

УДК 615.322:547.9

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФИТОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

© 2015 П.В. Афанасьева, В. А. Куркин, А.В. Куркина

Самарский государственный медицинский университет

Статья поступила в редакцию 20.11.2015

Проведено фитохимическое исследование по определению содержания суммы каротиноидов в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) сорта «Кальта», культивируемой в Самарской области, а также в настойке на основе данного сырья. В результате проведенных исследований установлено, что содержание суммы каротиноидов в цветках ноготков в пересчете на β -каротин варьирует от 33,50 до 63,10 мг% \pm 3,57%.

Ключевые слова: календула лекарственная (ноготки), *Calendula officinalis* L., цветки, настойка, каротиноиды, β -каротин, стандартизация, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр фармакологического действия цветков календулы (*Calendulae flores*) обусловлен содержанием таких важнейших биологически активных соединений как каротиноиды, флавоноиды, сапонины и полисахариды [8]. Препараты цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) обладают антимикробным, противовоспалительным, регенерирующим, отхаркивающим, желчегонным, противоязвенным, иммуномодулирующим свойствами. На наш взгляд, оптимальный подход к стандартизации любого вида лекарственного растительного сырья (ЛРС) должен включать в себя анализ на содержание ведущей группы биологически активных веществ (БАВ) [8]. В контексте цветков календулы это означает, что помимо контролирования сырья на содержание основных групп веществ – флавоноидов и сапонинов необходимо определять в растении нестабильные с точки зрения физико-химических свойств соединения – каротиноиды, которые можно назвать ведущей группой веществ. В цветках ноготков каротиноиды являются диагностическими и действующими компонентами [7]. В сырье календулы содержатся до 3 % различных каротиноидов: β -каротин, γ -каротин, δ -каротин, ликопин, неуроспорин, фитоен, фитолуин, рубиксантин, ксантофил (лютеин), зеаксантин, виолоксантин, флавохром, цитроксантин (мутатоксид), флавоксантин, хризантемаксантин.

При этом наибольшую биологическую активность из них проявляет β -каротин [3, 10].

Наше представление о вкладе биологически активных веществ в суммарное терапевтическое действие растения, а также о важности каротиноидов подтверждается многочисленными публикациями исследователей относительно ключевой группы веществ данного растения – каротиноидов [4, 10, 12-14, 16, 18]. Учеными неоднократно изучалась корреляция между окраской цветков растения и содержанием каротиноидов, при этом рассматривались различные селекционные формы, а также отечественные и зарубежные сорта растения [1, 12, 13]. Обнаружено, например, что в рамках данной зависимости – содержания каротиноидов от окраски язычковых цветков – в сортах календулы с темно-оранжевыми цветками веществ почти в 10 раз больше, чем в желтых [12].

По литературным данным было также выявлено, что содержание каротиноидов в соцветиях также варьирует в зависимости от погодных условий и продолжительности фазы цветения. В процессе хранения содержание каротиноидов снижается по причине неустойчивости при воздействии влаги и света. Так, например, через 4 месяца после сбора цветков их становится приблизительно в 6 раз меньше, чем было в свежесобранном материале [5].

Однако, несмотря на пристальное внимание ученых к проблемам стандартизации сырья и фитопрепаратов на основе календулы, до сих пор наблюдается очевидная противоречивость и явная неточность в подходах к фармакогностическому исследованию растения [9, 10, 13, 15]. Само сырье – цветки ноготков в действующих стандартах качества (ГФ СССР XI издания, ВФС 42-1738-87 и Изменение № 2 от 20.05.1997 г.) стандартизируется по внешним и анатомо-диагностическим признакам, по содержанию влаги, золы, примесей, а также по количественному содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых 70%-м этиловым спиртом [2].

Афанасьева Полина Валериевна, очный аспирант 2-го года кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: polafanasyeva@rambler.ru

Куркин Владимир Александрович, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии.

E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

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

Внимательное рассмотрение нормативных документов и фармакопей других стран позволяет увидеть те же аналитические проблемы. Обнаружено, что требования в Европейской и Британской фармакопеях к сырью полностью совпадают [12, 14]. Идентификацию воздушно-сухого сырья проводят по внешним признакам сырья, а также методом микроскопии с использованием раствора хлоралгидрата. Для качественного анализа используется тонкослойная хроматография (ТСХ) при 365 нм, с использованием ГСО рутина, что, на наш взгляд, является ошибочным подходом, так как по нашим данным в цветках данного растения доминирующим флавоноидом является нарциссин [9]. Для количественной характеристики используется содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид (не менее 0,4%) [12, 14]. Данный флавоноид, как известно, не является специфическим веществом для цветков ноготков по данным отечественных ученых [9].

