

Спектрофотометрический анализ фенольных соединений календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). Ревизионное исследование существующих методов.

© **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. Факс: +7 (3012) 43-47-43. E-mail: olennikovdn@mail.ru.

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: *Calendula officinalis*, Asteraceae, флавоноиды, фенилпропаноиды, спектрофотометрия, твердофазная экстракция.

Аннотация

Проведено ревизионное исследование спектрофотометрических методик анализа фенольных соединений в *Calendula officinalis* L., включая фармакопейные, нормативные и другие, предложенные ранее для исследования данного растительного вида. Выявлено, что ни одна из существующих методик не позволяет осуществить правильный и количественный анализ фенольных соединений в *C. officinalis*. Разработана новая методика количественного анализа флавоноидов и фенилпропаноидов с применением твердофазной экстракции и спектрофотометрии. Валидационные исследования показали, что методика удовлетворительными показателями правильности, точности, линейности и воспроизводимости.

Введение

Calendula officinalis L. (календула лекарственная) – известное лекарственное растение семейства Asteraceae, имеющее более чем вековой опыт применения в официальной медицине большинства стран мира. Данный растительный вид относится к числу многотоннажного культивируемого сырья, занимающего по площади выращивания второе место, уступая только ромашке аптечной [1].

Наукометрические исследования свидетельствуют о постоянно растущем интересе к изучению *C. officinalis* со стороны ученых различных отраслей науки – биологов, фармакологов, фитохимиков и других. Анализ данных литературы о химическом составе данного вида свидетельствует о его разнообразии; известно о присутствии терпеноидов и их гликозидов, стероидов, каротиноидов, простых фенолов, бензойных кислот, фенилпропаноидов, флавоноидов, кумаринов и алифатических соединений [2-4].

В России к числу разрешенных к использованию видов лекарственного сырья *C. officinalis* относятся “Ноготков цветки” [5] и “Календулы трава” [6]. Нормативные документы, принятые в XX в. либо не содержат разделов о количественной стандартизации сырья по действующим веществам, либо включают устаревшие рекомендации, которые не могут быть использованы для адекватного анализа сырья. Согласно современным требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP) к лекарственным средствам, необходимым условием является разработка правильной системы контроля качества растительного сырья и с применением чувствительных методов анализа. Опыт ряда ведущих мировых Фармакопей, а также частных исследований, в области анализа сырья и готовых лекарственных форм из *C. officinalis* свидетельствует об отсутствии правильных и селективных методов анализа фенольных соединений данного растительного вида.

Количественный анализ действующих веществ в *C. officinalis* с применением метода ВЭЖХ, безусловно, обоснован в ходе производства готового продукта, но для экспресс-ана-

иза культивируемого сырья было бы уместно применение более доступных методов, таких как спектрофотометрия. Ранее данный спектральный метод неоднократно использовался для научных исследований и стандартизации *C. officinalis* [7-12¹], однако к настоящему времени не было проведено сравнительного изучения существующих вариантов спектрофотометрических методик на предмет определения их правильности и точности анализа.

Целью настоящего исследования является ревизионное исследование существующих спектрофотометрических методик анализа фенольных соединений в *C. officinalis* и разработка новой методики количественного определения флавоноидов и фенилпропаноидов.

Экспериментальная часть

Растительное сырье и препараты. Образцы *C. officinalis* (сорта 'Большая оранжевая', 'Солнце Египта', 'Языки пламени', 'Гейша', 'Индийский принц', 'Радио', 'Красная с черным центром') были выращены в открытом грунте на экспериментальных плантациях ИОЭБ СО РАН (2013 г.) из аутентифицированных семян, полученных в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (Москва, Россия). Для культивирования были использованы рекомендованные для *C. officinalis* агро-технические условия [13]. Сбор цветков проводили в фазу массового цветения. Образцы сырья хранятся в гербарии ИОЭБ СО РАН (№ FAs/to-15/06-12/0813i – FAs/to-15/12-12/0813i). Коммерческое сырье и препараты были приобретены через аптечную сеть, в том числе цветки календулы лекарственной [ООО "Лекс+" (010112), ОАО "Аптека ЦВМ" (250612)], "Настойка календулы" [ООО "Тульская фармацевтическая фабрика" (010312)], "Экстракт календулы жидкий" [ОАО "Арура" (100913)], "Экстракт календулы сухой" [ОАО "Арура" (150513)].

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). Остальные реактивы имели степень чистоты чда.

ВЭЖХ. Исследования проводили на микроколонном 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). Условия анализа описаны ранее [14].

Методика количественного анализа флавоноидов и фенилпропаноидов методом твердофазной экстракции/спектрофотометрии. Около 0.8 г (точная навеска) измельченного сырья переносили в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и приливали 50 мл 60% этанола. Колбу помещали в ультразвуковую ванну и озвучивали при 40 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл через фильтр. Фильтр с сырьем переносили в экстракционную колбу и повторяли экстракцию еще один раз в тех же условиях. Объем объединенного извлечения доводили до метки 60% этанолом (раствор А). 4 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки водой (раствор Б). 5 мл раствора Б наносили на преколонизированный 96% этанолом и водой полиамидный патрон (1 г), после чего его промывали 20 мл воды. Далее патрон элюировали 20 мл 96% этанола в мерную колбу вместимостью 25 мл, в мерную колбу вносили 2 мл 5% раствора алюминия хлорида в 96% этаноле и доводили объем раствора до метки 96% этанолом (раствор В1). Далее патрон элюировали 20 мл 0.5% раствора NH_3 в 96% этаноле в мерную колбу вместимостью 25 мл, в мерную колбу вносили 100 мкл кислоты уксусной и доводили объем раствора до метки 96% этанолом (раствор В2). Оптическую плотность раствора В1 (флавоноиды) определяли через 15 мин при длине волны 410 нм, используя в качестве раствора сравнения раствор В1, приготовленный аналогичным образом без внесения алюминия хлорида. Оптическую плотность раствора В2 (фенилпропаноиды) определяли при длине волны 326 нм, используя в качестве раствора сравнения 96% этанол. Суммарное содержание групп соединений рассчитывали по формуле: $X = \frac{A \cdot k^V}{m} \cdot \frac{m_s}{A_s \cdot k_s^V} \cdot \frac{100}{100 - W} \cdot 1000$, где A и A_s – оптическая

