

Количественный анализ фенольных соединений в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) методом микроколоночной ВЭЖХ

© **Кащенко Нина Игоревна и Оленников*⁺ Даниил Николаевич**

Лаборатория медико-биологических исследований. Отдел биологически активных веществ.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии. Сибирское отделение РАН. Ул. Сахьяновой, 6. г. Улан-Удэ, 670047. Россия.

Тел.: (3012) 43-47-43. E-mail: oldaniil@rambler.ru. Факс: +7 (3012) 43-47-43

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: *Calendula officinalis*, *Asteraceae*, фенилпропаноиды, флавоноиды, микроколоночная ВЭЖХ.

Аннотация

Разработана методика количественного анализа 14 фенольных соединений методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ с двухволновым детектированием (330 и 360 нм) с применением колонки *ProntoSIL-120-5-C18* (2×75 мм) и градиентной элюентной системы [0.2 М LiClO₄ в 0.006 М HClO₄ – 0.01 М додецилсульфат натрия в воде (1:1)]-ацетонитрил. Методика была применена для анализа цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и некоторых препаратов (настойка, экстракты, жидкий и сухой настой, отвар). Проведено сравнительное исследование количественных показателей указанных лекарственных форм.

Введение

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) – официальный растительный вид, цветки которого широко применяются в медицинской практике для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний [1]. В результате химических исследований в цветках *C. officinalis* было установлено присутствие различных групп биологически активных соединений, в том числе фенилпропаноиды, флавоноиды [2], кумарины [3], тритерпеновые гликозиды [4], полисахариды [5], эфирное масло [6] и другие.

Информация о разделении фенольных соединений цветков *C. officinalis* с применением методов жидкостной хроматографии крайне ограничена, и касается в большинстве случаев определения отдельных компонентов (рутин, нарциссин, кверцетин, изорамнетин) [7, 8]. Данное обстоятельство не позволяет сформировать общую картину об индивидуальном фенольном профиле данного растительного вида.

В последнее время большим интересом пользуется метод микроколоночной ВЭЖХ (МК-ВЭЖХ), к числу преимуществ которого относятся экспрессность, экономичность и удовлетворительные метрологические показатели, в связи с чем нами рассмотрена возможность разработки простого и эффективного метода количественного определения фенольных соединений в цветках *C. officinalis* с применением обращенно-фазовой МК-ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Экспериментальная часть

Растительное сырье и препараты. Образцы *C. officinalis* (сорта ‘Русский размер’ и ‘Солнце Египта’) были выращены в открытом грунте на экспериментальных плантациях ИОЭБ СО РАН (2013 гг.) из аутентифицированных семян, полученных в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (Москва, Россия). Для культивирования были использованы рекомендованные для *C. officinalis* агротехнические условия [9]. Сбор цветков проводили в фазу массового цветения. Образцы сырья хранятся в гербарии ИОЭБ СО РАН (№ FAs/to-15/09-12/0813i, FAs/to-15/10-12/0813i). Коммерческое сырье и препараты были приобретены через аптечную сеть, в том числе цветки календулы лекарственной

В работе использовали следующие реактивы: лития перхлорат ($\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich), кислота перхлорная ($\geq 70.0\%$, Sigma-Aldrich), додецилсульфат натрия (BioXtra, $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich), цетилпиридиний-*N*-хлорид (BioChemica, $\geq 99.0\%$, AppliChem), цетилтриметиламмоний бромид (BioXtra, $\geq 99.0\%$, Sigma), Тритон X-100 (BioXtra, Sigma-Aldrich). Остальные реактивы имели степень чистоты чда.

ВЭЖХ. Исследования проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе *Милихром А-02* (Эконова), снабженным автосемплером, УФ-детектором и колонкой с обращено-фазовым сорбентом *ProntoSIL-120-5-C18 AQ* (2×75 мм, $\varnothing$ 5 мкм; Metrohm AG).

Количественный анализ. Для анализа растительного сырья 40 мг измельченных цветков переносили в пробирку *Эппендорфа* (2 мл), приливали 1 мл 50% EtOH и подвергали ультразвуковой обработке (50 кГц, 30 мин, 40 °C), после чего центрифугировали (6000 g, 20 мин). Полученное извлечение фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм) и использовали для анализа (1 мкл).

Количественный анализ фенилпропаноидов проводили при 330 нм, флавоноидов – при 360 нм. Расчет содержания индивидуальных компонентов осуществляли по градуировочным графикам, построенным с применением коммерческих образцов стандартных соединений (кофейная кислота, 3-*O*-, 4-*O*-кофеилхинные кислоты, 1,3- и 4,5-ди-*O*-кофеилхинные кислоты, рутин, изокверцитрин, нарциссин, изорамнетин-3-*O*- β -*D*-глюкопиранозид – все SigmaAldrich), выделенных ранее [2] образцов соединений с чистотой $\geq 95\%$ (мангаслин, календофлавобиозид, тифанеозид, календофлавозид, календофлазид) и по внешним образцам сравнения (изорамнетин-3-*O*-(6"-ацетил)- β -*D*-глюкопиранозид – по изорамнетин-3-*O*- β -*D*-глюкопиранозиду). Образцы настоек использовали без разбавления после предварительного фильтрования (мембранный фильтр, 0.45 мкм); для анализа препарата "Экстракт календулы жидкий", его предварительно разбавляли 60% этанолом 1:1 и фильтровали. Препарат "Экстракт календулы сухой" растворяли в 60% этаноле (10 мг на 1 мл растворителя) при ультразвуковой обработке (50 кГц, 15 мин, 40 °C), после чего центрифугировали (6000 g, 20 мин) и фильтровали. Образцы настоев и отваров получали согласно рекомендациям Государственной Фармакопеи [10] в соотношении сырье : экстрагент 1:25.