В отношении препаратов календулы («Настойка календулы») была разработана методика спектрофотометрического количественного определения суммы каротиноидов по β -каротину (ФС 42-1730-95) [12]. Определение проводится по собственному поглощению в видимой области спектра при 450 нм после предварительного разделения настойки на колонке с оксидом алюминия. Количественное содержание каротиноидов в настойке составило около 0,0017%, тогда как в исходном сырье – 0,5% [5].

Однако рассмотренные методики не в полной мере соответствуют современным представлениям о химической природе биологически активных соединений цветков календулы лекарственной.

Цель данной работы – совершенствование методики стандартизации суммы каротиноидов в цветках календулы лекарственной.

Материалы и методы: Объектом исследования служили цветки календулы лекарственной (сорт «Кальта»), собранные в Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР (урожай 2013-2015 г.), а также настойка календулы лекарственной (1:5), разработанная на базе кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. В качестве образца сравнения использовалось облепиховое масло. В качестве метода исследования использовалась спектрофотометрия. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве растворителей для экстрагирования суммы каротиноидов из календулы лекарственной были использованы такие органические растворители, как гексан, хлороформ и ацетон. Были исследованы и определены такие параметры, как время экстрагирования, время экстракции и т.д. Определено, что оптимальными параметрами являются: экстрагент – гексан, соотношение сырье: экстрагент (1:30), время экстрагирования 2 часа при комнатной температуре, при периодическом перемешивании.

Результаты сравнительного исследования электронных спектров гексановых извлечений образцов цветков календулы лекарственной свидетельствуют о том, что для всех образцов сырья характерен максимум поглощения при $\lambda_{\max} = 450 \pm 2$ нм (рис. 1). В качестве удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм использовалось значение равное 2773 [11].

Интересно, что спектры поглощения гексанового извлечения цветков календулы и гексанового раствора облепихового масла имеют сходные

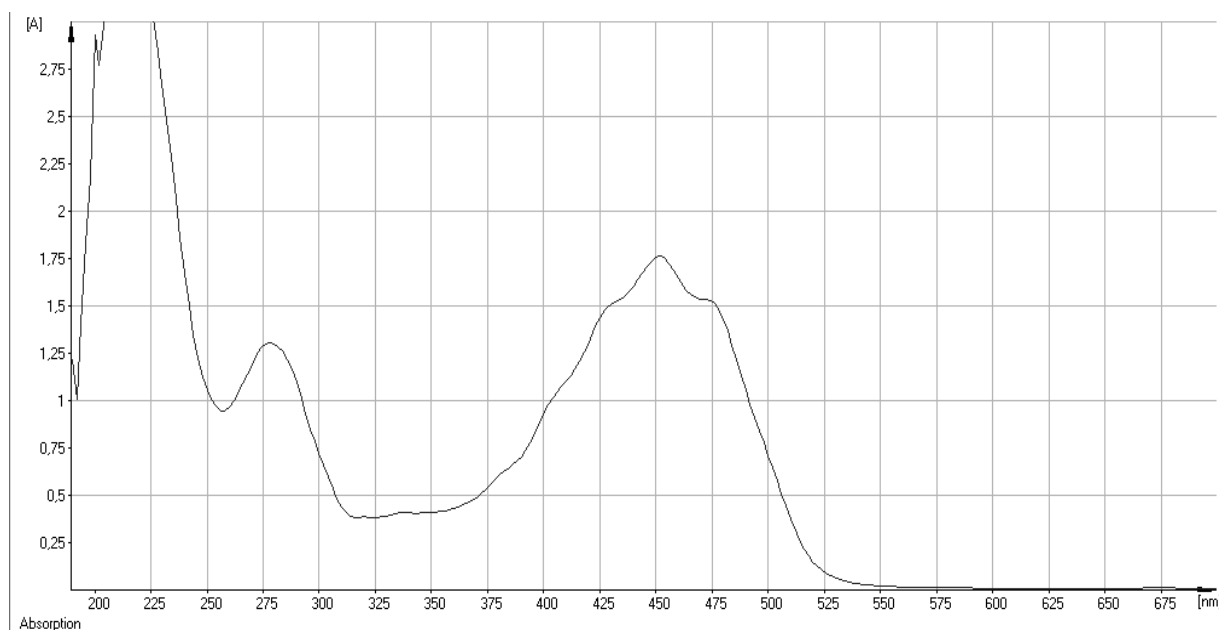


Рис. 1. Электронный спектр цветков календулы лекарственной

характеристики, что позволяет использовать данный препарат в качестве стандарта (рис. 2).

