

## ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ЭКСТРАГЕНТОВ НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ КАЛЕНДУЛЫ ЦВЕТКОВ

ЛУКАШОВ Р.И.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск,  
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №5. – С. 109-123.

## THE INFLUENCE OF NATURE AND CONCENTRATION OF ORGANIC EXTRACTANTS ON FLAVONOIDS EXTRACTION FROM CALENDULA FLOWERS

LUKASHOU R.I.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(5):109-123.

---

### Резюме.

Цель работы – изучить влияние природы и концентрации (объемной доли) органических экстрагентов на извлечение флавоноидов из календулы цветков. Объектом исследования служили календулы цветки промышленной серии.

Материал и методы: высокоэффективная жидкостная хроматография. Перечень используемых в работе органических растворителей приведен ниже. Изучали следующие объемные доли этих растворителей: 20, 40, 60, 80 и 100%. Результаты. В статье представлены результаты изучения экстракции флавоноидов из календулы цветков метанолом, этанолом, пропанолом-1, ацетоном, диметилсульфоксидом и их водными растворами, а также водой, пропанолом-2, бутанолом-1, бутанолом-2, этилацетатом. В полученных извлечениях при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии обнаружены от одного до восьми флавоноидов, преобладали производные изорамнетина. Экстрагирующая способность абсолютных экстрагентов в отношении флавоноидов календулы цветков уменьшалась в ряду: вода > метанол > диметилсульфоксид > этанол > бутанол-1 > этилацетат > бутанол-2 > ацетон > пропанол-1 > пропанол-2. Экстрагирующая способность пропанола-1 и ацетона уступала их водным растворам. Экстрагирующая способность метанола, этанола и диметилсульфоксида сопоставима с их водными растворами. Диэлектрическая проницаемость, динамическая вязкость, температура кипения, объемные доли экстрагентов в растворах статистически значимо ( $p < 0,05$ ) влияли на площади хроматографических пиков флавоноидов. Наиболее критическим фактором являлась объемная доля этанола в растворе. Для дальнейшего количественного определения флавоноидов в календуле цветках, учитывая значительную экстрагирующую способность и хорошую воспроизводимость результатов количественного определения, рекомендовано использовать 60% ацетон. Заключение. Изучена изменчивость качественного и количественного состава извлечений из календулы цветков при экстракции различными экстрагентами.

*Ключевые слова:* календулы цветки, флавоноиды, органические экстрагенты и их объемные доли, 60% ацетон.

### Abstract.

Objectives. To study the influence of nature and concentration (volume proportions) of organic extractants on the extraction of flavonoids from calendula flowers.

Material and methods. The object of the study was calendula flowers of the industrial series. The method used in the investigation was high-performance liquid chromatography. The list of organic solvents used in the work is given below. The following volume proportions of these solvents were studied: 20, 40, 60, 80 and 100%.

Results. The results of the study of flavonoids extraction from calendula flowers with the use of methanol, ethanol, propanol-1, acetone, dimethylsulfoxide and their aqueous solutions, as well as water, propanol-2, butanol-1, butanol-2, ethyl acetate are presented in this article. From one to eight flavonoids were detected in the prepared extracts by the method

of high-performance liquid chromatography, isoramnatin derivatives predominated. The extracting ability of absolute extractants with regard to flavonoids of calendula flowers decreased in the series: water> methanol> dimethylsulfoxide> ethanol> butanol-1> ethyl acetate> butanol-2> acetone> propanol-1> propanol-2. The extracting ability of propanol-1 and acetone was lower compared with that of their aqueous solutions. The extracting ability of methanol, ethanol and dimethylsulfoxide was comparable with that of their aqueous solutions. Dielectric permeability, dynamic viscosity, boiling point, volume proportions of extractants in solutions statistically significantly ( $p<0,05$ ) influenced the area of chromatographic peaks of flavonoids. The most critical factor was the volume proportion of ethanol in the solution. It is recommended to use 60% acetone for further quantitative determination of flavonoids in calendula flowers taking into account the significant extractive capacity and good reproducibility of the quantitative determination results.

