

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

АФАНАСЬЕВА ПОЛИНА ВАЛЕРИЕВНА

**КОМПЛЕКСНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*CALENDULA OFFICINALIS L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
доцент А.В. КУРКИНА

Самара - 2017

Оглавление

Введение		6
ГЛАВА 1.	АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1.	Анализ исторической справки и происхождения названия растения.....	16
1.2.	Систематическое положение и ботаническое описание календулы.....	19
1.3.	Сырьевая база. Заготовка и сушка. Агротехнические особенности.....	21
1.4.	Характеристика возможных примесных видов календулы лекарственной.....	22
1.5.	Характеристика микроскопических признаков (цветки, плоды, листья и стебли).....	23
1.6.	Химический состав различных органов календулы лекарственной.....	26
1.7.	Область применения надземной и подземной частей календулы лекарственной в народной и зарубежной медицине.....	35
1.8.	Фармакологическое действие сырья и препаратов календулы лекарственной, применение в современной медицине.....	35
1.9.	Фитопрепараты на основе календулы лекарственной.....	41
1.10.	Проблемы стандартизации календулы лекарственной.....	45
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	48
ГЛАВА 2.	ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1.	Объекты исследования.....	49

2.2.	Методы исследования.....	52
2.2.1.	Методики морфолого-анатомического анализа.....	52
2.2.2.	Физические методы анализа.....	53
2.2.3.	Химические методы анализа.....	54
2.2.4.	Хроматографические методы анализа.....	55
2.2.5.	Физико-химические методы анализа.....	58
2.2.6.	Технологические методы.....	59
2.2.7.	Фармакологические методы анализа.....	61
ГЛАВА 3.	МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ.....	63
3.1.	Морфолого-анатомическое исследование корневой системы календулы лекарственной.....	64
3.2.	Морфолого-анатомическое исследование плодов календулы лекарственной	70
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	73
ГЛАВА 4.	КОМПЛЕКСНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ...	74
4.1.	Выделение индивидуальных веществ из цветков календулы лекарственной сорта «Кальта», культивируемой в Самарской области.....	74
4.2.	Анализ фракций, представленных важнейшими индивидуальными веществами цветков календулы лекарственной.....	76
4.3.	Фитохимическое исследование надземной и подземной частей календулы лекарственной.....	84
4.4.	Определение динамики накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной.....	87

4.5.	Исследование сырья и препаратов календулы лекарственной методом ВЭЖХ.....	89
4.6.	Сравнительное газохроматографическое исследование различных органов календулы лекарственной и препаратов на основе цветков данного растения.....	93
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....		126
ГЛАВА 5.	СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ	128
5.1.	Совершенствование методов контроля качества сырья и препаратов календулы лекарственной.....	128
5.1.1.	ТСХ – анализ и спектрофотометрия.....	130
5.1.2.	Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	137
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....		133
ГЛАВА 6.	ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СИРОПОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ.....	134
6.1.	Описание состава и способа получения сиропа календулы лекарственной.....	134
6.2.	Аспекты стандартизации сиропа календулы лекарственной.....	134
6.2.1.	Качественный анализ сиропа календулы лекарственной...	134
6.2.2.	Количественное определение содержания суммы флавоноидов в сиропе календулы лекарственной.....	136
6.2.3.	Числовые показатели сиропа календулы лекарственной...	139
6.3.	Изучение влияния препаратов календулы лекарственной на экскреторную функцию почек.....	140

6.4.	Изучение острой токсичности лекарственных препаратов на основе цветков календулы лекарственной.....	143
6.5.	Изучение антимикробных свойств препаратов календулы лекарственной.....	144
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....	149
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	150
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	153
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	154
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	176
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В соответствии с Указами Президента Российской Федерации о стратегиях лекарственного обеспечения населения до 2025 года и стратегиях развития фармацевтической промышленности до 2020 года, импортозамещение лекарственных препаратов для страны становится более значимо. Фитопрепараты обладают рядом преимуществ по сравнению с лекарственными средствами синтетического происхождения: относительно низкий риск развития аллергии, более мягкий терапевтический эффект, достаточно широкий спектр терапевтического действия и безопасность (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007; Самылина И.А. и др., 2003; 2010).

Одним из наиболее известных лекарственных растений является календула лекарственная (ноготки лекарственные, *Calendula officinalis* L.), которая массово культивируется в Российской Федерации, причем в виде сортов, отличающихся высокой продуктивностью («Кальта», «Рыжик» и др.). Обширный спектр фармакологической активности цветков календулы (противовоспалительные, регенерирующие, антимикробные, желчегонные, отхаркивающие свойства) обоснован наличием разнообразных классов биологически активных веществ, а именно: каротиноидов, флавоноидов (гликозиды кемпферола, кверцетина и изорамнетина), сапонинов. Данный фактор делает календулу высокоперспективным ресурсом новых лекарственных растительных препаратов.

В настоящее время на территории РФ получают лишь один вид лекарственного растительного сырья, являющийся фармакопейным – цветки календулы. При этом огромное количество фитомассы растения (до 90%) не используется в медицинской практике.

Наряду с этим, в Европе трава календулы является фармакопейным видом лекарственного растительного сырья. Также литературный обзор показал интерес ряда отечественных и зарубежных ученых (Вечерко Л.П. 1971-1973, Wirginia Janiszowska W., 2005) к изучению корней календулы лекарственной в связи с содержащимися в них тритерпеновыми сапонинами, обуславливающими

отхаркивающее действие, что свидетельствует об актуальности комплексного изучения данного растения.

Кроме того, актуальным является создание высокопродуктивной базы календулы лекарственной.

Актуальным является и вопрос стандартизации фармакопейного вида цветков календулы лекарственной сорта Кальта, культивируемых на территории Самарской области. Необходим пересмотр и доработка методов качественного и количественного анализа, отвечающих современным требованиям.

Помимо фитохимических методов остро стоит и вопрос диагностики новых видов сырья методом морфолого-анатомического анализа. Таким образом, очевидна необходимость проведения сравнительного морфолого-анатомического исследования для выявления видовых диагностических признаков для подземной и надземной части календулы лекарственной.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день представлены методики стандартизации цветков календулы и фитопрепаратов данного растения с использованием различных аналитических методов, однако они не лишены ряда недостатков. Кроме того, морфолого-анатомические признаки цельного и измельченного сырья календулы лекарственной, диагностические признаки некоторых частей растения изучены в недостаточной степени.

Методики, применяемые в анализе сырья и препаратов календулы лекарственной, не всегда основаны на особенностях химического состава календулы лекарственной, поэтому в недостаточной степени специфичны. Так, в разделе «Подлинность» ФС.2.5.0030.15 (ГФ Российской Федерации XIII издания) предусматривается определение рутина в испытуемом сырье, однако доминирующим и диагностически значимым флавоноидом данного сырья является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина). В разделе «Количественное определение» представлен анализ флавоноидов, однако не предусмотрено количественное определение ведущей группы БАС – каротиноидов, тем более, что определение β -каротина предусмотрено в разделе «Подлинность» ГФ Российской Федерации XIII издания.

В научной литературе отражены результаты исследований по возможности использования остатков производства лекарственных средств из цветков календулы, однако, до сих пор задача сбережения ресурсов не решена в полном объеме (Бурцева И.В. и др., 2004).

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) по обоснованию методов стандартизации сырья и фитопрепаратов ноготков.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Морфологическое и анатомическое изучение целевых лекарственных растительных объектов (плоды, корни);
2. Изучение химического состава надземной и подземной частей ноготков в сравнительном аспекте (плоды, цветки, стебли, листья, корни);
3. Модификация методик качественного анализа цветков ноготков лекарственных;
4. Модификация методик количественного анализа цветков ноготков лекарственных;
5. Изучение показателей качества цветков календулы лекарственной;
6. Исследование фармакологического действия фитопрепаратов на основе календулы лекарственной;
7. Научное обоснование состава и методики получения сиропов ноготков лекарственных;
8. Разработка методик качественного анализа сиропов ноготков лекарственных;
9. Разработка методик количественного анализа сиропов на основе календулы лекарственной;
10. Изучение показателей сиропов календулы лекарственной;

11. Разработка проекта ФС на цветки календулы лекарственной.

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование корней календулы лекарственной позволило впервые выявить диагностические признаки, характерные для данного вида сырья.

Обоснованы методики анализа цветков и препаратов календулы лекарственной, основанные на определении действующих и диагностических веществ (нарциссина и β -каротина) методами ТСХ, УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

Изучение химического состава надземной и подземной частей календулы лекарственной предоставило возможность обосновать рациональность их комплексного применения.

Разработаны состав и способ получения лекарственного препарата на основе цветков календулы лекарственной - «Календулы лекарственной цветков сиропа».

Научная новизна диссертационных исследований подтверждено патентом № 2095227 Российской Федерации (2015). «Способ определения соответствия хроматографических пиков одному и тому же компоненту и устройство для его осуществления» и патентом № 2599016 Российской Федерации (2016). «Способ количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной».

Теоретическая и практическая значимость работы.

Модифицированы методики количественного определения флавоноидов и каротиноидов методом спектрофотометрии. Модификация заключается во введении расчетных значений показателя поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$. Разработана методика количественного анализа цветков календулы лекарственной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, заключающаяся в определении доминирующего и диагностически значимого флавоноида нарциссина.

Разработаны состав и способ получения лекарственного препарата «Календулы лекарственной цветков сироп». Определены показатели качества данного препарата, в том числе содержание суммы флавоноидов.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационных исследований используются в учебном процессе на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», а также в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы».

Методология и методы диссертационного исследования. Методология построена на изучении и обобщении данных отечественных и зарубежных авторов по фармакогностическому изучению календулы лекарственной, оценке степени разработки и актуальности указанной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

В качестве объектов исследования использовались надземная и подземная части представителей календулы лекарственной сорт «Кальта», заготовленные в различные фазы вегетации в Самарской области, а также препараты, полученные из цветков календулы лекарственной. Исследования осуществляли с использованием цифровой микроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопия, газожидкостной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. Помимо этого, в работе применялись различные гистохимические и пробирочные реакции на определенные группы БАС. Математическую обработку данных проводили с применением компьютерных программ согласно методике, которая описана в ГФ РФ XIII издания.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Полученные результаты морфологического и анатомического изучения плодов и корней календулы лекарственной.
2. Результаты фитохимического исследования различных органов календулы лекарственной.

3. Результаты изучения и разработки методик качественного и количественного анализов календулы лекарственной.

4. Результаты изучения и разработки способа получения лекарственного препарата на основе цветков календулы лекарственной («Календулы лекарственной цветков сироп»).

5. Результаты исследований по стандартизации лекарственных препаратов на основе цветков календулы лекарственной и разработке методик их количественного анализа.

6. Разработанные показатели качества цветков календулы лекарственной, а также разработанного лекарственного препарата – «Календулы лекарственной цветков сироп».

7. Результаты исследования фармакологической активности препаратов на основе цветков календулы лекарственной.

Степень достоверности. Достоверность результатов проведенного научного исследования подтверждена эмпирическими данными, полученными с использованием микроскопического метода, актуальных физико-химических и спектральных методов: ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ГЖХ, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различных химических превращений.

Апробация результатов. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на III и IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2015; 2016); на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения «Молодые ученые - медицине» (Самара, 2013; 2014; 2015; 2016); на Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» (Пенза, 2011); на VIII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы использования и охраны природных ресурсов России» (Самара, 2012; 2015); на XII Всероссийском молодежном

самарском конкурсе-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2014).

Проведение диссертационного исследования фрагментарно осуществлялось в рамках конкурса У.М.Н.И.К.-2012.

Внедрение результатов исследования. Результаты работы применяются в образовательном процессе на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре управления и экономики фармации Самарского государственного медицинского университета, в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы» и ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Персональное участие автора заключается в выполнении исследований по изучению морфологических, анатомических и гистологических особенностей строения надземной и подземной частей календулы лекарственной, выявлены их диагностические признаки. Исследован и проанализирован химический состав различных частей календулы лекарственной, определена химическая структура соединений, которые были выделены из сырья в виде индивидуальных веществ. Произведена модификация методик анализа цветков календулы лекарственной и препаратов данного растения. Предложены методики анализа сиропов календулы лекарственной. Определена динамика накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной в период вегетации. Разработаны состав и технология получения препарата – «Календулы лекарственного цветков сироп». Для препаратов календулы установлена фармакологическая активность. Автором разработаны методики качественного и количественного анализа фитопрепаратов методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии. Автором предложен проект ФС «Календулы лекарственной цветки».

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских задач университета. Диссертационное исследование выполнено согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ГБОУ

ВПО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2 - «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 - «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 - «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и 6 - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Публикации по теме диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 30 научных работ, из них 11 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, и 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 174 страницах машинописного текста, изложенные данные иллюстрированы 40 рисунками и представлены 25 таблицами. Работа состоит из введения, литературного обзора, объектов и методов исследования, 4 глав, в которых указаны результаты собственных исследований, итогов выполненного исследования, рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы, который включает в себе 203 источника, в том числе 139 отечественных и 64 иностранных.

Во введении указана актуальность темы исследования, представлены цель и задачи, сформулированы научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования, описаны основные положения, выносимые на защиту, а также сведения о публикациях и апробации работы.

В главе 1 проанализирован литературный обзор о состоянии исследований отечественных и зарубежных авторов в области изучения календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). В представленной главе приведены существующие данные о химическом составе различных частей календулы лекарственной, по использованию сырья ноготков в конвенциональной и альтернативной медицине. Изложены аспекты стандартизации сырья календулы лекарственной, используемые в Российской Федерации и в других странах.

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. Описаны методики установления подлинности и количественной оценки содержания БАС в сырье и препаратах календулы лекарственной.

В главе 3 уделено внимание морфологическому и анатомическому изучению плодов и подземной части календулы лекарственной.

В главе 4 приводятся результаты фитохимических исследований различных частей календулы лекарственной. Описаны результаты выделения индивидуальных БАС из цветков календулы лекарственной, установлена их структура.

В главе 5 изложены результаты разработки методик качественного анализа сырья ноготков лекарственных, методик определения количественного содержания БАС в сырье календулы лекарственной, а также выявление динамики накопления БАС в листьях и стеблях календулы лекарственной.

Глава 6 включает в себя исследования по разработке состава и методов стандартизации сиропа цветков календулы лекарственной, а также анализ оценки определенного фармакологического действия произведенных фитопрепаратов календулы.

Диссертационная работа завершается итогами, полученными в результате проделанных исследований общими выводами, рекомендациями, перспективами дальнейшей разработки темы и списком литературы.

В приложениях указаны проект фармакопейной статьи «Календулы лекарственной цветки», патент РФ № 2095227 «Способ определения соответствия хроматографических пиков одному и тому же компоненту и устройство для его осуществления», патент РФ № 2599016 «Способ количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной».

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Анализ исторической справки и происхождения названия растения

Календула лекарственная - одно из самых широко распространенных во всех уголках земного шара растений [137]. Ботаническое родовое название происходит от латинского «calendae», что в древнеримском календаре обозначало «первый день месяца» или «календарь». Соцветие календулы раскрывается днем и закрывается на ночь, извещая таким образом о начале и конце дня [113]. Встречается также второе латинское название – *Caltha*. Существует теория, что слово «calendae» относится к древнеславянскому богу Коленде (Коляде) – богу нового круга обращения времен, молодости и обновления. Вполне вероятно, что постоянно появляющиеся, «обновляющиеся» во время цветения корзинки календулы послужили поводом для отождествления растения с молодостью и обновлением [37,66,82,113]. Название календулы в сербском, хорватском (neven) и болгарском (невян) связано с молодостью, «нева» - это «молодая невеста». Во многих странах, в том числе и в России, календулу называют ноготками, семена этого растения похожи на кошачий ноготок. В Чехии изогнутые семена ассоциировались с полумесяцем, отсюда и название – *mesicek* – «маленький месяц». Форма семян («цветки-колечки», «цветки-завитки»), также представлена в названии на немецком (*ringelblume*), норвежском (*ringblomst*), и шведском (*ringblomma*) языках. В Китае календулу называют «цветок 10 тысяч лет», что символизирует долгую жизнь. В Дании календулу называют *morgenfrue* – «утренняя госпожа». Яркая окраска соцветий календулы отражена в испанских и португальских названиях – *maravilla* – «чудо, диво». Английское название растения *marigold* («золото Марии») связано с тем, что в средние века календула была одним из посвященных Богородице цветков [61, 113].

В Ботаническом словаре Н.И. Анненкова приводятся названия на различных языках, наиболее интересные из них цвет огня и бычий глаз [61,113]. В. Даль указывает несколько названий – ноготок и повой-воинский [49, 113]

Видовое название календулы происходит от латинского «*officinalis*» - аптечный [75,109,138].

К одному из первых упоминаний можно отнести фразу Уильяма Шекспира 1611-го года в произведении «Зимняя сказка»: «Вот вам цветы: лаванда, мята, майоран; календула, что спать ложится вместе с солнцем, и с ним встает». В «Энциклопедическом словаре» Ефрона и Брокгауза, изданного в 1897 году, говорится, что ноготки аптечные являются самым распространенным видом в садах России [61, 137]. В специализированном словаре издания 1900 года, написанном врачами Петровской и Залесовой, отмечено, что календула «разводится повсюду в садах в многочисленных сортах различного цвета» [61, 137].

В Средние века календулу использовали в пищу. В Англии ее сеяли со шпинатом и готовили вместе [113]. Арабы включали цветки ноготков в обязательный рацион своих знаменитых скакунов: в средние века считалось, что именно ноготкам они обязаны своей скоростью и неутомимостью [113].

Целебные свойства календулы были известны со времен Древней Греции, растение использовали для лечения плохо заживающих ран, фурункулов и карбункулов, горячки и других заболеваний [113]. Первое упоминание о ноготках в качестве лекарственного растения были обнаружены у философа и военного врача древнегреческого происхождения, Диоскорида, который жил в I веке нашей эры. Диоскорид применял настой календулы для лечения нарушений работы печени и для ликвидации спазмов внутренних органов [82,113].

Ибн Синна (Авиценна) (979-1037) советовал свежий сок календулы женщинам при проблемах с менструациями и при токсикозе, а золу ноготков с уксусом при ишиасе. Кроме того, он отмечал, что календула излечивает укусы ядовитых животных [2, 125].

Народная целительница из Германии Гильдегарда из Бингена (1098-1170) предлагала применять ноготки при интоксикации, головных болях, для лечения грибковых и других заболеваний кожного покрова [61,113].

Амирдовлат Амансциаци, врач армянского происхождения советовал использовать мазь календулы при «горячих отеках», пить сок на голодный желудок при отравлении различными видами ядов, припарки из дробленного корня ноготков прикладывать к спине для повышения половой активности, отвар из корня применять для избавления от зубной боли и при насморке [113].

Первая диссертация, посвященная исследованию целительных свойств календулы, была защищена в Гейдельберге в 1819 году [61]. Автор данной работы говорил об эффективности применения растолченных листьев и цветов календулы наружно при бородавках и мозолях, а внутрь при раке молочных желез и женской репродуктивной системы [137].

Календулу использовали во время Первой мировой войны в составе антисептических и противовоспалительных средств [113].

Первые упоминания в печати об использовании календулы в России имеют отношение к XVIII веку и ассоциируются с именем знаменитого русского естествоиспытателя Болотова, который являлся основоположником отечественной агрономии [61, 137]. В своих работах он превозносил примочки из цветков ноготков как наилучшее средство при болезнях глаз. В работе «О ноготках» в номере журнала «Экономический магазин...» 1781 года издания, Болотов произвел обобщение своих сведений о календуле, а также обзор зарубежной литературы тех времен [61, 137].

В России XIX-го века календулу использовали для лечения нервной лихорадки, рака, головокружений, от золотухи и некоторых заболеваний глаз. Академик А.П. Нелюбин в 1852 году отмечал в своем труде «Фармакография», что календула – это «целебное средство, наделенное особой лечебной силой» [61, 66,113, 158].

Ближе к середине XIX века врачи с охотой назначали листья и цветки календулы, тем не менее, в конце века в официальной медицине ноготки не

используются [61, 66,113, 158]. Для этого характерно снижение интереса к лекарственным растениям, их вытесняют препараты химического происхождения. Е.Н. Залесова и О.В. Петровская в 1900 году пишут, что «в нынешнее время врачи совершенно не назначают календулу» [61, 113, 137].

Важность календулы, как источника ранозаживляющих и дезинфицирующих средств, остро ощущается во время Второй мировой войны. Несмотря на сложившиеся трудности, ученые защищают научные диссертации по календуле [37, 113, 137].

В послевоенные годы роль календулы только возрастает. В 1955-1957 гг. издаются несколько изданий книги Мальцевой и Туровой «Ноготки (календула)», в них указана информация о систематике, способах возделывания, химическому составу и использованию календулы в медицине [61, 137]. Проводятся исследования по всем научным направлениям изучения календулы лекарственной.

В настоящий момент календула входит в десятку наиболее популярных лекарственных растений в мире. [61,113, 137].

1.2. Систематическое положение и ботаническое описание календулы

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) является травянистым однолетним растением с прямостоящим ребристым, состоящим из разветвлений стеблем высотой около 60 см [79,129]. Ответвляющиеся побеги в значительной степени длиннее главного, вследствие чего растение образует массивный густолиственный куст. Корень ветвистый, стержневой, глубоко проникающий в почву. Листья очередные, светло-зеленые, лопатчатые, на верхушке закругленные, цельнокрайние или слегка зубчатые, на стебле расположены близко друг к другу. Верхние листья мельче нижних, с черешками и имеют продолговато-яйцевидную форму, прикрепленные к стеблю – продолговатой формы или ланцетообразные, не имеющие черешка, слегка обхватывающие стебли. Стебли и листья покрыты жесткими и короткими волосками. Железистые волоски (содержащие эфирные

масла) покрывают верхнюю часть растения. Простые волоски расположены больше на стеблях, чем на листьях, где они встречаются только по краю листа [125, 158].

Цветки календулы желто-золотистые, насыщенно рыжие, в основном собраны в крупные (диаметром 4-10 см) апикальные корзинки.

Цветки, которые упорядочены по внешнему краю соцветия, называются краевыми, отличаются от внутренних как внешним видом, так и строением, и функции на общем цветоложе в соцветии они выполняют различные [113, 137].

В качестве женских (пестичных) цветков выступают краевые, с одногнездной изогнутой завязью, двулопастным столбиком [113, 137]. Они ланцетовидные, язычковые, имеют трехзубчатый внешний край, рыжие или желтые, упорядочены в виде рядов (махровые сорта могут иметь более 15 рядов). Они служат для привлечения всевозможных насекомых-опылителей, также их предназначение - образование семян [113, 137].

Маленькие тычиночные срединные цветки – пятизубчатые, трубчатые, с недостаточно развитым пестиком и тычинками в количестве пяти штук – служат в качестве опылителей [114, 137]. Снаружи общее цветоложе окружено оберткой, состоящей из двух рядов черепитчато-расположенных узколанцетных листочков [61,113,114,137]. Основная функция обертки – защита цветков от неблагоприятных воздействий внешней среды [113].

Плоды – семянки различной формы и величины в зависимости от их положения в головке [113,114,158]. Наружные плоды крупные, с длинным полым носиком, серповидные, длиной до 20 мм; срединные – без носика, изогнуты в виде кольца с широким крылом; внутренние – мелкие, крючковидной формы или кольцеобразноизогнутые (длиной 8-10 мм), без носика и крыла. На выпуклой стороне семена имеют острые зубцы, коричнево-желтого или сероватого цвета [113,114,137].

1.3. Сырьевая база. Заготовка и сушка. Агротехнические особенности

Известно свыше 20 видов рода календула, растущих в Средиземноморье на Ближнем Востоке до Ирана, а также в Центральной Европе, Африке и Азии. Растет календула по морским побережьям, на скалах; некоторые виды встречаются как сорные [129, 113, 137].

Календула лекарственная издавна культивируется как однолетнее, используемое в декоративных и лечебных целях растение практически в каждой европейской стране, а также в США, Средней Азии и на Кавказе [79,113].

Цветение календулы происходит довольно продолжительно (около 3 месяцев), по этой причине цветки собирают неоднократно, с момента цветения до первых заморозков.

Соцветия календулы собирают с момента раскрытия большей части язычковых цветков ручным или механическим способом. [79, 113]. При ручном сборе соцветия срывают у самого основания. Уборку механизированным способом осуществляют специальными машинами очесывающего типа для уборки календулы или ромашки. В случае применения данного способа, в общую массу попадают не только цветочные корзинки, но и часть бутонов и стеблей. В связи с данными обстоятельствами необходимо провести дальнейшую сортировку.

При сборе цветочных корзинок вручную, их срывают с верхней частью стебля длиной около трех сантиметров через 3-4 дня в первый момент цветения и через каждые 4-6 дней в последующие этапы цветения. Ноготки собирают от 15 до 18 раз за один сезон. Надлежащая уборка соцветий с растения благоприятствует образованию новых завязей и делает возможным повышение урожайности – до 12-18 центнеров с гектара. Собранное сырье освобождают от примеси в виде листьев, отцветших корзинок и кусочков стеблей [79, 113].

Календула лекарственная применяется в медицинских целях во многих странах мира, однако есть некоторые отличия в используемом для этой цели сырье ноготков [113]. В Польше, например, изготавливают лекарственные препараты только на основе язычковых цветков ноготков, для получения немецких препаратов используется растение целиком, в том числе корень [113].

В России для медицинского применения используют только соцветия календулы [66, 113]. Цветки ноготков собирают летом, когда они уже полностью раскрылись [113, 129]. Высушивание цветков календулы осуществляют в приспособлениях для сушки при температуре около 40°C, иногда в воздушных сушилках или в хорошо вентилируемом месте, раскладывая соцветия на ткани или листах бумаги однослойно. При сушке сырье следует оберегать от попадания прямых солнечных лучей, иначе оно будет выцветать, теряя при этом БАВ. Сушка считается законченной, если при надавливании на соцветия они не распадаются. В высушенном сырье естественная окраска должна не только сохраняться, но и углубляться [94, 113].

Цветки ручного сбора представляют собой цельные или частично осыпавшиеся корзинки диаметром 5 см, без цветочного стебля или с его остатками, длиной менее 3 см. Цветки механизированной уборки по внешним признакам значительно отличаются от сырья, собранного вручную и включают примесь цельных или отдельных соцветий, остатков трубчатых и ложноязычковых цветков, в более редких случаях бутонов и корзинок с плодами, отдельных плодов, а также обрывков листовых пластин и стеблей [94,113].

Хранят цветки календулы в бумажных пакетах или картонных коробках, в сухом, прохладном и проветриваемом помещении без доступа прямых солнечных лучей. Срок годности сырья составляет 2 года [89, 113].

1.4. Характеристика возможных примесных видов календулы лекарственной

К примесным видам календулы лекарственной можно отнести растения рода бархатцы (*Tagetes* L.) в силу схожести морфологических признаков внешнего облика растений [129]. Корзинки цилиндрические или чашеобразные, большей частью одиночные, редко собранные в соцветия. Обертка из одного ряда из пяти сросшихся кожистых листочков, покрытых продолговатообразными и выстроенными в линию полупрозрачными плоскими железками; ось цветка голая, плоская. Цветки диска обоеполые, имеют трубчатую форму, желто-золотистые,

рыжие или бурые; краевые цветки женские язычковые, расположенные в один ряд, желто-золотистые, светлорыжие, темнорыжие или бурые. При основании закруглены под тупым углом. Лопасты столбика тупые, у срединных цветков более длинные закрученные, расходятся у краевых язычковых цветков. Семянки единообразные, линейные или продолговато-линейные, у основани сужаются под углом. Хохолки состоят из разнородных и неравномерных пленок, которые срослись или находятся в свободном состоянии. Стебель прямой, ветвистый, листья супротивнорасположенные или очередные, обособленные имеют перистую форму с просвечивающими редкими округлыми бурыми железками. Из 26 видов к нам занесены или введены в культуру три. Растение с обильным цветением до глубокой осени. Различают крупноцветковые и мелкоцветковые сорта бархатцев [129].

Различают следующие виды бархатцев [129]:

1. *Tagetes minuta* L. – Бархатцы мелкие.
2. *Tagetes patula* L. – Бархатцы отклоненные.
3. *Tagetes erecta* L. – Бархатцы прямостоячие.

1.5. Характеристика микроскопических признаков (цветки, плоды, листья и стебли)

Благодаря данным ряда отечественных и зарубежных исследователей (Шарова О.В. 2007 г.; проф. Сампиев А.М. 2010 г.; Орловская Т.В., Ушакова Л.С., Маринина Т.Ф. 2013г.) в настоящее время известны особенности анатомического строения листа [113], стебля [113], цветка [137] и плодов календулы [102, 137].

Лист амфистоматический. Тип устьиц аномоцитный. Трихомы – волоски двух типов, расположенные на обеих сторонах листа [113].

Адаксиальная сторона. Проекция покровных клеток вытянутая, изредка распластанная (неправильно-многоугольная) [113]. Очертания стенок прямолинейные, округлые и редкоизвилистые. Извилистость стенок наблюдается вокруг стенок, окружающих устьица. В местах изгибов стенок клеток, лежащих вокруг устьиц, наблюдаются узловатые утолщения. На прямолинейных и

округлых участках стенки имеют равномерную толщину. Углы, образованные стенками смежных клеток, прямые, тупые, закругленные и острые. Клетки удлиненные, ориентированы осями в основном вдоль жилок и листовой пластинки. Над жилками расположены несколько рядов вытянутых неправильно многоугольных клеток с выраженными углами. Устьица круглые широкоовальные, погруженные, ориентированы продольными осями вдоль жилок. Устьица аномоцитного типа; они окружены 3-6 клетками. Трихомы – многоклеточные волоски двух типов: железистые волоски, и простые волоски с расширенными основаниями. Волоски расположены на жилках вдоль краев листа. Они создают хорошо заметную невооруженным взглядом опушенность листа [113].

Абаксиальная сторона. Проекция покровных клеток вытянутая и распластанная. Очертания стенок извилистые (U и V-образные), прямолинейные и комбинированные (прямолинейно-извилистые, округло-извилистые) [113]. На участках, характеризующихся извилистыми очертаниями, наблюдаются редко расположенные узловатые утолщения. На стенках клеток, окружающих устьица, нередко находятся короткие петлеобразные выступы. Устьицы круглые и широкоовальные, погруженные, ориентированы продольными осями в разных направлениях. Устьица несколько мельче, чем на адаксиальной стороне, вокруг них расположены в основном 3-4 покровные клетки, как правило, перпендикулярно к продольным осям устьиц. Трихомы – такие же многоклеточные волоски двух типов, как и волоски, наблюдаемые на адаксиальной стороне. В эпидерме абаксиальной стороны клетки трихомных оснований отличаются от окружающих их клеток. Они более крупные и имеют прямолинейные очертания стенок. Кроме того, в двурядных ножках железистых волосков нередко наблюдаются по четыре клетки в ряду [113].

Черешок листа. Поперечный срез через черешок нижнего листа проведен в наиболее характерном месте, т.е. у входа черешка в листовую пластинку. В нем обнаружены 4-6 отдельных проводящих пучка, расположенных прерванным, несколько сплюснутым кольцом, причем нижние 2 пучка величиной значительно

превосходят другие [113]. Пучки коллатеральные с ксилемой, обращенной к центру. Переходя в главную жилку листа, пучки обычно постепенно расходятся, и на срезе, проведенном в середине листа, видны 4 одинаковых пучка, между которыми находится крупноклеточная паренхима. Под эпидермисом над верхним пучком расположена колленхима с угловатыми утолщениями. На срезе близ верхушки листа обнаруживается лишь один пучок.

Цветки. Клетки эпидермиса у цветков язычкового типа имеют оранжевый цвет, содержат хромопласты округло-удлиненной формы; эпидермис на поверхности зубчиков с сосочковидными образованиями, в отдельных случаях с устьицами; сросшиеся в трубку нижние части лепестков имеют густое опушение в виде протых железистых волосков, расположенных в один или два ряда; нижняя расширенная часть пестика также имеет характерную опушенность: на выступающей стороне обнаруживаются железистые волоски; простые, однорядные и двурядные волоски на периферии вогнутой стороны. Верхушка волосков железистой природы складывается из 2,4 или 8 клеток [113, 137].

Эпидермальная часть трубчатых цветков схожа с эпидермисом язычковых цветков, сосочки зубчиков в большей степени вытянутой формы; сросшиеся в трубку нижние части лепестков и завязь имеют густое опушение в виде одного или двух рядов простых и железистых волосков. Складчатость кутикулы, как правило маскируемая с помощью хромопласт, просматривается лишь на некоторых участках. Пыльца имеет округлую, шиповатую форму [113].

Эпидермис листочков обертки образован клетками удлиненной формы со стенками прямого типа, в медиальной части извилистыми стенками и устьицами; листочки обертки имеют густое опушение: по краю – длинными одно-, двурядными простыми, железистыми ветвеобразными волосками в виде двух рядов; в срединной области – волосками железистой природы [113].

Стебель. Стебель ребристый, опушен крупными, простыми 5-10-клеточными волосками, прямыми и изогнутыми [113]. Под эпидермой в несколько слоев расположена колленхима, под ней – небольшой слой коровой паренхимы и крахмалоносное влагалище. Основную центральную часть стебля

составляет крупноклеточная паренхима сердцевины. Между сердцевиной и корой расположены сосудисто-проводящие пучки, чередующиеся с тонкостенной паренхимой. Сосудитые пучки коллатеральные, открытые, расположены равномерно по окружности стебля. Снаружи от сосудисто-волокнистых пучков расположены тяжи склеренхимы, примыкающие к флоэмной части пучка [113].

Плод. Семянка удлиненная, без носика, с 5 ребрышками. При рассмотрении плода с поверхности видны простые волоски одно- или двухрядные, длинные. На поперечном срезе перикарп имеет несколько выраженных слоев. Экзокарп состоит из одного ряда прямоугольных клеток, которые покрыты снаружи толстым слоем кутикулы. Под эпидермой находятся 5-6 рядов крупных, толстостенных клеток (склеренхимный слой мезокарпа), вдоль семени проходят небольшие проводящие пучки. Эндокарп не выражен. Клетки зародышевой ткани имеют тонкие стенки, содержат в себе жирные масла и зерна алейроновой природы [102, 113].

Необходимо отметить, что в научной литературе не выявлено данных по анатомическому и гистологическому строению корневой системы календулы. Кроме того, имеющиеся данные по анатомии плодов недостаточны и не позволяют проводить селективную диагностику целевого вида сырья и отличать его от примесей.

В настоящей работе (см. Глава 3) нами приводятся результаты собственных исследований решающих указанную проблему стандартизации.

1.6. Химический состав различных органов календулы лекарственной

Анализ химического состава календулы был начат с 1952 года, за это время было выделено более 400 веществ, в том числе моно-, сескви-, тритерпеноиды, сесквиерпеновые гликозиды, стероиды, каротиноиды, фенольные и алифатические соединения [3,21,23,27,28,50,58,59,62,149,203]. Наибольшее количество соединений было получено из надземных частей ноготков. Из цветков, листьев и корней *Calendula officinalis* L., *Calendula arvensis*, *Calendula*

persica было выделено 42 монотерпена, 106 сесквитерпенов, 17 сесквитерпеновых гликозидов, 20 стероидов, 71 терпеноид [62].

Широкий спектр действия календулы обусловлен значительным содержанием в сырье комплекса биологически активных соединений (БАС): каротиноидов, флавоноидов, фенилпропаноидов, стероидов, тритерпеноидов, эфирных масел, кумаринов, макро- и микроэлементов [61,76,137].

В составе календулы содержатся каротиноиды (в среднем 3% в цветках язычкового типа): α - и β -каротин, ликопин, лютеин, виолоксантин, флавоксантин, рубиксантин (в среднем 30 мг%) [3,58,61,76,137]. Некоторое количество каротиноидов было обнаружено в листьях и цветках ноготков: β -каротин, γ -каротин, δ -каротин, неуроспорин, фитофлуин, ликопин, фитоен, рубиксантин, ксантофил (лютеин), виолоксантин, зеаксантин, флавохром, флавоксантин, цитроксантин, хризантемаксантин [61,76, 137].

Определено, что количество каротиноидов в растении можно сопоставить с количеством лепестков в соцветиях, окраской язычковых цветков, а также оно зависит от способа сушки и условий хранения [76, 137, 192]. В цветках календулы рыжего цвета превалирует ликопин, наряду с этим в цветках желтой окраски по большому счету содержатся такие вещества, как флавоксантин, изомер флавоксантина (хризантемаксантин) и цитроксантин. По каротиноидному составу различаются растения в зависимости от мест их произрастания [113, 164, 167, 185]. Было отмечено, что существует взаимосвязь между компонентным составом каротиноидов и местом произрастания календулы. В Великобритании были идентифицированы β -, δ - и γ -каротины, флавоксантин, лютеин, ликопин, фитофлуин, флавохром и хризантемаксантин; в России - β -каротин, виолоксантин, ликопин и рубиксантин; в Австралийском Союзе - β -каротин, зеаксантин, виолоксантин, фитоен, лютеин и неуроспорин [61, 137].

Сведения о количестве каротиноидов в цветках ноготков достаточно разнообразны, это предположительно объясняется тем, что в анализе применяются различные методы количественного определения каротиноидов. [8,

66, 113, 167]. Сортные особенности, сроки сборки сырья, цвет сырья также влияют на количественное содержание каротиноидов в цветках. В высушенных желтых цветках трубчатого типа содержание каротиноидов насчитывает 91,2 мг%, в желтых цветках язычкового типа – 195,4 мг%; в темно-рыжих цветках рыжего цвета насчитывает 1546,6 мг%, в то время как весь цветок темно-рыжего оттенка – 34,9 мг%. В свежесобранных листьях календулы диагностировано содержание каротиноидов в количестве 0,53 мг%, в свежесобранных темно-рыжих цветках язычкового типа 48,4 мг% [91,137, 170].

Согласно изученной литературы, в 100 г цветков календулы содержится: β -каротин – 0,224 г, ликопин – 0,336 г, виолаксантин – 0,150 г и рубиксантин – 0,017 г [101, 113]. Содержание каротиноидов в цельных соцветиях составляет: во второй сбор – 1421-1522 мкг/100г, в четвертый сбор – 904-1187 и в шестой сбор – 773-813 мкг/100 г абсолютно сухого сырья [101, 113].

Необходимо отметить, что принципы высушивания сырья, методы и время хранения оказывают влияние на количество каротиноидов в цветках [61,113, 137]. По результатам проведенных исследований определено, что после термической сушки содержание суммы каротиноидов в цветках более высокое, чем при высушивании в естественных условиях, что может быть причиной продолжительной нехватки воды. Нюотки сорт «Кальта» содержат около 0,12-0,31% каротиноидов [61, 101,113, 137].

В соответствии с результатами исследований Костылева Д.А., содержание каротиноидов в цветках сорта Кальта варьирует от 105 мг% до 330 мг% исходя из климатических условий и времени цветения [67, 73, 113]. В результате хранения сырья содержание чувствительных к влаге и свету каротиноидов в течение 4 месяцев уменьшается в 6 раз [58, 61, 113].

Другие органы данного растительного объекта, в сравнении с цветками, менее богаты каротиноидами. Например, содержание каротина в свежих листьях календулы достигает лишь 0,5мг% [68, 113, 193, 211].

В цветках *Calendula officinalis* L. главным образом было выделено 6 простых фенолов, 7 бензойных кислот, 4 фенилпропаноида, 4 кумарина, 12 флавоноидов

[62]. Среди флавоноидов (от 0,33 до 0,88%) можно выделить: нарциссин, изокверцитрин, календофлавобиозид, изорамнетин-3-глюкозид, изорамнетин, календовлазид, календофлавозид, все же данные о флавоноидном составе достаточно противоречивы [29, 73, 82, 113, 124, 137].

Содержание суммы флавоноидов в зависимости от сорта и популяции составляет 0,26-0,91%, причем богаты этими БАВ сорта с махровыми оранжевыми соцветиями [30,83, 137]. Содержание флавоноидов в высушенных цветках варьирует от 0,41 до 0,91%, в связи с режимами высушивания [101, 137].

Исследователями было изучено, что состав фенольных соединений пыльцы календулы приближен к составу краевых цветков [62].

Помимо этого, в цветках ноготков лекарственных обнаружены кумарины (эскулетин, умбелиферон и скополетин) и около 3,4% веществ дубильной природы, фенолкарбоновые кислоты (коричная, о-кумаровая, вератровая, синапиновая, ванилиновая, хинная, салициловая, феруловая, гентизиновая [57, 113, 157, 226]. Содержание дубильных веществ в водном экстракте соцветий ноготков составляет 4,8%, флавоноидов (в пересчете на рутин) – 2,5% [66, 74, 113].

В различных частях ноготков содержатся вещества тритерпеновой природы: спирты и олеаноловая кислота [57, 113,124, 126, 137].

Тритерпеновые спирты, которые являются производными от лупеола, α - и β -амирина (арнидиол, фарадиол, лупеол, гетеролупеол, урсадиол, гелианол, календуладиол) эфиризованы пальмитиновой, лауриновой уксусной и миристиновой кислотами [57, 113, 124,126, 137].

В качестве моноолов выступают: α -амирин, β -амирин, (гетеролупеол), таракастерол, ψ -таракастерол, лупеол [64,113, 137].

Диолами представлены арнидиол, бреин, фарадиол, урсадиол, эритродиол, манилладиол, турберин [88, 137, 179, 188].

Триолы подразделяются на хелиантриол С, урасатриол, хелиантриол F, лупенстриол и лонгиспиногенин [88, 137, 179, 188]. Общее содержание

тритерпеновых спиртов (в свободном и связанном виде) в соцветиях достигает 5% [142,158, 222].

К ведущей группе БАВ также относят сапонины (календулозиды – гликозиды олеаноловой кислоты) [137]. Зарубежные ученые выявили в ноготках лекарственных тритерпеновые гликозиды [137]. Дальнейшая научно-исследовательская работа подтвердила происхождение данных веществ от олеаноловой кислоты. Практически все органы календулы лекарственной содержат сапонины тритерпеновой природы, они представляют собой спирты и олеаноловую кислоту [137].

Тритерпеноиды представлены производными лупеола – арнидиолом и фарадиолом [76,82,137,145]. Л.П. Вечерко, Z. Wojciechowski и Z. Kasprzyk определили химическое строение гликозидов олеаноловой кислоты календулы (календулозиды А, В, С, D, Е, F, G, H) [27, 28, 29, 30, 113, 203]. Вследствие анализа биосинтетических и метаболических процессов определено, что олеаноловая кислота и календулозиды образуются в надземной части календулы. После того, как листья стареют, большое количество сапонинов обнаруживается в корнях [27, 28, 29, 30, 125, 137, 163, 180, 191]. Имеются сообщения о связи между потреблением воды и содержанием сапонинов в ноготках. Установлено, что наибольшая потребность в воде для транспирации растения наблюдается во время цветения «первых» и «пятых» корзинок, максимальное содержание сапонинов было выявлено несколько раз – в фазе «быстрого роста» и за время полного цветения («седьмые» корзинки) [113, 199, 202].

Корни и надземная часть ноготков содержат около 5% суммы гликозидов олеаноловой кислоты [67,76, 137].

Все органы ноготков лекарственных в период сбора содержат вещества стеринной природы, в листьях содержание доходит до 18% [113, 162]. Стерины присутствуют как в свободном состоянии, так и в виде сложных эфиров и глюкозидов. Агликон стеринов представлен в большинстве случаев стигмастерином или β -ситостеринном, в качестве кислоты выступает лауриновая, пальмитиновая, миристиновая и уксусная кислоты. Помимо веществ эфирной

природы выявлены и гликозиды стеринов с одной молекулой глюкозы. В листьях календулы содержатся токоферол и календен [113, 237].