Результаты исследования показали, что содержание каротиноидов в цветках календулы сорт «Кальта», культивируемых в Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР (урожай 2013-2015 г.) варьирует от 33,50 мг% до 63,10 мг%, что свидетельствует о высоком качестве данного сырья и позволяет использовать для промышленного получения препаратов календулы.

Методика количественного определения содержания суммы каротиноидов в сырье календулы. Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл гексана, колбу закрывают пробкой и осуществляют экстракцию при периодическом перемешивании в течение 2 часов. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная полоса»). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 2 мл гексанового извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем гексаном до метки и перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют

по формуле:

$$X = \frac{D \times 30 \times 25 \times 100 \times 1000}{2773 \times m \times 2 \times (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

2773 – удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$

β -каротина при длине волны 450 нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы каротиноидов в цветках календулы лекарственной представлены в таблице 1.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы каротиноидов в цветках календулы лекарственной с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,57\%$.

В рамках оптимизации подходов к стандартизации сырья и препаратов на основе календулы лекарственной нами была рассмотрена возможность создания лекарственного средства «Календулы настойка». На наш взгляд, для существующего на сегодняшний день на фармацевтическом рынке лекарственного препарата «Настойка календулы» (1:10) применяется неоправданное разведение при промышленном получении лекарственной формы. В этой связи нами было предложено классическое соотношение (1:5) для

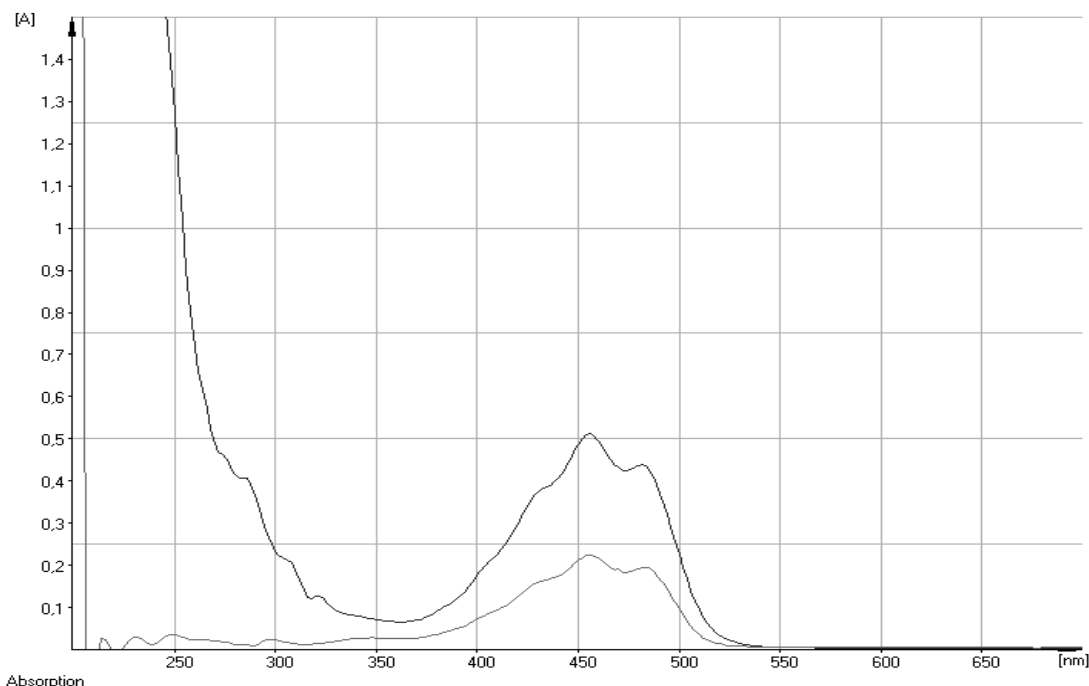


Рис. 2. Электронный спектр цветков календулы лекарственной и облепихового масла

Таблица 1. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы каротиноидов в цветках календулы лекарственной

| <i>f</i> | \bar{X} | <i>S</i> | <i>P</i> , % | <i>t</i> (<i>P</i> , <i>f</i>) | ΔX | <i>E</i> , % |
|----------|-----------|----------|--------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| 10 | 63, 10 | 0,9686 | 95 | 2, 23 | $\pm 2, 16$ | $\pm 3,57$ |

