

ВЭЖХ-АНАЛИЗ НАРЦИССИНА В ЦВЕТКАХ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

А.В. Куркина¹, доктор фармацевтических наук, доцент,
П.В. Афанасьева¹, **В.А. Куркин**^{1*}, доктор фармацевтических наук, профессор,
И.А. Платонов², доктор технических наук, профессор, **Л.В. Павлова**²

¹Самарский государственный медицинский университет;

Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

²Самарский государственный аэрокосмический университет им. академика С.П. Королева
(Национальный исследовательский университет);

Российская Федерация, 443086, Самара, Московское шоссе, д. 34

Введение – фармакологические свойства лекарственных препаратов цветков календулы обусловлены содержащимися в них флавоноидами, каротиноидами и сапонинами. Доминирующим веществом цветков календулы является флавоноид нарциссин (3-рутинозид-изорамнетина) (11, 12). Данное соединение было впервые выделено из календулы лекарственной методом колоночной хроматографии.

Цель исследования – разработка методики количественного определения флавоноида нарциссина (3-О-рутинозид изорамнетина) в цветках календулы лекарственной (*Flores Calendulae*).

Материал и методы. Объекты исследования – промышленные образцы цветков календулы. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ–этанол–вода (26:16:3). Регистрацию УФ-спектров осуществляли с помощью спектрофотометра «Spesord 40». Анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-анализ) проводили жидкостным хроматографом, хроматографической колонкой Phenomenex Luna C18(2) (250×4,6 мм; 5 мкм). Использовались стандартные образцы нарциссина (3-О-рутинозид изорамнетина), рутина (3-О-рутинозид кверцетина), изокверцитрина (3-О-β-D-глюкопиранозид кверцетина) и кверцетина.

Результаты. ТСХ-анализ показал, что доминирующим компонентом водно-спиртовых извлечений из цветков календулы является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), химическая структура которого близка к рутину, сопоставима с ним в подвижности и имеет близкие Rf и спектральные характеристики. Проведены исследования по разработке ВЭЖХ-методики количественного определения нарциссина в цветках календулы, с помощью которой вычислено его содержание в сырье.

Заключение. Разработана ВЭЖХ-методика количественного определения нарциссина в цветках календулы. Ошибка единичного определения разработанной методики с доверительной вероятностью 95% составляет ±4,97%. Содержание нарциссина в цветках календулы колеблется от 0,68±0,02 до 0,97±0,03%.

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

*E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Цветки календулы лекарственной или ноготков (*Flores Calendulae*) используются в отечественной и зарубежной медицине как противовоспалительные, регенерирующие, желчегонные, отхаркивающие лекарственные средства [1–3, 5, 8, 10]. Фармакологические свойства лекарственных препаратов цветков календулы обусловлены содержащимися в них флавоноидами, каротиноидами и сапонинами. Несмотря на изученность химического состава сырья, до сих пор в полной мере не решены проблемы его стандартизации [1–4, 13–16]. В фармакопейной статье на цветки ноготков, включенной в Государственную фармакопею (ГФ XI) СССР XI издания, предусмотрено определение содержания экстрактивных веществ [1]. В Европейской и Британской фармакопеях цветки календулы стандартизуют по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид, используя спектрофотометрию при длине волны 425 нм. Стандартизация цветков календулы в ГФ Республики Казахстан [2] сформулирована по аналогии с подходами Европейской и Британской фармакопей [13, 14]. Еще в большей мере противоречивость в подходах к стандартизации обнаруживается при определении подлинности цветков и препаратов календулы лекарственной, которое осуществляется, как правило, путем обнаружения рутина, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, галловой кислоты [13–16], не являющихся диагностическими веществами для сырья данного растения.

Как было установлено ранее, доминирующим веществом цветков календулы является флавоноид нарциссин (3-рутинозид-изорамнетина) [11, 12]. Данное соединение было впервые выделено из календулы лекарственной методом колоночной хроматографии, а методами ^1H -ЯМР и масс-спектрометрии было установлено его химическое строение [6, 11].

Определение данного компонента делает привлекательным использование не только ТСХ, но и ВЭЖХ, применяемой для фармакопейного анализа сырья и препаратов некоторых лекарственных растений [9, 13].

В зарубежных фармакопеях отсутствует опыт ВЭЖХ-анализа для стандартизации сырья календулы [2, 3, 13–16], однако в современной литературе приводятся данные о возможности применения метода ВЭЖХ для стандартизации сырья календулы [4, 10].