Статистический анализ. Расчеты проводили с использованием одностороннего анализа отклонений (ANOVA) и средние значения определяли по методу Дункана с использованием пакета программ *Statistica*. Результаты анализа представлены в виде $X_{cp} \pm SD$ (стандартное отклонение) от пяти последовательных изменений.

Результаты и их обсуждение

В ходе выбора условий для хроматографического анализа флавоноидов и фенилпропаноидов цветков *C. officinalis* методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ в качестве базовой была выбрана методика, предложенная ранее для анализа флавоноидов растений рода *Filipendula* [11]. Установлено, что применение данной методики не позволяет добиться разделения следующих компонентов (критических смесей) (рис. 1а):

- календофлавобиозид (4; здесь и далее, обозначения согласно рис.), тифанеозид (5) и рутин (6);
- 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (10) и 6"-ацетил-изокверцитрин (11);
- ди-*O*-кофеилхинная кислота (12) и нарциссин (13);
- изорамнетин-3-*O*-глюкозид (14), изорамнетин-3-(2"-рамнозил)-рамнозид (15) и 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (16).

Увеличение концентрации элюента В в начале процесса приводит к повышению подвижности всех компонентов, но не позволяет разделить критические смеси (рис. 1б). Для устранения данного недостатка было предложено заменить градиентный режим в части процесса на изократический, что позволило разделить основную часть компонентов, кроме 5 и 6 (рис. 1в,г), на отделение которых положительно повлияло повышение температуры колонки (рис. 1д). Снижение концентрации элюента В не привело к удовлетворительной динамике разделения (рис. 1е,ж). По результатам проведенных исследований был выбран режим элюирования, позволяющий добиться разделения 17 компонентов цветков *C. officinalis*.

Дополнительно было изучено влияния состава элюента на характер хроматографического разделения. Так, было выявлено, что присутствие HClO_4 в составе элюента В влияет на подвижность кофеилхинных кислот: повышение концентрации HClO_4 приводит к увеличению величин t_R ди-кофеилхинных кислот и снижению – для моно-кофеилхинных кислоты (рис. 2а-г).

7-22% (0-7.6 мин), 22-25% (7.6-8.6 мин), 25-27% (8.6-12 мин), 27-100% (12-17 мин), 100% (17-24 мин);
T 35 °C

9-25% (0-8 мин), 25% (8-16 мин),
100% (16-24 мин); T 35 °C

11-18% (0-5 мин), 18% (5-16 мин),
100% (16-24 мин); T 35 °C

11-18% (0-5 мин), 18% (5-9 мин),
18-20% (9-10 мин), 20% (10-16 мин), 100% (16-24 мин); T 35 °C

11-18% (0-5 мин), 18% (5-9 мин),
18-20% (9-10 мин), 20% (10-16 мин), 100% (16-24 мин); T 40 °C

11-16% (0-5 мин), 16% (5-9 мин),
16-18% (9-10 мин), 18% (10-16 мин), 100% (16-24 мин); T 40 °C

