

ПОИСК НОВЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ КСАНТОФИЛЛОВ

Л.А. Дейнека, Н.А. Шаркунова, М.Ю. Третьяков, С.С. Сиротина, И.Н. Лиманская,
Т.Н. Ожерельева, А.А. Сиротин, В.Н. Сорокопудов, В.И. Дейнека

Белгородский государственный университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
deineka@bsu.edu.ru

В работе исследован каротиноидный комплекс некоторых нетрадиционных источников, которые либо входят в состав Белгородской флоры, либо могут с успехом культивироваться в условиях Белгорода. Метод ВЭЖХ был использован для определения качественного состава, а спектрофотометрический – для количественного состава комплекса. Установлено, что основные компоненты каротиноидного комплекса *Cosmos sulphureus* - диэфиры лютеина, образованные радикалами миристиной и пальмитиновой кислот, а оранжево-красные цветки *Tropaeolum majus* накапливают эфиры лютеина с кислотами от лауриновой до пальмитиновой. В работе приведены данные о каротиноидах хвои, момордики и адониса летнего.

Ключевые слова: ВЭЖХ, каротиноиды, *Cosmos sulphureus*, *Tropaeolum majus*, *Momordica charantia*, *Adonis aestivalis*.

Роль и значение β -каротина для здоровья человека (и животных) давно и хорошо известны [1 - 3]. На основе β -каротина созданы и используются различные готовые формы для лечения и профилактики здоровья человека а также для кормления животных. Относительно недавнее открытие особой роли для здоровья человека некоторых ксантофиллов, таких как, например, пара лютеин + зеаксантин [4] или астаксантин [5], привело к росту интереса к другим каротиноидам. В результате начато производство готовых форм и кормовых добавок на основе ксантофиллов, что в конечном итоге стало следствием обнаружения природных источников этих каротиноидов. При этом в настоящее время остается актуальным не только поиск новых источников биологически активных веществ, но и методы целенаправленного изменения метаболизма каротиноидов в растениях [6, 7].

Данная работа является продолжением исследований по поиску биологически активных веществ в растениях Белгородской флоры, или в тех растениях, которые могут с успехом культивироваться в Белгородской области.

Экспериментальная часть

Для исследования каротиноидов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Altex 110А, 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). Хроматографические условия: колонка 250 \times 4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; подвижные фазы готовили смешиванием ацетонитрила и ацетона в нужном соотношении, расход элюента: 1 мл/мин. Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветах с использованием спектрофотометра КФК-3-01.

Результаты и обсуждение

Каротиноиды хвои

В работе [8] исследовали накопление каротиноидов в хвое кедра сибирского, причем было найдено, что основной компонент каротиноидного комплекса – лютеин (и зеаксантин в неустановленном соотношении), содержание которого увеличивалось к зимним месяцам и было примерно в 3-4 раза выше, чем β -каротин (примерно 165 ± 10 и 60 ± 20 мкг/г, соответственно). Этот факт представляет интерес, например, в том отно-

шении, что по старинной русской традиции каждую зиму в отходы уходит огромное количество елок и сосен, использованных при оформлении новогодних праздников. Соответственно, принципиально возможна утилизация этого ценного материала.

Действительно, хвоя исследованных родов хвойных растений содержала значительное количество каротиноидов (пики которых могут быть отличимыми от пиков хлорофиллов при сопоставлении поглощений при 445 и 650 нм, рис.1), в том числе и лютеина: от 100 до 250 мкг на 1 г. Вероятно, к благоприятным факторам следует отнести присутствие в хвое кроме лютеина α - и β -каротинов, что позволяет рассчитывать на создание комплексных каротиноидных препаратов широкого спектра действия.

