна показала 14 идентифицированных соединений, содержание которых варьируется между сортами в диапазоне 270–440 мкг/г масла.

Авторами [37] для разделения ЦП была использована HPLC-DAD и колонка C18. Подвижными фазами были деионизированная вода (А) и ацетонитрил (В). В результате разделения были получены 12 ЦП. Показано, что содержание ЦП в экстракте может достигать 631,41 мкг/г масла (при использовании горячего прессования).

В работе [35] описано разделение ЦП из масла льна с помощью препаративной жидкостной хроматографии низкого давления. Масло растворяли в смеси этилацетат/гексан (1/19) и наносили на стеклянную хроматографическую колонку с силикагелем. Разделение проводили посредством последовательного смыва пятью растворителями: 100% гексан, 20% раствор этилацетата в гексане, 50% раствор этилацетата в гексане, 100% этилацетат и 10% раствор метанола в дихлорметане. Отбирали фракции, получаемые последними двумя растворителями, затем растворители удаляли на роторном испарителе до получения сухого порошкообразного экстракта. Содержание ЦП в полученных экстрактах не указано.

После предварительно проведенной экстракции авторы [40] выполняли разделение. Разработан практический метод на основе препаративной ВЭЖХ для одновременного выделения 12 типов ЦП. Дополнительно проводили аналитическую ВЭЖХ с диодно-матричным детектором (HPLC-PDA) и обращенно-фазовой колонкой. Оптимальные условия: начальное соотношение ацетонитрила к воде 40%, конечное соотношение ацетонитрила 80%. Полученные 12 ЦП также состояли из некоторых окисленных промежуточных и восстановленных форм ЦП, которые обычно выходят с другими соединениями. Чистота ЦП составляла более 95%.

В исследовании [9] было проведено разделение полученной смеси ЦП с использованием ВЭЖХ и колонок Grace™ Vydac, Gemini™ C18 и Kinetex™ C18, различающихся размером частиц и порами. Полное разделение 12 ЦП было достигнуто быстрым и экономичным методом ВЭЖХ на колонке Kinetex™ C18 с использованием метанола/воды в качестве элюента. Лучшее разделение наблюдалось при применении колонок Gemini™ и Kinetex™.

Брюль с соавторами [39] провели хроматографическое разделение ЦП с использованием ВЭЖХ с колонкой RP-18e (силикагель с привитыми C18 группами). Элюирование начинали со смеси 60% воды и 40% ацетонитрила, которую заменяли на 35% воды и 65% ацетонитрила, затем на 25% воды и 75% ацетонитрила и далее до 100% ацетонитрила. Ввиду отсутствия эталонных стандартных веществ цель получения количественных результатов не ставилась.

В работе [32] после проведенной экстракции, описанной выше, было выполнено последующее разделение ЦП. Установлено, что наилучшее разделение ЦП льняного семени было достигнуто с использованием колонки Kinetex C18, что позволило разделить ЦП: CLA и CLJ, а также CLN и CLD. Всего удалось разделить 14 ЦП.

Несмотря на большое количество представленных методов, извлечение ЦП с применением растворителей, разрешенных для использования в пищевой промышленности, обнаружено только в диссертации Ванга [31]. Суть экстракции заключалась в следующем: на первом этапе льняное масло добавляли к 100% этанолу (1:1) в делительной воронке и встряхивали для смешивания двух фаз. Собирали верхний слой раствора в воронке (этанольный экстракт). Аналогично масло экстрагировали 50, 60, 70, 80 и 90% водным раствором этанола. Определено, что использование 70 и 80% водного раствора этанола с объемным соотношением растворителя к маслу 0,25:1 приводило к наиболее высокому выходу ЦП из масла. Оптимальным было принято использование 70% раствора этанола. Примечательно, что авторам удалось успешно масштабировать данную методику от 160 мл до 4200 литров масла. Степень извлечения ЦП составляла 61,2–92,0% в зависимости от используемых объемов масла.