11-16% (0-5 мин), 16% (5-16 мин),
100% (16-24 мин); T 40 °C

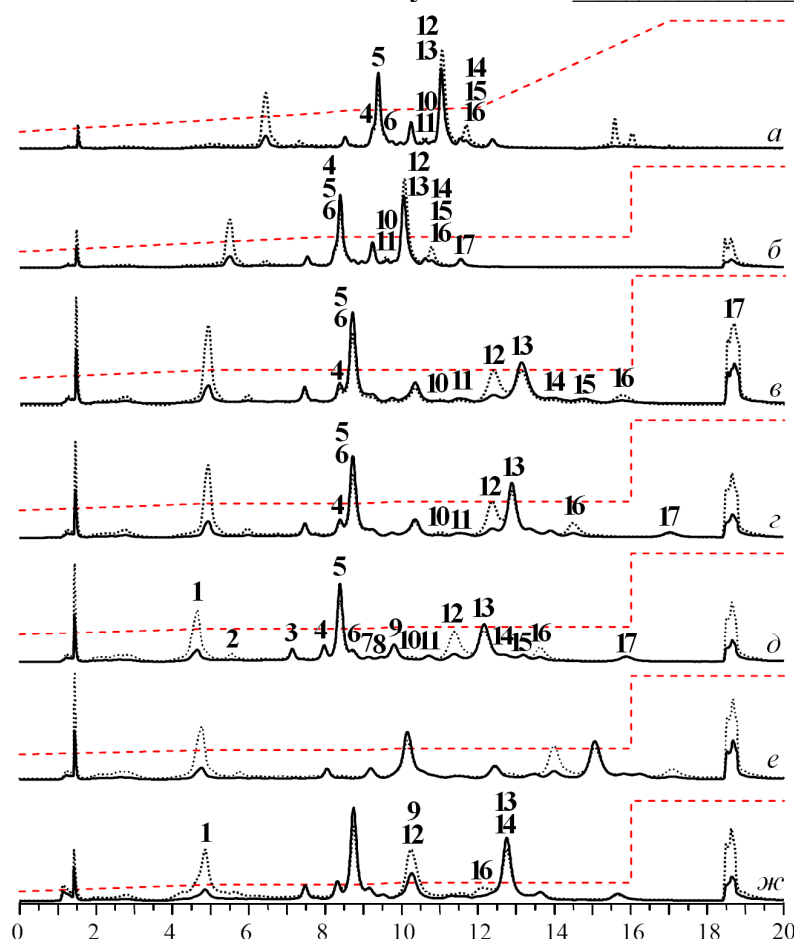


Рис. 1. Влияние режима элюирования на характер разделения основных компонентов цветков *C. officinalis*. Условия: элюент А [0.2 М LiClO₄ в 0.003 М HClO₄]; элюент В [MeCN]; ν 150 мкл/мин; детектор 330 (пунктир) и 360 нм (линия). Числами обозначено положение соединений: 1 – 3CQA, 2 – CA, 3 – Q-3-(Rha^{2,6})Glc, 4 – Q-3-(Rha²)Glc, 5 – Ir-3-(Rha^{2,6})Glc, 6 – Q-3-(Rha⁶)Glc, 7 – Q-3-Glc, 8 – Q-3-(Rha²)Rha, 9 – Ir-3-(Rha²)Glc, 10 – 3,5-dCQA, 11 – Q-3-(Ac⁶)Glc, 12 – 1,5-dCQA, 13 – Ir-3-(Rha⁶)Glc, 14 – Ir-3-Glc, 15 – Ir-3-(Rha²)Rha, 16 – 4,5-dCQA, 17 – Ir-3-(Ac⁶)Glc.

Следует отметить, что возрастание содержания HClO₄ положительно влияет на форму пика – увеличивает высоту и симметричность, достигая наиболее удовлетворительных показателей при концентрации 0.006 М. Удаление из элюента LiClO₄ из состава элюента А приводит к слиянию компонентов 12 и 13 (рис. 2д), а дальнейшее повышение температуры колонки – к близким временам удерживания 15 и 16 (рис. 2е).

Замена пары LiClO₄-HClO₄ в более гидрофильном элюенте А на неорганические (KCl-HCl, Na₂HPO₄-H₃PO₄, NaH₂PO₄-H₃PO₄, K₂HPO₄-H₃PO₄, KH₂PO₄-H₃PO₄) или органические соединения (CH₃COONa-CH₃COOH, HCOONa-HCOOH, (COONa)₂-(COOH)₂, CH₃CH(OH)COONa-CH₃CH(OH)COOH), используемые для разделения флавоноидов и фенилпропаноидов других растительных объектов, не привело к положительным изменениям в характере разделения основных компонентов цветков *C. officinalis*.

С целью улучшения формы пиков нами была рассмотрена возможность применения мицеллярных модификаторов подвижной фазы, в качестве которых были использованы следующие ПАВ – додецилсульфат натрия (SDS), цетилпиридиний-*N*-хлорид (CPC), цетилтриметиламмоний бромид (CAB) и Тритон X-100 (TX). В качестве объекта исследования была выбрана смесь стандартных соединений, представленных структурно близкими фенилпропаноидами (монокофеилхинные кислоты) и флавоноидами (моноголикозиды и биозиды кверцетина и изорамнетина), зачастую рассматриваемых в качестве критических смесей для хроматографического разделения (рис. 3).

Проведенные исследования показали, что использование SDS в качестве модификатора приводит к повышению подвижности всех соединений, причем кофейлхинные кислоты, а

также некоторые пары флавоноидов [авикулярин (8) – нарциссин (9); кверцетин (12) – изорамнетин (13)] обладают близкими временами удерживания (рис. 3б). Применение СРС, САВ и ТХ типично и также не позволяет добиться удовлетворительного разделения (рис. 3в).

