

## ТРИТЕРПЕНОИДЫ ЦВЕТКОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*CALENDULA OFFICINALIS* L.)

### В.И. Осипов

д.б.н., гл. науч. сотрудник, лаборатория метаболомики,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва);  
Объединенная Российско-финская лаборатория биотехнологии и группа химии природных соединений,  
факультет химии, Университет Турку (г. Турку, Финляндия)  
E-mail: ossipov@utu.fi

### В.А. Быков

д.т.н., академик РАН, гл. науч. сотрудник, лаборатория метаболомики,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва);  
Объединенная Российско-финская лаборатория биотехнологии и группа химии природных соединений,  
факультет химии, Университет Турку (г. Турку, Финляндия)

### Ф.М. Хазиева

к.б.н., зав. отделом агробиологии и селекции,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

### Н.И. Сидельников

д.с.-х.н., директор, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Исследован состав тритерпеноидов цветков трех сортов календулы лекарственной (*Calendula officinalis*) методами газожидкостной хроматографии и ультраэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС и УЭЖХ-МС). Идентифицированы четыре календулозида (H, G, F и E), два неизвестных гликозида олеаноловой кислоты и агликон  $\beta$ -амирин, который является предшественником в биосинтезе олеаноловой кислоты и тритерпеноидов. Различий в составе и содержании тритерпеноидов в цветках исследованных сортов календулы лекарственной не установлено.

**Ключевые слова:** *Calendula officinalis*, цветки, тритерпеноиды, ГХ-МС, УЭЖХ-МС.

**Для цитирования:** Осипов В.И., Быков В.А., Хазиева Ф.М., Сидельников Н.И. Тритерпеноиды цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(6):3–9. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-01>

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) – лекарственное растение, широко используемое не только в России, но и во многих странах мира (Германии, Великобритании, Нидерландах, США, Испании, Индии, Румынии, Франции и др.) [1]. Под названием «ноготки лекарственные» оно было включено в Государственную фармакопею (ГФ) СССР XI в 1990 г., ГФ Российской Федерации XIII в 2015 г. [2, 3].

Сорт Кальта включен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в 1984 г. В результате селекционного процесса с использованием химических мутагенов во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, Москва) были получены два новых сорта календулы лекарственной: Золотое море и Райский сад, которые запатентованы соответственно в 2014 г. (Патент № 7532) и в 2016 г. (Патент № 8651) [4, 5]. Эти сорта отличаются морфо-

логической однородностью и более высокой урожайностью соцветий и семян [6], но их качество и ценность по содержанию биологически активных метаболитов требует детального исследования.

Лекарственные свойства растений календулы обусловлены содержанием различных вторичных метаболитов. Наиболее важными из них являются тритерпеноиды, представленные в основном гликозидами олеаноловой кислоты и различающиеся числом и положением присоединённых к ней молекул глюкозы, галактозы и глюкуроновой кислоты [1, 7–11].

Цель работы – адаптация методов ГХ-МС и УЭЖХ-МС для исследования состава тритерпеноидов в цветках разных сортов календулы лекарственной.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили цветки растений календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.).

*nalis* L.) сортов Кальта, Золотое море и Райский сад, выращенных на экспериментальных полях ВИЛАР. Цветки календулы собирали в фазе цветения растений, высушивали в темноте при температуре 45 °С при вентиляции, гомогенизировали на шаровой мельнице MM200.

Образцы цветков массой 50 мг экстрагировали 1 мл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт: нафталин для ГХ-МС (0,02 мг/мл) и камфорульфоновую кислоту для УЭЖХ-МС (0,01 мг/мл). Экстракцию проводили в течение 60 мин при постоянном перемешивании (VORTEX Genie 2, «Scientific Industries») и при комнатной температуре. Экстракт отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 29000 g (SIGMA 3-15, «B. Braun Biotech International GmbH») и фильтровали (PTFE фильтр, 0,2 µm) для ГХ-МС и УЭЖХ-МС анализа.

Газожидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием метаболитов осуществляли с помощью хроматографической системы «Perkin Elmer GC AutoSystem XL» с масс-спектрометром «Turbo Mass Gold quadrupole». Использовали капиллярную колонку (PE-5MS, 30 м, 0,5 мм, толщина слоя 0,25 мкм, «Perkin Elmer») и гелий в качестве газа-носителя со скоростью потока 1,0 мл/мин. Образец экстракта цветков объемом 2 мкл вводили при разделении потока 1/20. Температура инжектора – 290 °С, линии соединения ГХ и МС – 300 °С, МС источник – 250 °С. Начальная температура хроматографической колонки – 90 °С держится 5 мин с последующим увеличением температуры до 320 °С, общее время анализа – 50 мин. Масс-спектрометр функционировал по методу электронной ионизации (electron impact mode, EI+). Начало сканирования – через 5 мин после введения образца, скорость сканирования – 3 скан/с, диапазон сканирования – от 50 до 620 m/z [12].

