

## ИЗУЧЕНИЕ ПЛОДОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Орловская Т.В.<sup>1</sup>, Ушакова Л.С.<sup>1</sup>, Маринина Т.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, г. Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

Целью данной работы является изучение морфолого-анатомических признаков, биологически активных соединений и разработка технологии получения масляного экстракта из плодов календулы лекарственной. В результате изучения морфолого-анатомического строения выявлены основные диагностические признаки. Установлены товароведческие показатели сырья. Наибольшее количество экстрактивных веществ извлекалось ацетоном. В плодах календулы лекарственной обнаружены: каротиноиды, органические кислоты, белок, полисахариды, жирное масло и следовые количества алкалоидов. Количественное содержание отдельных групп БАС в плодах календулы лекарственной составило: белков  $25,73 \pm 0,64\%$  (в пересчете на альбумин) и полисахаридов –  $1,49 \pm 0,09\%$ . При выделении жирного масла петролейным эфиром его выход составил  $7,87 \pm 0,14\%$ , а хлороформом –  $11,016 \pm 0,019\%$ . Изучили жирнокислотный состав методом ГЖХ. При разработке технологии масляного экстракта установили оптимальный экстрагент, степень измельченности сырья, время экстракции. Данные проведенных исследований определяют перспективность дальнейшего изучения и рекомендации использования жирного масла плодов календулы лекарственной в качестве потенциального лекарственного средства.

Ключевые слова: календула лекарственная, плоды, полисахариды, каротиноиды, органические кислоты, белки, жирное масло, микроэлементы, масляный экстракт, ГЖХ, жирнокислотный состав.

## STUDY CALENDULA OFFICINALIS FRUITS FOR CREATION OF DRUGS

Orlovskaya T.V.<sup>1</sup>, Ushakova L.S.<sup>1</sup>, Marinina T.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute - branch of the SBEE HPE VolgSMU of Minzdrav of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina, 11), e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

The aim of this work is to study the morphological and anatomical features of biologically active compounds, and the development of technology for the oil extract from the fruit of *Calendula officinalis*. A study of morphological and anatomical structure identified key diagnostic features. Established merchandising performance materials. The largest number of extractives were extracted with acetone. Fruits *Calendula officinalis* detected: carotenoids, organic acids, proteins, polysaccharides, fatty oil and trace amounts of alkaloids. Quantification of individual groups of biologically active compound in the fruit *Calendula officinalis* was: protein  $25,73 \pm 0,64\%$  (calculated as albumin), and polysaccharides -  $1,49 \pm 0,09\%$ . When you select a fatty oil with petroleum ether its yield was  $7,87 \pm 0,14\%$ , and chloroform -  $11,016 \pm 0,019\%$ . Studied the fatty acid composition by GLC. With the development of technology installed oil extract optimum extraction agent, the degree of fineness of raw materials, the extraction time. These studies define the perspective of further study and recommendations concerning the use of fat oil fruits *Calendula officinalis* as a potential drug.

Key words: *Calendula officinalis*, fruits, polysaccharides, carotinoids, organic acids, proteins, fatty oil, minerals, oil extract, GLC, fatty acid composition.

**Введение.** В настоящее время актуальным остается вопрос о расширении номенклатуры отечественных препаратов, в том числе и на основе лекарственного растительного сырья. Как известно, из произрастающих на Земле высших растений лишь около 10-15% исследовано на наличие биологически активных веществ. Проводить скрининговые исследования остальных 85-90% видов нерационально, кроме того, такие исследования требуют серьезного вложения материальных средств. Поэтому первостепенное

значение приобретает анализ информации о растениях, уже накопленной в академической и народной медицине, и разработка системного подхода к ее оценке.

В последние годы наблюдается сокращение запасов, а зачастую и уничтожение многих ценных видов растений в связи с нерациональным отношением к сырьевому потенциалу нашей страны, а для производства фитопрепаратов необходимо наличие достаточной стабильной сырьевой базы, обеспечить которую в настоящее время могут только культивируемые растения.

Анализ литературных источников свидетельствует о наличии в маслах семейства Asteraceae значительного количества биологически активных веществ: жирных кислот, фосфолипидов, витаминов и др. Эти вещества обладают ранозаживляющими, противовоспалительными, антисептическими и другими свойствами.