плотность исследуемого раствора и раствора рабочего стандартного образца (РСО); k^V и k_s^V – коэффициент разбавления исследуемого раствора и раствора РСО; m и m_s – масса навески исследуемого образца и РСО, г; W – потеря в массе при высушивании исследуемого образца, %; 1000 – коэффициент пересчета в мг. В качестве РСО применяли нарциссин ($\geq 95\%$; Extrasynthese; анализ флавоноидов) и 3-О-кофеилхинную кислоту ($\geq 93\%$; Sigma-Aldrich; анализ фенилпропаноидов).

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).

¹ Приведены ссылки на избранные статьи, т.к. создание полного библиографического перечня исследований по данной проблеме не входит в рамки настоящей работы.

Результаты и их обсуждение

Европейская фармакопея (EPH) предлагает проведение количественного анализа флавоноидов в цветках *C. officinalis* с использованием процедуры, включающей экстракцию растительного сырья с одновременным гидролизом в среде ацетон/НСI/гексаметилентетрамин [15]. После экстракции полученное извлечение разбавляют водой и подвергают жидкофазной экстракции этилацетатом, далее органический слой доводят до определенного объема и используют в качестве рабочего раствора.

Аналитическая реакция, регистрируемая дифференциальным спектрофотометрическим методом ($\Delta\epsilon$ -метод), заключается в образовании окрашенного комплекса между компонентами рабочего раствора и $AlCl_3$ в среде этилацетат/метанол/кислота уксусная. Длительность процедуры составляет около 4-5.5 ч.

Выбор столь сложной и многостадийной процедуры анализа обусловлен тем фактом, что цветки *C. officinalis* не являются накопителем какого-либо одного «спектрообразующего» соединения, спектральные свойства которого могли бы сформировать спектр суммарного извлечения из растительного сырья. С целью «упрощения» химического состава рабочего раствора было принято решение использовать этап гидролиза, приводящего к образованию агликонов флавоноидов, компонентный состав которых ограничен двумя соединениями – кверцетином и изорамнетином. Правильность выбора условий для гидролиза подтверждается результатами хроматографического анализа: после гидролиза в рабочем растворе обнаруживается только два агликona (изорамнетин и кверцетин); флавоноидные гликозиды отсутствуют (рис. 1а).

Согласно рекомендациям EPh референтным веществом при расчете количественного содержания флавоноидов является гиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид), являющийся гликозидом кверцетина. В этой связи возникает ряд вопросов:

- почему при расчетах содержания агликонов используются спектральные параметры гликозида, хотя известно, что величины экстинкции агликонов значительно выше таковых для гликозидов; подобное несоответствие может привести к заведомо завышенным результатам анализа;
- учитывая сведения о химическом составе *C. officinalis*, непонятной является рекомендация о применении производного кверцетина, хотя доминирующей группой флавоноидов являются дериваты изорамнетина, спектральные свойства которых отличаются от таковых кверцетина.

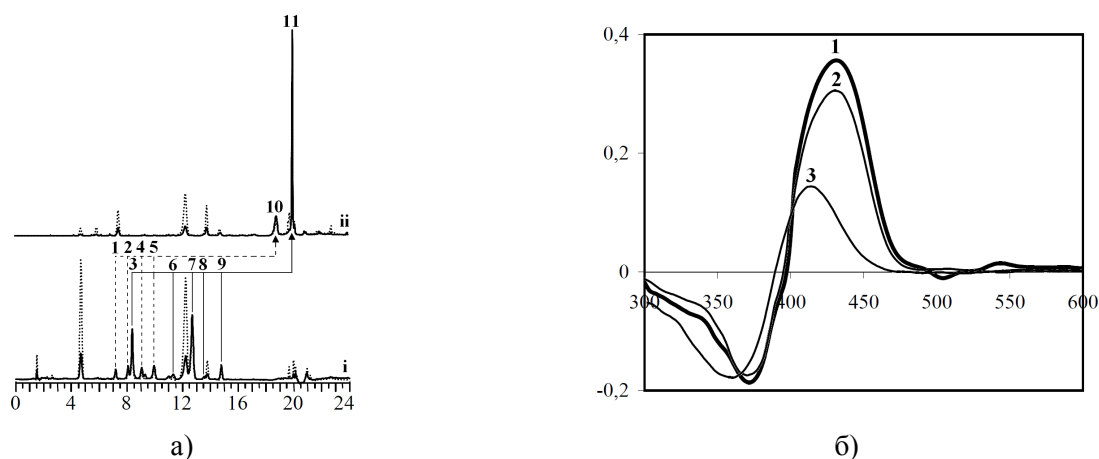


Рис. 1. а) Хроматограммы извлечения из цветков *C. officinalis* до (i) и после гидролиза (ii) [λ 330 (пунктир), 360 нм (линия)]. Числами обозначено положение соединений: 1 – Q-3-(Rha^{2,6})Glc, 2 – Q-3-(Rha²)Glc, 3 – Ir-3-(Rha^{2,6})Glc, 4 – Q-3-(Rha⁶)Glc, 5 – Q-3-Glc, 6 – Ir-3-(Rha²)Glc, 7 – Ir-3-(Rha⁶)Glc, 8 – Ir-3-Glc, 9 – Ir-3-(Ac⁶)Glc, 10 – Q, 11 – Ir. б) Дифференциальные спектры гидролизата цветков *C. officinalis* (1), изорамнетина (2; 20 мкг/мл) и гиперозида (3; 20 мкг/мл) после взаимодействия с $AlCl_3$.