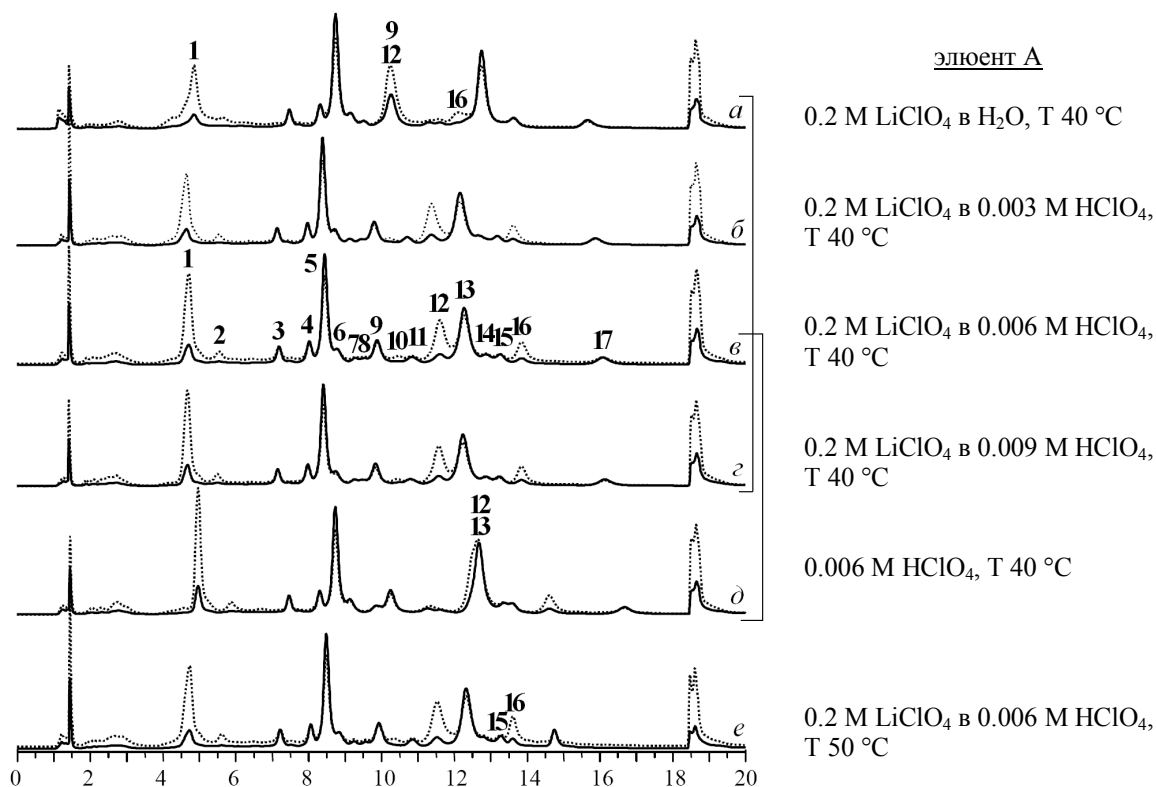


Рис. 2. Влияние состава элюента А на характер разделения основных компонентов цветков *C. officinalis*. Условия: элюент В [MeCN]; режим элюирования: 11-18% В (0-5 мин), 18% В (5-9 мин), 18-20% В (9-10 мин), 20% В (10-16 мин), 100% (16-24 мин); ν 150 мкл/мин; детектор 330 (пунктир) и 360 нм (линия). Обозначение соединений: см. рис. 1.

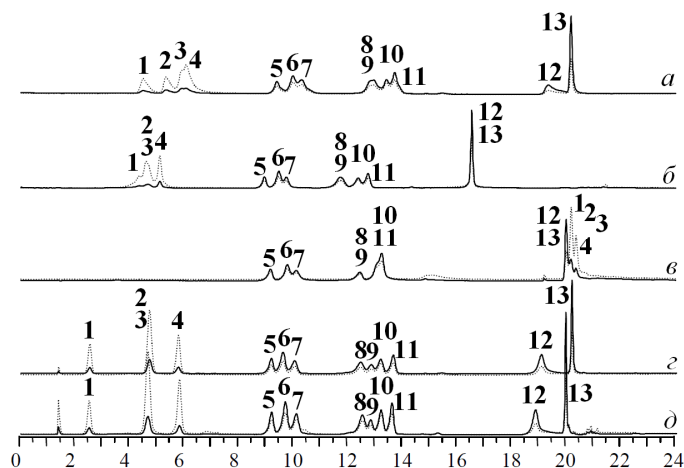


Рис. 3. Влияние мицеллярных модификаторов на характер разделения стандартной смеси фенольных соединений. Условия: элюент А [H₂O (а), 0.01 М SDS (б), 0.01 М CPC (в), 0.2 М LiClO₄ в 0.006 М HClO₄ (г), 0.2 М LiClO₄ в 0.006 М HClO₄ – 0.01 М SDS (1:1) (д)] элюент В [MeCN]; режим элюирования: 11-18% В (0-5 мин), 18% В (5-9 мин), 18-20% В (9-10 мин), 20% В (10-16 мин), 100% (16-20 мин); ν 150 мкл/мин; детектор 330 (пунктир) и 360 нм (линия). Числами обозначено положение соединений: 1 – 4CQA, 2 – 3CQA, 3 – 5CQA, 4 – CA, 5 – Q-3-(Rha⁶)Glc, 6 – Q-3-Gal, 7 – Q-3-Glc, 8 – Q-3-Ara, 9 – Ir-3-(Rha⁶)Glc, 10 – Q-3-Rha, 11 – Ir-3-Glc, 12 – Q, 13 – Ir.

Следует отметить, что данные модификаторы значительно увеличивают времена удерживания фенольных соединений (от 4-6 мин до 20-22 мин). Наилучшие результаты были получены при одновременном присутствии LiClO₄-HClO₄ и SDS (1:1) в составе элюента А (рис. 3д).

Несмотря на близкие значения подвижности 3- (2) и 5-*O*-кофеилхинных кислот (3) и следовое содержание 3 в цветках *C. officinalis*, общий характер деления был наиболее оптимальным. Повышение концентрации SDS в элюенте (до 0.005 M) не сказывалось на качестве разделения.