Эфирномасличные соединения в количестве 0,12% обуславливают пахучесть цветков [82, 137,143,183]. Трубочатые цветки венгерской календулы содержат 40-50 мг% эфирного масла, язычковые цветки 3-4 мг%, семена 4-8 мг%, бутоны 15-25 мг%, стебли 2-8 мг%, листья 6-9 мг%, корни 8-10 мг%. Все органы календулы желтого цвета, не учитывая бутоны и язычковые цветки, содержат эфирное масло в большем количестве, чем растения оранжевой окраски [67,91,137,156].

Семена ноготков содержат триглицериды пальмитиновой и лауриновой кислот [113, 181, 217].

Цветки календулы содержат воск, в состав которого входят высокоатомные спирты в количестве 11,31%: фитол, трикозан, экойзан, нонакозон, генкойзан, докозаном, гептокозан, октакозан; в виде спиртовой фракции – кадинол, муурол и веридифлор [113].

Полисахариды календулы представлены арабинозой, глюкозой, галактозой, ксилозой и рамнозой, уроновой кислотой и маннозой [96, 113]. Такие углеводы, как водорастворимые полисахариды (14,75%), гемицеллюлоза (5,92%) и пектиновые вещества (9,67%) содержатся в соцветиях календулы. В составе гидрофильных полисахаридов насчитывается 31,25% сахаров восстанавливающего типа и 25,77% кислых сахаров, в моносоставе содержатся: глюкоза, арабиноза, галактоза, рамноза, ксилоза и галактуроновая кислота [113, 157].

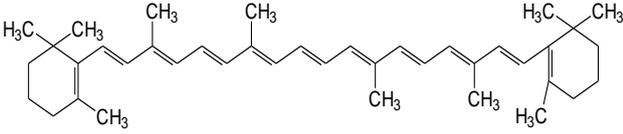
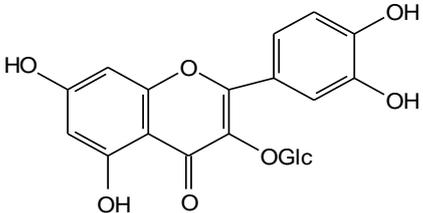
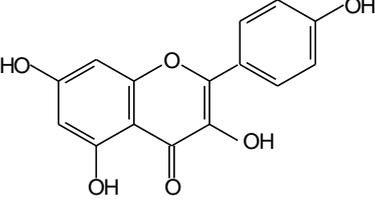
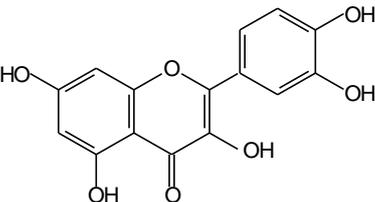
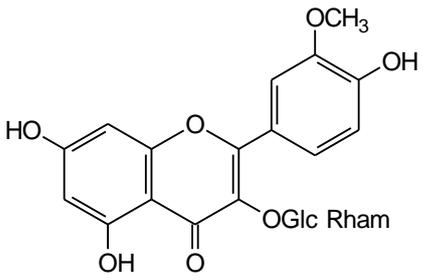
Имеются данные, что общее содержание слизи в цветках ноготков достигает 2,5%, из которой азотсодержащей слизи – 1,5%, а также об обнаружении следовых количеств алкалоидов [65, 74, 88, 113].

В соцветиях ноготков также идентифицированы витамины и органические кислоты (яблочная, пентадециловая, аскорбиновая). Количественное содержание суммы органических кислот колеблется от 4,7 до 7,0% [57, 110, 113, 226].

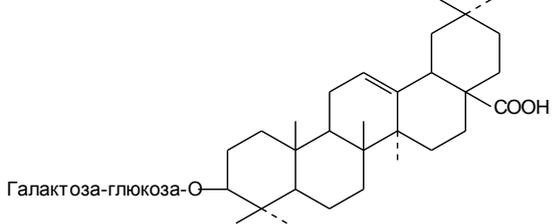
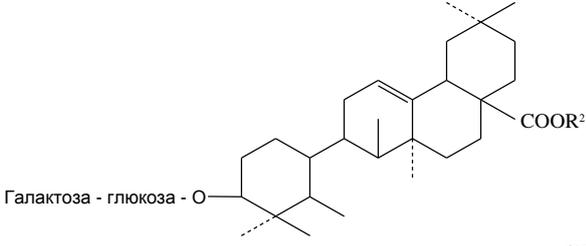
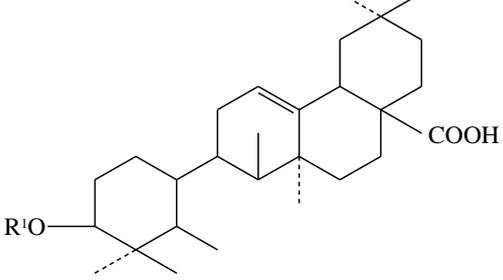
Кроме того, в соцветиях ноготков найдены аминокислоты [106, 113]. Аминокислотами, преобладающими в исследованном водном извлечении цветков календулы, являются аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин. Среди

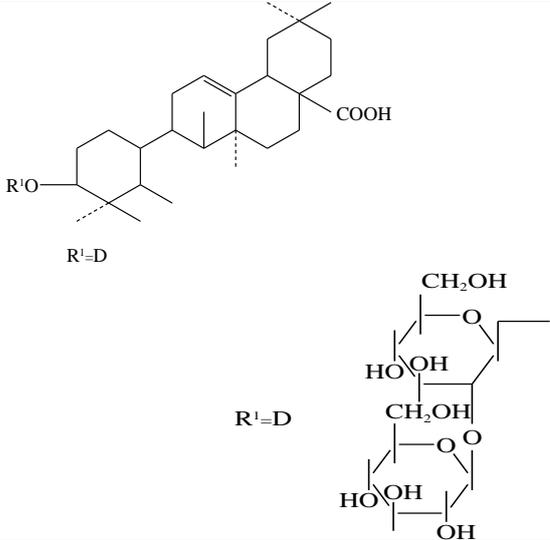
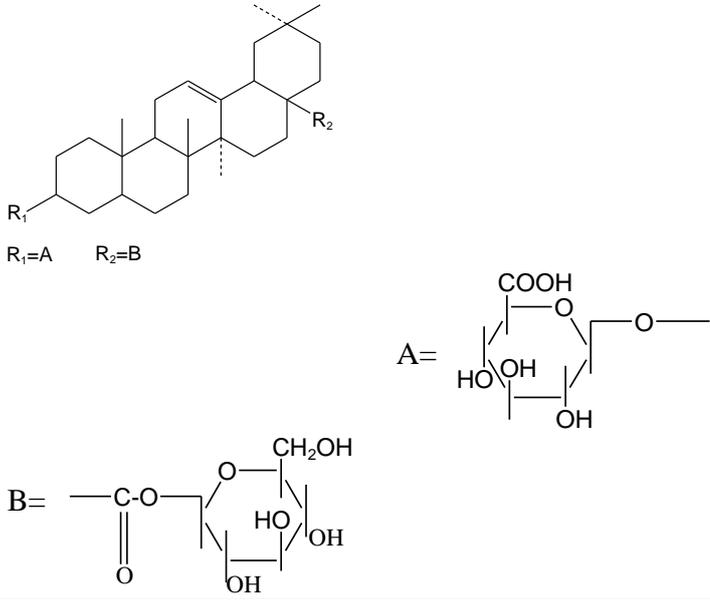
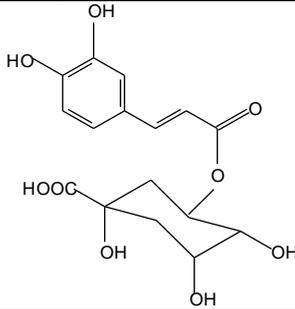
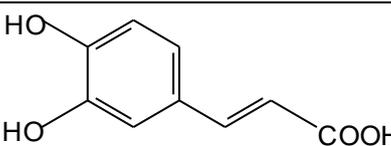
идентифицированных аминокислот 4 являются незаменимыми – треонин, валин, изолейцин, лейцин [113,137].

Таблица 1 – Важнейшие химические соединения календулы лекарственной

№	Соединение	Химическая структура	Источник
Каротиноиды			
1.	β-Каротин		Цветки, листья
Флавоноиды			
2.	Изокверцитрин		Цветки, листья
3.	Кемпферол		Цветки, листья
4.	Кверцетин		Цветки, листья
5.	Изорамнетина 3-О-рутинозид (нарциссин)		Цветки, листья

Производные олеаноловой кислоты (календулозиды)

6.	Календулозид А	 <p align="center">Галактоза-глюкоза-O</p>	Цветки, листья, корни
7.	Календулозид В	 <p align="center">Галактоза - глюкоза - O</p> <p align="center">COOR²</p> <div style="text-align: center;"> $B = \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{---O---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{---} \quad \text{---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$ $R^2 = B$ </div>	Цветки, листья, корни
8.	Календулозид С	 <p align="center">R¹O</p> <p align="center">R¹-C</p> <div style="text-align: center;"> $C = \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{---O---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{---} \quad \text{---} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$ $R^1 = C$ </div>	Цветки, листья, корни

9.	Календулозид D		Цветки, листья, корни
10.	Календулозид F		Цветки, листья, корни
Фенилпропаноиды			
11.	Хлорогеновая кислота		Цветки, листья, корни
12.	Кофейная кислота		Цветки, листья, стебли

1.7. Область применения надземной и подземной частей календулы лекарственной в народной и зарубежной медицине

В качестве диуретического средства при гипертонии ноготки лекарственной используются в Китае, в Тунисе ревматизм излечивается с помощью календулы; масляная мазь с соком календулы применяется при злокачественных новообразованиях [137,164]. Листья календулы в Испании применяют в качестве средства, вызывающего выделение пота; используют наружным способом для лечения недоброкачественных язвенных болезнях, новообразованиях, каллюсах [137, 164]. Как возбуждающее, стимулирующее, противосудорожное средство цветки нашли применение в медицине Китая; в медицине Индии – антисептическое и стиулирующее средство [4, 6, 137]; в Западной Европе используют соцветия календулы в виде потогонного средства [137, 164]; при недоброкачественных опухолях [137, 164]. В традиционной медицине применяется наружно в виде ранозаживляющего средства [5, 137].

В традиционной медицине славян востока растение общеизвестно с XII века [43, 137]. В книгах тех времен указывается о внутреннем и наружном использовании истолченных цветков и листьев для лечения наростов, мозолей, кист и опухолей (особенно опухолей половых органов и молочных желез). Для того, чтобы улучшить зрение и самочувствие в книгах XII века было рекомендовано смотреть на колоритные цветки календулы [43, 137].

Ноготки в России 19-го века использовали для избавления от нервной лихорадки, головных болей, рака, заболеваний глаз и золотухи. Помимо этого, календулу в народе прикладывали для удаления мозолей и бородавок. [137].

1.8. Фармакологическое действие сырья и препаратов календулы, применение в современной медицине

Наличие в цветках ноготков биологически активных соединений, каротиноидов, флавоноидов и сапонинов в качестве биологически активных веществ обуславливает широчайший диапазон фармакологического действия [74, 113, 124]. В результатах проведенных исследований на крысином кожном покрове

было выявлено, что смесь, которая содержит хлорофилл, каротиноиды и другие соединения липофильной природы оказывает при наружном нанесении противовоспалительное действие, увеличивает скорость регенерационных процессов в тканях, их развитие и повышает уровень восстановления поврежденных участков тканей, благоприятствует восстановлению и формированию эпителия в поврежденном участке кожи и образованию гладкого келоида [113].

При пероральном применении лекарственные средства на основе ноготков также оказывают противовоспалительное действие [113,190,206,207]. Фитопрепараты и их индивидуальные химические вещества, оказывают содействие в восстановлении слизистой эпигастрия и кишечного тракта, рубцевания эрозий и ран [113,190,206,207]. Сапонины, которые были выделены из цветков календулы лекарственной в качестве индивидуальных веществ оказывают противовоспалительное действие на примере каррагенинового отека [113,164,196]. Противоаллергическое и противовоспалительное действия спиртового экстракта и некоторых других препаратов календулы объясняется способностью снижать синтез лейкотриенов и угнетать миграцию лейкоцитов в очаге воспаления [113, 177]. Выделенные из ноготков флавоноидные гликозиды изорамнетина являются ингибиторами липооксигеназы [113, 178].

Тритерпеновым эфирам календулы присуще противоотечное действие [113, 142]. Фитонцидными и антисептическими свойствами обладают эфирное масло, каротин, ликопин и некоторые другие гидрофобные соединения ноготков [17,76,95].

Этанольный экстракт из цветков календулы обладает нейропротективным действием в отношении нейротоксичности у крыс, вызванной 3-нитропропионовой кислотой [62, 170,171]. Метанольный экстракт из цветков защищает против нейротоксичности, вызванной глутаматом натрия [62, 170,171].

Водно-спиртовой экстракт из цветков проявлял антиноцицептивный эффект у крыс на моделях «удар хвоста», «уксусные корчи» [62,63,168]. Обезболивающее действие было отмечено для этанольного экстракта из

надземной части ноготков [14, 62]. Свежее извлечение в виде сока из листьев ноготков оказывает сильное обезболивающее влияние на различных примерах опытов, которое можно сравнить с антиноцицепцией, вызванной метамизолом натрия [62,77].

Извлечение из соцветий *Calendula arvensis*, полученное с использованием этилового эфира уксусной кислоты, а также метанольное извлечение из соцветий *Calendula officinalis* ингибирует фермент ацетилхолинэстеразу [62].

Календулозид В, являющийся гликозидом тритерпеновой природы, демонстрирует ярко выраженную активность в отношении трех моделей различных язвенных болезней желудка [57, 62, 78,125]. Кроме того, была изучена эффективность этанольного экстракта из цветков календулы в лечении язвенного колита у собак. Извлечение из цветков ноготков применимо для полной регенерации слизистой [62, 106]. Назначение во внутрь календулозидов F и G, а также глюкозида В вызвало гастропротекторную активность в отношении различных типов повреждения желудка, вызванных этиловым спиртом, по сравнению с препаратом омепразол. Календулозиды E, H и G, а также глюкозид А, продемонстрировали угнетающее действие в отношении моделей повреждения слизистой оболочки желудка, которые были вызваны препаратами индометацина [62, 208].

Гексановый и этанольный экстракты из календулы, гель, мазь, крем цветков календулы лекарственной оказывают выраженное ранозаживляющее действие [62,71,183].

Использование во внутрь суммированного извлечения этанолового спирта из наземной части ноготков проявляло значительное понижающее жар воздействие, по сравнению с контрольными испытаниями (в качестве субстанции использовался аспирин) в идентичной дозировке [14, 62].

Водное извлечение цветков ноготков в разведенном виде, которым производилась обработка крысиных сердец до ишемии, оказывало кардиопротекторное воздействие, производя стимуляцию давления в полости левого желудочка, а

также уменьшало степень инфаркта в мышце сердца и отмирания мышечных клеток сердца [62, 159].

В соответствии с литературными данными было установлено ангиогенное действие спиртового извлечения и фракционных извлечений из соцветий ноготков, а также лиофилизированного экстракта из календулы цветков [62,136,138].

Извлечения этилового спирта из соцветий ноготков в качестве нефропротекторного средства были использованы на модели нефротоксичности, вызванной цисплатином [62, 152]. Предварительно обработав крыс извлечениями из календулы, ученые получали улучшение миелосупрессии, которая была вызвана цисплатином, и продуцировала увеличение антиоксидантных энзимов – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатиона [62, 152].

На примере воздействия на печень тетрахлорметана *in vivo* и *in vitro* бутанольное извлечение цветков ноготков предупреждает проявление отмирания клеток печени, увеличивает степень активности микросомальных энзимов печени, приводит в норму пропорциональность некоторых фосфолипидных соединений в мембранах клеток печени и энзимов сыворотки крови. При этом происходит угнетение супероксидного и гидроксильного радикалов, обусловленное наличием фенольных соединений. Таким образом, экспериментально подтверждено гепатопротекторное действие бутанольного экстракта соцветий ноготков, содержащего сапонины и флавоноиды [113, 197].

Гипогликемическая активность была выявлена после однократного применения календулозидов G и E у крыс [62, 208]. Употребление во внутрь крысами водно-спиртового извлечения листьев календулы приводило к значительному снижению уровня глюкозы в крови, сахара в моче и сывороточных липидов. Кроме того, увеличился уровень общего гемоглобина [25,40, 62]. Извлечение метиловым спиртом наземной части ноготков ингибировало реакцию Майяра, понижая накопление конечных продуктов гликирования. Антигликирующая активность извлечения сравнивалась с аминогуанидином [13,62].

Антиоксидантное действие и антирадикальная активность были отмечены учеными для: этилацетатного, ацетонового и метанольного экстрактов из околоцветников ноготков; пропиленгликолевого экстракта из цветков; бутанольной фракции из цветков; водно-метанольного экстракта цветков и гексанового экстракта листьев календулы лекарственной [108,34,49,62,162]. Метанольный экстракт из цветков и этилацетатный экстракт из листьев и цветков *Calendula arvensis* проявили ингибирующее влияние на свободные радикалы в железо-связывающей активности [62]. Извлечения из листьев ноготков лекарственных: метанольный экстракт, петролейный эфир, этилацетатный экстракт, суммарный 50% водный и метанольный экстракты. Метанольный и водный по сравнению с кверцитином оказывали антиоксидантное действие на примере угнетения радикала окиси азота [42, 62].

Этанольный экстракт из цветков календулы лекарственной и экстракт петролейного эфира из надземной части *Calendula arvensis* обладают иммуномодулирующим действием [91,62,156,]. По некоторым данным формирование гуморального иммунного ответа стимулируют полисахариды цветков [91,62,156].

Препараты календулы обладают антибластомными свойствами, особенно это характерно для индивидуальных веществ, выделенных для различных частей ноготков [86,113,163,172]. Достаточно хорошей токсичностью по отношению к клеткам обладали извлечения, которые содержали липиды, терпеноиды, тритерпеноиды в свободном состоянии, сапонины тритерпеновой природы, хлорофиллоносные вещества, соединения фенольной природы и флавоноиды. Наиболее активным был экстракт с максимальным содержанием тритерпеновых сапонинов [86,113,163,172]. Чай из цветков календулы лекарственной оказывает селективный цитотоксический эффект, направленный на злокачественные клетки [62, 104].

Противомикробное действие эфиромасличных соединений ноготков превышает десятикратно активность отвара соцветий ноготков [76,113]. Спиртовое и эфирномасличные извлечения соцветий ноготков оказывают также

противопротозойное действие по отношению к *Trichomonas vaginalis*. Выявлено, что имеющее известность трихомонацидное действие эфирномасличных соединений определяет их составляющая, содержащая кислород, в которой обнаружены монотерпены и сесквитерпены [76,113].

Петролейный, хлороформный, бутанольный, этанольный, водный экстракты, полученные из листьев, корней, стеблей, и цветков проявили антимикробную активность в отношении следующих патогенных штаммов: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* и др. [62, 103].

Фитопрепараты ноготков имеют седативные и центральнодепрессивные свойства: значительно подавляют активность двигательного типа, понижают тонус мышц и возбуждательные рефлексy у животных, делают их сонливыми и адинмичными [113,131]. Общеустановлено, что календулозиды (сапонины тритерпеновой природы) оказывают влияние на центральную нервную систему [113,131]. Сапонины соцветий календулы понижают содержание холестерина и приводят в норму липидный состав крови [57,113,164,170]. Некоторые БАС ноготков ускоряют процессы метаболизма в печени, улучшают компонентную составляющую желчи, снижают концентрацию холестерина и пигментов печени, способствуют улучшению секреторной функции печени. Таким образом, ноготки улучшают процессы выделения желчи, что позволяет ликвидировать застой желчи в желчных путях [113,120,146].

Выраженное противовирусное действие проявил дихлорметановый-метанольный (1:1) экстракт из цветков календулы лекарственной *in vitro* в условиях МТТ-модели [62,83].

Метанольный, этанольный и водный экстракты проявили значительную антигельминтную активность *in vitro* [62,155].

Ацетон-метанольный экстракт (2:1) из цветков календулы проявил инсектицидную активность по отношению к молчалим жучкам [62,184].

Было изучено моллюскоцидное действие водного экстракта из различных органов календулы на взрослой особи моллюсков. Листья, цветки, стебли и корни ингибировали моллюсков *Biomphalaria alexandrina* и *Biomphalaria truncatus*.

Рутин, выделенный из этанольного экстракта цветков календулы проявил также моллюскоцидную активность против *Biomphalaria truncatus* [9,62,137].

Водные и спиртовые извлечения наземной части ноготков проявляли противогенотоксичную активность в различных методах повреждения и восстановления ДНК [62,99]. Кроме того, водный экстракт проявил протекторное действие в отношении генетического материала [62,99].

1.9. Фитопрепараты на основе календулы лекарственной

Широкий фармакологический спектр действия БАС, содержащихся в календуле лекарственной, послужил основанием для получения ряда препаратов [113].

Таблица 2 – Лекарственные средства, содержащие календулу лекарственную

№ п/п	Наименование препарата	Фармакологическое действие. Показания к применению
1	Соцветия календулы	Применяются при наличии диспептических расстройств желудка, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, гастрита, болезней печени
2	Календулы настойка (1:10) на 70% спирте	Применяются наружно при наличии порезов, гнойных ран, ожогов, в целях полоскания горла, в стоматологии (при наличии кровоточивости десен и парадонтоза) и гинекологии (при заболевании эрозии шейки матки)
3	Экстракт календулы жидкий	Применяется при наличии ожогов, порезов, трещин сосков и губ, при наличии ушибов, экзем и фурункулеза
4	Мазь «Календула»	Оказывает противовоспалительное, противомикробное действие, активизирует процессы регенерации
5	Калефлон, таблетки	Оказывают противовоспалительную активность, стимуляцию репаративных процессов. Применяются при наличии язвенных поражений двенадцатиперстной кишки и желудка

6	Ротокан, смесь жидких экстрактов	Обладает репаративной, противовоспалительной, гемостатической и противомикробной активностью. Используется при наличии воспалительных процессов слизистых оболочек рта, пародонтоза, гингивита, афтозного стоматита
7	Алором, линимент	Обладает противовоспалительной, антисептической, обезболивающей, рассасывающей и репаративной активностью. Используется при наличии посттравматического артрита, гематом поверхностного типа, плекситов, радикулитов, миозитов, полиартритов и в качестве профилактических мер против пролежней
8	Доктор Тайсс, венозный гель	Оказывает противовоспалительное, венотонизирующее, противоотечное действия. Используется при наличии варикозного расширения вен, флебитов, локальных отеков, процессов воспалительного характера, венозного застоя нижних конечностей
9	Доктор Тайсс, мазь календулы	Оказывает антисептическое, противовоспалительное действия. Используется при незначительных ранах, ожогах, при тромбофлебите и варикозном расширении вен
10	Arcalen, эмульсия	Проявляет противовоспалительную активность, способствует повышению скорости грануляционных и регенерационных процессов. Используется наружно при наличии контузий, ушибов, ран, ожогов, отморожений, фурункулеза
11	Arcanum-Strath, капли	Применяется для усиления аппетита, при наличии психического и физического переутомления, оказывает тонизирующее влияние на нервную систему
12	Арника, гель	Используется при наличии повреждений суставов и мышц травматического характера, растяжений, ушибов, сдавливаний, вывихов, разрывов связок, гематом и отеков мягких тканей

13	Azucalen, спиртовой раствор	Оказывает противомикробное, противосудорожное действия
14	Befelka-Oel, масло	Используется при наружном применении при наличии кожного зуда, опрелостей, экземы сухого и мокнущего типа, поражения бороды сикозом, кожных болезней головы, высыпаний на коже
15	Calendula Echenacea Salbe, мазь	Используется для лечения ран, лечения и профилактики пролежней
16	Calendulene, раствор для наружного применения	Используется для наружного применения как компрессы, обтирания, для того, чтобы промыть глаза при конъюнктивитах
17	Calenduline, вагинальные таблетки	Используется в качестве противовоспалительного средства для слизистого влагалища
18	Cikaderma, мазь	Используется наружно при наличии эритем солнечного типа, ожогов, кожных трещин, укусов насекомых, незначительных неглубоких язв
19	Ferrum-Strath, капли	Применяется при железодефицитной анемии
20	Hemostin, аэрозоль	Оказывает противовоспалительное, кровоостанавливающее и регенерирующее действия. Предотвращает повреждение кожи благодаря способности пленкообразования. Применяется для наружного применения (орошение поверхности ран)
21	Pomade au Calendula LHF, мазь	Используется для локального нанесения при наличии порезов, гематом, трещин без протекающих воспалительных процессов
22	Pomade au Calendula pau Digesthion, мазь	Находит применение при наличии эритем солнечного типа, ожогов, кожных трещин, укусов насекомых, незначительных неглубоких язв
23	Цикадерма, гомеопатическая мазь	Оказывает противовоспалительное, антисептическое действия. Применяется при легких ожогах, солнечной эритеме, ранах, мелких порезах, трещинах, укусах насекомых
24	Суппозитории ректальные с настойкой	Оказывает противовоспалительное, противогеморроидальное действия
25	Sanofil, аэрозоль	Оказывает противовоспалительное, противомикробное действия

26	Желчегонный сбор №3	Проявляет желчегонную активность. Используется при наличии острого и хронического холецистита, гепатита, во время послеоперационного периода при проблемах с печенью, желчным пузырем и желчевыводящими путями
27	Почечный сбор № 23	Проявляет противовоспалительную, антимикробную активность, усиливает выделение мочи, способствует очищению мочеточников. Применяется при цистите, уретрите, пиелонефрите
28	Грудной сбор № 9	Проявляет противовоспалительную, отхаркивающую и антисептическую активность, успокаивает кашель, делает лучше дренаж бронхов естественным путем. Используется при наличии острого и хронического бронхитов, трахеитов
29	Сбор бронхиальный № 8	Способствует разжижению мокроты, делает кашель более мягким, проявляет противовоспалительную, бактерицидную и отхаркивающую активность, делает лучше естественный дренаж бронхов. Используется при наличии бронхитов, трахеитов, пневмоний, проявляет свою эффективность против кашля у курильщиков
30	Сбор при заболеваниях печени и желчевыводящих путей № 18	Проявляет спазмолитическое и болеутоляющее действия на мускулатуру желчных путей кишечника, повышает выделение желчи, благоприятствует процессам пищеварения, ликвидирует вздутие живота, оказывает антигепатотоксическое действие. Применяется при дискинезии желчевыводящих путей, желчекаменная болезнь
31	Настойка, мазь с настойкой (гомеопатические)	Оказывает противовоспалительное, противогеморроидальное действия

1.10. Проблемы стандартизации календулы лекарственной

Цветки ноготков используются в качестве официального лекарственного растительного сырья (ЛРС) в различных государствах [39,41,64]. Наряду с этим, ноготки лекарственные являются хорошо известным растением в гомеопатической практике. Гомеопатические фармакопеи таких стран, как Германия и Франция располагают данными о календуле в своем содержании [161]. При этом в Немецкой гомеопатической фармакопее в качестве сырья указана вся надземная часть ноготков в период цветения, а не только цветки, как в фармакопеех других государств [39,41,64,160].

Анализ растительного сырья в Фармакопейной статье 5 «Цветки ноготков» (Государственная фармакопея СССР XI издания) предполагался только лишь с учетом содержания экстрактивных веществ. Тем не менее, эта величина не позволяет объективно оценить качественную характеристику сырья и фитопрепаратов [42,43].

Действующая фармакопейная статья ФС.2.5.0030.15 «Ноготков лекарственных цветки» (Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания) предполагает для определения основных групп биологически активных веществ метод ТСХ [40,41]. В качестве стандартных образцов используются РСО рутина, РСО хлорогеновой кислоты, РСО кофейной кислоты, РСО β -каротина. По нашему мнению, данные вещества не в полной мере являются диагностическими для цветков календулы, так как распространены во множестве других растительных объектов. В представленной статье определить количественные характеристики (экстрактивные вещества и содержание флавоноидов в пересчете на рутин) сырья предлагается с использованием спектрофотометрического метода [40,41]. Однако в целях более объективной стандартизации следует учитывать высокое содержание каротиноидов в цветках календулы, а также их весомый вклад в суммарное терапевтическое действие растения.

Подходы, которые используются в фармакопее Европы и фармакопее Британии имеют полное совпадение [159]. Идентификационный анализ высушенного сырья производят в соответствии с характерными внешними

признаками, дополнительно микроскопируют сырье, используя хлоралгидрат. Качественный анализ осуществляется с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) при длине волны равной 365 нм. Раствором сравнения выступает смесь кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты и рутин в метаноле. Система растворителей: муравьиная кислота безводная:вода:этилацетат 10:10:80. В целях определения количественных особенностей предлагается использовать показатель содержания флавоноидов в пересчете на гиперозид равный более 0,4%. Количественную оценку осуществляют спектрофотометрическим методом при длине волны 425 нм. Подраздел «Числовые показатели» описывает такие характеристики, как: посторонние примеси (цветоложе с обертками - менее 5 %; другие примеси – менее 2%), потеря в массе при высушивании (менее 12 %) и зола общая (менее 10%).

Стандартизация цветков календулы в государственной фармакопее Республики Казахстан схожа с подходами Европейской фармакопеи. В НД также проводят испытания на микробиологическую чистоту, тяжелые металлы и радионуклиды [39,159].

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. Система растворителей: уксусная кислота:вода:бутанол (10:40:50) [161].

Во Французской гомеопатической фармакопее используются свежие цветки календулы. В качестве метода анализа матричной настойки используют ТСХ (детекция при 365 нм), контрольным раствором является смесь рутина и хлорогеновой кислоты в метаноле (методика повторяет подход Европейской и Британской аллопатических фармакопей). Однако диагностическими веществами отмечают пятна рутина, хлорогеновой кислоты и нарциссина [161].

Упоминание в данном НД нарциссина совпадает с результатами наших исследований [161].

Общеизвестно, что широкая направленность фармакологической активности соцветий ноготков определена наличием одних из самых важных биологически активных веществ, таких как: флавоноиды, каротиноиды и сапонины [76,113,137]. С нашей точки зрения, оптимальные аспекты стандартизации цветков ноготков должны заключать в себе оценку сырья на содержание ведущих групп биологически активных веществ [76,137].

По результатам фитохимических исследований доминирующим и диагностическим веществом цветков календулы является флавоноид нарциссин. Данное диагностическое вещество было впервые выделено из ноготков методом колоночной хроматографии. Методом ^1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрального анализа ранее было установлено его химическое строение [137]. Сопоставление выделенного доминирующего флавоноида с ГСО рутин с использованием метода ТСХ (R_f около 0,4), хроматографическая система хлороформ-метанол-вода 26:14:3) установило, что хроматографическая подвижность выделенного соединения обладает другим значением R_f , равным 0,45. Обнаружено, что нарциссин и рутин имеют близкие спектральные характеристики [137], что объясняет ошибочный поход к анализу сырья календулы, применяемый в зарубежных фармакопеях.

Таким образом, совершенствование современных подходов к стандартизации сырья календулы является актуальным фармакогностическим направлением.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.

1. По результатам оценки литературы были описаны многообразные химические составляющие разных морфологических частей ноготков лекарственных, содержащих каротиноиды, флавоноиды, фенилпропаноиды, сапонины, эфирные масла, полисахариды, кумарины.

2. Всевозможные компоненты БАС обуславливают широкую направленность фармакологических свойств ноготков. При анализе работ отечественных и зарубежных ученых были выявлены противовоспалительные, противоаллергические, фитонцидные, антисептические, противоотечные, нейропротективные, противоязвенные, гепатопротекторные, ранозаживляющие, жаропонижающие, гепатопротекторные, гипогликемические, антиоксидантные, иммуномодулирующие, антибластомные, антимикробные, антипротозойные, трихомонацидные, седативные, снижающие уровень холестерина, желчевыделительные, противовирусные, антигельминтные, инсектицидные, моллюскоцидные, антигенотоксичные свойства.

3. Широкий спектр фармакологической активности и богатый химический состав обуславливают перспективу создания новых ЛРП.

4. В Российской Федерации нормативная документация на цветки календулы лекарственной не в полной мере отвечает современным требованиям стандартизации, таким образом требуется доработка и унификация методик количественной и качественной оценки содержания БАС.

5. Встречающийся опыт использования зарубежных методик анализа и стандартизации не лишен некоторых недочетов, что определяет востребованность увеличения избирательности и прецизионности анализа ноготков и фитопрепаратов на их основе посредством выполнения научных исследований.

6. Изучение надземной и подземной частей календулы сделает возможным применение всей фитомассы растения для полноценного применения сырьевого ресурса и производства новых импортозамещающих лекарственных средств с широкой направленностью фармакологического действия.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступали цветки, плоды, трава и корни календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). Сырье заготавливали на территории Самарской области. Некоторое сырье было собрано в разные вегетационные периоды растения в промежуток между июнем и сентябрем.

Представители растительных объектов:

- Цветки календулы лекарственной, заготовленные в Самарской области;
- Листья и стебли календулы лекарственной, заготовленные в Самарской области;
- Плоды календулы лекарственной, заготовленные в Самарской области;
- Корни календулы лекарственной, заготовленные в Самарской области.

Изучены лекарственные препараты и субстанции, перечисленные ниже:

1. Календулы лекарственной настойка 1:10;
2. Календулы лекарственной настойка 1:5;
3. Настой цветков ноготков лекарственных;
4. Календулы лекарственной экстракт жидкий 1:2 70% спирт;
5. Календулы лекарственной экстракт жидкий 1:2 40% спирт;
6. Фильтр-пакеты календулы лекарственной;
7. Пищевой сорбит (ТУ 9197-008-72315488-2010);
8. Фруктоза (ТУ 9111-101-54904577);
9. Сахароза (ГОСТ 21-94);
10. Сироп на основе сахарозы (сорбита, фруктозы) с настоем цветков календулы лекарственной;
11. Сироп на основе сахарозы (сорбита, фруктозы) с настойкой цветков календулы лекарственной на спирте этиловом 70%;

12. Сироп на основе сахарозы (сорбита, фруктозы) с жидким экстрактом цветков календулы лекарственной на спирте этиловом 70%;
13. Сироп на основе сахарозы (сорбита, фруктозы) с жидким экстрактом цветков календулы лекарственной на спирте этиловом 40%;
14. Индивидуальные вещества: рутин, нарциссин, изокверцитрин, кверцетин, β -каротин, кофейная кислота, хлорогеновая кислота;
15. *n*-Алканы от гексана до тетрадекана включительно, марки х.ч.

Экспериментальные данные были получены с применением следующей приборной базы:

1. Аналитические весы «Mettler Toledo XS 204»; весы электронные САРТО ГОСМ ЛВ 210-А, весы Мора ВА-4М; весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20;
2. Спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena);
3. Спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ Спектр);
4. Термостат суховоздушный «ТС-1/80»;
5. Рефрактометр «RL-3»;
6. Набор ареометров ИСП.АІ;
7. Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ»;
8. Хроматографическая система: хлороформ-этанол-вода (26:16:3);
9. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ;
10. Цифровые микроскопы марки Motic: DM-111 и DM-39C-N9GO-A;
11. Цифровой люминесцентный микроскоп «Альтами ЛЮМ-2»;
12. Набор сит с различными размерами отверстий;
13. Спектрофотометр «Bruker AM-300»;
14. Масс-спектрометр «Kratos MS-30»;
15. рН-метр «MP-25»;

16. Газовый хроматограф «Кристалл 5000.2» (ЗАО «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), (Госреестр средств измерений РФ № 18482-99);

17. Газовый хроматограф «Цвет-500» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД);

18. Капиллярная кварцевая колонка VF-1 (Varian, США) (30м×0,32мм×0,5мкм) с полидиметилсилоксановой неполярной неподвижной фазой;

19. Капиллярная кварцевая колонка INNOWAX (Agilent Technologies, США) (30м×0,32мм×0,5мкм) с неподвижной полярной фазой ПЭГ-20М;

20. Устройство для отбора пробы из паровой фазы;

21. Микрошприцы «Hamilton» объемом 1 мкл;

22. Жидкостной хроматограф «Biotronic»; хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (250 мм × 4,6 мм × 5 мкм);

23. Шкаф сушильный, ГОСТ 7365-55.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

В работе исследовали надземную и подземную части календулы лекарственной. В целях проведения микроскопического анализа проводили фиксацию свежесобранного сырья в смеси глицерина очищенного, этанола 96% и воды (соотношение 1:1:1).

Микропрепараты готовили в соответствии с указаниями общей фармакопейной методики ГФ СССР XI издания, раздел «Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы». Проведение исследования осуществляли с использованием метода световой микроскопии и цифрового микроскопа марки Motic DM-111 на светлом поле, в проходящем свете, кратность увеличения составляла x40, x100, x400. Кроме того, использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе Альтами ЛЮМ -2 (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила - высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: 420-550 нм. Осуществление гистохимических реакций и подготовка микропрепаратов производилась в соответствии с указаниями общей фармакопейной методики [42,43].

Для определения размеров рассматриваемых объектов использовали линейку, а также программное оборудование цифрового микроскопа стереоскопического типа Motic DM-39C-N9GO-A. Окраску устанавливали при использовании дневного освещения, запах определяли после разламывания объекта, также проводили оценку вкусовых характеристик сырья.

Проведение исследования микропрепаратов осуществлялось в отраженном и проходящем свете при помощи цифровых микроскопов марки “Motic”: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

Оболочки клеток, подвергшиеся одревеснению, обрабатывали препаратом раствора сернокислого анилина; производили окраску эпидермиса, содержащего

кутин раствором Судана III и 5% раствором щелочи [42,43,105,114] в соответствии с ниже описанными методиками.

1. *Окраска клеточных оболочек, подвергшихся одревеснению и лигнификации.* На предметное стекло с исследуемым срезом, осуществляли нанесение капли раствора сернокислого анилина, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдалась желтая окраска клеточных оболочек, подвергшихся лигнификации [105,114].

Приготовление раствора сернокислого анилина. 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси 194 мл этанола 50% и 4 мл ледяной уксусной кислоты [105,114].

2. *Окраска клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин.* На предметное стекло с исследуемым срезом осуществляли нанесение капли раствора Судана III, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдалась розоватая окраска клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин [105,114].

Приготовление раствора Судана III. 0,01 г Судана III растворяли в 5 мл этанола 95% и добавляли 5 мл очищенного глицерина [105,114].

2.2.2. Физические методы анализа

Определение плотности сиропов производили с использованием набора ареометров общего назначения ИСП.АI по описанным в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII и XIII издания методикам [22, 24].

Определение показателя преломления сиропов осуществляли с использованием рефрактометра RL-3 по описанной в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII издания методике [22].

Определение величины рН сиропов проводили с использованием рН-метра «MP-225» по описанным в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII и XIII издания методикам [40,41].

2.2.3. Химические методы анализа

Для того, чтобы провести предварительный фитохимический анализ нами были осуществлены пробирочные реакции, характерные для определенных групп БАС:

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) была использована для того, чтобы определить присутствие флавоноидов в извлечении календулы лекарственной. К 1-2 мл извлечения прибавляли 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 5-10 мг цинка. Наблюдали красно-малиновую окраску [137].

Цианидиновая реакция по Брианту. Раствор, полученный в результате проведения цианидиновой реакции разбавляли водой очищенной в соотношении 1:1 и прибавляли *n*-бутанол. В случае наличия агликонов флавоноидов красно-малиновая окраска переходила в верхнюю органическую фазу. При наличии гликозидов – окраска оставалась в неорганическом слое [137].

Реакция с алюминия (III) хлоридом. К 1-2 мл извлечения календулы лекарственной прибавляли 1-2 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида. Наблюдали как появляется желтая окраска.

Реакция Сальковского, свойственная для сапонинов тритерпеновой природы. Сухой остаток растирали с незначительным количеством хлороформа и прибавляли серную кислоту концентрированную. В результате проведения реакции окраска от желтой менялась до красной [137].

Реакцию Лафона осуществляли для того, чтобы подтвердить наличие сапонинов тритерпеновой природы в извлечении. К 2 мл водного извлечения добавляли 1 мл серной кислоты концентрированной, 1 мл этанола и 1 каплю 10% раствора сернокислого железа. После нагревания наблюдали зелено-синюю окраску.

2.2.4. Хроматографические методы анализа

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

При помощи метода ТСХ были проанализированы водные и водно-спиртовые извлечения из надземных и подземных органов календулы лекарственной, а также препаратов на основе данного сырья.

В анализе использовали хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» (ТУ 26-11-17-89, зернение 5-17 мкм, тип сорбента – силикагель СТХ-1А, Россия). В ходе исследований растворителей система хлороформ – спирт этиловый 96% - вода (26:16:3) была определена как оптимальная и использована в дальнейших исследованиях.

Перед проведением исследования хроматографические пластинки помещали в сушильный шкаф при температуре 100-105°C. Насыщение хроматографической камеры осуществляли парами системы в течение суток. Анализ осуществляли при комнатной температуре.

Осуществляли нанесение образцов исследования на линию старта стандартным капилляром, затем погружали в камеру и проводили хроматографирование с применением восходящего способа. Завершение хроматографического анализа обуславливали фронтом прохождения растворителя, который составляет около 8 см.

Обнаружение пятен на полученных высушенных хроматограммах осуществляли при дневном свете и в УФ-свете (366 и 254 нм). Проявку хроматограмм осуществляли с использованием щелочного раствора диазобензолсульфокислоты и спиртового раствора фосфорно-молибденовой кислоты.

Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография

С помощью метода адсорбционной жидкостной хроматографии нами был проанализирован компонентный состав водно-спиртового извлечения из цветков календулы лекарственной сорт «Кальта», культивируемой в Самарской области. В виде сорбента нами был использован силикагель КСКГ измельченный (фракция

0,04-0,10 мм, ГОСТ 3956-76, производитель: Sorbis Group). В роли элюентов выступали хлороформ, этанол 96%, спирто-хлороформные смеси в разных соотношениях и вода очищенная.

В результате проведенных исследований были получены фракции, которые содержат некоторые БАС цветков календулы лекарственной. Для очистки фракций использовался полиамид для колоночной хроматографии (Woelm Pharma, Германия), силикагель КСКГ измельченный, Сефадекс LH-20 (Швеция).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

ВЭЖХ-анализ осуществляли на жидкостном хроматографе марки «Biotronic»; хроматографическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (250 мм x 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 инжектируемой 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.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ).

ГЖХ-анализ осуществляли на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и газовом хроматографе «Цвет-500» с ПИД. В качестве газа-носителя выступал водород, скорость составила 1 мл/мин. Применяли капиллярные кварцевые колонки VF-1 фирмы Varian, США (30м×0,32мм×0,5мкм) с неполярной полидиметилсилоксановой фазой и капиллярную колонку INNOWAX фирмы Agilent Technologies, США (30м*0,32мм*0,5мкм) с полярной неподвижной фазой ПЭГ-20М. Осуществляли хроматографирование с использованием программирования температурного режима колонки. При применении колонки с неподвижной неполярной фазой температура в начале эксперимента составляла 40°C, линейное программирование 5°C/мин, температура в конце эксперимента составляла 200°C. Температурный режим испарителя составлял 200°C, температурный режим детектора 200°C. Для колонки с полярной фазой ПЭГ-20М температура в начале эксперимента составляла 40°C, линейное программирование

4°C/мин, температура в конце эксперимента составила 180°C. Температурный режим испарителя составил 200°C, температурный режим детектора составил 200°C. Время проведения анализа составило 40 мин.