Сравнительный анализ дифференциальных спектров гидролизата цветков *C. officinalis*, изорамнетина и гиперозида показал, что экстремумы для рабочего раствора из растительного сырья и изорамнетина совпадают (433 ± 2 нм) (рис. 1б). Для гиперозида наблюдается максимум

в более коротковолновой области (410 ± 2 нм), что более чем на 20 нм отличается от такового рабочего раствора. Учитывая, что допустимое отклонение максимума спектра у рабочего раствора не должно превышать $\pm 4-5$ нм, использование гиперозида в качестве вещества сравнения не может гарантировать получение правильных результатов.

Исследование трех партий растительного сырья с применением метода EPh выявило, что при использовании гиперозида наблюдается завышение результатов на 80-86%, от таковых, полученных с использованием изорамнетина (табл. 1). Следует отметить, что многостадийность метода и использование таких неколичественных операций, как жидкофазная экстракция и концентрирование в вакууме, приводит к высокой относительной ошибке определения (ΔE) – 6.90-9.58%, превышающей рекомендованный показатель в 5%.

Табл. 1. Суммарное содержание флавоноидов в цветках *C. officinalis*, определенное по методу EPh ($n = 7$)

Характеристика сырья (партия, дата сбора)	Вещество-сравнения						$\left[\frac{x_1}{x_2} \cdot 100\right] - 100, \%$
	Гиперозид			Изорамнетин			
	x_1 , мг/г	$\pm SD$	ΔE , %	x_2 , мг/г	$\pm SD$	ΔE , %	
Коммерческий образец, ОАО “Аптека ЦВМ” (250612)	5.537	0.459	8.28	3.018	0.226	7.49	83.47
Коммерческий образец, ООО “Лекс+” (010112)	1.367	0.131	9.58	0.759	0.072	9.49	80.11
Интродукция, сорт ‘Русский размер’ (15 VII 2013)	4.751	0.328	6.90	2.561	0.179	6.99	85.51

Согласно ранним сведениям [14], суммарное содержание флавоноидов в изученных париях сырья, определенное с применением метода ВЭЖХ, было выше и составило, например, для цветков сорта ‘Русский размер’ 15.971 мг/г, что более чем в 3 раза отличается от результатов метода EPh.

Проведенные исследования метода EPh указывают на две серьезные ошибки, не позволяющие рассматривать его в качестве оптимального инструмента для анализа цветков *C. officinalis*:

- использование гидролитической процедуры, изменяющей нативный состав анализируемой матрицы веществ, а также отсутствие в расчетной формуле некоего коэффициента пересчета из агликоны в гликозиды приводит к заведомо заниженным данным о количественном содержании флавоноидов;
- неудачный выбор референтного вещества также приводит к снижению результатов.

Близкий к методу EPh вариант анализа флавоноидов *C. officinalis*, включающий гидролиз флавоноидов 6% H_2SO_4 , с последующими этапами фильтрования фракции агликонов и спектрофотометрическим определением, включен в нормативную документацию на настойку [7] и траву календулы [6]. Для анализа препарата Калефлон (очищенная фракция флавоноидов *C. officinalis*) применяют 0.6 М HCl и цинк-уранил ацетат в качестве аналитического агента [8]. В обоих вариантах референтным веществом является кверцетин.

Табл. 2. Суммарное содержание флавоноидов в цветках *C. officinalis*, определенное модифицированными гидролитическими методами ($n = 7$)

Характеристика сырья (партия, дата сбора)	Вариант анализа	Метод анализа					
		НД “Настойка календулы”			НД “Калефлон”		
		x_1 , мг/г	$\pm SD$	ΔE , %	x_2 , мг/г	$\pm SD$	ΔE , %
Коммерческий образец, ОАО “Аптека ЦВМ” (250612)	параллельный	3.517	0.182	4.72	3.002	0.186	6.20
	последовательный	3.525	0.341	9.67	3.114	0.386	12.40
Коммерческий образец, ООО “Лекс+” (010112)	параллельный	0.784	0.037	4.72	0.541	0.030	5.55
	последовательный	0.791	0.078	9.86	0.557	0.065	11.67
Интродукция, сорт ‘Русский размер’ (15.VII.2013)	параллельный	3.105	0.167	5.38	2.490	0.122	4.90
	последовательный	3.102	0.347	11.18	2.506	0.310	12.37

Полученные результаты близки к таковым метода EPh, однако на 30-50% ниже, что указывает на недостаток выбора условий гидролиза флавоноидных гликозидов. Относительная ошибка в серии параллельных определений составила 4.72-6.20%, что близко к допустимому уровню ошибки, однако для серии последовательных определений величина ошибки

возрастает до 9.67-12.40%. К одному из наиболее вероятных источников столь высокой ошибки следует отнести последовательность этапов осаждения агликонов, фильтрации и промывания осадков на фильтре. Для подтверждения данного явления была проведена серия экспериментов по количественному гидролизу флавонол-гликозидов (рутина и нарциссина) в данных условиях (табл. 3).