Зарегистрированные метаболиты идентифицировали, используя программу «MS-search v.2.0» (NIST, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, США) и базы масс-спектрометрических данных «NIST-2008» ([www.nist.gov](http://www.nist.gov)) и GMD (Golm Metabolome Database, <http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de>, Германия) [13].

УЭЖХ-МС анализ метаболитов осуществляли с помощью хроматографической системы Agilent 1200 HPLC с BRUKER micrOTOF-Q-MS детектором; колонка Acquity BEH C18 (100×2,1 мм, pore size 1.7 µm, Waters). В качестве элюентов

использовали 0,1%-ный водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (Б). Профиль элюции: 0–0,1 мин, 1% Б в А; 0,1–15,5 мин, 1–99% Б в А (линейный градиент); 15,5–20 мин, 99% Б в А. Скорость элюции – 0,3 мл/мин. Объем хроматографируемого образца – 5 мкл. Условия масс-спектрографического детектирования: электроионизация в распыленном состоянии (ESI), регистрация отрицательных ионов с m/z 50–2000, напряжение на игле 4000 В, температура азота – 200 °С, скорость потока газа – 8,0 л/мин. Для идентификации метаболитов использовали базы масс-спектрометрических данных: HMDB (Human Metabolome Database), METLIN (Metabolite and Tandem MS Database), MassBank (High Quality Mass Spectral Database), Chem Spider (Search and share chemistry).

Содержание тритерпеноидов определяли в относительных единицах: площадь пика m/z аддукта [M–H]<sup>–</sup> каждого соединения, нормализованная на площадь пика внутреннего стандарта и на 1 г сухой массы образца.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод ГХ-МС характеризуется высокой чувствительностью и эффективностью при анализе низкомолекулярных и термостабильных метаболитов, в том числе терпеноидов. В результате его применения в экстракте цветков календулы лекарственной были обнаружены четыре соединения, имеющие масс-спектры, характерные для тритерпеноидов (рис. 1 и 2). Установлено, что ГХ-МС профили исследованных сортов календулы идентичны как по содержанию метаболитов, так и по их относительному содержанию.

Соединение 1 (28,81 мин) идентифицировано как β-амирин (олеан-12-ен-3-ол). Совпадение масс-спектра соединения 1 и масс-спектра β-амирина из базы данных составило 87%. β-Амирин является непосредственным предшественником в биосинтезе олеаноловой кислоты и далее гликозидов пентациклических тритерпеноидов календулы лекарственной [11].

Соединения 2–4 имели масс-спектры, близкие масс-спектру β-амирина, но определить их точную структуру по базам масс-спектрометрических данных не удалось. Предварительно эти соединения были идентифицированы как тритерпеноиды, производные олеаноловой кислоты (рис. 2).