Встречаются сведения об использовании масла из семян календулы при лечении язвы желудка, а также кожных ран. Известно, что нанесение масла семян календулы на раневую поверхность ускоряет сроки заживления, развитие эпителизации, т.е. обладает репаративной активностью. Французская фармакопея 1840 г. рекомендовала 5 препаратов из травы, листьев и семян календулы для лечения некоторых разновидностей рака [6].

В научно-практической медицине только цветки календулы лекарственной находят обширное применение в виде настоек, мазей, суммарных галеновых препаратов и др., имеющих широкий спектр фармакологической активности. На основе плодов календулы препаратов нет ввиду того, что они практически не изучены с химической точки зрения [4].

**Цель работы:** определить морфолого-анатомические признаки плодов календулы лекарственной; изучить сырье на присутствие БАС; разработать технологию получения лекарственной формы на основе жирного масла.

**Материал и методика.** Объектом наших исследований являются плоды (семянки) календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) из семейства астровых (Asteraceae) – однолетнего травянистого растения, заготовленные от культивируемых растений в Ставропольском крае.

Для морфолого-анатомических исследований были использованы живые и фиксированные (70% этанол + глицерин) образцы. При микроскопии использовали метод мацерации, т.е. просветления в растворе хлоралгидрата. Микропрепараты изучали с помощью микроскопа «Биолам». Микрофотографии были получены с помощью микроскопа «DM-111» фирмы *Motic* со встроенной цифровой камерой при увеличениях 40×, 100×, 400×, 1000× с разрешением 640x480 пикселей. Фотоснимки обрабатывали на компьютере с помощью программ *Adobe Photoshop CS* и *Corel DRAW X3*.

Определение числовых показателей проводили по методикам ГФ XI и ГФ XII [2; 4].

Качественное исследование на присутствие различных групп химических соединений проводили по схеме предварительного качественного определения биологически активных соединений в растительном сырье [4].

Содержание белка определяли по методу Лоури в модификации Миллера.

Количественное содержание полисахаридов определяли методом осаждения путем прибавления к концентрированным водным извлечениям трехкратных объемов спирта этилового 96%-ного [9].

Содержание макро- и микроэлементов определяли спектральным методом на кварцевом спектрографе ДФС-8 на базе испытательной лаборатории при ФГУП «Кавказгеолсъемка» (г. Ессентуки) по методике предприятия. Фотометрирование спектрограмм проводили с помощью атласа спектральных линий и спектров-стандартов. Метод основан на полном испарении аналитической навески из кратера угольного электрода в плазме электрической дуги переменного тока [7].

Для получения жирного масла использован метод исчерпывающей экстракции хлороформом в аппарате Сокслета, с последующим отгоном растворителя на роторно-испарительной установке при вакууме 0,8 атм. и температуре 60 °С (т.е. в условиях, исключающих окисление липидов) [8].

Органолептический анализ полученных образцов жирного масла осуществляли в соответствии с ОФС «Масла жирные» [3].

Растворимость жирных масел в воде, эфире, хлороформе, спирте этиловом определяли по методике, изложенной в статье «Растворимость» ГФ XII [2].

Разделение жирных кислот осуществляли методом ГЖХ в виде метиловых эфиров в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» ГФ XII изд. [2] и ГОСТ 30418-96 «Масла растительные» [1].

Полученное жирное масло 0,03 г переносили в колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл спирта метилового и 3 капли ацетилхлорида, затем нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Избыток спирта метилового отгоняли. Остаток растворяли в 0,2 мл гексана. В испаритель газового хроматографа с помощью микрошприца вводили 1 мкл испытуемого раствора.

Разделение компонентов проводили на газовом хроматографе «Цвет 500» с пламенно-ионизационным детектором. При этом использовали стальную колонку длиной 2,0 м с внутренним диаметром – 0,3 см, твердый носитель *Inerton super*, фракция 0,16-0,2 мм (Чехия), неподвижная фаза *Reoplex-400* в количестве 10% от массы твердого носителя.

Условия хроматографирования: температура термостата колонки – 180 °С, испарителя – 250 °С, термостата детектора – 250 °С. Скорость подачи газа – носителя (азота) – 30 мл/мин., водорода – 30 мл/мин, воздуха – 300 мл/мин.

