

КАРОТИНОИДЫ ЛЕПЕСТКОВ ЦВЕТКОВ *CHELIDONIUM MAJUS* L.

**В.И. ДЕЙНЕКА,
М.Ю. ТРЕТЬЯКОВ,
Н.А. ШАРКУНОВА,
А.В. ТУРТЫГИН,
В.Н. СОРОКОПУДОВ**

Белгородский государственный
университет

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе методом ортогональной хроматографии и УФ - спектроскопии определен состав диэфиров ксантофиллов лепестков цветков *Chelidonium majus* L. Диэфиры ксантофиллов представлены производными лютеина и двух изомеров лютеоксантина. Объект отличается тем, что диэфиры образованы не только насыщенными высшими жирными кислотами (от лауриновой до стеариновой), но и олеиновой кислотой.

Ключевые слова: Ортогональное разделение, ТСХ, ОФ ВЭЖХ, *Chelidonium majus* L., диэфиры ксантофиллов, лютеин, лютеоксантин.

Чистотел (*Chelidonium majus* L.) широко распространен в европейской части России, произрастает на сорных местах, свалках, пустырях, в огородах, садах, по выгонам, на осыпях, каменистых склонах, берегах рек и ручьев, в зарослях кустарников, разреженных лесах и парках. Чистотел входит в число традиционных лекарственных растений народной и официальной медицины [1, 2]. Особое внимание уделяется исследованию алкалоидов чистотела в связи с их антиканцерогенным действием [3]. А в последнее время интенсивно исследуется новое полусинтетическое средство лечения рака, основанное на химически модифицированных алкалоидах чистотела, известное под названием "Ukrain"[4]. Чистотел цветет желтыми цветками, окраска которых, по всей вероятности, обусловлена накоплением каротиноидов. Целый ряд каротиноидов привлекают внимание благодаря высокой биологической активности, опубликовано множество работ по поиску природных источников этих соединений, но работ по определению каротиноидов в цветках чистотела нами в научной литературе не обнаружено.

Настоящая работа посвящена исследованию каротиноидов цветков чистотела; она выполнена в рамках исследования источников каротиноидов в Белгородской флоре.

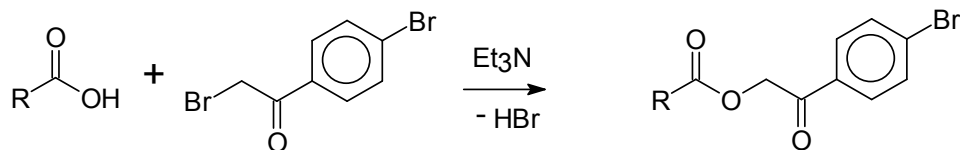
Экспериментальная часть

Для исследования каротиноидов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Altex 110A, крана дозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, детектора LC/9563 Nicolet, длина волны детектирования 445 нм. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографическая колонка 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижные фазы готовили смешиванием ацетонитрила и ацетона в нужном соотношении, расход элюента: 1 мл/мин. Для тонкослойной хроматографии использовали пластины Сорбфил в подвижных фазах состава 20 мл гексана + 0,5 ÷ 1,0 мл ацетона. Пятна ксантофиллов счищали с пластины и ксантофиллы реэкстрагировали ацетоном. Экстракт отделяли от силикагеля центрифугированием 10 мин. 5000 об./мин. Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах с использованием спектрофотометра КФК-3-01.

Свежие или сушеные лепестки цветков растирали с очищенным кварцевым песком и ксантофиллы экстрагировали ацетоном небольшими последовательными порциями до практически полного обесцвечивания последующего экстракта. Затем все фракции объединяли; для последующего разделения методом ТСХ ксантофиллы реэкстрагировали в *n*-гексан.

Для омыления эфиров ксантофиллы экстрагировали диэтиловым спиртом, смешивали 1:1 со спиртовым раствором щелочи (40% KOH), нагревали на водяной бане до кипения. После подкисления раствора серной кислотой до кислой реакции продукты

омыления экстрагировали *n*-гексаном; удаляли растворитель, добавляли триэтиламин, ацетонитрил и ацилирующий реагент для получения феноцильных производных:



Факторы удерживания сорбатов рассчитывали по найденному по удерживанию рядов гомологов (диэфиров лютеина из цветков бархатцев) «мертвому времени» - 1.90 мин.

