

ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

¹Куркина А.В., ¹Афанасьева П.В., ¹Куркин В.А., ²Платонов И.А., ²Павлова Л.В.

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия (443099, Самара, ул. Чапаевская, 89), e-mail: kurkina-av@yandex.ru, polafanasyeva@rambler.ru;

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева (Национальный исследовательский университет)», Самара, Россия (443086, Самара, Московское шоссе, 34), e-mail: pia@ssau.ru

В статье приводится сравнительная характеристика подходов к стандартизации календулы лекарственной в различных фармакопеях мира. Проведены исследования по обоснованию и разработке методик количественного определения доминирующих соединений календулы лекарственной с помощью комплекса методов — ТСХ-анализа, спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Сравнительное исследование водно-спиртовых извлечений цветков календулы методом ТСХ показало, что на хроматограммах доминирующим компонентом является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), который при проявлении хроматограммы раствором диазобензолсульфокислоты обнаруживается в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета с R_f около 0,45 или R_s около 1,1 относительно рутина. Результаты фитохимических исследований позволяют использовать дифференциальную спектрофотометрию для количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на ГСО рутин при аналитической длине волны в 412 нм. С использованием метода ВЭЖХ определено содержание доминирующего соединения (нарцисина) методом ВЭЖХ в образцах водно-спиртового извлечения цветков календулы лекарственной, которое варьирует от $0,57 \pm 0,02\%$ до $0,72 \pm 0,03\%$. Обнаружение нарцисина как доминирующего и биологически активного флавоноида имеет диагностическое значение, что является целесообразным для целей стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной. Результаты четкого хроматографического разделения компонентов извлечения из цветков ноготков позволяют предлагать использование метода ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения.

Ключевые слова: календула лекарственная, ноготки, *Calendula officinalis* L., цветки, препараты, флавоноиды, нарциссин, рутин, изокверцитрин, спектрофотометрия, ТСХ, ВЭЖХ, стандартизация

SUBSTANTIATION OF NEW APPROACHES TO STANDARDIZATION OF HERBAL MATERIALS AND PHARMACEUTICALS OF *CALENDULA OFFICINALIS* L.

¹Kurkina A.V., ¹Afanasyeva P.V., ¹Kurkin V.A., ²Platonov I.A., ²Pavlova L.V.

¹Samara State Medical University, Samara, Russia (443079, Samara, Ul. Chapayevskaya, 89), e-mail: kurkina-av@yandex.ru, polafanasyeva@rambler.ru

²Samara State Aerospace University named academician S.P. Korolev, Samara, Russia (443086, Samara, Moskovskoye highway, 34), e-mail: pia@ssau.ru.

The article provides a comparative description of approaches to standardization of the marigold (*Calendula officinalis* L.) in various world pharmacopoeias. There were carried out the studies on the substantiation and development of methods of quantitative determination the dominant compounds of *Calendula officinalis* L. through comprehensive research by TLC-analysis, spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). A comparative study of water-alcoholic extracts of pot marigold flowers by TLC showed that the dominant component on the chromatograms is narcissin (3-O-rutinoside of isorhamnetin) that the processing of the chromatogram by diazobenzolsulfoacid's solution is found in the form of a dominant spot yellow-orange color with an R_f of about 0,45 or about R_s 1,1 relatively rutin. Phytochemical studies allow the use of differential spectrophotometry for the quantitative determination of total flavonoids based on standard sample of rutin at the analytical wave length at 412 nm. The calculated content of dominant compound (narcissin) by HPLC in samples of water-alcoholic extracts of *Calendula officinalis* L. flowers varies from $0,57 \pm 0,02\%$ до $0,72 \pm 0,03\%$. Detection of narcissin as an acting and dominant flavonoid has diagnostic importance that is appropriate for the purposes of standardization of herbal materials and preparations of pot marigold. The results well-defined chromatographic separation of components of pot marigold flowers allows to

offer the using the HPLC method for determining the authenticity of herbal materials and phytopharmaceuticals of this medicinal plant.