Предложенные условия хроматографического разделения были использованы для исследования сырья и некоторых препаратов и показали свою применимость для качественного и количественного анализа *C. officinalis* (рис. 4). В ходе предварительных исследований было установлено, что маркерными компонентами цветков *C. officinalis* являются 14 соединений: 5 фенилпропаноидов и 9 флавоноидов, содержание которых определялось в сырье (коммерческом и интродуцированном), настояках, экстрактах жидком и сухом, а также двух галеновых формах – настое и отваре (табл. 1-3).

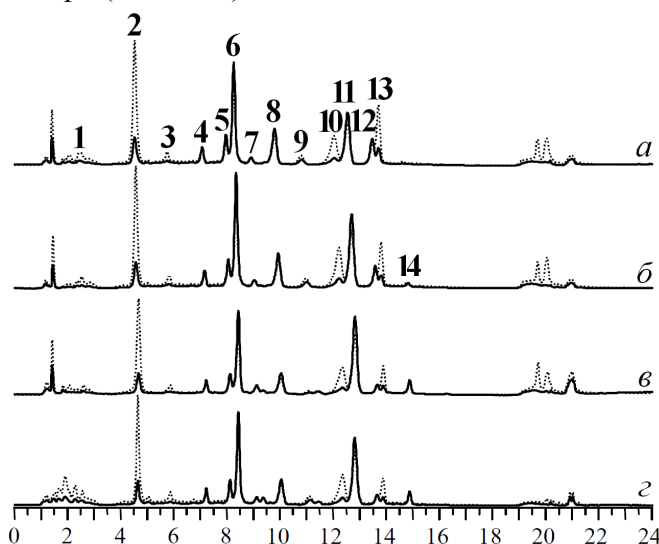


Рис. 4. Хроматограммы (МК-ВЭЖХ) коммерческих препаратов *C. officinalis*. а – настойка (ООО “Тюльская фармацевтическая фабрика”, 010312), б – экстракт жидкий (ОАО “Арура”, 100913), в – экстракт сухой (ОАО “Арура”, 150513), г – отвар (‘Русский размер’, 15.VII.2013). Условия: элюент А [0.2 M LiClO₄ в 0.006 M HClO₄ – 0.01 M SDS (1:1)] элюент В [MeCN]; режим элюирования: 11-18% В (0-5 мин), 18% В (5-9 мин), 18-20% В (9-10 мин), 20% В (10-16 мин), 100% (16-20 мин); v 150 мкл/мин; детектор 330 (пунктир) и 360 нм (линия). Числами обозначено положение соединений: 1 – 4CQA, 2 – 3CQA, 3 – CA, 4 – Q-3-(Rha²Rha⁶)Glc, 5 – Q-3-(Rha²)Glc, 6 – Ir-3-(Rha²Rha⁶)Glc, 7 – Q-3-(Rha⁶)Glc, 8 – Q-3-Glc, 9 – Ir-3-(Rha²)Glc, 10 – 1,3-dCQA, 11 – Ir-3-(Rha⁶)Glc, 12 – Ir-3-Glc, 13 – Ir-3-(Ac⁶)Glc, 14 – 4,5-dCQA.

Суммарное содержание идентифицированных фенольных соединений в коммерческих и интродуцированных образцах¹ цветков *C. officinalis* составило 0.70-1.55 и 1.31-1.95%, соответственно, в том числе фенилпропаноидов / флавоноидов – 0.18/0.44-0.38/0.97 и 0.12/1.19-0.36/1.60%, соответственно (табл. 1).

Производные изорамнетина являются доминирующими компонентами комплекса фенольных соединений и составляют 62-78% от общего содержания данного класса соединений и 83-87% от суммы флавоноидов (0.44-1.33%). К числу основных флавоноидов относятся изорамнетин-3-*O*-(6"-рамнозил)глюкозид (нарциссин; 0.2-0.8%) и изорамнетин-3-*O*-(ди-2'',6''-рамнозил)глюкозид (тифанеозид; 0.19-0.46%). На долю производных кверцетина приходится не более 13-17% от общего содержания флавоноидов (0.08-0.26%).

Фенилпропаноиды представлены как моно-, так и ди-кофеилхинными кислотами; доминирование отдельных компонентов зависит от партии или сорта сырья.

Выявленные особенности накопления определенных групп фенольных компонентов характерны для всех изученных препаратов *C. officinalis*: производные изорамнетина являются доминирующим классом соединений (табл. 2, 3). Данный факт указывает на сохранность компонентного профиля у готовых лекарственных форм в сравнении с исходным сырьем.

¹ Для коммерческих образцов представлены данные анализа для двух партий сырья, с наименьшим и наибольшим содержанием; для интродуцированных образцов – для двух сортов с наибольшим содержанием.