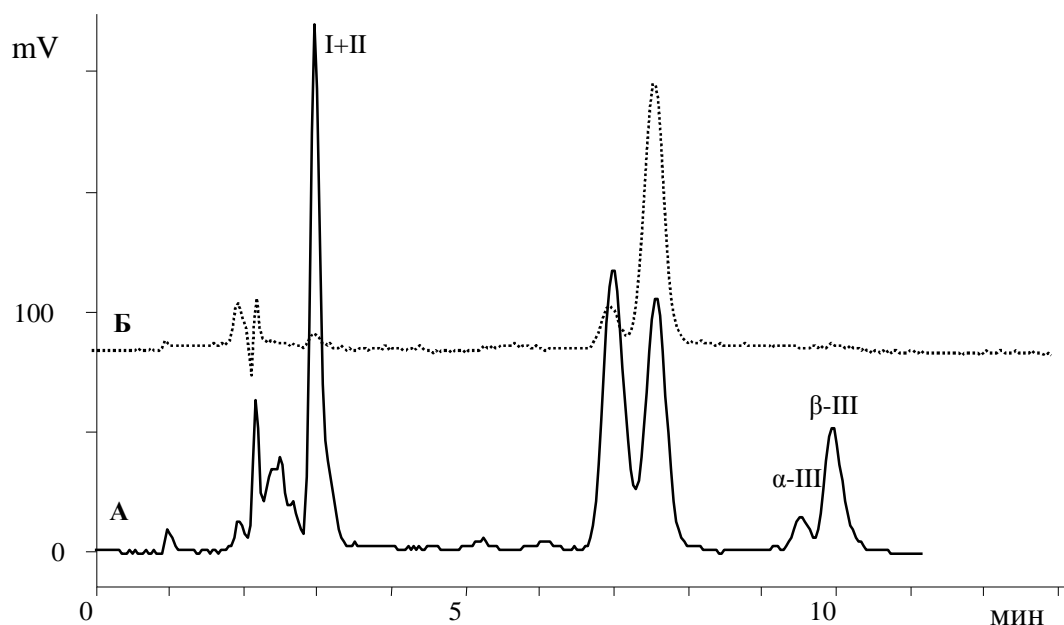


Рис.1. Разделение пигментов хвои лиственницы:
 I – лютеин, II – зеаксантин, III – изомеры каротина.
 Подвижная фаза: 30 об.% ацетонитрила в ацетоне.
 Длина волны детектирования: А – 445 нм и Б – 650 нм.

Однако было установлено, что даже при непродолжительном (в течение недели) хранении хвои, отделенной от растения, наблюдался распад хлорофиллов, что соответствует литературным данным [9]. Следовательно, технология переработки хвои должна включать стадию отделения каротиноидов от хлорофиллов и продуктов их распада.

***Cosmos sulphureus* – космея (космос)**

Если лютеин известен как один из наиболее распространенных ксантофиллов в листе растений, то высокое содержание этого каротиноида в лепестках цветков растений – довольно редкое явление. Например, хорошо известно промышленное использование бархатцев, *Tagetes* sp. [10] для извлечения из лепестков цветков этого растения эфиров лютеина. В последние годы на клумбах Белгорода можно найти новое декоративное растение, внешне напоминающее бархатцы. Речь идет о космее, но не о традиционном виде с окраской лепестков цветков (кроме белой) от розовой до пурпурно-красной, *Cosmos bipinnatus* Cav., обусловленной накоплением антоцианов [11], а о другом – *C. sulphureus* с желто-оранжевыми цветками. По литературным данным в цветках этого растения в условиях Бразилии накапливается 650–700 мкг/г лютеина [12].

На хроматограмме, рис.2, ацетонового экстракта лепестков цветков *C. sulphureus*, выращенных в 2006 и 2007 г.г., видны основные компоненты – димиристат, миристат-пальмитат и дипальмитат лютеина. Однако для цветков, собранных в сентябре 2007 го-

да, значительна также доля в каротиноидном комплексе неидентифицированных компонентов относительно более высокой гидрофильности, что может быть следствием менее благоприятных условий для развития растения в начале осени сезона 2007 г.

