

**П.В. АФАНАСЬЕВА, А.В. КУРКИНА**

Самарский государственный медицинский университет

# **ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ**

В статье изложено обоснование новых подходов к анализу сырья и препаратов календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) с помощью комплекса методов ТСХ-анализа, спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Обнаружение нарциссина как доминирующего и биологически активного флавоноида имеет диагностическое значение, что является целесообразным для целей стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной. Для объективной оценки качества были разработаны методики, позволяющие анализировать сырье и фитопрепараты на содержание основных групп биологически активных веществ – флавоноидов.

**Ключевые слова:** календула лекарственная, *Calendula officinalis* L., лекарственное растительное сырье, цветки календулы, настойка, экстракт, флавоноиды, рутин, нарциссин

**Афанасьева Полина Валерьевна** - очный аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: appolinarija03@mail.ru

**Куркина Анна Владимировна** - доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: kurkina-av@yandex.ru

**P.V. AFANASYEVA, A.V. KURKINA**

Samara State Medical University

## **FOUNDATION FOR APPROACHES TO THE PHARMACEUTICAL ANALYSIS OF HERBAL MATERIALS AND PHYTOCHEMICALS OF CALENDULA OFFICINALIS**

The article described foundation for new approaches to the analysis of herbal materials and preparations of *Calendula officinalis* L. by use of complex methods such as the TLC analysis, spectrophotometric and high performance liquid chromatography (HPLC). Discovery of narcissin as a dominant and active flavonoid has diagnostic value that is beneficial for the purpose of standardization of herbal materials and phytopharmaceuticals of *Calendula officinalis* L. For the purpose of objective quality evaluation of herbal materials and phytochemicals new methods were developed that allow analysis of the main groups of biologically active substances - flavonoids.

**Key words:** pot marigold, *Calendula officinalis* L., herbal materials, pot marigold's flowers, tincture, extract, flavonoids, rutin, narcissin.

**Polina Afanasyeva** - postgraduate student at the Department of pharmacognosy with botany and basis of phytotherapy. E-mail: appolinarija03@mail.ru

**Anna Kurkina** - doctor of Pharmacy, Associate Professor of Pharmacognosy with Botany and basis of Phytotherapy Department. E-mail: kurkina-av@yandex.ru

Одним из интересных с точки зрения научных исследований и перспективных для фармацевтического производства лекарственных растений является календула лекарственная (ноготки) (*Calendula officinalis* L.). Цветки ноготков являются официальным лекарственным растительным сырьем (ЛРС) для получения широко используемых в медицине противовоспалительных лекарственных средств. В отечественной и европейской медицине цветки календулы применяются также в качестве лекарственных средств («Настойка кален-

дулы», «Ротокан», «Фитогепатол», мазь «Календула», «Свечи с календулой»), обладающих регенерирующей, желчегонной, отхаркивающей активностью, что обусловлено содержанием каротиноидов, флавоноидов и сапонинов как важнейших групп биологически активных веществ (БАВ) [3].

Нормативная документация на сырье календулы представлена в Государственной фармакопее СССР XI издания, Государственной фармакопее Республики Казахстан, Европейской фармакопее, Британской фармакопее [1, 2, 9, 10]. Кро-

ме того, растение входит в Немецкую гомеопатическую фармакопею и во Французскую гомеопатическую фармакопею [11, 12].

Однако, несмотря на имеющийся мировой опыт применения сырья и фитопрепаратов ноготков, проблема стандартизации остается одним из самых острых вопросов [6, 7]. В этой связи необходимо совершенствовать методики анализа на сырье и фитопрепараты календулы лекарственной с учетом современных требований к фармацевтическому анализу.

На наш взгляд, объективный подход к стандартизации цветков календулы должен включать в себя анализ сырья и фитопрепаратов на содержание основных групп биологически активных веществ (БАВ).

