



УДК 615.322:543.544.5.068.7

КАРОТИНОИДЫ ЛЕПЕСТКОВ ЦВЕТКОВ КАЛЕНДУЛЫ

В.И. Дейнека
И.А. Гостищев
М.Ю. Третьяков
И.В. Индина

Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет
e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе исследован каротиноидный комплекс лепестков цветков *Calendula officinalis*, выращенных в Белгороде. В свежих лепестках цветков календулы методом обращено-фазовой ВЭЖХ с диодно-матричным детектором и ТСХ неомыленных ацетоновых экстрактов по удерживанию и по спектральным параметрам идентифицированы изомеры ликопина, γ -, α - и β -каротинов, неэтерифицированные флавоксантин, лютеин и рубиксантин, моноэфирные флавоксантина и лютеоксантина. Цветки желтой окраски отличаются от цветков оранжевой окраски главным образом меньшим вкладом изомеров ликопина, γ -каротина и рубиксантина. Обращено внимание на существующую в научной и, особенно, в рекламной информации путаницу между календулой и бархатцами.

Ключевые слова: *Calendula officinalis*, каротиноиды, ВЭЖХ, ТСХ, спектроскопия.

Введение

Календула, *Calendula*, – род растений, включающий от 10 до 20 видов [1] как однолетних, так и многолетних растений семейства сложноцветные, родина которых – от Макаронезии через Средиземноморье до Ирана. Календула лекарственная (*C. officinalis* L.) относится к числу хорошо известных во всем мире и в России [1, 2] лекарственных и повсеместно выращиваемых в декоративных целях растений. В настоящее время в современной рекламной и научной отечественной литературе возникло заблуждение связанное, по-видимому, с английским названием растения – pot marigold, поскольку имеются и другие созвучные названия: corn marigold (*Glebionis segetum*), desert marigold (*Baileya*), marsh marigold (*Caltha palustris*) и, особенно, French marigold (*Tagetes patula*) и African marigold (*Tagetes erecta*). При пренебрежении к научной точности переводов в многочисленных рекламных материалах календула заменила бархатцы, цветки которых и только которых являются уникальным источником лютеина [3].

Ботаническая путаница присутствует и в публикациях иностранных авторов (не говоря о ее полном засилии на английском же языке в рекламной информации). Так, в монографии, посвященной обзору использования ВЭЖХ в фитохимическом анализе [4] на стр. 672 в одном абзаце, посвященном обзору работ по определению каротиноидов *Calendula officinalis*, вначале обсуждается использование этого метода для разделения изомеров лютеина в омыленном экстракте «marigold», и диэфиров лютеина в исходном экстракте, причем в цитированных работах исследовались каротиноиды цветков бархатцев. А затем, в этом же абзаце, речь идет о каротиноидах действительно календулы.

Благодаря накоплению большого числа разнообразных классов биологически активных веществ [2, 5] календула во всем мире признана как лекарственное растение и включена в официальную фармакопею РФ [6], являясь источником получения ряда лекарственных препаратов:

- 1) Ноготков цветки (Flores *Calendula officinalis*) содержат флавоноиды, каротиноиды, сапонины, дубильные вещества и др. Применяют в виде настоя (10 г на 200 мл воды) в качестве антисептического и противовоспалительного средства при ангине и воспалительных заболеваниях полости рта для полосканий. Возможно и применение внутрь. Впрочем, в воду каротиноиды как липофильные соединения не будут переходить, т.е. роль каротиноидов в данном случае условна.



- 2) Настойка календулы (*Tinctura Calendulae*) – спиртовая (на 70%-ном спирте, 1:10) цветков и цветочных корзинок, которую применяют при порезах, гнойных ранах, для полоскания горла...
- 3) Мазь «Календула» (*Unguentum «Calendula»*) – эмульсия настойки календулы и вазелина; применяется наружно для смазывания порезов, ожогов и пр.

В аптеках можно приобрести также и «Масло ноготков» или календулы (*Oleum Calendulae*), которое получают настаиванием краевых цветков или целых цветочных корзинок календулы в растительном масле. Масло обладает антисептическим, бактерицидным, противовоспалительным, регенерирующим, ранозаживляющим, смягчительным и солнцезащитным действием.