Табл. 1. Содержание фенольных соединений в цветках *C. officinalis*, мг/г (производитель / сорт, серия / дата сбора)

Соединение	Коммерческое сырье				Интродуцированное сырье			
	ООО “Лекс+” (010112)		ОАО “Аптека ЦВМ” (250612)		‘Русский размер’ (15.VII.2013)		‘Солнце Египта’ (25.VII.2013)	
	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$
<i>Фенилпропаноиды</i>								
CA	0.100	0.003	0.187	0.005	0.105	0.003	0.035	0.001
3CQA	0.625	0.018	1.299	0.036	0.955	0.027	0.334	0.009
4CQA	0.452	0.012	0.392	0.011	0.243	0.007	0.131	0.004
1,3-dCQA	0.397	0.013	1.463	0.041	1.977	0.055	0.647	0.018
4,5-dCQA	0.218	0.005	0.496	0.014	0.283	0.008	0.095	0.003
Σ	1.792		3.837		3.563		1.242	
<i>Производные кверцетина</i>								
Q-3-Glc	0.357	0.010	0.937	0.027	0.776	0.022	0.718	0.020
Q-3-Rha ² Glc	0.216	0.006	0.245	0.005	0.571	0.015	0.337	0.009
Q-3-Rha ⁶ Glc	0.090	0.002	0.289	0.007	0.795	0.019	0.145	0.003
Q-3-Rha ^{2,6} Glc	0.145	0.004	0.425	0.011	0.497	0.012	0.340	0.009
Σ	0.808		1.896		2.639		1.540	
<i>Производные изорамнетина</i>								
Ir-3-Glc	0.158	0.003	0.343	0.008	0.116	0.004	0.112	0.003
Ir-3-Ac ⁶ Glc	0.146	0.004	0.390	0.010	0.436	0.011	0.556	0.014
Ir-3-Rha ² Glc	0.143	0.003	0.357	0.008	0.356	0.009	0.292	0.007
Ir-3-Rha ⁶ Glc	2.005	0.048	4.688	0.117	7.982	0.207	4.829	0.115
Ir-3-Rha ^{2,6} Glc	1.942	0.050	3.937	0.102	4.442	0.124	4.588	0.124
Σ	4.394		9.715		13.332		10.377	
Σ флавоноидов	5.202		11.611		15.971		11.917	
Σ соединений	6.994		15.448		19.534		13.159	

Табл. 2. Содержание фенольных соединений в готовых лекарственных формах *C. officinalis* (производитель, серия)

Соединение	Настойка (ОАО “Флора Кавказа”, 090812), мкг/мл		Настойка (ООО “Тульская фармацевтическая фабрика”, 010312), мкг/мл		Экстракт жидкий (ОАО “Арура”, 100913), мкг/мл		Экстракт сухой (ОАО “Арура”, 150513), мг/г	
	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$
<i>Фенилпропаноиды</i>								
CA	7.15	0.21	19.79	0.59	88.43	2.65	0.79	0.02
3CQA	36.90	1.14	104.89	3.25	484.56	12.60	6.07	0.17
4CQA	10.08	0.28	22.10	0.64	86.91	2.05	1.32	0.03
1,3-dCQA	26.67	0.72	49.84	1.25	317.22	8.24	3.61	0.10
4,5-dCQA	25.35	0.76	67.49	1.95	231.56	6.48	2.12	0.06
Σ	106.15		264.11		1208.68		13.91	
<i>Производные кверцетина</i>								
Q-3-Glc	36.70	0.88	62.99	1.63	230.14	5.98	2.96	0.09
Q-3-Rha ² Glc	18.53	0.50	42.71	1.11	214.04	4.50	2.29	0.07
Q-3-Rha ⁶ Glc	7.66	0.20	12.50	0.35	69.02	1.79	1.26	0.04
Q-3-Rha ^{2,6} Glc	9.06	0.26	25.55	0.74	135.72	3.34	1.62	0.05
Σ	71.95		143.75		648.92		8.13	
<i>Производные изорамнетина</i>								
Ir-3-Glc	28.51	0.66	35.11	0.84	148.08	4.44	0.84	0.02
Ir-3-Ac ⁶ Glc	сл.	-	1.33	0.04	24.32	0.63	1.26	0.03
Ir-3-Rha ² Glc	11.87	0.28	16.67	0.41	101.09	2.42	0.42	0.01
Ir-3-Rha ⁶ Glc	145.85	4.08	163.33	4.40	1085.95	26.07	17.54	0.49
Ir-3-Rha ^{2,6} Glc	158.94	3.81	225.87	5.87	1238.80	37.16	13.80	0.37
Σ	345.17		442.31		2598.24		33.86	
Σ флавоноидов	417.12		586.06		3247.16		41.99	
Σ соединений	523.27		850.17		4455.84		55.90	

К числу наиболее обогащенных лекарственных форм относятся сухой и жидкий экстракты, содержащие 5.59 и 0.45% фенольных соединений, соответственно, в т.ч. флавоноидов / фенилпропаноидов – 3.39/1.39 и 0.32/0.12%, соответственно.

Настойки, настои и отвары, представляют собой лекарственные формы, полученные по малоэкстенсивной технологии, что отражается на качестве готового продукта. Так, суммарное содержание флавоноидов в изученных партиях настоек не превышало 0.06%, что почти в 5.5 раз меньше такового в жидком экстракте и более чем в 70 раз меньше, чем в сухом экстракте.