Образец, подвергавшийся исследованию, помещали в герметичную закрывающуюся емкость и держали при температуре 100°C 40-60 минут. Для того, чтобы ввести пробу в хроматограф, посредством герметичной резиновой мембраны с использованием конструкции с иглой задавали давление в емкости с помощью газа-носителя.

Пробу дозировали в испаритель хроматографа, при анализе равновесной паровой фазы шприцем объемом 2 см.³ 0,5 см³ в колонку с неподвижной неполярной фазой, 1 см³ в колонку с неподвижной полярной фазой. Для сравнительного анализа использовали стандартный ряд *n*-алканов (пентан – тетрадекан) по 0,2 мкл для двух колонок микрошприцем емкостью 1 мкл.

Деление потока при входе в колонку составляло 1:50. Избыточное давление газа-носителя на входе в колонку 29,4 кПа.

Газохроматографическое исследование объектов образцов осуществляли в следующем порядке:

- проводили определение наличия артефактов («ложных пиков») в результате «холостого» опыта, при температурном режиме 200°C на колонке с неподвижной неполярной фазой и 180°C на колонке с неподвижной полярной фазой при постоянной температуре, дозировали воду с помощью микрошприца объемом 5 мкл для понижения количества артефактов «холостого опыта».
- хроматографировали компоненты РПФ растительного сырья и фитопрепараты;
- проводили анализ смеси *n*-алканов для расчета линейных индексов удерживания.

По результатам газохроматографического анализа проводили расчет следующих характеристик:

- 1) индексов удерживания Ван-ден-Доола и Кратца компонентов РПФ при программировании температурного режима колонки, I_i^T [133];

2) относительные площади пиков, $A_{i,отн},\%$ [133].

Проведение оценки точности определения линейных индексов удерживания при программировании температурного режима колонки с подвижной неполярной фазой осуществляли в соответствии с анализом равновесной паровой фазы календулы лекарственной из выборки $n = 5$ измерений. В результате исследования проводили определение:

- среднего квадратичного отклонения единичного результата измерения индекса удерживания, S_x [133];
- границы доверительного интервала измерения индекса удерживания, ε [133].

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия.

Метод спектрофотометрического определения применяли для установления содержания суммы флавоноидов и каротиноидов в извлечениях и препаратах календулы лекарственной. А также для анализа индивидуальных веществ, выделенных из цветков ноготков лекарственных. Исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм. Раствором сравнения выступал этанол 96%. Обработку результатов, полученных в ходе эксперимента осуществляли при помощи программного обеспечения «WinAspect Excel». Использовались также «методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье «Ноготков цветки» и «методика количественного определения суммы каротиноидов в сырье «Ноготков цветки» [137]:

2. ^1H -ЯМР-спектроскопия и масс спектральный анализ.

Спектральные и физико-химические характеристики выделенных соединений исследовали посредством регистрации ^1H -ЯМР-спектров на приборе «Bruker AM 300» (300 мГц); регистрацию масс-спектров электронного удара проводили на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70эВ и колебании температурного режима ионного источника от 100 до 250 °С.

Определение температуры плавления выделенных веществ проводили на блоке Кофлера.

2.2.6. Технологические методы

Настойку и экстракты цветков календулы лекарственной изготавливали с использованием нескольких методов: метода перколяции и метода дробной мацерации с элементами модификации в соответствии с общими правилами фармацевтической технологии. Разработанный на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ метод модифицированной ремацерации был апробирован на различных видах сырья, содержащего фенилпропаноиды (Патент РФ на изобретении № 2102999, № 2134584, № 2133620 и др.). Настойку 1:5 получали на 70% спирте этиловом, а экстракты получали с использованием 40% и 70% спирта этилового в соотношении 1:2 [137].

Стадии получения настойки цветков календулы лекарственной методом модифицированной мацерации [137]:

День 1. 150,0 г измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, цветков календулы лекарственной распределяют по 50,0 г. в три экстрактора. В первый экстрактор заливают полуторократное количество 70% этилового спирта (75 мл) для набухания в течение 3 часов и затем 5 объемов экстрагента (250 мл) для экстракции сырья в течение 24 часов при комнатной температуре. Во второй экстрактор помещают 75 мл 70% этилового спирта для замачивания сырья в течение 24 часов.

День 2. Из первого экстрактора переливают 250 мл извлечения во второй экстрактор и оставляют на 24 ч при комнатной температуре. В первый экстрактор заливают 250 мл свежего экстрагента и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. В третий экстрактор помещают 75 мл 70% этилового спирта для замачивания.

День 3. Из второго экстрактора переливают 250 мл извлечения в третий экстрактор и оставляют на 24 часа при комнатной температуре для экстракции, из первого экстрактора переливают 250 мл извлечения во второй экстрактор и

оставляют на 24 часа при комнатной температуре. В первый экстрактор заливают 250 мл свежего экстрагента и оставляют на 24 часа при комнатной температуре.

День 4. Осуществляют слив извлечения из третьего экстрактора в сосуд с готовой продукцией (1/3 часть). Из второго экстрактора переливают 250 мл извлечения в третий экстрактор и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. В первом экстракторе осуществляют термическую экстракцию с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение из первого экстрактора переливают во второй экстрактор и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. Сырье из первого экстрактора является отработанным.

День 5. Осуществляют слив извлечения из третьего экстрактора в сосуд с готовой продукцией (1/3 часть). Во втором экстракторе осуществляют термическую экстракцию с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение из второго экстрактора переливают в третий экстрактор и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. Сырье из второго экстрактора является отработанным.

День 6. В третьем экстракторе осуществляют термическую экстракцию с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение из третьего экстрактора в сосуд с готовой продукцией (1/3 часть). Сырье из третьего экстрактора является отработанным.

Полученный готовый продукт составляет (750 мл). Его выдерживают при температуре 8°С в течение 2-3 дней и фильтруют. Выпавший осадок отфильтровывают, полученное извлечение фасуют в емкости темного стекла.

Сорбитный, сахарный и фруктозный сиропы были получены в соответствии с классической методикой [63].

Этапы приготовления базовой формы сиропа [63].

Загрузку сахара осуществляли в термоустойчивую колбу и прибавляли немного воды. Затем прибавляли оставшуюся воду, чтобы получить соотношение сахара и воды 64:36, производили нагревание до 60-70°С и помешивали до тех пор, пока сахар не растворится. Затем приготовленный сироп кипятили до

образования пены. В случае, если пена главным образом не образовывалась, осуществляли фильтрование и фасовку полученного горячего сиропа в емкости темного стекла. По аналогичному принципу изготавливали сорбитный и фруктозный сиропы. Базовые сиропы, которые были получены использовались в дальнейшем для получения сиропа цветков календулы лекарственной/

2.2.7. Фармакологические методы анализа

Было изучено влияние извлечений из цветков календулы лекарственной на экскреторную деятельность почек в эксперименте хронического типа. Проведение исследований осуществлялось на крысах обоего пола белых и беспородных массой 200-220 г. В общей сложности было осуществлено 6 серий опытов на кафедре фармакологии Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). Крыс содержали в виварии со свободным доступом к воде и обычным рационом. За сутки до проведения эксперимента крысам давали водную нагрузку в объеме 3% от массы тела крысы посредством применения зонда внутрижелудочно. В день проведения опыта контрольной группе животнох вторично давали водную нагрузку для водных экстрактов и водно-спиртовую нагрузку для спиртовых экстрактов, опытной группе животных – внутрижелудочно лекарственное средство в эквивалентном объеме [55, 56]. Проводили исследование образцов настойки календулы 1:5 и экстракта календулы лекарственной 1:2 на 70% спирте этиловом, разработанные и полученные на кафедре фармакогнозии СамГМУ; промышленный образец настойки 1:10 (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» серия 91214 (в дозировке 50 мкл/кг за 4 и 24 ч опыта). Крысы были помещены в специализированные обменные клетки сроком на сутки, производили сбор 4-х и 24-х часовых порций мочи [55]. В каждом образце проводили определение экскреции воды, регистрирование концентрации натрия и калия методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3. Статистическую обработку данных, которые были получены, проводили согласно критерия

Манна-Уитни, при этом использовали программное обеспечение Statistica 8.0 и Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа» [54,56].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

В качестве одного из безусловно важных аспектов стандартизации всех видов сырья можно выделить проведение оценки подлинности и уровня качества ЛРС с использованием морфологического и анатомического исследования. Вследствие потребности в выявлении случайных примесей или преднамеренной фальсификации сырья данный диагностический метод в особенности важен для фармацевтического анализа.

Фармакопейным видом сырья календулы являются цветки [41,43,45,46,76], помимо этого встречаются литературные сведения об использовании ноготков лекарственных травы [62].

Проведение анализа научных литературных данных предоставило возможность для выявления интереса некоторых ученых к проведению исследований с корнями календулы. Данный интерес можно объяснить значительным содержанием сапонинов тритерпеновой природы в корнях ноготков [27, 28, 29, 30, 175,176].

В Российской Федерации и зарубежом отсутствует нормативная документация на корни календулы лекарственной, что создает препятствие для разработки современных импортозамещающих препаратов с использованием данного растительного сырья.

Перспективы внедрения в медицинскую и фармацевтическую практическую деятельность корней календулы как нового лекарственного вида сырья создает потенциальную возможность безотходного и многоаспектного использования сырьевых ресурсов Российской Федерации.

Для того, чтобы внедрить новый вид сырья в практическую фармацию, необходимо провести исследования по разработке нормативной документации, в том числе одного из важнейших разделов «Микроскопия» [41,105, 113,114].

Общеизвестно, что как зарубежные, так и отечественные ученые проявляли заинтересованность к морфологическим и анатомическим аспектам ноготков

лекарственных. Тем не менее нами не было найдено научной информации о гистологии и анатомии корневой системы календулы [61,113,137].

3.1. Морфолого-анатомическое исследование корневой системы календулы лекарственной сорта Кальта

Анализ морфологических аспектов изучаемых образцов растения обосновал строение корневой системы стержневого типа календулы лекарственной.

Основопологающие принципы строения, характерные для представителей подкласса Asteridae были выявлены посредством изучения характерных особенностей строения корневой системы календулы с точки зрения анатомии.

Микроскопические исследования поперечных срезов главного корня, в диаметре от 0,2 до 15 мм показали, что корень имеет вторичное строение. Корень представлен тканями центрального цилиндра как совокупностью тканей проводящего типа, тканями коры и пробки (рис. 1А, Б).

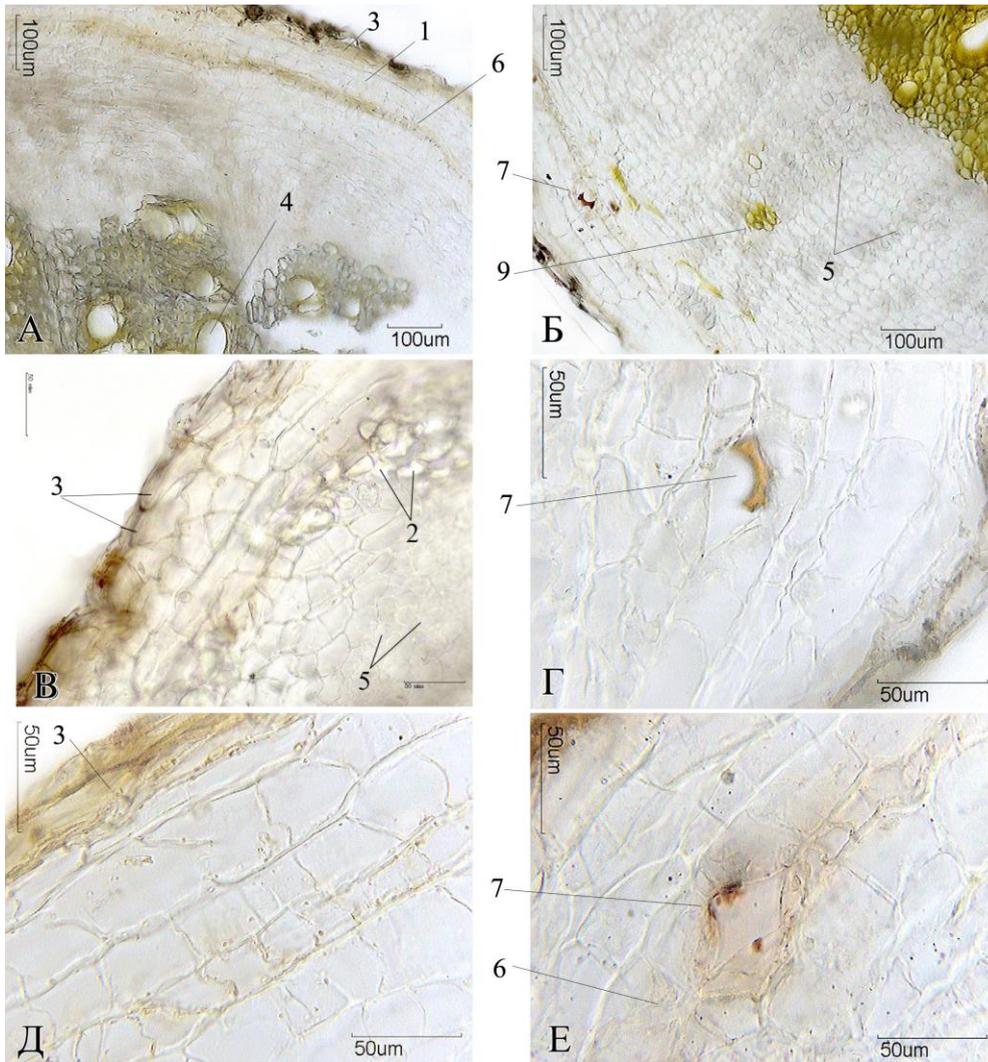


Рисунок 1 - Кóровая часть корня календулы лекарственной (d=2мм):

А, Б – лигнифицированные ткани корня календулы (поперечный срез, окраска 10% раствором сернокислого анилина, x100);

В, Г – кóровая часть корня (поперечный срез, x400);

Д, Е – поперечный срез корня (кóровая часть), окраска раствором Судана III, (x400).

Обозначения: 1- паренхима коры; 2- слой клеток кóровой паренхимы с кристаллическими включениями; 3- пробка; 4- сосуд ксилемы; 5- ткани флоэмы; 6 – пигментированный слой; 7 – клетка с пигментом; 8 – паренхима сердцевинного луча; 9 – лигнифицированные клетки паренхимы.

Форма корня на поперечном срезе, большей частью, округлая. Кóровая и покровная части составляют приблизительно 20-30 % (от 200 до 1600 μm) от структуры поперечного среза исходя из величины корня в диаметре. В большей

степени преобладает ксилема центрального цилиндра. Данная характерная черта принадлежит представителям семейства сложноцветные, ранее эта особенность была установлена рядом ученых.

В результате увеличения диаметра и роста корня происходит увеличение объема коровой части (тканей вторичной коры). В подтверждении литературных данных в корнях с большим диаметром (9-15 мм) размер пробки составляет приблизительно восемь слоев клеток.

Коровая часть корня представлена клетками со скоплениями включений кристаллической природы (рис. 1В), которые являются сферокристаллами инулина. Включения идентифицируют фиксацией образцов раствором этанола (70%). Важно заметить, что сферокристаллы инулина относятся к специфическому признаку представителей подкласса *Asteridae*.

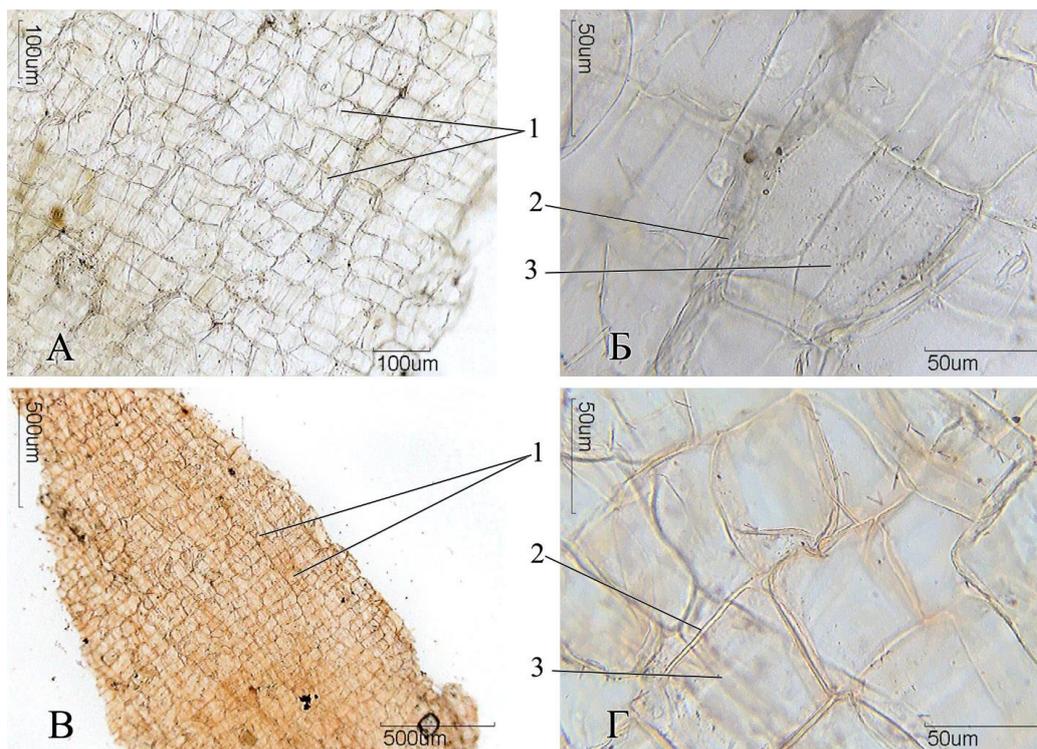


Рисунок 2 - Пробка корня календулы лекарственной. Вид с поверхности. (d=2мм):

А – фрагмент до окраски, (x100); Б – фрагмент до окраски, (x400);

В – окрашивание раствором Судана III, (x40); Г - окрашивание раствором Судана III, (x400).

Обозначения: 1 – пробковый слой клеток; 2 – стенка клетки; 3 – полость клетки.

При исследовании корня на поверхности различимы клетки пробки, чаще всего, имеют одинаковый размер и прямоугольную форму. Окраски оболочек, до использования реактивов практически нет, иногда оболочка имеет желтоватый оттенок (рис. 2А, Б). После обработки Суданом III оболочки приобретают ярко-оранжевую окраску (рис. 2В, Г).

Основная ткань коры на поперечном сечении представляет собой паренхимные клетки основной ткани, выраженные в тканях флоэмы (рис. 1Д). На периферии коровой части располагается пигментированный слой в виде непрерывного кольца (рис. 1А, Г, Е). Размеры клеток пигментированного слоя колеблются. Клетки пигментированного слоя крупного размера заключают в себе липофильный протопласт, который имеет бурую окраску (рис. 1Е).

На продольных сечениях корня клетки основной ткани коры плотно смыкаются, паренхимного типа, имеют четырехугольную форму; имеют расположение в виде правильных слоев, ориентированы от периферии к центру среза. В участках коры с темной окраской местами можно встретить фрагменты, подвергшиеся лигнификации.

Проводящие элементы луба представляют собой расположенные радиально ряды клеток уплощенного типа, имеющие тонкие целлюлозные стенки (рис. 3А, Б). Характерное окрашивание протопласта клеток раствором Судана III подтверждает липофильную природу веществ, которые входят в него.

По мере увеличения диаметра корня ткани флоэмы начинают быть более различимыми, становятся структурированными и упорядоченными. Наряду с этим зона камбия имеет слабую визуализацию (рис. 3В, Г).

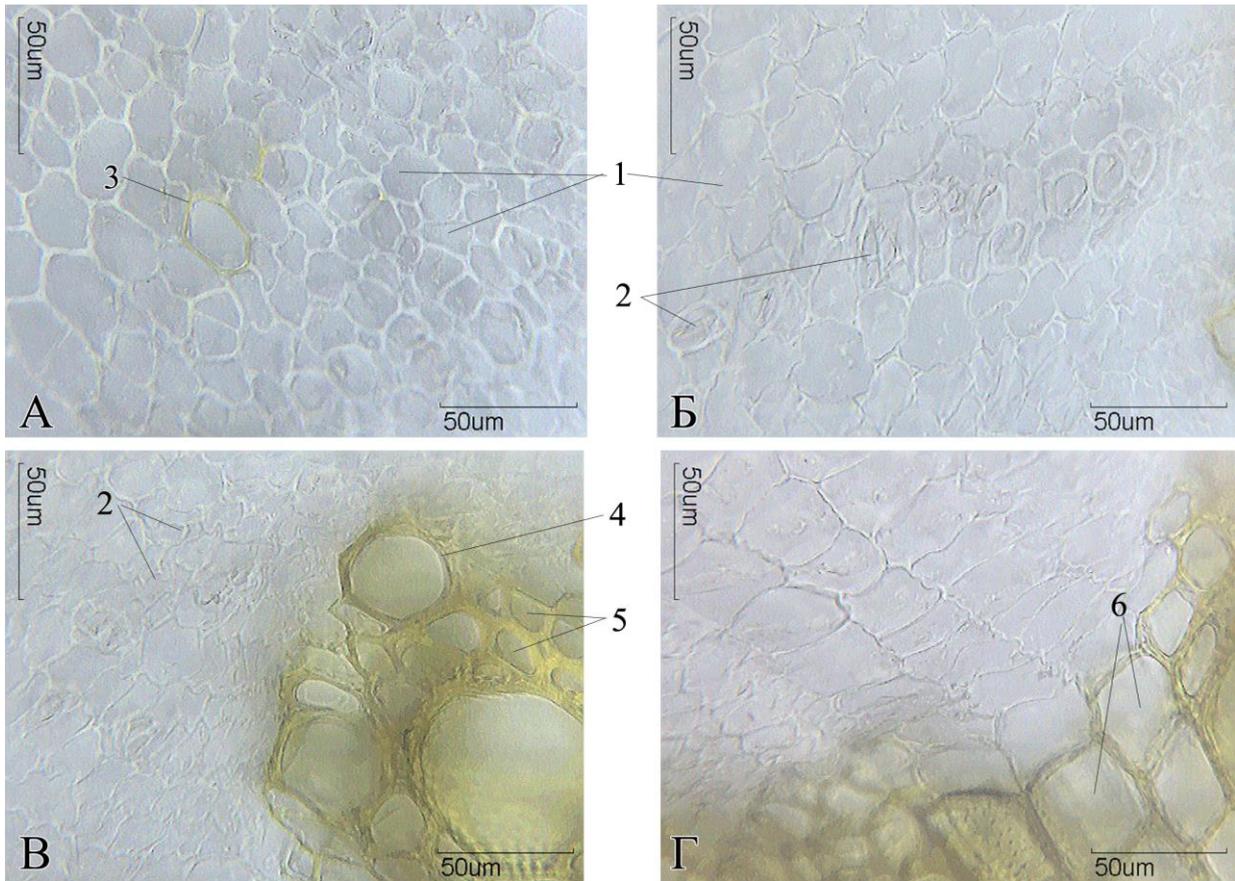


Рисунок 3 - Ткани флоэмы корня календулы лекарственной (d=2мм):

А, Б – фрагмент ксилемы и флоэмы (поперечный срез, окраска 10% раствором сернокислого анилина , x400);

В, Г – ткани флоэмы корня (поперечный срез, окраска 10% раствором сернокислого анилина, x400).

Обозначения: 1 – паренхима флоэмы; 2 – проводящие элементы флоэмы; 3 – слаболигнифицированная клетка; 4 – сосуд ксилемы; 5 - клетки древесной паренхимы; 6 – паренхима радиального луча.

Корень в центральной части представлен ксилемой. Клеточные стенки проводящих тканей при обработке срезов сернокислым анилином приобретают желтоватую окраску (рис. 4). Первичная ксилема двулучевое строение. Первичные радиальные лучи паренхимы имеют хорошую визуализацию (рис. 4В).

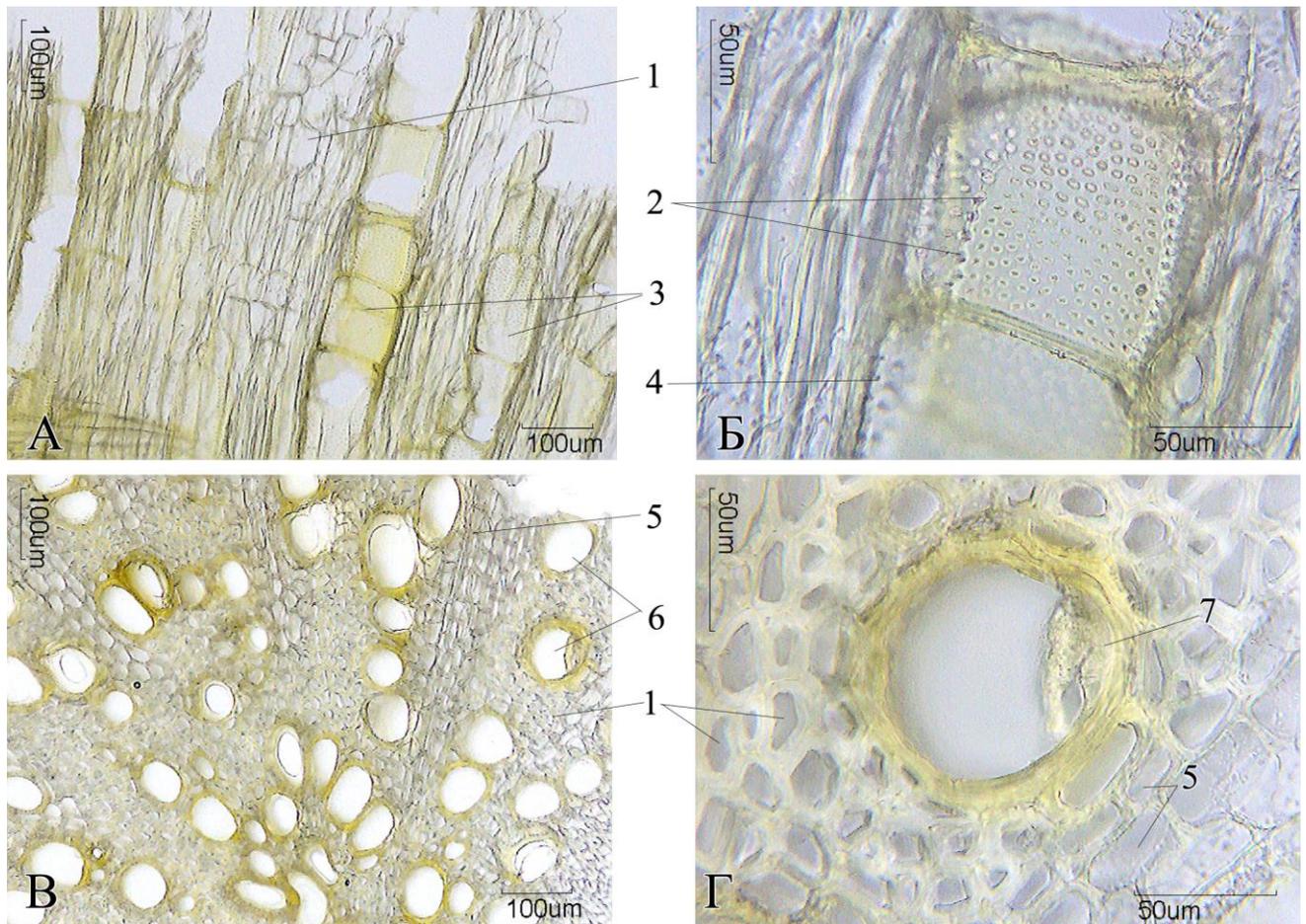


Рисунок 4 - Ксилема корня календулы лекарственной (d=2мм):

А, Б – продольный срез корня календулы лекарственной, окраска 10% раствором сернокислого анилина (x100; x400);

В, Г – ксилема корня календулы лекарственной (поперечный срез, окраска 5 % раствором натрия гидроксида, x100; x400).

Обозначения: 1 – древесная паренхима ксилемы; 2 – фрагмент пористого сосуда; 3 – членики сосудов; 4 – клеточная стенка сосуда; 5 – ткани радиального луча; 6 – сосуды ксилемы; 7 – включения фенольной природы.

При увеличении корня в диаметре в структуре ксилемы не происходит изменений. Происходит лишь некоторое увеличение клеток в размере и объеме. Паренхима первичных радиальных лучей в такой же степени визуализируется. Изучение поперечных и продольных срезов ксилемной части корней календулы продемонстрировало, что проводящие элементы ксилемы представляют собой

крупные, в большей части, пористые сосуды, которые окружены ксилемной паренхимой, подвергшейся лигнификации (рис. 4А, Б).

Неокрашенные болочки клеток проводящих элементов (сосуды различных диаметров) вследствие обработки 5 % раствором щелочи, приобретают желтую окраску. Данное явление обуславливает локализация соединений флавоноидной или фенольной природы (рис. 4Г).

Преимущественно оболочки клеток имеют равномерное утолщение. Клетки на продольных срезах прозенхимного типа. Стенки основной ткани (паренхима радиальных лучей) тонкие, окраска подтверждает частичную лигнификацию оболочек клеток.

В составе оболочек клеток паренхимы радиальных лучей находятся липофильные вещества, которые обнаруживаются при окрашивании раствором Судана III в розоватый цвет.

3.2. Морфолого-анатомическое исследование плодов календулы лекарственной сорта Кальта

В рамках комплексного исследования нами были изучены плоды календулы лекарственной, которые являются источником каротиноидов, жирных масел и полисахаридов.

Кроме того, использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе Альтами ЛЮМ -2 (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила - высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: 420-550 нм.

Из описательной анатомии представителей семейства сложноцветные известно, что у растений рода *Calendula* в одном соцветии отмечается полиморфизм плодов (рис. 5).



Рисунок 5 - Образцы плодов календулы лекарственной, выбранные из соцветия одной особи.

По литературным данным известно, что размер и форма плодов календулы является диагностичной [102,113]. На рисунке приведены также иллюстрации из атласа по описательной морфологии, где приведены формы плодов трёх основных таксонов (Приложение 1).

Однако морфологических особенностей для диагностики ЛРС недостаточно, особенно при измельчении сырья (Приложение 1).

При анализе полиморфных плодов календулы совокупность семянков разделили на пять групп. Наиболее показательные и часто встречающиеся формы плодов были отмикроскопированы (Приложение 1).

Перикарпий плода состоит из трёх слоёв: экзокарпия, мезокарпия и эндокарпия. При этом из-за особенностей формы и структуры плода поперечное сечение имеет особое очертание с выступами. Выступы в основном состоят из склерифицированных клеток мезокарпия, покрытых с поверхности тонким слоем одноклеточного экзокарпия (эпидермы плода) (Приложение 1).

Выросты, описанные выше в зависимости от размера плода и морфологической группы, могут быть сильно выражены.

При микроскопировании поперечных сечений выростов была выявлена из гистологическая структура, заключающаяся в наличии опорного пучка проводящих элементов ксилемы, армированных склеренхимой (Приложение 1).

При микроскопировании поперечных сечений в ультрафиолетовом свете отчетливо видна желтая флуоресценция лигнифицированных оболочек паренхимы выростов и опорных пучков. Перикапий на основной протяженности плода с поверхности покрыт тонким слоем экзодермы – эпидермы плода (Приложение 1).

Непосредственно под экзодермой локализована крупноклеточная, склерифицированная паренхима мезокарпия в которой однородно, в соответствии с рёбрами плода расположены пучки. Под мезокарпием располагается слой склеренхимных волокон эндокарпия, придающий плодам механическую прочность (Приложение 1).

Склеренхимные волокна лигнифицированы и окрашиваются раствором сернокислого анилина в лимонно-желтый цвет. При рассмотрении с поверхности экзокарпий сложен из тонкостенных клеток с волнистыми оболочками, дающими слабую люминесценцию за счет кутикулярного слоя. Под эпидермой видны клетки паренхимы с протопластом окрашенным в бурый цвет (Приложение 1).

Вся поверхность плодов покрыта простыми кроющими трихомами, характерными и ранее описанными в литературе для календулы лекарственной.

Трихомы могут быть однорядные или многорядные, их клеточные стенки слабо люминесцируют в ультрафиолетовом свете. Зародыш плодов на поперечном сечении вытянутой формы, исходно не окрашен. При люминесценции видны зачатки проводящих элементов с желтой флуоресценцией (Приложение 1).

Паренхима зародыша плодов однородная, тонкостенная. В клетках зародыша отсутствует крахмал и локализовано большое количество капель жирного масла (Приложение 1).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.

1. В результате морфологического и анатомического исследования корней календулы лекарственной (сорт Кальта), выявлены характерные особенности строения корней календулы как высокоперспективного источника новых лекарственных растительных средств.

2. Были отмечены следующие диагностически значимые признаки, которые необходимы для того, чтобы подтвердить подлинность корней календулы:

- присутствие пигментированного слоя клеток с бурым протопластом липофильной природы в коровой части корня;
- присутствие скоплений включений инулина кристаллического типа в коровой части корня;
- присутствие уплощенных клеток флоэмы, радиально расположенных рядами, имеющих тонкие целлюлозные стенки;
- присутствие лучей первичной двулучевой ксилемы, которые являются достаточно визуализируемыми и неодревесневшими.

3. Форма, размеры и особенности выростов на плодах являются диагностическими для конкретных видов календулы. К особенностям плодов календулы лекарственной можно отнести особенности очертаний поперечных сечений, структуру экзокарпия с многочисленными одно- и многорядными трихомами, а также наличие опорных пучков в паренхиме в мезокарпии состоящей из особых крупных клеток с лигнифицированной оболочкой.

4. Признаки, имеющие диагностическое значение, могут быть рекомендованы для внесения в раздел «Микроскопия» проекта фармакопейной статьи на новые виды лекарственного растительного сырья «Календулы лекарственной плоды» и «Календулы лекарственной корни».

ГЛАВА 4. КОМПЛЕКСНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Цветки календулы лекарственной широко применяются в отечественной и зарубежной медицинской практике за счет наличия широкого спектра фармакологической активности. Тем не менее, противоречивые литературные данные о химическом составе ноготков требуют дополнительного исследования химического состава цветков календулы лекарственной [39,41,43,142,159].

4.1. Выделение индивидуальных веществ из цветков календулы лекарственной сорт «Кальта», культивируемой в Самарской области

Для выделения БАС применяли метод колоночной хроматографии [53]. Объектом исследований являлась настойка календулы лекарственной на 70% спирте этиловом, которая была получена с использованием метода модифицированной дробной мацерации. Для приготовления 1000 мл настойки потребовалось 200 г сырья. Произвели упаривание полученного объема настойки с помощью роторного вакуумного упаривателя до 100 мл жидкого экстракта. Наносили упаренное извлечение на сорбент (силикагель L 40/100 (КСКГ измельченный, фр. 0,04 – 0,10 мм ГОСТ 39 56-76 Sorbis Group 05.2012) и производили его сушку. Отвешивали 60,0 г сорбента в качестве навески для пробы, данное количество составило приблизительно 30% от массы сырья. Примерно идентичное количество сорбента отвешивали для колонки.

Наносили высушенную смесь с пробой (сорбент и сухой экстракт) на слой силикагеля (высота – 6 см, диаметр – 8 см), формируя хлороформную взвесь. Элюацию хроматографической колонки проводили хлороформом, смесью хлороформ-этанол в разных концентрациях, этанолом и водой. Схема элюирования показана в таблице 3.

Таблица 3 - Схема элюирования хроматографической колонки

Хлороформ	Спирт	Объём	№ фракции
100%	0%	1000 мл	1-6
99%	1%	500 мл	7-11
98%	2%	500 мл	12-16
97%	3%	500 мл	17-22
95%	5%	1000 мл	23-27
93%	7%	1000 мл	28-33
90%	10%	1000 мл	34-38
85%	15%	500 мл	39-42
80%	20%	500 мл	43-47
70%	30%	500 мл	48-51
60%	40%	500 мл	52-56
50%	50%	500 мл	57-60
40%	60%	500 мл	61-65
30%	70%	500 мл	66-70
0%	100%	700 мл	71-78

После элюировали хроматографическую колонку дистиллированной водой (около 500 мл), проводили упаривание полученного элюата на водяной бане. Упаренные фракции переносили в емкости с маркировками и продолжали упаривать до 10 мл посредством вакуумного выпарителя. Концентраты полученных фракций помещали в пенициллиновые флаконы и продолжали исследование.

Для детекции элюирования использовали визуальный метод (оценки насыщенности окраски раствора), в том числе с применением метода тонкослойной хроматографии. На хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», активированную заранее при 105°C в сушильном шкафу, были нанесены концентраты фракций.

Хроматографическое разделение осуществляли в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (26:16:3). Пластинку вынимали после прохождения фронтом 7-8 см, производили сушку и просматривали в УФ-свете при длине волны 366 нм и 254 нм, а затем проводили обработку щелочным раствором ДСК или ФМК.

Объектами-свидетелями служили настойка цветков календулы лекарственной 1:5 на 70% спирте этиловом и ГСО рутина.

4.2. Анализ фракций, представленных важнейшими индивидуальными веществами цветков календулы лекарственной

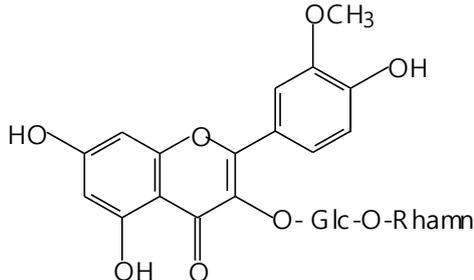
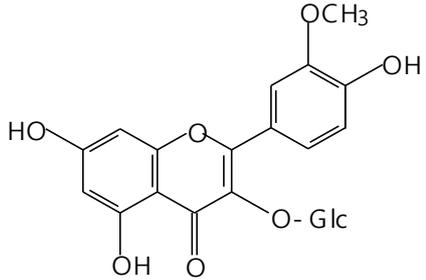
В результате проведенного ТСХ-анализа были установлены фракции, которые содержат доминирующие вещества. Объединенные фракции (элюент – хлороформ-этанол 50:50), которые содержат доминирующее соединение **1**, были объединены, подвергались упариванию и хроматографированию на полиамиде (элюирование водой и раствором спирта этилового концентрацией 20%, 30%, 40%, 70%, 96%). Объединенные фракции с веществами **2** и **3** (хлороформ-этанол, 40:60), были нанесены на полиамид «Woelm» для проведения последующей очистки. Высушенный порошок (полиамид и упаренные фракции) помещали в хроматографическую колонку (диаметр сорбента – 4 см, высота – 5 см), и рехроматографировали на силикагеле хлороформом и смесью хлороформ-этанол 80:20, 70:30, 60:40, 50:50). Объединенные фракции (элюент – хлороформ-этанол, 20:80), которые содержат вещество **4** были подвергнуты упариванию и хроматографированию на сефадексе (осуществляли элюирование хлороформом и смесью хлороформ – спирт 90:10, 80:20). Проводили рехроматографию на силикагеле (осуществляли элюирование хлороформом и смесью хлороформ – спирт 95:5, 90:10, 85:15, 80:20). Объединенные фракции (хлороформ – этанол, 30:70), которые содержат соединение **5**, подвергались упариванию и нанесению на полиамид «Woelm» для проведения последующей очистки. Высушенную порошкообразную смесь (полиамид и упаренные фракции) помещали в

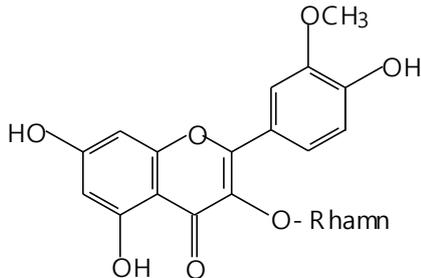
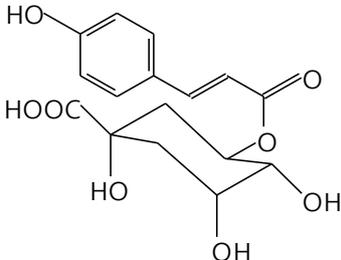
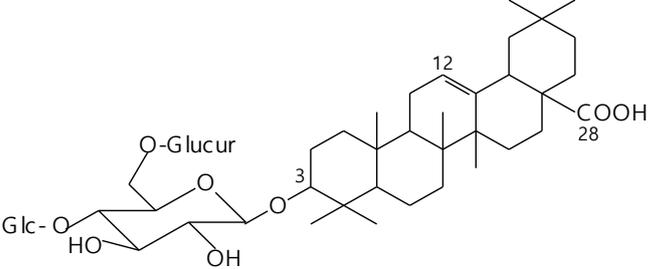
хроматографическую колонку (диаметр сорбента – 4 см, высота – 5 см), проводя элюацию водой и растворами этилового спирта (10%, 20%; 30%, 40%; 70%; 96%).

Спектральные физико- химические характеристики выделенных индивидуальных соединений и

В итоге осуществления пробоподготовки из фракций №42-44, 45-48, 51-54, 59-60, 66-72 выделены индивидуальные соединения. Для того, чтобы установить структуру выделенных веществ проводили исследование полученных веществ методом ТСХ, спектрофотометрии, масс спектрального анализа и ЯМР. Спектральные характеристики ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C получали с помощью приборов «Bruker AM 300» (300 МГц), масс спектральные характеристики получали с помощью масс-спектрометра «Kratos MS-30», УФ-спектры регистрировали с использованием спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Данные, полученные в ходе эксперимента отображены в табл. 4.

Таблица 4 – Спектральные и физико-химические характеристики выделенных соединений

№ п/п	Название	Химическая формула
1.	Нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина) $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	
2.	3-О-β-D-глюкопиранозид изорамнетина $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	

3.	3-О-α-L-рамнопиранозид изорамнетина C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	
4.	3-О-п-кумароилхинная кислота C ₁₆ H ₁₈ O ₈	
5.	Календулозид К 3-О-[(1→4)-β-D- глюкопиранозил-(1→6)-β-D- глюкуронопиранозил]-β-D- глюкопиранозид олеаноловой кислоты C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	

Идентификация выделенных веществ

Нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина). Кристаллическое вещество с желтой окраской из спирта этилового, имеет состав C₂₈H₃₂O₁₆, т. пл. 173-175° (водный спирт). λ_{max} EtOH 263, 276 пл, 368 нм; +AlCl₃ 273, 287пл., 408 нм.

¹H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 0,98 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы), 3,0-5,2 (10H сахаров), 3,83 (с, 3H, CH₃O), 4,43 (1H, уш. с, H-1¹¹¹ рамнопиранозы), 5,42 (1H, д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкопиранозы), 6,22 (1H, д, 2 Гц, H-6), 6,44 (1H, д, 2 Гц, H-8), 6,93 (1H, д, 8,5 Гц, H-5¹), 7,53 (1H, дд, 2 и 8,5 Гц, H-6¹), 7,87 (1H, д, 2 Гц, H-2¹), 12,59 (1H, с, 5-ОН группы).

Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): M⁺ 647 (624 + Na), 317 (M⁺ агликона) (316+H).

¹³C-ЯМР спектр (50 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): С-2 (156,44), С-3 (133,01), С-4 (177,32), С-5 (161,17), С-6 (98,70), С-7 (164,12), С-8 (93,17), С-9 (149,44), С-10

(103,99), C-1¹ (121,03), C-2¹ (115,22), C-3¹ (146,87), C-4¹ (149,44), C-5¹ (115,23), C-6¹ (122,57), C-1¹¹ глюкозы (101,16), C-1¹¹¹ рамнозы (100,86), OCH₃ (55,64), CH₃ (17,67), углеродные атомы при углеводных протонах (66,80-76,38).

3-О-β-D-глюкопиранозид изорамнетина. Желтое кристаллическое вещество состава C₂₂H₂₂O₁₂ с температурой плавления 220-223 °С (спирт водный). λ_{max} EtOH 260, 269 пл, 360 нм; +AlCl₃ 268, 276пл., 403. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): 501 [M + Na]⁺.