Conclusions. The variability of qualitative and quantitative composition of extracts from calendula flowers was studied during extraction by means of various extractants.

Key words: *calendula flowers, flavonoids, organic extractants and their volume proportions, 60% acetone.*

Календула лекарственная – однолетнее растение семейства астровые (*Asteraceae* Dumort.), широко используемое в современной медицине как источник получения лекарственных средств (ЛС) для наружного применения [1]. На современном фармацевтическом рынке Республики Беларусь представлены следующие ЛС и биологически активные добавки к пище на основе календулы цветков.

Мазь для наружного применения «Календула» в тубах по 25 г (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»). Код по анатомо-терапевтическо-химической классификации (АТХ): D03AX – прочие ЛС, способствующие заживлению ран. Оказывает местное противовоспалительное и антисептическое действие. Применяют в терапии ожогов первой степени, небольших поверхностных ран.

Календулы настойка 1 к 10 содержит не менее 65% этанола по 30 и 50 мл во флаконе или в полимерных бутылках с полиэтиленовой пробкой-капельницей и навинчивающейся пластмассовой крышкой (ООО «Тернофарм»; ООО «Житомирская фармацевтическая фабрика»; СОАО «Ферейн»; ЗАО «Брынциалов-А»/Научно-производственное унитарное предприятие «Диалек»; ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»; ЗАО «БелАсептика»). Код по АТХ: R02AA – препараты для лечения заболеваний горла. Антисептики. Оказывает антисептическое, противовоспалительное, ранозаживляющее действие. В форме полосканий применяют для комплексной терапии воспалительных заболеваний рта (стоматит, гингивит, пародонтит) и горла (тонзиллит), легких воспалительных процессов кожи и небольших поверхностных ран.

Ноготков (календулы) цветки – измельченное сырье 40 г в бумажном пакете в пачке или

крупный порошок по 1,2 г или 1,5 г в фильтр-пакетах № 20 в пачке (ООО «Падис`С», ООО «Фармгрупп»), измельченное или цельное сырье 50 г и 100 г в бумажном пакете в пачке (ООО «Калина», ЗАО «Парафарм», ООО «НПК Биотест», КСУП «Совхоз «Большое Можейково»). Применяют в форме водных извлечений по показаниям, аналогичным настое.ке.

Календула П – таблетки 250 мг № 100 (ООО «Парафарм»). Дополнительный источник витамина С и флавоноидов.

Календула Фиточай – измельченное сырье по 1,2 г в фильтр-пакетах № 20 в пачке (ООО «Витро Лайф») [2, 3].

Противовоспалительное, ранозаживляющее и антисептическое действие водных и этанольных извлечений из календулы цветков связывают с содержащимися в них флавоноидами, фенольными кислотами, сапонинами и каротиноидами [1].

В цветках календулы лекарственной содержится больше флавоноидов (4,4%), чем в листьях (0,45%) и семенах (0,11%) [4]. Среди флавоноидов календулы цветков выделяют две большие группы: производные изорамнетины и кверцетина. Среди производных изорамнетины преобладают тифанеозид и нарциссин, среди производных кверцетина – мангаслин и календофлавобиозид.

Стандартизацию календулы цветков проводят по суммарному содержанию флавоноидов двумя способами. Первый способ изложен в Европейской [5], Британской [6], Украинской [7] фармакопеех и Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) (первая методика) [8] и заключается в экстракции флавоноидов ацетоном с одновременным гидролизом гликозидов в присутствии *хлористоводородной кислоты Р* и *гексаметилентетрамина Р*. Из ацетоновых

вытяжек агликоны извлекают этилацетатом в присутствии воды *P* и фильтруют через *натрия сульфат безводный P*. Пересчет ведут на гиперозид (не менее 0,4%). Второй способ представлен в фармакопейной статье Российской Федерации [9] и ГФ РБ (вторая методика) [8] и заключается в экстракции флавоноидов водно-этанольными растворами. Пересчет ведут на рутин (не менее 1% или 0,6% соответственно). В обоих способах проводят реакцию флавоноидов с *алюминия хлоридом P* в *спирте P* с добавлением *раствора уксусной кислоты P*.

