



УДК 543.544:543.645.9

ОЦЕНКА ВЫСУШЕННЫХ ЦВЕТКОВ БАРХАТЦЕВ В КАЧЕСТВЕ ДОСТУПНОГО ИСТОЧНИКА ДИЗФИРОВ ЛЮТЕИНА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КСАНТОФИЛЛОВ

И.А. Гостищев
М.Ю. Третьяков
И.П. Анисимович
Л.А. Дейнека
В.И. Дейнека

Белгородский
государственный
университет

Россия, 308015 г. Белгород,
ул. Победы, 85

E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе с использованием спектрофотометрического метода и ВЭЖХ показано, что лепестки цветков бархатцев оранжевой окраски содержат дизфиры лютеина, образованные в основном миристиновой и пальмитиновой и, в меньшем количестве, стеариновой и пальмитиновой кислотами. При этом качественный состав дизфиров мало изменяется при смене вида бархатцев – среди *Tagetes patula*, *T. erecta* и *T. tenuifolia*, сорта и условий выращивания. Кроме того, установлено, что сушка и последующее хранение, по крайней мере, в легко реализуемых условиях не приводят ни к количественному, ни к качественному изменению каротиноидного комплекса вследствие особенности упаковки этих соединений в высушенном материале. По указанным причинам высушенные лепестки бархатцев могут быть использованы вместо труднодоступных синтетических стандартных веществ при исследовании природных каротиноидных комплексов.

Ключевые слова: ОФ ВЭЖХ, спектрофотометрия, дизфиры лютеина, *Tagetes patula*, *T. erecta*, *T. tenuifolia*.

Введение

Одна из работ известного специалиста по аналитической химии каротиноидов D.V. Rodriguez-Amaya [1] посвящена обсуждению возможных ошибок при количественном и качественном определении каротиноидов в растительных материалах. Среди целого ряда проблем отмечается, что при использовании стандартных веществ, кроме недоступности некоторых из них, следует учитывать и нестабильность каротиноидов даже при хранении при низких температурах в среде азота. Проблема усложняется в нашем регионе, поскольку в настоящее время от заказа и оплаты до получения заказанных реактивов требуется, по крайней мере, несколько месяцев. Поэтому сохранность реактивов имеет первостепенное значение.

В работе [2] было показано, что плоды черной смородины благодаря доступности и постоянному качественному и достаточно постоянному количественному составу по антоцианам могут быть использованы в качестве дешевого и доступного источника стандартов – смеси 3-рутинозидов и 3-глюкозидов цианидина и дельфинидина для качественной идентификации антоцианов хроматографическим методом. И хотя каротиноиды для использования в качестве стандартных веществ или свидетелей, как правило, выделяют из растительных материалов, в соответствующих публикациях обычно ограничиваются технологией выделения веществ из исходного материала, свойствам которого не уделяется должного внимания.

Лютеин и зеаксантин (и/или эфиры этих ксантофиллов) представляют в настоящее время особый интерес благодаря установлению их необходимости для предотвращения возрастной макулярной дегенерации [3]. По этой причине поиск источников этих ксантофиллов в растительных материалах представляет важную не только в научном плане задачу. Наиболее эффективным методом исследования каротиноидных комплексов различных объектов растительного происхождения является высокоэффективная жидкостная хроматография в обращенно-фазовом варианте. Однако хроматографические методы являются методами, требующими использования стандартных веществ (для построения градуировочных зависимостей при количественном анализе) или «свидетелей» – при идентификации компонентов смесей. Критерий подлинности в данном случае – совпадение времен удерживания исследуемого компонента и стандартного образца – не является, строго говоря, абсолютным. В случае



каротиноидов проблема неоднозначности решения обратной задачи хроматографии (идентификации вещества по времени удерживания) решается анализом спектров, которые являются характеристическими для групп каротиноидов с одинаковыми хромофорами.

Данная работа является одной из серии работ по исследованию возможности использования растительных материалов как доступных источников биологически активных веществ, которые могут быть использованы как стандарты или свидетели при анализе сложных смесей.

Экспериментальная часть

Для обращено-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему, составленную из насоса *Altex 110A*, крана дозатора *Rheodyne 7100* с петлей объемом 20 мкл, детекторов LC/9563 Nicolet и R410. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (AmperSand Ltd. 2005). Хроматографические условия: колонка 250×4.6 мм Kromasil-100 5С18 с предколонкой 10×4.6 мм Kromasil-100 5С18; подвижные фазы системы «ацетонитрил – ацетон», скорость подачи элюента 1 мл/мин. Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах с использованием спектрофотометра КФК-3-01.