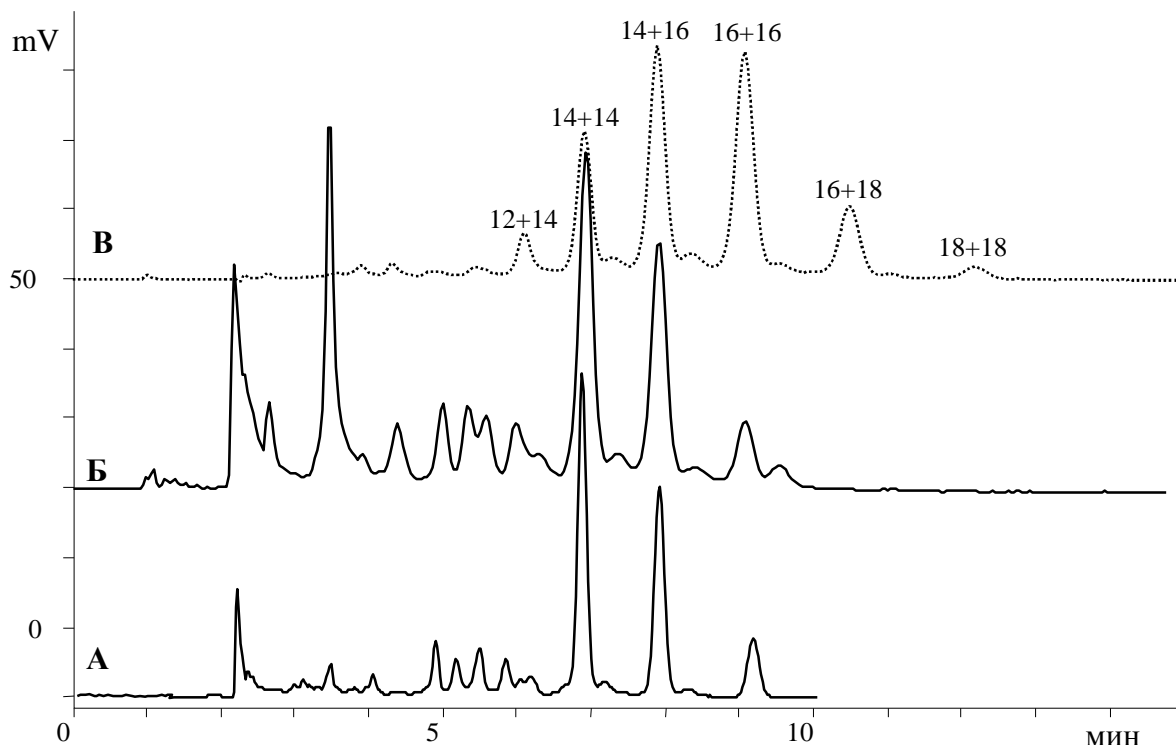


Рис.2. Хроматограмма ацетонового экстракта лепестков цветков *C. Sulphureus*:
Хроматограммы экстрактов цветков, собранных: А – в 2006 году, Б – в 2007 году;
В – экстракт лепестков бархатцев. Обозначение пиков, например,
14+16 соответствует миристату-пальмитату лютеина.
Подвижная фаза: 10 об.% ацетонитрила в ацетоне. Длина волны детектирования – 445 нм.

По спектрофотометрическим данным накопление каротиноидов в лепестках цветков составило 2.4 ? 3.2 мг на 1 г свежих лепестков (в пересчете на лютеин). Отметим, что концентрация производных лютеина в лепестках цветков *C. sulphureus* сопоставима с этой характеристикой цветков бархатцев лучших сортов (*Tagetes erecta*), накапливающих по нашим данным в условиях Белгорода 2 ? 4 мг/г. Таким образом, цветки космеи могут рассматриваться как хорошие источники диэфиров лютеина.

***Tropaeolum majus* L. - настурция**

Цветы довольно обычного для нашего региона растения – настурции были исследованы в работе [13], в которой было установлено, что в лепестках накапливается 450 ± 60 и 350 ± 50 мкг/г лютеина - в лепестках желтой и коричневато-оранжевой окраски, соответственно. Образцы цветков были приобретены в супермаркете (в Бразилии они относятся к пищевым продуктам) и для количественного определения была использована сложная процедура. Сначала каротиноиды экстрагировали холодным ацетоном, затем реэкстрагировали в петролейный эфир, в течение ночи омыляли метанольным раствором щелочи, отмывали и упаривали в вакууме под азотом. Затем анализ проводили методом ВЭЖХ. Методика подготовки образцов приведена, поскольку при таких операциях трудно избежать потерь достаточно малоустойчивых каротиноидов.

В наших исследованиях было установлено, что, во-первых, цветки настурции (собранные в конце сентября 2007 г) с желтой и коричневатой окраской содержат существенно меньше каротиноидов по сравнению с цветками оранжево-красной окраски

(1.25 мг/г в пересчете на лютеин). Во-вторых, в последнем случае лютеин накапливается в основном в виде диэфиров, рис.3.