И, хотя каротиноиды (как нерастворимые в воде и плохо растворимые в этаноле соединения) не обязательно являются основными действующими веществами всех препаратов на основе цветков календулы, их значимость в общем случае не вызывает сомнения и поэтому их определению посвящено несколько работ. В недавно изданной монографии [7] обобщены известные сведения о каротиноидах, накапливаемых в цветках этого растения. В итоге список видов каротиноидов оказывается более чем внушительным, включающим большой перечень веществ из обычных для сложноцветных растений схем биосинтеза (схема 1), – в их число входят различные углеводородные производные: β -каротин, γ -каротин, δ -каротин, ликопин, нейреспорин, фитоин, фитофлуин; ксантофиллы – рубиксантин, лютеин, зеаксантин, виолаксантин, флавохром, мутатохром, флавоксантин, хризантемаксантин. При этом известно, что существует взаимосвязь между компонентным составом каротиноидов и местом произрастания растения.

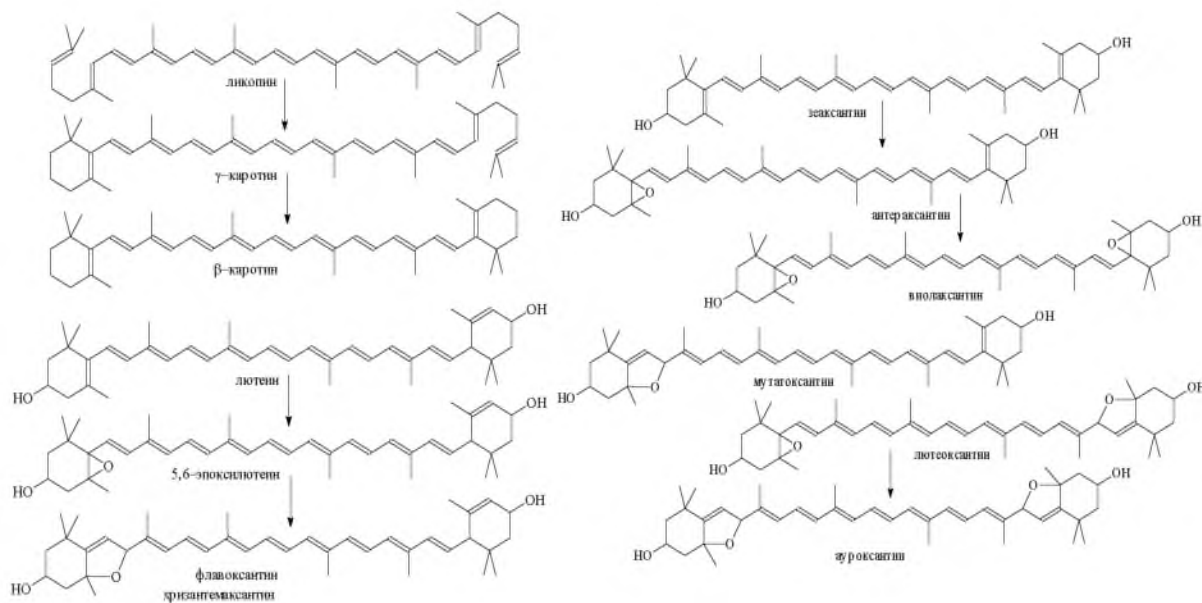


Схема 1. Некоторые каротиноиды – углеводороды

В Англии [8] в лепестках цветков календулы обнаружили среди углеводов: фитофлуин (0,4%), β - (13,8%), γ - (14,1%) и ζ - (7,8%) каротины и ликопин (59,1%), а среди ксантофиллов – 11 компонентов, основными из которых были – хризантемаксантин (26,3%), флавоксантин (24,5%), мутатохром (17,8%), соединения типа рубиксантина и аурохрома (по 7,4%). На лютеин приходилось лишь 5,2% от суммы ксантофиллов (доля которых составляла в свою очередь 54,7% от суммы всех каротиноидов), что является недостаточным для причисления этого растения к источникам лютеина. В работе венгерских ученых [9] основными компонентами каротиноидного комплекса цветков оказались флавоксантин и ауроксантин.



Впрочем, такой набор каротиноидов может быть с успехом использован для получения колорантов для пищевой промышленности [10] – для окраски коровьего масла или карамельных конфет.