Keywords: pot marigold, *Calendula officinalis* L., flowers, pharmaceuticals, flavonoids, narcissin, rutin, isoquercitrin, spectrophotometry, TLC, HPLC, standardization

Проблема создания современных отечественных импортозамещающих лекарственных средств является одной из актуальных задач современной фармации. Одним из перспективных в этом отношении лекарственных растений является календула лекарственная (ноготки) (*Calendula officinalis* L.). Цветки ноготков применяются в качестве официального лекарственного растительного сырья (ЛРС) в Российской Федерации и во многих странах мира. Препараты календулы широко используются в отечественной и в европейской медицине в качестве противовоспалительных лекарственных средств, обладающих регенерирующей, желчегонной, отхаркивающей активностью [5, 8].

Однако, несмотря на пристальное внимание ученых к проблемам стандартизации сырья и фитопрепаратов календулы, до сих пор наблюдается очевидная противоречивость в подходах к фармакогностическому исследованию растения [1–4, 8–10]. На фоне популярности и востребованности лекарственных средств на основе цветков ноготков представляется целесообразным обобщить имеющийся мировой опыт и оценить с точки зрения соответствия методик нормативной документации (НД) современным требованиям к фармацевтическому анализу, а также обсудить результаты собственных исследований по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов данного растения.

При рассмотрении было обнаружено, что фармакопейная статья 5 «Цветки ноготков» Государственной фармакопеи СССР XI издания предполагает анализ ЛРС только по содержанию экстрактивных веществ, при этом отсутствуют разделы «Качественные реакции» и «Количественное определение» [2].

В отношении лекарственных средств на основе календулы (настойка, экстракт) также не применяются адекватные методики анализа, поскольку предлагаемые показатели не дают объективной оценки качества фитопрепаратов «Календулы настойка», «Календулы экстракт жидкий». Так, если с реакцией подлинности с концентрированной серной кислотой на сапонины можно согласиться, поскольку она направлена на определение третьей группы действующих веществ — сапонинов, вносящих вклад в фармакологическую активность, то использование реакции на дубильные вещества с хлоридом окисного железа не представляется специфичным для данного вида ЛРС. Качество данных препаратов оценивается по содержанию суммы окисленных веществ [5], что не соответствует современным представлениям о химической природе биологически активных соединений цветков календулы лекарственной.

При рассмотрении нормативной документации других стран были выявлены следующие подходы к стандартизации календулы лекарственной.

Требования к сырью в Европейской и Британской фармакопеях полностью совпадают [9]. 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. Раствором сравнения является смесь кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты и рутина в метаноле. Система растворителей: муравьиная кислота безводная: вода:этилацетат 10:10:80. На наш взгляд, стандарты, используемые в методике ТСХ-анализа, не обеспечивают специфичность ЛРС. В соответствии с вышеуказанными зарубежными фармакопеями количественное определение проводят на спектрофотометре при длине волны 425 нм. При этом для количественной характеристики используется содержание флавоноидов в пересчете на гиперозид (не менее 0,4%). Расчет содержания суммы флавоноидов проводится на вещество гиперозид, не содержащийся в цветках календулы лекарственной. Раздел «Числовые показатели» представлен такими характеристиками, как: посторонние примеси (цветоложе с обертками — не более 5%; другие примеси – не более 2%), потеря в массе при высушивании (не более 12%) и зола общая (не более 10%) [9].

Стандартизация цветков календулы в государственной фармакопее Республики Казахстан сформулирована по аналогии с подходами Европейской фармакопеи. В данной НД также проводят испытания на микробиологическую чистоту, тяжелые металлы и радионуклиды [1].

В Государственной фармакопее Украины в отношении настойки календулы предлагается проводить идентификацию методом ТСХ по таким действующим веществам, как флавоноиды и сапонины (календулозиды — производные олеаноловой кислоты) [3].