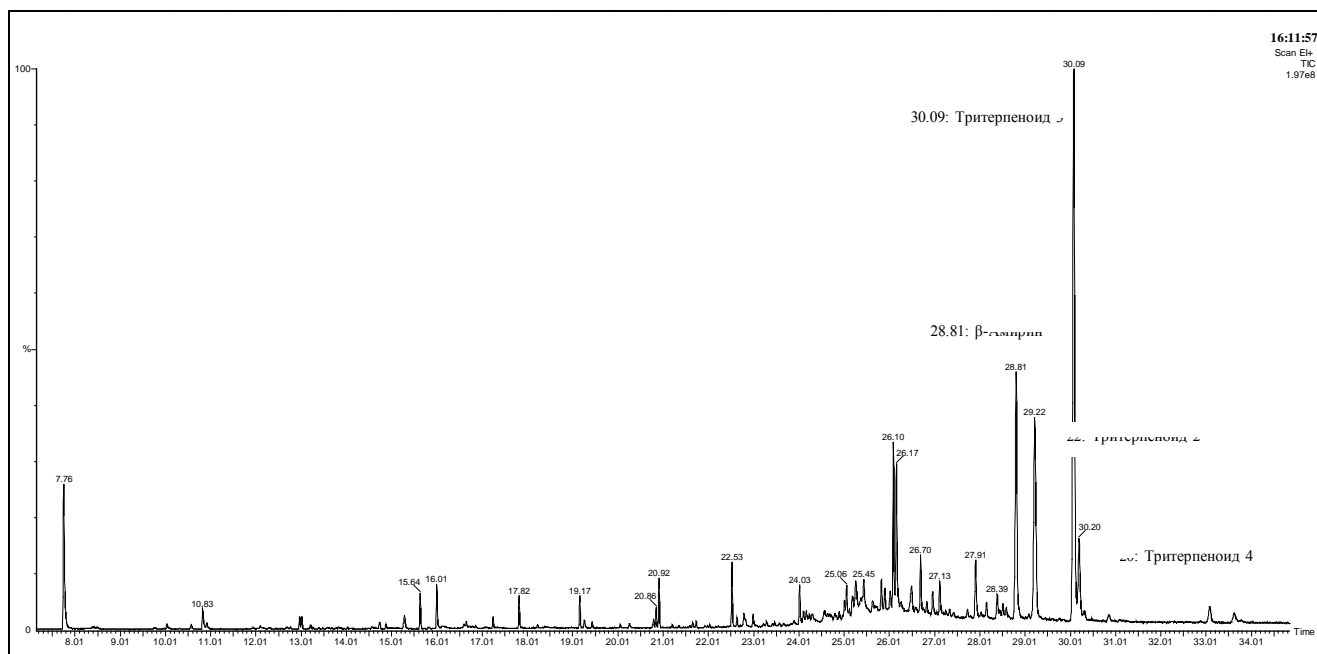


Рис. 1. ГХ-МС профиль экстракта из цветков календулы лекарственной, сорт Кальта

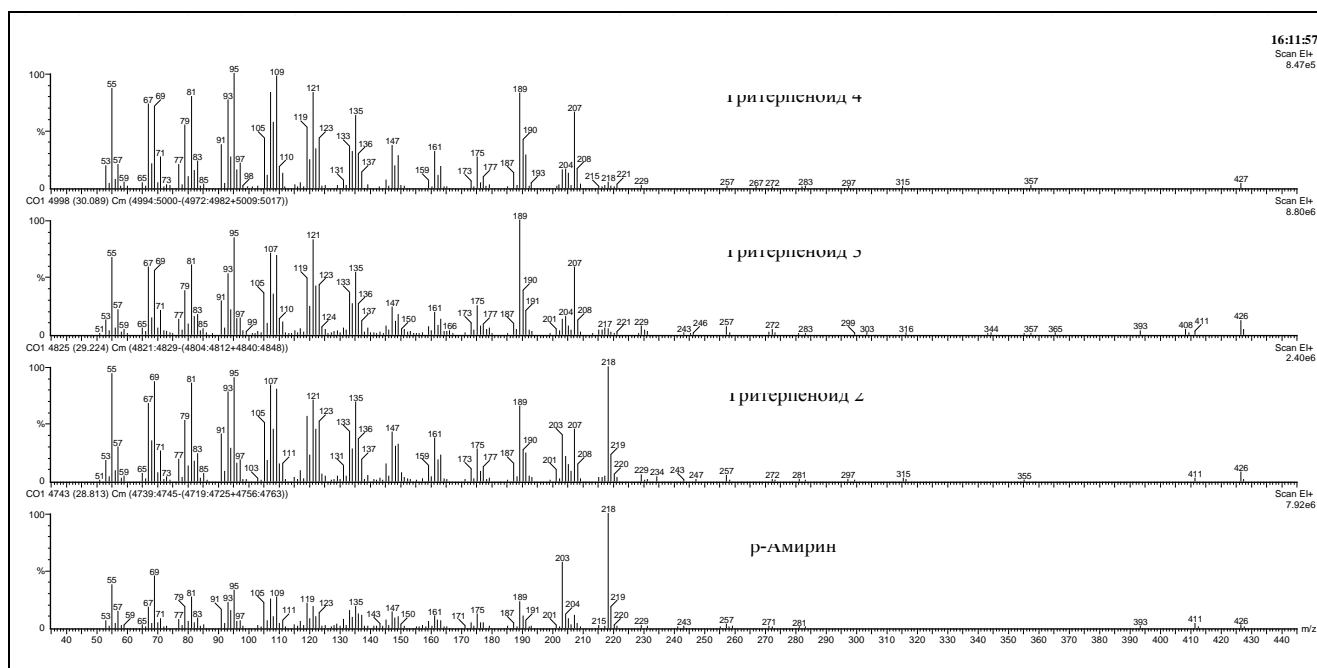


Рис. 2. Масс-спектры тритерпеноидов цветков календулы лекарственной, полученные методом ГХ-МС

Таким образом, в свободном виде в цветках календулы лекарственной обнаружен только один агликоктритерпеноид – β-амирин. Тритерпеноиды 2–4, вероятнее всего, являются производными олеаноловой кислоты или продуктами распада сложных гликозидов олеаноловой кислоты в условиях ГХ-МС анализа.