В обстоятельном исследовании каротиноидного состава цветков календулы трех сортов оранжевой окраски и трех сортов желтой окраски [11] был использован метод ВЭЖХ с колонкой УМС Carotenoid (250×4,6 мм, 5мкм) в градиентном режиме 0/100, 12/100, 96/0 (мин/%А), где А: метанол – метил-*трет*-бутиловый эфир – вода (90:6:4 по объему), а Б: метанол – метил-*трет*-бутиловый эфир – вода (25:71:4 по объему), после омыления экстрагированных ацетоном каротиноидов, очищенных в двухфазной системе диэтиловый эфир – 10%-ный водный раствор NaCl.

В результате выполненного исследования авторы констатировали большое различие в каротиноидных комплексах лепестков цветков желтых и оранжевых окрасок. И если в составе ксантофиллов различия не обязательно большие – здесь во всех случаях основной компонент – флавоксантин (известен как пищевой колорант под номером Е161а) и немногим меньше доля (8'R)-лютеоксантина, то в лепестках желтой окраски отсутствуют изомеры рубиксантина, ликопина и других каротиноидов углеводородного состава.

В работе Pintea и сотр. [79] в лепестках цветков календулы оранжевой окраски сорта «Double Estrel Orange», содержащих 0,276 мг/г свежих лепестков, основными каротиноидами оказались β-каротин (16,7%), рубиксантин (14,4%), флавоксантин (14,1%), ликопин (14,0%), γ-каротин (12,2%), лютеин (9,2%), лютеоксантин (8,9%), лактукаксантин (4,5%) и другие минорные компоненты. При переходе к желто-оранжевым цветкам сорта «Bonbon Abricot» при общем снижении накопления каротиноидов до 0,048 мг/г основным каротиноидом оказывается флавоксантин (42,1%); несколько меньше лютеоксантина (19,0%), лютеина (12,3%) и лактукаксантина (11,3%) и др. Отметим, что в работе использовали традиционную C18-фазу – Nucleosil ODS, 5 мкм (250×4,6 мм) в градиентном режиме из двух базовых растворов А (ацетонитрил – вода 9:1 с добавкой 0,25% триэтиламина) и Б (этилацетат с добавкой 0,25% триэтиламина).

Таким образом, по литературным данным каротиноидный комплекс календулы довольно сложен; лютеин в нем присутствует, но не является основным компонентом, поэтому следует различать каротиноиды, экстрагированные из лепестков календулы и бархатцев как принципиально различные по составу.

Поскольку хорошо известно, что накопление любых биологически активных веществ может зависеть от условий произрастания, то целью настоящей работы было исследование каротиноидного комплекса лепестков цветков календулы, выращенной в условиях Белгорода с использованием ВЭЖХ с диодно-матричным детектором, позволяющим записывать спектры веществ непосредственно в ячейке детектора, причем была поставлена задача – исследование неомыленного экстракта.

Материалы и методы исследования

Для получения экстрактов использовали растения с желтой и оранжевой окраской цветков выращиваемые в течение ряда лет на базе филиала Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) Белгородский район. Каротиноиды экстрагировали из свежих лепестков ацетоном при растирании в фарфоровой ступке под слоем растворителя, который добавляли в ступку небольшими порциями (по 3 ÷ 5 мл). Экстракты отбирали одноразовым шприцем в мерную колбу. Число последовательных экстрактов определялось по отсутствию окраски новой порции экстракта. Сумму экстрактов доводили до метки ацетоном и записывали спектры после фильтрования через фильтрующую насадку с диаметром пор 0,4 мкм. Для ВЭЖХ ацетоновые экстракты упаривали на вакуумном ротационном испарителе, а для ТСХ переводили реэкстракцией в *n*-гексан с добавлением 10%-ного водного раствора хлорида натрия.



ТСХ осуществляли на отечественных пластинах Сорбфил (Краснодар, РФ). Для ВЭЖХ использовали комплект оборудования фирмы Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Колонка: 250×4 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм.

Результаты исследования и их обсуждение

Спектры ацетоновых экстрактов, представленные на рис.1, свидетельствуют о том, что, как и утверждалось в научной литературе, основной компонент в обоих случаях имеет второй максимум при 422 нм, что соответствует флавоксантину. Каротиноидный комплекс цветков оранжевой окраски отличается наложением на такой спектр явно длинноволновых максимумов, скорее всего от ликопина, хотя точно вычислить положение λ_{\max} нового компонента при этом практически невозможно. Поэтому важнейшим методом анализа компонентного состава может быть ВЭЖХ.