¹H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12,63 (1H, с, 5-OH), 10,89 (1H, с, 7-OH), 9,80 (1H, с, 4¹-OH), 7,96 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 7,52 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,93 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,46 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,23 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,59 (д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 3,84 (с, 3H, CH₃O), 3,1-4,5 (м, 6H глюкозы).

3-О-α-L-рамнопиранозид изорамнетина. Желтое кристаллическое вещество состава C₂₂H₂₂O₁₁. λ_{max} EtOH 258, 267 пл, 358 нм; +AlCl₃ 268, 276пл., 404. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): 501 [M + K]⁺.

¹H-ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12,63 (1H, с, 5-OH), 10,88 (1H, с, 7-OH), 9,82 (1H, с, 4¹-OH), 7,94 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 7,53 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,94 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,45 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,21 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,38 (1H, уш.с, H-1¹¹ рамнозы), 3,84 (с, 3H, CH₃O), 3,1-4,5 (м, 4H рамнозы), 0,85 (д, J=6,0, CH₃ рамнозы).

n-Кумароилхинная кислота. C₁₆H₁₈O₈. Светло-желтое аморфное вещество (вода). Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z): M⁺ 338 (14%). λ_{max} EtOH 284, 315 (пл) нм. ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 9,78 (1H, с, ароматическая OH), 7,45 (1H, д, 16 Гц, H-7¹), 7,35 (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,75 (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,30 (д, 16 Гц, H-8¹), 5,30 (1H, м, H-5), 4,10 (1H, м, H-3), 3,70 (1H, м, H-4), 1,8-2,2 (4H, м, 2H-2 и 2H-6).

Календулозид К: 3-О-[(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкуронопиранозил]-β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты. Кристаллы белого цвета из этилового спирта, состава C₄₈H₇₆O₁₉. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): M⁺ 979 [956 + Na]⁺.

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 0,70 (3H, с, CH_3), 0,73 (3H, с, CH_3), 0,88 (9H, с, 3CH_3), 0,98 (3H, с, CH_3), 1,10 (3H, с, CH_3 -29), 2,75 (1H, уш.дд, H-18), 3,60 (1H, м, H-3), 3,1-5,15 (16H сахаров), 4,39 (2H, д, 7 Гц, H- 1^1 глюкопиранозы и H- 1^{11} глюкопиранозы), 4,25 (1H, д, 7 Гц, H- 1^{11} глюкуропиранозы), 5,25 (1H, д, 9 Гц, H-12).

^{13}C -ЯМР спектр (50 МГц, ДМСО- d_6 , δ_c , м.д.): C-1 (31,51), C-2 (25,44), C-3 (76,66), C-4 (36,24), C-5 (47,05), C-6 (17,72), C-7 (32,70), C-8 (39,79), C-9 (47,03), C-10 (36,24), C-11 (22,50), C-12 (121,63), C-13 (143,79), C-14 (41,25), C-15 (27,16), C-16 (23,33), C-17 (45,91), C-18 (40,74), C-19 (45,91), C-20 (30,27), C-21 (32,23), C-22 (31,57), C-23 (27,44), C-24 (22,91), C-26 (16,80), C-27 (25,46), C-28 (175,18), C-29 (33,23), C-30 (23,34), C- 1^1 глюкозы (103,72), C- 1^{11} глюкозы (103,53), C- 1^{11} глюкуроновой кислоты (104,69), углеродные атомы при углеводных протонах (60,55-89,00), C- 6^{11} глюкуроновой кислоты (169,96).

Описание структурных особенностей выделенных соединений

Идентификацию выделенных флавоноидных гликозидов, фенилпропаноидов (гидроксикоричные кислоты) и сапонинов проводили, используя УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различные химические превращения (химический и ферментативный гидролиз).

В основе выделенных флавоноидных гликозидов лежит агликон изорамнетин – 3,5,7,4 1 -тетрагидрокси-3 1 -метоксифлавоон [143], в ЯМР-спектре которого (на примере нарциссина) присутствуют характерные сигналы протонов H-6 (1H, д, 2 Гц), H-8 (1H, д, 2 Гц), H-5 1 (1H, д, 8,5 Гц), H-6 1 (1H, дд, 2 и 8,5 Гц) и H-2 1 (1H, д, 2 Гц) при 6,22, 6,44, 6,93, 7,53 и 7,87 м.д. Кроме того, в ЯМР-спектре агликона присутствует характерный трехпротонный синглетный сигнал метоксигруппы в области 3,83 м.д.

В результате кислотного гидролиза доказано, что в гидролизате нарциссина содержатся глюкоза и рамноза, а случае других флавоноидов по одному сахару – рамноза и глюкоза соответственно. Наличие в молекуле флавоноидных гликозидов углеводных фрагментов подтверждается данными ЯМР-

спектроскопии: наличие сигналов аномерных протонов глюкозы и рамнозы (нарциссин) при 5,42 м.д. (1H, д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкопиранозы) и 4,43 м.д. (1H, уш.с, H-1¹¹ рамнопиранозы) соответственно (рис.7). В ЯМР-спектре других флавоноидов обнаруживается лишь по одному сигналу аномерных протонов, причем в одном случае глюкозы (5,59 м.д., д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), а в другом - рамнозы (5,38 м.д., уш.с, H-1¹¹ рамнозы).

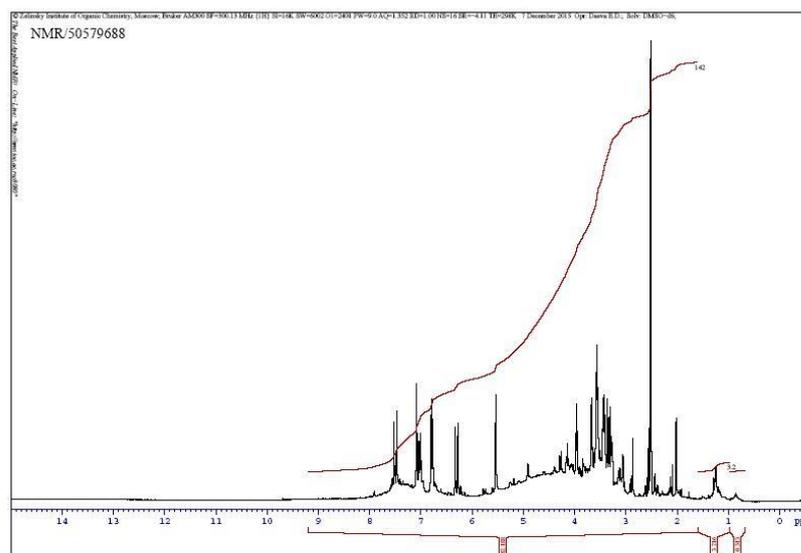


Рисунок 7 – ¹H – ЯМР спектр нарциссина (1), выделенного из цветков календулы лекарственной.

Сравнение УФ-спектров исходных растворов, выделенных флавоноидов, а также УФ-спектров в присутствии раствора алюминия хлорида позволило доказать, что в исследуемых флавоноидах сахара присоединяются 3-ОН-группе (наличие батохромного сдвига Δ40 нм, характерного для флавонолов с замещенной 3-ОН-группой). Свободные ОН-группы при С-5 в молекулах, исследуемых флавоноидов доказываются наличием в ¹H-ЯМР-спектрах однопротонных синглетных сигналов в области 12,5-12.6 м.д.

Флавоноидные структуры флавоноидов подтверждаются данными масс-спектров, в которых обнаруживаются молекулярные пики ионов рутинозида изорамнетина (M⁺ 647: 624 + Na), глюкозида изорамнетина (M⁺ 501: 478+ Na) и рамнозида изорамнетина (M⁺ 501: 462+ K) [143].

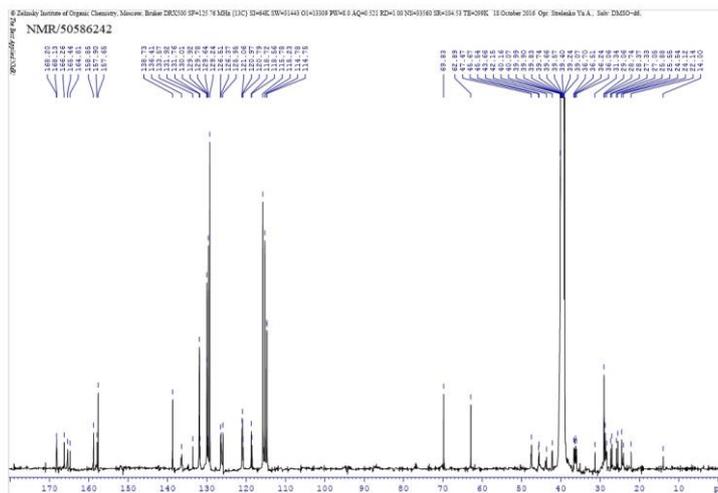


Рисунок 9 - ^{13}C – ЯМР спектр *n*-кумароилхинной кислоты (4), выделенной из цветков календулы лекарственной.

Совокупность данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, масс-спектров, а также результатов кислотного гидролиза позволила доказать, что в основе выделенного сапонина лежит олеаноловая кислота [157, 182], содержащая две молекулы глюкозы и одну молекулу глюкуроновой кислоты. Наличие двух свободных карбоксильных групп (в молекуле глюкуроновой кислоты и олеаноловой кислоты: С-28) доказывается наличием в ^{13}C -ЯМР-спектре сапонина двух сигналов при 169,96 м.д. (С-6¹¹¹ глюкуроновой кислоты) и 175,18 м.д. (С-28). В случае, если бы была гликозилирована карбоксильная группа олеаноловой кислоты (С-28), сигнал аномерного протона глюкозы находился бы в области 6,0 м.д., а не при 4,39 м.д., как это имеет место. Сравнение полученных спектральных характеристик, а также литературных данных для известных календулозидов позволило сделать вывод о том, что выделенный сапонин является новым природным соединением, для которого можно предложить предварительную структуру 3-О-[(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкуронопиранозил]-β-D-глюкопиранозида олеаноловой кислоты (календулозид К). Предложенная химическая структура подтверждается данными масс-спектра: M^+ 979 [$956 + \text{Na}$]⁺ (рис. 10, 11).

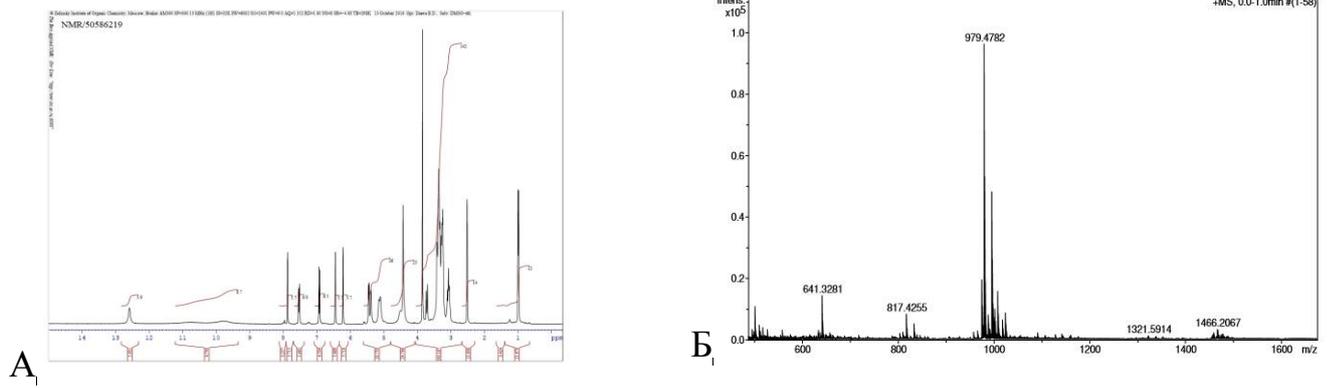


Рисунок 10 - $^1\text{H-NMR}$ - спектр (А) и масс-спектр (Б) календулозида К (5), выделенного из цветков календулы лекарственной

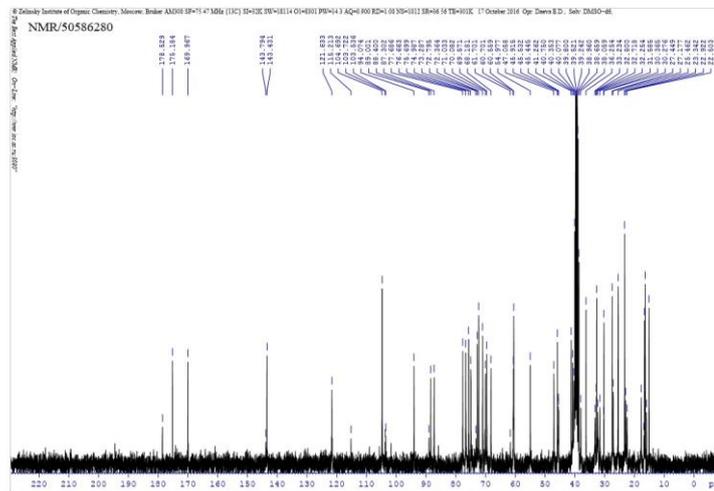


Рисунок 11 - $^{13}\text{C-NMR}$ спектр календулозида К (5), выделенного из цветков календулы лекарственной.

4.3. Фитохимическое исследование надземной и подземной частей календулы лекарственной

Превалирующая часть растения ноготков лекарственных (плоды, листья, стебли, корни – около 90% фитомассы) на сегодняшний день не используется в рамках медицинского применения в Российской Федерации [43,45,46,76]. Важно подчеркнуть, что календула широко культивируется в России. В Самарской области находится одна из самых крупных отечественных сырьевых баз ноготков лекарственных.

Спектрофотометрия [137]. Электронные спектры водно-спиртовых извлечений из цветков, плодов, корней, листьев и стеблей календулы лекарственной, культивируемой в Самарской области (рис.12) имеют характерный максимум при $\lambda_{\max}=256\pm 2$ нм (флавоноиды) и «плечо» в области 330-350 нм (флавоноиды и гидроксикоричные кислоты). Характерный максимум каротиноидов $\lambda_{\max}=450\pm 2$ нм (рис. 13). В данной области спектра каротиноиды (β -каротин) и флавоноиды (нарциссин) имеют прямопропорциональную зависимость оптической плотности от концентрации. Полученные данные позволяют применять метод УФ-спектрофотометрии для количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин.

Результаты определения количественного содержания каротиноидов и суммы флавоноидов отображены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 - Содержание суммы флавоноидов в надземной и подземной частях ноготков лекарственных

Часть растения	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин
Плоды	0,11%±0,05%
Листья и стебли	0,45%±0,06%
Цветки	4,37%±0,04%
Корни	-

Таблица 6 - Содержание каротиноидов в различных органах календулы лекарственной

Образец	Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин и абсолютно сухое сырье
Плоды	0,34 мг%±3,50%
Листья и стебли	2,92 мг%±3,97%
Цветки	63,10 мг%±3,56%
Корни	0,09 мг%±3,48%

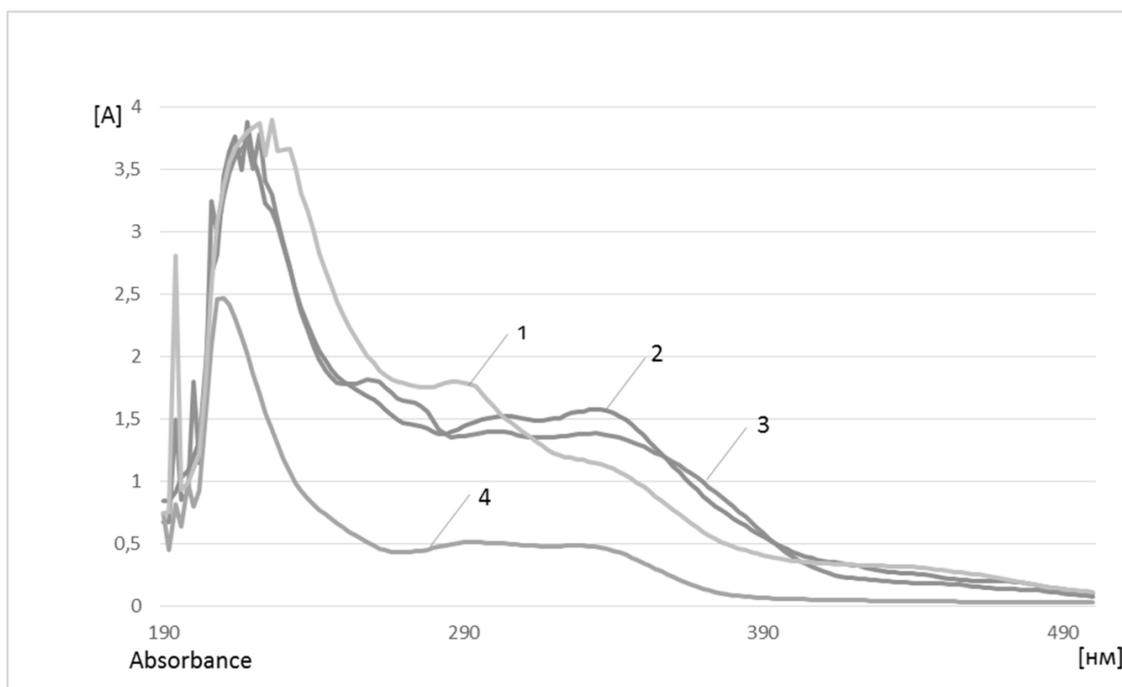


Рисунок 12 –Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из плодов, цветков, листьев и стеблей, корней календулы

Обозначения:

1 - плоды; 2 – листья и стебли; 3 - цветки; 4 - корни

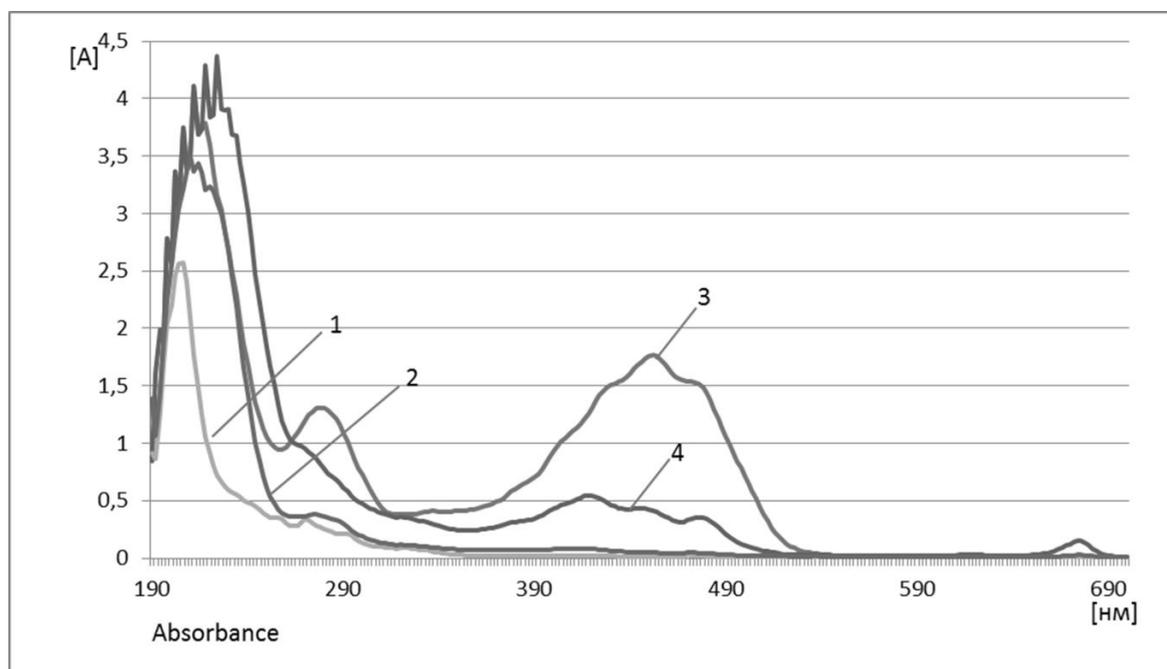


Рисунок 13 –Электронный спектр растворов гексанового извлечения цветков, плодов, листьев и стеблей, корней календулы

Обозначения:

1 - корни; 2 - плоды; 3 - цветки; 4 – листья и стебли

Определено, что самое наибольшее содержание каротиноидов ($63,10 \text{ мг}\% \pm 3,56\%$) и суммы флавоноидов ($4,37\% \pm 0,04\%$) характерно для цветков ноготков. Кроме того, незначительное содержание каротиноидов ($2,92 \text{ мг}\% \pm 3,97\%$) и флавоноидов ($0,45\% \pm 0,06\%$) характерно для листьев и стеблей ноготков.

4.4. Определение динамики накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной

Объектами исследования служили образцы листьев и стеблей календулы лекарственной сорт «Кальта», собранные в период с июня по сентябрь в Самарской области. Высушивание сырья осуществляли под навесами, естественным путем. Качественную оценку сырья осуществляли, опираясь на разработанные методики ТСХ и спектрофотометрического анализа.

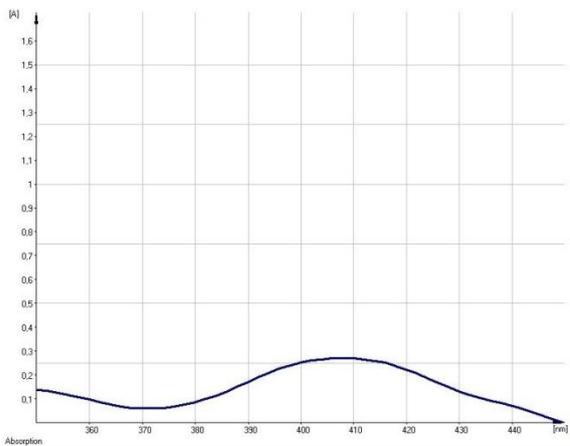
Извлечения сырья для ТСХ-анализа и спектрофотометрического определения получали в соответствии с ранее разработанной методикой [137]. Около 1 г (точная навеска) сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 1 мм, переносили в колбу с притертым шлифом на 50 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 70%. Закрывали колбу притертой пробкой и подвергали взвешиванию, используя аналитические весы, затем присоединяли к обратному холодильнику и проводили нагревание на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Проводили охлаждение раствора, доводили объем этанолом до первоначальной массы, осуществляли фильтрование через фильтр бумажный (красная полоса). Профильтрованное извлечение наносили на хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» с помощью стандартного капилляра объемом 6 мкл. Веществом-стандартом служил ГСО рутин.

Нанесенные на пластинку пробы опускали в камеру для хроматографирования со смесью растворителей хлороформ - этанол - вода (26:16:3), заранее проводили ее насыщение в течение 60 минут, и осуществляли хроматографирование восходящим способом.

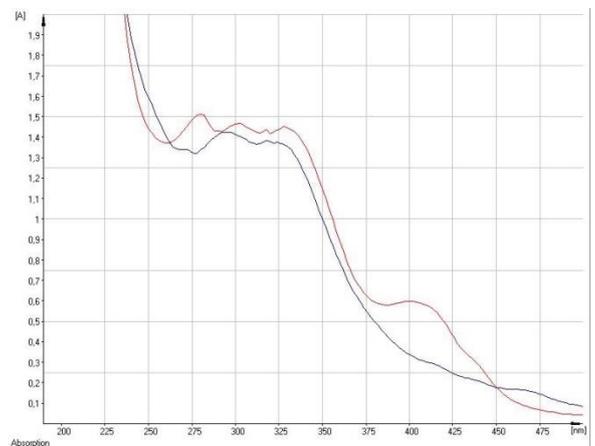
Детекцию хроматограммы осуществляли при дневном свете и в УФ-свете с длиной волны 254 и 366 нм. В целях осуществления проявки соединений флавоноидной природы проводили обработку хроматограммы свежеприготовленным раствором ДСК в насыщенном растворе натрия карбоната.

Образцы листьев и стеблей календулы в большей степени схожи своей флавоноидной гаммой, в независимости от периода сбора.

Спектральный анализ осуществляли методом дифференциальной спектроскопии на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena). Спектральные характеристики листьев и стеблей календулы лекарственной указывают на то, что характер кривой поглощения обусловлен преимущественно флавоноидами в независимости от периода вегетации (рис. 14). Наибольшее содержание флавоноидов было отмечено в образцах, собранных в середине июля и середине сентября (рис.14, рис.15).



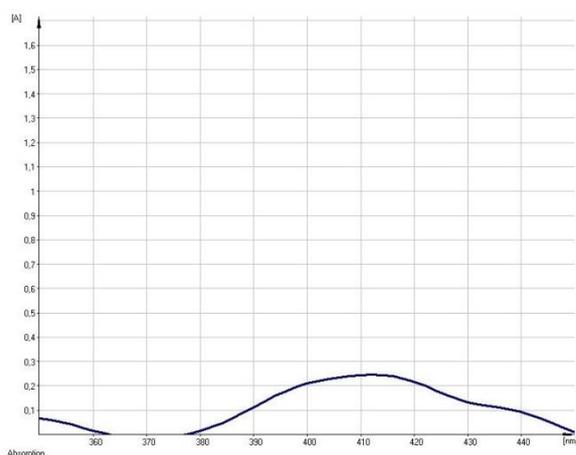
А



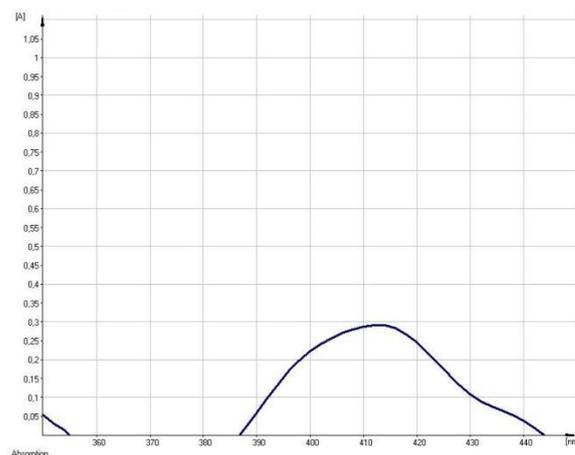
Б

Рисунок 14 – Электронные спектры водно-спиртовых извлечений из листьев и стеблей календулы лекарственной

А – образец, собранный в середине июля; Б – образец, собранный в середине июля с добавлением $AlCl_3$.



А



Б

Рисунок 15 – Электронные спектры водно-спиртовых извлечений листьев и стеблей календулы лекарственной, собранных в разные периоды вегетации.

А – образец, собранный в начале сентября; Б – образец, собранный в середине сентября.

Оценку содержания суммы флавоноидов в образцах осуществляли с применением метода дифференциальной спектрофотометрии. Определение содержания суммы флавоноидов проводили в пересчете на рутин в соответствии с разработанной ранее методикой. Данные, полученные в результате анализа динамики накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной указывают на тенденцию к накоплению флавоноидов в период с июня по сентябрь. В качестве оптимального времени сбора листьев и стеблей календулы лекарственной рекомендуется использовать середину июля и середину сентября.

4.5. Исследование сырья и препаратов календулы лекарственной методом ВЭЖХ

В последнее время для целей стандартизации активно внедряется метод ВЭЖХ, позволяющий проводить количественный и качественный анализы ЛРС одновременно [18,43,200]. С нашей точки зрения, в ВЭЖХ-анализе маркером

может служить нарциссин, который является доминирующим флавоноидом ноготков [137]. В результате ВЭЖХ-исследований было установлено, что нарциссин (время удерживания 37 мин) в большей степени отделен от остального компонентного состава цветков ноготков лекарственных (рис. 17 и 18), что позволяет данный метод рекомендовать и с целью идентификации цветков календулы, и с целью проведения стандартизации фитопрепаратов календулы.

Принимая во внимание схожие физико-химические и спектральные характеристики нарциссина (1) и рутина (2) (рис. 16), а также доступность и широкое применение рутина как стандартного образца в фармакопейном анализе ЛРС, считаем целесообразным использовать данный флавоноид в методике ВЭЖХ-анализа в качестве внешнего стандарта (рис. 19).

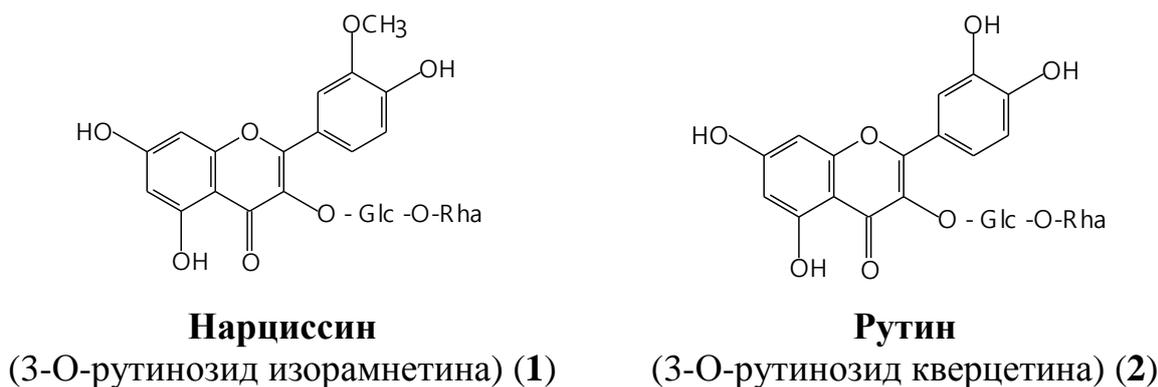


Рисунок 16 - Химические структуры важнейших флавоноидов цветков календулы лекарственной.

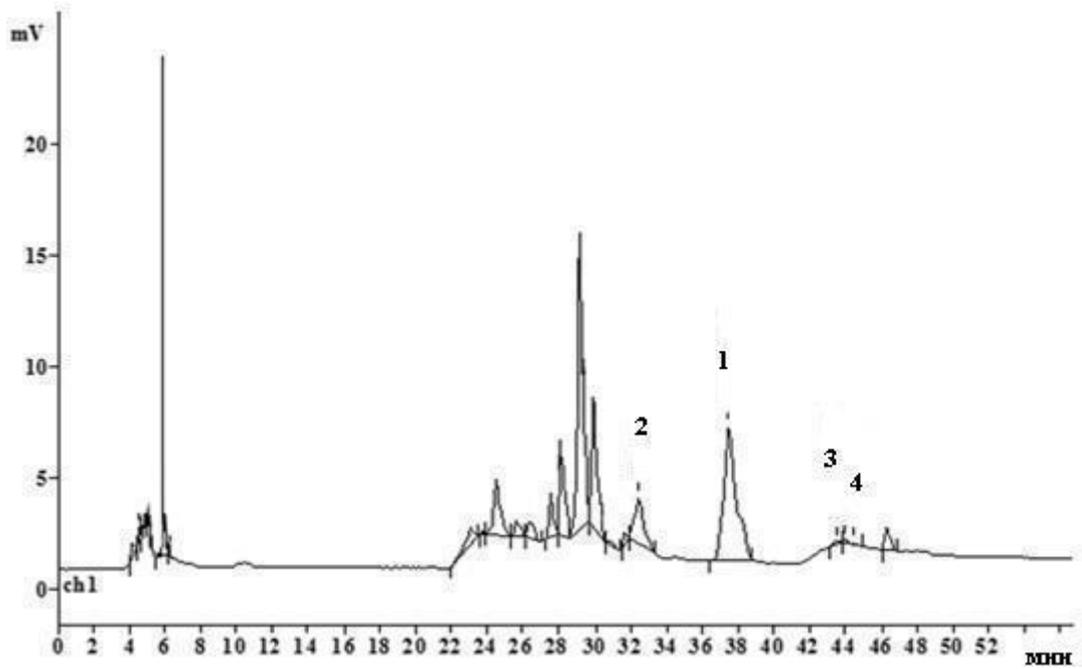


Рисунок 17 - ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового извлечения из цветков календулы лекарственной.

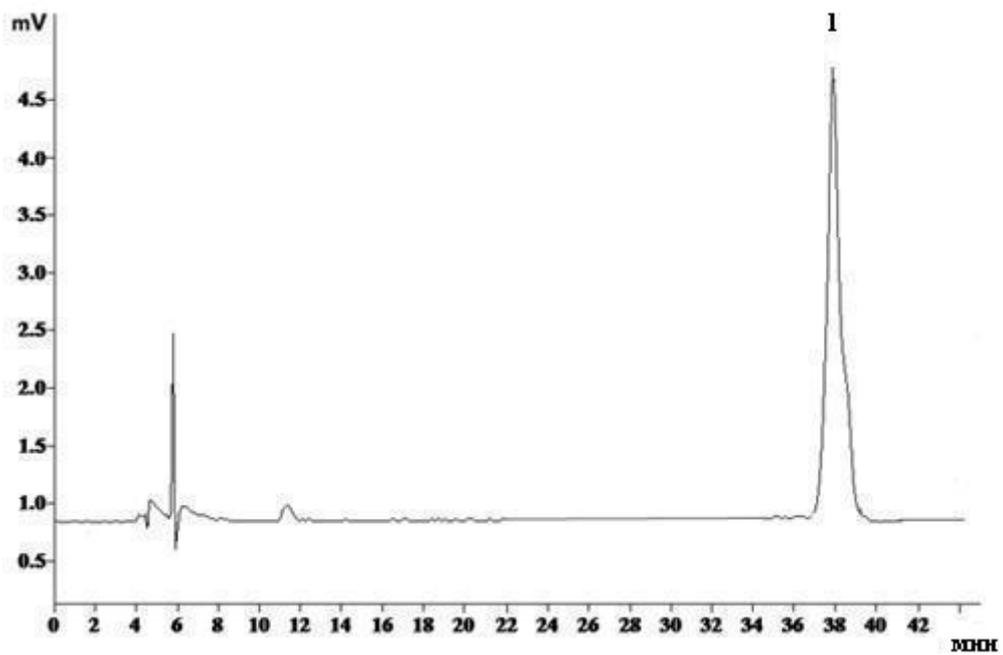


Рисунок 18 - ВЭЖХ-хроматограмма спиртового раствора нарциссина (1).

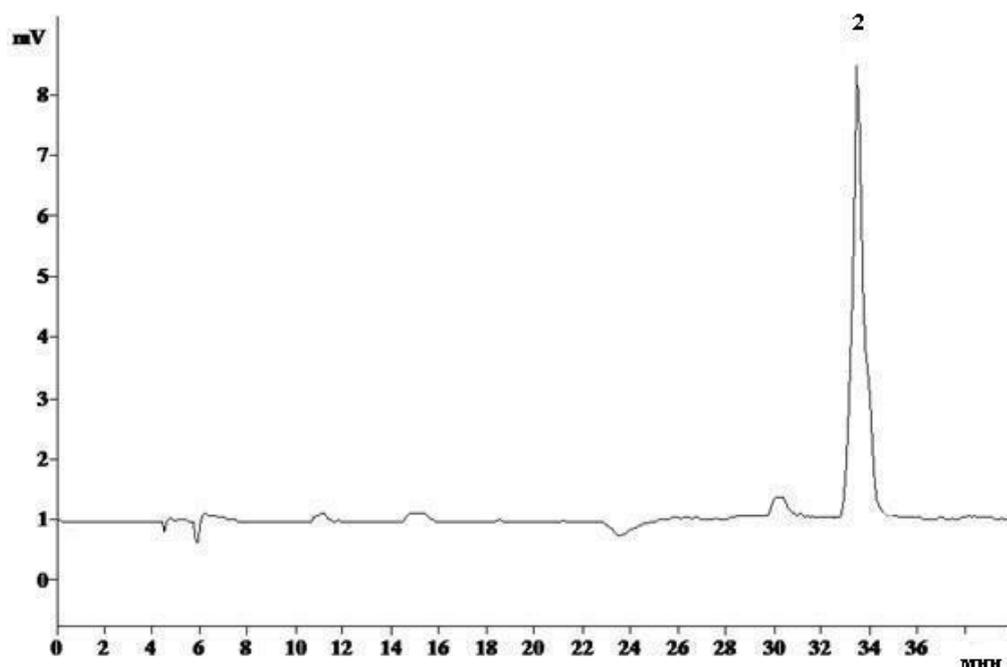


Рисунок 19 - ВЭЖХ-хроматограмма спиртового раствора ГСО рутина (2).

Установлено, что количественное содержание нарциссина (доминирующего компонента) в цветках ноготков лекарственных, определенное посредством метода ВЭЖХ, колеблется между $0,68 \pm 0,02\%$ и $0,97 \pm 0,03\%$. Время удерживания нарциссина составило $37,42 \pm 0,10$ мин (табл. 7).

Таблица 7 – Характеристика некоторых флавоноидов цветков календулы лекарственной

№ пика	Наименование флавоноида	Время удерживания	Содержание в цветках календулы, в %
1.	Нарциссин	$37,42 \pm 0,10$ мин	$0,68 \pm 0,03\%$.
2.	Рутин	$32,64 \pm 0,12$ мин	$0,28\% \pm 0,02\%$.
3.	Кверцетин	$43,87 \pm 0,10$ мин	$0,04\% \pm 0,002\%$.
4.	Изокверцитрин	$43,46 \pm 0,13$ мин	$0,06\% \pm 0,002\%$.

При хроматографировании пробы рабочего стандартного образца нарциссина методом ВЭЖХ время удерживания анализируемого вещества

составило $37,83 \pm 0,10$ мин (рис. 18), что подтверждает корректность разделения компонентов в водно-спиртовом извлечении цветков ноготков лекарственных (рис. 17). В предоставленных условиях в исследуемом извлечении подобно этому было отмечено присутствие рутина, содержание которого составляет $0,28\% \pm 0,01\%$ (табл. 7). Время удерживания рутина составило $32,64 \pm 0,12$ мин. Кроме того, в минорных количествах обнаруживается изокверцитрин ($0,06\% \pm 0,02\%$) и кверцетин ($0,04\% \pm 0,04\%$) (табл. 7).

4.6. Сравнительное газохроматографическое исследование различных органов календулы лекарственной и препаратов на основе цветков данного растения.

Метод газовой хроматографии является одним из наиболее перспективных экспрессных методов анализа, в том числе для определения подлинности сырья и фитопрепаратов [11,60,95,133] Как известно, каждое растение выделяет в газовую фазу характерные для него летучие компоненты, обеспечивающие специфический запах растения и препаратов на его основе. Данный метод позволяет разделить, идентифицировать летучие компоненты сложных смесей, в том числе растительного происхождения [95,133].

Нами совместно с учеными Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева (профессор Онучак Л.А., доцент Арутюнов Ю.И. и др.) был запатентован метод для оценки подлинности ЛРС (Патент РФ № 2452944 от 10.06.2012 г.).

При применении данной методики возможно провести идентификацию сложных смесей, используя хроматографические спектры как совокупность величин удерживания («finger prints – отпечатки пальцев»), не исследуя отдельные компоненты. ЛРС и фитопрепараты являются сложными смесями по своей природе, следовательно, газохроматографический метод сможет найти свое широкое применение в вопросах стандартизации растений [133].

Обсуждаемые методические подходы к анализу использованы нами для определения подлинности цветков, корней, листьев и стеблей календулы лекарственной и препаратов на основе вышеперечисленных образцов сырья.

Аналізу подвергали цветки, корни, листья и стебли календулы лекарственной сорт «Кальта», собранные на территории Самарской области в 2013 г.; препарат «Фильтр-пакеты календулы лекарственной», Московская обл., г. Красногорск ОАО «Красногорсклексредства», рег. Носер Р № ЛРС-000176/78; настойка алендулы лекарственной цветков 1:5 на 70% спирте, которая была разработана на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ.

Газохроматографический анализ (ГХ) осуществляли в соответствии с описанной методикой [133].

Оценку точности определения линейных индексов удерживания с использованием программирования температурного режима колонки с неполярной подвижной фазой осуществляли на примере исследования равновесной паровой фазы календулы лекарственной с выборкой $n = 5$ измерений. В табл. 8 отображены результаты оценки точности определений с повторяемостью измерения индексов удерживания при использовании программирования температурного режима хроматографической колонки с подвижной неполярной фазой [133].

Таблица 8 - Точность измерений линейных индексов удерживания календулы лекарственной, полученных на колонке с полидиметилсилоксановой неподвижной неполярной фазой VF-1

\bar{I}_i^T	I_i^T , в выборке	S_x	ε
460	463, 457, 462, 462, 455	3,57	± 5
499	501, 498, , 497, 501, 498	1,87	± 3
648	647, 648, 649, 647, 649	1,00	± 2
924	925, 924, 923, 924, 923	0,87	± 1

Прецизионность определяет качество хроматографической системы. Исходя из результатов, представленных в табл. 8, при начальных температурах линейного программирования ошибка составляет ± 5 единиц индекса. Ошибка измерения становится меньше при увеличении температурного режима. Подобным образом, с увеличением температурного режима прецизионность становится лучше, вероятно это связано с тем, что в начале программирования происходят большие возмущения процесса регулировки температурного режима колонки. С увеличением температурного режима возмущения становятся меньше.

В табл. 9 отображены результаты оценки прецизионности при условии повтора измерений индексов удерживания с использованием линейного программирования температурного режима хроматографической колонки с неподвижной полярной фазой.

Таблица 9 - Прецизионность измерения линейных индексов удерживания календулы лекарственной, которые были получены на колонке с неподвижной полярной фазой

\bar{I}_i^T	I_i^T , в выборке	S_x	ε
666	659, 673, 665, 661, 671	6,1	± 8
889	885, 893, 888, 893, 885	4,03	± 5
956	954, 959, 958, 955, 954	2,35	± 3
1049	1048, 1050, 1047, 1051, 1048	1,66	± 2

При использовании колонки с неподвижной полярной фазой ошибка измерения индексов удерживания аналогично становится лучше при увеличении температурного режима. В начале программирования температурного режима она составляет ± 8 единиц индекса, при увеличении температурного режима ошибка измерения становится ниже.

По методике, описанной ранее, был осуществлен газохроматографический анализ равновесной паровой фазы различных частей растения (цветков, корней, листьев и стеблей) календулы лекарственной и препаратов на ее основе (фильтр-пакеты и настойка).

Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков календулы отображена на рис. 20. При использовании программного обеспечения «Хроматэк Аналитик 2.5» на хроматограмме зарегистрировано 24 пика. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что на начальном участке хроматограммы присутствует наибольшее число летучих компонентов. Этот участок представлен в увеличенном виде в правом верхнем углу рисунка. Индексы удерживания отмечены над пиками.