Авторы статьи [10] критически относятся к спектрофотометрическому определению флавоноидов календулы цветков, т.к. фенольные кислоты и другие соединения, содержащиеся в извлечениях, полученных из данного сырья, вносят вклад в светопоглощение испытуемых растворов, что приводит к завышенным результатам количественного определения флавоноидов. В ряде спектрофотометрических методик для устранения влияния фенольных кислот добавляют *уксусную кислоту P*, которая разрушает комплекс между фенольными кислотами и *алюминия хлоридом P*, и определение проводят против испытуемого раствора без добавления *алюминия хлорида P* [5-8]. Однако в этом случае анализ флавоноидов затруднителен, т.к. отсутствуют данные об удельном показателе поглощения стандартного образца нарциссина, который можно считать аналитическим маркером календулы цветков, с необходимой чистотой и установленным происхождением.

Для анализа фенольных соединений календулы цветков и ЛС на их основе предложена методика, сочетающая сорбцию фенольных соединений на полиамиде с последующим элюированием с него флавоноидов 96% этанолом и фенольных кислот раствором аммиака, и спектрофотометрический анализ полученных элюатов. В подобных методиках не учитывают поправку на неполное элюирование веществ с сорбента и их частичное связывание с ним [10].

Кащенко Н.И. и соавторы [11, 12] указывают на перспективность применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного определения флавоноидов календулы цветков. Трудность в использовании ВЭЖХ в данном случае заключается в необходимости использования дорогостоящих и труднодоступных стандартных образцов флавоноидов календулы (нарциссин, тифанеозид).

Нерешенной остается проблема пересчета суммарного содержания (массовой доли) на один флавоноид. Как правило, выбирают аналитический маркер, который содержится в сырье в значительном количестве или присутствует в нем как специфическое соединение, характерное только для этого вида сырья, или фармакологический (терапевтический) маркер, с которым связывают фармакологический (терапевтический) эффект. Для календулы цветков аналитическим маркером может служить нарциссин, однако в подавляющем большинстве методик пересчет ведут на гиперозид или рутин. Пересчет на гиперозид проводят в извлечениях после проведения гидролиза, в результате которого в них содержатся агликоны. Удельные показатели поглощения агликонов значительно отличаются от гликозидов (например, кверцетина от гиперозида). Использование в пересчетах рутина как более доступной замены нарциссину обосновано недостаточно, т.к. не приводятся сведения о степени близости удельных показателей поглощения рутина и нарциссина. Имеет место только указание на то, что их спектры поглощения близки друг другу [13-15] и результаты пересчета на нарциссин и рутин суммарного содержания флавоноидов сопоставимы при их спектрофотометрическом определении [10].

На наш взгляд, стандартизацию календулы цветков следует проводить по нативному комплексу флавоноидов, который должен незначительно изменяться при проведении экстракции. Поэтому стадии гидролиза и сорбции в таком случае должны отсутствовать, и остается немаловажным полнота экстракции и минимизация деструкции флавоноидов. В работе [16] предложено ввести коэффициенты пересчета на неполноту экстракции, что недопустимо в виду отсутствия сведений о составе таких извлечений. В частности, о составе и содержании в извлечениях, полученных при неполной экстракции, флавоноидов (в т.ч. минорных), обладающих фармакологическим действием.

Одним из факторов достижения полноты экстракции является правильный подбор экстрагента и его доли в водном растворе. В фармакопейных методиках в качестве экстрагентов для флавоноидов из календулы цветков применяют ацетон и водно-этанольные растворы. В литературных источниках приводятся также сведения об использовании других растворителей для извлечения флавоноидов из календулы цветков. В

русскоязычной литературе, как правило, экстракция проводится водно-этанольными растворами, в англоязычной – водно-метанольными.

Извлечение, полученное путем ультразвуковой экстракции 60% этанолом, с последующим анализом после стадии сорбции содержит от 9,8 до 25,4 мг/г флавоноидов и от 0,70 до 5,95 мг/г фенилпропаноидов [10].