Методом ТСХ было установлено, что в образцах имеются каротиноиды углеводородного типа, ксантофиллы и моноэфиры ксантофиллов, содержание диэфиров ксантофиллов оказалось незначительным, рис. 2. Каротиноиды углеводородного типа наиболее слабо удерживаются в условиях нормально-фазовой хроматографии. Но отличить их от также слабоудерживаемых диэфиров ксантофиллов (как и моноэфиров моногидрокси-производных) можно при небольших добавках (около 0,1:10) ацетона к *n*-гексану, рис. 2а, поскольку они заметно медленнее перемещаются по слою сорбента в подвижных фазах со слабой элюирующей силой. В подвижных фазах, содержащих умеренные добавки ацетона (около 2:10) к *n*-гексану, можно установить присутствие или отсутствие моноэфиров ксантофиллов диольного типа, рис. 2б.

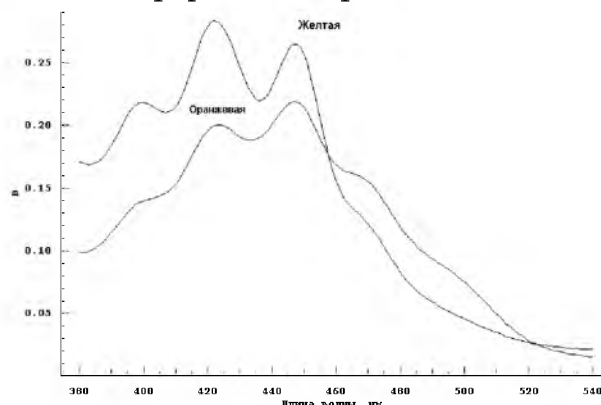


Рис. 1. Спектры ацетонового экстракта лепестков цветков календулы двух цветов

Хроматограммы неомыленных экстрактов цветков обоих цветов оказались сложными – видны несколько основных соединений и множество минорных компонентов. По сопоставлению с хроматограммой смеси ликопина и β -каротина легко можно определить время удерживания этих компонентов, рис. 3.

Поскольку компонентный состав обоих образцов в качественном отношении был одинаков, то более подробно в дальнейшем исследовали каротиноидный состав экстракта цветков календулы оранжевой окраски в более медленных элюентах (50 об.% ацетонитрила в ацетоне) рис. 4 и (60 об.% ацетонитрила в ацетоне) рис. 5. Однако и в этих элюентах были проблемы с разделением компонентов экстракта, причем уменьшение элюирующей силы не приводило к улучшению разделения – во втором элюенте хуже разделяются средние группы пиков.

Первые три компонента, являющиеся наименее липофильными, лучше разделены во втором элюенте. Спектры этих соединений весьма характеристичны: первое из них, рис.5, имеет λ_{\max} 399, 422 и 448 нм, что соответствует лютеоксантину, флавоксантину или их смеси, поскольку их спектральные параметры очень близки по литературным данным [11] (они имеют одинаковую хромофорную цепочку двойных связей).