Некоторые авторы предлагают проводить анализ цветков календулы методом ВЭЖХ с использованием ГСО кверцетина [10]. На наш взгляд, кверцетин не является маркером для данного сы-

рья, так как содержится в следовых количествах, а кроме того, он наиболее распространенный в растениях флавоноидный агликон. Другие исследователи для 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-(6¹¹-ацетил) глюкозид [4].

Широкий спектр фармакологического действия цветков календулы (противовоспалительное, регенерирующее, антимикробное) обусловлен содержанием таких различных классов биологически активных соединений (БАС), как каротиноиды, флавоноиды (гликозиды кемпферола, кверцетина и изорамнетина), сапонины [5, 8]. Ранее нами были разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения флавоноидов в цветках ноготков с использованием ТСХ и спектрофотометрии [7]. Впоследствии этот подход как основной был взят и другими отечественными учеными [10]. Таким образом, анализ данных литературы показывает противоречивость подходов к анализу цветков и препаратов календулы лекарственной, которые ориентированы на различные группы БАС (флавоноиды, фенилпропаноиды, сапонины, каротиноиды), что не позволяет объективно оценивать качество сырья и лекарственных средств данного растения. Следовательно, разработка методик стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной с использованием современных методов анализа [12], включая ВЭЖХ, становится особенно актуальной.

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения содержания нарциссина в цветках календулы лекарственной с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – промышленные образцы цветков календулы лекарственной (ОАО «Красногорсклексредства», ЗАО «Самаралектравы», Средне-Волжский филиал ФГБНУ ВИЛАР).

ТСХ осуществляли на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ–этиловый спирт–вода (26:16:3). Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40». Использовались стандартные образцы нарциссина (3-О-рутинозид изорамнетина), рутина (3-О-рутинозид кверцетина), изокверцитрина (3-О- β -D-глюкопиранозид кверцетина) и кверцетина. ВЭЖХ-анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Biotronic»; хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (250×4,6 мм; 5 мкм), элюент А – метанол; элюент В – 0,01 М KH_2PO_4 ,

подкисленный H_3PO_4 до pH $3,00 \pm 0,01$, расход подвижной фазы – 0,6 мл/мин, объем инжестируемой пробы – 20 мкл. Режим элюирования – градиентный, трехступенчатый: элюент А 10% – 9 мин; подъем до 50% за 1 мин, 30 мин – 70% А. Рабочая длина волны – 254 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам ТСХ, на хроматограммах водно-спиртовых извлечений цветков календулы доминирующим компонентом является нарциссин