Содержание флавоноидов, определенное методом ВЭЖХ, составляет от 10,52 до 46,87 мг/г и фенилпропаноидов – от 4,93 до 33,47 мг/г. Содержания индивидуальных компонентов составляют: 3-О-кофеилхинная (3,32 мг/г), кофейная (0,92 мг/г), 3,5-ди-О-кофеилхинная (1,16 мг/г), 1,5-ди-О-кофеилхинная (3,03 мг/г), 4,5-ди-О-кофеилхинная (1,02 мг/г) кислоты; производные изорамнетина: тифанеозид (42,46 мг/г), календофлавозид (6,43 мг/г), нарциссин (12,92 мг/г), изорамнетин-3-О-глюкозид (1,79 мг/г), календофлазид (0,33 мг/г) и изорамнетин-3-О-(6"-ацетил)-глюкозид (1,86 мг/г); производные кверцетина: мангаслин (12,62 мг/г), календофлавобиозид (10,12 мг/г), рутин (2,26 мг/г), изокверцитрин (0,66 мг/г), кверцетин-3-О-(2"-рамнозил)-рамнозид (0,60 мг/г) и кверцетин-3-О-(6"-ацетил)-глюкозид (0,49 мг/г) [12].

Водные извлечения содержат от 211,7 до 274,5 мкг/мл суммы фенилпропаноидов и от 446,3 до 580 мкг/мл суммы флавоноидов, из которых на производные изорамнетина приходится от 382,7 до 465 мкг/мл и на производные кверцетина – от 63,6 до 115,1 мкг/мл [11].

Содержание нарциссина в этанольных извлечениях при определении методом ВЭЖХ составляет от 0,57% до 0,72%, рутин – 0,21%, изокверцитрин – 0,06% и кверцетин – 0,04% [15].

Содержание флавоноидов при экстракции 70% этанолом в течение 10 мин при соотношении сырья и экстрагента 1 к 100 при нагревании на кипящей водяной бане с учетом поправки на неполноту экстракции составляет в среднем 1,73% [16].

Содержание флавоноидов при двукратной экстракции 70% этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1 к 50 и времени экстракции – 60 мин составляет в среднем 1,53% [17].

Содержание флавоноидов в извлечении, полученном при экстракции в ультразвуковом поле из навески 0,1 г 2,0 мл 70% этанола в течение 10 мин при 60°C, составляет 1,1% [18].

Содержание суммы фенольных соединений и суммы флавоноидов в извлечении, полученном при экстракции 70% метанолом, составляет 15,1 и

5,1 мг/кг соответственно. После концентрирования извлечения путем упаривания получают фракции обработкой этилацетатом, петролейным эфиром, хлороформом и бутанолом. Рутин обнаружен в этилацетатной, бутанольной и водной фракциях. Этилацетатная фракция содержит кумаровую, кофейную и хлорогеновую кислоты, водная – только хлорогеновую. Хлороформная и петролейная фракции не содержат фенольных соединений. Изорамнетин и нарциссин обнаружены в метанольной, этилацетатной, бутанольной и водной фракциях. В следующем ряду уменьшается антиоксидантная активность: этилацетат>н-бута-нол>метанол>вода>хлороформ>петролейный эфир [19].

Содержание фенольных соединений в извлечении, полученном при экстракции 70% метанолом при комнатной температуре, составляет 109,27 мг/г. Содержание галловой кислоты – 10,15 мг/г, изокверцитрин – 12,31 мг/г, рутин – 34,33 мг/г и изорамнетин-3-глюкозида – 8,86 мг/г [20].

Извлечение, полученное при экстракции 50% метанолом при 40°C, содержит гликозиды изорамнетина от 0,62% до 1,73% (изорамнетин-3-рамнозилрутинозид (от 0,37% до 0,83%); нарциссин (от 0,29% до 0,83%); изорамнетин-3-глюкозид (от 0,01% до 0,03%)) [21].

Наибольшее содержание фенольных соединений (около 150 мг/мл), в т.ч. флавоноидов (около 100 мг/мл), приходится на экстракцию 80% метанолом и 96% этанолом (в сравнение со 100% пропанолом-1 и 60% этанолом). Эти же извлечения проявляют максимальный антиоксидантный эффект [22].