Наиболее подходящим методом анализа структурно сложных пентациклических тритерпе-

ноидов является метод УЭЖХ-МС, который позволяет регистрировать метаболиты с массой до 2000 Да. Сравнение УЭЖХ-МС профилей метаболитов соцветий сортов Кальта, Золотое море и Райский сад показало, что они идентичны по составу метаболитов и практически не отличаются по их относительному содержанию.

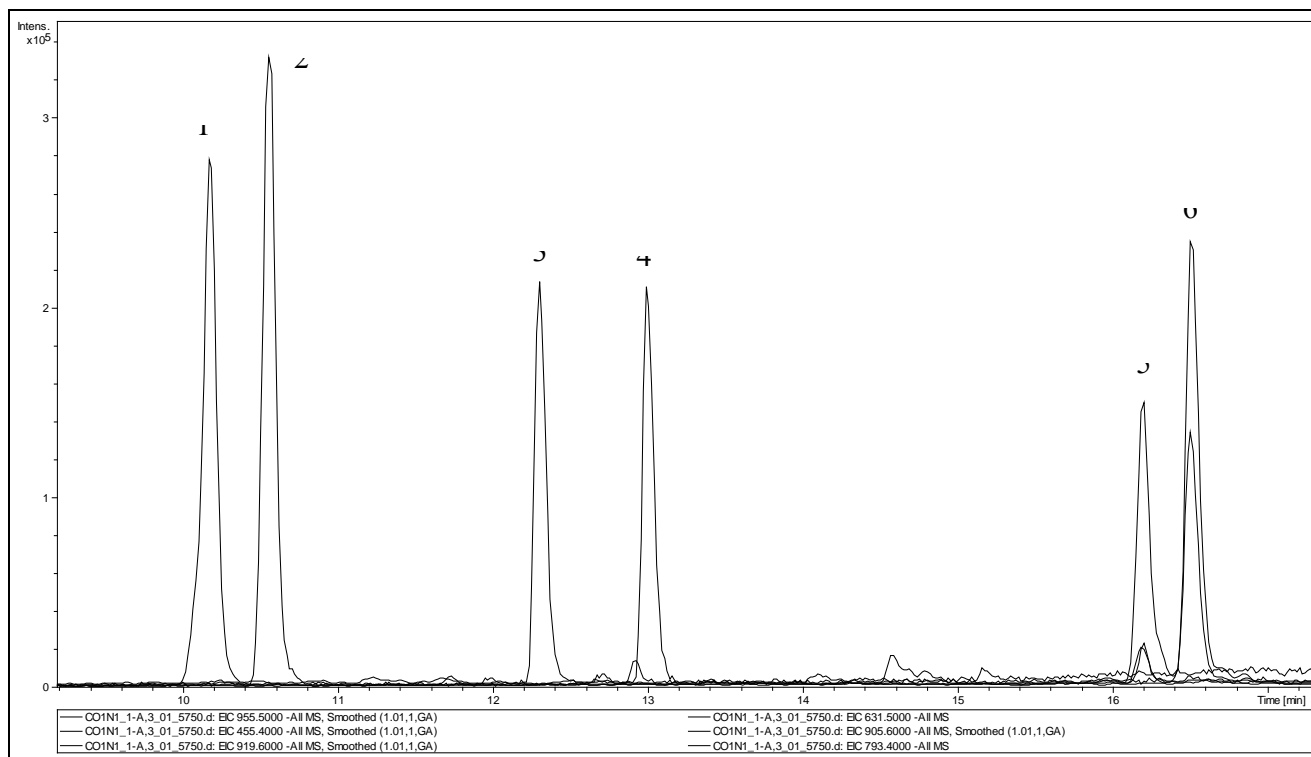
Экстракция из общей хроматограммы ионов (Total Ion Chromatogram), профилей аддуктов, m/z

которых соответствуют значениям ионов  $[M-H]^-$  известных тритерпеноидов, позволило обнаружить в экстракте календулы лекарственной четыре календулозида: E, F, G и H, которые являются, соответственно, моно-, ди- и тригликозидами олеаноловой кислоты (таблица, рис. 3, 4) [14]. Кроме того, обнаружены два не идентифицированных тритерпеноида, которые имели массу  $[M-H]^-$  ионов, равную соответственно 919,6 и 905,6 (таблица, рис. 3).