Кроме того, календула лекарственная является популярным растением в гомеопатии. Так, растение входит в Немецкую гомеопатическую фармакопею [10]. При этом в документации в качестве сырья указана вся надземная часть растения в период цветения, а не только цветки, как в фармакопеях других государств. Фармакопейная статья календулы лекарственной в Немецкой гомеопатической фармакопее представлена подробным описанием внешних признаков всей надземной цветущей части данного растения. Кроме того, в этом документе также приводится характеристика матричной настойки. Анализ данной лекарственной формы проводится с помощью метода ТСХ (детекция при 254 нм). В качестве контрольного раствора используют раствор галловой кислоты в метаноле, что не обеспечивает специфичность [10].

В результате ранее проведенных фитохимических исследований было достоверно установлено, что доминирующим и диагностическим веществом цветков календулы является флавоноид нарциссин (3-рутинозид-изорамнетина) [6, 7]. Данное диагностическое вещество было впервые выделено в Российской Федерации из данного растения методом колоночной хроматографии. Методом ^1H -ЯМР и масс-спектрометрии было установлено химическое строение выделенного соединения [6]. Сравнение полученного нами доминирующего флавоноида с ГСО рутином методом ТСХ (R_f около 0,4), хроматографическая система хлороформ-метанол-вода (26:14:3) по хроматографической подвижности показало, что выделенное соединение имеет другое значение R_f около 0,45. Обнаружено, что нарциссин и рутин имеют близкие спектральные характеристики [6, 7]. На наш взгляд, это объясняет ошибочный поход к анализу сырья календулы, применяемый в зарубежных фармакопеях, в которых ученые указывают на наличие рутина как диагностического вещества цветков ноготков.

Достоверно известно, что широкий спектр фармакологического действия цветков календулы (противовоспалительное, регенерирующее, антимикробное) обусловлен содержанием различных классов биологически активных соединений (БАС), таких как каротиноиды, флавоноиды (гликозиды кемпферола, кверцетина и изорамнетина), сапонины [5]. На наш взгляд, оптимальный подход к стандартизации цветков календулы должен включать в себя анализ сырья на содержание ведущих групп биологически активных веществ [8]. В этой связи нами ранее были разработаны методики качественного и количественного анализа цветков ноготков на содержание флавоноидов с использованием метода ТСХ и спектрофотометрии [7]. Этот подход был взят позже за основу и другими отечественными учеными [9]. Таким образом, анализ литературных данных показывает противоречивость подходов к анализу цветков и препаратов календулы лекарственной, которые ориентированы на различные группы БАС (флавоноиды, фенилпропаноиды, сапонины, каротиноиды, органические кислоты), что не позволяет объективно оценивать качество сырья и лекарственных средств данного растения. Следовательно, на настоящий момент разработка методик стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной с использованием современных методов анализа, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), представляется актуальным вопросом.

Целью нашего исследования является 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, заготовленные в августе 2013 г. на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского государственного университета, а также промышленные образцы сырья.

В работе были использованы тонкослойная хроматография, спектрофотометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Воздушно-сухое растительное сырье подвергали исчерпывающему экстрагированию спиртом этиловым 70% в соотношении «сырье:экстрагент» — 1:30. 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 и их обсуждение

Результаты сравнительного исследования методом ТСХ свидетельствуют о том, что на хроматограммах водно-спиртовых извлечений цветков календулы доминирующим компонентом является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), который при проявлении хроматограммы свежеприготовленным раствором диазобензолсульфокислоты обнаруживается в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета с R_f около 0,45. Данное диагностическое вещество было впервые выделено из данного растения методом колоночной хроматографии. Методом ^1H -ЯМР и масс-спектрометрии ранее было установлено химическое строение [6]. Сравнение выделенного нарциссина с ГСО рутином методом ТСХ (R_f около 0,4) по хроматографической подвижности показало, что полученное нами соединение имеет значение R_f около 0,45. Нарциссин по отношению к пятну ГСО рутина имеет значение R_s около 1,1. Ввиду сопоставимой подвижности и близких значений R_f и спектральных характеристик зарубежные ученые принимают пятно нарциссина за рутин (рис. 1), что находит отражение в ошибочных методиках анализа, включенных в Европейскую фармакопею и в фармакопеи других стран [1, 3, 9]. Расчет величины R_s позволит повысить объективность методики для анализируемого вещества. Кроме того, в этих же хроматографических условиях обнаруживается второе менее интенсивное пятно вещества желтого цвета с R_f около 0,6, который соответствует изокверцитрину.