Водно-этанольными и водно-метанольными растворами экстрагируется различное количество флавоноидов из календулы цветков. Полученные извлечения обладают различной антирадикальной активностью. Отсутствие систематизированных данных о влиянии природы и объемной доли экстрагентов на извлечение флавоноидов из календулы цветков обуславливает целесообразность проводимого исследования.

Целью настоящей статьи является изучение влияния природы и концентрации (объемной доли) органических экстрагентов на извлечение флавоноидов из календулы цветков.

## Материал и методы

Объектом исследования служили календулы цветки производства ООО «ПАДИС'С» (серия 47340316).

Для изучения выбраны следующие экстрагенты: метанол (ч.д.а.), этанол (ч.д.а.), пропанол-1 (ч.д.а.), ацетон (ч.д.а.), диметилсульфоксид (ч.д.а.) и их водные растворы с объемными долями 20, 40, 60 и 80%, вода *P*, бутанол-1 (ч.д.а.), пропанол-2 (х.ч.), бутанол-2 (х.ч.) и этилацетат (ч.д.а.). Данные экстрагенты отличались по полярности, вязкости, летучести, химическому строению и способности к отрыву протона. Для характеристики летучести использовали температуру кипения (°C): диметилсульфоксид – 189; бутанол-1 – 117,7; бутанол-2 – 100; вода – 100; пропанол-1 – 97; пропанол-2 – 82,4; этанол – 78,4; этилацетат – 77,1; метанол – 64,7 и ацетон – 56 [23].

Идентификацию и количественное определение флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, проводили с помощью ВЭЖХ.

Извлечения, полученные при экстракции различными объемными долями органических растворителей, анализировали на жидкостном хроматографе Agilent 1260 в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G5611A, диодно-матричным детектором G1315D, термостатом колонок G1316C, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G5667A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения осуществлялись с помощью программы Agilent OpenLAB.

Хроматографическое определение проводили в условиях, описанных в работе [24], а также воспроизводили условия, рекомендованные статьями [11, 12, 15].

Идентификацию флавоноидов осуществляли путем сопоставления коэффициентов удерживания и спектров поглощения веществ в исследуемых извлечениях со стандартными образцами флавоноидов; базой, которая включала хроматографические и спектральные характеристики 27 флавоноидных соединений: агликонов, моно- и дигликозидов [25], и литературными данными [11, 12, 15, 26, 27].

Параллельно с получением исследуемых извлечений готовили для инъектирования растворы стандартных образцов гиперозида, рутина и изокверцитрина.

Концентрации рутина и изокверцитрина в мкг/мл рассчитывали с помощью метода внешнего стандарта. Относительное содержание индивидуальных флавоноидов определяли методом внутренней нормализации. С учетом поправки на

массу навески календулы цветков пересчитывали площади хроматографических пиков тифанеозида, нарциссина и суммарную площадь хроматографических пиков, принадлежащих флавоноидам.

Статистическую обработку проводили при помощи компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007 (пакет «Анализ данных») и Statistica Advanced 10.0. Каждое испытание повторяли три раза ( $n=3$ ;  $P=0,95$ ). Результаты представляли в виде:  $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{x}}$ , где  $\bar{X}$  – среднее значение выборки;  $\Delta_{\bar{x}}$  – полуширина доверительного интервала средней величины.

Для оценки статистической значимости влияния природы и объемной доли используемых экстрагентов на извлечение флавоноидов из календулы цветков применяли дисперсионный анализ. Значения статистически значимо различались при  $p<0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В таблицах 1-6 представлены относительные содержания, площади хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков при экстракции изучаемыми экстрагентами и их водными растворами.