Идентификацию жирных кислот проводили сравнением показаний времени удерживания исследуемых кислот и смеси стандартных образцов (Sigma). Количественное определение проводили методом внутренней нормализации.

### **Результаты и их обсуждение**

Плодами календулы лекарственной являются семянки, расположенные в 2-3 ряда, изогнутые, гетероморфные: наружные отличаются по форме и структуре поверхности от средних и внутренних. Сырьем наших исследований являлись дуговидно изогнутые, с выпуклой стороны с несколькими продольными рядами ребер зрелые семянки длиной до 20 мм.

При рассмотрении плода с поверхности видны простые волоски одно- или двухрядные, длинные (рис. 1). На поперечном срезе перикарп имеет два выраженных слоя. Экзокарп, состоящий из одного ряда прямоугольных клеток, снаружи покрытых толстым слоем кутикулы (рис. 3.2). Под эпидермой находятся 5-6 рядов крупных, толстостенных клеток (склеренхимный слой мезокарпа), вдоль семени проходят небольшие проводящие пучки. Эндокарп не выражен (рис. 2).

Ткань зародыша состоит из тонкостенных клеток, заполненных жирным маслом и алевроновыми зернами (рис. 3.1).

В качестве подтверждающего критерия проводили гистохимическую реакцию. Поперечный срез семени помещали в реактив Судан III на сутки, затем промывали 50%-ным этиловым спиртом и заключали в глицерин. Судан III окрашивал жиры в оранжево-красный цвет. Указанная реакция не специфична, для получения достоверных результатов проводили пробу на омыление. Срез помещали в 15%-ный раствор калия гидроксида и слегка подогревали, через некоторое время образовывались игольчатые кристаллы жирно-кислых солей (мыла).

Данные реакции свидетельствуют о наличии жирного масла в семенах календулы лекарственной.



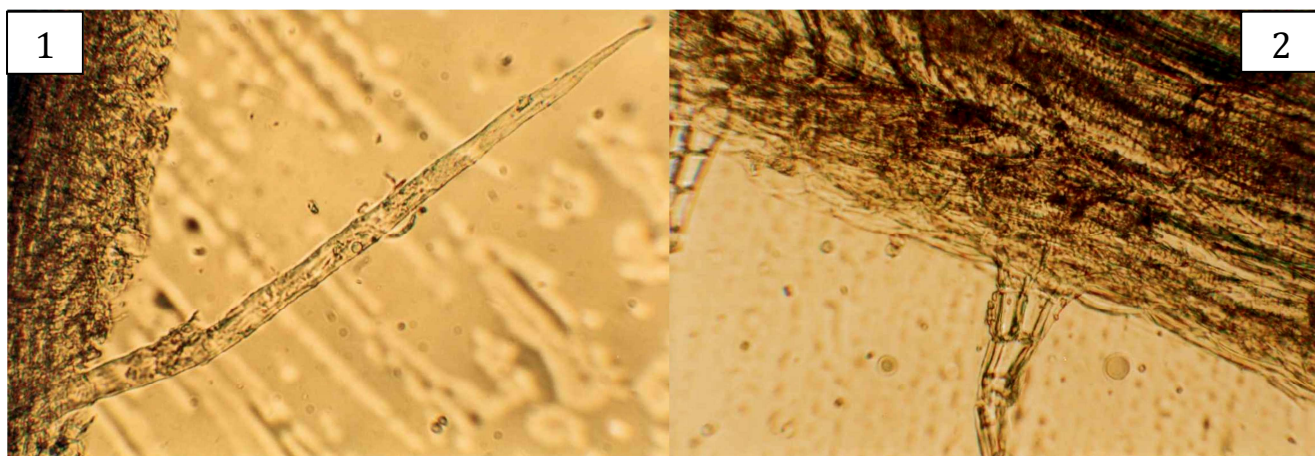


Рисунок 1 – Микрофотографии плода календулы с поверхности (увел. x160):