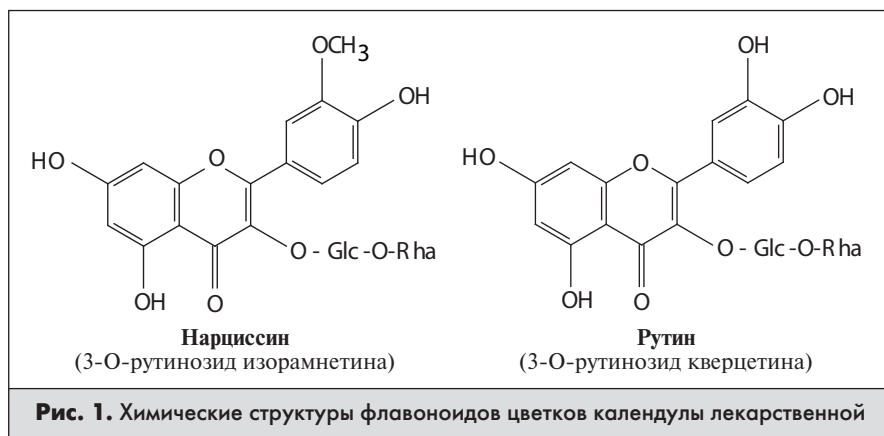


Рис. 1. Химические структуры флавоноидов цветков календулы лекарственной

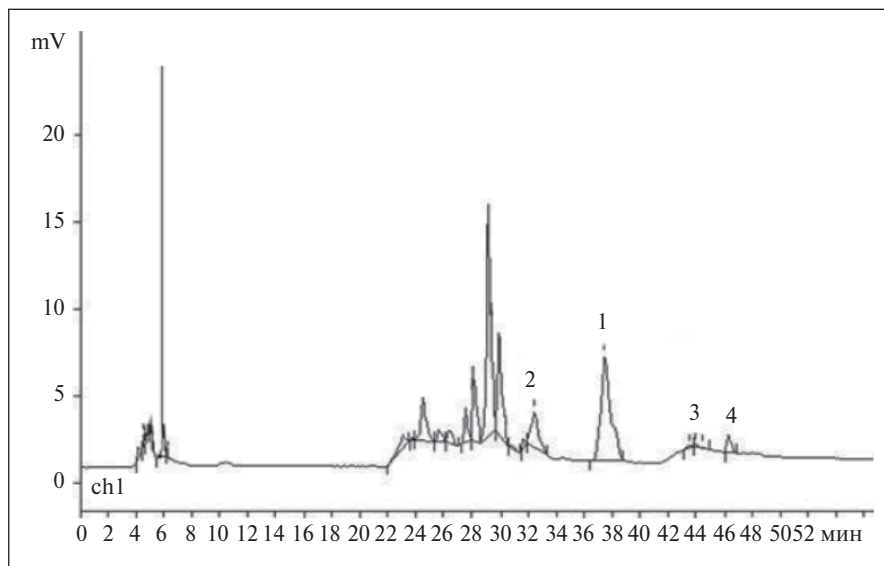


Рис.2. ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового извлечения цветков календулы лекарственной: 1 – нарциссин; 2 – рутин, 3 –кверцетин, 4 – изокверцитрин

(3-О-рутинозид изорамнетина), который при проявлении хроматограммы свежеприготовленным раствором диазобензолсульфо кислоты обнаруживается в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета с R_f около 0,45. Хроматографическая подвижность нарциссина очень близка к рутину (R_f около 0,4). Нарциссин по отношению к пятну ГСО рутина имеет значение R_s около 1,1. Ввиду сопоставимой подвижности и близких значений R_f , спектральных характеристик, а также химической структуры (рис. 1) часто ошибочно принимают зону нарциссина за рутин, что

находит отражение в методиках анализа [13, 14]. Расчет величины R_s позволит повысить объективность методики для анализируемого вещества.

Нарциссин в условиях ВЭЖХ-анализа может выступать в качестве маркера. В исследуемых условиях хроматографирования он имеет время удерживания около 37 мин и хорошо отделяется от других компонентов цветков календулы (рис. 2). Принимая во внимание схожие физико-химические и спектральные характеристики нарциссина и рутина, а также доступность и широкое применение рутина как стандартного образца в фармакопейном анализе лекарственного растительного сырья (ЛРС), целесообразно использовать рутин в методике ВЭЖХ-анализа цветков календулы в качестве внешнего стандарта.

Время удерживания нарциссина составило $37,42 \pm 0,10$ мин (табл. 1). При хроматографировании пробы рабочего стандартного образца (РСО) нарциссина методом ВЭЖХ время удерживания анализируемого вещества составило $37,83 \pm 0,10$ мин, что подтверждает корректность разделения компонентов в водно-спиртовом извлечении цветков календулы. В данных условиях в анализируемом извлечении также установлено наличие рутина, содержание которого составляет $0,28 \pm 0,01\%$ (см. табл. 1). В минорных количествах были обнаружены изокверцитрин ($0,06 \pm 0,02\%$) и кверцетин ($0,04 \pm 0,04\%$). Со-

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ В ЦВЕТКАХ КАЛЕНДУЛЫ

№ пика	Флавоноид	Время удерживания, мин	Содержание, %
1	Нарциссин	$37,42 \pm 0,10$	$0,68 \pm 0,03$
2	Рутин	$32,64 \pm 0,12$	$0,28 \pm 0,02$
3	Кверцетин	$43,87 \pm 0,10$	$0,040 \pm 0,002$
4	Изокверцитрин	$43,46 \pm 0,13$	$0,060 \pm 0,002$

Таблица 2

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАРЦИССИНА В ЦВЕТКАХ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

n	f	\bar{X}	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
11	10	0,68	0,0152	95	2,23	$\pm 0,034$	$\pm 4,97$

держание доминирующего соединения (нарциссина) в цветках календулы, определенное методом ВЭЖХ, колеблется от $0,68 \pm 0,02\%$ до $0,97 \pm 0,03\%$.

Методика количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Колбу закрывают пробкой, взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) при температуре 85–90°C в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

20 мкл полученного водно-спиртового извлечения вводится в жидкостной хроматограф «Biotronic» с УФ-детектором. Введенную пробу хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме: хроматографическая колонка «Phenomenex Luna C18(2)» (250×2,0 мм); элюентная система – 0,01 М раствор KH_2PO_4 , подкисленный H_3PO_4 до pH 3,0 (буферный раствор), и метанол (90:10; 50:50; 70:30); скорость элюирования – 0,6 мл/мин. Режим элюирования – градиентный, трехступенчатый: метиловый спирт – буферный раствор (10:90); с 10-й мин: метиловый спирт – буферный раствор (50:50); с 30-й мин: метиловый спирт – буферный раствор (70:30). УФ-детектирование проводят при длине волны 254 нм.