**Цель исследования:** научное обоснование подходов к стандартизации цветков календулы лекарственной и препаратов на основе данного сырья методом ТСХ, спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

#### Материалы и методы

Объектами исследования являлись цветки календулы лекарственной, предоставленные Средне-Волжским филиалом ФГБНУ ВИЛАР (урожай 2015 г.), а также препараты, разработанные на базе кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: настойка календулы (1:5) на 70-процентном этиловом спирте, жидкий экстракт календулы (1:2) на 70-процентном этиловом спирте, жидкий экстракт календулы (1:2) на 40-процентном этиловом спирте.

В работе были использованы тонкослойная хроматография (ТСХ), спектрофотометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Воздушно-сухое растительное сырье подвергали исчерпывающему экстрагированию 40- и 70-процентным спиртом этиловым. Настойка календулы (1:5) получена методом модифицированной ремацерации. Жидкий экстракт календулы (1:2) получен методом реперколяции по Чулкову. Анализ полученных водно-спиртовых извлечений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ-метанол-вода (26:14:3). Использовались стандартные образцы нарциссина (3-О-рутинозид изорамнетина), рутина (3-О-рутинозид кверцетина), кверцетина, изокверцитрина и астрагалина. ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе «Biotronic».

#### Результаты исследования

В рамках исследования цветков календулы методом ТСХ обнаруживается доминирующее и диагностическое вещество - нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина) с  $R_f$  около 0,45, а также вещество с  $R_f$  около 0,6, соответствующий изокверцитрин. Нарциссин как диагностическое вещество было впервые выделено отечественными учеными, его химическое строение было установлено с помощью методов  $^1\text{H}$ -ЯМР и масс-спектрометрии [5, 8].

В нормативной документации Европы и других стран используется ошибочный подход к анализу календулы лекарственной [9, 10]. Возможная причина заключается в том, что нарциссин и рутин имеют сопоставимую подвижность и близкие значения  $R_f$  – около 0,45 и около 0,4 соответственно. В этой связи для большей достоверности нами предложено использовать показатель соотношения стандартов – показатель  $R_s$  (Ration of standards). Нарциссин по отношению к пикну ГСО рутина имеет значение  $R_s$  около 1,1.

Результаты сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений образцов цветков календулы лекарственной свидетельствуют о том, что для всех образцов сырья характерны максимумы поглощения при  $\lambda_{\text{max}}$   $260 \pm 2$  нм (флавоноиды) и области 330-350 нм (флавоноиды и гидроксикоричные кислоты). Кроме того, для раствора извлечения в присутствии  $\text{AlCl}_3$  наблюдается bathochromный сдвиг в области 408 нм  $\pm 2$  нм, характерный для флавонолов с гликозилированной 3-ОН-группой. Важно отметить, что нарциссин и рутин, являющиеся 3-О-рутинозидами изорамнетина и кверцетина соответственно, близки по своим спектральным характеристикам – по коротковолновому и длинноволновому максимуму поглощения (около 258 нм и 360 нм). Это нашло подтверждение в условиях дифференциальной спектрофотометрии: максимум поглощения в области 408-412 нм, что позволяет рекомендовать в качестве аналитической длины волны значение 412 нм. Данное обстоятельство позволило использовать спектрофотометрию для количественного определения флавоноидов в пересчете на ГСО рутина.

Также нами была усовершенствована методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье календулы, а также обосновано использование данного показателя в таких препаратах, как настойка (1:5) и жидкий экстракт (1:2).

При разработке методик количественного анализа за основу была взята ранее предложенная методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной [4]. Нами была оптимизирована методика получения раствора рутин-стандартного образца с использованием 70-процентного этилового спирта и навески оптимальной массы. В случае отсутствия стандарта, а также для упрощения расчетов предлагается использовать рассчитанный удельный показатель поглощения. Определено, что для рутин-значения удельного показателя поглощения составляет 240.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 412 нм через 40 мин после приготовления всех растворов. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{D * 30 * 25 * 100}{240 * m * 1 * (100 - W)},$$

где D - оптическая плотность испытуемого раствора;

m - навеска сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %;

240 - удельный показатель поглощения  $E_{1\%}^{1\text{см}}$  рутин при длине волны 412 нм.