Табл. 3. Эффективность модифицированных гидролитических методов для количественного гидролиза флавонол-гликозидов

Соединение	Навеска, мг	Получено агликона, мг					
		Метод анализа					
		НД "Настойка календулы"			НД "Калефлон"		
		теор.	эксп.	Δ , %	теор.	эксп.	Δ , %
Рутин (кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид)	10	4.95	3.15	-36.36	4.95	2.04	-58.77
	25	12.38	9.04	-26.98	12.38	8.15	-34.17
	50	24.75	18.67	-24.55	24.75	16.04	-35.19
Нарциссин (изорамнетин-3- <i>O</i> -рутинозид)	10	5.06	2.67	-47.23	5.06	2.09	-58.70
	25	12.66	10.04	-20.70	12.66	8.15	-35.62
	50	25.32	18.04	-28.75	25.32	15.27	-39.69

Ни один из исследованных методов не позволил осуществить гидролиз с эффективностью 95-100%. Применение 6% H_2SO_4 приводит к занижению результатов на 20.70-47.23%; для 0.6 М HCl данный показатель составил 34.17-58.77%. Таким образом, полученные результаты однозначно доказывают неэффективность подобных методик для количественного анализа флавоноидов в *C. officinalis*.

К числу наиболее часто используемых относится метод, использующий дифференциальную спектрофотометрию спиртового извлечения без предварительной обработки пробы с последующим пересчетом результатов в эквивалентах рутин. Данный метод включен в Фармакопею Белоруссии в качестве альтернативного [16], а также был описан во множестве работ, посвященных количественному анализу *C. officinalis* [7-12].

Принципиальных отличий в технике исполнения аналитических процедур нет; основные изменения направлены на выявление оптимального экстрагента или подбор условий образования аналитического сигнала. Метод характеризуется простотой выполнения, удовлетворительной воспроизводимостью результатов и относительной безопасностью. Дает ли этот метод анализа достаточно правильные результаты? Имеющиеся сведения, представленные в доступной литературе, не позволяют дать утвердительный ответ. В этой связи нами было проведено ревизионное исследование метода дифференциальной спектрофотометрии, используя данные ВЭЖХ в качестве референтных показателей.

На первом этапе было изучено спектральное поведение двух доминирующих соединений – нарциссина и 3-*O*-кофеилхинной кислоты, представителей основных классов веществ *C. officinalis* – флавонол-гликозидов и фенилпропаноидов. В результате установлено, что наличие экстремума в области 410-412 нм характерно только для нарциссина (рис. 2а).

Интенсивность поглощения в данной области для 3-*O*-кофеилхинной кислоты составляет не более 15-20% от таковой основного экстремума при 345 нм. В спектре смеси указанных соединений присутствуют все характеристические пики, отмеченные для спектров индивидуальных соединений. Расчетные данные свидетельствуют о том, что для аддитивного спектра смеси в области основного максимума флавоноидов наблюдается завышение оптической плотности.

Определение концентраций флавоноидов в растворах индивидуальных соединений и их смесей показывает, что при анализе нарциссина ошибка метода не превышает величины 1% и может быть как положительной, так и отрицательной (табл. 4). Анализ растворов 3-*O*-кофеилхинной кислоты дает ложноположительный результат, так как при полном отсутствии флавоноидов в растворе наблюдаются положительные значения оптических плотностей.

Данное явление особенно выражено при исследовании смесей веществ; завышение данных может составлять до 20% от истинного значения, что, в конечном счете, может сказаться на результатах анализа реальных объектов.

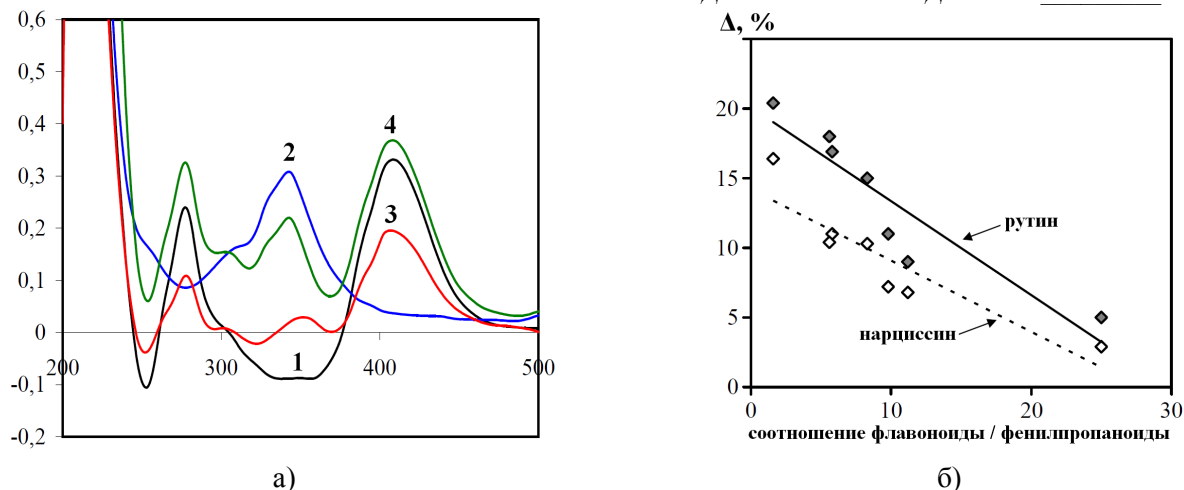


Рис. 2. а) Дифференциальные спектры соединений: **1** – нарциссин (25 мкг/мл), **2** – 3-*O*-кофеилхинная кислота (25 мкг/мл), **3, 4** – смесь нарциссина и 3-*O*-кофеилхинной кислоты (экспериментальный спектр, по 12.5 мкг/мл – **3**, расчетный спектр, по 25 мкг/мл – **4**). б) Зависимость ошибки определения флавоноидов (Δ, %) от соотношения суммарного содержания флавоноидов / фенилпропаноидов в цветках *C. officinalis* с использованием двух референтных соединений (рутин, нарциссин).