В масс-спектре этих двух соединений присутствовал интенсивный ион олеаноловой кислоты с  $m/z$  455,4. Профиль этого аддукта [Олеаноловая кислота-Н] $^-$  полностью совпадает на хроматограмме по времени удерживания с профилями  $m/z$  919,6 и 905,6 (рис. 3). На основании этого соединения 5 и 6 были предварительно идентифицированы как гликозиды олеаноловой кислоты 1 и 2 (таблица, рис. 3).

**Таблица. Масс-спектрометрические данные тритерпеноидов цветков календулы лекарственной, полученные методом УЭЖХ-МС**

| Время, мин | Аддукт метаболита, m/z |                                | Молекулярная формула метаболита | Моноизотопная масса, Да | Название идентифицированного метаболита |
|------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---|
|            | $[M-H]^-$              | [Олеаноловая кислота - H] $^-$ |                                 |                         |   |
| 10,17      | 955,47                 | —                              | $C_{48}H_{76}O_{19}$            | 956,50                  | Календулозид H                          |
| 10,56      | 793,42                 | —                              | $C_{42}H_{66}O_{14}$            | 794,45                  | Календулозид F                          |
| 12,30      | 703,42                 | —                              | $C_{42}H_{66}O_{14}$            | 794,45                  | Календулозид G                          |
| 12,98      | 631,37                 | —                              | $C_{36}H_{56}O_9$               | 632,39                  | Календулозид E                          |
| 16,19      | 919,64                 | 455,34                         | $C_{60}H_{88}O_7$               | 920,65                  | Гликозид олеаноловой кислоты 1          |
| 16,49      | 905,63                 | 455,34                         | $C_{59}H_{86}O_7$               | 906,64                  | Гликозид олеаноловой кислоты 2          |



**Рис. 3.** Объединенные экстрагированные ионные хроматограммы тритерпеноидов календулы лекарственной, полученные методом УЭЖХ-МС анализа экстракта цветков сорта Кальта. Для экстракции ионных хроматограмм выбраны значения  $m/z$ , которые соответствуют массе отрицательных ионов  $[M-H]^-$  календулозида H (№ 1,  $m/z$  955,5), календулозидов F и G (№№ 2 и 3,  $m/z$  793,4), календулозида E (№ 4,  $m/z$  631,5), а также двух тритерпеноидов, предварительно идентифицированных как гликозиды олеаноловой кислоты (№ 5,  $m/z$  455,4 и 919,6; № 6, 455,4 и 905,6)