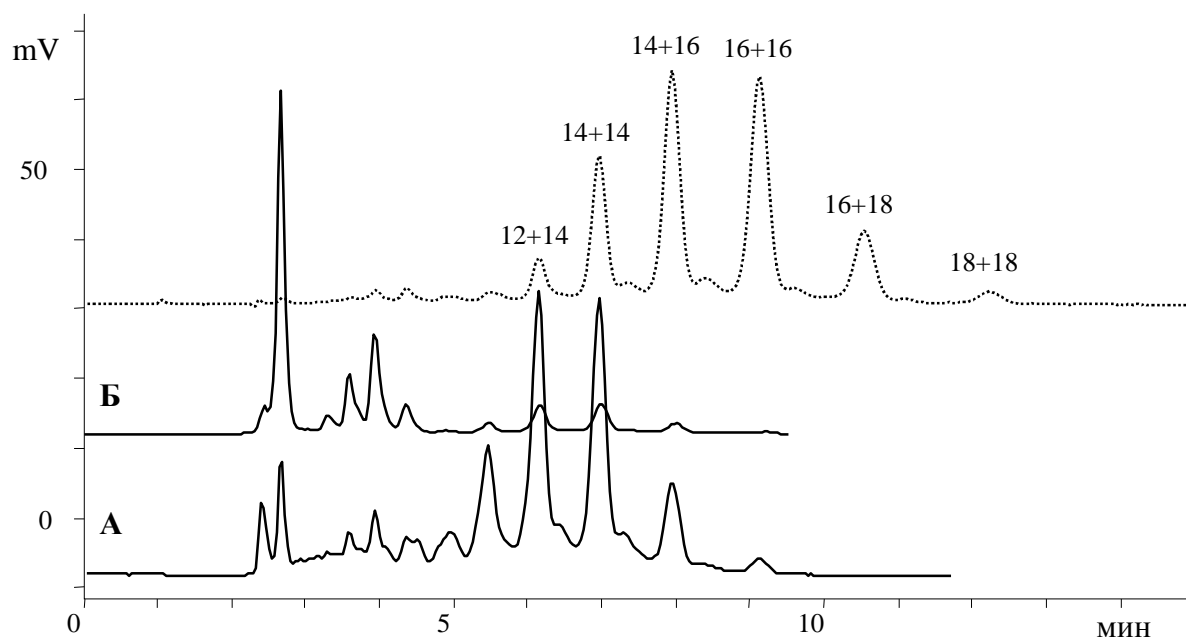


Рис.3. Хроматограмма ацетонового экстракта лепестков цветков *Tropaeolum majus* L.:
Хроматограммы экстрактов цветков: А - оранжево-красной окраски,
Б - коричневатой окраски. В - экстракт лепестков бархатцев

Как следует из сопоставления удерживания пиков ксантофиллов на хроматограммах экстрактов, рис.3, диэфиры каротиноидного комплекса лепестков цветков настурции красно-оранжевого цвета образованы в основном лауриновой и миристиновой кислотами. При этом пигменты лепестков с коричневатой окраской содержат лютеин с существенно меньшей степенью этерификации, а пигменты лепестков желтой окраски содержат в основном неэтерифицированный лютеин. Таким образом, цветки настурции оранжево-красной окраски лишь немногим уступают по накоплению лютеина бархатцам, но в отличие от многих иных источников лютеина, могут быть непосредственно употребленными в пищу, что делает их особенно привлекательными.

***Momordica charantia* - момордика**

Это экзотическое растение семейства тыквенные представляет интерес благодаря уникальному маслу семян, содержащему большое количество конъюгированной октадекатриеновой кислоты – α -элеостеариновой [14]. Кроме того, этот овощ содержит противодиабетические вещества харантин, вицин и полипептид-р [15]. Спелые плоды момордики (выращенные в условиях Белгородской области рассадным методом в 2007 г.) имеют желто-оранжевую окраску, а семена в них находятся в рубиново-красном ариллусе, имеющим вкус спелой хурмы. По литературным данным при созревании в ариллусе момордики накапливается рекордно большое количество ациклического каротиноида – ликопина: более 250 мкг/г, что многократно выше, чем в привычном источнике этого каротиноида – в томатах [16]. В настоящее время к ликопину привлечено особое внимание в связи с предполагаемой эффективностью этого каротиноида в профилактике раковых и сердечных заболеваний [17].