Табл. 4. Концентрация флавоноидов, определенная в растворах индивидуальных соединений и смесей, с использованием дифференциальной спектрофотометрии ($n = 9$)

Соединение	Концентрация соединения, мкг/мл	Концентрация флавоноидов, мкг/мл		Δ, %
		теор.	эксп.	
Нарциссин	25.00	25.00	25.12	+0.48
3- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	25.00	0.00	2.41	- ^б
Смесь веществ ^а	25.00/25.00	25.00	27.84	+11.36
Нарциссин	12.50	12.50	12.47	-0.24
3- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	12.50	0.00	1.35	- ^б
Смесь веществ ^а	12.50/12.50	12.50	13.94	+11.52
Смесь веществ ^а	25.00/12.50	25.00	26.53	+6.12
Смесь веществ ^а	12.50/25.00	12.50	14.90	+19.20

^а концентрация нарциссина / 3-*O*-кофеилхинной кислоты; ^б – ложноположительный результат.

Результаты анализа цветков *C. officinalis* с применением указанного метода свидетельствуют о том, что во всех случаях наблюдается завышение результатов на 5.0-20.4% от таковых, полученных методом ВЭЖХ (табл. 5). Следует отметить, что на величину ошибки непосредственное влияние оказывает содержание фенилпропаноидов в сырье; так, для сорта 'Языки пламени', для которого наблюдается максимальное значение ошибки (+20.4%), соотношение флавоноидов и фенилпропаноидов составило 1.6:1, а для сорта 'Солнце Египта' (ошибка +5.0%) – 25:1. Данные регрессионного анализа подтверждают данное явление – зависимость ошибки определения флавоноидов от соотношения суммарного содержания флавоноидов / фенилпропаноидов в цветках *C. officinalis* описывается уравнением линейной регрессии ($Y = -0.675 \cdot X + 20.103$) с величиной коэффициента детерминации $r^2 = 0.8483$ (рис. 2б). Применение нарциссина в качестве референтного вещества снижает показатели ошибки на 3-6%, но также не позволяет добиться правильных результатов.

Следует учесть, что на химический состав лекарственного растительного сырья влияет множество различных факторов (сорт, условия культивирования и хранения и др.), то есть оно не является матрицей с постоянным составом, даже в пределах одного ботанического вида. В этой связи выбор неких унифицированных условий анализа, позволяющих учесть описанные выше недостатки и добиться получения правильных результатов, не представляется возможным.

Учитывая недостатки существующих методов спектрофотометрического анализа цветков *C. officinalis*, нами рассмотрена возможность создания удобного метода, позволяющего проводить правильное определение количественных показателей для данного вида растительного сырья. В качестве альтернативного подхода для решения данной проблемы предла-

гается известный методический подход, объединяющий сорбционные метод разделения классов фенольных соединений, в качестве которого выбрана твердофазная экстракция на полиамидном патроне, и спектрофотометрический метод детектирования, объединенные под общим названием твердофазная экстракции / спектрофотометрия (ТФЭ/СФМ). Ранее проблема разделения флавоноидных гликозидов и фенилпропаноидов была удачно решена с использованием ТФЭ/СФМ при анализе *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. [18], *Panzerina lanata* (L.) Sojak. [19], *Scutellaria galericulata* Fisch. ex. Schrank [20] и некоторых других видов.

Табл. 5. Суммарное содержание флавоноидов и фенилпропаноидов в цветках 7 сортов *C. Officinalis*

Показатель	Сорт <i>C. officinalis</i>													
	‘Большая оранжевая’		‘Солнце Египта’		‘Языки пламени’		‘Гейша’		‘Индийский принц’		‘Радио’		‘Красная с черным центром’	
	x	±SD	x	±SD	x	±SD	x	±SD	x	±SD	x	±SD	x	±SD
<i>ВЭЖХ (n = 3). Суммарное содержание</i>														
Флавоноиды	25.30	0.61	17.24	0.44	9.75	0.19	18.10	0.56	15.60	0.48	17.41	0.50	14.35	0.43
Фенилпропаноиды	2.26	0.05	0.69	0.02	5.97	0.18	3.14	0.08	1.87	0.04	1.77	0.05	2.57	0.06
Соотношение ^a	11.2		25.0		1.6		5.8		8.3		9.8		5.6	
<i>Дифференциальная спектрофотометрия (n = 9). Суммарное содержание флавоноидов (референтное соединение)</i>														
Рутин	27.58	0.61	18.10	0.38	11.74	0.35	21.16	0.61	17.94	0.44	19.32	0.59	16.93	0.44
Δ, % ^b	+9.0		+5.0		+20.4		+16.9		+15.0		+11.0		+18.0	
Нарциссин	27.01	0.60	17.75	0.27	11.35	0.27	20.09	0.48	17.21	0.41	18.66	0.52	15.84	0.38
Δ, % ^b	+6.8		+2.9		+16.4		+11.0		+10.3		+7.2		+10.4	
<i>ТФЭ/СФМ (n = 7). Суммарное содержание</i>														
Флавоноиды	25.64	0.32	17.59	0.24	9.80	0.15	18.42	0.25	15.48	0.25	17.70	0.29	14.38	0.24
Δ, % ^b	+1.34		+2.03		+0.51		+1.77		-0.76		+1.67		+0.21	
Фенилпропаноиды	2.28	0.04	0.70	0.01	5.95	0.11	3.16	0.05	1.88	0.03	1.79	0.03	2.60	0.05
Δ, % ^b	+0.89		+1.45		-0.34		+0.64		+0.54		+1.12		+1.17	

^a соотношение суммарного содержания флавоноидов к таковому фенилпропаноидов; ^b ошибка определения в сравнении с данными ВЭЖХ.