Из таблицы 1 видно, что максимальное суммарное значение площадей хроматографических пиков флавоноидов приходилось на экстракцию 20% метанолом. Дальнейшее увеличение объемной доли метанола в диапазоне: от 40% до 80% приводило к снижению суммарного значения. При росте объемной доли метанола от 80% до 100% наблюдали увеличение суммарного значения на 7,3% (отн.). Максимальную площадь хроматографического пика нарциссина наблюдали при экстракции 20% метанолом. При росте объемной доли метанола от 20% к 40% данное значение для нарциссина снижалось на 20% (отн.). Плато максимальной экстракции тифанеозида приходилось на 20% и 40% метанол. При росте объемной доли метанола от 40% к 60% площадь хроматографического пика тифанеозида снижалась на 27% (отн.). Максимальная концентрация изокверцитрина экстрагировалась 20% и 40% метанолом, рутина – 100% метанолом.

В полученных извлечениях обнаружены пять флавоноидов, относительное содержание которых изменялось не более чем  $\pm 6\%$  при разных объемных долях метанола. Максимум зна-

Таблица 1 – Зависимость относительного содержания, площадей хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от объемной доли метанола

Название флавоноида	Объемная доля метанола, %				
	20	40	60	80	100
Относительное содержание, %					
Тифанеозид	40±2	42±2	40±2	45±2	40±2
Рутин	1,4±0,3	1,5±0,2	1,6±0,2	1,5±0,2	4,4±0,3
Изокверцитрин	13±1	15±1	15±1	14±1	15±1
Нарциссин	41±2	37±1	37±1	35 ±1	37 ±2
Изорамнетин-3-глюкозид	4,8±0,3	5,2±0,5	6,2±0,5	4,2±0,5	4,6±0,4
Площадь хроматографического пика					
Тифанеозид	2376±15	2326±20	1829±10	1725±12	1625±19
Нарциссин	2415±16	2006±14	1706±23	1314±45	1525±43
Сумма	5949±35	5510±45	4602±46	3803±23	4117±29
Концентрация, мкг/мл					
Рутин	11±1	11±1	10±1	8±1	24±1
Изокверцитрин	31±1	34±1	30±2	23±1	25±1

Таблица 2 – Зависимость относительного содержания, площадей хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от объемной доли этанола

Название флавоноида	Объемная доля этанола, %					
	0	20	40	60	80	96
Относительное содержание, %						
Тифанеозид	25±1	28±2	26±1	27±2	28±2	28±1
Мангаслин	11±1	13±1	12±1	12±1	12±1	12±1
Рутин	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1
Флавоноид (1)	1,8±0,2	2,0±0,2	2,1±0,5	2,0±0,2	2,0±0,2	2,0±0,2
Изокверцитрин	11±1	12±1	11±1	11±2	13±1	11±1
Флавоноид (2)	1,8±0,2	1,7±0,3	7,8±0,3	1,7±0,6	2,0±0,2	1,5±0,1
Нарциссин	35±2	39±1	38±2	37±2	38±2	40±2
Изорамнетин-3-глюкозид	14±2	4,4±0,4	3,2±0,5	8,5±0,6	4,5±0,7	4,3±0,3
Площадь хроматографического пика						
Тифанеозид	1052±6	926±12	909±24	1038±32	963±10	972±16
Нарциссин	1464±10	1268±12	1316±11	1429±22	1334±14	1382±10
Сумма	4450±23	3285±23	3482±43	3864±43	3480±14	3462±23
Концентрация, мкг/мл						
Рутин	3,3±0,2	2,7±0,1	2,9±0,5	3,3±0,3	2,8±0,2	2,7±0,2
Изокверцитрин	20±1	16±1	16±1	19±1	18±1	16±1

чения суммы флавоноидов при экстракции 20% метанолом связан с более высоким относительным содержанием нарциссина по сравнению с экстракцией 40% метанолом.

Характер экстракции суммы флавоноидов в зависимости от объемной доли метанола опре-

делялся тифанеозидом и нарциссином.

Массовая доля суммы флавоноидов в пересчете на рутин при экстракции 60% метанолом составила в среднем 3,0%, что превышает аналогичный параметр, определенный в работах [19-21]. Массовая доля рутина и изокверцитрина со-

ставила в среднем 0,05% и 0,15% соответственно, что меньше в сравнении с данными работы [20]. Пересчет массовой доли суммы флавоноидов проводили на рутин в виду того, что в работе [10] показано, что между результатами пересчета суммарных содержаний флавоноидов календулы цветков на рутин и на нарциссин отсутствуют существенные отличия и стандартный образец рутин более доступен.