Согласно представленным результатам, для извлечения ЦП из льняного семени и продуктов его переработки обычно используют экстракцию в системе «твердое вещество — жидкость» или «жидкость — жидкость» (измельченное льняное семя или масло и органический растворитель) и «твердофазную» экстракцию (льняное масло и силикагель). В большинстве случаев в качестве растворителей используют метанол, гексан, этилацетат, дихлорметан, ацетонитрил и деионизированную воду. Такой подход позволяет с высокими выходами извлечь ЦП из исходного сырья, однако не лишен недостатков. Основным недостатком является отсутствие селективности при извлечении для ЦП — одновременно в раствор/на силикагель переходят близкие по химическим свойствам матричные компоненты. Для решения этой проблемы применяя дополнительные стадии очистки и концентрирования ЦП — препаративную флеш-хроматографию на силикагеле или полимерных адсорбентах. Так, например, в случае силикагеля, за счет постадийного увеличения полярности в системе растворителей гексан-этилацетат удается практически полностью избавиться от полярных примесей. Финальной стадией очистки смеси ЦП или получения индивидуальных стандартов является высокоэффективная жидкостная хроматография. Здесь в качестве неподвижной фазы наиболее часто используют неполярные модифицированные сорбенты-октадецильные (C18) и фенилгексилные функциональные группы. Последние, в свою очередь, позволяют добиться высочайшей степени разделения и проводить качественные и количественные измерения ЦП в семени льна.

3.2. Методы идентификации циклических пептидов

Для получения ЦП из семян льна или продуктов его переработки существует необходимость поиска методов идентификации исследуемых компонентов. Нами было обнаружено множество различных подходов, позволяющих идентифицировать ЦП в составе льна. Так, в исследовании Матсумото [23] для идентификации ЦП использовали ИК- и УФ- спектроскопию, ^1H и ^{13}C ЯМР, масс-спектрометрию (FAB-MS), тонкослойную (TLC) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), что позволило обнаружить 4 ЦП (CLF-CLJ). В исследовании [40] чистоту выделенных фракций определяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором HPLC-PDA (длина волны 214 нм) и гибридного масс-спектрометра высокого разрешения (ESI-Q-TOF-MS/MS), что позволило успешно идентифицировать до 12 типов ЦП. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором HPLC-DAD (длина волны 214 нм) использовали в исследовании [34]. Авторам удалось идентифицировать 12 различных ЦП, общая концентрация которых варьировалась от 385,63 до 1268,88 мг/кг в зависимости от анализируемого сорта семян. В работе [29] авторы использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с диодно-матричным детектором HPLC-DAD (длины волн 214, 244 и 280 нм), что позволило количественно измерить с использованием внутреннего стандарта в диапазоне 5–500 мкг/мл 6 различных циклических пептидов. Подобную методику использовали авторы [38] для идентификации циклического пептида F (CLF). В исследовании Окиньо-Овити [15] определение ЦП осуществляли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодным матричным детектором (HPLC-DAD) и гибридного масс-спектрометра высокого разрешения (ESI-Qq-TOF-MS) в tandemном режиме (ESI-Qq-TOF-MS/MS). В результате авторами были обнаружены три ЦП. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором HPLC-PDA (длина волны 210 нм) и масс-спектрометра высокого разрешения (ESI-Q-Orbitrap-MS) в tandemном режиме (ESI-Q-Orbitrap-MS/MS), позволило авторам [32] идентифицировать и количественно определить в диапазоне 1,5–1000 мкг/мл 14 различных ЦП (CLA, CLB, CLC, CLD, CLE,

CLF, CLG, CLH, CLI, CLJ, CLK, CLL, CLM, CLN). Аналогичная методика применялась авторами [9], благодаря чему было идентифицировано в общей сложности 15 ЦП (CLA-CLG, CLI, CLK-CLP, CLT). Стефанович [24] идентифицировал ЦП с использованием гибридного масс-спектрометра (ESI-QqQ-MS) в tandemном режиме (ESI-QqQ-MS/MS), что позволило успешно обнаружить наличие 14 ЦП. В работе [28] авторами для обнаружения ЦП использовались ^1H ЯМР, высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором HPLC-DAD (диапазон длин волн 190–300 нм) и масс-спектрометрии высокого разрешения в tandemном режиме (ESI-Q-TOF-MS/MS). Подобный подход позволил подтвердить пять ЦП. В работе [41] обнаружили один циклический пептид (CLE) с помощью ИК-спектроскопии, ^1H и ^{13}C ЯМР, высокоэффективной жидкостной хроматографии HPLC-DAD (длина волны 210 нм) и масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-Q-TOF-MS). Согласно утверждению авторов, идентифицированный циклический пептид (CLE) является ключевым горьким соединением, содержащимся в хранящемся льняном масле. Зенг с соавторами [37] применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию HPLC-DAD (длина волны 214 нм) и масс-спектрометрию высокого разрешения (ESI-Q-TOF-MS). Среди идентифицированных ЦП в основном были представлены пептиды, содержащие метионин, такие как CLB, CLA, CLP и CLO, имеющие более низкую полярность, чем другие ЦП. Остальные ЦП содержали S-S-диоксид метионина. В исследовании [30] авторы использовали круговой дихроизм, ИК-спектроскопию, ЯМР, высокоэффективную жидкостную хроматографию HPLC-DAD (длина волны 214 нм) и tandemную масс-спектрометрию высокого разрешения (ESI-Q-TOF-MS/MS) для идентификации и количественного определения ЦП в 13 образцах льняного масла. Всего идентифицировано и количественно определено 14 различных ЦП, концентрации которых варьировались от 273 ± 3 до 434 ± 7 мкг/г масла. В работе [16] авторами был проведен анализ на-