В настоящей работе установлено, что даже после высушивания ариллуса без особых мер предосторожности из остатка удается экстрагировать большое количество практически чистого ликопина, рис.4. Подтвержден также факт полного различия каротиноидного комплекса кожуры и ариллуса плодов момордики, см. рис.4.

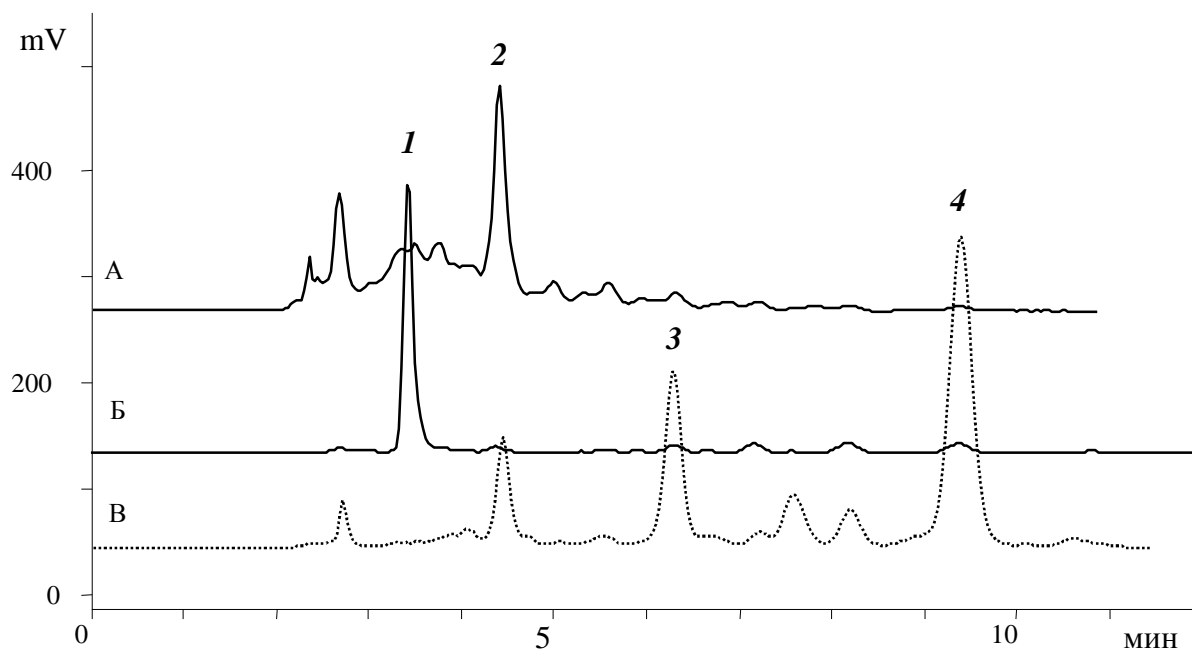


Рис.4. Хроматограмма ацетоновых экстрактов плодов момордики: Экстракты: А – внешней корки плода, Б – ариллуса. В – экстракт плодов физалиса декоративного. 1- ликопин, 2 – β -каротин, 3 – пальмитат β -криптоксантина; 4 – дипальмитат зеаксантина. Подвижная фаза: ацетонитрил: ацетон 1:2.5 об./об.

Количественные исследования накопления в плодах момордики и сохранности ликопина предполагается выполнить в следующем году.

Adonis aestivalis L. – адонис летний

Красные цветки этого растения уникальны способностью синтезировать кетоксантофилл – астаксантин, антиоксидантная активность которого считается рекордной [18]. Исследование возможности выращивания адониса летнего, вероятно, единственного сухопутного растения, которое может быть использовано для получения природного астаксантина, было начато в 2006 году. Это позволило в 2007 году использовать семена, полученные с растений, выращенных в Белгородском регионе.

Каротиноидный комплекс цветов довольно сложен и образован в основном эфирами (большей частью – диэфирами) изомеров астаксантина. Это было подтверждено не только спектрофотометрическими данными ($\lambda_{\max} = 470$ нм в ацетоне с размытой колебательной структурой), но и практически точным выполнением инкрементной (гомологической) разности в сопоставлении с компонентами каротиноидного комплекса диэфиров лютеина экстракта цветков бархатцев по методологии, изложенной в работе [19], рис.5.