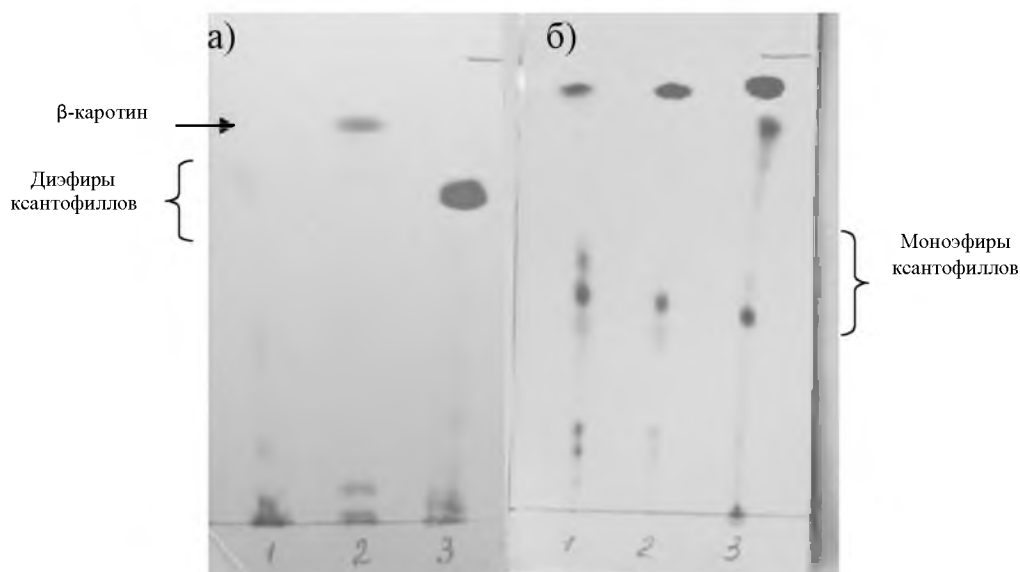


Рис. 2. Разделение каротиноидов в условиях ТСХ на пластинах Сорбфил (SiO_2) Экстракт лепестков цветков календулы 1 – желтого и 2 – оранжевого цветов; 3 – лепестков цветков бархатцев. Подвижные фазы: ацетон/*n*-гексан - а) 0,2:10; б) 2:8.

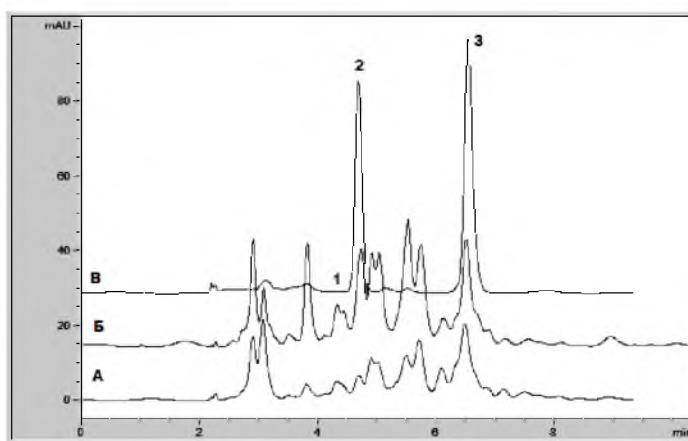


Рис. 3. Разделение каротиноидов цветков календулы желтой (А) и оранжевой (Б) окраски на фоне смеси ликопина и β -каротина 1 – β -криптоксантин, 2 – ликопин, 3 – β -каротин; 250×4 мм Reprosil-Pur 5C18-AQ, 33 об.% ацетонитрила в ацетоне; 1 мл/мин.

Пик №2 имеет спектр, идентичный спектру лютеина в данном растворителе (446 и 474 нм). Максимумы абсорбции пика №3 смещены батохромно на 16 ÷ 17 нм, что указывает на наличие хромофора с одним нециклическим концевым фрагментом – как у γ -каротина, но низкая хроматографическая подвижность указывает на наличие гидроксильной группы. Следовательно, пик №3 (рис. 5) принадлежит рубиксантину, схема 2, причем очевидно присутствие в нем нескольких *цис,транс*-изомеров – и по уширению пика и по наличию *цис*-пика в спектре.

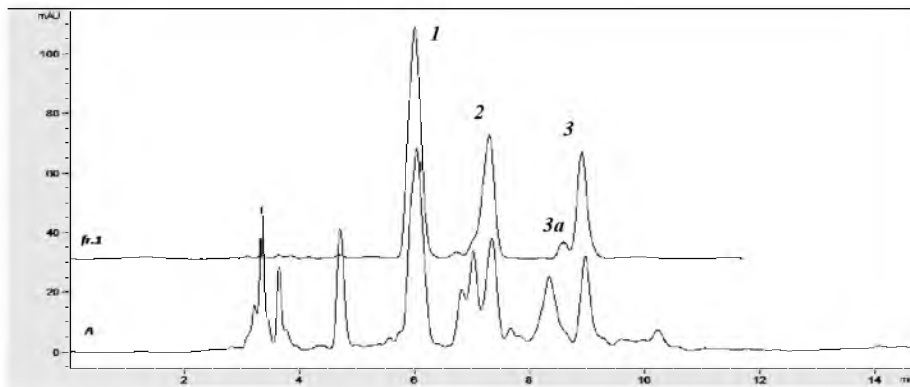


Рис. 4. Разделение каротиноидов цветков календулы оранжевой 250×4 мм Reprosil-Pur 5C18-AQ, 50 об.% ацетонитрила в ацетоне; 1 мл/мин.