1 – простой волосок однорядный, 2 – простой волосок двурядный

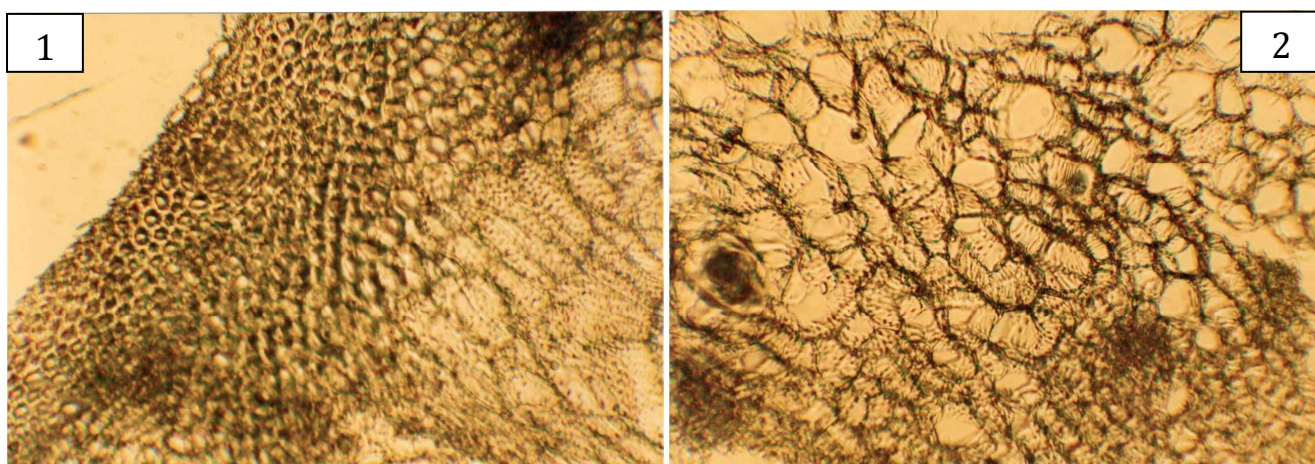


Рисунок 2 – Микрофотографии поперечного среза плода календулы лекарственной:

1 – увел. x160; 2 – увел. x250

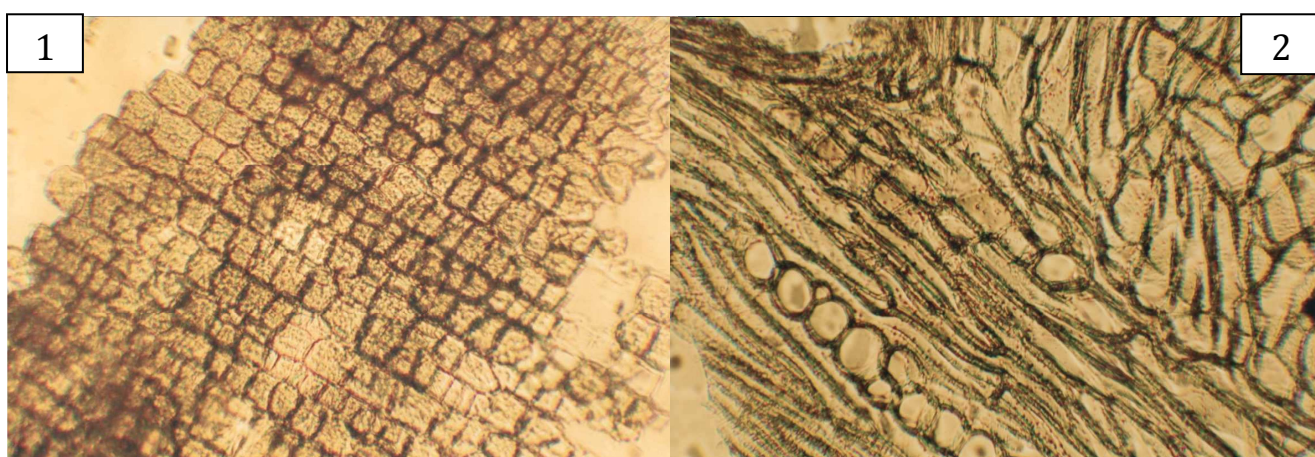


Рисунок 3 – Микрофотографии поперечного среза семени календулы лекарственной:

(увел. x160):

1 – клетки семядоли зародыша; 2 – клетки эпидермы с поверхности

Следующим этапом исследований явилось установление общих числовых показателей сырья. Из данных таблицы 1 следует, что экстрактивных веществ больше извлекается при использовании в качестве экстрагента ацетона.