Результаты сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений образцов цветков календулы лекарственной свидетельствуют о том, что для всех

образцов сырья характерны максимумы поглощения при λ_{\max} 260 ± 2 нм (флавоноиды) и области 330–350 нм (флавоноиды и гидроксикоричные кислоты) (рис. 2). Кроме того, для раствора извлечения в присутствии $AlCl_3$ наблюдается батохромный сдвиг в области 408 нм ± 2 нм (рис. 3), характерный для флавонолов с гликозилированной 3-ОН-группой. Важно отметить, что нарциссин и рутин, являющиеся 3-О-рутинозидами изорамнетина и кверцетина соответственно (рис. 1), близки по своим спектральным характеристикам – по коротковолновому и длинноволновому максимуму поглощения (около 258 нм и 360 нм) (рис. 4 и 5). 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.

	
<p>Нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина) желтые кристаллы из этилового спирта, $C_{28}H_{32}O_{16}$, т. пл. 173–175°C</p>	<p>Рутин (3-О-рутинозид кверцетина) желтый кристаллический порошок $C_{27}H_{30}O_{16}$, т. пл. 192–196°C.</p>

Рис.1. Химические структуры важнейших флавоноидов цветков календулы лекарственной

Данное обстоятельство позволило использовать спектрофотометрию для количественного определения флавоноидов в пересчете на ГСО рутин. В последнее время для целей стандартизации активно внедряется метод ВЭЖХ, позволяющий 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 данный метод рекомендовать как для целей идентификации сырья ноготков, так и для целей стандартизации препаратов на основе сырья данного растения.

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

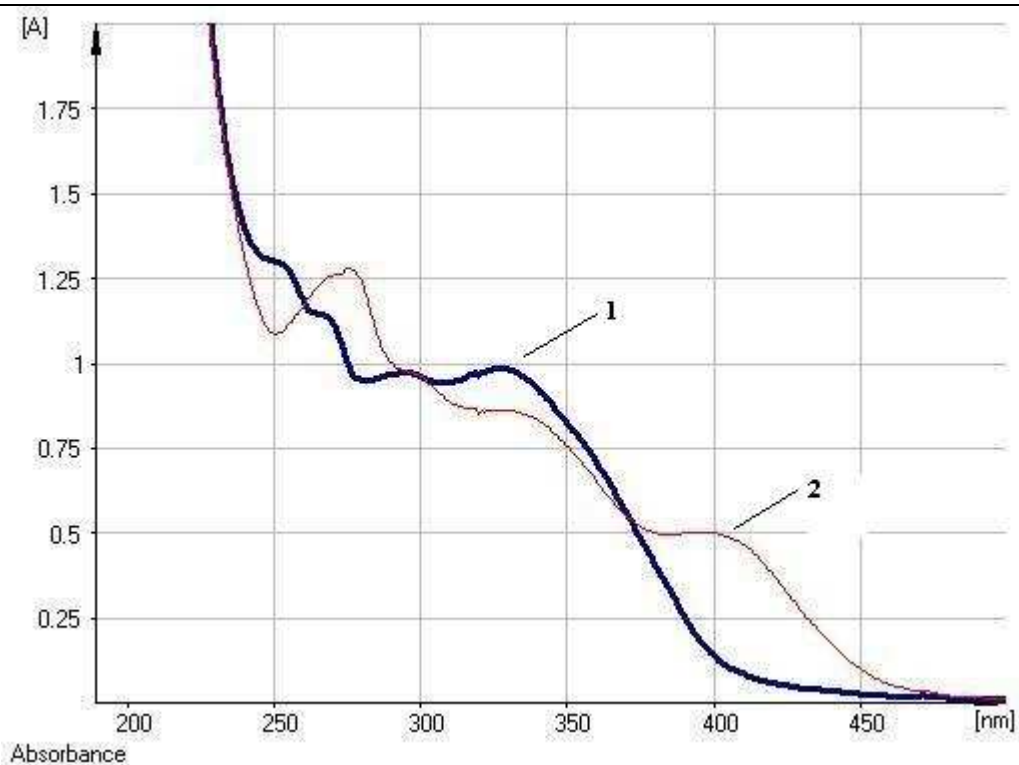


Рис. 2. УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из цветков календулы лекарственной. Обозначения: 1 – раствор извлечения (1:30); 2 – раствор извлечения (1:30) с добавлением алюминия хлорида