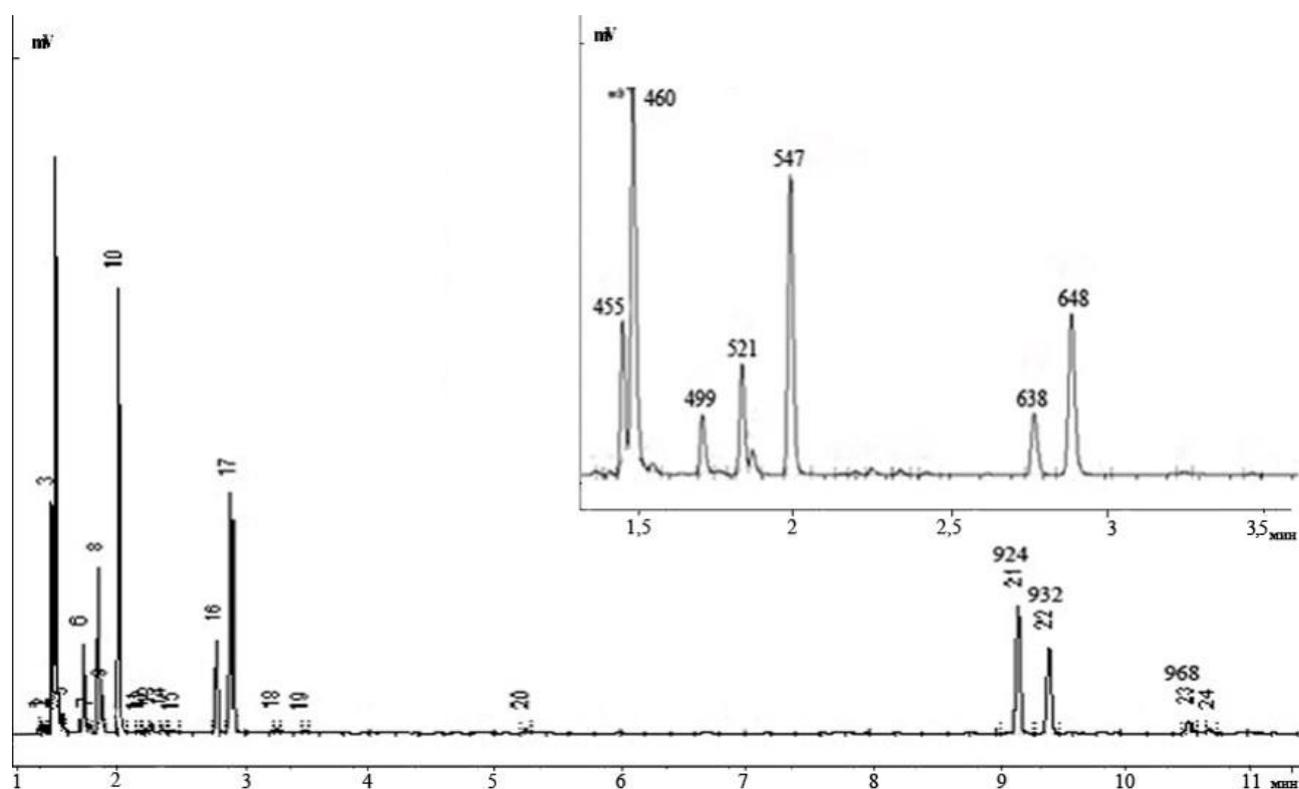


Рисунок 20 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой.

Число пиков, зарегистрированных на хроматограмме – 24 (рис.20). Относительное содержание основных летучих компонентов в паровой фазе $A_{i,отн} \geq 1\%$, среди них 10 компонентов с индексами удерживания 455, 460, 499, 521, 547, 638, 648, 924, 932, 968.

Было отмечено сходство и различие хроматограмм летучих компонентов цветков с хроматограммами летучих компонентов других частей растения.

На рис. 21 представлена хроматограмма летучих компонентов корней календулы лекарственной.

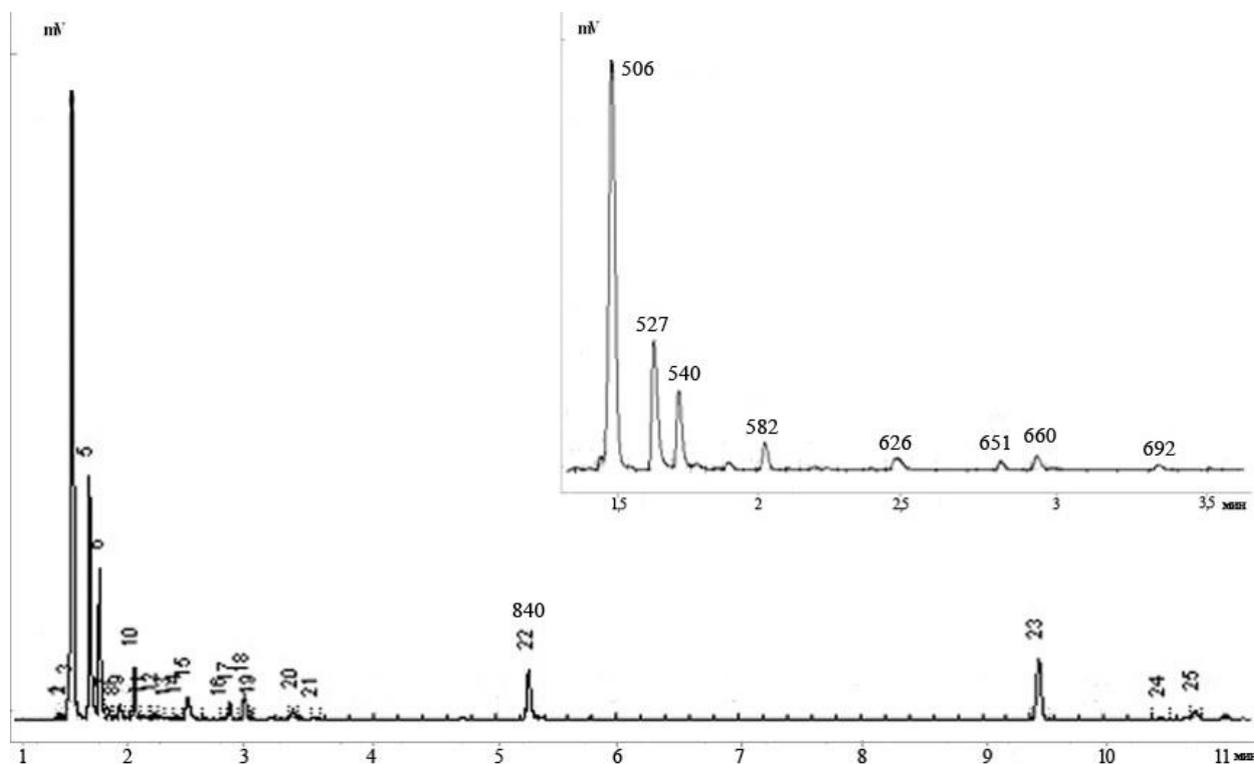


Рисунок 21 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы корней календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой.

На хроматограмме получено 25 компонентов (рис. 21). Основных летучих компонентов ($A_{i,отн} \geq 1\%$) десять, им соответствуют индексы удерживания 506, 527, 540, 582, 626, 651, 660, 692, 840, 932.

Общий вид хроматограммы отличается от хроматограммы летучих компонентов цветков. Однако можно проследить наличие схожих по времени выхода из хроматографической колонки компонентов. К примеру, четыре основных компонента с индексами удерживания 527, 540, 651, 932 в пределах погрешности измерения присутствуют как на хроматограмме летучих компонентов цветков, так и на хроматограмме летучих компонентов корней календулы.

На рис. 22 представлена хроматограмма летучих компонентов листьев и стеблей календулы лекарственной.

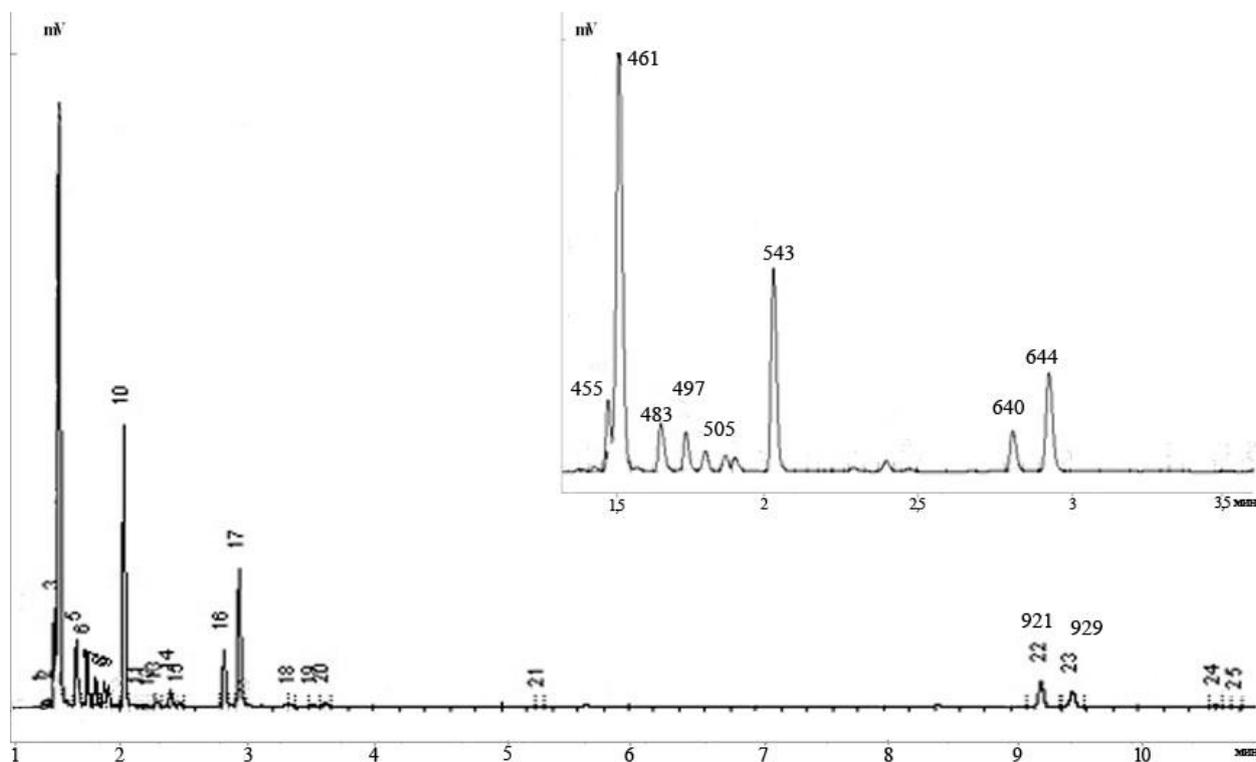


Рис. 22. Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы листьев и стеблей календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой.

Общее число пиков, полученных на хроматограмме – 25 (рис.22). Из сравнения рис. 16 и рис. 18 видно, что хроматограммы летучих компонентов цветков и летучих компонентов листьев и стелей очень похожи.

Одиннадцать основных компонентов ($A_{i,отн} \geq 1\%$), представленных на хроматограмме, имеют индексы удерживания: 455, 461, 483, 497, 505, 521, 543, 640, 644, 921, 929. Из них с основными летучими компонентами цветков в пределах погрешности совпадают девять компонентов с индексами удерживания 455, 461, 497, 521, 543, 640, 644, 921, 929.

Таким образом, летучие компоненты цветков, листьев и стеблей календулы имеют близкий состав.

На основе лекарственного сырья календулы современные фармацевтические предприятия производят большое число лекарственных препаратов, среди которых были исследованы фильтр-пакеты (Московская обл., г. Красногорск ОАО «Красногорсклексредства»), а также образец настойки календулы лекарственной, полученной в условиях лаборатории.

На рис. 23 отображена хроматограмма летучих компонентов фильтр-пакетов календулы лекарственной.

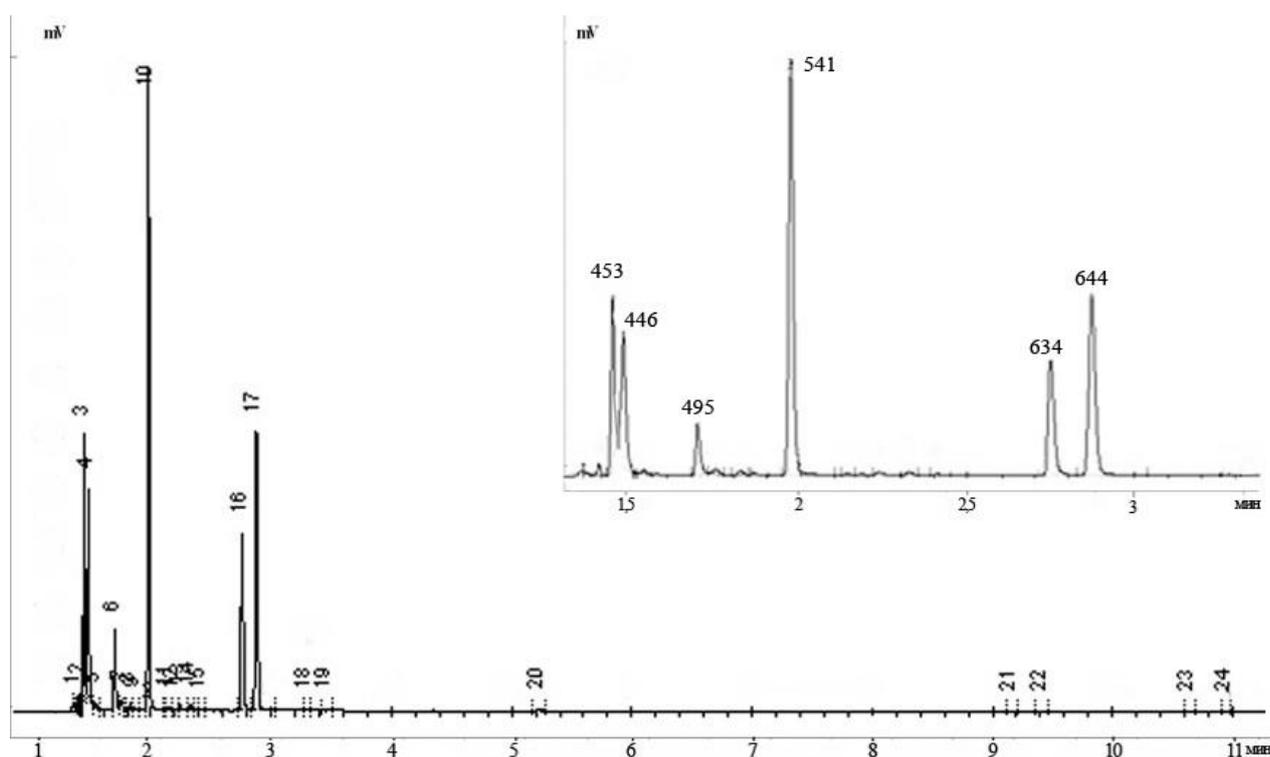


Рисунок 23 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы фильтр-пакетов календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой.

Общее число летучих компонентов фильтр-пакетов, полученных на хроматограмме, совпадает с числом компонентов на хроматограмме летучих компонентов цветков, и равно 24 (рис.23).

Семь компонентов с индексами удерживания 446, 453, 495, 541, 582, 634, 644 являются основными, зарегистрированными на хроматограмме ($A_{i,отн} \geq 1\%$).

Хроматограммы летучих компонентов цветков и фильтр-пакетов имеют близкий вид: пять основных летучих компонентов цветков совпадают с

основными летучими компонентами фильтр-пакетов в пределах погрешности, им соответствуют индексы удерживания 453, 495 541, 634, 644.

Малое сходство с хроматограммой летучих компонентов цветков имеет хроматограмма летучих компонентов настойки календулы (рис. 24), что, по-видимому, связано с утратой некоторых компонентов в процессе изготовления препарата.

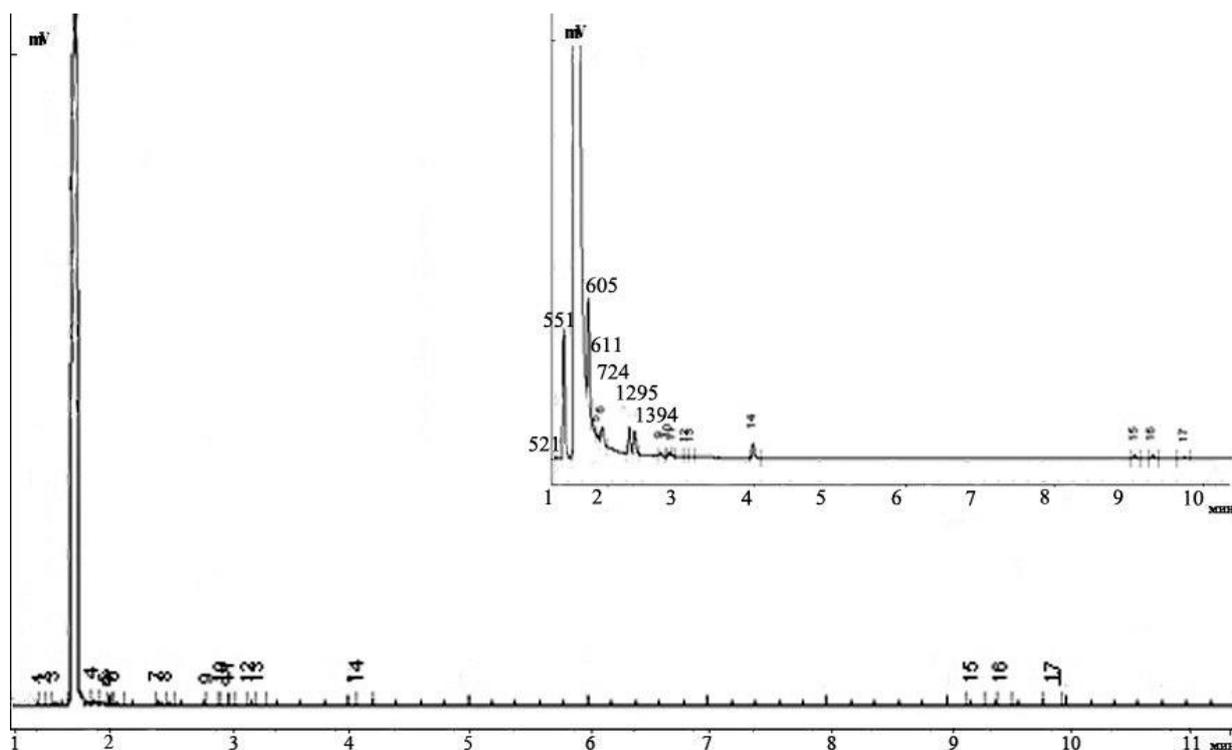


Рисунок 24 - Хроматограмма летучих компонентов экстракта календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой.

На хроматограмме настойки календулы лекарственной зарегистрировано 23 пика (рис.24).

Относительную площадь $A_{i,отн} \geq 1\%$ имеют восемь основных компонентов с индексами удерживания 521, 551, 605, 611, 724, 931, 1295, 1394, среди которых совпадают с летучими компонентами цветков в пределах погрешности только четыре компонента, имеющие индексы удерживания 521, 551, 605, 931.

В таблице 10 представлен газохроматографический спектр индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн.}\%$ цветков календулы и ее препаратов с различным содержанием летучих компонентов.

Таблица 10 - Газохроматографический спектр индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн.}\%$ летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной, полученные на колонке с неполярной неподвижной фазой

I_i^T	Относительное содержание $A_{i,отн.}\%$				
	Цветки	Листья и стебли	Корни	Фильтр-пакеты	Настойка
442±5	0,313	0,077	-	0,072	-
448±5	0,210	0,462	-	0,719	0,182
455±5	5,950	4,297	-	10,612	0,167
460±5	24,743	36,357	-	12,148	-
472±5	0,418	-	-	0,302	-
483±5	-	4,269	-	-	-
489±5	-	-	0,030	-	-
493±5	-	-	0,366	-	-
499±3	3,615	3,530	0,579	4,343	-
505±3	0,184	2,214	32,128	0,566	-
516±3	-	-	-	0,416	-
521±3	6,267	1,41	22,573	0,187	39,000
526±3	0,817	-	-	-	-
547±3	17,680	24,105	8,322	34,833	6,290
550±3	-	-	0,813	-	0,80
560±3	-	-	0,718	-	-
568±3	-	0,056	0,559	0,141	-
575±3	0,099	0,016	-	0,107	-
582±3	0,207	0,428	3,374	0,44	-
591±3	0,448	-	0,392	-	-

Таблица 10 (продолжение)

605±3	0,278	0,181	0,366	0,322	10,183
610±3	0,163	0,375	0,183	0,135	8,95
613±3	-	-	0,151	-	-
638±3	4,482	5,134	-	13,277	0,900
648±2	11,893	12,121	1,27	20,382	1,428
653±2	-	-	-	-	0,418
667±2	-	-	-	-	0,376
677±2	0,215	0,083	0,14	0,126	0,323
695±2	0,185	0,157	1,023	0,159	-
705±2	-	0,316	0,285	-	-
724±2	-	-	-	-	5,49
783±1	0,300	0,041	-	0,353	-
924±1	11,845	3,774	-	-	0,8
932±1	8,175	2,383	7,103	-	1,37
944±1	-	-	-	-	0,38
965±1	-	0,145	-	-	-
968±1	1,050	0,043	0,731	0,07	-
973±1	0,463	-	-	0,053	-
994±1	-	-	6,041	-	0,163
1194±1	-	-	-	-	0,600
1295±1	-	-	-	-	5,000
1394±1	-	-	-	-	16,190

Двадцать восемь из всех, содержащихся в различных частях растения и препаратах летучих компонентов имеют два или более совпадений индексов удерживания в пределах погрешности (табл. 10). Эти компоненты отмечены в таблице полужирным шрифтом и являются характеристическими компонентами. Из двадцати семи выбранных, шесть компонентов имеют пять совпадений, восемь компонентов имеют четыре совпадения, восемь компонентов имеют три совпадения, пять компонентов имеют два совпадения индексов удерживания в пределах погрешности.

Из всего газохроматографического спектра индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн},\%$ летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной нами выбран фрагмент с относительным содержанием компонентов $A_{i,отн} \geq 1\%$, представленный в табл. 11.

Таблица 11 - Фрагмент газохроматографического спектра индексов удерживания I_i^T основных летучих компонентов растительного сырья и препаратов на основе календулы лекарственной с относительным содержанием в равновесной паровой фазе $A_{i,отн},\% \geq 1\%$

I_i^T	Относительное содержание $A_{i,отн},\%$				
	Цветки	Листья и стебли	Корни	Фильтр-пакеты	Настойка
455±5	5,950	4,297	-	10,612	
460±5	24,743	36,357	-	12,148	-
483±5	-	4,269	-	-	-
499±3	3,615	3,530		4,343	-
505±3	-	2,214	32,128	-	-
521±3	6,267	1,41	22,573	-	39,000
547±3	17,680	24,105	8,322	34,833	6,290
582±3			3,374		-
605±3					10,183
610±3					8,95
638±3	4,482	5,134	-	13,277	
648±2	11,893	12,121	1,27	20,382	1,428
695±2			1,023		-
724±2	-	-	-	-	5,49
924±1	11,845	3,774	-	-	
932±1	8,175	2,383	7,103	-	1,37
968±1	1,050	-			-
994±1	-	-	6,041	-	

1295±1	-	-	-	-	5,000
1394±1	-	-	-	-	16,190

Летучие компоненты равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепараты календулы с относительным содержанием $A_{i,отн} \geq 1\%$ (табл.11) названы нами основными. Равновесные паровые фазы исследуемых образцов растительного сырья и препаратов на основе календулы содержат от шести (РПФ фильтр-пакетов) до одиннадцати (РПФ листьев и стеблей) основных летучих компонентов. Основные компоненты различных исследуемых образцов имеют много совпадений индексов удерживания I_i^T в пределах погрешности. Из двадцати выбранных компонентов два компонента имеют пять совпадений, два компонента имеют четыре совпадения, четыре компонента имеют три совпадения, два компонента имеют два совпадения. Оставшиеся десять компонентов не имеют совпадений основных индексов удерживания с другими исследуемыми образцами в пределах погрешности.

По результатам оценки газохроматографических характеристик относительных площадей $A_{i,отн, \%}$ и индексов удерживания I_i^T основных летучих компонентов была построена диаграмма-образ равновесной паровой фазы цветков (рис. 25).

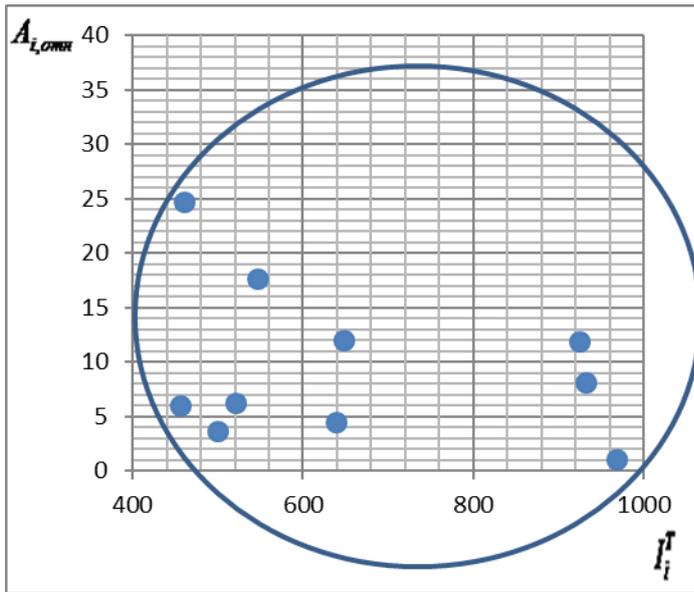


Рисунок 25 - Диаграмма-образ летучих компонентов цветков календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой

Диаграмма показывает зависимость индексов удерживания I_i^T от относительной площади пиков $A_{i,отн.}\%$. Равновесная паровая фаза цветков календулы содержит десять основных летучих компонентов, представленных на рис. 25.

Было отмечено сходство и различие диаграмм-образов летучих компонентов равновесной паровой фазы для всех исследуемых образцов.

На рис. 26 представлена диаграмма-образ летучих компонентов листьев и стеблей календулы лекарственной.

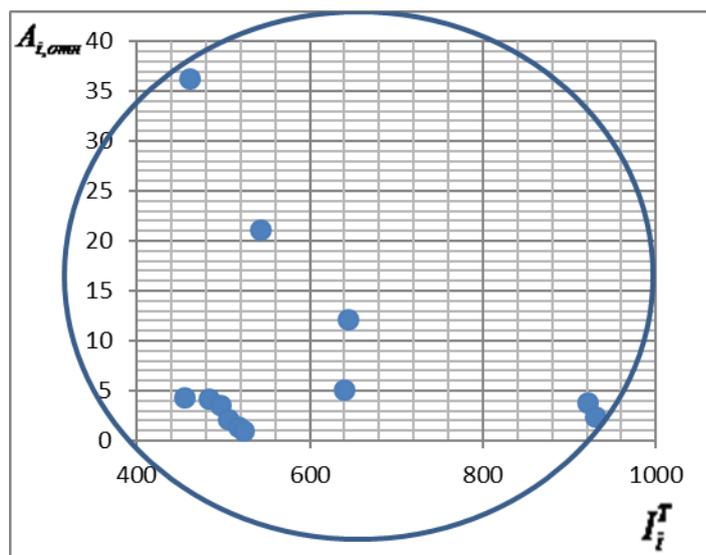


Рисунок 26 - Диаграмма-образ летучих компонентов листьев и стеблей календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено одиннадцать основных летучих компонентов равновесной паровой фазы листьев и стеблей календулы. Диаграмма-образ летучих компонентов листьев и стеблей имеет ряд существенных сходств с диаграммой-образом летучих компонентов цветков. Во-первых, компоненты на диаграммах распределены на два участка: первый участок находится в пределах от 400 до 650 единиц индекса удерживания, здесь сконцентрировано большее число компонентов; второй участок – от 850 до 1000, здесь присутствует два основных компонента. Во-вторых, обращает на себя внимание наличие двух основных компонентов с наибольшим содержанием и одинаковыми индексами удерживания 460 ± 5 и 547 ± 3 .

В целом диаграммы-образы летучих компонентов цветков, листьев и стеблей имеют девять основных компонентов с одинаковыми индексами удерживания в пределах погрешности: 455 ± 5 , 460 ± 5 , 499 ± 3 , 521 ± 3 , 547 ± 3 , 638 ± 3 , 648 ± 2 , 924 ± 1 , 932 ± 1 . Отличие двух диаграмм составляют летучие компоненты с индексами удерживания 483 ± 5 и 505 ± 3 , которые присутствуют на диаграмме летучих компонентов листьев и стеблей и компонент с индексом удерживания 968 ± 1 , присутствующий на диаграмме летучих компонентов цветков.

Следовательно, диаграммы образы летучих компонентов цветков, листьев и стеблей имеют схожий вид.

На рис. 27 представлена диаграмма-образ летучих компонентов корней календулы лекарственной.

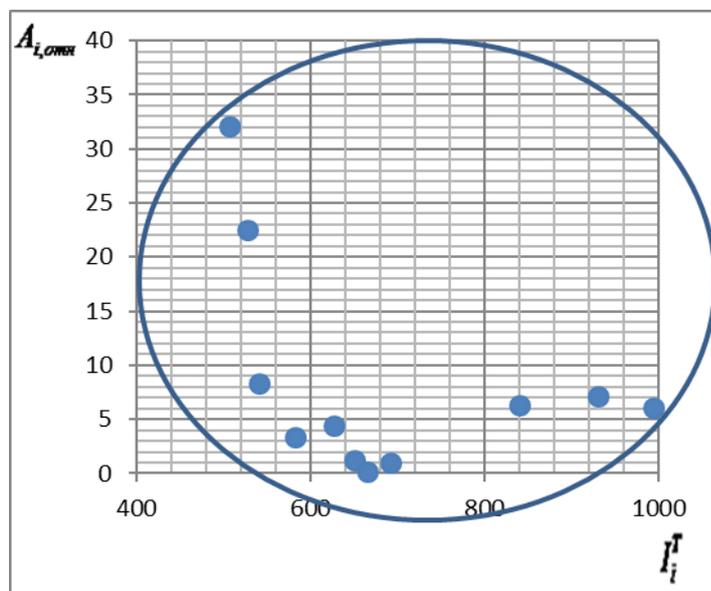


Рисунок 27 - Диаграмма-образ летучих компонентов корней календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено одиннадцать основных летучих компонентов равновесной паровой фазы корней календулы. Также на диаграмме можно выделить два участка, по которым распределены основные компоненты: первый участок смещен по отношению к участку на диаграмме летучих компонентов цветков календулы и находится в пределах от 450 до 700 единиц индекса удерживания, второй участок так же содержит малое число летучих компонентов и лежит в пределах от 800 до 1000 единиц индекса удерживания. На диаграмме летучих компонентов корней аналогичным диаграмме летучих компонентов цветков образом распределены компоненты с наибольшим содержанием, однако им соответствуют индексы удерживания, отличные от индексов удерживания наибольших летучих компонентов цветков: 505 ± 3 , 521 ± 3 .

В целом диаграммы-образы основных летучих компонентов цветков и корней имеют четыре компонента с одинаковыми индексами удерживания в пределах погрешности: 521 ± 3 , 547 ± 3 , 648 ± 2 , 932 ± 1 . Отличие двух диаграмм составляют основные летучие компоненты с индексами удерживания 505 ± 3 , 582 ± 3 , 695 ± 2 , 994 ± 1 , присутствующие на диаграмме летучих компонентов корней и компоненты с индексами удерживания 455 ± 5 , 460 ± 5 , 499 ± 3 , 638 ± 3 , 968 ± 1 , 924 ± 1 , которые присутствуют на диаграмме летучих компонентов цветков.

Следовательно, диаграмма-образ летучих компонентов корней значительно отличается от диаграммы-образа цветков значительно.

На рис. 28 отображена диаграмма-образ летучих компонентов фильтр-пакетов календулы лекарственной.

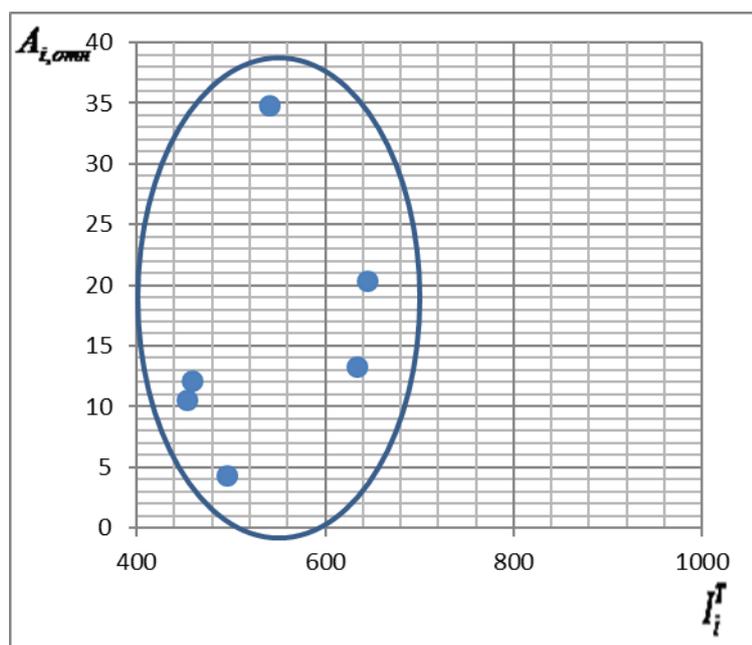


Рисунок 28 - Диаграмма-образ летучих компонентов фильтр-пакетов календулы лекарственной, полученных на колонке с неполярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено шесть основных летучих компонентов равновесной паровой фазы фильтр-пакетов календулы. Все основные компоненты фильтр-пакетов расположены в пределах от 400 до 650 единиц индекса удерживания, что соответствует первому участку на диаграмме основных летучих компонентов цветков календулы. Второй участок, располагающийся в пределах

от 850 до 1000 единиц индекса на диаграмме основных компонентов цветков, полностью отсутствует на диаграмме основных летучих компонентов фильтр-пакетов. Компонент с наибольшим содержанием имеет индекс удерживания 460 ± 5 , и совпадает с наибольшим компонентом на диаграмме летучих компонентов цветков.

В целом индексы удерживания основных летучих компонентов, представленных на диаграмме фильтр-пакетов, полностью совпадают с индексами удерживания основных летучих компонентов, представленных на диаграмме цветков.

Следовательно, диаграммы образы летучих компонентов фильтр-пакетов и схожи между собой. Факт отсутствия отдельных компонентов связан, вероятно, с издержками производства препарата.

На рис. 29 отображена диаграмма-образ летучих компонентов настойки календулы лекарственной.

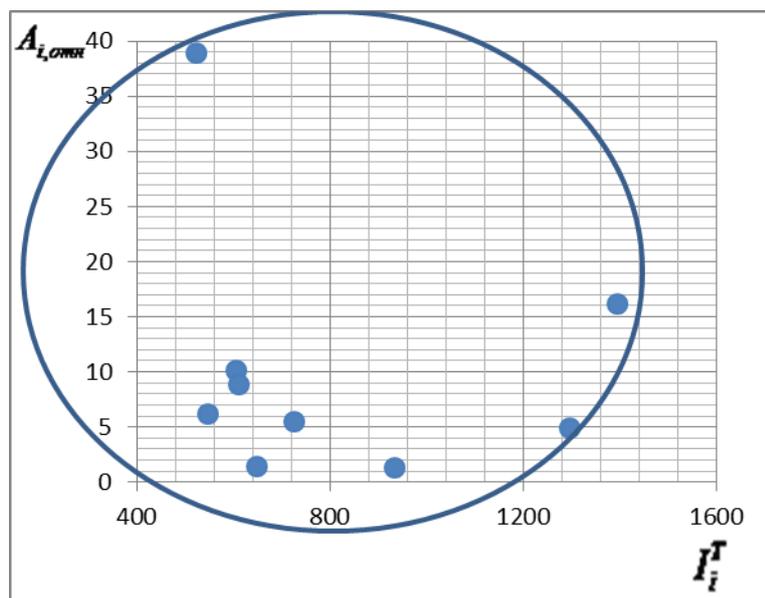


Рисунок 29 - Диаграмма-образ летучих компонентов настойки календулы лекарственной, полученная на колонке с неполярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено девять основных летучих компонентов равновесной паровой фазы настойки календулы. Компоненты, отмеченные на диаграмме, не имеют четкого разделения на два участка, как на диаграмме

летучих компонентов цветков. Однако и диаграмма основных летучих компонентов настойки имеет некоторые сходства с диаграммой основных летучих компонентов цветков: во-первых, компоненты с наибольшим содержанием имеют существенно большее количество по сравнению с другими компонентами и находятся в одном и том же интервале индексов удерживания (521 на диаграмме летучих компонентов настойки и 460 на диаграмме летучих компонентов цветков); во-вторых, на диаграмме летучих компонентов настойки присутствует целая группа летучих компонентов, имеющих индексы удерживания 547 ± 3 , 605 ± 3 , 610 ± 3 , 648 ± 2 и находящихся в том же интервале индексов удерживания, что и аналогичная группа летучих компонентов цветков. Компонент с индексом удерживания 932 ± 1 так же присутствует как на диаграмме летучих компонентов настойки, так и на диаграмме летучих компонентов цветков.

Отличие от диаграммы летучих компонентов настойки составляет отсутствие основных летучих компонентов в интервале индексов удерживания от 455 ± 5 до 521 ± 3 и наличие их в интервале от 968 ± 1 до 1394 ± 1 . Таким образом, диаграмма основных летучих компонентов настойки как бы смещена в сторону больших индексов удерживания по сравнению с диаграммой основных летучих компонентов цветков.

В целом диаграммы-образы основных летучих компонентов настойки и цветков имеют четыре компонента с одинаковыми индексами удерживания в пределах погрешности: 521 ± 3 , 547 ± 3 , 648 ± 2 , 932 ± 1 . Пять основных летучих компонентов с индексами удерживания 605 ± 3 , 610 ± 3 , 724 ± 2 , 1295 ± 1 , 1394 ± 1 , которые присутствуют на диаграмме летучих компонентов настойки, не найдены у цветков.

Следовательно, диаграммы основных летучих компонентов цветков имеют разительные отличия от диаграммы настойки.

У изученных объектов нами было отобрано три характеристических компонента, содержащихся в равновесной паровой фазе в максимальном количестве. Результаты отображены в табл. 12.

Таблица 12 - Хроматографические характеристики (I_i^T и $A_{I,отн.,\%}$) некоторых компонентов спектра, которые включают три характеристических компонента *

I_i^T	Относительное содержание $A_{I,отн.,\%}$				
	Цветки	Листья и стебли	Корни	Фильтр-пакеты	Настойка
460±5	24,664	36,357	-	12,148	-
505±3	0,184	2,214	32,128	0,566	-
521±3	6,267	1,41	22,573	0,187	39,000
547±3	17,68	21,111	8,322	34,833	6,29
605±3	0,278	0,181	0,366	0,322	10,183
648±2	11,893	12,121	1,27	20,382	0,418
1394±1	-	-	-	-	16,190

Примечание. *- маркеры в таблице выделены жирным шрифтом

По наличию маркеров можно определить подлинность сырья календулы и фитопрепаратов на ее основе. Компоненты исследованных объектов, индексы удерживания которых совпадают с маркерами данного объекта, так же указаны в таблице.

Кроме того, некоторые из выбранных маркеров совпадают для разных объектов. Так, например, маркер с индексом удерживания $I_i^T = 460 \pm 5$ присутствует в летучих компонентах цветков, фильтр-пакетов, листьев и стеблей. Маркеры корней и настойки с индексом удерживания 521 ± 3 также являются совпадающими. Особый интерес представляют компоненты с индексом удерживания 547 ± 3 , так как здесь прослеживается целых четыре совпадения маркеров среди исследованных объектов, это маркеры цветков, листьев и стеблей, корней и фильтр-пакетов.

Хроматографический спектр компонентов, который был получен на колонке с неподвижной полярной фазой, содержит индексы удерживания от 602 до 1499. Начальный участок хроматограммы, как и в опытах с использованием колонки с неполярной неподвижной фазой INNOWAX, содержит большое число летучих компонентов.

На рис. 30 отображена хроматограмма летучих компонентов цветков календулы лекарственной. В правом верхнем углу представлен увеличенный начальный участок хроматограммы с индексами удерживания над каждым пиком.

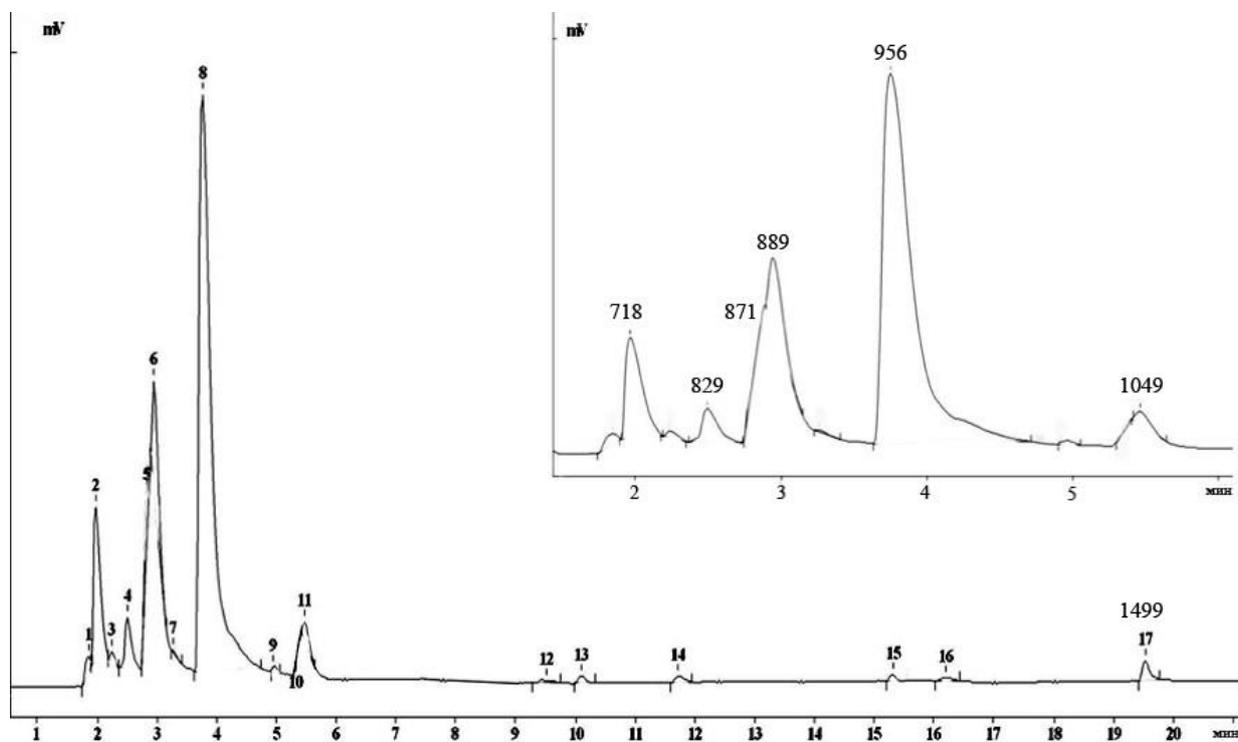


Рисунок 30 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков календулы лекарственной, полученная на колонке с неподвижной полярной фазой.

С использованием программного обеспечения «МультиХром» на хроматограмме зарегистрировано 17 пиков (рис. 30).

Основными летучими компонентами с относительной площадью $A_{i,отн} \geq 1\%$ являются шесть компонентов с индексами удерживания 718, 829, 871, 889, 956, 1049.

Как и в случае использования хроматографической колонки с неполярной неподвижной фазой INNOWAX, опыты по исследованию частей растения календулы, не являющихся сырьем для изготовления лекарственных препаратов, а так же самих лекарственных препаратов были проведены и на колонке с неподвижной полярной фазой ПЭГ-20М.

На рис. 31 отображена хроматограмма летучих компонентов корней календулы.