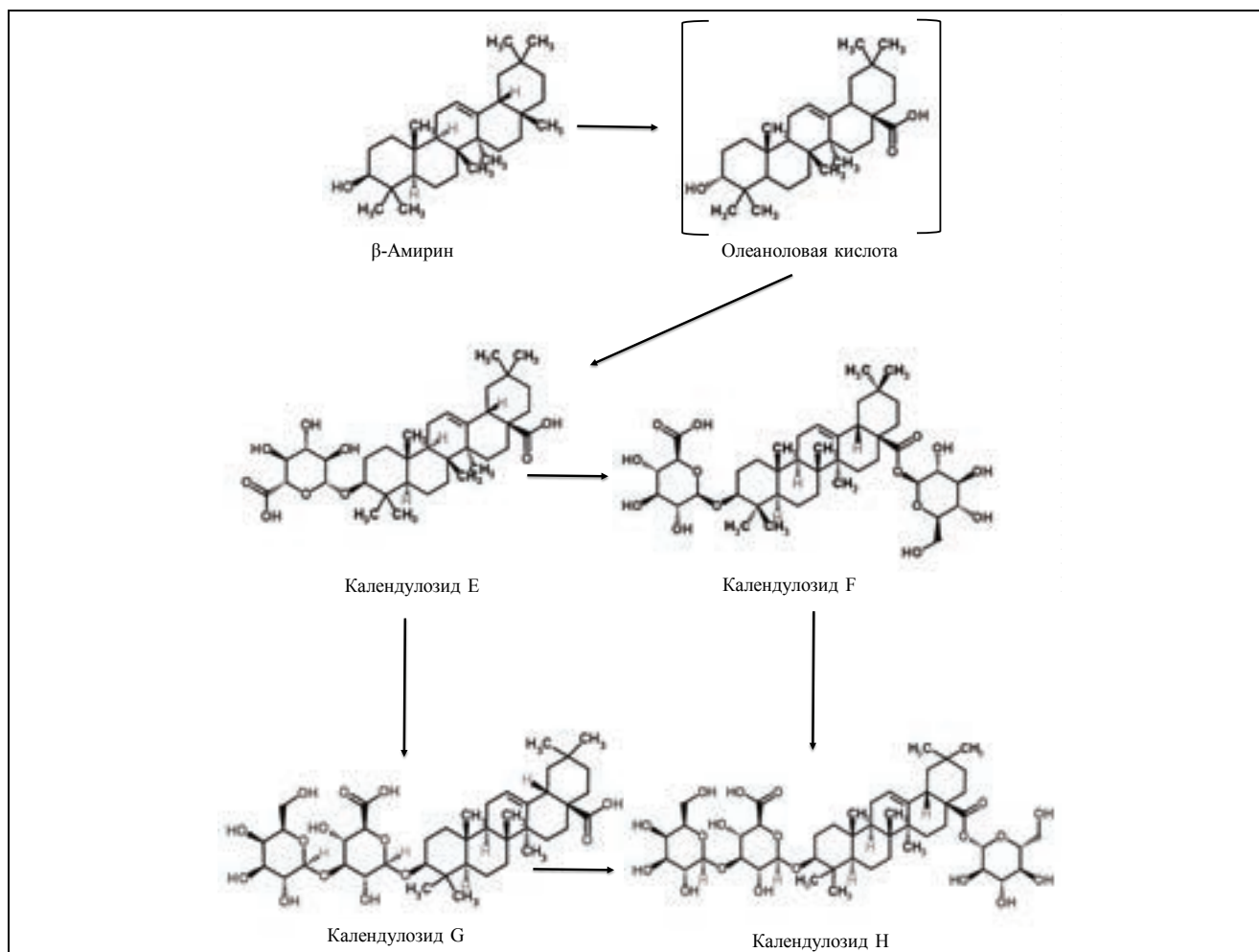


Рис. 4. Структура β-амирина, олеаноловой кислоты и тритерпеноидов, идентифицированных в цветках календулы лекарственной методами ГХ-МС и УЭЖХ-МС. Стрелками показаны вероятные пути образования календулозидов