Результаты и обсуждение

В работе исследовались цветки растений, выращенных в различных частях Белгорода, Шебекино и Строителя. При этом хроматограммы полученных из них экстрактов мало отличались от представленной на рис.1.

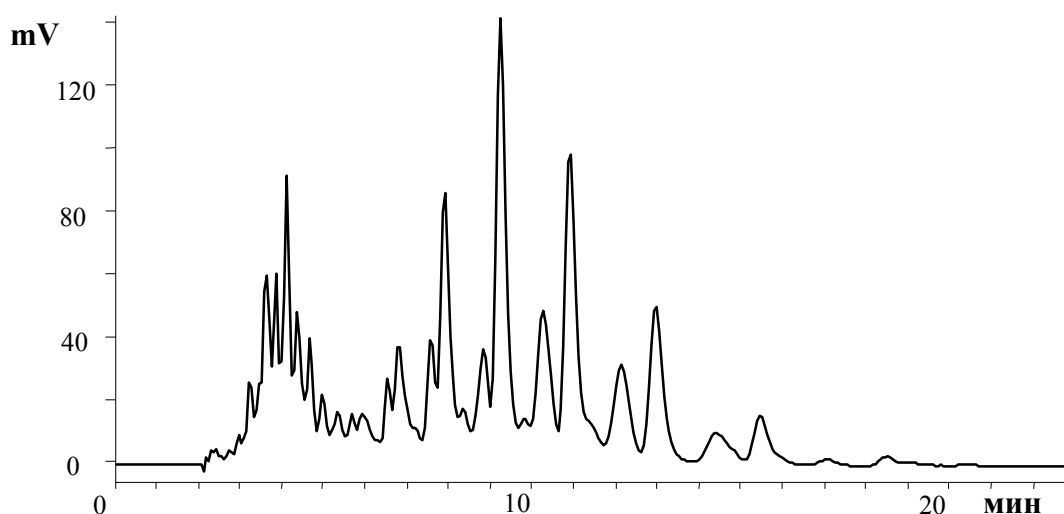


Рис.1. Хроматограмма экстракта лепестков цветков *Chelidonium majus* L.

Колонка: 250·4 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм. Подвижная фаза 15 % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор: 470 нм.

Как правило, площадь пиков в области удерживания неэтерифицированных ксантофиллов (2 ÷ 3 мин) была незначительной, а на долю моноэфиров (время удерживания 3 ÷ 6 мин) приходилось порядка 30 % от суммарной площади пиков. Таким образом, диэфиры ксантофиллов были основными компонентами каротиноидного комплекса.

Разделение пиков на рис.1 на группы гомологов можно провести по методу, изложенному в работе [5]. Но существенно более информативным является результат двухмерного ортогонального разделения, суть которого состоит в двух последовательных разделениях, основанных на различных свойствах сорбатов. Нормально-фазовая тонкослойная хроматография (на пластинах Сорбфил) позволяет разделить вещества сложной смеси по числу и доступности полярных функциональных групп, - длина гидрофобного радикала мало сказывается на удерживании сорбатов. Т.е., в этом случае удастся разделить смесь на группы гомологов. Действительно, в подвижной фазе, содержащей в 10 мл *n*-гексана 1 мл ацетона, удастся выделить три фракции диэфиров: (I – $R_f = 0.77$; II - $R_f = 0.54$ и III - $R_f = 0.42$). Эти фракции легко идентифицируются по спектральным параметрам, рис.2.

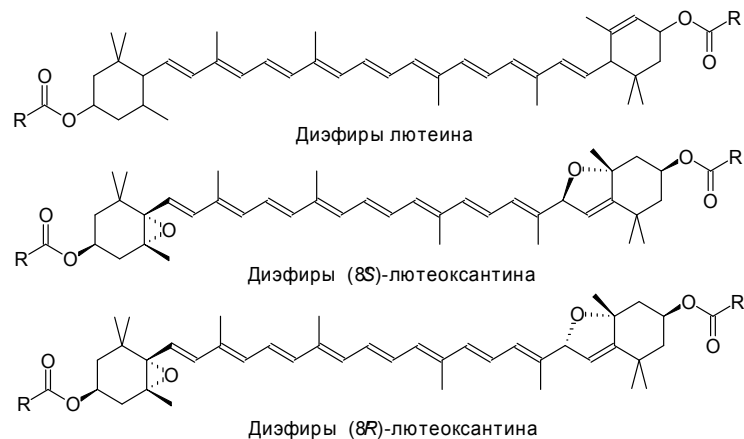


Рис.2. Спектры трех фракций экстрактов лепестков цветков чистотела

Спектр фракции **I** (417, 437 и 469 нм) совпадает со спектром диэфиров лютеина. Хроматограмма этой фракции, записанная в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ, содержит пики, совпадающие по удерживанию с пиками диэфиров лютеина (из цветков бархатцев), но при этом детектируются и другие компоненты, также принадлежащие к некоторому гомологическому ряду. Кроме того, имеется еще один пик, не принадлежащий этим двум рядам, рис.3.