Учитывая недостатки существующих методов спектрофотометрического анализа цветков *C. officinalis*, нами рассмотрена возможность создания удобного метода, позволяющего проводить правильное определение количественных показателей для данного вида растительного сырья. В качестве альтернативного подхода для решения данной проблемы предлагается известный методический подход, объединяющий сорбционные метод разделения классов фенольных соединений, в качестве которого выбрана твердофазная экстракция на полиамидном патроне, и спектрофотометрический метод детектирования, объединенные под общим названием твердофазная экстракции / спектрофотометрия (ТФЭ/СФМ). Ранее проблема разделения флавоноидных гликозидов и фенилпропаноидов была удачно решена с использованием ТФЭ/СФМ при анализе *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. [18], *Panzerina lanata* (L.) Sojak. [19], *Scutellaria galericulata* Fisch. ex. Schrank [20] и некоторых других видов.

Общая процедура ТФЭ заключается в нанесении пробы на полиамидный патрон, предварительно преколонизированный этанолом и водой, и последующей элюцией фракций последовательно водой, 95% этанолом и 0.5% раствором NH₃ в 95% этаноле. Вода позволяет удалить несорбируемые компоненты, такие как углеводы, аминокислоты и другие водорастворимые компоненты, ухудшающие качество последующего анализа. В результате элюции 95% этанолом и 0.5% раствором NH₃ в 95% этаноле можно получить фракции, содержащие флавоноиды (агликоны и гликозиды) и фенилпропаноиды, соответственно.

Анализ спектров поглощения элюатов после ТФЭ свидетельствует о значительном улучшении аналитических параметров для спиртовых извлечений из цветков *C. officinalis*. Водная фракция не содержит компонентов, поглощающих в диапазоне длин волн 300-400 нм, и не дает положительные реакции на флавоноиды и фенилпропаноиды, что подтверждается данными ВЭЖХ (рис. 3а). Для спиртового элюата характерно наличие спектра поглощения, типичного для флавонол-гликозидов (рис. 3а).

Сравнительный анализ хроматограмм необработанного извлечения и данной фракции указывает на переход всех маркерных флавоноидов в элюат (рис. 3б). Аналогичная картина наблюдается для щелочного элюата, содержащего все основные производные кофейной кис-

лоты. Таким образом, применение ТФЭ на полиамиде позволяет разделить две доминирующие группы фенольных соединений, входящих в состав цветков *C. officinalis*.

Данные количественного анализа элюатов свидетельствуют практически о количественном определении групп флавоноидов и фенилпропаноидов (табл. 5). Ошибка определения в сравнении с методом ВЭЖХ составила для флавоноидов -0.76 - +2.03%, фенилпропаноидов - -0.34 - +1.45%, что свидетельствует об удовлетворительной правильности метода.

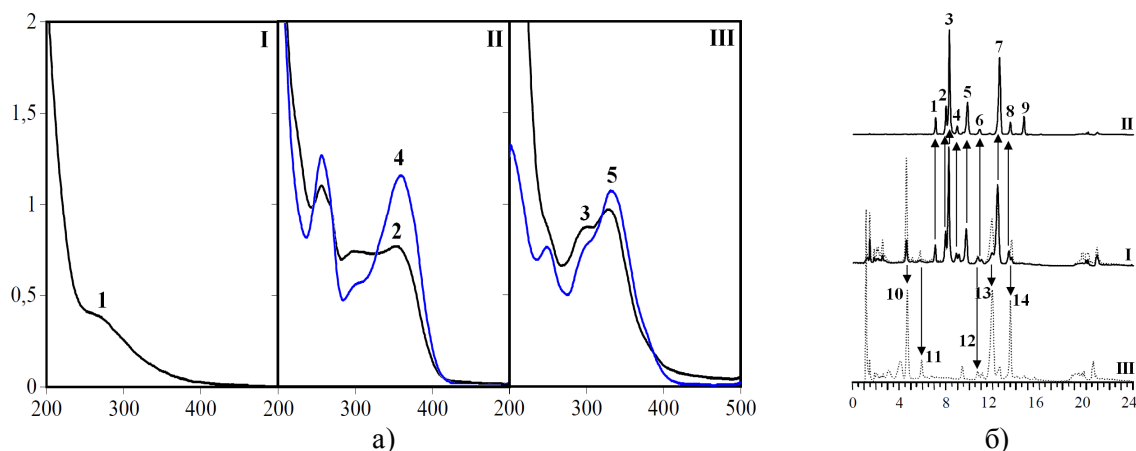


Рис. 3. а) Спектры поглощения элюатов после ТФЭ (1-3) и растворов веществ сравнения (4, 5). Элюент: 1 – вода, 2 – 95% этанол, 3 – 0.5% раствор NH_3 в 95% этаноле. Соединения: 4 – нарциссин, 5 – 3-О-кофеилхинная кислота. б) Хроматограммы (ВЭЖХ) спиртового извлечения из цветков *C. officinalis* (I) и элюатов после ТФЭ (II – 95% этанол, III – 0.5% раствор NH_3 в 95% этаноле). Числами обозначено положение соединений: 1 – Q-3-(Rha^{2,6})Glc, 2 – Q-3-(Rha²)Glc, 3 – Ir-3-(Rha^{2,6})Glc, 4 – Q-3-(Rha⁶)Glc, 5 – Q-3-Glc, 6 – Ir-3-(Rha²)Glc, 7 – Ir-3-(Rha⁶)Glc, 8 – Ir-3-Glc, 9 – Ir-3-(Ac⁶)Glc, 10 – 3-CQA, 11 – CA, 12 – 3,5-dCQA, 13 – 1,3-dCQA, 14 – 4,5-dCQA.