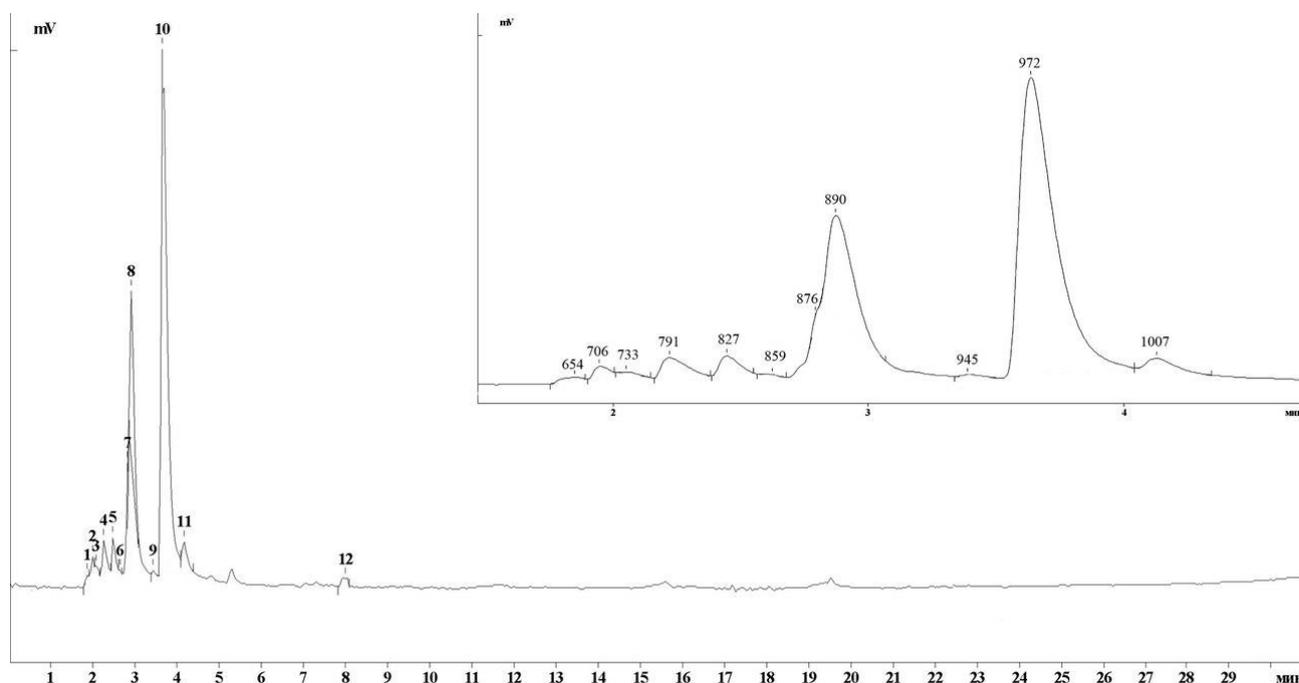


Рисунок 31 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы корней календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой.

На хроматограмме зарегистрировано 11 пиков (рис.31). Шесть компонентов с индексами удерживания 791, 827, 890, 945, 972, 1007 ($A_{i,отн} \geq 1\%$) являются основными, из них три компонента с индексами удерживания 827, 890, 945 совпадают с компонентами цветков в пределах погрешности.

Таким образом, летучие компоненты корней и летучие компоненты цветков имеют неодинаковый состав.

На рис. 32 отображена хроматограмма летучих компонентов листьев и стеблей календулы лекарственной.

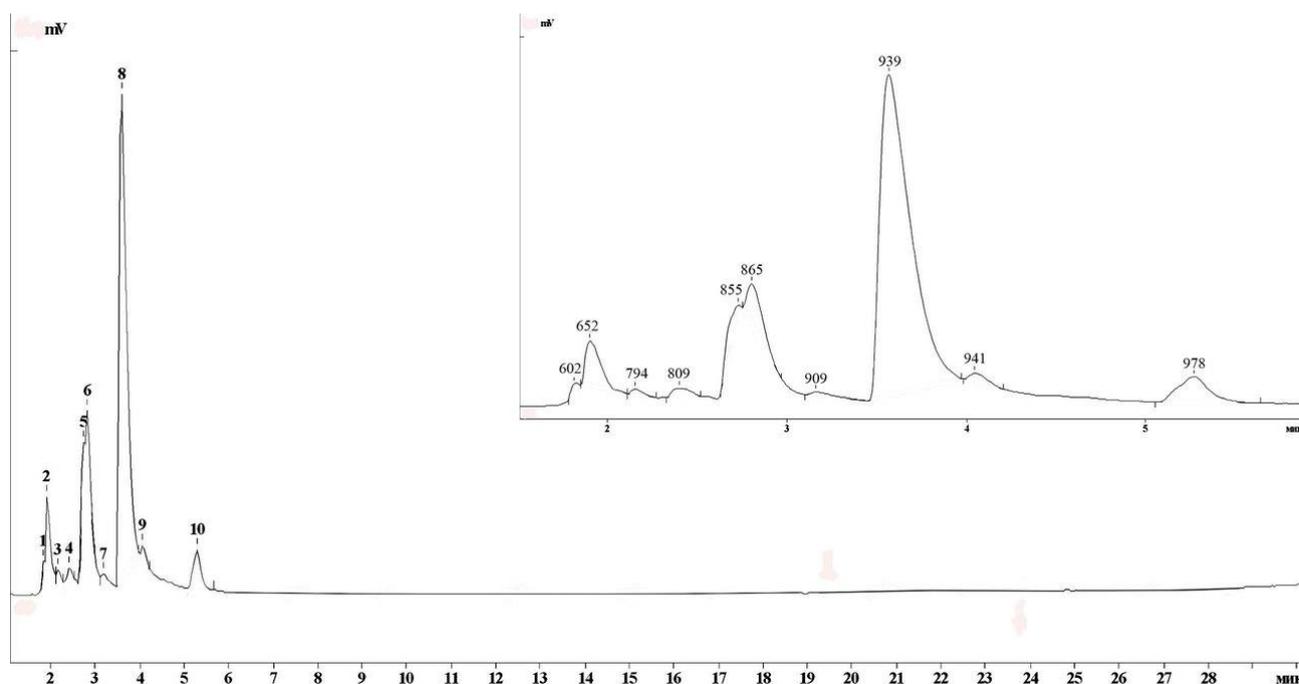


Рисунок 32 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы листьев и стеблей календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой.

На хроматограмме листьев зарегистрировано 10 летучих компонентов (рис.28). Основными летучими компонентами, имеющими относительную площадь $A_{i,отн} \geq 1\%$ являются шесть компонентов с индексами удерживания 652, 855, 865, 939, 948, 971, только два из них имеют совпадения с основными летучими компонентами цветков, индексы удерживания 939 и 971 соответствуют им.

На рис. 33 отображена хроматограмма летучих компонентов фильтр-пакетов календулы.

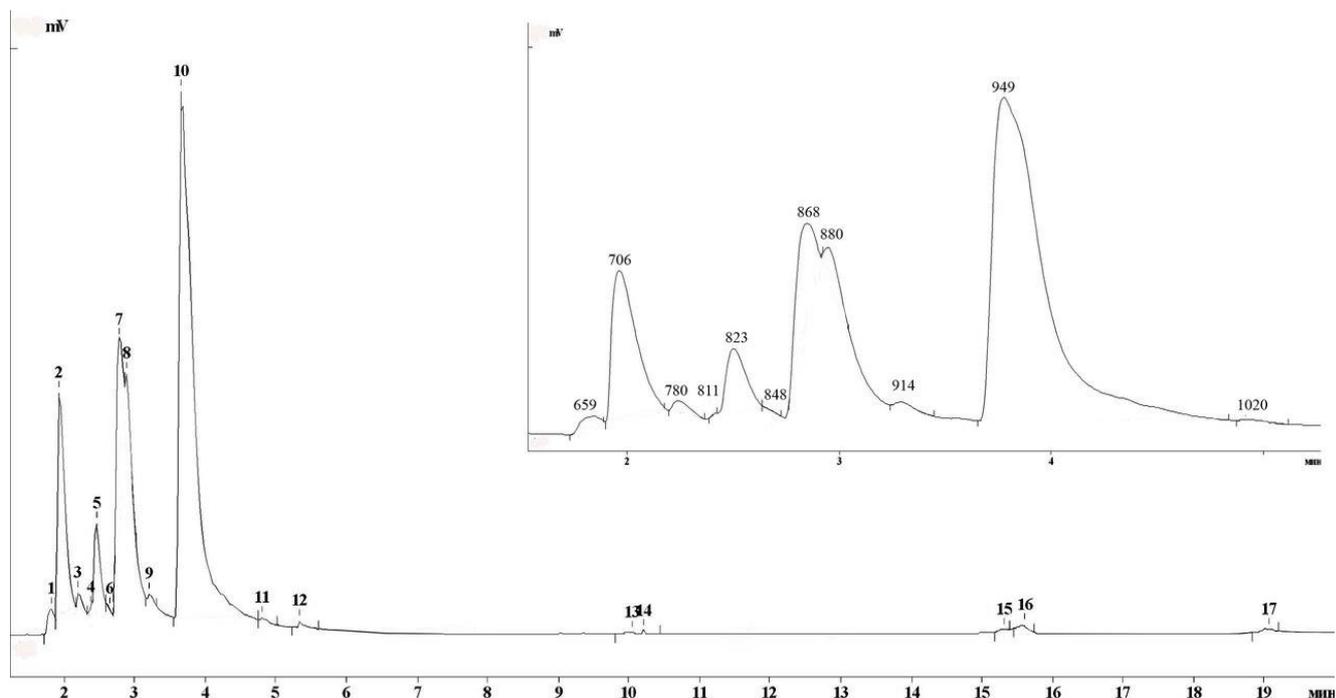


Рисунок 33 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы фильтр-пакетов календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой.

На хроматограмме летучих компонентов фильтр-пакетов календулы зарегистрировано семнадцать пиков (рис.34), что совпадает с числом пиков на хроматограмме летучих компонентов цветков. Основных компонентов ($A_{i,отн} \geq 1\%$) на хроматограмме пять, индексы удерживания: 706, 823, 868, 880, 949 соответствуют им. Из них с основными летучими компонентами цветков в пределах погрешности совпадают пять компонентов с индексами удерживания 706, 823, 868, 880, 949.

Таким образом, летучие компоненты цветков и фильтр-пакетов близки по составу.

На рис. 34 представлена хроматограмма летучих компонентов настойки календулы.

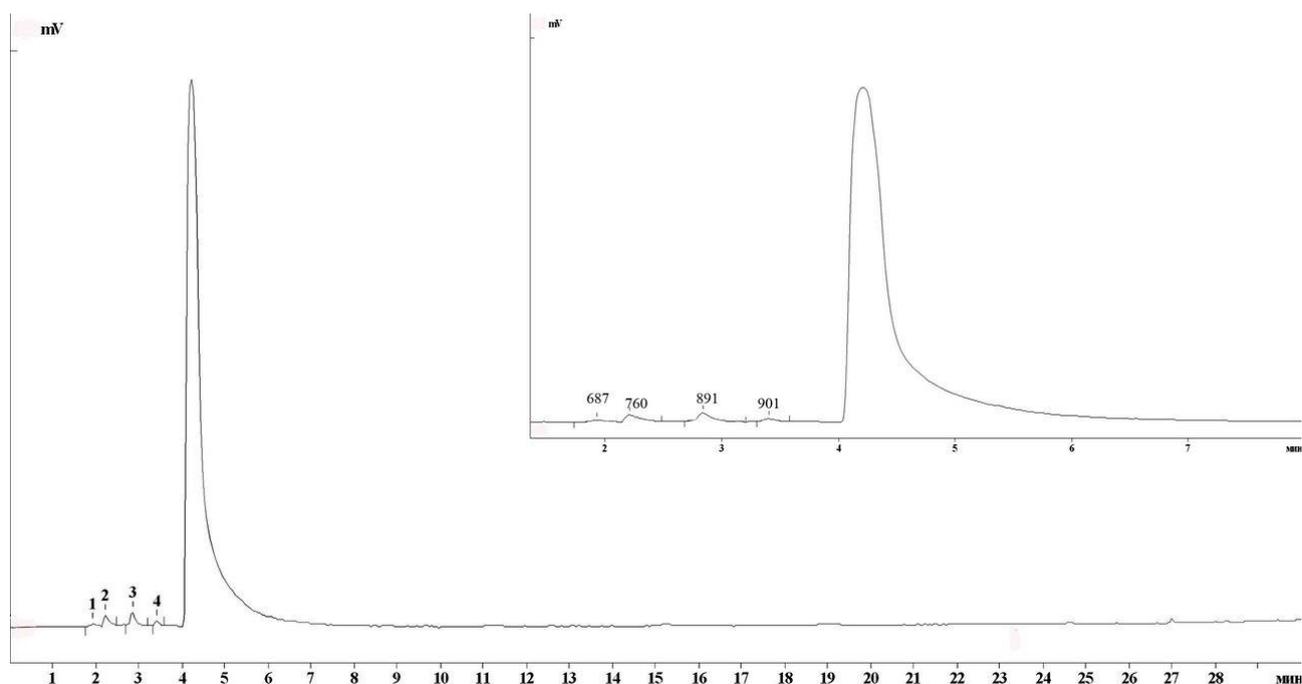


Рисунок 34 - Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы настойки календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой.

Общее число летучих компонентов экстракта календулы, полученных на хроматограмме – 4 (рис.34).

Как и в случае анализа на колонке с неполярной неподвижной фазой, зарегистрировано только три сходных с цветками характеристических компонента: 760, 891, 901, что связано с потерей некоторых компонентов в процессе изготовления препарата. Из них только один основной летучий компонент ($A_{i,отн} \geq 1\%$), с индексом удерживания 891, совпадает с основными компонентами цветков в пределах погрешности. Следовательно, данный летучий компонент может рассматриваться как диагностический для сырья и препаратов календулы лекарственной.

В табл. 13 приведен хроматографический спектр индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн.,\%}$ для летучих компонентов цветков календулы и ее препаратов, включающий все зарегистрированные компоненты.

Таблица 13 - Газохроматографический спектр индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн},\%$ летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной, полученные на колонке с полярной неподвижной фазой

I_i^T	Относительное содержание $A_{i,отн},\%$				
	Цветки	Листья и стебли	Корни	Фильтр-пакеты	Настойка
602±8	-	0,510	-	-	-
654±8	0,857	4,512	0,500	0,900	-
706±8	11,144	-	0,725	14,190	-
733±8	-	-	0,190	-	-
760±8	-	-	-	-	36,080
780±8	-	-	-	0,695	-
791±8	0,436	0,542	3,205	0,695	-
829±8	3,273	0,224	2,555	4,335	-
855±8	-	3,290	0,215	0,045	-
868±8	2,610	3,943	0,285	8,10	-
889±5	8,460	-	23,315	1,760	41,930
901±5	-	0,574	-	-	7,780
914±5	0,181	-	-	0,350	-
956±3	66,820	80,210	1,350	67,940	-
971±3	-	4,68	65,050	-	-
978±3	-	1,515	-	-	-
1007±3	-	-	2,610	-	-
1024±3	0,372	-	-	0,165	-
1042±3	0,218	-	-	-	-
1049±2	1,570	-	-	0,290	-
1203±2	0,270	-	-	-	-
1219±2	0,617	-	-	0,140	-
1268±2	0,623	-	-	0,110	-
1289±2	-	-	-	0,115	-
1374±2	0,521	-	-	0,405	-

Таблица 13 (продолжение)

1401±2	0,373	-	-	-	-
1499±2	1,655	-	-	0,16	-

Семнадцать из всех компонентов, которые содержатся в разных частях растения и препаратах, имеют два или более совпадений индексов удерживания в пределах погрешности (табл.13). Данные компоненты отмечены в таблице полужирным шрифтом и являются характеристическими компонентами. Из семнадцати выбранных, шесть компонентов имеют четыре совпадения, три компонента имеют два совпадения, девять компонентов имеют девять совпадений индексов удерживания в пределах погрешности.

Из всего газохроматографического спектра индексов удерживания I_i^T и относительных площадей пиков $A_{i,отн},\%$ летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной нами выбран фрагмент с относительным содержанием компонентов $A_{i,отн} \geq 1\%$, представленный в табл. 14.

Таблица 14 - Фрагмент газохроматографического спектра индексов удерживания I_i^T основных летучих компонентов равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной с относительным содержанием $A_{i,отн},\% \geq 1\%$

I_i^T	Относительное содержание $A_{i,отн},\%$				
	Цветки	Листья и стебли	Корни	Фильтр-пакеты	Настойка
654±8	-	4,512	-	-	-
687±8	-	-	-	-	14,21
706±8	11,144	-	-	14,190	-

760±8	-	-	-	-	36,080
791±8	-	-	3,205	-	-
829±8	3,273	-	2,555	4,335	-
855±8	-	3,290	-	-	-
868±8	2,610	3,943	-	8,10	-
889±5	8,460	-	23,315	1,760	41,930
901±5	-	-	-	-	7,780
956±3	66,820	80,210	1,350	67,940	-
971±3	-	4,68	65,050	-	-
978±3	-	1,515	-	-	-
1007±3	-	-	2,610	-	-
1049±2	1,570	-	-	-	-
1499±2	1,655	-	-	-	-

Летучие компоненты равновесной паровой фазы растительного сырья и фитопрепараты календулы с относительным содержанием $A_{i,отн} \geq 1\%$ (табл.14) названы нами основными. Равновесные паровые фазы исследуемых образцов растительного сырья и препаратов на основе календулы содержат от семи (РПФ цветков) до четырех (РПФ настойки) основных летучих компонентов. Основные компоненты различных исследуемых образцов имеют совпадения индексов удерживания I_i^T в пределах погрешности. Из пятнадцати выбранных компонентов два компонента имеют четыре совпадения, два компонента имеют три совпадения, два компонента имеют два совпадения. Оставшиеся девять компонентов не имеют совпадений основных индексов удерживания с другими исследуемыми образцами в пределах погрешности.

С использованием газохроматографических характеристик относительных площадей $A_{i,отн, \%}$ и индексов удерживания I_i^T основных летучих компонентов была построена диаграмма-образ равновесной паровой фазы цветков (рис. 35).

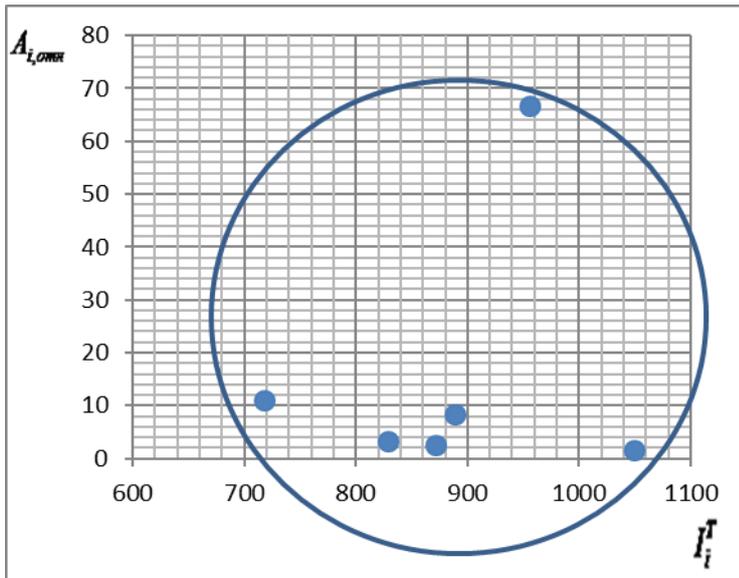


Рисунок 35 - Диаграмма-образ летучих компонентов цветков календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой

Диаграмма показывает зависимость индексов удерживания I_i^T от относительной площади пиков $A_{i,отн.}, \%$. Равновесная паровая фаза цветков календулы содержит шесть основных летучих компонентов, представленных на рис. 35.

Было отмечено сходство и различие диаграмм-образов летучих компонентов равновесной паровой фазы для всех исследуемых образцов.

На рис.36 отображена диаграмма-образ основных летучих компонентов корней календулы лекарственной.

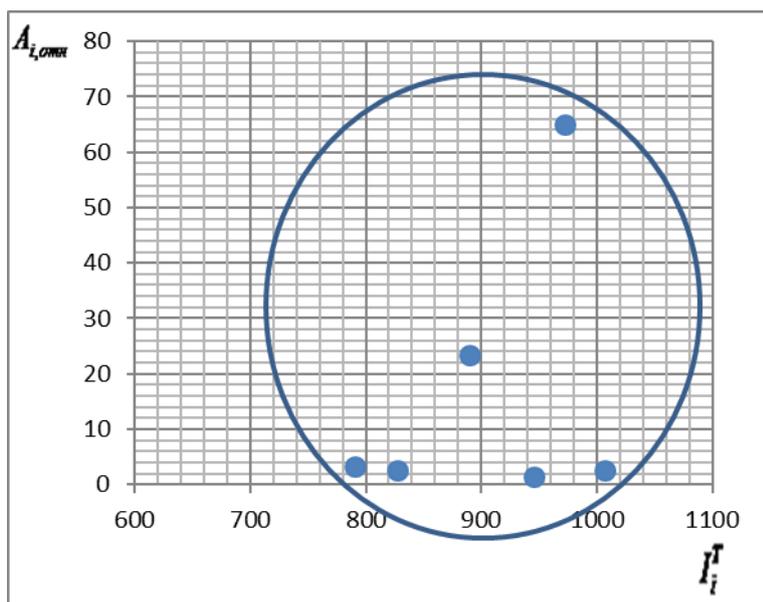


Рисунок 36 - Диаграмма-образ летучих компонентов корней календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено шесть основных летучих компонентов равновесной паровой фазы корней календулы. Летучие компоненты корней с наибольшим содержанием имеют существенно большее количество по сравнению с другими компонентами и находятся в одном и том же интервале индексов удерживания (971 на диаграмме летучих компонентов корней и 956 на диаграмме летучих компонентов цветков).

В целом диаграммы-образы летучих компонентов цветков и корней имеют три основных компонента с одинаковыми индексами удерживания в пределах погрешности: 829 ± 8 , 889 ± 5 , 956 ± 3 .

Отличие двух диаграмм составляют четыре летучих компонента с индексами удерживания 706 ± 8 , 868 ± 5 , 1049 ± 2 , 1499 ± 2 , присутствующие на диаграмме летучих компонентов цветков и два компонента с индексами удерживания 791 ± 8 , 971 ± 3 , 1007 ± 3 , присутствующие на диаграмме летучих компонентов корней.

Следовательно, диаграммы образы летучих компонентов корней и цветков имеют как сходства, так и отличия.

На рис. 37 отображена диаграмма-образ основных летучих компонентов листьев и стеблей календулы лекарственной.

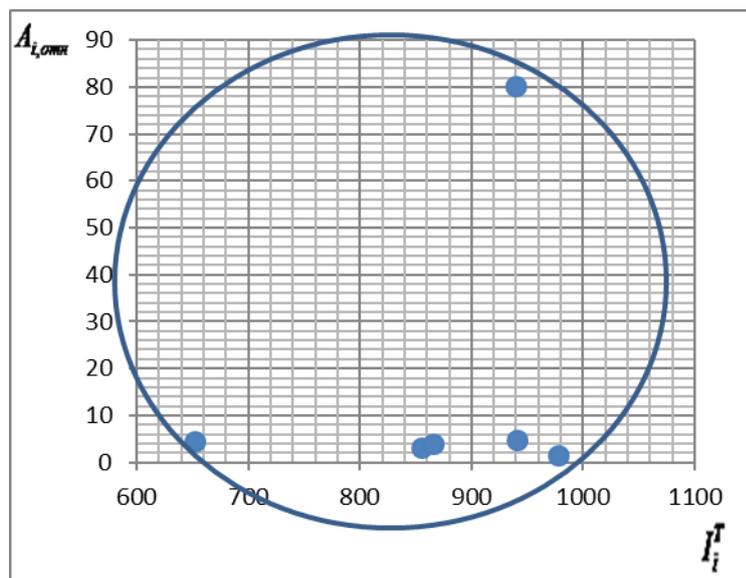


Рисунок 37 - Диаграмма-образ летучих компонентов листьев календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено шесть основных летучих компонентов равновесной паровой фазы листьев календулы (рис.37). Летучие компоненты цветков, листьев и стеблей календулы с наибольшим содержанием имеют существенно большее количество по сравнению с другими компонентами, их индексы удерживания совпадают в пределах погрешности и равны 956 ± 3 .

В целом диаграммы-образы летучих компонентов цветков, листьев и стеблей имеют два основных компонента с одинаковыми индексами удерживания в пределах погрешности: 868 ± 8 и 956 ± 3 .

Было отмечено наличие компонента с индексом удерживания 654 ± 8 , отсутствующего как на диаграмме цветков, так и на диаграммах других исследуемых образцов.

Отличие двух диаграмм составляют пять летучих компонентов с индексами удерживания 706 ± 8 , 829 ± 8 , 889 ± 5 , 1049 ± 2 , 1499 ± 2 , которые присутствуют на диаграмме летучих компонентов цветков и четыре компонента с индексами

удерживания 654 ± 8 , 855 ± 8 , 971 ± 3 , 978 ± 3 , присутствующие на диаграмме летучих компонентов корней.

Следовательно, диаграммы образы летучих компонентов цветков, листьев и стеблей имеют как сходства, так и отличия.

На рис. 38 отображена диаграмма-образ основных летучих компонентов фильтр-пакетов календулы лекарственной.

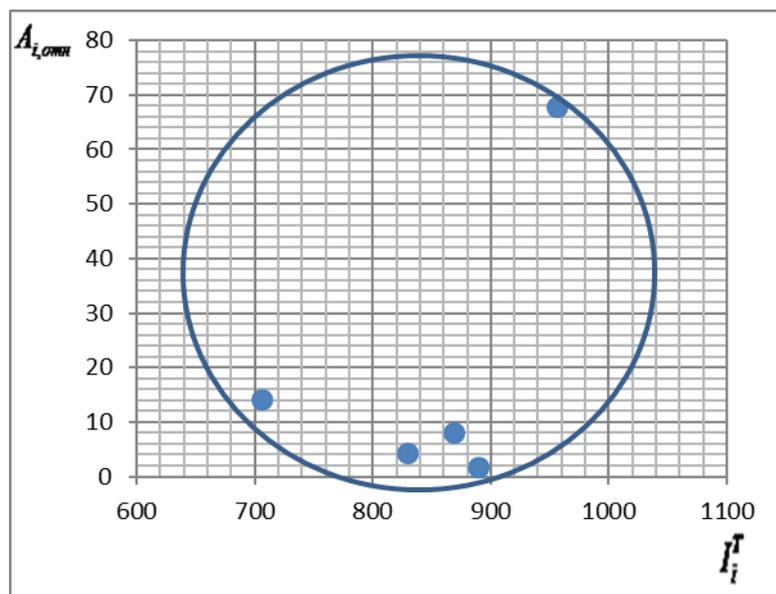


Рисунок 38 - Диаграмма-образ летучих компонентов фильтр-пакетов календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено пять основных летучих компонентов равновесной паровой фазы фильтр-пакетов календулы (рис.38). Летучие компоненты фильтр-пакетов и цветков календулы с наибольшим содержанием имеют существенно большее количество по сравнению с другими компонентами, их индексы удерживания совпадают в пределах погрешности и равны 956 ± 3 .

Все основные компоненты, присутствующие на диаграмме летучих компонентов фильтр-пакетов так же присутствуют на диаграмме основных летучих компонентов цветков.

Наличие на диаграмме основных компонентов цветков компонентами с индексами удерживания 1049 ± 2 и 1499 ± 2 , и отсутствие компонентов с такими

индексами на диаграмме летучих компонентов фильтр-пакетов вероятно связано с особенностями изготовления препарата.

Следовательно, диаграммы летучих компонентов цветков и фильтр-пакетов имеют схожий вид.

На рис. 39 отображена диаграмма-образ основных летучих компонентов экстракта календулы лекарственной.

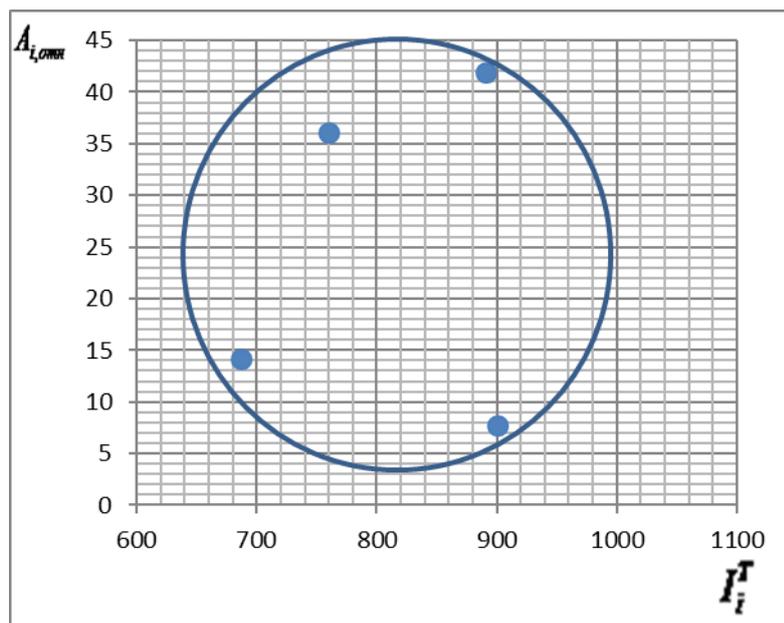


Рисунок 39 - Диаграмма-образ летучих компонентов настойки календулы лекарственной, полученная на колонке с полярной неподвижной фазой

На диаграмме отмечено четыре основных летучих компонента равновесной паровой фазы листьев и стеблей календулы.

Только один из основных летучих компонентов настойки календулы с индексом удерживания 889 ± 5 совпадает с основными летучими компонентами цветков. Этот же основной летучий компонент настойки является компонентом с наибольшим содержанием, однако он не совпадает индексом удерживания наибольшего по содержанию летучего компонента цветков.

Следовательно, диаграмма основных летучих компонентов цветков имеет разительное отличие от диаграммы настойки.

Таблица 15 - Хроматографические характеристики (I_i^T и $A_{I,отн.,\%}$) некоторых компонентов спектра, которые включают три компонента с максимальным содержанием в равновесной паровой фазе для изучаемых объектов*

I_i^T	Относительное содержание $A_{I,отн.,\%}$				
	Цветки	Корни	Листья и стебли	Фильтр-пакеты	Настойка
654±8	0,857	0,5	4,512	0,9	-
706±8	11,144	0,725	-	14,19	-
760±8	-	-	-	-	36,08
791±8	0,436	3,205	0,542	0,695	-
868±8	2,61	0,285	3,943	8,100	-
889±5	8,46	23,315	-	1,760	41,930
901±5	-	-	0,574	-	7,78
956±3	66,82	1,35	80,21	67,94	-
971±3	-	65,05	4,68	-	-

Примечание. * – маркеры в таблице выделены жирным шрифтом

По присутствию маркеров можно определить подлинность сырья и фитопрепаратов календулы лекарственной. Компоненты исследованных объектов, индексы удерживания которых совпадают с маркерами данного объекта, так же указаны в таблице.

Кроме того, некоторые из выбранных маркеров совпадают для разных объектов. Так, например, маркер с индексом удерживания $I_i^T = 706 \pm 8$ присутствует в летучих компонентах цветков и фильтр-пакетов. Маркеры цветков, корней и настойки с индексом удерживания 889 ± 5 так же являются совпадающими. Особый интерес представляют компоненты с индексом удерживания 956 ± 3 , так как здесь прослеживается три совпадения индексов удерживания маркеров среди исследованных объектов, это маркеры цветков, фильтр-пакетов, листьев и стеблей.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.

1. Проведено комплексное фитохимическое исследование различных органов календулы, которое позволило выявить в цветках, листьях, стеблях и корнях различных групп БАС – флавоноидов, фенилпропаноидов, каротиноидов и сапонинов.
2. Определена динамика накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной. В качестве оптимального времени сбора листьев и стеблей календулы лекарственной выбраны середина июля и середина сентября, поскольку именно в эти периоды вегетации отмечено максимальное содержание суммы флавоноидов.
3. Проведено исследование цветков календулы лекарственной методом ВЭЖХ. Разработана методика количественного определения содержания нарциссина, являющегося доминирующим и диагностически значимым флавоноидом цветков календулы лекарственной.
4. С использованием капиллярных колонок с неполярной (VF-1) и полярной (INNOWAX) неподвижными фазами экспериментально определены газохроматографические характеристики летучих компонентов, которые выделяются в равновесную паровую фазу из цветков, корней, листьев и стеблей, а также фитопрепаратов календулы. Получены газохроматографические спектры удерживания летучих компонентов для данных объектов, которые включают совокупность индексов удерживания Ван-ден-Доола и Кратца в диапазоне от 442 ± 5 до 1394 ± 1 для колонки с неполярной и от 602 ± 8 до 1499 ± 2 для колонки с полярными неподвижными фазами. Определено, что летучие компоненты цветков и листьев близки по составу, а летучие компоненты корней существенно отличаются от летучих компонентов цветков календулы.
5. Из массива полученных газохроматографических данных по календуле лекарственной, включающего 42 индекса удерживания летучих компонентов для неполярной фазы и 27 индексов удерживания

для полярной фазы, выбраны характеристические летучие компоненты, которые имеют по два и более совпадений индексов удерживания.

6. Согласно результатам определения основных летучих компонентов каждого объекта исследования (относительное содержание которых $A_{i,отн.} \geq 1\%$), построены диаграммы-образы в целях идентификации этих объектов и проведения оценки их подлинности. Обнаружено некоторое совпадение диаграмм летучих компонентов листьев и цветков для колонки с неподвижной неполярной фазой и диаграмм летучих компонентов фильтр-пакетов и цветков для колонки с неподвижной полярной фазой.
7. В виде маркеров цветков календулы рекомендуется использовать три компонента, максимально содержащиеся в паровой фазе ($A_{i,отн.} = 24,67\%$; $17,68\%$; $11,89\%$), имеющие индексы удерживания на неполярной фазе: 460 ± 5 , 547

ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

5.1. Совершенствование методик количественного анализа сырья и препаратов календулы лекарственной

5.1.1. ТСХ - анализ и спектрофотометрия

На кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ были разработаны: методики качественного ТСХ-анализа цветков календулы лекарственной, основанные на обнаружении нарциссина, β -каротина, а также на определении параметров УФ-спектра; методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на ГСО рутина с использованием дифференциальной спектрофотометрии; методика количественного определения суммы каротиноидов [137].

В качестве модификации методики определения флавоноидов мы предлагаем в отсутствие стандарта ГСО рутина использовать расчетное значение удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ рутина равное 240 при длине волны 412 нм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * 30 * 25 * 100}{240 * m * 1 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

240 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ рутина при длине волны 412 нм.

Использование удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм равное 2773 также целесообразно использовать вместо указанного в методике стандарта бихромата калия.

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 30 \times 25 \times 100 \times 1000}{2773 \times m \times 2 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

2773 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

Кроме того, для комплексного анализа препаратов календулы на содержание как флавоноидов, так и каротиноидов, была разработана методика количественного определения суммы каротиноидов в настойке календулы.

Методика количественного определения содержания суммы каротиноидов в настойке календулы.

5 мл настойки (1:5) помещают в делительную воронку и обрабатывают гексаном в объеме 25 мл трехкратно порциями по 10 мл, 10 мл и 5 мл гексана соответственно.

Первоначально к 5 мл настойки (1:5) в делительной воронке добавляют 10 мл гексана и перемешивают. После образовавшегося расслоения нижнюю фазу (настойку) сливают временно в колбу вместимостью 50 мл. Порцию гексана из делительной воронки собирают в мерную колбу вместимостью 25 мл через меньшую воронку.

Настойку возвращают в делительную воронку и добавляют вторую порцию гексана (10 мл). Таким же образом нижнюю фазу (настойку) после обработки гексаном сливают в колбу объемом 50 мл. Порцию гексана из делительной воронки собирают в ту же вышеуказанную мерную колбу вместимостью 25 мл.

Настойку возвращают в делительную воронку и добавляют третью порцию гексана (5 мл). Таким же образом нижнюю фазу (настойку) после обработки гексаном сливают в колбу на 50 мл, и после чего обработанная трехкратно гексаном настойка (1:5) считается отработанной. Порцию гексана из делительной воронки собирают в ту же вышеуказанную мерную колбу объемом 25 мл, доводят объем содержимого колбы гексаном до метки.

2 мл полученного гексанового извлечения количественно переносят в мерную колбу объемом 25 мл, доводят объем гексаном до метки и осуществляют перемешивание.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание суммы каротиноидов в настойке в пересчете на β -каротин в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25 \times 1000}{2773 \times V \times 2}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

V – объем настойки, мл;

2773 – удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

5.1.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Методика количественного определения нарциссина в цветках ноготков лекарственных. 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 °С 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)» (250x2,0 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: метанол – буферный раствор – 10:90; с 10-ой мин: метанол – буферный раствор – 50:50; с 30-ой мин: метанол – 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:

$$X = \frac{S \times m_i \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{S_i \times m \times V_o \times V_2 \times (100 - W)}$$

где: S – площадь пика нарциссина на хроматограмме испытуемого образца;

S_o – площадь пика на хроматограмме стандартного образца рутина;

m – навеска сырья, г;

m_o – масса ГСО рутина, г;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора ГСО рутина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора ГСО рутина, мкл;

W – влажность сырья, %.

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 месяца.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику рутина, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5:

1. Внесены уточнения в методики количественного определения суммы флавоноидов и каротиноидов в цветках календулы лекарственной, заключающиеся в введении удельных показателей поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$ для рутина и β -каротина.
2. Разработана методика количественного определения содержания суммы каротиноидов в настойке календулы лекарственной, методом спектрофотометрии.
3. Разработана методика количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной с использованием метода ВЭЖХ.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СИРОПОВ НА ОСНОВЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

6.1. Описание состава и способа получения сиропа календулы лекарственной

Для приготовления сиропа цветков календулы лекарственной было получено несколько базовых сиропов: фруктозный, сахарный сироп и сироп на сорбите в соответствии со стандартной методикой получения сиропа (см. главу 2 «Объекты и методы исследования») [60,63]. Главными компонентами сиропов являлись: настойка цветков календулы лекарственной 1:5 на 70% спирте этиловом в количестве 10% от массы сиропа; жидкий экстракт цветков календулы лекарственной 1:2 на 70% спирте этиловом в количестве 5% от массы сиропа; экстракт цветков календулы лекарственной 1:2 на 40% спирте этиловом в количестве 5% от массы сиропа.

6.2. Аспекты стандартизации сиропа календулы лекарственной

В соответствии с установленными на сегодняшний момент требованиями к стандартизации лекарственных средств важно соблюдать преемственность в аспектах стандартизации между лекарственным растительным сырьем, субстанцией и лекарственным препаратом [107,131]. Таким образом, методики стандартизации, используемые для цветков ноготков лекарственных и настойки календулы (как полуфабриката для получения сиропа), требуют адаптации к качественному анализу и количественному определению БАС календулы лекарственной сиропе [107,131].

6.2.1. Качественный анализ сиропа календулы лекарственной

В целях установления состава БАС был использован метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), проводимый на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Предварительно активацию пластинки осуществляли в сушильном шкафу при температурном режиме 100°C в течение 40 мин. Осуществляли пробоподготовку

образцов сиропов перед тем, как нанести их на пластинку. 5 мл сиропа переносили в делительную воронку, осуществляли перемешивание, прибавляли 5 мл ацетона и проводили экстракцию 10 мин. Отделяли ацетоновый слой и проводили упаривание на водяной бане до сухого состояния. Проводили растворение сухого остатка в 0,5 мл 96% спирта этилового. Исследуемый раствор наносили на линию старта капилляром объемом 0,05 мл. Разделение осуществляли в вертикальной камере, насыщенной смесью растворителей хлороформ – этанол – вода (26:16:3) в течении 24 ч. Проводили сушку полученных хроматограмм и просматривали их в ультрафиолетовом свете при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 366$ нм, затем производили обработку свежеприготовленным щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК). Образцом-свидетелем служили настойка цветков календулы лекарственной на 70% спирте этиловом и ГСО рутина.

Во всех образцах сиропа календулы лекарственной обнаруживается диагностически значимое вещество флавоноидной природы – нарциссин с $R_f = 0,45$. Помимо этого, прочие БАС, которые присутствуют в настойке календулы лекарственной, аналогично можно обнаружить в образце сиропа.

Подобным образом, методика, которая была использована для осуществления пробоподготовки может быть применима для стандартизации сиропов на основе календулы лекарственной.

Спектральные характеристики сиропов изучали методом спектрофотометрии на приборе Specord 40 (Analytik Jena). Для того, чтобы приготовить раствор А, 5 мл сиропа переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки. 2 мл данного раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96% (раствор Б) (рис. 40).

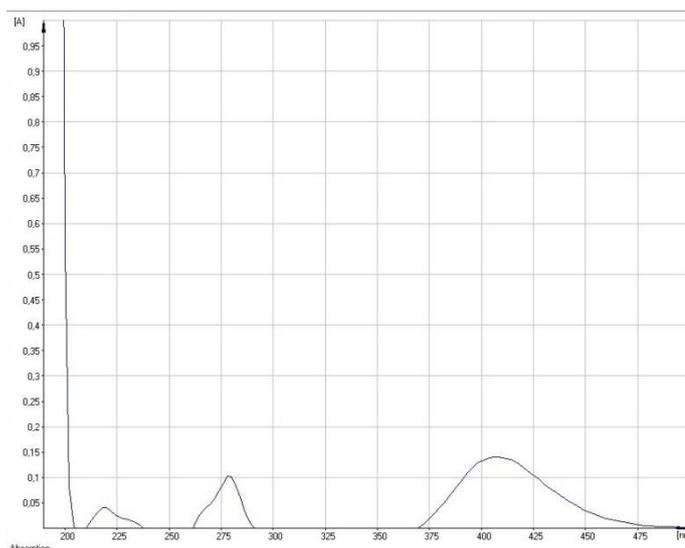


Рисунок 40 – Электронный спектр раствора сиропа на основе настойки календулы лекарственной.

Спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) сканирующего типа в кюветах с толщиной 10 мм. Полученный электронный спектр имеет максимум при $\lambda_{\max}=256\pm 2$ нм (флавоноиды). Аналогичный УФ-спектр был получен для исходного сырья (цветков календулы лекарственной), а также для настойки цветков календулы лекарственной. Таким образом, вероятно сделать вывод о возможности применения разработанных методик стандартизации для фитопрепарата «Календулы лекарственной цветков сироп».

6.2.2. Количественное определение содержания суммы флавоноидов в сиропе календулы лекарственной

Количественное определение суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии с пересчетом суммы флавоноидов на ГСО рутина [137].

Методика определения суммы флавоноидов в сиропе цветков календулы лекарственной (дифференциальная спектрофотометрия).

Около 1 г сиропа (точная навеска) переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл 3% этанольного раствора хлорида алюминия и доводят

объем раствора до метки 70% спиртом этиловым (испытуемый раствор А). В виде раствора сравнения применяют раствор, который был приготовлен в аналогичных условиях, но в отсутствии хлорида алюминия (раствор сравнения А).

Измерение оптической плотности осуществляли посредством спектрофотометра, используя кюветы с толщиной 10 мм при длине волны 412 нм. Проводили параллельно определение оптической плотности ГСО рутин.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 25}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ - оптическая плотность раствора ГСО рутин;

m – масса сиропа, г;

m₀ - масса ГСО рутин, г.

Результаты количественных определений отмечены в табл.16.

Таблица 16 - Количественное содержание суммы флавоноидов в образцах сиропов цветков календулы лекарственной

№ п/п	Наименование препарата	Настойка цветков (1:5) 70% этиловый спирт (разработка кафедры)	Жидкий экстракт цветков (1:2) 70% этиловый спирт	Жидкий экстракт цветков (1:2) 40% этиловый спирт
1.	% содержания препаратов в сиропе	10%	5%	5%
2.	Содержание веществ в препарате	0,230±0,002	0,430±0,002	0,340±0,002
3.	Содержание веществ в сиропе на основе сахарозы	0,020±0,002	0,021±0,002	0,017±0,002

Результаты статистической оценки проведенных опытов удостоверяют в том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в сиропах календулы лекарственной с доверительной вероятностью 95% достигает $\pm 3,60\%$ (табл. 17).