В 2007 году было исследовано влияние способов подготовки семян (полученных от растений, выращенных нами в сезоне 2006 г) на продуктивность растения. Следует отметить склонность адониса к самосеву, в то время как семена, приобретаемые в розничной торговле, по нашим данным не отличались высокой всхожестью. При посеве сухими семенами (контроль) сбор лепестков адониса летнего составил 4.1 г/м^2 , что соответствует выходу астаксантина $0,045 \text{ г/м}^2$. После предпосевного прогрева семян при 30°C в течение 21 дня урожай лепестков вырос примерно в полтора раза – 6.7 г/м^2 , и еще более внушительным оказался рост продуктивности при посеве стратифицированными семенами – более 8 г свежих лепестков на м^2 .

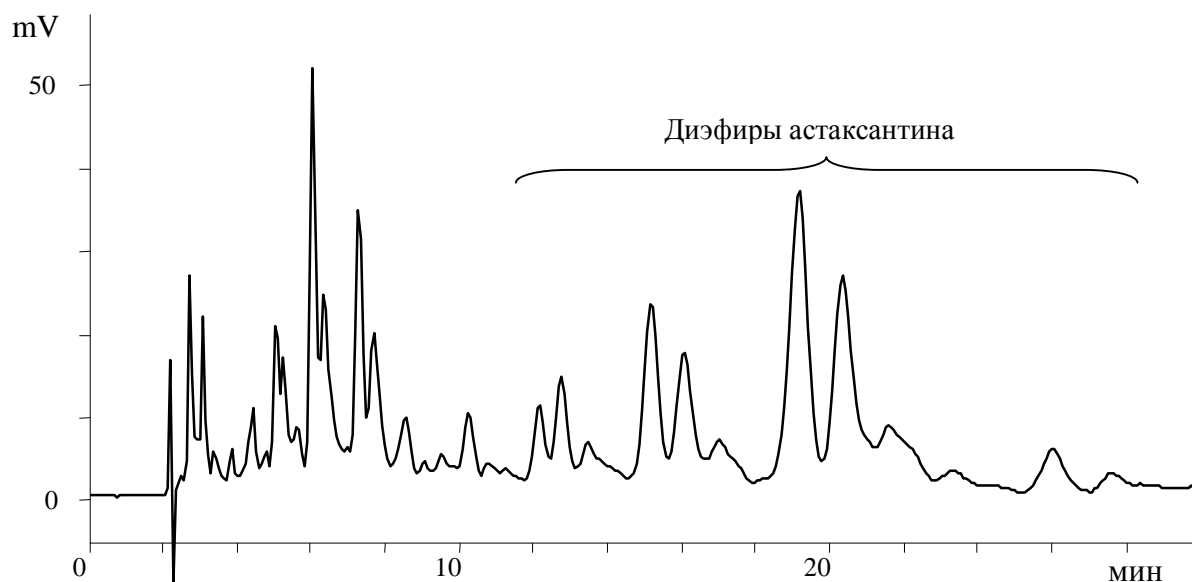


Рис.5. Хроматограмма экстракта лепестков цветков *Adonis aestivalis*:
Подвижная фаза ацетонитрил: ацетон 1:3, детектирование 470 нм.

Таким образом, адонис летний может позволить расширить ассортимент каротиноидной продукции, поскольку на территории России не существует регионов с достаточным количеством естественного солнечного света для выращивания микроводоросли *Haematococcus*, промышленно выращиваемой только на Гавайских островах [20].

Выводы

В работе приведены данные по исследованию каротиноидного состава нетрадиционных источников этих биологически активных веществ. Показано, что растения Белгородской флоры или растения, которые могут с успехом культивироваться в условиях Белгорода, могут представлять интерес для производства готовых форм на основе собственного сырья.