личия ЦП с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа, снабженного УФ-ВИД детектором HPLC-VWD (длина волны 214 нм), и при помощи гибридных масс-спектрометров высокого разрешения (MALDI-Q-TOF-MS и ESI-QqQ-TOF-MS).

Таким образом, для идентификации ЦП льна в основном используют следующие инструментальные методы анализа: ИК-спектроскопию, ЯМР, высокоэффективную жидкостную хроматографию с детектором типа диодная матрица (HPLC-PDA/DAD), tandemную масс-спектрометрию высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ESI-HRMS/MS). Причем стоит отметить, что для качественного и количественного определения ЦП достаточным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектором типа диодная матрица на длине волны 214 нм. В свою очередь, масс-спектральные методы, в том числе tandemная масс-спектрометрия, позволяют подтвердить качественный состав и установить аминокислотную последовательность ЦП. Авторами [6] отмечено, что tandemная масс-спектрометрия высокого разрешения с источником ионизации, таким как электроспрей (ESI), предпочтительна для качественного анализа ЦП из-за простоты подготовки проб, высокой чувствительности и широкого динамического диапазона.

4. Выводы

В результате проведенного обзора показаны существующие принципы идентификации циклических пептидов, методы их экстракции и разделения. Учитывая, что в большинстве имеющихся методов использованы токсичные растворители, применение выделенных ЦП возможно только в непищевых целях. В связи с этим существует необходимость разработки методов экстракции и разделения этих биологически активных веществ растворителями, разрешенными для применения в пищевой промышленности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2022). FAO-STAT. Crops and livestock products. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Accessed August 30, 2024.
- Shim, Youn Young, Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., Reaney, M. J. T. (2014). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 38(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.011>
- Bekhit, A. E.-D. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch, J., Teh, S., Mohamed Ahmed, I. A. et al. (2018). Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 129–152. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.017>
- Dzuvor, C. K. O., Taylor, J. T., Acquah, C., Pan, S., Agyei, D. (2018). Bioprocessing of functional ingredients from flaxseed. *Molecules*, 23(10), Article 2444. <https://doi.org/10.3390/molecules23102444>
- Yang, J., Wen, C., Duan, Y., Deng, Q., Peng, D., Zhang, H. et al. (2021). The composition, extraction, analysis, bioactivities, bioavailability and applications in food system of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 118(Part A), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.025>
- Shim, Y. Y., Song, Z., Jadhav, P. D., Reaney, M. J. T. (2019). Orbitides from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.007>
- Saharan, R., Kumar, S., Khokra, S. L., Singh, S., Tiwari, A., Tiwari, V. et al. (2022). A comprehensive review on therapeutic potentials of natural cyclic peptides. *Current Nutrition and Food Science*, 18(5), 441–449. <https://doi.org/10.2174/1573401518666220114153509>
- Xiong, Q., Lee, Y.-Y., Li, K.-Y., Li, W.-Z., Du, Y., Liu, X. et al. (2022). Status of linusorbs in cold-pressed flaxseed oil during oxidation and their response toward antioxidants. *Food Research International*, 161, Article 111861. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111861>
- Fojnica, A., Leis, H.-J., Murkovic, M. (2022). Identification and characterization of the stability of hydrophobic cyclolinopeptides from flaxseed oil. *Frontiers in Nutrition*, 9, Article 903611. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.903611>
- Mueed, A., Madjirebaye, P., Shibli, S., Deng, Z. (2022). Flaxseed peptides and cyclolinopeptides: A critical review on proteomic approaches, biological activity, and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(46), 14600–14612. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06769>
- Fojnica, A., Gromilic, Z., Vranic, S., Murkovic, M. (2023). Anticancer potential of the cyclolinopeptides. *Cancers*, 15(15), Article 3874. <https://doi.org/10.3390/cancers15153874>