Валидационный анализ показал, что зависимость оптической плотности от концентрации индивидуальных соединений в диапазоне концентрации 5-150 мкг/мл описывалась линейной регрессией со значением коэффициентов детерминации 0.9978-0.9982 (табл. 6).

Табл. 6. Валидационные параметры методики количественного анализа флавоноидов и фенилпропаноидов методом ТФЭ/СФМ

Показатель	Индивидуальное соединение		Группа соединений	
	Нарциссин	3-О-Кофеилхинная кислота	Флавоноиды	Фенилпропаноиды
Линейность (r^2)	0.9978	0.9982	-	-
Диапазон линейности, мкг/мл	10-150	5-100	-	-
S_{yx}	$1.78 \cdot 10^{-2}$	$1.16 \cdot 10^{-2}$	-	-
LOD, мкг/мл	2.54	0.84	-	-
LOQ, мкг/мл	7.70	2.55	-	-
Воспроизводимость ^б , %	1.42	1.14	1.74	1.50
Правильность:				
день-в-день ^б , %	1.90	1.47	2.64	1.96
день-через-день ^б , %	2.18	1.94	2.98	2.11
Точность ^б , %	98.20-102.14	98.83-101.16	97.34-102.54	98.04-102.07

Величины пределов детектирования (LOD) / количественного определения (LOQ) нарциссина и 3-О-кофеилхинной кислоты составили 2.54 / 7.70 и 0.84 / 2.55 мкг/мл, соответственно. Показатели воспроизводимости и правильности не превышали 2.2%, а точность методики, определенная для пяти уровней концентрации (80-120%) составила 98.20-102.14%. Для групп соединений показатели воспроизводимости и правильности не превышали 3%, а точность составила 97.34-102.54%. Валидационные исследования показали, что разработанная методика соответствует критериям приемлемости и может быть использована для аналитических целей.

Сравнительный анализ некоторых показателей методик EPh и ТФЭ/СФМ показали, что последняя отличается большей экспрессностью, меньшей себестоимостью и количеством токсичных компонентов, а также большей эффективностью (табл. 7).

Разработанная методика была апробирована для анализа других видов сырья из *C. officinalis* (травы, листья) и некоторых готовых лекарственных форм из цветков данного растительного вида (настойка, экстракты жидкий и сухой).

Для всех изученных образцов завышение результатов в сравнении с данными ВЭЖХ не превышало 2.5%, что свидетельствует о широких возможностях применения метода в практической фармации для анализа сырья и препаратов *C. officinalis* (табл. 8).

Табл. 7. Некоторые показатели эффективности методов анализа флавоноидов в цветках *C. officinalis* методами EPh и ТФЭ/СФМ

Показатель	EPh	ТФЭ/СФМ
Время анализа 1 образца ($n = 7$)	7-8.5 ч	2-2.5 ч
Себестоимость анализа 1 образца	~ 12 EUR	~ 2 EUR
Токсичные реагенты (LD_{50} , г/кг / ПДК, мг/л)	метанол (0.42/1), ацетон (3.0/200), этилацетат (11.3/200)	этанол (10-45/1000)
Определяемые группы соединений	1 (флавоноиды)	2 (флавоноиды, фенилпропаноиды)
Правильность метода	низкая	высокая
Относительная ошибка определения, %	6-10	1.5-2.5

Табл. 8. Суммарное содержание флавоноидов в некоторых видах сырья и препаратах *C. officinalis*, определенное методами ТФЭ/СФМ и ВЭЖХ

Объект	Метод анализа											
	ТФЭ/СФМ						ВЭЖХ					
	флавоноиды			фенилпропаноиды			флавоноиды			фенилпропаноиды		
	x	$\pm SD$	ΔE , %	x	$\pm SD$	ΔE , %	x	$\pm SD$	ΔE , %	x	$\pm SD$	ΔE , %
Листья ^a , мг/г	6.26	0.09	1.44	20.49	0.42	2.05	6.11	0.12	1.96	20.17	0.48	2.38
Трава ^b , мг/г	11.09	0.18	1.62	3.02	0.06	1.98	10.91	0.26	2.28	2.95	0.08	2.71
Настойка ^b , мкг/мл	599.72	9.89	1.65	267.38	5.80	2.16	586.06	11.56	1.97	264.11	7.68	2.91
Экстракт жидкий ^г , мг/мл	3.29	0.04	1.22	1.23	0.02	1.63	3.25	0.07	2.18	1.21	0.03	2.65
Экстракт сухой ^д , мг/г	42.69	0.65	1.52	14.04	0.26	1.85	41.99	0.92	2.19	13.91	0.38	2.73

^a Интродукция, сорт 'Языки пламени', дата сбора 20.VIII.2013; ^b Интродукция, сорт 'Русский размер', дата сбора 25.VIII.2013;

^в ООО "Тульская фармацевтическая фабрика", серия 010312; ^г ОАО "Арура", серия 100913; ^д ОАО "Арура", серия 150513.