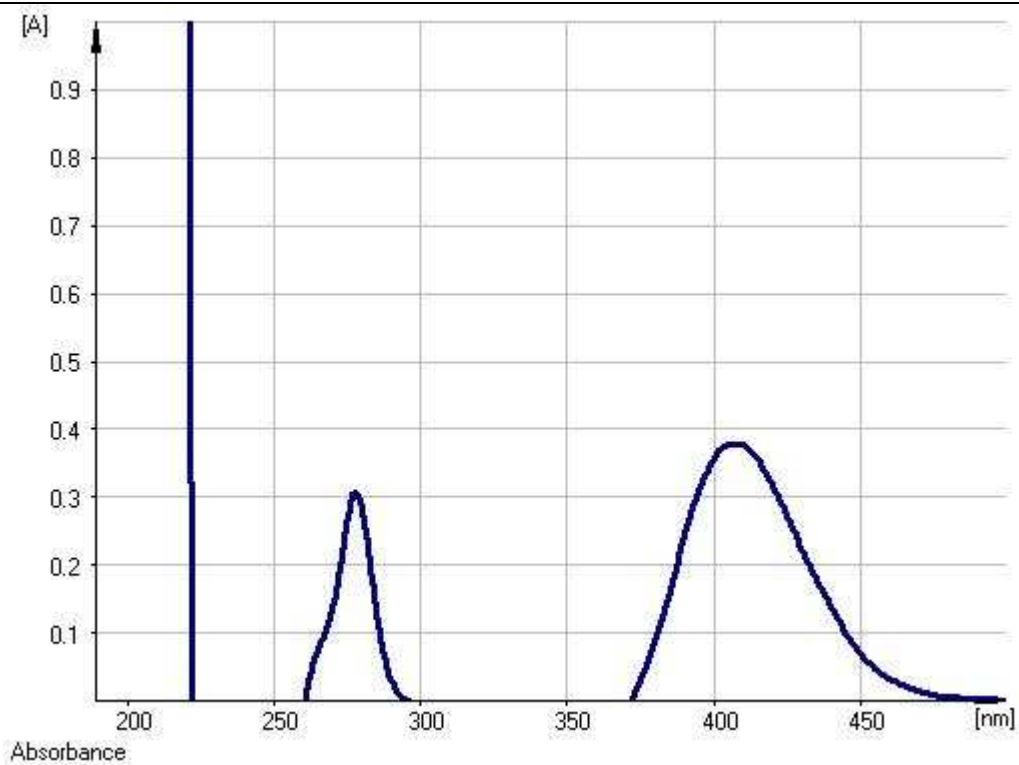


Рис. 3. УФ-спектр раствора водно-спиртового извлечений из цветков календулы лекарственной (дифференциальный спектр)