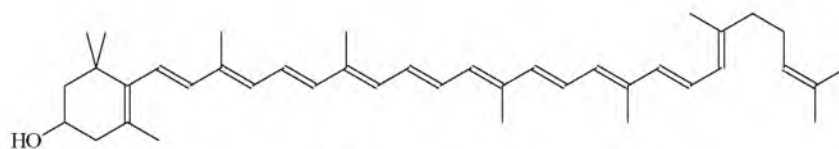


Схема 2. Строение рубиксантина

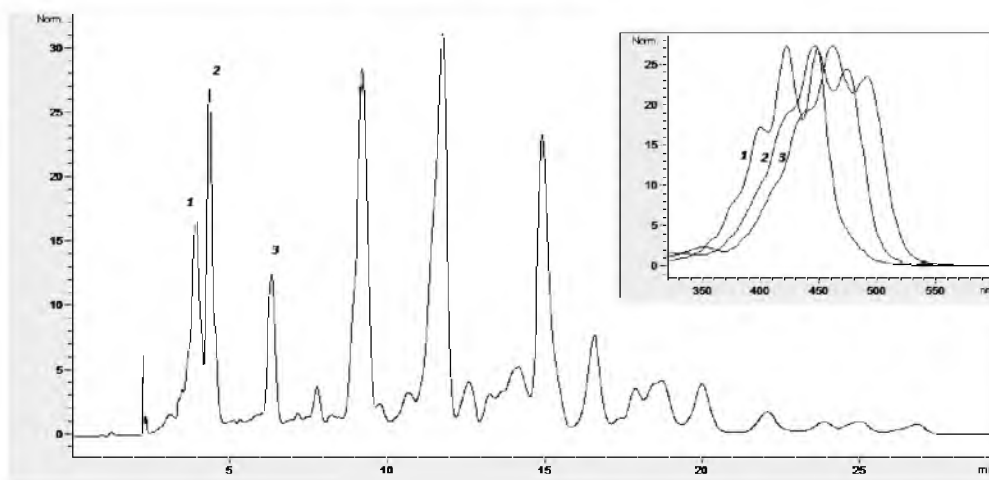


Рис. 5. Разделение каротиноидов цветков календулы оранжевой 250×4 мм Reprosil-Pur 5C18-AQ, 60 об.% ацетонитрила в ацетоне; 1 мл/мин.

На рис.4, кроме хроматограммы всего экстракта, приведена хроматограмма смеси углеводородных компонентов. Углеводородные компоненты отделили от остальных каротиноидов пропусканием гексанового раствора через концентрирующий патрон ДИАПАК, заполненный силикагелем. Элюат с несорбировавшимися компонентами упарили и растворили в подвижной фазе перед хроматографированием.

При этом получили три основных пика. Уширенный и по спектральным данным неомогенный пик №1 (рис. 4) имел максимумы второй полосы от 463 до 472 нм, что может свидетельствовать о наличии нескольких изомеров ликопина. Пик №2 (рис. 4) был также неомогенным с максимумами поглощения второй полосы от 458 до 462 нм и идентифицирован как сумма изомеров γ -каротина, поскольку этот максимум находится в центре интервала длин волн между λ_{max} второй полосы ликопина и λ_{max} второй же полосы β -каротина – 453,5 нм (пик. №3 на рис. 4), рис. 6. На

этом же рисунке приведен спектр и α -каротина (пик №3а, рис. 4), присутствующего в небольших количествах.