Параллельно в жидкостный хроматограф вводят 20 мкл раствора рутина и хроматографируют в тех же условиях. На хроматограмме испытуемого раствора определяют площадь пика нарциссина со временем удерживания около 37 мин и относительным временем удерживания по сравнению с пиком ГСО рутина около 1,10–1,15. Рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Параллельно измеряют площадь пика рутина на хроматограмме стандартного образца рутина (внешний стандарт). Рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание нарциссина в цветках календулы лекарственной в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_1 \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{S_0 \times m \times V_0 \times V_2 \times (100 - W)}$$

где S – площадь пика нарциссина на хроматограмме испытуемого образца; S_0 – площадь пика на хроматограмме стандартного образца рутина; m – навеска сырья, г; m_0 – масса ГСО рутина, г; V_1 – объем извлечения, мл; V_0 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_2 – объем раствора ГСО рутина, мл; – объем вводимой пробы раствора ГСО рутина, мкл; W – влажность сырья, %.

Примечания. 1. *Приготовление раствора государственного стандартного образца рутина:* около 0,02 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки и перемешивают. Объем вводимой пробы составляет 20 мкл.

2. Приготовление элюента для ВЭЖХ.

Навеску калия гидрофосфата (ЧДА ГОСТ 2493-75) 1,36 г переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и разбавляют водой до метки, перемешивают. Полученный раствор подкисляют раствором ортофосфорной кислоты до pH $3,00 \pm 0,01$. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,4–0,5 мкм. Раствор дегазируют с помощью ультразвуковой ванны непосредственно перед анализом. Раствор годен в течение 1 мес.

3. *Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной при следующих условиях: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику рутина, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования показано, что для стандартизации цветков календулы целесообразно определять в ЛРС содержание доминирующего флавоноида нарциссина. Разработана методика количественного определения нарциссина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Содержание нарциссина в цветках календулы лекарственной, установленное с использованием данной методики, колеблется от $0,68 \pm 0,02$ до $0,87 \pm 0,03\%$. Метрологические характеристики методики, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что ошибка единичного определения разработанной методики с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,97\%$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР XI изд., вып. 2. М.: Медицина, 1990; 237–8.
2. Государственная фармакопея Республики Казахстан. I изд., т. 2. Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2009; 704–5.
3. Государственная фармакопея Украины. I изд., Доп. 4. Харьков, 2011; 540.
4. Кашченко Н.И. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): дис.... канд. фарм. наук. Улан-Удэ, 2014; 223.
5. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; СамГМУ, 2007; 1239.
6. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis*. Химия природных соединений, 2007; 2: 179–80.
7. Куркин В.А., Шарова О.В. Разработка методик стандартизации цветков ноготков. Фармация, 2007; 8: 11–3.
8. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия. М.: Медицина, 2002; 656.
9. Рыжов В.М., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Лужнов Н.Д. Перспективы использования ВЭЖХ для стандартизации

гепатопротекторного лекарственного средства «Силимар» // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 7. – С. 26–29.

10. Сампиев А.М., Хочава М.Р. Календула лекарственная. Краснодар: Советская Кубань, 2010; 144.
11. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация. Фармация, 2004; 2: 39–41.
12. Шарова О.В., Куркин В.А. Флавоноиды цветков календулы лекарственной. Химия растительного сырья, 2007; 1: 65–8.
13. British Pharmacopoeia, 6.0, vol. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. 2009; 6813–6.
14. European Pharmacopoeia. 8-th ed., vol. 1. Strasbourg: Council of Europe, 2014; 1456.
15. Francaise homeopatique pharmacopée, XE ed. Paris, 1989; 75–6.
16. German Homeopathic Pharmacopoeia (GHP). Stuttgart: Deutscher apotheker Verlag, 1993; 155–6.

Поступила 16 января 2016 г.

HPLC DETERMINATION OF NARCICICIN IN POT MARIGOLD (*CALENDULA OFFICINALIS*) FLOWERS

A.V. Kurkina¹, PhD; P.V. Afanasyeva¹; Professor V.A. Kurkin¹, PhD; Professor I.A. Platonov², PhD; L.V. Pavlova²

¹Samara State Medical University; 89, Chapaevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

²Academician S.P. Korolev Samara State Aerospace University (National Research University); 34, Moscovskoe Shosse, Samara 443086, Russian Federation

SUMMARY

Background. The pharmacological properties of pot marigold (*Calendula officinalis*) preparations are due to their containing flavonoids, carotenoids, and saponins. The dominant substance of pot marigold flowers is the flavonoid narcissin (isorhamnetin-3-rutinoside) (11, 12). This compound was first extracted from pot marigold by column chromatography.