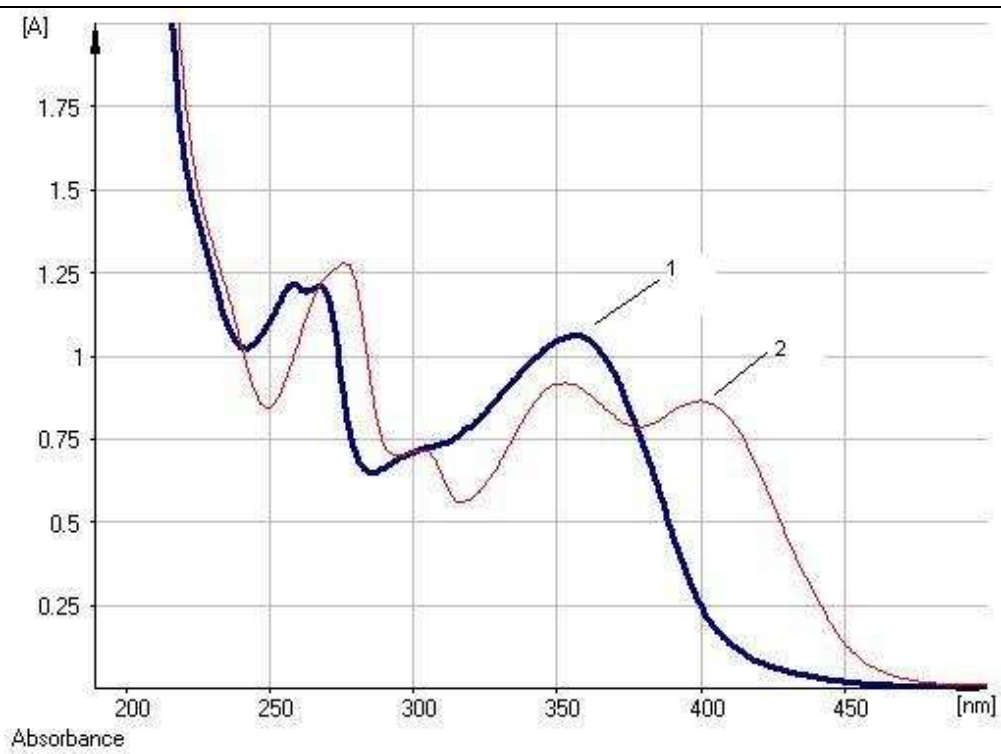


Рис. 4. УФ-спектр раствора нарциссина

Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

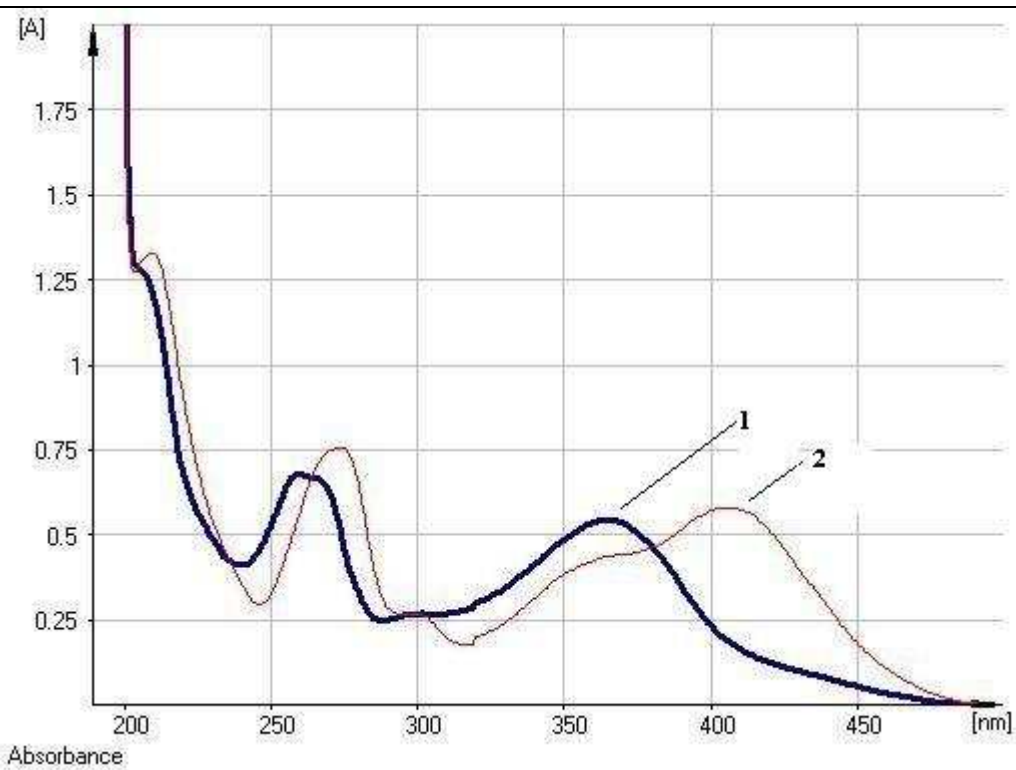


Рис. 5. УФ-спектр раствора рутина

Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

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

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

Необходимо отметить, что в зарубежных фармакопеях отсутствует опыт использования ВЭЖХ анализа для стандартизации сырья календулы [1, 3, 9, 10]. Важно подчеркнуть, что в современной литературе встречаются данные относительно возможности применения метода ВЭЖХ анализа для стандартизации сырья календулы [4, 8]. По данным некоторых авторов, анализ извлечения цветков календулы лекарственной методом ВЭЖХ необходимо проводить идентификацией кверцетина с определением высоты пика в данного вещества, а также с использованием ГСО кверцетина [8]. Кроме того, кверцетин не является диагностическим веществом для цветков календулы лекарственной, так как, во-первых, содержится в следовых количествах, а во-вторых, является наиболее распространенным флавоноидным агликоном в растениях. Другие исследователи в рамках проведения ВЭЖХ-анализа предлагают использовать такие маркерные компоненты, как: тифанеозид (изорамнетин-3-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид), нарциссин, изорамнетин-3-О-глюкозид и изорамнетин-3-О-(6''-ацетил)-глюкозид [4]. Однако, несмотря на четкое хроматографическое разделение компонентов извлечения из цветков ноготков, представляются некорректными рассуждения ученых относительно доминирующего компонента — тифанеозида (производное изорамнетина). В опубликованных результатах высокоэффективной жидкостной хроматографии авторы не предлагают конкретное диагностическое соединение, не проводят расчет содержания доминирующего флавоноида, а также не приводят методику количественного определения [4]. Минорные количества рутина на хроматограмме не согласуются с данными наших исследований, а также с представлениями, изложенными в Европейской и Британской фармакопеях [9]. Европейские специалисты указывают на наличие рутина как диагностического вещества и в связи с близостью спектральных и физико-химических характеристик рутина с нарциссином не обнаруживают последнее в календуле лекарственной. На наш взгляд, доминирующим и диагностическим флавоноидом является нарциссин, и определение именно данного флавоноида, в том числе с использованием