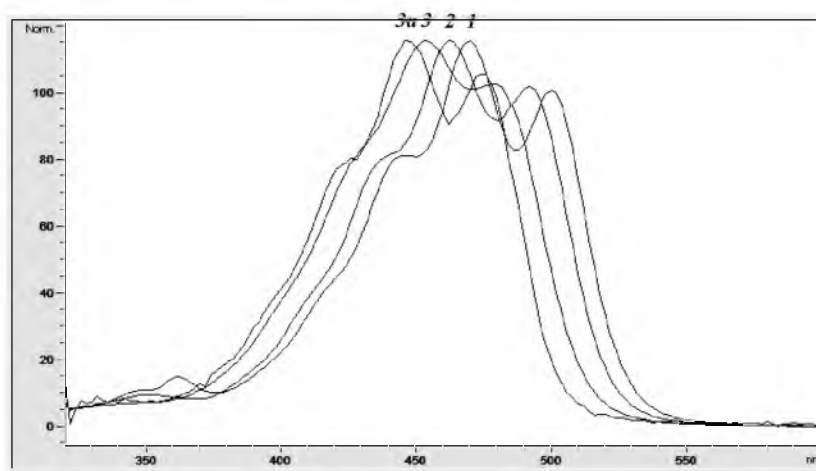


Рис. 6. Спектры пиков на рис. 4

Отнесение пиков к γ -каротину и к рубиксантину, выполненное выше, подтверждается не только спектральными параметрами, но и хроматографическими инкрементными соотношениями: в одном из элюентов разность между логарифмами удерживания рубиксантина и β -криптоксантина (определен по сопоставлению с удерживанием гидролизата экстракта плодов физалиса) составила:

$$\Delta(\gamma \rightarrow \beta) = \lg k(\beta\text{-cryptoxanthin}) - \lg k(\text{rubixanthin}) = 0,271 - 0,153 = 0,118.$$

При переходе от ликопина к β -каротину происходит две такие замены:

$$2 \Delta(\gamma \rightarrow \beta) = \lg k(\beta\text{-carotene}) - \lg k(\text{lycopene}) = 0,575 - 0,340 = 0,235,$$

поэтому совпадение инкрементов оказалось более чем удовлетворительное – $0,235/2 = 0,1175$.

Тогда для γ -каротина:

$$\lg k(\gamma\text{-carotene}) = \lg k(\text{lycopene}) + (\lg k(\beta\text{-carotene}) - \lg k(\text{lycopene}))/2 = 0,458,$$

что практически идеально совпало с экспериментальным параметром.

Два пика с удерживанием в диапазоне $6,75 \div 7,25$ мин имеют характеристические спектры, рис.7: максимумы поглощения первого из них совпадают с ранее рассмотренным спектром пика №1 на рис.5, а у второго пика заметен гипсохромный сдвиг на 3 нм, поэтому это вероятно, – моноэфир лютеоксантина [12]. На ТСХ-пластинах ниже желтого пятна (предположительно) моноэфира флавоксантина располагается пятно немногим более полярного соединения, постепенно приобретающее зеленоватую окраску. Такой эффект характерен для превращения 5,6-эпоксидов в кислой атмосфере – лютеоксантин содержит две эпокси-группировки, одна из которых – требуемого типа. Отметим, что уширенный пик с удерживанием $8,0 \div 8,5$ мин неоднороден и состоит из веществ аналогичных типов спектров. Поскольку и для флавоксантина, и для лютеоксантина возможно существование по два неэквивалентных моноэфира, то понятно, что это – смесь гомологов – моноэфиров флавоксантина и лютеоксантина, причем инкрементная разность между этими группами пиков аналогична разности для серии эфиров β -криптоксантина (0,111). Тем более, что за β -каротином обнаруживается группа минорных пиков, которые по удерживанию также удовлетворяют требованию к гомологам этих соединений.

Количественные параметры комплекса трудно оценить надежно по причине присутствия большого числа компонентов с различными спектральными параметрами. Но в сумме в лепестках цветков различной окраски обнаруживается довольно высокое и близкое содержание каротиноидов: 0,911 мг/г для желтых и 1,015 мг/г для оранжевых цветков (в пересчете на лютеин), в то время как в случае бархатцев пере-



ход от желтой окраски к оранжевой сопровождается несколько кратным увеличением накопления каротиноидов. По площадям пиков на хроматограмме, записанной при 450 нм, каротиноидный комплекс лепестков цветков календулы содержит флавоксантина – 9,4%, лютеина – 4,5%, рубиксантина – 8,7%, изомеров ликопина – 21,2%, моноэфиров лютеоксантина и флавоксантина – 25,2%, γ -каротина 13,6%, α -каротина – 1,6% и β -каротина – 9,2%. В цветках желтой окраски доля β -каротина несколько возросла (до 17,3%), но резко снизилось содержание ликопина и рубиксантина (до 4,4 и 3,5%, соответственно).