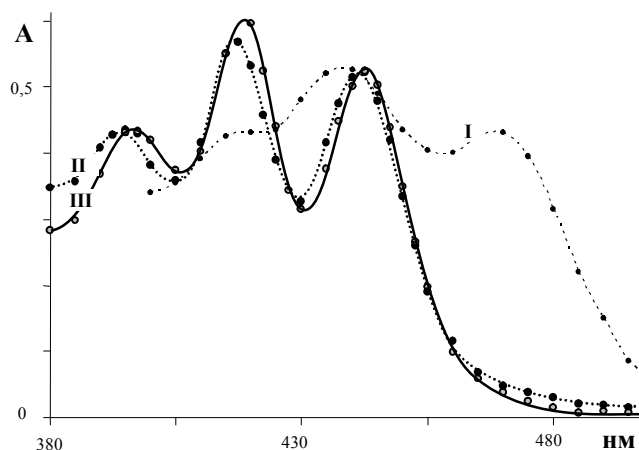


Рис.3. Хроматограммы трех фракций экстрактов лепестков цветков чистотела

Условия см. рис.1.

Фракции **II** и **III** (395 и 396, 417 и 418, 441 и 441 нм, соответственно) имели близкие спектры с максимумами поглощения, соответствующими изомерам лютеоксантина [6, 7]. То, что эти две группы веществ являются изомерами, подтверждается совпадением времен удерживания соответствующих компонент в условиях обращено-фазовой (ОФ) хроматографии. ОФ ВЭЖХ менее чувствительна к геометрии молекул по сравнению с нормально-фазовой хроматографией, при которой доступность полярных групп может иметь определяющее значение при сорбции на силанольных группах силикагеля. Существенно также и то, что хроматографический профиль всех трех фракций аналогичен: во всех случаях имеются две группы гомологов и дополнительно еще одно вещество вне этих групп.

Найденную особенность состава диэфирных фракций можно объяснить следующим образом. Во-первых, часть пиков диэфиров лютеина легко идентифицируется по сравнению с пиками диэфиров лютеина из цветков бархатцев [8], рис.4, таблица. Во-

вторых, пики разделяются на два гомологических ряда с одинаковой гомологической разностью:

$$\Delta(CH_2 - CH_2) = 0.102 \pm 0.001.$$

Т.е. основная группа гомологов – эфиры, образованные только насыщенными жирными кислотами - от дилаурата (12+12) до пальмитата-стеарата (16+18). Отсутствующий в списке дистеарат лютеина трудно детектировать по причинам малой концентрации и естественного размывания пика с большим временем удерживания.

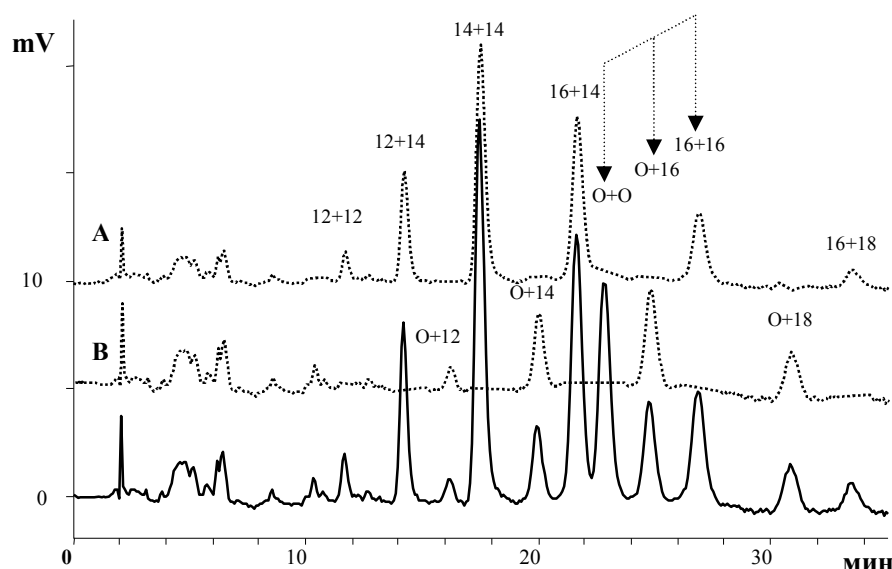


Рис.4. Отнесение пиков фракции I

Условия см. рис.1. Обозначение пиков см таблицу.