Ксантофиллы экстрагировали из измельченных с кварцевым песком лепестков ацетоном (тремя последовательными порциями) до обесцвечивания исходного материала.

Результаты и обсуждение

Существует множество растений, накопление некоторых соединений в которых зависит от вида, сорта и от условий выращивания и степени созревания, что делает такие растения непригодными для поставленной в работе цели. Однако, как следует из нашего пятилетнего опыта работы, в течение которой были исследованы более сотни бархатцев трех видов – *Tagetes erecta*, *T. patula* и *T. tenuifolia*, выращенных в различных районах Белгородской области и в различных погодных условиях, было установлено, что накопление ксантофиллов в цветках довольно однородно, если использовать цветки сортов не желтой или лимонно-желтой, а оранжевой окраски. В слабо окрашенных цветках существенно меньше степень этерификации ксантофиллов (и, соответственно, меньше суммарный уровень накопления ксантофиллов), т.к. велика доля неэтерифицированного лютеина и моноэфиров. В цветках оранжевой окраски содержатся в основном диэфиры лютеина, что подтверждается сопоставлением спектра экстрактов (рис. 1), с литературными данными [4].

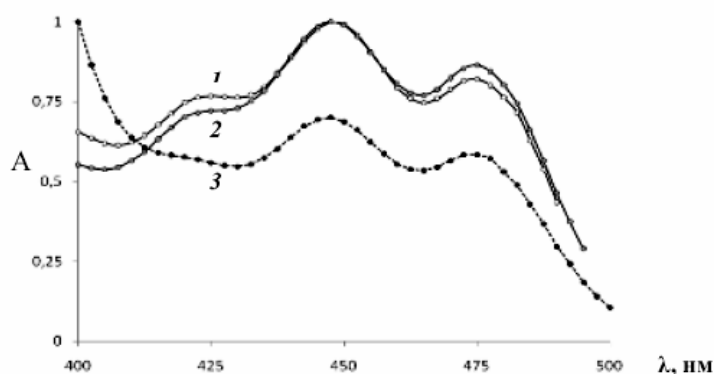


Рис. 1. Спектры ацетонового экстракта цветков бархатцев трех сортов: 1 – «фангасик», 2 – «оранжевый бриллиант», 3 – «сиерра светло-оранжевая»

Жирнокислотный состав диэфиров также довольно однороден, в продуктах омыления каротиноидного экстракта обнаруживаются две основные кислоты – миристиновая и пальмитиновая, а также (но в меньших количествах) стеариновая и лаури-



новая кислоты. Поскольку в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ удерживание увеличивается с ростом липофильности сорбатов, то наибольшее время удерживания должно соответствовать дистеарату. Затем в порядке увеличения хроматографической подвижности на хроматограмме должны появиться пальмитат-стеарат, дипальмитат, миристант-пальмитат, димиристант, лаурат-миристант и, наконец, дилаурат лютеина. Действительно, на хроматограммах обнаруживаются все указанные пики, кроме дилаурата (рис.2), причем такое (очевидное для обращенно-фазовой ВЭЖХ, но предположительное) отнесение подтверждено с использованием масс-спектрометрического детектора [5].

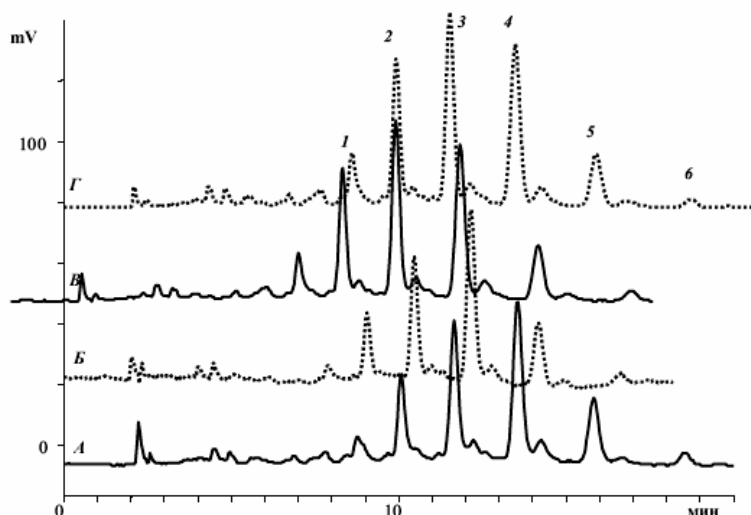


Рис. 2. Разделение компонентов экстракта лепестков цветков бархатцев
Сорта бархатцев: А – «Бронзовый купидон»; Б – «Оранжевый бриллиант»; В – «Гавайи»; Г – «Гавайи»
после сушки. Диэфиры лютеина: 1 – лаурат-миристант, 2 – димиристант, 3 – миристант-пальмитат,
4 – дипальмитат, 5 – пальмитат-стеарат и 6 – дистеарат. Подвижная фаза:
10% ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин