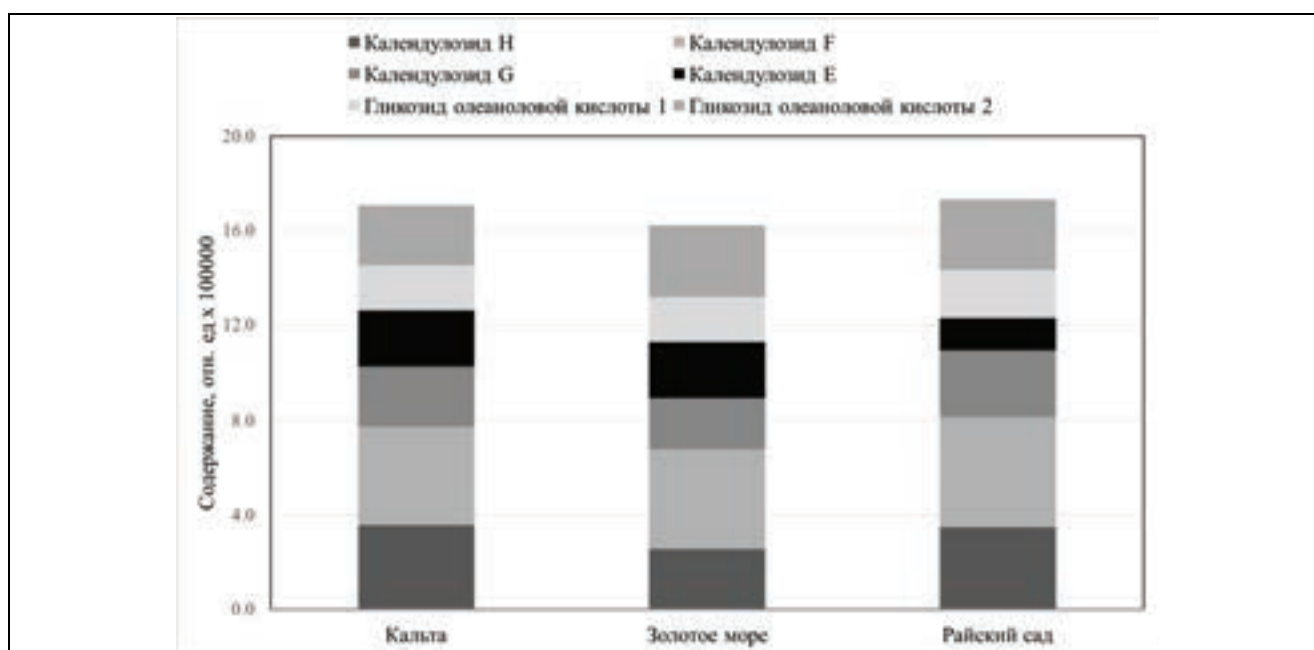


Рис. 5. Содержание календулозидов H, F, G, E и двух гликозидов олеаноловой кислоты в цветках сортов календулы лекарственной

При определении общего содержания тритерпеноидов в цветках календулы лекарственной, как суммы содержания индивидуальных соединений, видимых различий между сортами Кальта, Золотое море и Райский сад не обнаружено (рис. 5). Относительное содержание некоторых индивидуальных тритерпеноидов незначительно варьирует в зависимости от сорта календулы лекарственной.

## ВЫВОДЫ

Применение комбинации двух хроматографических методов, ГХ-МС и УЭЖХ-МС, позволило идентифицировать в цветках календулы лекарственной один агликон – β-амирин, который является предшественником на пути синтеза олеаноловой кислоты, и четыре календулозида – Е, F, G и H. Кроме того, обнаружены два тритерпеноида, которые предварительно идентифицированы как гликозиды олеаноловой кислоты. Различий в содержании тритерпеноидов в цветках исследованных сортов календулы лекарственной не установлено.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Muley B., Khadabadi S., Banarase N. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2009. V. 8. № 5. P. 455–465.
2. Государственная фармакопея СССР. 1990. XI изд-е. Т. 2. М.: Медицина. 400 с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд-е. Т. 3. М. 2015. 1294 с.
4. Патент № 7532, № 8653683 (РФ). Ноготки лекарственные *Calendula officinalis* L. Сорт «Золотое море». / И.В. Басалева, А.Н. Бознякова, А.Е. Бурова, М.Ю. Грязнов, И.Н. Коротких, Р.Р. Костяновский, О.Н. Критуус, С.А. Тоцкая, Ф.М. Хазиева, А.В. Широкова.
5. Патент № 8651, № 8354701 (РФ). Ноготки лекарственные *Calendula officinalis* L. Сорт «Райский сад». / М.Ю. Грязнов, Т.Е. Саматадзе, Н.Ю. Свистунова, Ф.М. Хазиева, А.Н. Цицилин.
6. Хазиева Ф.М., Басалева И.В., Тоцкая С.А., Грязнов М.Ю., Сидельников Н.И., Бурова А.Е. Влияние химических мутагенов на *Calendula officinalis* L. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 4. С. 66–67.
7. Mahato S., Nandy A., Roy G. Triterpenoids // Phytochem. 1992. V. 31. № 1. P. 2199–2249.
8. Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives // J. Ethnopharmacol. 2005. V. 100. P. 92–94.
9. Szakiel A., Ruszkowski D., Janiszowska W. Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity // Phytochem. Rev. 2005. V. 4. P. 151–158.
10. Dlugosz M., Wiktorowska E., Wiśniewska A., Pączkowski C. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. // Acta Biochimica Polonica. 2013. V. 60. № 3. P. 467–473.
11. Pollier J., Goossens A. Oleanolic acid // Phytochem. 2012. V. 77. P. 10–15.
12. Ossipov V., Ossipova S., Bykov V., Oksanen E., Koricheva J., Haukioja, E. Application of metabolomics to genotype and phenotype discrimination of birch trees grown in a long-term open-field experiment // Metabolomics. 2008. V. 4. P. 39–51.
13. Schauer N., Steinhauser D., Strelkov S., Schomburg D., Allison G., Moritz T., Lundgren K., Roessner-Tunali U., Forbes M., Willmitzer L., Fernie A.R., Kopka J. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples // FEBS Letters. 2005. V. 259. P. 1332–1337.
14. Vidal-Ollivier E., Balansard G. Revised structures of triterpenoidsaponins from the flowers of *Calendula officinalis* // J. Nat. Prod. 1989. V. 52. № 5. P. 1156–1159.

Поступила 18 апреля 2018 г.