Важно отметить, что в проекте ФС на цветки календулы формулируется некорректный подход в отношении приготовления раствора ГСО рутин, а именно использование 96-процентного спирта этилового для растворения навески вещества. Считаем целесообразным применение 70-процентного спирта этилового при нагревании для получения раствора рутин-стандартного образца.

В результате было определено, что содержание суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной составило 1,82%; содержание суммы флавоноидов в настойке (1:5) - 0,22%; в жидком экстракте (1:2) на этиловом спирте 40 % - 0,27%; в жидком экстракте (1:2) на этиловом спирте 70% - 0,42%.

Современный фармакопейный анализ предполагает использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который позволяет одновременно осуществлять качественный и количественный анализ ЛРС. На наш взгляд, в условиях ВЭЖХ в качестве маркера может выступать доминирующий флавоноид нарциссин. Результаты ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том,

что в исследуемых условиях хроматографирования нарциссин хорошо отделяется от других компонентов цветков календулы лекарственной, что позволяет рекомендовать данный метод как для целей идентификации сырья ноготков, так и для целей стандартизации препаратов на основе сырья данного растения.

Было определено, что содержание доминирующего соединения (нарцисина) в извлечении цветков календулы лекарственной, установленное методом ВЭЖХ, варьируется от  $0,57 \pm 0,02\%$  до  $0,72 \pm 0,03\%$ . В данных условиях в анализируемом извлечении также отмечается наличие флавоноида рутин в достаточном количестве (его содержание составляет  $0,21\% \pm 0,01\%$ ). Кроме того, в минорных количествах обнаруживается изокверцитрин ( $0,06\% \pm 0,002\%$ ) и кверцетин ( $0,04\% \pm 0,001\%$ ).

Таким образом, в ходе исследования разработана методика количественного определения доминирующего флавоноида нарцисина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Содержание нарцисина в цветках календулы, установленное с использованием данной методики, варьируется от  $0,57 \pm 0,02\%$  до  $0,72 \pm 0,03\%$ .

Учитывая специфичность нарцисина для цветков календулы лекарственной, считаем целесообразным использование метода ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение.

### Заключение

Таким образом, разработаны новые подходы к стандартизации цветков календулы лекарственной, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ. По результатам проведенного исследования цветков календулы лекарственной были оптимизированы методики количественного анализа по содержанию суммы флавоноидов в цветках ноготков, а также в лекарственных препаратах, полученных из данного сырья. Учитывая специфичность нарцисина для цветков календулы лекарственной, представляется целесообразным использование метода ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение.

### Список литературы

1. Государственная Фармакопея Республики Казахстан: Т. 2. – 1-е издание. – Алматы: издательский дом «Жибек жолы», 2009. - С. 704-705.

2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 237-238 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия. Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
4. Куркин В.А., Шарова О.В. Разработка методик стандартизации цветков ноготков // Фармация. - 2007. - № 8. – С. 11-13.
5. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis* // Химия природных соединений. – 2007. - № 2. - С. 179-180.
6. Куркин В.А., Шарова О.В., Афанасьева П.В., Вельмисева Л.Е., Федоров А.В. Перспективы создания высокопродуктивной сырьевой базы календулы лекарственной // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2012. – Т. 14. – № 1 (9). – С. 2249-2252.
7. Шарова О.В. Фитохимическое исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе календулы лекарственной: Автореф. дис. канд. фармац. наук. – Самара, 2007. – 24 с.
8. Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растительного сырья. – 2007. - № 1. – С. 65-68.
9. British Pharmacopoeia, 6.0, Vol. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. - 2009. – P. 6813-6816.
10. European Pharmacopoeia, 6.0, 2008, «Herbal drugs».
11. Francaise homeopathique pharmacopoe, X<sup>e</sup> edition. – Paris. - 1989. – P. 75-76.
12. German Homoeopathic Pharmacopoeia (GHP): Deutscher apotheker Verlag. - Stuttgart. - 1993. - P. 155-156.