Такой экстракт позволяет обнаруживать диэфиры лютеина в экстрактах других растительных материалов, оценивая одновременно и жирнокислотный состав диэфиров. Например, в экстракте лепестков цветков настурции по сопоставлению с экстрактом цветков бархатцев основные каротиноиды идентифицируются как диэфиры лютеина – от дилаурата до дипальмитата с небольшим пиком пальмитата-стеарата (рис.3).

Сумма диэфиров лютеина в экстракте из лепестков цветков бархатцев важна и в другом отношении, поскольку позволяет рассчитать «мертвое время» колонки по соотношению Зенкевича [6]. Действительно, если в ряду диэфиров соблюдается постоянство инкрементных вкладов (вещества 1–6 последовательно различаются на две метиленовые группы):

$$\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2) = \lg k(n+1) - \lg k(n),$$

то данное соотношение преобразуется в рекуррентное соотношение, константы которого содержат «мертвое время» колонки:

$$\text{tr}(n+1) = 10^{\Delta} \cdot \text{tr}(n) - (10^{\Delta} - 1)t_0,$$

где $\lg k(i)$ – логарифм фактора удерживания; $\text{tr}(i)$ – время удерживания сорбата i , t_0 – «мертвое время».

После расчета «мертвого времени» возможно вычисление инкремента $\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2)$, который необходим для разбиения диэфиров ксантофиллов на гомологи [7]. Таким образом, доступный и дешевый материал позволяет заменить набор труднодоступных синтетических реактивов. При этом важно то, что, как было установлено в настоящей работе, ксантофиллы, чрезвычайно неустойчивые при хранении даже при



Таблица
**Сохранность ксантофиллов
в высушенных лепестках цветков
бархатцев**

Срок хранения, дни	Содержание ксантофиллов (n = 2), мг/г лепестки цветков бархатцев	
	Комнатная температура	4°C
	0	12.4 ± 0.8
10	12.2 ± 0.8	12.4 ± 0.8
36	12.7 ± 0.8	12.3 ± 0.8
74	12.2 ± 0.8	12.4 ± 0.8
94	11.2 ± 0.8	12.9 ± 0.8
134	11.5 ± 0.8	12.7 ± 0.8

соблюдении ряда непростых в исполнении требований, хорошо сохраняются в растительном материале (табл.).

Так, по данным, приведенным в табл., при хранении измельченных лепестков цветков бархатцев в бытовом холодильнике в обычной посуде с закручивающейся крышкой потери ксантофиллов не обнаруживаются вообще. А при хранении при комнатной температуре вне прямого солнечного света сохранность ксантофиллов за этот период превышает 90%. Существенно и то, что значимых изменений в качественном составе ксантофиллов при сушке и хранении растительного материала не было обнаружено.

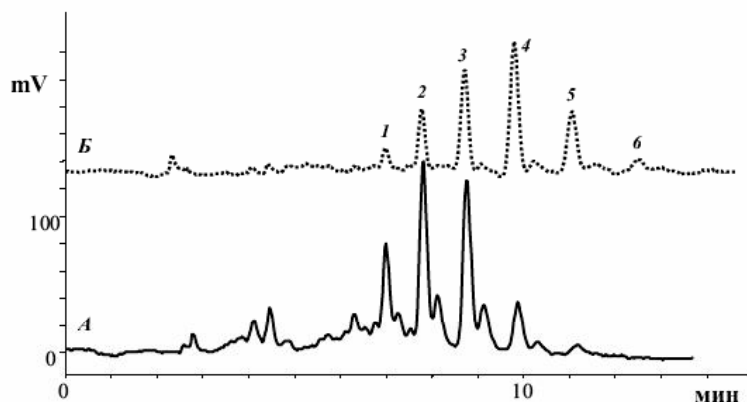


Рис.3. Разделение компонентов экстракта лепестков цветков настурции и бархатцев: А – настурция; Б – бархатцы. Подвижная фаза 100% ацетон, 1 мл/мин. Нумерация пиков – см. рис. 2.