Табл. 3. Содержание фенольных соединений в галеновых жидких лекарственных формах *C. officinalis*, мкг/мл

Соединение	Коммерческое сырье (ОАО “Аптека ЦБМ”, 250612)				Интродуцированное сырье (‘Русский размер’, 15.VII.2013)			
	настой		отвар		настой		отвар	
	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$	<i>x</i>	$\pm SD$
<i>Фенилпропаноиды</i>								
CA	17.12	0.59	12.72	0.33	8.71	0.25	17.54	0.45
3CQA	63.01	1.51	79.40	2.30	70.62	1.48	75.54	1.96
4CQA	77.21	2.00	111.97	3.47	96.45	2.79	98.76	2.07
1,3-dCQA	47.20	1.36	61.82	1.61	51.16	1.27	51.43	1.18
4,5-dCQA	7.19	0.17	38.12	0.91	17.24	0.45	31.23	0.81
Σ	211.73		304.03		244.18		274.50	
<i>Производные кверцетина</i>								
Q-3-Glc	25.08	0.72	29.20	0.70	40.29	1.16	44.34	0.97
Q-3-Rha ² Glc	17.29	0.50	20.75	0.63	30.80	0.67	34.22	0.71
Q-3-Rha ⁶ Glc	5.33	0.15	7.17	0.21	11.32	0.25	13.63	0.31
Q-3-Rha ^{2,6} Glc	15.89	0.31	15.72	0.39	17.95	0.56	22.92	0.52
Σ	63.59		72.84		100.36		115.11	
<i>Производные изорамнетина</i>								
Ir-3-Glc	5.26	0.14	10.52	0.23	14.36	0.32	13.78	0.34
Ir-3-Ac ⁶ Glc	34.75	1.01	36.64	0.95	15.70	0.41	17.07	0.43
Ir-3-Rha ² Glc	8.11	0.21	8.68	0.19	8.89	0.18	10.76	0.27
Ir-3-Rha ⁶ Glc	142.12	3.12	145.39	3.78	193.71	4.64	211.48	6.13
Ir-3-Rha ^{2,6} Glc	192.44	5.01	225.56	6.31	186.03	3.72	211.91	6.35
Σ	382.68		426.79		418.69		465.00	
Σ флавоноидов	446.27		499.63		519.05		580.11	
Σ соединений	658.00		803.66		763.23		854.61	

Следует отметить, что ранние сведения о количественном содержании флавоноидов в препарате “Настойка календулы” около 0.2-0.3% [12, 13], слишком завышены. Одной из вероятных причин этого явления является то, что метод, используемый для анализа (дифференциальная спектрофотометрия) не позволяет проводить селективное определение группы флавоноидов.

Сравнительный анализ количественных показателей настоек и водных галеновых форм (настои и отвары) из цветков *C. officinalis*, показал, что последние не уступают, а в ряде случаев превосходят по качеству спиртовые формы (табл. 3). Например, содержание флавоноидов / фенилпропаноидов в галеновых формах составило 0.05-0.06/0.02-0.03%, соответственно, что близко к таковым показателям настоек (0.04-0.06/0.01-0.03%, соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о возможности проведения адекватной замены настоек отварами или настоями, при неосуществимости применения последних (детский возраст, аллергия на этанол и др.).

Учитывая сведения о допустимых нормах приема различных лекарственных форм из цветков *C. officinalis*, нами были рассчитаны показатели суточного потребления двух групп действующих соединений – фенилпропаноидов и флавоноидов (табл. 4).

Табл. 4. Суточное потребление фенилпропаноидов и флавоноидов при приеме лекарственных форм из цветков *C. Officinalis*

Лекарственная форма	Норма потребления	Суточное потребление при приеме, мг/г	
		фенилпропаноиды	флавоноиды
Настойка	2-3 мл/сут.	0.5-0.8	1.2-1.7
Экстракт жидкий	1-2 мл/сут.	1.2-2.4	3.3-6.5
Экстракт сухой	0.1-0.3 г/сут.	1.4-2.1	4.2-6.3
Настой	100-150 мл/сут.	24-36	52-78
Отвар	100-150 мл/сут.	30-46	58-87

Представленные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на некоторую архаичность таких лекарственных форм, как настой и отвар, их применение позволяет добиться максимального приема биологически активных соединений (в 70-90 раз больше, чем при приеме настоек). Согласно сведениям о рекомендуемых уровнях потребления пищевых и

биологически активных веществ, показатель адекватного суточного уровня потребления для флавонол-гликозидов составляет около 30 мг/сут., а верхний допустимый предел – 100 мг/сут.; для фенилпропаноидов эти показатели составляют 10 и 20 мг/сут., соответственно [14]. Таким образом, прием 100 мл отвара (настоя) цветков *C. officinalis* позволяет удовлетворить суточную потребность организма в данных соединениях.

Заключение

Мицеллярные модификаторы подвижной фазы в методе микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии (МК-ВЭЖХ) положительно влияют на характер разделения фенилпропаноидов и флавонол-гликозидов в условиях МК-ВЭЖХ. Впервые проведено сравнительное изучение химического состава и определено количественное содержание 14 фенольных соединений (5 фенилпропаноидов и 9 флавоноидов) в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и некоторых лекарственных препаратах из данного вида растительного сырья.