Отнесение пиков диэфиров лютеина

№	Состав	t_R , мин	lgk	Ряды гомологов				Псевдо-гомологи		Сим-вол
				1-й		2-й				
				Δ_1		Δ_1		Δ_2		
1	дилаурат	11.62	0.709	*						12+12
2	лаурат-миристант	14.16	0.810	*	0.101					12+14
3	лаурат-олеат	16.16	0.875			**				12+O
4	димиристант	17.44	0.913	*	0.103					14+14
5	миристант-олеат	19.95	0.978			**	0.102			14+O
6	миристант-пальмитат	21.60	1.016	*	0.103					14+16
7	диолеат	22.82	1.042					***		O+O
8	олеат-пальмитат	24.74	1.080			**	0.102	***	0.038	O+16
9	дипальмитат	26.87	1.119	*	0.103			***	0.039	16+16
10	олеат-стеарат	30.79	1.182			**	0.102			O+18
11	пальмитат-стеарат	33.38	1.219	*	0.101					16+18

* и ** - группы гомологов; *** - «псевдогомологи».

Если предположить, что в экстракте лепестков чистотела существуют ксантофиллы, этерифицированные непредельной кислотой (одной), то происхождение второго ряда гомологов получает логичное объяснение. Это диэфиры, в которых изменяется только одна из кислот – насыщенная при одном неизменном радикале от ненасыщенной кислоты. Очевидно, что число гомологов в этом ряду должно быть меньше предыдущего – только четыре (по четырем насыщенным жирным кислотам –

лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой), что подтверждается экспериментально, рис.4.

Более того, должен быть еще один компонент, содержащий две эти ненасыщенные кислоты, что также соответствует экспериментальным данным.

Наконец, судя по изменению удерживания соответствующих компонент можно предположить, что искомой ненасыщенной кислотой может (и должна) быть олеиновая кислота. Тогда три диэфира – дипальмитат, олеат-пальмитат и диолеат составляют тройку «псевдогомологов», для которой должна сохраняться (и в действительности сохраняется) инкрементная разность:

$$\Delta(O \rightarrow 16) = 0.039 \pm 0.001 .$$

Для подтверждения указанных предположений было проведено омыление этанольного экстракта ксантофиллов, и полученные при этом жирные кислоты были переведены в фенацильные производные (для повышения чувствительности определения жирных кислот). На рис.5 представлены хроматограммы полученной при этом смеси относительно образца сравнения, полученного омылением оливкового масла (источника олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот); к этому гидролизату добавили лауриновую и миристиновую кислоты и затем получили сумму фенацильных производных.