## TRITERPENOIDS OF CALENDULA OFFICINALIS FLOWERS

© Authors, 2018

### V.I. Ossipov

Dr.Sc. (Biol.), Chief Research Scientist, Laboratory of Metabolomics, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow); Joint Russian-Finnish Biotechnology Laboratory (JBL) and Natural Compounds Research Group, Department of Chemistry, University of Turku (Turku, Finland)  
E-mail: ossipov@utu.fi

### V.A. Bykov

Dr.Sc.(Tech.), Academician of RAS, Chief Research Scientist, Laboratory of Metabolomics, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow); Joint Russian-Finnish Biotechnology Laboratory (JBL) and Natural Compounds Research Group, Department of Chemistry, University of Turku (Turku, Finland)

### F.M. Hazieva

Ph.D. (Biol.), Head of Department of Agrobiological and Breeding, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

### N.I. Sidel'nikov

Dr.Sc.(Agricul.), Corresponding Member of RAS, Director, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The medicinal properties of *Calendula officinalis* plants are due to the content of various secondary metabolites. The most important among them are triterpenoids, which are mainly glycosides of oleanolic acid. The purpose of the work was to adapt the gas-liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography in combination with mass-spectrometric detection methods (GC-MS and UPLC-MS) to study the composition of triterpenoids in flowers of three varieties of *Calendula officinalis*: "Calta", "Golden Sea" and "Garden of Eden". As a result, there were found four calendulosides (H, G, F and E), two not identified oleanolic acid glycosides and aglycone  $\beta$ -amyrin, which is a precursor in the biosynthesis of oleanolic acid. Differences in the composition and total content of triterpenoids in the flowers of the studied varieties were not established.

**Key words:** *Calendula officinalis*, flowers, triterpenoids, GC-MS, UPLC-MS.

**For citation:** Ossipov V.I., Bykov V.A., Haziyeva F.M., Sidel'nikov N.I. Triterpenoids of *Calendula officinalis* flowers. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(6):3-9. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-06-01>

## REFERENCES

1. Muley B., Khadabadi S., Banarase N. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2009. V. 8. № 5. P. 455–465.
2. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. XI izd-e. T. 2. M.: Medicina. 1990.400 s.
3. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. XIII izd-e. T.3. M. 2015. 1294 s.
4. Patent № 7532, № 8653683 (RF). *Calendula officinalis* L. Sort «Zolotoe more». / Basalaeva I.V., Boznyakova A.N., Burova A.E., Gryaznov M.YU., Kostyanovskij R.R., Korotkih I.N., Kritius O.N., Sidel'nikov N.I., Tockaya S.A., Haziyeva F.M., Shirokova A.V.
5. Patent № 8651, № 8354701 (RF). *Calendula officinalis* L. Sort «Rajskij sad». / Gryaznov M.U., Samatadze T.E., Svistunova N.U., Haziyeva, F.M., Cicilin A.N.
6. Haziyeva, F.M., Basalaeva, I.V., Totskaya S.A., Gryaznov M.U., Sidel'nikov N.I., Burova A.E. The effects of chemical mutagen on *Calendula officinalis* L. // Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii. 2014. № 4. S. 66–67.
7. Mahato S., Nandy A., Roy, G. Triterpenoids // Phytochem. 1992. V. 31. № 1. P. 2199–2249.
8. Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives // J. Ethnopharmacol. 2005. V. 100. P. 92–94.
9. Szakiel A., Ruszkowski D., Janiszowska W. Saponins in *Calendula officinalis* L. — structure, biosynthesis, transport and biological activity // Phytochem. Rev. 2005. V. 4. P. 151–158.
10. Długosz M., Wiktorowska E., Wiśniewska A., Pączkowski C. Production of oleanolic acid glycosides by hairy root established cultures of *Calendula officinalis* L. // Acta Biochimica Polonica. 2013. V. 60. № 3. P. 467–473.
11. Pollier J., Goossens A. Oleanolic acid // Phytochem. 2012. V. 77. P. 10–15.
12. Ossipov V., Ossipova S., Bykov V., Oksanen E., Koricheva J., Haukioja E. Application of metabolomics to genotype and phenotype discrimination of birch trees grown in a long-term open-field experiment // Metabolomics. 2008. V. 4. P. 39–51.
13. Schauer N., Steinhäuser D., Strelkov S., Schomburg D., Allison G., Moritz T., Lundgren K., Roessner-Tunali U., Forbes M., Willmitzer L., Fernie A.R., Kopka J. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples // FEBS Letters. 2005. V. 259. P. 1332–1337.
14. Vidal-Ollivier E., Balansard G. Revised structures of triterpenoidsaponins from the flowers of *Calendula officinalis* // J. Nat. Prod. 1989. V. 52. № 5. P. 1156–1159.