- Okinyo-Owiti, D. P., Burnett, P.-G. G., Reaney, M. J. T. (2014). Simulated moving bed purification of flaxseed oil orbitides: Unprecedented separation of cyclolinopeptides C and E. *Journal of Chromatography B*, 965, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.037>
- Gui, B., Shim, Y. Y., Reaney, M. J. T. (2012). Distribution of cyclolinopeptides in flaxseed fractions and products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8580–8589. <https://doi.org/10.1021/jf3023832>
- Lang, T., Frank, O., Lang, R., Hofmann, T., Behrens, M. (2022). Activation spectra of human bitter taste receptors stimulated with cyclolinopeptides correspond-
- ing to fresh and aged linseed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(14), 4382–4390. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00976>
- Okinyo-Owiti, D. P., Young, L., Burnett, P.-G. G., Reaney, M. J. T. (2014). New flaxseed orbitides: Detection, sequencing, and ^{15}N incorporation. *Biopolymers*, 102(2), 168–175. <https://doi.org/10.1002/bip.22459>
- Lao, Y. W., Mackenzie, K., Vincent, W., Krokkin, O. V. (2014). Characterization and complete separation of major cyclolinopeptides in flaxseed oil by reversed-phase chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(14), 1788–1796. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400193>
- Tan, N.-H., Zhou, J. (2006). Plant cyclopeptides. *Chemical Reviews*, 106(3), 840–895. <https://doi.org/10.1021/cr040699h>
- Kaufmann, H. P., Tobschirbel, A. (1959). About an oligopeptide from flax seeds. *Chemische Berichte*, 92(11), 2805–2809. <https://doi.org/10.1002/cber.19590921122> (In German)
- Deng, S., Li, J., Luo, T., Deng, Z. (2022). Flaxseed cyclic peptide [1–9-NaC]-linusorb B3 (CLA) improves oxidative stability of flaxseed oil by chelating metal ions and intermediate oxidative products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(50), 15776–15786. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06102>
- Morita, H., Shishido, A., Matsumoto, T., Takeya, K., Itokawa, H., Hirano, T. et al. (1997). A new immunosuppressive cyclic nonapeptide, cyclolinopeptide B from *Linum usitatissimum*. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 7(10), 1269–1272. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00206-0)
- Morita, H., Shishido, A., Matsumoto, T., Itokawa, H., Takeya, K. (1999). Cyclolinopeptides B–E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron*, 55(4), 967–976. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)01086-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)01086-2)
- Olivia C. (2013) High Throughput Screening of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Cyclolinopeptides. Thesis Degree of Master of Science University of Saskatchewan, Saskatoon. Retrieved from <https://harvest.usask.ca/items/25362000-bf73-443d-80c4-22af6b940f57> Accessed August 21, 2024.
- Matsumoto, T., Shishido, A., Morita, H., Itokawa, H., Takeya, K. (2001). Cyclolinopeptides F–I, cyclic peptides from linseed. *Phytochemistry*, 57(2), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00442-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00442-8)
- Stefanowicz, P. (2004). Electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of the natural mixture of cyclic peptides from linseed. *European Journal of Mass Spectrometry*, 10(5), 665–671. <https://doi.org/10.1021/ejms.657>
- Stefanowicz, P. (2001). Detection and sequencing of new cyclic peptides from linseed by electrospray ionization mass spectrometry. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 1125–1129. <https://doi.org/10.18388/abp.2001.3877>
- Dahiya, R., Dahiya, S., Shrivastava, J., Fuloria, N. K., Gautam, H., Mourya, R. et al. (2021). Natural cyclic polypeptides as vital phytochemical constituents from seeds of selected medicinal plants. *Archiv Der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences*, 354(4), Article 2000446. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000446>
- Reaney, M. J., Jia, Y., Shen, J., Schock, C., Tyler, N., Elder, J. et al. (2008). Recovery of hydrophobic peptides from oils. Patent US No. 8383172.
- Burnett, P.-G. G., Jadhav, P. D., Okinyo-Owiti, D. P., Poth, A. G., Reaney, M. J. T. (2015). Glycine-containing flaxseed orbitides. *Journal of Natural Products*, 78(4), 681–688. <https://doi.org/10.1021/np5008558>
- Gui, B., Shim, Y. Y., Datla, R. S., Covello, P. S., Stone, S. L., Reaney, M. J. T. (2012). Identification and quantification of cyclolinopeptides in five flax-