Objective: to develop a procedure for quantification of the flavonoid narcissin (isorhamnetin-3-rutinoside) in the pot marigold flowers (*Flores Calendulae*).

Material and methods. The commercial samples of pot marigold flowers (OAO «Krasnogorskleksredstva, ZAO «Samaralektravy», Mid-Volga Branch, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants) were the subjects of the investigation. Thin-layer (TLC) chromatography was performed using Sorbfil HPTLC-AF-A-UV plates in the chloroform-ethanol-water (26:16:3). UV spectra were recorded applying a Specord 40 spectrophotometer (Analytic Jena). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out employing a Biotronic liquid chromatograph and a Phenomenex Luna C18(2) chromatographic column (250×4.6 mm; 5 μm). The standard samples of narcissin (isorhamnetin-3-O-rutinoside), rutin (quercetin-3-O-rutinoside), isoquercitrin (quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside), and quercetin.

Results. TLC analysis indicated that the predominant component of aqueous alcoholic extracts from pot marigold flowers was narcissin (isorhamnetin-3-O-rutinoside), the chemical structure of which was close to that of rutin, comparable with the latter in mobility, and had close R_f and spectral characteristics. Investigations were conducted to develop a HPLC procedure to assay narcissin in the pot marigold flowers, which made it possible to calculate it in raw materials.

Conclusion. The HPLC procedure was developed to quantify narcissin in the pot marigold flowers. The error of a single determination using the developed procedure with a 95% confidence probability was ±4.97%. The content of narcissin in the pot marigold flowers ranged from 0.68±0.02% to 0.97±0.03%.

Key words: pot marigold, *Calendula officinalis* L., flowers, flavonoids, narcissin, rutin, flavonoids, narcissin, rutin, High performance liquid chromatography, standardization.

REFERENCES

1. State Pharmacopoeia of the USSR. XI-th ed., vol.2. Moscow: Medicine, 1990; 400 (in Russian).
2. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. I-st ed., vol.2. Almaty: Publishing house «Zhibek Zholy», 2009; 704–5 (in Ukrainian).
3. The state Pharmacopoeia of Ukraine. I-st ed., suppl. 4. Kharkov, 2011; 540 (in Ukrainian).
4. Kashchenko N.I. Phytochemical study and improvement of methods for the standardization of the flowers and herbs of calendula (*Calendula officinalis* L.): dis.... cand. phar. sciences. Ulan-Ude, 2014; 223 (in Russian).
5. Kurkin V.A. Pharmacognosy. Samara: «Ofort»; GOU VPO «SamGMU Roszdrava», 2007; 1239 (in Russian).
6. Kurkin V.A., Sharova O.V. Flavonoids of the flowers of *Calendula officinalis*. Chemistry of Natural Compounds, 2007; 2: 179–80 (in Russian).
7. Kurkin V.A., Sharova O.V. Development of methods of standardization *Calendula officinalis* flowers. Farmatsiya, 2007; 8: 11–3 (in Russian).
8. Muravjeva D.A., Samylyina I.A., Jakovlev G.P. Pharmacognosy. Moscow: Medicine, 2002; 656 (in Russian).
9. Ryzhov V.M., Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Luzhnov N.D. The perspectives of the using of the HPLC for the standardization of the hepatoprotective pharmaceutical «Silymar» // Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry, 2010; 7: 26–9 (in Russian).
10. Sampiev A.M., Khochava M.R. *Calendula officinalis*. Krasnodar, Sovetskaya Kuban, 2010; 144 (in Russian).
11. Samylyina I.A., Balandina I.A. The pathways of the using of medicinal vegetative raw materials and its standardization. Farmatsiya, 2004; 2: 39–41 (in Russian).
12. Sharova O. V., Kurkin V. A. Flavonoids of the flowers of *Calendula officinalis*. Khimija Rastitel' nogo Syr' ja, 2007; 1: 65–8 (in Russian).
13. British Pharmacopoeia. 6.0, vol. III. Herbal drugs and herbal drug preparations. 2009; 6813–16.
14. European Pharmacopoeia. 8-th ed., vol.1. Strasbourg: Council of Europe, 2014; 1456.
15. Francaise homeopatique pharmacopée, XE ed. Paris, 1989 ; 75–6.
16. German Homeopathic Pharmacopoeia (GHP). Stuttgart: Deutscher apotheker Verlag, 1993; 155–6.