Заключение

Существующие спектрофотометрические методы определения количественного содержания фенольных соединений (флавоноидов) в сырье и препаратах *Calendula officinalis* делятся на две группы: деструктивные (гидролитические), изменяющие нативный компонентный состав растительного сырья (аналитические агенты – флавоноидные агликоны), и недеструктивные, аналитическими агентами в которых являются исходные соединения (флавоноидные гликозиды). Для первой группы методов характерно получение значительно заниженных результатов анализа (более чем в 3 раза от реального). Данные измерений недеструктивных методик приводят к завышению результатов, вследствие совместного присутствия флавоноидов и фенилпропаноидов в сырье. Использование комбинированного метода твердофазной экстракции/спектрофотометрии позволяет получить правильные результаты, отражающие реальные количественные соотношения искомых классов соединений в *C. officinalis*.

Выводы

1. Известные спектрофотометрические методы определения флавоноидов в сырье и препаратах *Calendula officinalis* не позволяют определить реальное содержание данной группы соединений. Использование существующих методик приводит к заниженным (гидролитические методы) или завышенным результатам (дифференциальная спектрофотометрия).
2. Последовательное применение твердофазной экстракции на полиамиде и спектрофотометрии для анализа сырья и препаратов *Calendula officinalis* позволяет определить содержание двух доминирующих классов фенольных соединений – флавоноидов и фенилпропаноидов. Метод характеризуется высокой точностью (разница с данными ВЭЖХ не превышает 3%), простотой и экономичностью, и может быть рекомендован для применения в практической фармации.

Используемые сокращения

3CQA – 3-О-кофеилхинная кислота, 1,3-dCQA – 1,3-ди-О-кофеилхинная кислота, 3,5-dCQA – 3,5-ди-О-кофеилхинная кислота, 4,5-dCQA – 4,5-ди-О-кофеилхинная кислота, СА – кофейная кислота; производные кверцетина: Q – кверцетин, Q-3-Glc – кверцетин-3-О-глюкозид (изокверцитрин), Q-3-(Rha²)Glc – кверцетин-3-О-(2''-рамнозил)глюкозид (календофлавобиозид), Q-3-(Rha⁶)Glc – кверцетин-3-О-(6''-рамнозил)глюкозид (рутин), Q-3-(Rha^{2,6})Glc – кверцетин-3-О-(ди-2'',6''-рамнозил)глюкозид (мангаслин); производные изорамнетина: Ir – изорамнетин, Ir-3-Glc – изорамнетин-3-О-глюкозид, Ir-3-(Ac⁶)Glc – изорамнетин-3-О-(6''-ацетил)глюкозид, Ir-3-(Rha²)Glc – изорамнетин-3-О-(2''-рамнозил)глюкозид (календофлавозид), Ir-3-(Rha⁶)Glc – изорамнетин-3-О-(6''-рамнозил)глюкозид (нарциссин), Ir-3-(Rha²)Rha – изорамнетин-3-О-(2''-рамнозил)рамнозид (календофлазид), Ir-3-(Rha^{2,6})Glc – изорамнетин-3-О-(ди-2'',6''-рамнозил)-глюкозид (тифаноэзид).

Благодарности

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

Литература

- [1] Куркин В.А., Шарова О.В., Афанасьева П.В., Вельмисева Л.Е., Федоров А.В. Перспективы создания высокопродуктивной сырьевой базы календулы лекарственной. *Изв. Самарск. научн. центра РАН*. **2012**. Т.14. С.2249-2252.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] D.N. Olennikov, N.I. Kashchenko. Componential profile and amylase inhibiting activity of phenolic compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. *The Scientific World Journal*. **2014**. Vol.2014. Art. ID 654193.
- [5] Государственная Фармакопея СССР. Москва: Медицина. **1990**. Вып.2. С.237-238.
- [6] Трава календулы. ТУ 9375-090-04868244-98. М. **1998**.
- [7] Костенникова З.П., Панова Г.А., Драмбраускене З. Количественное определение флавоноидов в настойке календулы методом УФ-спектрофотометрии. *Фармация*. **1984**. №6. С.33-35.
- [8] Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: Наука. **1990**. 335с.
- [9] Слеува 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.
- [10] Куркин В.А., Шарова О.В. Разработка методик стандартизации цветков ноготков. *Фармация*. **2007**. №8. С.11-13.
- [11] Кобраков К.И., Целикова Г.А., Маланкина Е.Л., Кузнецова Л.В. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной различных сортов. *Бутлеровские сообщения*. **2011**. Т.28. №19. С.16-20.
- [12] M. Butnariu, C.Z. Coradini. Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chem. Central J.* **2012**. Vol.6. Art. ID 35.
- [13] Полуденный Л.В., Сотник В.Ф., Хлапцев Е.Е. Эфирномасличные и лекарственные растения. М.: Колос. **1979**. 286с.
- [14] Кашенко Н.И., Оленников Д.Н. Количественный анализ фенольных соединений в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) методом микроколоночной ВЭЖХ. *Бутлеровские сообщения*. **2013**. Т.36. №12. С.66-74.
- [15] Calendula Flower. Art. No 01/2005:1297. *European Pharmacopoeia 5.0*. **2005**. P.1169-1170.
- [16] Ноготков цветки (Календулы цветки). Государственная Фармакопея Республики Беларусь. Минск: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении. **2007**. Т.II. С.385-387.
- [17] V. Švehlíková, R.N. Bennett, F.A. Mellon, P.W. Needs, S. Piacente, P.A. Kroon, Y. Bao. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*. **2004**. Vol.65. P.2323-2332.
- [18] D.N. Olennikov, L.M. Tankhaeva. Chemical investigation of *Panzerina lanata*. *Chem. Nat. Comp.* **2011**. Vol.47. P.802-804.
- [19] D.N. Olennikov, N.K. Chirikova. Phenolic compounds and cinnamamide from *Scutellaria scordiifolia*. *Chem. Nat. Comp.* **2013**. Vol.49. P.124-126.