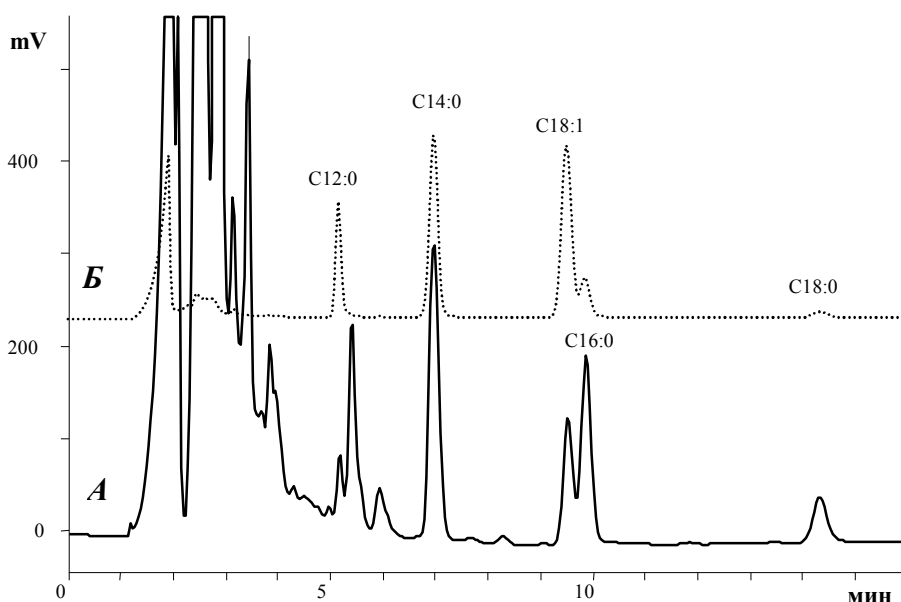


Рис.5. Разделение фенацильных производных жирных кислот

А – гидролизат экстракта *Chelidonium majus* L., Б – гидролизат оливкового масла с добавками лауриновой и миристиновой кислот. Колонка 250·4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижная фаза: 10 об.% изопропанола в ацетонитриле, 1 мл/мин. Детектор: 254 нм.

Такой подход однозначно свидетельствует о присутствии радикалов олеиновой кислоты в эфирных фракциях ксантофиллов чистотела.

Выводы

В работе для определения каротиноидного состава применена группа методов, включающая ортогональное разделение, спектрофотометрические исследования и хроматографический анализ продуктов омыления.

Метод нормально фазовой хроматографии позволил выделить три фракции диэфиров ксантофиллов: диэфиры лютеина и две группы диэфиров изомерных лютеоксантинов, которые были идентифицированы по спектрам в видимой части электромагнитного спектра.

Метод обращено-фазовой ВЭЖХ позволил внутри каждой группы выделить по две группы гомологов и одно вещество вне этих групп. Предложен метод определения состава диэфирных фракций, подтвержденный исследованием продуктов омыления. Так было подтверждено, что диэфиры образованы не только высшими предельными

жирными кислотами (лауриновой, миристиновой, пальмитиновой и стеариновой), но и ненасыщенной – олеиновой кислотой.

Список литературы

1. Журба О.В., Дмитриев М.Я. Лекарственные, ядовитые и вредные растения. – М.: КолосС, 2005. – 512 с.
2. Ерофеева Л.Н., Бубенчикова В.Н., Баркалая Е.В. Биологически активные вещества чистотела большого и их фармакологические свойства // Фармация. – 1997. – Т.46. №6. – С. 39–41.
3. Шалимов С.А., Гриневич Ю.А., Мартыненко С.В., Храновская Н.Н. Противоопухолевое и иммуномодулирующее действие препарата на основе тиофосфорных производных алкалоидов чистотела большого // Экспериментальная онкология. - 2001. - Т.23. - С.282 – 286.
4. Susak Y.M., Zemskov V.S., Yaremchuk O.Y. Comparison of chemotherapy and x-ray therapy with Ukrain monotherapy for colorectal cancer. // Drugs Exp. Clin. Res. – 1996. – V.22. – P.115-22.
5. Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Инкрементный подход в анализе каротиноидов методом ОФ ВЭЖХ. Разделение диэфиров ксантофиллов. // Сорбц. и хроматограф. процессы. – 2006. - Т.6. №3. – С. 366-375.
6. Kull D., Pfander H. Isolation and identification of carotenoids from the petals of rape (Brassica napus) // J. Agric. Food Chem. – 1995. – V.43. – P.2854-2857.
7. Dugo P., Herrero M., Guiffrida D., Kumm T., Dugo G., Mondello L. Application of comprehensive two-dimensional liquid chromatography to elucidate the native carotenoid composition in red orange essential oil // J. Agric. Food Chem. – 2008. – V.56. – P.3478-3485.
8. 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.

CAROTENOIDS OF *CHELIDONIUM MAJUS* L. FLOWERS PETALS

**V.I. Deineka,
M.Yu. Treťakov,
N.A. Sharkunova,
A.V. Turtyguin,
V.N. Sorokopudov**

Belgorod State University

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

*Carotenoid complex of *Chelidonium majus* L. flowers petals has been determined by means of orthogonal chromatography and UV-Vis – spectroscopy. The xanthophylls diesters were separated into three groups: that of lutein and two luteoxanthin isomers. Esters of xanthophylls were built by radicals of saturated fatty acids (lauric, myristic, palmitic and stearic), oleic acid being another uncommon source of the radicals.*

*Key words: Orthogonal separation, TLC, RP HPLC, *Chelidonium majus* L., xanthophyll diesters, lutein, luteoxanthin, fatty acids.*