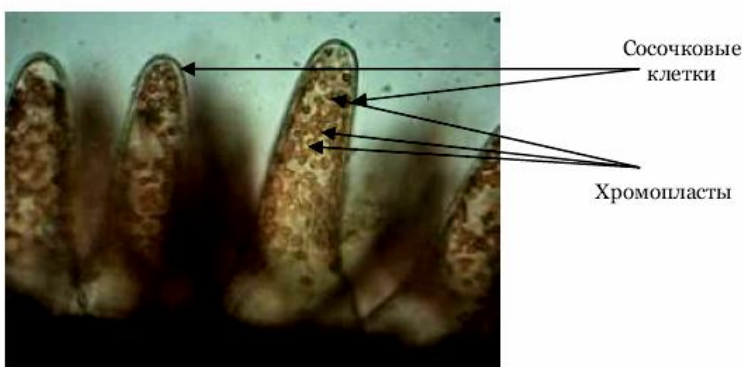


Рис. 4. Сосочковые клетки с хромопластами верхнего эпидермиса лепестков цветков. *T. erecta* 40/0.065 ? 10/18

Такая высокая устойчивость каротиноидов объясняется тем, что диэфирные лютеины накапливаются в хромопластах, имеющих у бархатцев шарообразную форму.

Хромопласты присутствуют во всех клетках мезофилла лепестков цветков, но концентрируются в основном в эпидермальных сосочковых

клетках (рис.4). При высушивании исходного материала хромопласты оказываются прочно запечатанными целлюлозными клеточными стенками, что, по всей видимости, и предопределяет возможности сохранности каротиноидов в высушенном сырье – цветках бархатцев.

Кстати, по этой же причине для полной экстракции ксантофиллов при определении их содержания необходимо тщательное растирание высушенного материала с



мелким кварцевым песком. Соответственно, при измельчении цветков бархатцев некоторая часть целлюлозных мембран разрушается, и высвобождающиеся каротиноиды довольно быстро разрушаются, поэтому для большей сохранности растительного материала лепестки не следует измельчать.

Заключение

Таким образом, высушенные лепестки цветков бархатцев являются надежным дешевым материалом для экстракции серии гомологов – диэфиров лютеина, сохраняющимися при простом и удобном способе хранения.

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

Список литературы

1. Kimura M., Rodriguez-Amaya D.B. Sources of errors in the quantitative analysis of food carotenoids by HPLC // *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. – 1999. – Vol. 49. – P. 58-66.
2. Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Семенов В.Ф. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины // *Сорбц. хром. процесс*. – 2009. – Т. 9, вып. 4. – С. 529-536.
3. Richer S. Lutein – An Opportunity For Improved Eye Health // *JANA*. – 2001. – Vol. 4. – P. 6-7.
4. Niizu P.Y., Rodriguez-Amaya D.B. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein // *J. Food Sci.* – 2005. – Vol. 70. – P. 605-609.
5. Breithaupt D.E., Wirt U., Bamedi A. 2002. Differentiation between lutein monoester region-isomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – Vol. 50. – P. 66-70.
6. Зенкевич И.Г. Рекуррентные соотношения для аппроксимации физико-химических констант гомологов // *Журнал физической химии*. – 2008. – Т. 82, № 85. – С. 807-816.
7. 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.

ESTIMATION OF DRIED MARIGOLD PETALS AS A SUITABLE SOURCE OF LUTEIN DIESTERS FOR CHROMATOGRAPHIC XANTHOPHYLLS IDENTIFICATION

I.A. Gostyshchev
M.Yu. Tret'jakov
I.P. Anisimovich
L.A. Deyneka
V.I. Deyneka

Belgorod State University
Pobedy St., 85, Belgorod,
308015, Russia
E-mail: deineka@bsu.edu.ru

The paper deals with the methods of spectrophotometry and HPLC by means of which it has been revealed that marigold petals contain lutein diesters formed by mainly myristic and palmitic as well as some stearic and lauric acids. The qualitative content of the diesters is rather constant for some *Tagetes patula*, *T. erecta* and *T. tenuifolia* varieties regardless the cultivation conditions. More over it has been established that drying followed by storage may be easily performed without substantial losses of xanthophylls in quantitative and qualitative changes due to a unique package of the substances by cell's cellulose membranes. So dried marigold petals may be used instead of hardly available synthetic standard substances for investigation of complex carotenoid mixtures.

Key words: RP HPLC, spectrophotometry, lutein diesters, *Tagetes patula*, *T. erecta*, *T. tenuifolia*.