метода ТСХ и ВЭЖХ, является целесообразным для целей стандартизации сырья и препаратов.

Выводы:

1. Разработаны новые подходы к стандартизации подхода к стандартизации цветков календулы лекарственной, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

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

3. Разработанные подходы целесообразно использовать для целей стандартизации препаратов на основе цветков календулы лекарственной как возможность реализации принципа гармонизации в ряду «лекарственное растительное сырье — лекарственный препарат».

Список литературы

1. Государственная Фармакопея Республики Казахстан: Т. 2. – Изд. 1-е – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2009. – С. 704–705.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. Изд. 11-е, доп. – М.: Медицина, 1990. – С. 237–238.
3. Государственная фармакопея Украины. Харьков, 2011. — 1-е вид. Доп. 4. — 540 с.
4. Кащенко Н.И. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): дис.... канд. фармацевт. наук.– Улан-Удэ, 2014. – 223 с.
5. Куркин В.А. Фармакогнозия. Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). Изд. 2-е, перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.
6. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis* // Химия природных соединений. – 2007. — № 2. — С. 179–180.
7. Куркин В.А., Шарова О.В. Разработка методик стандартизации цветков ноготков // Фармация. – 2007. — № 8. – С. 11–13.
8. Сампиев А.М., Хочава М.Р. Календула лекарственная. – Краснодар: Советская Кубань, 2010. – 144 с.
9. European Pharmacopoeia, 6.0, 2008, «Herbal drugs».

10. German Homeopathic Pharmacopoeia (GHP). – Stuttgart: Deutscher apotheker Verlag, 1993. – P. 155–156.

Рецензенты:

Шаталаев И.Ф., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Правдивцева О.Е., д.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.