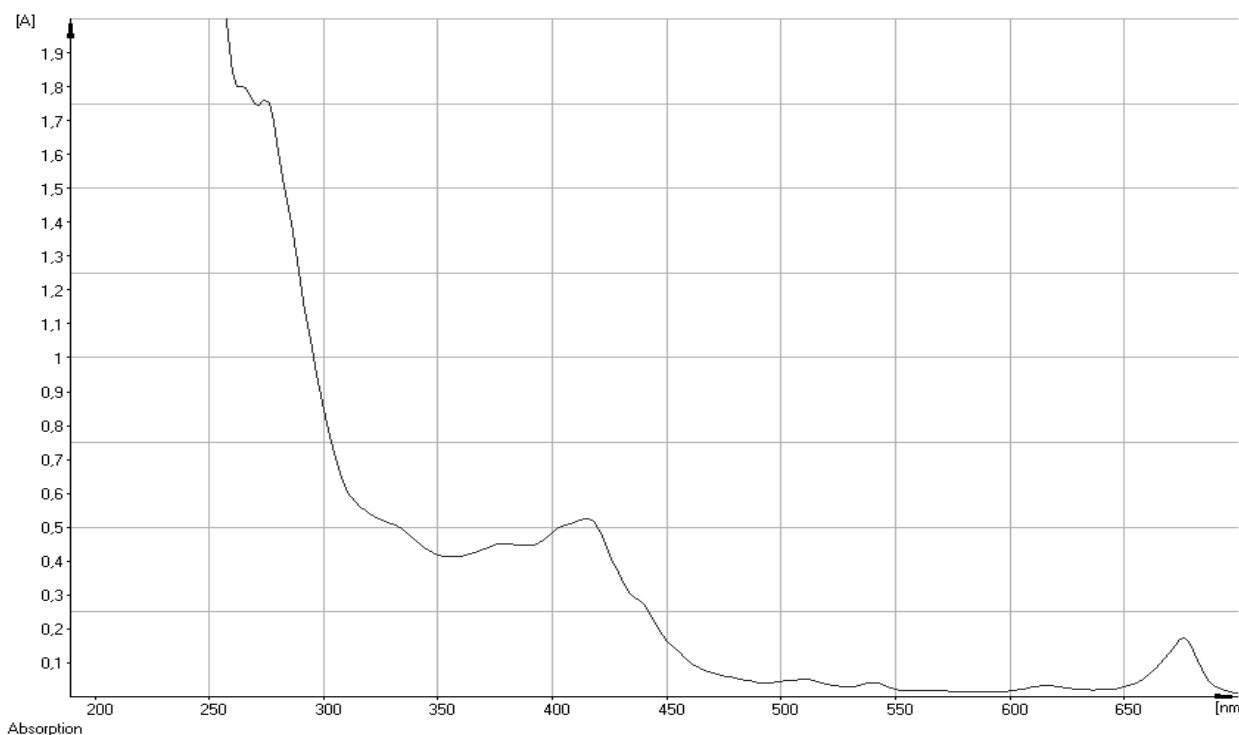


Рис. 3. Электронный спектр настойки календулы (1:5)

настойки на основе цветков календулы. Настойка из данного вида ЛРС была получена методом модифицированной ремацерации. Кроме того, была изучена возможность анализа фитопрепарата на содержание каротиноидов.

Спектрофотометрический анализ проводили следующим образом. 5 мл настойки (1:5) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, трехкратно по 10, 10 и 5 мл производят извлечение каротиноидов гексаном в мерную колбу объемом 25 мл, доводят гексаном до метки. 2 мл гексанового извлечения количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем гексаном до метки и перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25 \times 1000}{2773 \times V \times 2},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
V – объем настойки, мл;

2773 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

При анализе настойки был выявлен максимум поглощения, который не соответствует таковому для раствора гексанового извлечения цветков календулы лекарственной (рис. 3).

Видимо, это связано с тем обстоятельством, что при получении настойки календулы 70% этиловый спирт не позволяет исчерпывающе извлекать каротиноиды, в особенности β -каротин.

Вопрос относительно целесообразности стандартизации настойки календулы по содержанию суммы каротиноидов требует проведения дополнительных исследований, в том числе обоснования пробоподготовки гексанового извлечения из данного препарата.