Таблица 17 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в «Календулы цветков сиропе»

f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
10	0,021	0,0004	95	2, 23	0,0008	$\pm 3,60$

Таким образом, содержание суммы флавоноидов в сиропе календулы лекарственной, в соответствии с полученными результатами, должно составлять не менее 0,02%.

6.2.3. Числовые показатели сиропа календулы лекарственной

В соответствии с нормативной документацией для осуществления стандартизации разрабатываемого сиропа [40,42] нужно определить некоторый ряд показателей качества сиропа, таких как, рН, плотность, концентрация спирта, показатель преломления, микробиологическая чистота, а также содержание суммы флавоноидов [137] (табл. 18).

Таблица 18 - Числовые показатели сиропа цветков календулы лекарственной

Показатель	Значение
Плотность (г/см ³)	1,32±0,002
Показатель преломления	1,4370±0,001
рН	5,1±0,1
Концентрация спирта (%)	2,1±0,05

Микробиологическая чистота	Аэробных бактерий – 170 Грибов – 29 Отсутствуют бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Сумма флавоноидов (%)	0,021±0,002

6.3. Изучение влияния препаратов календулы лекарственной на экскреторную функцию почек

На сегодняшний день поиск новых нефропротекторных лекарственных препаратов остается актуальным [56, 133].

Наличие флавоноидов в цветках календулы лекарственной позволяет предположить присутствие мочегонного эффекта у фитопрепаратов календулы. Кроме того, цветки ноготков входят в состав лекарственных сборов, применяемых при лечении заболеваний почек и мочевыводящих путей, например, «Фитонефрол» («Урологический сбор») [45,46].

Исследованию подвергались: настойка календулы 1:5 и экстракт календулы лекарственной 1:2 на 70% спирте этиловом, разработанные и полученные на кафедре фармакогнозии СамГМУ; промышленный образец настойки 1:10 (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», серия 91214 в дозе 50 мкл/кг. Исследование осуществлялось согласно методики, описанной в главе 2 «Объекты и методы исследования» [55].

Результаты исследований отображены в таблице 19.

Таблица 19 - Воздействие препаратов календулы лекарственной на 70% этаноле в дозе 50 мкл/кг при внутрижелудочном введении на фоне 3% водной нагрузки на выделительную функцию почек за 4 ч эксперимента

Контроль/Опыт	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатининуре 3, мг
Контроль (Этанол 70%)	1,06±0,10	120,14±21,07	50,96±3,82	1,11±0,10
Опыт 1 (Календулы настойка 1:10)	0,85±0,06	115,15±14,99	45,29±7,24	1,03±0,08
Опыт 1/Контроль	p=0,118	p=0,850	p=0,502	p=0,550
Опыт 2 (Календулы настойка 1:5)	1,86±0,10* **	217,67±26,64 *	80,96±6,56* *	1,50±0,13* *
Опыт 2/Контроль	p=0,000	p=0,014	p=0,002	p=0,039
Опыт 3 (Календулы экстракт жидкий 1:2)	1,85±0,15* *	214,86±26,03 *	91,18±11,44 **	1,38±0,18 **
Опыт 3/Контроль	p=0,001	p=0,015	p=0,006	p=0,214

Примечание: здесь и далее * - достоверность отличий опытных значений от контрольных $p < 0,05$; ** - достоверность отличий опытных значений от контрольных $p < 0,01$; *** - достоверность отличий опытных значений от контрольных $p < 0,001$.

В ходе исследования показатели секреторной функции почек при однократном внутрижелудочном введении настойки календулы промышленного производства в дозе 50 мкл/кг за 4 ч опытного периода изменялись недостоверно по отношению к водно-спиртовому контролю (табл.19).

Однократное внутрижелудочное введение настойки календулы (1:5) в аналогичной дозе за 4 ч эксперимента вызвало достоверное возрастание всех исследуемых параметров выделительной функции почек по отношению к спиртовому контролю: диуреза – на 75%, натрийуреза – на 81%, калийуреза – на 59%, креатининурезы – на 35% (табл. 19).

При введении жидкого экстракта (1:2) на 70% этаноле в дозе 50 мкл/кг за 4 ч опыта вызвало достоверное возрастание почечной экскреции воды – на 75%, натрия и калия – на 79% в сравнении с водно-спиртовым контролем, в тоже время креатининурия увеличивался недостоверно (табл. 19).

В тоже время спустя 24 ч данные лекарственные препараты проявили себя несколько слабее. Так, показатели выделительной функции почек при однократном внутрижелудочном введении настойки календулы промышленного производства в дозе 50 мкл/кг за 24 ч опытного периода были сравнимы с контрольными значениями (табл. 20).

Таблица 20 - Влияние препаратов календулы лекарственной на 70% этаноле в дозе 50 мкл/кг при внутрижелудочном введении на фоне 3% водной нагрузки на выделительную функцию почек за 24 ч эксперимента

Контроль/Опыт	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатининурия з, мг
Контроль (Этанол 70%)	2,70±0,09	310,51±27,4 8	128,17 ±11,67	3,87±0,3 1
Опыт 1 (Календулы настойка 1:10)	2,91±0,14	353,77±25,6 8	130,07 ±10,27	4,23±0,2 6
Опыт 1/Контроль	p=0,240	p=0,2 72	p=0,9 05	p=0,394
Опыт 2 (Календулы настойка 1:5)	3,42±0,21* *	430,54 ±33,38*	152,74 ±13,19	4,42±0,5 9
Опыт 2/Контроль	p=0,008	p=0,0 17	p=0,1 88	p=0,426
Опыт 3 (Календулы экстракт жидкий 1:2)	3,64±0,24* *	457,28 ±41,68*	176,99 ±8,05**	4,61±0,4 2
Опыт 3/Контроль	p=0,003	p=0,0 12	p=0,0 05	p=0,182

Однократное внутрижелудочное введение настойки календулы (1:5) в дозе 50 мкл/кг за 24 ч эксперимента вызвало достоверное возрастание всех исследуемых показателей выделительной функции почек по отношению к водно-спиртовому контролю: диуреза – на 27%, натрийуреза – на 39%, калийурез и креатининуриза при этом возрастали недостоверно.

При введении жидкого экстракта (1:2) на спирте этиловом 70% в дозе 50 мкл/кг за 24 ч опыта вызвало достоверное возрастание почечной экскреции воды – на 35%, натрия – на 47%, калия – на 38% в сравнении с водно-спиртовым контролем, в тоже время, креатининуриза повышался недостоверно.

Следует отметить, что препараты на основе цветков календулы лекарственной способны оказывать комплексное нефропротекторное действие на организм. Это связано с богатым химическим составом данного сырья, представленным каротиноидами, флавоноидами, фенилпропаноидами, полисахаридами, сапонинами и другими веществами. Несомненно, препараты цветков ноготков, обладая антисептическим, противовоспалительным, диуретическим действием, представляют большой интерес в плане лечения заболеваний почек и мочевыводящих путей.

Основным вопросом на этапе создания новых лекарственных средств является вопрос безвредности их применения. В связи с этим было проведено исследование острой токсичности препаратов цветков календулы лекарственной.

6.4. Изучение острой токсичности лекарственных препаратов на основе цветков календулы лекарственной

Опыты по изучению острой токсичности [56] препаратов ноготков лекарственных проводили на 20 белых беспородных половозрелых крысах массой 200-220 г. (2 серии экспериментов). В первые сутки крысы постоянно наблюдались. Продолжительность эксперимента в общем составила 14 суток. В ходе исследования летальных случаев выявлено не было. Во время наблюдения отклонений в поведении крыс контрольной и опытной групп не отмечалось. Вес опытных животных также не имел достоверных отличий от массы контрольных

крыс на протяжении всего эксперимента. Однократное внутрижелудочное введение экспериментального средства в дозе 15 мл/кг не привело к гибели животных, значит, изученные препараты можно отнести к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

Таким образом, было установлено, что среди изученных препаратов за 4 ч эксперимента жидкий экстракт обладает выраженными диуретическими и салуретическими свойствами, настойка (1:5) – выраженными диуретическими, салуретическими и креатининуретическими свойствами, а настойка (1:10) имеет лишь тенденцию к повышению диуреза, причем данные эффекты ослабевают в течение суток. Препараты ноготков можно отнести к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

6.5. Изучение антимикробных свойств препаратов календулы лекарственной

В ходе изучения антимикробной активности были исследованы такие препараты, как водное извлечение (настой) цветков календулы (1:20); настойка цветков календулы (1:10) на 70% спирте ООО «Тулская фармацевтическая фабрика», препарат «Календулы настойка», серия 91214 годен до 1217; а также лабораторные образцы настойки цветков календулы (1:5) (70% спирт), жидкого экстракта цветков календулы (1:2) на 40% спирте; жидкого экстракта цветков календулы (1:2) на 70% спирте.

В качестве тестовых культур для определения антимикробной активности водных и спиртовых извлечений были применены следующие патогены: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*.

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли, используя метод двойных серийных разведений в бульоне в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

В результате микробиологического исследования получили следующие результаты. В случае настоя цветков календулы отмечалась довольно высокая

активность по отношению ко всем изученным штаммам. В особенности, настой проявляет антимикробное действие по отношению к *Escherichia coli* до разведения в 4 раза, по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* до разведения в 8 раз, и по отношению *Candida albicans* до разведения в 32 раза (табл. 21).

Таблица 21 - Антимикробная активность водного извлечения цветков календулы (1:20) (экстрагент – вода очищенная)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Образец настойки (1:10) на 70% спирте Тульской фармацевтической фабрики, полученный в промышленных условиях, продемонстрировал антибактериальную активность по отношению ко всем указанным штаммам, кроме палочки кишечной. В числе прочего, настойка проявляет антимикробную активность по отношению к *Staphylococcus aureus* до разведения в 8 раз, по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* до разведения в 16 раз, а также по отношению к *Bacillus cereus* и *Candida albicans* до разведения в 64 раза (табл. 22).

Таблица 22 - Антимикробная активность настойки цветов календулы (1:10)
(экстрагент – спирт этиловый 70%)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

В соответствии с результатами исследования для настойки цветков календулы (1:5) на 70% спирте установлена антибактериальная активность по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* до разведения в 8 раз, а также в по отношению к *Bacillus cereus* до разведения в 256 раз (табл.23).

Таблица 23 – Антимикробная активность настойки календулы (1:5) (экстрагент – спирт этиловый 70%)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Важно подчеркнуть, что жидкий экстракт цветков календулы (1:2) 40% в сравнении с жидким экстрактом (1:2) 70% имеет наиболее широкую направленность действия по отношению к микроорганизмам: к *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*. По отношению к *Staphylococcus aureus* жидкий экстракт на 70% спирте не проявляет

антимикробную активность. Тем не менее жидкий экстракт на 70% спирте проявляет более выраженное антимикробное действие на *Bacillus cereus* до разведения в 256 раз, а жидкий экстракт на 40% спирте проявляет более выраженное антимикробное действие на *Candida albicans* до разведения в 16 раз. По отношению к *Pseudomonas aeruginosa* оба экстракта проявляют одинаковую антимикробную активность до разведения в 8 раз (табл. 24 и 25).

Таблица 24 – Антимикробная активность жидкого экстракта цветков календулы (1:2) (экстрагент – спирт этиловый 40%)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 25 - Антимикробная активность жидкого экстракта цветков календулы (1:2) (экстрагент – спирт этиловый 70%)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Важно отметить, что жидкий экстракт цветков календулы (1:2) на 70% спирте оказывает максимальное антимикробное действие из всех анализируемых извлечений календулы лекарственной.

Особую широкую направленность антибактериального действия имеет настой цветков календулы, что представляется важным с точки зрения лечения бронхолегочной патологии, заболеваний почек, печени и других органов пищеварения, которым соответствует процесс микробной этиологии. По отношению к *Pseudomonas aeruginosa* более активным извлечением представляется настойка (1:10) на 70% спирте, по отношению к *Escherichia coli* лишь одним извлечением, которое проявило антимикробную активность, является настой цветков календулы (1:20), по отношению к *Bacillus cereus* большую активность показала настойка цветков календулы (1:5) на 70% спирте и жидкий экстракт (1:2) на 70% спирте, по отношению *Candida albicans* большую активность показала настойка (1:10) на 70% спирте.

Подобным образом, базируясь на основе полученных в ходе эксперимента результатов, возможно сделать заключение о присутствии в препаратах цветков календулы лекарственной протимикробной активности по отношению к патогенным микроорганизмам *in vitro*. Присутствие данной активности, по всей вероятности, связано с наличием комплекса БАС цветков календулы.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.

1. Обоснованы способ получения и состав сиропа цветков календулы лекарственной. Разработаны методики качественного анализа препарата и количественного определения БАС.
2. Рекомендуемое содержание суммы веществ флавоноидов в пересчете на рутин в сиропе календулы лекарственной должно составлять не менее 0,02 %.
3. Для разработанных лекарственных препаратов цветков календулы лекарственной определены параметры диуретической и антимикробной активности. Особую широкую направленностью антибактериального действия имеет настой цветков календулы, что представляется важным с точки зрения лечения бронхолегочной патологии, заболеваний почек, печени и других органов пищеварения, которым соответствует процесс микробной этиологии. По отношению к *Pseudomonas aeruginosa* наибольшую активность проявляет настойка (1:10) на 70% спирте, по отношению к *Escherichia coli* единственным извлечением, которое проявило антимикробную активность, является настой цветков календулы (1:20), по отношению к *Bacillus cereus* большую активность продемонстрировали настойка цветков календулы (1:5) на 70% спирте и жидкий экстракт (1:2) на 70% спирте, по отношению к *Candida albicans* большую активность показала настойка (1:10) на 70% спирте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования ноготков лекарственных (*Calendula officinalis* L.) были сделаны следующие общие выводы:

1. В результате морфологического и анатомического исследования корней календулы лекарственной (сорт Кальта), выявлены характерные особенности строения корней календулы как высокоперспективного источника новых лекарственных растительных средств. Были отмечены следующие диагностически значимые признаки, которые необходимы для того, чтобы подтвердить подлинность корней календулы: присутствие пигментированного слоя клеток с бурым протопластом липофильной природы в коровой части корня; присутствие скоплений включений инулина кристаллического типа в коровой части корня; присутствие уплощенных клеток флоэмы, радиально расположенных рядами, имеющих тонкие целлюлозные стенки; присутствие лучей первичной двулучевой ксилемы, которые являются достаточно визуализируемыми и неодревесневшими. К особенностям плодов календулы лекарственной можно отнести особенности очертаний поперечных сечений, структуру экзокарпия с многочисленными одно- и многорядными трихомами, а также наличие опорных пучков в паренхиме мезокарпия состоящей из особых крупных клеток с лигнифицированной оболочкой. Признаки, которые были выявлены позволят доподлинно провести идентификацию исследуемого вида ЛРС.
2. Проведено комплексное фитохимическое исследование различных органов календулы, которое позволило выявить в цветках, листьях, стеблях и корнях различных групп БАС – флавоноидов, фенилпропаноидов, каротиноидов и сапонинов. В качестве оптимального времени сбора листьев и стеблей календулы лекарственной выбраны середина июля и середина сентября, поскольку именно в эти периоды вегетации отмечено максимальное содержание суммы флавоноидов.

3. Проведено исследование цветков календулы лекарственной методом ВЭЖХ. Разработана методика количественного определения содержания нарциссина, являющегося доминирующим и диагностически значимым флавоноидом цветков календулы лекарственной.
4. В качестве маркеров цветков календулы рекомендуется использовать три компонента с максимальным содержанием в паровой фазе ($A_{i, \text{отн.}} = 24,67\%$; $17,68\%$; $11,89\%$) и с индексами удерживания на неполярной фазе: 460 ± 5 , 547 .
5. Внесены уточнения в методики количественного определения суммы флавоноидов и каротиноидов в цветках ноготков лекарственных, заключающиеся в введении удельных показателей поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$ для рутина и β -каротина. Разработана методика количественного определения содержания суммы каротиноидов в настойке календулы лекарственной, методом спектрофотометрии. Разработана методика количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной с использованием метода ВЭЖХ. Разработана методика газохроматографического определения летучих компонентов равновесной паровой фазы календулы лекарственной и лекарственных препаратов на ее основе, заключающаяся в определении профиля («отпечатка пальца») календулы лекарственной.
6. Обоснованы способ получения и состав сиропа цветков календулы лекарственной. Разработаны методики качественного анализа данного препарата и количественного определения БАС. Рекомендуемое содержание суммы веществ флавоноидов в пересчете на рутин в сиропе календулы лекарственной должно составлять не менее $0,02\%$.
7. Для разработанных лекарственных препаратов цветков календулы лекарственной определены параметры диуретической и антимикробной активности. Особую широкую направленность антибактериальной активности имеет настой цветков календулы, по отношению *Pseudomonas*

aeruginosa более активным извлечением является настойка (1:10) на 70% спирте

8. На основе результатов фармакогностических исследований разработан проект ФС «Календулы лекарственной цветки» (Приложение 2).

Практические рекомендации:

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды, флавоноиды и каротиноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих фенилпропаноиды, флавоноиды и каротиноиды, а также разработки методик анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья, которые отвечают современным требованиям. Кроме того, важным является научное обоснование комплексного использования растительных ресурсов в медицинской и фармацевтической практике. В процессе проведения исследований большое значение придается использованию современных методов анализа и приборной базы, а также изучению фармакологических эффектов лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

- БАВ – биологически активные вещества
- БАС – биологически активные соединения
- ВФС – временная фармакопейная статья
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГСО – государственный стандартный образец
- ГФ – Государственная Фармакопея
- ДСК – диазобензолсульфокислота
- НД – нормативная документация
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛР – лекарственное растение
- ЛРП – лекарственный растительный препарат
- ЛРС – лекарственное растительное сырье
- ЛС – лекарственное средство
- ЛФ – лекарственная форма
- ОФС – общая фармакопейная статья
- РСО – рабочий стандартный образец
- СО – стандартный образец
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
- ФС – фармакопейная статья
- ФСП – фармакопейная статья предприятия
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Библиографический список

1. Абдуллабекова, В.Н. Разработка метода количественного анализа цветков календулы лекарственной / В.Н. Абдуллабекова, А.А. Тулаганов // Химико-фармацевтический журнал - 2001. - Т. 35, № 10. - С. 25-26.
2. Авдеева, Е.В. Теоретическое и экспериментальное обоснование использования лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, для получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов: автореф. ...докт. фарм. наук: 15.00.02 / Авдеева Елена Владимировна. – Пермь, 2006. – 44 с.
3. Андреева Л.Г. Локализация и содержание каротиноидов в высокопродуктивных формах *Calendula officinalis* // Аптечное дело. – 1961. Т.10, № 3. – С. 46-49.
4. Арзамасцев, А.П. Основные аспекты совершенствования фармакопейного анализа / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, В.Л. Багирова // Хим.-фарм. журн. – 2000. - №5 – С. 47-49.
5. Арзамасцев, А.П. Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной статьи) / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, Н.П. Садчикова // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. - № 3. – С. 24-26.
6. Арзамасцев, А.П. Валидация фармакопейных методов (проект общей фармакопейной статьи) / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2001. -№ 1. – С. 28-29.
7. Арифходжаев, А.О. Галактаны и галактаносодержащие полисахариды высших растений / А.О. Арифходжаев // Химия природных соединений – 2000. - №3 – С. 185-197.

8. Астахова, А.В. Лекарственные травы и биологически активные добавки. / Безопасность лекарств. – 2000. - № 1. – С. 83-95.
9. Астахова, А.В. Биологически активные добавки (БАД). / Безопасность лекарств. – 2000. - № 4. – С. 12-16.
10. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. – М.: Наука. – 1964. – 153 с.
11. Багирова, В.Л. О стандартизации лекарственных средств на современном этапе / В.Л. Багирова, Е.Л. Ковалева, Н.П. Садчикова // Хим. – фарм. журн. – 2001.- Т. 34, № 11. – С. 46-47.
12. Багирова, В.Л. Ассортимент лекарственного растительного сырья на фармацевтическом рынке России / В.Л. Багирова, И.А. Баландина, Т.А. Сокольская, О.Н. Воробьева, Л.Г. Алехина // Новая аптека. – 2004. - № 2. – С. 57-62.
13. Багирова, В.Л. Ассортимент лекарственных сборов на фармацевтическом рынке России / В.Л. Багирова, И.А. Баландина, Т.А. Сокольская, О.Н. Воробьева, Л.Г. Алехина // Новая аптека. – 2004. - № 3. – С. 65-70.
14. Багинская, А.И. Густой экстракт календулы – новое ранозаживляющее средство / А.И. Багинская, О.А. Коновалова, В.К. Колхир, Н.Г. Глазова, М.Б. Боровкова, Т.Е. Лескова // Человек и лекарство: Тез. докл. XI Рос. нац. конгр., Москва, 2004 г. - М., 2004. – С. 246.
15. Бандюкова, В.А. Исследование флавоноидов некоторых видов растений семейства сложноцветных, бурачниковых и бересклетовых /В.А. Бандюкова, С.Ф. Джумырко, Н.В. Сергеева, А.Л. Шинкаренко // Труды первого всесоюзного съезда фармацевтов: Пятигорск, 14-19 сент. 1967г. – М.: 1970. – С. 253-258.
16. Беленький, Б.Г. Тонкослойная хроматография. В кн.: Успехи хроматографии. К 100-летию со дня рождения М.С. Цвета. / Под ред. К.В. Чмутова и К.И. Сакодынского. М.: Наука. – 1972. – с. 134-162.

17. Беликов, В.В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов / В.В. Беликов, Т.В. Точкова // Фенольные соединения и их физиологические свойства. – Алма-Ата, 1973. – С. 168-172.
18. Беликов, В.В. Применение ВЭЖХ в анализе флавоноидных препаратов / В.В. Беликов // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств: Мат. докл. всесоюз. конф., 18-21 декабря 1991. – М., 1991. – Т. 2, ч. 1 – С. 14-16.
19. Березовская, Т.П. Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т.П. Березовская, Н.В. Дощинская, Е.А. Серых. – Томск, 1978. – 113 с.
20. Библиография по лекарственным растениям. Указатель отечественной литературы: рукописи XVII-XIX вв., печатные издания 1732-1954 гг./ Уткин Л.А., Гаммерман А.Ф., Невский В.А. и др. – М.: ВИЛАР, 1987. – С.40-47.
21. Бирюк, В.А. Фенольные соединения соцветий *Calendula officinalis* L. / В.А. Бирюк, В.Т. Чернобай // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Тез. докл. II съезда фармацевтов Украинской ССР: Тез. докл. II съезда фармацевтов Украинской ССР 1972 г. – Киев, 1972. – С. 744-745.
22. Бубенчикова, В.Н. Разработка методов анализа растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.Н. Бубенчикова, Т.В. Точкова // Состояние и перспективы развития фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: Тез. докл. Научно-практической конференции, посвященной 50-летию фармацевтического факультета 1991 г. – Томск, 1991. – С. 117-118.
23. Бурцева, И.В. Исследование нового вида сырья – шрота цветков ноготков / И.В. Бурцева, Г.И. Олешко, В.Ф. Левинова и др. // Фармация. – 2004. №4. – С. 16-18.
24. Бурцева, И.В. Фармакогностическое изучение шрота цветков ноготков после получения настойки: Автореф. дис. канд. фарм. наук / И.В. Бурцева. – Пермь, 2004. – 22 с.
25. Бурцева, И.В. Оптимальные условия получения масляного экстракта шрота цветков ноготков / И.В. Бурцева, М.С. Чигвинцева, В.Ф. Левинова, Л.К.

- Бабиян // Науки о человеке: Сб. ст. V конгр. молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2004. – С. 338-339.
26. Вельмайкина, Е.И. Фармакогностическое исследование эхинацеи пурпурной как источника иммуномодулирующих средств: дисс. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Екатерина Ивановна Вельмайкина. – Самара, 2013. – 147 с.
27. Вечерко, Л.П. Календулозид А из *Calendula officinalis* L. / Л.П. Вечерко, Э.П. Зинкевич, Н.И. Либизов, А.И. Баньковский // Химия природ. соединений. – 1969. - № 1. С. 58-59.
28. Вечерко, Л.П. Строение календулозида А / Л.П. Вечерко, Э.П. Зинкевич, Н.И. Либизов, А.И. Баньковский // Химия природ. соединений. – 1971. - № 1. С. 22-27.
29. Вечерко, Л.П. Строение календулозида F из корней *Calendula officinalis* L. / Л.П. Вечерко, Э.П. Зинкевич, М. Коган // Химия природ. соединений. – 1973. - № 4. С. 561-562.
30. Вечерко, Л.П. Строение календулозидов С и D из *Calendula officinalis* L. / Л.П. Вечерко, Э.П. Зинкевич, А.Ф. Свиридов, М. Коган // Химия природ. соединений. – 1975. - № 3. С. 366.
31. Видюкова, А.И. О противовоспалительном действии полфенольного препарата из календулы лекарственной / А.И. Видюкова, Я.И. Хаджей, Г.В. Оболенцева // Четвертый всесоюзный симпозиум по фенольным соединениям: Тез. докл. – Ташкент, 1982. – С. 14-15.
32. Высокоэффективная тонкослойная хроматография / Под ред. А. Златкиса и Р.Е. Кайзера (пер. с англ. под ред. д.х.н., проф. В.Г. Березкина). – М.: Мир. – 1979. – 245 с.
33. ВФС 42-1638-86. Экстракт календулы жидкий / Фармакопейный государственный комитет. – Введ. 10.06.87 до 31.12.91. – 3 с.
34. Георгиевский, В.П. 50 лет тонкослойной хроматографии / В.П. Георгиевский, Ю.В. Шостенко // Фармация. – 1989. – Т. 38, № 3. – С. 86-87.

35. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук - Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. - 330 с.
36. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений. Учеб. пособие для фарм. вузов / Н.И. Гринкевич, И.А. Баландина, В.А. Ермакова и др. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
37. Головкин, Б.Н. О чем говорят названия растений / Б.Н. Головкин. – М.: Колос, 1992. – 192 с.
38. Гордиенко, А.Д. Гепатопротекторный механизм действия флавоноидов // А.Д. Горденко // Фармация. - 1990. - Т. 39, № 3. - С.75-78.
39. Государственная Фармакопея Республики Казахстан / Министерство Здравоохранения Республики Казахстан. – Т. 1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. – 592 с.
40. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М.–2015. – 1470 с.
41. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М.– 2015. – 1004 с.
42. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
43. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
44. ГОСТ 17768-80. Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
45. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. – 16.07.14.
46. Государственный реестр лекарственных средств. Т.1: офиц. изд. (по состоянию на 1 апреля 2008 г.) (VIII ежегод. периодич. изд.) / Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития; Науч. центр экспертизы средств мед. применения. - М.: Медицина, 2008. – 1300 с.

47. Григорьева, Н.А. Биологические особенности возделывания календулы лекарственной и ромашки аптечной при минимальных затратах ручного труда, без применения средств химизации: Автореф. дис. канд. биол. наук / Н.А. Григорьева. – Москва, 2003. - 23 с.
48. Гунар, О.В. Особенности испытания лекарственного растительного сырья на микробиологическую чистоту / О.В. Гунар // Фармация. – 2003. – Т. 51, № 3. – С. 5-7.
49. Даль В. Толковый словарь живого русского языка. – М.: Изд-во АЛ Прогресс, Универс, 1994. – Т.2. – С. 1434.
50. Деркач А.И., Комисаренко Н.Ф., Чернобай В.Т. Кумарины соцветий *Calendula officinalis* и *Helichrysum arenarium* // Химия природных соединений. – 1986. - №6. – С. 67-74.
51. Деркач А.И. Флавоноиды и терпениоды некоторых видов чистец и календулы лекарственной: Автореф. Дисс. ...канд.фармац. наук. – Харьков, 1989. – 24 с.
52. Дрозд, Г.А., Дрозд, Н.Г. Лекарственные растения, содержащие флавоноиды: ограничения для применения. // Сборник работ 68-й итоговой научной сессии КГМУ и отделения медико-биологических наук Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 2-х частях. Часть II. – Курск: КГМУ. – 2002. – С. 215-216.
53. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака (пер. с англ.). – М.: Мир. – 1978. – 428 с.
54. Зайцев, В.М., Прикладная медицинская статистика / Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. – С.-Пб. Фолиант. - 2003. – 432 с.
55. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных: патент на изобретение 2494703 Рос. Федерация. №2012104057/13; заявл. 06.02.12; опубл. 10.10.13 // Изобретения. Полезные модели. – 2013; 28: 11 с.
56. Зайцева, Е.Н. Препараты на основе травы зверобоя как средства коррекции экскреторной функции почек / Е.Н. Зайцева, В.А. Куркин, А.В. Дубищев,

- О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Известия Самарского научного центра РАН. - 2011. - Т. 13, № 1(8). - С. 1999-2002.
57. Запесочная, Г.Г. Фенилпропаноиды в стандартизации лекарственных растений / Г.Г. Запесочная, В.А. Куркин // III Международная конференция «Экологическая патология и ее фармакокоррекция»: Тез. докл. - Чита, 1991. - Ч. II. - С. 23.
58. Зузук Б.М., Куцик Р.В., Калугина С.М., Гудивок Я.С., Куровец Л.М. Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.). Аналитический обзор // Химия растительного сырья, 2001. - №4,5. – С. 105-110.
59. Ивасенко С.А. Содержание каротиноидов и флавоноидов в соцветиях некоторых сортов *Calendula officinalis* L. / Ивасенко С.А., Прибыткова Л.Н., Адекенов С.М. и др./ Растительные ресурсы, 2000. Т.36. – Вып.2. – С. 107-110.
60. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. – Т.2 / Н.В. Меньшутина [и др.]. – М.: БИНОМ, 2013. – 480 с.
61. Исмаилов, Р.Р., Костылев Д.А. Календула. / Р.Р. Исмаилов, Д.А. Костылев. - Уфа: БГАУ, 2000. 102 с.
62. Кащенко, Н.И. Фитохимическое исследование и совершенствование методов стандартизации цветков и травы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.): автореф. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Кащенко Нина Игоревна. – Улан-Удэ, 2014. – 22 с.
63. Ким, М.Е. Сиропаы с фитопрепаратами: номенклатура, разработка, особенности состава, технологии (обзор) / М.Е. Ким, Т.А. Олейникова, С.Б. Евсеева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015. – №2-2. – С. 21-26.
64. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества/ Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. - М.: Издательство профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. - 295с.

65. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х томах. / Пер. с англ. Под ред. д.х.н., проф. В.Г. Березкина. – М.: Мир. –1981. – 1139 с.
66. Колесникова, В.Г., Марченко В.А., Сыровежко Н.В. Лекарственные растения: мифы и реальность / В.Г. Колесникова, В.А. Марченко, Н.В. Сыровежко – С.-Пб.: СПХФА, 1998. – 261 с.
67. Комисаренко, Н.Ф. Флавоноиды соцветий *Calendula officinalis* L. / Н.Ф. Комисаренко, В.Т. Чернобай, А.И. Деркач // Химия природ. соединений. - 1988. - № 6. - С. 795-801.
68. Коновалова О.А., Рыбалко К.С. Биологически активные вещества *Calendula officinalis* L. // Растительные ресурсы. – 1990. Т.26. – Вып.3. – С.448-463.
69. Корсун, В.Ф. Лечение кожных болезней препаратами растительного происхождения: Справочник / В.Ф. Корсун. – Минск: Беларусь, 1995.- С. 15-37.
70. Костенникова, З.П. Количественное определение флавоноидов в настойке календулы методом УФ-спектрофотометрии / З.П. Костенникова, Г.А. Панова, Р. Дамбраускеш // Фармация. – 1984. – Т. 33. - № 6. – С. 33-35.
71. Кражан, И.А. Лечение хронического катарального гингивита с применением календулы, иммобилизованной на полисорбе / И.А. Кражан, Н.Н. Гаража // Стоматология. – 2001. - №5. – С. 11-13.
72. Крапивина, И.В. Сравнительное изучение химического состава шрота цветков календулы лекарственной и исходного сырья / И.В. Крапивина, В.Ф. Левинова, Г.И. Олешко, А.В. Канин // Актуальные проблемы в фармацевтической науке и образовании: Мат. межвуз. науч. конф. – Пермь: ПГФА, 2001. – С. 108-109.
73. Кулатаева, А.К. К вопросу разработки препарата для лечения заболеваний пародонта на основе фитокомпозиции этанольных экстрактов и эфирных масел лекарственных растений / А.К. Кулатаева, Р.Н. Пак, С.М. Адекенов // V конгресс молодых ученых и специалистов «Науки о человеке»: Сборник статей. – Томск, 2004. – С. 174.

74. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов/ В.А. Куркин, И.К. Петрухина // *Фундаментальные исследования*. – 2014. - №11. – С. 366-371.
75. Куркин, В.А. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников / В.А. Куркин, В.Ф. Новодранова, Т.В. Куркина – Москва; Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. – 188с.
76. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
77. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
78. Куркин, В.А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2015. - Т. 159, № 3. - С. 348-352.
79. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармац. вузов – Изд. 2-ое, перераб. и доп. / В.А. Куркин. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. – 1239 с.
80. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ...докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
81. Лавренов, В.К., Лавренова, Г.В. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины / В.К. Лавренов, Г.В. Лавренова – С.-Пб.: Издательский дом «Нева», 2003, 272 с., илл., с. 90.
82. Ладыгина, Е.Я. Календула лекарственная / Е.Я. Ладыгина // *Фармация*. – 1992.-Т.40. №4. – С. 84-86.

83. Левандовский Г.С. Ноготки лекарственные // Биология, селекция и семеноводство лекарственных культур. – М., 1982. – С. 69-75.
84. Лекарственные растения государственной фармакопеи 1 и 2 том / Под ред. Самылиной И.А., Северцева В.А. М. Анми. – 1999, 2003.
85. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие/ Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2006. – С. 350-354.
86. Лечение растениями: основы фитотерапии: Учеб. пособие / В.М. Баева – М.: ООО «Издательство Астрель», 2004. – 202 с.
87. Лигай Л.В., Мартынов О.А., Кошкарева И.В. и др. Изучение полисахаридного комплекса клубней зопника клубненосного и надземной части календулы лекарственной // Региональная конференция по фармации, фармакологии и подготовке провизоров. – Пятигорск, 1997. – С. 14-15.
88. Литвиненко, В.И. Гликофлавоноиды в растениях семейства астровые / В.И. Литвиненко, В.Н. Бубенчикова, Т.П. Попова // Состояние и развитие фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: Тез. докл. Научно-практической конференции, посвященной 50-летию фармацевтического факультета 1991 г. – Томск, 1991. – С. 156-157.
89. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Изд. 15-е, перераб., испр. и доп. – Москва: Новая Волна, 2006. – 1206 с. Мовчан С.Д. К исследованию каротиноидных пигментов из лепестков *Calendula officinalis* // Журнал прикладной химии. – 1960. – Т.33, № 2. – С. 484-486.
90. Надиров, К.С. Адсорбция флавоноидов на платиновом электроде / К.С. Надиров // Химия природных соединений – 2000. № 4. – С. 176.
91. Налепо, Л.Ф. Гиполипидемическое действие настойки календулы / Л.Ф. Налепо // Гомеопатия и фитотерапия – 1997. № 2. – С. 86-87.
92. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / Под ред. Багировой В.Л., Северцева В.А. С-Пб.: СпецЛит. 2001.
93. Никитин, А.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений / А.А. Никитин, И.А. Панкова. – Л., Наука, 1982. – С. 290-293.

94. Никифорова Е.Б., Хочава М.Р., Сампиев А.М. Исследование аминокислотного состава водорастворимых комплексов календулы и кукурузных рылец // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. – СПб., 2005. – С. 764-766.
95. Ногаре, С.Д. Газо-жидкостная хроматография. Теория и практика (пер. с англ.). / С.Д. Ногаре, Р.С. Джувет – Л.: Недра. – 1996. – 420 с.
96. Носенко, М.А. Подбор лекарственных трав для конструирования косметического противовоспалительного средства / М.А. Носенко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Материалы 58-й межрегиональной конференции по фармации и фармакологии. – Пятигорск, 2003. – С. 343-346.
97. Носов, А.М. Лекарственные растения / А.М. Носов. – М.: ООО «Издательство «Эксмо», 2004. – 350 с.
98. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Николаева Г.Г., Маркарян А.А. Методика количественного определения суммарного содержания органических кислот в растительном мире // Растительные ресурсы, 2004. – Вып.3. – С. 112-117.
99. Олешко, Г.И. К рациональному использованию листьев земляники и цветков ноготков / Г.И. Олешко, О.В. Петухова, И.В. Крапивина, В.Ф. Левинова // Человек и лекарство: Тез. докл. X Рос. нац. конгр., Москва, 2003 г. - М., 2003. – С. 643.
100. Олешко, Г.И. Перспективы использования лекарственных средств календулы лекарственной и земляники лесной / Г.И. Олешко, Г.А. Иванова, И.В. Крапивина, В.Ф. Левинова, О.В. Петухова // Человек и лекарство: Тез. докл. XI Рос. нац. конгр., Москва, 2004 г. - М., 2004. – С. 672.
101. Омельчук, М.А. Календула лекарственная – источник сырья для новых лекарственных препаратов / М.А. Омельчук / Современные методы исследования лекарственных растений: Научные труды. Т. XX. – М., 1983. – С.188-192.

102. Орловская Т.В., Ушакова Л.С., Маринина Т.Ф. Изучение плодов календулы лекарственной с целью создания лекарственных средств // Современные проблемы науки и образования. – 2013. № 4. С.343.
103. Пастушенков, Л.В., Лесиовская, Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии / Л.В. Пастушенков, Е.Е. Лесиовская // - Ч. I, II. – С.-Пб.: СПХФИ, 1995.
104. Патент на ПМ 115651 Рос. Федерация №2011138631/13. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Зайцева Е.Н.[и др.]; заявл. 20.09.11; опубл. 10.05.12 // Изобретения. Полезные модели. – 2012; 13: 2 с.
105. Потанина, О.Г. Совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него на основе микроскопического метода исследования: дисс. ...д.фармац.наук: 15.00.02/ Потанина Ольга Георгиевна. – М., 2004. – 424 с.
106. Просовский, М.А. Перспективы использования сырья календулы после получения настойки / М.А. Просовский, Г.И. Олешко, И.В. Крапивина и др. // Перспективы использования естественных наук в высшей школе: Тр. междунар. науч. конф. – Пермь, 2001. – Т.4. – С. 194-198.
107. Прохорова, Л.В. Разработка фармакопейных статей на препараты календулы цветки и календулы настойка / Л.В. Прохорова, Н.П. Антонова, Е.И. Богданова, Л.И. Замараева // Человек и лекарство: Тез. докл. XI Рос. нац. конгр., Москва, 2004 г. – М., 2004. – С.890-891.
108. Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. Е.Н. Вергейчика, Н.Н. Каревой // Пятигорская ГФА, С.-Пб. ГХФА. – Пятигорск, 2007. – С. 207-208.
109. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. — Л.: Наука, Т. 1—7, 1987—1993.
110. Реестр лекарственных средств в России, 7-е изд., перераб. и доп./ Под ред. Крылова Ю.Ф., Вышковского Г.Л. – М.: РЛС, 2000. – 1400 с.

111. Сампиев, А.М. К вопросу о действующих веществах и проблеме стандартизации препаратов календулы лекарственной / И.А. Сампиев // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы IV Международного съезда, Великий Новгород, 29 июня – 1 июля, 2000 г. – 2000. – С. 310-313.
112. Сампиев А.М. Календула лекарственная / А.М. Сампиев, М.Р. Хочава. – Краснодар: Советская Кубань, 2010. – 143 с.
113. Сампиев А.М., Дзаурова М.М., Хочава М.Р. О содержании тритерпеновых гликозидов в препаратах календулы // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы IV Международного съезда. – СПб., 2002. – С. 310-313.
114. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 1. – 192 с.
115. Сахаров В.В. Селекция и культура ноготков аптечных (*Calendula officinalis* L.) // Генетические механизмы селекции и эволюции. – М.: Наука, 1986. – С. 15-17.
116. Северцева, О.В. Изучение каротиноидов бархатца крупноцветкового (*Tagetes erecta*) и календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / О.В. Северцева // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы IV Международного съезда, Великий Новгород, 29 июня – 1 июля, 2000 г. – 2000. – С. 318-320.
117. Слуева, Е.К. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке календулы / Е.К. Слуева, Е.Н. Жукович, Л.А. Шарикова, Т.Ф. Прибыткова, Е.Б. Деревщикова // Фармация. – 2003.-Т.51, № 1. – С. 13-15.
118. Смирнова, Л.П. Особенности применения стандартного образца рутина в анализе растительного сырья, витаминных и фитопрепаратов / Л.П. Смирнова, С.С. Николаева, В.А. Быков, Л.В. Яковлева и др. // Химико-фармацевтический журнал - 2000. Т. 34. № 1. С. 29-31.
119. Смирнова, Л. Календула, или ноготки лекарственные, - золотой ключ к долголетию / Авт.- сост. Л. Смирнова. – М.: АСТ; Мн.: Харвест, 2005. – 64 с.

120. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Рук. для врачей. / С.Я. Соколов. – М.: Медицинское информационное агенство, 2000. – С. 224-228.
121. Соколов, С.Я. Сравнительное исследование стимулирующих свойств некоторых фенилпропаноидов / С.Я. Соколов, В.П. Бойко, В.А. Куркин // Хим. - фармац. журнал. - 1990. - Т. 24, № 10. - С. 66-68.
122. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия): Справ. / Сост.: С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Медицина, 1988. – 463 с.
123. Тахтаджан, А.Л. Жизнь растений. Цветковые растения / А.Л. Тахтаджан, Ан. А. Федоров. – М.: Просвещение, 1981. – Т. 5. - Ч. 2. – С. 468-469.
124. Тумаков, С.А. Хроматография на бумаге и в тонком слое. Теория и практика. Учеб. пособие для студентов, врачей и фармацевтов / С.А. Тумаков, Р.А. Тимирбулатов, В.Я. Кириллова. – Самара, СамГМУ, 1999. – 70 с.
125. Фадеева, О.В. Исследование некоторых представителей семейства Астровых (сложноцветных) на содержание флавоноидов / О.В. Фадеева // III Всесоюзный съезд фармацевтов: Тез. докл., Кишенев, 14-17 окт. 1980г. – Кишенев «Тимпул», 1980. – С. 194-195.
126. Фармакогнозия. Атлас. Учеб. пособие для студентов фармацевт. ин-тов и фармацевт. фак-тов мед. ин-тов / Е.Я. Ладыгина, Н.И. Гринкевич, И.А. Самылина и др.; Под ред. Н.И. Гринкевич., Е.Я. Ладыгиной. – М.: Медицина, 1989. – 511 с.: ил. – (Учеб. лит. для студентов мед. ин-тов Фармацевт. фак-т).
127. Федоров, А.А. Атлас по описанию и морфологии высших растений. Соцветие / А.А. Федоров, З.Т. Артюшенко. – С.-Пб.: Наука, 1979. – 296 с.
128. Фитотерапия с основами клинической фармакологии: Справ. / Под ред. В.Г. Кукеса. – М.: Медицина, 1999. – 192 с.
129. Флора СССР / Под ред. В.Л. Комарова. – Москва-Ленинград: Издательство академии наук СССР, 1961. – Т. 26. – С. 857-860.
130. ФСП 42-02061363-01. Календулы настойка / Фармакопейный государственный комитет. – Введ. 27.06.01 до 27.06.06. – 6 с.