Список литературы

1. Yiki V. Biological functions and activities of animal carotenoids // *Pure Appl. Chem.* - 1991. - V.63, №1. – P. 141-146.
2. Johnson E.J. The role of carotenoids in human health // *Nutr. Clin. Care.* - 2002. – V.5, №2. – P. 56–65.
3. Khachik F., Carvalho L., Bernstein P.S., Muir G.J., Zhao D.-Y., Katz N.B. // *Chemistry, Distribution, and Metabolism of Tomato Carotenoids and Their Impact on Human Health* // *Exp. Biol. Med.* - 2002. – V.227. – P. 845–851.
4. Stringham J.M., Hammond B.R., Jr. Dietary lutein and zeaxanthin: Possible effects on visual function // *Nutr. Rev.* - 2005. - V.63, №2. - P. 59-64.
5. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition // *J. Nat. Prod.* – 2006. – V.69. – P. 443-449.
6. Ralley L., Enfissi E.M.A., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M., Fraser P.D. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants // *Plant J.* – 2004. – V.39. – P. 477–486
7. US Patent 6,784,351 B2

8. Зотикова А.П., Воробьева Н.А., Соболевская Ю.С. Динамика содержания и роль каротиноидов хвои кедрового сибирского в высокогорье // Вестник Башкирского университета. - 2001. - № 2 (II). - С. 67-69.
9. Антонов В.И., Ягодин В.И. Превращения зеленых пигментов при экстракционной переработке древесной зелени хвойных // Химия растительного сырья. - 2006. - №1. - С. 41-44.
10. Sowbhagya H.B., Sampathu S.R., Krishnamurthy N. Natural Colorant from Marigold-Chemistry and Technology // Food Rev. Intern. - 2004. - V.20, №1. - P. 33-50.
11. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Ермаков А.М. Антоцианы некоторых растений Белгородской флоры. //Химия природн. соедин. - 2003. - №5. - С. 412-413.
12. Rodriguez-Amaya D.B. Brazil: A bounty of carotenoid sources // Sight Life. - 2002. - №4. - P. 3-8.
13. Niizu P.Y., Rodriguez-Amaya D.B. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein // J. Food Sci. - 2005. - V.70, №9. - P. S605-S609
14. Дейнека В.И., Шапошников А.А., Дейнека Л.А., Сорокопудова О.А., Федлюк П.П., Сорокопудов В.Н. Эссенциальные жирные кислоты в растениях Белгородской флоры // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина и фармация. - 2006. - №3(23), Вып.4. - С. 30-39.
15. Krawinkel M.B., Keding G.B. Bitter Gourd (*Momordica charantia*): A Dietary Approach to Hyperglycemia // Nutr. Rev. - 2006. - V.64, №7. - P. 331-337.
16. Rodriguez D.B., Lee T.-C., Chichester C.O. Comparative Study of the Carotenoid Composition of the Seeds of Ripening *Momordica charantia* and Tomatoes // Plant Physiol. - 1975. - V.56. - P. 626-629.
17. Bramley P.M. Is lycopene beneficial to human health? // Phytochemistry. - 2000. - V.54. - P. 233-236.
18. Naguib Y.M.A. // Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids // J. Agric. Food Chem. - 2000.- V.48. - P. 1150-1154.
19. 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.
20. Lorenz R.T., Cysewski G.R. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin // Tibtech. - 2000. - v.18, (April). - P. 160-167.

SEARCH FOR NEW VEGETATIVE SOURCES OF XANTHOPHYLLS

**L.A. Dejneka, N.A. Sharkunova, M.Y. Tretjakov, S.S. Sirotnina, I.N. Limanskaja,
T.N. Ozhereljeva, A.A.Sirotnin, V.N. Sorokopudov, V.I. Dejneka**

Belgorod State University, 85 Pobeda Str., Belgorod, 308015
dejneka@bsu.edu.ru

Carotenoid composition of some uncommon carotenoid sources of the Belgorod flora, as well as of plants that can be successfully cultivated in Belgorod conditions has been investigated. HPLC was utilized for definition of the qualitative composition while spectrophotometry in visible region was utilized for the overall carotenoid content determination. It is established that the basic carotenoid components of *Cosmos sulphureus* being lutein diesters formed by myristic and palmitic acids, while lutein diesters of orange-red *Tropaeolum majus* petals were composed by fatty acids from lauric up to palmitic. Some more new information on carotenoid complex of conifer needle, *Momordica charantia* and *Adonis aestivalis* is given.

Key words: HPLC, carotenoids, *Cosmos sulphureus*, *Tropaeolum majus*, *Momordica charantia*, *Adonis aestivalis*.