ВЫВОДЫ

Обосновано целесообразность стандартизации цветков календулы не только по флавоноидам и сапонидам, но и по сумме каротиноидов.

Таким образом, в результате исследований была разработана методика определения содержания каротиноидов в цветках календулы для сорта «Кальта», культивируемого в Самарской области. Содержание суммы каротиноидов в цветках ноготков варьирует от 33,50 до 63,10 мг% $\pm 3,57\%$.

Предложенный подход по анализу сырья и препаратов на содержание ведущей и второй основной группы действующих веществ позволит объективно реализовать принцип гармонизации в ряду «лекарственное растительное сырье – лекарственный препарат».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.Г. Локализация и содержание каротиноидов в высокопродуктивных формах *Calendula officinalis* L. // Аптечное дело. 1961. Т. 10, № 3. С. 46-49.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. С. 237-238.

3. Дайнека В.И., Гостищев И.А., Третьяков М.Ю., Индина И.В. Каротиноиды лепестков цветков календулы // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2011. Т. 15. № 9-2 (104). С. 277–285.
4. Ивасенко С.А., Прибыткова Л.Н., Аденов С.М. Содержание каротиноидов и флавоноидов в соцветиях некоторых сортов *Calendula officinalis* L. // Растительные ресурсы, 2000. Т. 36. Вып. 2. С.107-110.
5. Исмаилов Р.Р., Костылев Д.А. Календула // Уфа: БГАУ, 2000. 102 с.
6. Кащенко Н.И. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): дис. ... канд. фармац. наук. Улан-Удэ, 2014. 223 с.
7. Куркин В.А., Шарова О.В., Афанасьева П.В., Вельмисева Л.Е., Федоров А.Ф. Перспективы создания высокопродуктивной сырьевой базы календулы лекарственной // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 1 (9). С. 2249–2252.
8. Куркин В.А. Фармакогнозия. Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. – 1239 с.
9. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis* // Химия природных соединений. 2007. № 2. С. 179–180.
10. Мовчан С.Д. К исследованию каротиноидных пигментов из лепестков *Calendula officinalis* // Журнал прикладной химии. 1960. Т. 33, № 2. С. 484–486.
11. Первушкин С.В., Маркова И.И., Куркин В.А., Желонкин Н.Н. Разработка методик количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*Spirulina platensis*) // Фундаментальные исследования. 2013. № 8–6. С. 1426–1429.
12. Сампиев А.М., Хочава М.Р. Календула лекарственная. – Краснодар: Советская Кубань, 2010. 144 с.
13. Adela Pinteа, Constantin Bele, Sanda Andrei, Carmen Socaciu. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flores // Acta Biologica Szegediensis. – 2003. Vol. 47. P. 37–40.
14. Bako Eszter, Deli Jozsef, Gyula Toth. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products // J. Biochem.Biophys.Methods. 2002. No 53. P. 241–250.
15. British Pharmacopea, 6.0, Vol. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. 2009. P. 6813–6816.
16. Godwin T.W. Studies in carotene genesis. The carotenoids of flower petals of *Calendula officinalis* // Biochem. J. 1954. Vol. 58, No 1. P. 90–94.
17. European Pharmacopea, 6.0, 2008, «Herbal drugs».
18. Kishimoto S. et al. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.) // Bioscience, biotechnology and biochemistry. 2005. Vol. 69. No 11. P. 2122–2128.

OPTIMIZATION OF THE APPROACHES TO THE STANDARDIZATION OF PHYTOPREPARATIONS BASED ON CALENDULA OFFICINALIS

© 2015 P.V. Afanasyeva, V.A. Kurkin, A.V. Kurkina

Samara State Medical University

A phytochemical research for the determination of total content of carotenoids in the flowers of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) varieties of “Kalta” cultivated in the Samara region was carried out. The tincture based on these herbal materials was also investigated in this way. The analysis found out that the total content of carotenoids calculated on β-carotene in the flowers of calendula varies from 33.50 to 63,10mg% ± 3,56%.

Key words: pot marigold, *Calendula officinalis* L., flowers, tincture, carotenoids, β-carotene, standardization, spectrometry.

Polina Afanasyeva, Postgraduate Student, Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: polafanasyeva@rambler.ru

Vladimir Kurkin, Doctor of Pharmacy, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Anna Kurkina, Doctor of Pharmacy, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy. E-mail: kurkina-av@yandex.ru