131. Хакимова, Д.Р. Унификация методов стандартизации флавоноидов в процессе производства препаратов боярышника, зверобоя и календулы: Автореф. дис. канд. фарм. наук / Д.Р. Хакимова. – Москва, 1994. – 24 с.
132. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). В 2 кн. Кн. 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа: Учебник для вузов. – М.: Высш. Шк., 2001. – 559 с.: ил.
133. Хусаинова А.И. Фармакогностическое исследование цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.): дис. фарм. наук: 14.04.02 / Хусаинова Алия Ильясовна. – Самара, 2015. – 206 с.
134. Чакчир, О.Б. Исследование влияния ионизирующей радиации на противовоспалительную активность цветков календулы и настоя из них / О.Б. Чакчир, Е.Е. Лесиовская, Е.И. Саканян, Т.С. Потехина // VIII Международный съезд «Актуальные проблемы создания лекарственных препаратов природного происхождения» ФИТОФАРМ, Миккели, 21-23 июня Финляндия, 2004г. – Миккели, 2004. С. 180-181.
135. Чернобаева, М.Г. Адсорбционная и ингибирующая активность календулы и фурацилина на полисорбе в отношении микрофлоры ротовой полости / М.Г. Чернобай // Актуальные вопросы клинической стоматологии – 1997. – С. 16-17.
136. Чушенко В.Н., Жуев Г.А., Карамова О.Е. и др. Углеводы соцветий *Calendula officinalis* // Химия природных соединений. -1988. - №4. – С. 585-586.
137. Шарова, О.В. Фитохимическое исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе календулы лекарственной: автореф. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Шарова Ольга Владимировна. – Самара, 2007. – 44 с.
138. Энциклопедия лекарственных растений. Пер. с немец. / Предисл. И.А. Губанова. – М., Мир, 1998. – С. 209-210.

139. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: Учеб. пособие / Под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – С.-Пб.: Спец. лит., 1999. – 407 с.
140. Abbasi, A.M. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables / A.M. Abbasi, M.H. Shah, Tong Li, X. Fu, X. Guo, R.H. Liu // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2015. – Vol. 162. – P. 333-345.
141. Adler G., Kasprzyk Z. Free sterol, steryl ester, glycosides, acylated glucosides and water-soluble complexes in *Calendula officinalis* // *Phytochemistry*, 1976. – Vol. 15. – P. 205-207.
142. American Herbal Pharmacopeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines / edited by: Roy Upton ... [et al.], 2011.
143. Antunes-Ricardo M., Gutierrez-Uribe, Martinez-Vitela, Serna-Saldivar S. Topical anti-inflammatory effects of isorhamnetin glycosides isolated from *Opuntia ficus-indica* // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-9.
144. Auguscinska E., Szakiel A., Willkomiski B., Kasprzyk Z. The metabolism of [3-³H] oleanolic acid glucosides isolated from *Calendula officinalis* // *Phytochemistry*, 1985. – Vol. 24. – P. 1713-1715.
145. Bako E., Deli J., Gyula T. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products // *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2002. – Vol.53. – P. 241-250.
146. Balza F., Towers G.H.W., *Phytochemistry*, 1984. - Vol. 23, № 10. - P. 2333.
147. Bauer, R., Wagner H. *Echinacea: Handbuch für Ärzte Apotheker und andere Naturwissenschaftler*.-Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1990. - 182 s.
148. Brasseur, T. Propriétés antiinflammatoires de flavonoïdes / T. Brasseur // *I. Pharm. Belg.*- 1989.- Vol. 44, № 3. - P. 235-241.

149. Chemli, R. et al. Arvenoside A and B, triterpenoid saponins from *Calendula arvensis* / R. Chemli, A. Badadjamian, R. Faure, K. Boukef, G. Balansard, E. Vidal // *Phytochemistry*. 1987. - Vol. 26, №6. P. 1785-1786.
150. Chemli, R., et al. Etude des acides amines de *Calendula arvensis* eu arvensis Maire / R. Chemli, K. Boukef, G. Balansard, A. Gayte-Sorbier // *Plant. med. phytother.* 1986. T. 20, №3. P. 203-209.
151. Cholc V.S A Simple Assembly for Rapid Measurements of R, in Paper t Chromatography - Biochemical Educaiiion (IUB) - Pergamon Press. Oxford, UK t - 1982, V. 10, 1. p 26-26.
152. Ciborowski P., Willkomiski B., Zdrojewski W., Kasprzyk Z. // *Phytochemistry*, 1983. – Vol. 22. – P. 107-109.
153. Cromack H., Smith J., Morton K. Weed control in new industrial oilseed species / The 1997 Brighton corp. protecctons conference. Brighton: BCPC, 1997. – P. 845-850.
154. Danzer, K. Three- and higher-dimensional calibration in analytical chemistry: Abstr. 14 th Semin. Atom. Spectrochem., Hightatras-Podbanske, Sept. 7-11, 1998 / K. Danzer // *ISP Inf. Newslett.* -1999.- Vol. 24, №8. - P. 642.
155. Dean P D G, Johnson W S, Middle F A , Ed Affinity Chromalography i. A Practical Approach - IRL Press. Oxford, England 1985. – 215 p.
156. Dudek, G. A spectrophotometric method for planr pigments determination and herb classification / G. Dudek, A. Strzelewicz, M. Krasowska, A. Rybak, R. Turzyn // *Chemical Papers*. 2014. No. 68 (5). – P. 579-583.
157. Elgindi M., Abd alkhaliq S., Melek F., Hassan M., Abdelaziz H. Saponins isolared from *Polyscias guilfoylei* F. Araliaceae. // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2015. – Vol. 6(3). – P. 545-549.
158. Ellis, B.E. Natural products from plant tissue culture / B.E. Ellis // *Phytochemistry*. - 1988. - Vol. 5, N. 9. - P. 581-612.

159. European Pharmacopoeia / European Directorate for the quality of medicines and healthcare. – 6-th edition, Supplement 6.5. – Council of Europe, Strasbourg, 2008.
160. European Pharmacopoeia, Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 3rd ed., Strasbourg: Council of Europe. - 1999.
161. German Homoeopathic Pharmacopoeia, 5th supplement / British homoeopathic association. – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1993. – 401 p.
162. Flavonoid and antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes / F. Saija, M. Scalese, M. Lanza et al. // Free Radical Biol.Med.- 1995.- Vol. 19, № 4.- P. 481-486.
163. Forgacs E., Cserhati T. Molecular Bases of Chromatographic Separation. - Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. – 1997. - 288 p.
164. Gaspar, G. Chromatographie in phase gazeuse. Pasymentir de de pin n'est pas une fatalite /G. Gaspar // Spectra anal. - 1997.- Vol.26, № 199. -P.36-37.
165. Gedeon J., Mayer M. Uber die Verteilung des Oleanolsaureglycosiden und uber den Bitterstoff in der Ringelblume (*Calendula officinalis* L.) // Die Pharmazie, 1954. – Vol. 11. – S. 922-923.
166. Geisman, T.A. The chemistry of flavonoid compounds / T.A. Geisman.- Oxford; London; New-York; Paris, 1962.- 666 p.
167. Godwin T. Studies in carotogenesis. The carotenoids of flower petals of *Calendula officinalis* // Biochem J., 1954, Vol. 58, P. 90-94.
168. Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action / E.Haslam // J. Nat. Prod. - 1996. – 59. – P. 205-215.
169. Hartwell, J.L. Plants used against cancer // Lloidia. 1968. Vol. 31, N 2. P. 71-170.
170. Hoppe, H.A. Drogenkunde. Bd 1-1. Berlin; New York, 1975. Bd 1. 1311 S.
171. Janiszowska M. Intracellular localization of tocopherol biosynthesis in *Calendula officinalis* // Phytochemistry, 1987. – Vol. 26. – P. 1403-1407.
172. Karrer, W. Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe. - Basel-Boston-Stuttgart: Birkhauser Verlag, 1985.- Ergantung 2.- Teil 2.- 2328 s.

173. Kasprzyk Z., Janiszowska M., Sobzyk A. Metabolism of new series of oleanolic acid glycosides in *Calendula officinalis* roots // *Acta Biochim. Pol.*, 1973. – Vol. 20. – P. 231-235.
174. Kasprzyk Z., Sliwowski J., Skwarko B. Metabolism of triterpenoids in the seeds of *Calendula officinalis* germinating // *Phytochemistry*, 1972. – Vol. 11. – P. 1961-1966.
175. Kasprzyk Z., Pyrek J. Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* flowers // *Phytochemistry*, 1968. – Vol. 7. – P. 1631-1639.
176. Kasprzyk Z., Turowska G. Structure of sterol ester and of triterpenic monol ester from the flowers of *Calendula officinalis* // *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chem.*, 1969. – Vol. 17. – P. 397-398.
177. Kirchner, J.G. Eds. *Thin Layer Chromatography Techniques of Chemistry*, Vol XIV Part 1 - Techniques Part 2 / J.G. Kirchner, E.S Perry - Applications 2nd ed - Sigma Chemical. U.S.A. - 1990 – 1137 p.
178. Kuczkowiak U., Petereit F., Nahrstedt A. Hydroxycinnamic acid derivatives obtained from a commercial *Crataegus* extract and from authentic *Crataegus* spp. // *Scientia Pharmaceutica*, 2014. – Vol. 82. – P. 835-846.
179. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids: perspective biologically active compounds of medicinal plants / V.A. Kurkin // *Physical-chemical Basis of Plant Physiology: Abstracts of Annual Symposium*. - Pushchino, 1996. - P. 147.
180. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids as biologically active compounds and standards of the medicinal plants / V.A. Kurkin, V.N. Ezhkov, E.V. Avdeeva and all // *Polyphenols communications 2004*. – XXII International Conference on Polyphenols – Helsinki 2004. - P. 619-620.
181. Kurkin, V.A. Phytochemical and Pharmacological investigation of some medicinal plants containing flavonoids / V.A. Kurkin, A.N. Dubishchev, E.V. Avdeeva // *Polyphenols communications 2006*. – XXIV International Conference on Polyphenols – Winnipeg, Manitoba, Canada, 2006. – P. 513-514.
182. Kwon H.C., Lee K.R., Zee O.P. Cytotoxic constituents of *Pilea mognolica* // *Archives of Pharmacal Research*. – 1997. - Vol. 20, No. 2. – P. 180-183.

183. Mabry, T.J. The Systematic Identification of Flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas Springer Verlag: Berlin - Heidelberg - New York. - 1970. - 354 p.
184. Martens, S. Biochemical properties of dioxygenases involved in flavonoid biosynthesis in parsley: an evolutionary aspect / S. Martens and al. // XII International Conference on Polyphenols. – Helsinki, 2004. – P. 31-32.
185. Milborrow B., Swift I., Netting A. The stereochemistry of hydroxylatin of the carotenoid lutein in *Calendula officinalis* // Phytochemistry, 1982. – Vol. 21. P. 2853-2857.
186. Okuda, T. In Polyphenolic phenomena / T. Okuda // Scalbert, A., Ed., INRA Publications: Paris, 1993. – P. 221-235.
187. Poole, CF Chromatography today / CF Poole, SK Poole. Amsterdam: Elsevier Science – 1991.
188. Pinkas, M., Torck, M., Perrin E., Recherches sur la composition du Sonsides champs // C. r. Acad. sci. D. 1975. T. 281, N. 5-8. P. 447-450.
189. Prog Drug Res. 1997;48:147-71.: Izv Akad Nauk SSSR Biol. 1965 Sep-Oct;5:762-5.
190. Reed D., Savile C., Qui Xiao et al. Mechanism of 1,4-dehydrogenation catalyzed by a fatty acid (1,4)-desaturase of *Calendula officinalis* // Eur.j.Biochem, 2002. – V. 269. – P. 5024-5029.
191. Shakeri A., Ahmadian M. Phytochemical studies of Some Terpene compounds in roots of *Cynara scolymus* // International Journal of Farming and Allied Science. – 2014. - Vol. 3, No. 10. – P. 1065-1068.
192. Sheffer, J.J.C. De goudbloem (*Calendula officinalis*) als geneeskruid in verleden en heden. – «Pharmaceutisch week-blad», 1979, v. 114, №42, p. 1149-1157.
193. Sprecher, E. Modedrogen // Z. Phytotherapie. – 1990. – V. 11. - № 4. – P. 103-112.
194. Stevenson R. Some constituents of *Calendula officinalis* // J. org. Chem., 1961/ - Vol. 26. – P. 5228-5230

195. Sun, H.-Y. In vitro antibacterial activities of antibiotics and traditional Chinese medicinal herb extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / H.-Y. Sun, Z.-B. Li, W.-X. Liu, X.-Y. Wang, T.-J. Zhang, Z.-J. Feng // Asian Journal of Chemistry. – 2014. – Vol. 26. – Issue 1. – P. 298-302.
196. The Flavonoids / Ed. by J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry. - London: Chapman and Hall, 1975. - 1204 p.
197. The Flavonoids: Advances and Research / Ed. by J.B. Harborne, T.J. Mabry. - London: Chapman and Hall, 1982. - 744 p.
198. Thin-Layer Chromatography, general method 2.02.27.00. In: Eur. 4th ed. Strasbourg: Council of Europe. - 2002.
199. Touchstone J.C. Practice of Thin Layer Chromatography, 3rd Ed. - John Wiley & Sons, New York. U.S.A. - 1992 – 416 p.
200. Wagner H. Die DC- und HPLC-Analyse der Eleutherococcus Droge / H.Wagner, Y.H. Heuer, A. Obermeier et al. // Planta Medica. -1982. - Vol. 44, N. 2. - P. 193-198.
201. Wagner, H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag, 1993.- 522 s.
202. Wagner H., Blatt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg - New York, 1995. - 384 p.
203. Willum G., Westnaus R. Loliolide (calendin) from *Calendula officinalis* // Planta med., 1987. – Vol. 53. – P.304.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Микрофотоснимки Морфологических и анатомо-гистологических признаков плодов календулы лекарственной



Рисунок 1 – Полиморфизм плодов исследуемого вида календулы (x20).

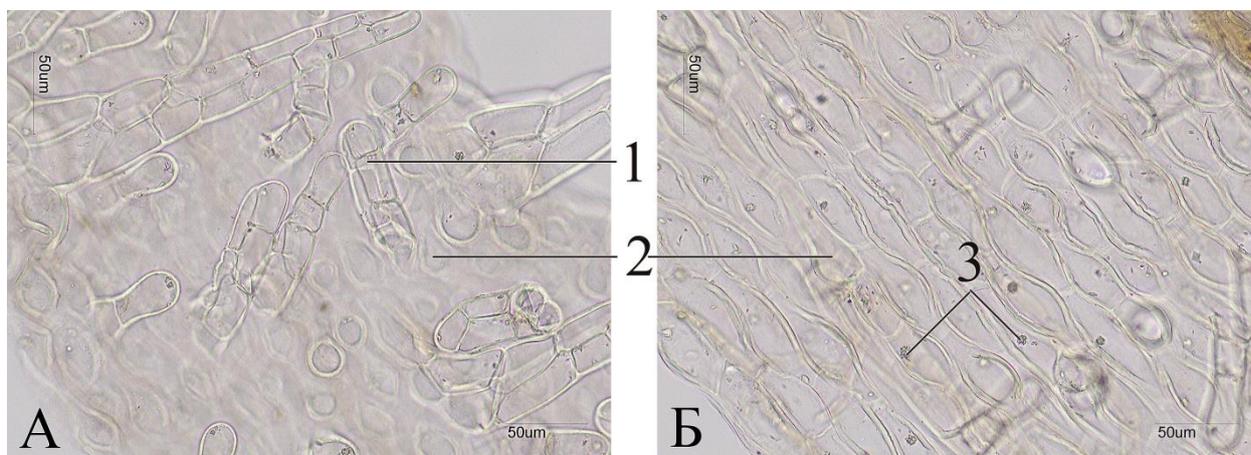


Рисунок 2 - Эпидермис плода календулы лекарственной. Продольный срез: А – Фрагмент эпидермиса , Б – Фрагмент эпидермиса.

Обозначения: 1 – многоклеточная трихома, 2 – клетки эпидермиса, 3 – друзы.

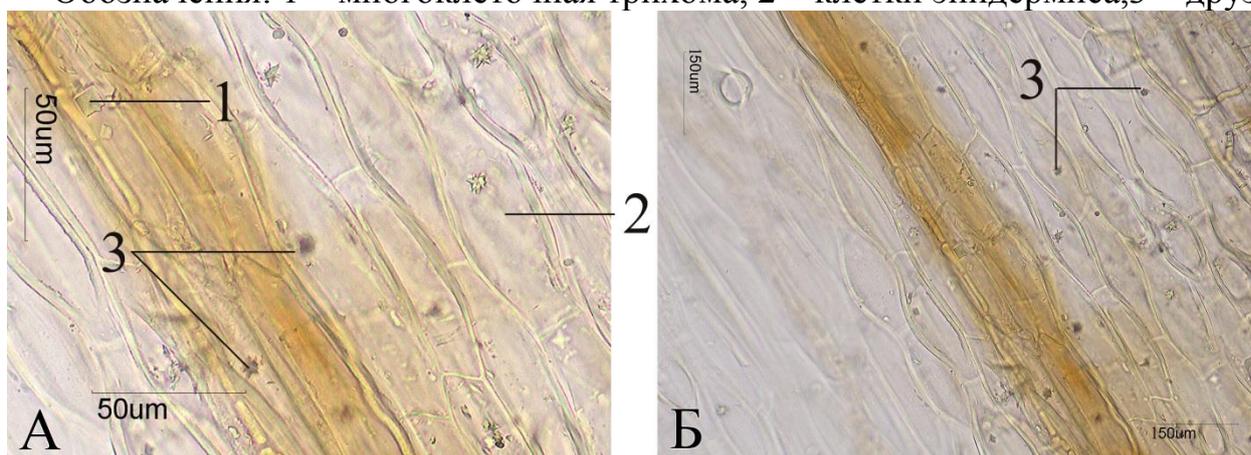


Рисунок 3 - Эпидермис нижней части плода календулы лекарственной группы №4. Продольный срез: А – Фрагмент эпидермиса (x400), Б – Фрагмент эпидермиса (x100).

Обозначения: 1 – сферический монокристалл, 2 – клетки эпидермиса, 3 – друзы.

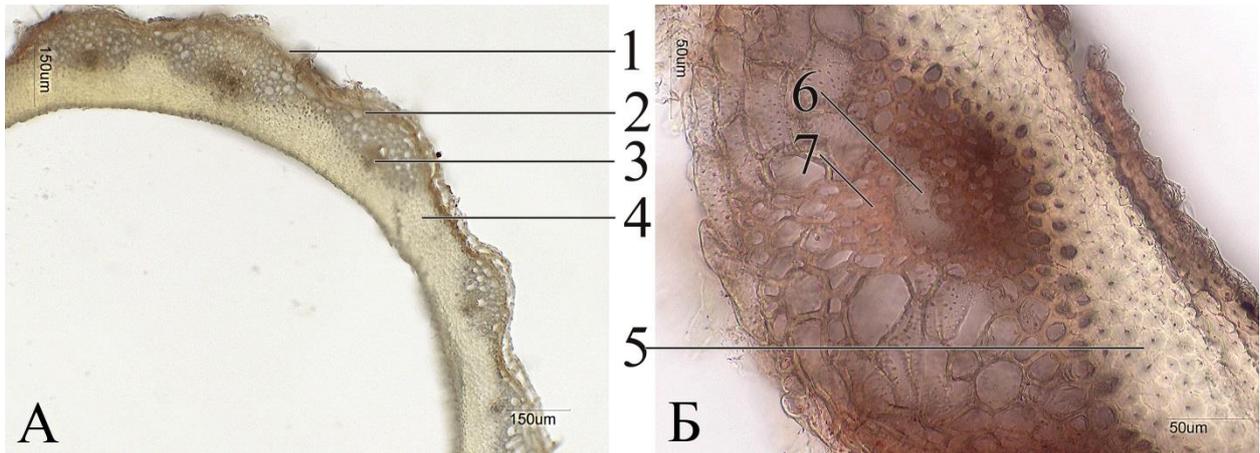


Рисунок 4 - Перикарпий плода календулы на поперечном срезе: А – Фрагмент плода (x100), Б – Фрагмент плода, окрашенный Суданом III (x400).
 Обозначения: 1 – эпидермис, 2 – основная паренхима, 3 – закрытый коллатеральный пучок, 4 – пояс склеренхимы, 5 – склеренхима, 6 – флоэма, 7 – ксилема.

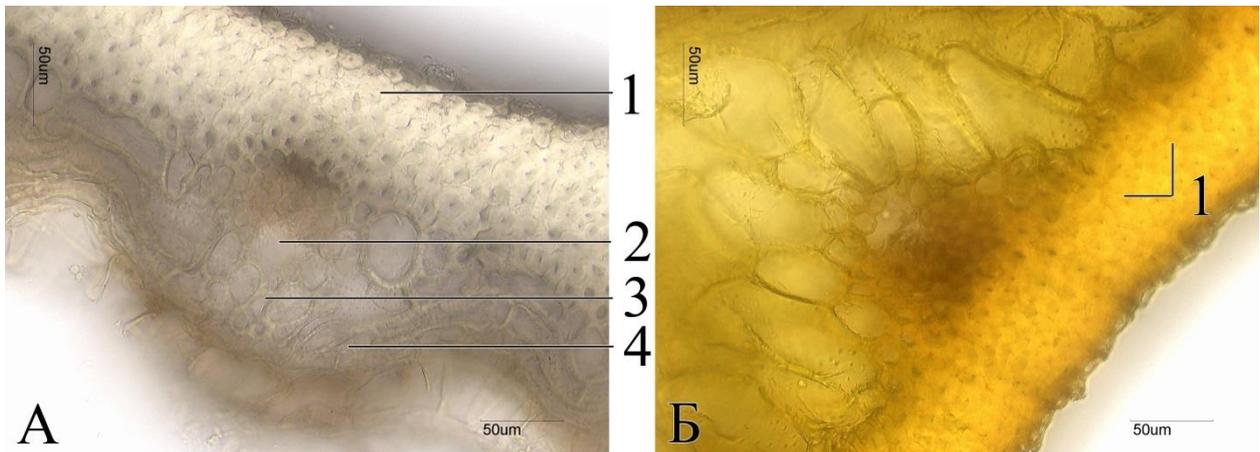


Рисунок 5 – Одревеснение клеточных стенок перикарпия. Поперечный срез: А – Фрагмент плода (x400), Б – Фрагмент плода (x400), окрашенный Серноокислым анилином.

Обозначения: 1 – склеренхима, 2 – ксилема, 3 – флоэма, 4 – основная паренхима.

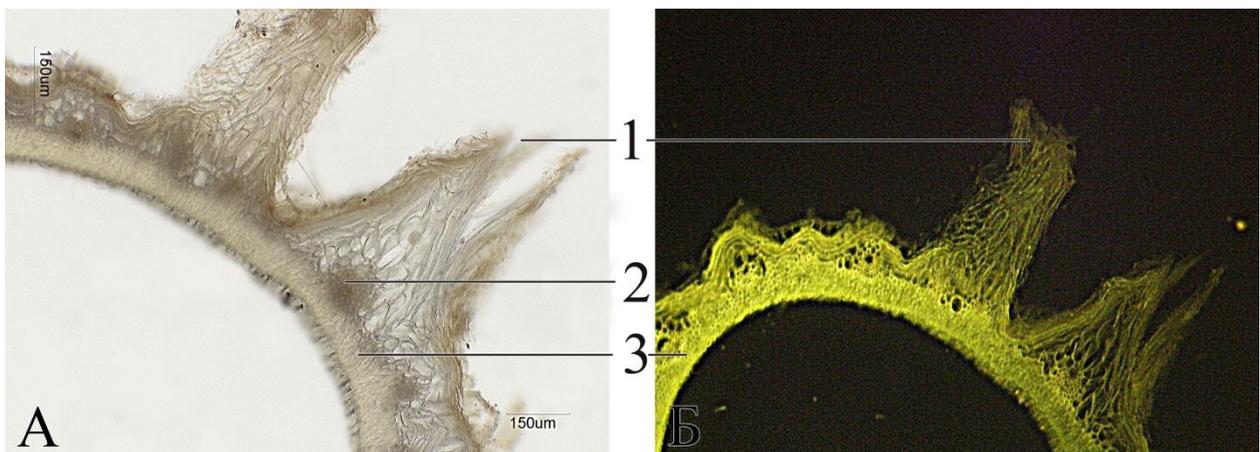


Рисунок 6 – Люминесценция перикарпия. Поперечный срез (x100):
 А – Фрагмент плода в видимом свете, Б – Фрагмент плода, при облучении.
 Обозначения: 1 – шипик, 2 – закрытый коллатеральный пучок, 3 – пояс склеренхимы.

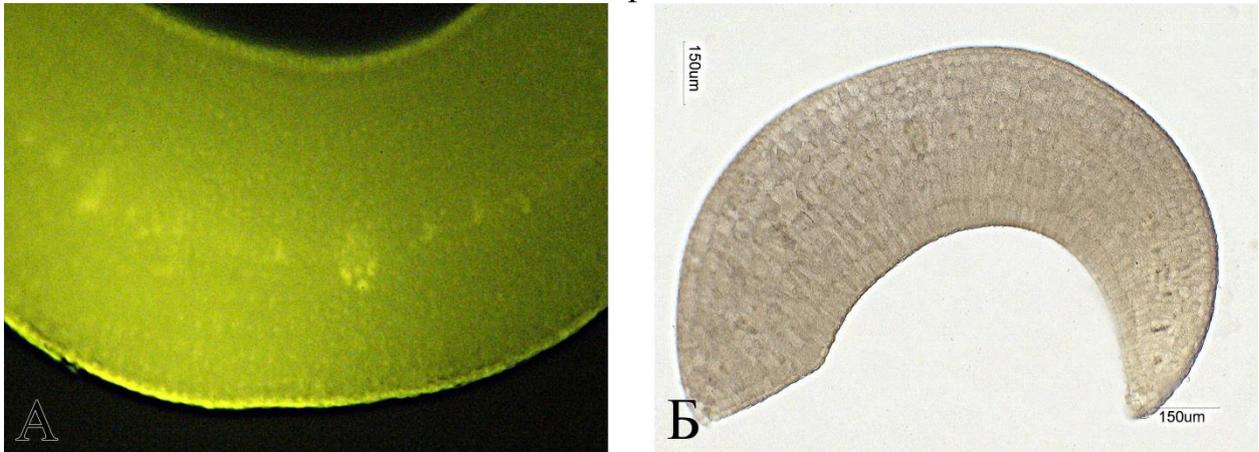


Рисунок 7 – Люминесценция зародыша. Продольный срез (x100): А – Фрагмент зародыша при облучении, Б – Фрагмент зародыша, в видимом свете.

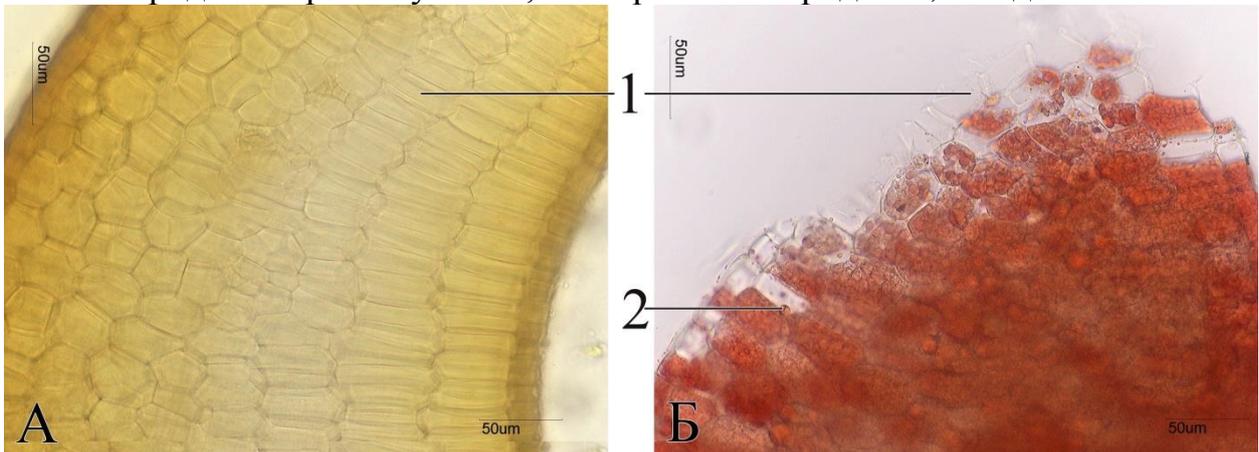


Рисунок 8 – Гистохимия зародыша. Поперечный срез (x400): А – Фрагмент зародыша, окрашенного раствором Люголя, Б – Фрагмент зародыша, окрашенного раствором Судана III.

Обозначения: 1 – клетки зародыша, 2 – Капли жирного масла.

«Утверждаю»

Генеральный директор
ЗАО «Самаралектравы» Н.Д. ЛУЖНОВ«02»  2016 г.

АКТ

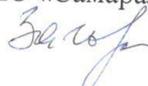
о внедрении результатов диссертационной работы Афанасьевой Полины Валериевны «Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загарянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Афанасьевой П.В., посвященного разработке методик получения и анализа настойки календулы лекарственной, а также изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья календулы лекарственной.

Разработанные методики качественного и количественного анализа цветков календулы лекарственной, а также настойки из данного лекарственного растительного сырья апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе календулы лекарственной.

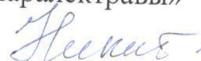
Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»



А.Н. ЗАГАРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»



А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская обл., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ

«Центр контроля качества

лекарственных средств

Самарской области»

Е.А. КАЛАБУХОВА

2016 г.

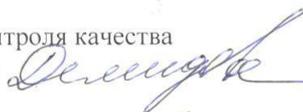
АКТ



о внедрении результатов диссертационной работы Афанасьевой Полины Валериевны «Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Демидовой Г.А., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Афанасьевой П.В., посвященного фармакогностическому изучению календулы лекарственной при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии ГСО рутин и раствора β -каротина. Методики определения подлинности сырья и препаратов календулы лекарственной, а также методики определения содержания суммы флавоноидов и содержания суммы каротиноидов воспроизводимы и удобны в работе. Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Афанасьевой П.В. будут способствовать повышению объективности стандартизации календулы лекарственной, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель руководителя ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Г.А. ДЕМИДОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Г.И. ВЛАСОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»  Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ШУКИН

«10» февраля 2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Афанасьевой Полины Валериевны «Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора В.А. Куркина, профессора, д.фарм.н. Е.В. Авдеевой, доцента, д.фарм.н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Афанасьевой П.В., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных препаратов на основе календулы лекарственной, содержащих флавоноиды и каротиноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют разработке методик диагностики и определению качества сырья календулы лекарственной и препаратов на его основе.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., профессор

 В.А. КУРКИН

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

 Е.В. АВДЕЕВА

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

 О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ЦУЖИН

«10» февраля 2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Афанасьевой Полины Валериевны «Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, д.б.н., профессора И.Ф. Шаталаева, доцента, к.фарм.н. А.В. Воронина, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Афанасьевой П.В., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов календулы лекарственной, содержащих флавоноиды и каротиноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды и каротиноиды. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе календулы лекарственной.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
д. б. н., профессор

И.Ф. ШАТАЛАЕВ

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. фарм .н.

А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. х. н.

С.Х. ШАРИПОВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ШУКИН

«10» февраля 2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Афанасьевой Полины Валериевны «Комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, к.фарм.н. И.К. Петрухиной, доцента, к.фарм.н. Е.П. Гладуновой, доцента, к.фарм.н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Афанасьевой П.В., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе календулы лекарственной, содержащих флавоноиды и каротиноиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований антимикробных, противовоспалительных и регенерирующих лекарственных препаратов. Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе календулы лекарственной и создания конкурентоспособных антимикробных, противовоспалительных и регенерирующих лекарственных средств, в том числе импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации,
к. фарм. н., доцент

И.К. ПЕТРУХИНА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
д. фарм. н.

Е.П. ГЛАДУНОВА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
к. фарм. н.

Е.Л. АБДУЛМАНОВА

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2556759

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СООТВЕТСТВИЯ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ ОДНОМУ И ТОМУ ЖЕ
КОМПОНЕНТУ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО
ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Самарский государственный университет" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014123333

Приоритет изобретения **06 июня 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **18 июня 2015 г.**

Срок действия патента истекает **06 июня 2034 г.**

*Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2599016

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
НАРЦИССИНА В ЦВЕТКАХ КАЛЕНДУЛЫ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015130963

Приоритет изобретения 24 июля 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 08 сентября 2016 г.

Срок действия патента истекает 24 июля 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», доктор фармацевтических наук, профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«___» _____ 20__ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ноготков лекарственных цветки

Взамен ФС.2.5.0030.15

Calendulae officinalis flores

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

Собранные в начале распускания трубчатых цветков и высушенные цветочные корзинки культивируемого однолетнего травянистого растения ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L., сем. астровых – *Asteraceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично осыпавшиеся корзинки диаметром до 5 см, без цветоносов или с остатками цветоносов длиной не более 3 см. Обертка серовато-зеленая, одно-, двухрядная; листочки ее линейные, заостренные, густоопушенные. Цветоложе слегка выпуклое, голое. Краевые цветки язычковые, длиной 15 – 28 мм, шириной 3 – 5 мм с изогнутой короткой опушенной трубкой, трехзубчатым отгибом, вдвое превышающим обертку, и 4 – 5 жилками. Цветки расположены в 2 – 3 ряда у немахровых и в 10 – 15 рядов у махровых форм. Пестик с изогнутой нижней одногнездной завязью, тонким столбиком и двухлопастным рыльцем. Срединные цветки трубчатые с пятизубчатым венчиком. Изредка встречаются недозрелые плоды и их кусочки различной формы.

Цвет краевых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко- или бледно-желтый; срединных – оранжевый, желтовато-коричневый или желтый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый и коричневый. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Измельченное сырье. Смесь кусочков цветоложа, язычковых, трубчатых цветков, листочков обертки и их фрагментов, цветоносов, изредка кусочков недозрелых плодов проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При просмотре под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки цветоложа голые, часто с сохранившимися остатками обертки по краю; язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, обычно с оборванным трубчатым основанием; трубчатые цветки пятизубчатые, часто нераскрывшиеся (в виде бутонов); густоопушенные листочки обертки серовато-зеленого цвета, узкие ланцетовидные с более светлой полосой по краю и слегка выступающей главной жилкой; цилиндрические кусочки цветоносов. Цвет язычковых цветков красновато-оранжевый, оранжевый, ярко-желтый или бледно-желтый; трубчатых цветков светло-желтый, желтый; листочков обертки серовато-зеленый; незрелых плодов – зеленый, серовато-зеленый, желтовато-зеленый, желтовато-коричневый

и коричневый; цветоложа – светло-серый, зеленовато- или коричневатого-серый; цветоносов – серовато-зеленый.

Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Порошок. Смесь частиц ноготков цветков проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны: кусочки краевых язычковых цветков ланцетной формы с длинным отгибом, оранжевого или желтого цвета, с 3 зубчиками, с изогнутой коротко опушенной трубкой; цельные длинные (3 – 5 мм) трубчатые цветки, преимущественно их части, пятизубчатые, оранжево-желтого или желтого цвета; фрагменты сероватого цветоложа, кусочки густоопушенной обертки зеленовато-серого цвета, с плотной темной срединной жилкой и пленчатым полупрозрачным краем, изредка кусочки плодов зеленого, серовато-зеленого, желтовато-зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета; кусочки серовато-зеленых цветоносов.

Цвет порошка зеленовато-желтый с вкраплениями серовато-зеленого, красновато-оранжевого, оранжевого, светло-желтого, зеленого, желтовато-коричневого и коричневого цвета. Запах слабый. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

Микроскопические признаки. *Цельное, измельченное сырье.* При рассмотрении микропрепарата язычковых цветков с поверхности должны быть видны удлиненные клетки эпидермиса с оранжевыми округлыми хромопластами и покрыты ярко выраженной кутикулой; с хорошо заметными мелкими друзами оксалата кальция в мезофилле цветка; на зубчиках эпидермис с сосочками, иногда с устьицами; трубка венчика густо опушена одно-, двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклой стороны железистыми, по краям вогнутой стороны - простыми двухрядными волосками; фрагменты цветоложа с головчатыми волосками, их обломками или местами их прикрепления в виде 2

базальных тонкостенных клеток восьмеркообразной формы. Головка железистых волосков состоит из 2, 4 или 8 клеток. Эпидермис трубчатых цветков такой же, как у язычковых, но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками; нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-, двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками. Складчатость кутикулы, обычно маскируемая хромопластами, просматривается только на отдельных участках. Пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырепорная. Эпидермис листочков обертки по краю представлен удлиненными клетками с прямыми стенками, в средней части - извилистыми стенками и устьицами, устьица аномоцитного типа; листочки обертки густо опушены: по краю – длинными одно-, двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части – только железистыми волосками.

Порошок. При рассмотрении порошка должны быть видны: фрагменты эпидермиса язычковых и трубчатых цветков с удлиненными клетками и оранжевыми округлыми хромопластами; отдельные железистые волоски с двух-, четырех- или восьмиклеточной головкой и одно-, реже двухрядные простые волоски или их обломки; фрагменты тычиночных нитей, состоящих из почти квадратных клеток с утолщенными стенками; фрагменты эпидермиса густоопушенных листочков обертки с прямыми или извилистыми стенками с устьицами и длинными одно-, двухрядными железистыми, простыми и ветвистыми волосками; мелкие друзы оксалата кальция в мезофилле; пыльца округлая и округло-трех-, четырехгранная шиповатая трех-четырепорная.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) нарциссина. Около 0,005 г нарциссина растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г рутина (рутина тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО β-каротина. 1 мл облепихового масла растворяют в 10 мл хлороформа.

Диазобензолсульфокислоты раствора. 0,01 г диазобензолсульфокислоты растворяют в 10 мл 10 % раствора натрия карбоната. Раствор используют свежеприготовленным.

Фосфорновольфрамовой кислоты раствора 10% в 95 % этиловом спирте. 0,3 г фосфорновольфрамовой кислоты растворяют в 0,8 мл разведенной хлористоводородной кислоты и разбавляют спиртом этиловым 95% до 10 мл.

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в термостойкую коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 70% этилового спирта и нагревают с обратным холодильником при умеренном кипении на электроплитке с закрытой спиралью в течение 15 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой.

На линию старта пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» микропипеткой наносят 0,02 мл извлечения и рядом 0,01 мл 0,05% раствора ГСО рутина в 95% спирте и 0,006 мл 10% раствора РСО облепихового масла (раствор β-каротина) в хлороформе. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, которую предварительно насыщают не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ – этанол – вода 26:16:3, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей проходит около 13 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в видимом свете. При просмотре хроматограммы в УФ-свете при длине волны 254 нм обнаруживается доминирующее пятно с фиолетовой флуоресценцией; величина R_f около 0,5 (нарциссин). На хроматограмме извлечения возможно обнаружение также других веществ – изокверцитрина (пятно с фиолетовой флуоресценцией), а также β-каротин с величиной R_f около 0,9 (пятно желтого цвета).

При проявлении хроматограммы извлечений свежеприготовленным щелочным раствором диазобензолсульфокислоты обнаруживается доминирующее пятно желто-оранжевого цвета с R_f около 0,5 (3-О-рутинозид изорамнетина). Это вещество по отношению к пятну ГСО рутина имеет значение R_s около 1,1. Кроме того, в этих условиях обнаруживается второе менее интенсивное пятно желтого цвета ($R_f=0,6$), которое, предположительно, соответствует изокверцитрину.

Затем хроматограмму проявляли 1% спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты (нагревание при 100-105°C). При этом пятно β -каротина (с R_f около 0,9) приобретает розоватое окрашивание и наблюдается появление пятна с R_f около 0,85 (олеаноловая кислота и β -ситостерин), а также пятен с R_f около 0,2 и 0,3 (тритерпеновые сапонины), имеющие величину R_s относительно рутина 0,5 и 0,8.

2. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья, с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в термостойкую коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл 95 % спирта и нагревают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 15 мин. Затем извлечение охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр. К 1 мл полученного извлечения прибавляют цинк металлический (1 таблетка) или 0,1 г порошка магния, после прибавляют 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты; постепенно появляется розовато - красное окрашивание (флавоноиды).
3. Ультрафиолетовый спектр раствора Б, приготовленный для количественного определения, должен иметь полосы поглощения с максимумом при 256 нм и «плечом» в области 330-350нм.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 14 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 11 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Остатки цветоносов, в том числе отделенные от корзинок при анализе. *Цельное сырье* – не более 6 %.

Корзинки с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обертками). *Цельное сырье* – не более 20 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Другие части растения (кусочки стеблей, листьев). *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 1 %; суммы каротиноидов в пересчете β -каротин – не менее 30мг%, содержание нарциссина – не менее 0,5%, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 %, – не менее 35 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 35 %.

а) Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в термостойкую коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, приливают 30 мл спирта 70% и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивают, доводят ее содержимое спиртом 70% до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

Содержимое колбы тщательно перемешивают (испытуемый раствор А). 1 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% раствора хлорида алюминия в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки (испытуемый раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл испытуемого раствора А, доведенного до метки 95% этиловым спиртом в мерной колбе, вместимостью 25 мл (раствор сравнения Б). измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 412 нм.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 412 нм через 40 мин после приготовления всех растворов.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * 30 * 25 * 100}{240 * m * 1 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

240 – удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$ рутина при длине волны 412 нм.

б) Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья (пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, приливают 40 мл гексана и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу с содержимым оставляют на экстракцию в течение 2ч, при постоянном перемешивании (комнатная температура). После проведения 2-х часовой экстракции колбу взвешивают, доводят ее содержимое гексаном до первоначальной массы, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой в мерную колбу вместимостью 25 мл.

Содержимое колбы тщательно перемешивают (испытуемый раствор) и доводят объем раствора гексаном до метки. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 450 нм. В качестве раствора сравнения используют гексан.

Примечание:

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 30 \times 25 \times 100 \times 1000}{2773 \times m \times 2 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

2773 – удельный показатель поглощения $E^{1\%}_{1\text{см}}$ β -каротина при длине волны 450 нм.

в) *Приготовление раствора*

Раствор СО 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. Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

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 месяца.

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья (пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм) 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 °С 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)» (250x2,0 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: метанол – буферный раствор – 10:90; с 10-ой мин: метанол – буферный раствор – 50:50; с 30-ой мин:

метанол – 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:

$$X = \frac{S \times m_i \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{S_i \times m \times V_o \times V_2 \times (100 - W)}$$

где: S – площадь пика нарциссина на хроматограмме испытуемого образца;

S_o – площадь пика на хроматограмме стандартного образца рутина;

m – навеска сырья, г;

m_o – масса ГСО рутина, г;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_o – объем раствора ГСО рутина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора ГСО рутина, мкл;

W – влажность сырья, %.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, экстрагенты – вода очищенная, спирт 70 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят для сырья, предназначенного для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); определение суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % проводят для сырья, предназначенного для производства настойки.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ректор ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
Академик РАН, лауреат
Государственной премии РФ и
дважды лауреат премии
Правительства РФ, заслуженный
деятель науки РФ, профессор

Г.П. Котельников
«___» _____ 2017 г.

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, доктор
фармацевтических наук, профессор

В.А. Куркин
«___» _____ 2017 г.

Доцент кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, доктор
фармацевтических наук, доцент

А.В. Куркина
«___» _____ 2017 г.

Очный аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

П.В. Афанасьева
«___» _____ 2017 г.