- seed cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8571–8579. <https://doi.org/10.1021/jf301847u>
30. Zou, X.-G., Chen, X.-L., Hu, J.-N., Wang, Y.-F., Gong, D.-M., Zhu, X.-M. et al. (2017). Comparisons of proximate compositions, fatty acids profile and micronutrients between fiber and oil flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.001>
31. Wang, D. (2014). Extraction of Orbitides from Flaxseed. Thesis Degree of Master of Science University of Saskatchewan, Saskatoon. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10388/ETD-2014-02-1435> Accessed August 30, 2024.
32. Aladedunye, F., Sosinska, E., Przybylski, R. (2013). Flaxseed cyclolinopeptides: Analysis and storage stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(3), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2173-0>
33. Burnett, P.-G. G., Olivia, C. M., Okinyo-Owiti, D. P., Reaney, M. J. T. (2016). Orbitide composition of the flax core collection (FCC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(25), 5197–5206. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02035>
34. Cai, Z.-Z., Xu, C.-X., Song, Z.-L., Li, J.-L., Zhang, N., Zhao, J.-H. et al. (2024). A two-step method of cyclolinopeptide (linusorb) preparation from flaxseed cake via dry-screening. *Food Chemistry*, 449, Article 139243. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139243>
35. Zou, X.-G., Li, J., Sun, P.-L., Fan, Y.-W., Yang, J.-Y., Deng, Z.-Y. (2020). Orbitides isolated from flaxseed induce apoptosis against SGC-7901 adenocarcinoma cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 71(8), 929–939. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1750573>
36. Zou, X.-G., Hu, J.-N., Zhu, X.-M., Wang, Y.-F., Deng, Z.-Y. (2018). Methionine sulfone-containing orbitides, good indicators to evaluate oxidation process of flaxseed oil. *Food Chemistry*, 250, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.030>
37. Zeng, J., Xiao, T., Ni, X., Wei, T., Liu, X., Deng, Z.-Y. et al. (2022). The comparative analysis of different oil extraction methods based on the quality of flaxseed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, Article 104373. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104373>
38. Kaneda, T., Nakajima, Y., Koshikawa, S., Nugroho, A. E., Morita, H. (2019). Cyclolinopeptide F, a cyclic peptide from flaxseed inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis via downregulation of RANK expression. *Journal of Natural Medicines*, 73(3), 504–512. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01292-w>
39. Brühl, L., Bonte, A., N'Diaye, K., Matthäus, B. (2022). Oxidation of cyclo-lino peptides in linseed oils during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 124(12), Article 2200137. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202200137>
40. Liu, X., Cai, Z.-Z., Lee, W. J., Lu, X.-X., Reaney, M. J. T., Zhang, J.-P. et al. (2021). A practical and fast isolation of 12 cyclolinopeptides (linusorbs) from flaxseed oil via preparative HPLC with phenyl-hexyl column. *Food Chemistry*, 351, Article 129318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129318>
41. Brühl, L., Matthäus, B., Fehling, E., Wiege, B., Lehmann, B., Luftmann, H. et al. (2007). Identification of bitter off-taste compounds in the stored cold pressed linseed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7864–7868. <https://doi.org/10.1021/jf071136k>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Соболев Роман Владимирович — кандидат технических наук, инженер-исследователь, лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: sobolevrv@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2166-006X * автор для контактов	Roman V. Sobolev , Candidate of Technical Sciences, Research Engineer, Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustinsky proyezd, 109240, Moscow, Russia Tel: +7-495-698-53-89 E-mail: sobolevrv@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2166-006X * corresponding author
Соколов Илья Евгеньевич — научный сотрудник, лаборатория пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: sokolov.iliya1993@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2819-6001	Ilya E. Sokolov , Researcher, Laboratory of Food Toxicology and Safety Assessment of Nanotechnology, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustinsky proyezd, 109240, Moscow, Russia Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: sokolov.iliya1993@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2819-6001
Петров Никита Александрович — кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: petrov@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9755-6002	Nikita A. Petrov , Candidate of Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustinsky proyezd, 109240, Moscow, Russia Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: petrov@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9755-6002
Саркисян Варужан Амбарцумович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: sarkisyan@ion.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5911-610X	Varuzhan A. Sarkisyan , Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustinsky proyezd, 109240, Moscow, Russia Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: sarkisyan@ion.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5911-610X
Кочеткова Алла Алексеевна — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14 Тел.: +7-495-698-53-89 E-mail: kochetkova@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9821-192X	Alla A. Kochetkova , Doctor of Technical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Food Biotechnologies and Specialized Products, Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety 2/14, Ustinsky proyezd, 109240, Moscow, Russia Tel. +7-495-698-53-89 E-mail: kochetkova@ion.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9821-192X
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.