Выводы

1. Микроколоночная ВЭЖХ может быть успешно использована для анализа растительных объектов, содержащих структурно близкие соединения групп фенилпропаноидов и флавоноидов.
2. Разработанная методика ВЭЖХ-анализа позволяет определять содержание 14 маркерных компонентов цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) и применима для исследования исходного растительного сырья и некоторых препаратов (настойки, экстракты, настои, отвары).

Используемые сокращения

МК-ВЭЖХ – микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография; *фенилпропаноиды*: 3CQA – 3-*O*-кофеилхинная кислота, 4CQA – 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5CQA – 5-*O*-кофеилхинная кислота, 1,5-dCQA – 1,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 3,5-dCQA – 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-dCQA – 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, СА – кофейная кислота; *производные кверцетина*: Q – кверцетин, Q-3-Gal – кверцетин-3-*O*-галактозид (гиперозид), Q-3-Glc – кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин), Q-3-Rha – кверцетин-3-*O*-рамнозид (кверцитрин), Q-3-Ara – кверцетин-3-*O*-арабинозид (авикулярин), Q-3-(Ac⁶)Glc – кверцетин-3-*O*-(6"-ацетил)глюкозид, Q-3-(Rha²)Glc – кверцетин-3-*O*-(2"-рамнозил)глюкозид (календофлавобиозид), Q-3-(Rha⁶)Glc – кверцетин-3-*O*-(6"-рамнозил)глюкозид (рутин), Q-3-(Rha²)Rha – кверцетин-3-*O*-(2"-рамнозил)рамнозид, Q-3-(Rha^{2,6})Glc – кверцетин-3-*O*-(ди-2",6"-рамнозил)глюкозид (мангаслин); *производные изорамнетина*: Ir – изорамнетин, Ir-3-Glc – изорамнетин-3-*O*-глюкозид, Ir-3-(Ac⁶)Glc – изорамнетин-3-*O*-(6"-ацетил)глюкозид, Ir-3-(Rha²)Glc – изорамнетин-3-*O*-(2"-рамнозил)глюкозид (календофлавозид), Ir-3-(Rha⁶)Glc – изорамнетин-3-*O*-(6"-рамнозил)глюкозид (нарциссин), Ir-3-(Rha²)Rha – изорамнетин-3-*O*-(2"-рамнозил)рамнозид (календофлазид), Ir-3-(Rha^{2,6})Glc – изорамнетин-3-*O*-(ди-2",6"-рамнозил)глюкозид (тифаноизид).

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФИ 12-03-31547(мол_а).

Литература

- [1] K.A. Khalid, J.A. Teixeira da Silva. Biology of *Calendula officinalis* Linn.: Focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Med. Arom. Plant Sci. Biotechnol.* **2012**. Vol.6. P.12-27.
- [2] D.N. Olennikov, N.I. Kashchenko. New isorhamnetin glucosides and other phenolic compounds from *Calendula officinalis*. *Chem. Nat. Comp.* **2013**. Vol.49. P.717-723.
- [3] A.I. Derkach, N.F. Komissarenko, V.T. Chernobai. Coumarins of the inflorescences of *Calendula officinalis* and *Helichrysum arenarium*. *Chem. Nat. Comp.* **1986**. Vol.22. P.722-723.
- [4] A. Szakiel, D. Ruskowski, W. Janiszowska. Saponins in *Calendula officinalis* L. – structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochem. Rev.* **2005**. Vol.4. P.151-158.

- [5] J. Varljen, A. Lipták, H. Wagner. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*. **1989**. Vol.28. P.2379-2383.
- [6] V. Kaškonienė, P. Kaškonas, M. Jalinskaitė, A. Maruška. Chemical composition and chemometric analysis of variation in essential oil of *Calendula officinalis* L. during vegetation stages. *Chromatographia*. **2011**. Vol.73. P.S163-S169.
- [7] P. Pietta, R.M. Facino, M. Carini, H. Mauri. Thermospray liquide chromatography-mass spectrometry of flavonol glycosides from medicinal plants. *J. Chrom. A*. **1994**. Vol.661. P.121-126.
- [8] I.Z. Matic, Z. Juranic, K. Savikin, G. Zdunic, N. Nadvinski, D. Godevac. Chamomile and marigold tea: Chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytother. Res*. **2013**. Vol.26. P.852-858.
- [9] Полуденный Л.В., Сотник В.Ф., Хлапцев Е.Е. Эфирномасличные и лекарственные растения. М.: Колос. **1979**. 286с.
- [10] Государственная Фармакопея СССР: 11 изд. М.: Медицина. **1990**. 398с.
- [11] D.N. Olennikov, M.Yu. Kruglova. New quercetin glucoside and other phenolic compounds from *Filipendula* genus. *Chem. Nat. Comp*. **2013**. Vol.49. P.524-529.
- [12] Костенникова З.П., Панова Г.А., Драмбраускене З. Количественное определение флавоноидов в настойке календулы методом УФ-спектрофотометрии. *Фармация*. **1984**. №6. С.33-35.
- [13] Слуева Е.К., Жукович Е.Н., Шарикова Л.А., Прибыткова Т.Ф., Деревщикова Е.Б. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке календулы. *Фармация*. **2003**. №1. С.13-15.
- [14] Рациональное питание. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных соединений. Методика. МР № 2.3.1.1915-04 от 2 июля **2004** г.