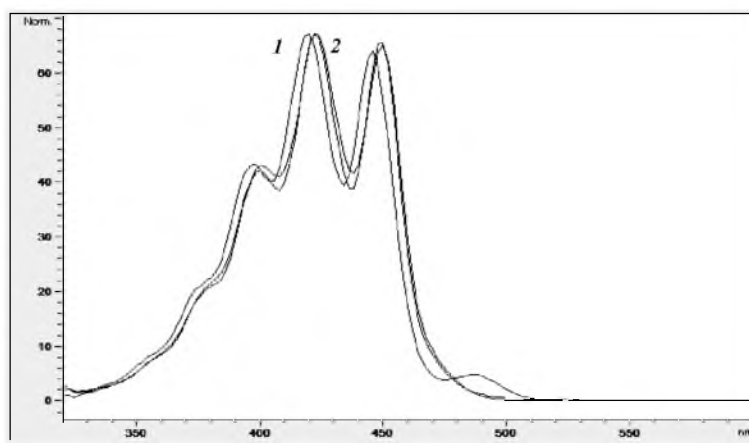


Рис. 7. Спектры моноэфиров лютеоксантина(1) и моноэфиров и неэтерифицированного флавоксантина (2)

Выводы

Таким образом, цветки календулы могут считаться хорошим источником каротиноидов как антиоксидантов, но не являются растительным материалом для получения лютеина.

Работа была выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы, ГК П-174.

Список литературы

1. Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65-68.
2. Б. М. Зузук, Р. В. Куцик, С. М. Калугина, Я. С. Гудивок, Л. М. Куровець Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) Аналитический обзор // Провизор. – 2001. – Вып.5. – http://www.provisor.com.ua/archive/2001/N5/art_29.php
3. Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Третьяков М.Ю. Исследование цветков *Tagetes* sp. как источника лютеина // Хим.-фарм. ж. – 2007. – Т.41, №10. – С. 30-32.
4. High-Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Chromatographic science series. V.102. Ed. M. Waksmundzka, J. Sherma. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2011. – 995 p.
5. Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review // Tropical J. Pharm. Res. – 2009. – V.8. – P. 455-465.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.:ООО «Издательство Новая Волна», 2005. – 1200 с.
7. Исмагилов Р.Р., Костылев Д.А. Календула. Уфа: БГАУ, 2000. – 102 с.
8. Goodwin T.W. Studies in carotenogenesis. 13. The carotenoids of the flower petals of *Calendula officinalis* // Biochem. J. – 1954. – V.58. – P. 90-94.
9. Bako E., Deli J., Toth G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – V.53. – P. 241-250.



10. Орлин Н.А. Пищевые красители из лепестков календулы // Успехи современного естествознания. - 2010. - № 6. - С. 93-93.
11. Pintea A., Bele C., Andrei S., Socaciu C. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers // Acta Biol. Szegediensis. – 2003. – V.47. – P. 37-40.
12. Pilar Cano M., Begona de Ancos Carotenoid and carotenoid ester composition in mango fruit as influenced by processing method / J. Agric. Food Chem. – 1994. – V.72. – P.2737-2742.

CAROTENOIDS OF CALENDULA FLOWERS PETALS

V.I. Deineka
I.A. Gostyshchev
M.Yu. Ttet'jakov
I.V. Indina

*Belgorod National Research
University*

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

The paper is devoted to the investigation of *Calendula officinalis* flower petals carotenoids harvested in Belgorod. By means of RP HPLC with diode-array detector and TLC of unsaponified acetone extracts by retention parameters as well as spectral analysis the main components were identified as lycopene isomers, isomers of γ -, α - and β -carotene, unesterified flavoxanthin, lutein rubixanthin, monoesters of flavoxanthin and luteoxanthin. The difference of the complexes of yellow and orange colours has been found to be mainly due to the lower fraction of lycopene, γ -carotene and rubixanthin in the former case. The attention has been paid to the problem of «*Tagetes* – *Calendula*» confusion in commercial and scientific information.

Key words: *Calendula officinalis*, carotenoids, HPLC, TLC, spectrophotometry.