Таблица 1 – Товароведческие показатели плодов календулы лекарственной

| Наименование показателя                                           | Значение показателя, % |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------|
| влажность                                                         | 6,06±0,49              |
| зола общая                                                        | 2,12±0,23              |
| зола, нерастворимая в 10%-ном растворе кислоты хлористоводородной | 1,06±0,16              |
| экстрактивные вещества (вода очищенная)                           | 17,60±0,06             |
| экстрактивные вещества (40%-ный этанол)                           | 19,73±0,38             |
| экстрактивные вещества (70%-ный этанол)                           | 17,65±0,60             |
| экстрактивные вещества (96%-ный этанол)                           | 19,47±0,65             |
| экстрактивные вещества (ацетон)                                   | 29,24±0,50             |

В результате качественного анализа на присутствие различных групп биологически активных соединений установлено наличие в плодах календулы лекарственной каротиноидов, органических кислот, белка, полисахаридов и жирного масла, обнаружены также следовые количества алкалоидов.

Количественно определили содержание белка – 25,73±0,64% (в пересчете на альбумин) и полисахаридов – 1,49±0,09%.

Макро- и микроэлементный состав представлен в таблице 2. В результате установлено содержание в плодах календулы лекарственной 23 элементов, среди которых основными по содержанию были фосфор, калий, кальций, магний, натрий, кремний, железо.

Таблица 2 – Содержание элементов в процентах в золе плодов календулы лекарственной

| № п/п | Элемент  | Количество | № п/п | Элемент  | Количество |
|-------|----------|------------|-------|----------|------------|
| 1     | медь     | 0,006      | 12    | молибден | 0,0006     |
| 2     | сурьма   | 0,01       | 13    | никель   | 0,0006     |
| 3     | фосфор   | >1         | 14    | платина  | –          |
| 4     | ванадий  | 0,0003     | 15    | кальций  | >1         |
| 5     | калий    | >1         | 16    | серебро  | 0,00002    |
| 6     | цинк     | 0,006      | 17    | стронций | 0,008      |
| 7     | олово    | 0,001      | 18    | титан    | 0,03       |
| 8     | марганец | 0,15       | 19    | железо   | 0,2        |
| 9     | хром     | 0,003      | 20    | магний   | >1         |
| 10    | натрий   | 0,6        | 21    | алюминий | 0,2        |
| 11    | свинец   | 0,1        | 22    | кремний  | 0,6        |
|       |          |            | 23    | бор      | 0,003      |

Масло плодов календулы лекарственной было получено в аппарате Сокслета и представляло собой непрозрачную маслянистую жидкость темно-желтого цвета, запах и вкус своеобразные.

В результате исследований было установлено, что масло плодов нерастворимо в воде, спирте, диэтиловом эфире, хорошо растворимо в петролейном эфире и хлороформе.

При выборе оптимального органического растворителя для экстракции изучено влияние петролейного эфира и хлороформа на истощенность сырья. При количественном определении петролейным эфиром выход жирного масла составил  $7,87 \pm 0,14\%$ , а хлороформом –  $11,016 \pm 0,019\%$ , поэтому наиболее селективным экстрагентом по отношению к жирному маслу явился хлороформ.

Затем было изучено влияние степени измельченности сырья и времени экстракции. При экстрагировании неизмельченного сырья выход жирного масла составил  $5,02 \pm 0,45\%$ , а при экстрагировании сырья измельченного до размера частиц 0,3-0,5 см выход масла составил  $10,03 \pm 0,51\%$ .

В результате проведенных исследований разработана следующая технология масляного экстракта плодов календулы лекарственной: измельченные вальцеванием плоды загружали в экстрактор и экстрагировали хлороформом в течение 8 часов при температуре 50-60 °С. По истечении указанного времени хлороформ отгоняли. Пары хлороформа поступали в сборник и снова использовались для экстракции. Полученный комплекс липофильных веществ анализировали и рассчитывали количество подсолнечного масла, необходимого для получения готового продукта – экстракта 1:10 по отношению к маслу. Рассчитанное количество подсолнечного масла смешивали с извлечением в течение часа при включенной мешалке и температуре  $50,0 \pm 0,5$  °С.

Характеристика хроматограммы с указанием последовательности выхода пиков, идентификацией и показателями содержания жирных кислот масла представлена в таблице 3 и на рисунке 4.

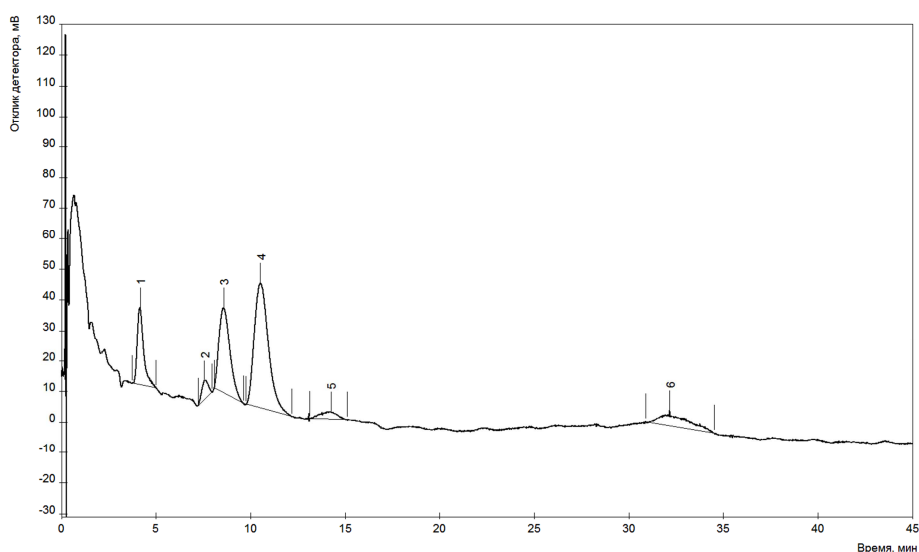


Рисунок 4 – Хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот плодов календулы лекарственной



Таблица 3 – Жирнокислотный состав липидов (%)

| № пика | Время удерживания метилового эфира, мин | Содержание, % | Числовой символ | Результаты идентификации кислоты |
|--------|-----------------------------------------|---------------|-----------------|----------------------------------|
| 1      | 4,157                                   | 13,013        | 16:0            | пальмитиновая                    |
| 2      | 7,557                                   | 3,051         | 18:0            | стеариновая                      |
| 3      | 8,576                                   | 24,874        | 18:1            | олеиновая                        |
| 4      | 10,517                                  | 46,841        | 18:2            | линолевая                        |
| 5      | 14,243                                  | 3,214         | 18:3            | линоленовая                      |
| 6      | 32,169                                  | 9,008         | –               | не идентифицирована              |

Из полученных данных видно, что жирнокислотный состав плодов календулы лекарственной характеризуется высоким содержанием линолевой кислоты (46,84%), олеиновой (24,87%) и пальмитиновой (13,01%).

**Выводы.** Данные проведенных исследований определяют перспективность дальнейшего изучения и рекомендации использования жирного масла плодов календулы лекарственной в качестве потенциального лекарственного средства.

### Список литературы

- ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. – Введ. 1998-01-01. – Минск : Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1996. – 7 с.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. – М. : Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2007. – Ч. 1. – 704 с.
- Государственная фармакопея СССР. – 10-е изд. – М. : Медгиз, 1968. – 1081 с.
- Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа. Лекарственное сырье. - 11-е изд. доп. - М. : Медицина, 1990. – С. 400.
- Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) : аналит. обзор / Б.М. Зузук [и др.] // Провизор. – 2001. – № 4. – С. 29-31.
- Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) : аналит. обзор / Б.М. Зузук [и др.] // Провизор. – 2001. – № 5. – С. 29-34.
- Орловская Т.В., Ибрагим С.А., Челомбитько В.А. Аминокислотный и минеральный состав корневищ куркумы длинной // Изв. высш. уч. зав. Сев.-Кавк. регион. – 2007. – Спецвып. – С. 102-104.
- Орловская Т.В. Изучение жирнокислотного состава липидов семян клоповника посевного // Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Фармация. – 2006. – № 2. – С. 334-335.
- Орловская Т.В., Гюльбякова Х.Н., Гужва Н.Н., Огурцов Ю.А. Изучение коры липы сердцелистной с целью создания новых лекарственных средств // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2. - URL: [www.science-education.ru/108-8561](http://www.science-education.ru/108-8561).



**Рецензенты:**

Челомбитько В.А., д.ф.н., профессор кафедры фармакогнозии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ, г. Пятигорск.

Компанцев В.А., д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой неорганической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ, г. Пятигорск.