Наличие рутина, изокверцитрина, нарциссина и изорамнетин-3-глюкозида в извлечениях, полученных путем экстракции водно-метанольными растворами, подтверждено в работах [19-21].

Максимальное суммарное значение площадей хроматографических пиков флавоноидов приходилось на экстракцию 60% этанолом. Дальнейшее увеличение объемной доли этанола приводило к снижению суммарного значения. В диапазоне объемных долей этанола от 20% до 60% происходило увеличение суммарного значения. Наибольшие площади хроматографических пиков тифанеозида и нарциссина наблюдали при экстракции 60% этанолом. Максимальная концентрация изокверцитрина приходилась на экстракцию 60% и 80% этанолом. Концентрация рутина практически не зависела от объемной доли этанола. Максимум значения суммы флавоноидов также связан с большим относительным содержанием изорамнетин-3-глюкозида в извлечении, полученном при экстракции 60% этанолом, в сравнении с экстракцией 40% и 80% этанолом. При экстракции 40% этанолом наблюдали максимальное относительное содержание флавоноида 2. Относительное содержание остальных флавоноидов изменялось не более чем на  $\pm 3\%$  при разных объемных долях этанола.

Флавоноидный состав водного и этанольных извлечений схож и включал восемь соединений. При этом вода *P* извлекала на 16% (отн.) больше суммы флавоноидов, чем 60% этанол, что объяснялось большим относительным содержанием изорамнетин-3-глюкозида в водном извлечении в сравнении с извлечением, полученным при экстракции 60% этанолом.

Характер экстракции суммы флавоноидов в зависимости от объемной доли этанола преимущественно определялся нарциссином.

При пересчете на рутин массовая доля суммы флавоноидов при экстракции 60% этанолом составила в среднем 2,6%, что сопоставимо с результатами, полученными Кащенко Н.И. и соавторами с помощью спектрофотометрического

анализа с предварительной стадией сорбции и метода ВЭЖХ [10]. При экстракции 70% этанолом массовая доля суммы флавоноидов, установленная спектрофотометрическим методом по реакции с *алюминия хлоридом P*, с учетом неполной экстракции, оптимальных условий экстракции водно-этанольными смесями и экстракции в ультразвуковом поле [16-18] занижена в сравнении с аналогичными значениями, полученными нами. Массовая доля рутина и изокверцитрина составила в среднем 0,02% и 0,08% соответственно, что меньше, чем определенная в работе [15] при помощи метода ВЭЖХ. Концентрация флавоноидов в водном извлечении составила 593 мкг/мл, что сопоставимо с данными статьи [11].

Наличие идентифицированных флавоноидов в извлечениях, полученных путем экстракции *водой P* и водно-этанольными растворами, подтверждено в работах [11, 12].

Полученные в нашей работе значения массовых долей флавоноидов при экстракции водно-метанольными и водно-этанольными смесями из календулы цветков сопоставимы либо больше, чем приведенные в научной литературе. Это можно объяснить использованием разных сортов календулы лекарственной для проведения исследований и тем, что литературные методики использовали условия экстракции, которые не обеспечивали ее полноту (в частности, ультразвуковую экстракцию, нагревание в течение непродолжительного времени, при комнатной температуре, 40 и 60°C).

Из таблицы 3 видно, что максимальное суммарное значение площадей хроматографических пиков флавоноидов приходилось на экстракцию 20% пропанолом-1 (первый максимум экстракции). Второй максимум экстракции, который статистически значимо меньше на 43% (отн.) ( $p=0,04$  по *t*-критерию Стьюдента) по сравнению с первым, наблюдали при объемной доле пропанола-1 80%. Максимальная площадь хроматографического пика тифанеозида приходилась на экстракцию 20% и 80% пропанолом-1, нарциссина и изокверцитрина – 20% пропанолом-1, рутин – 60% пропанолом-1.

Наиболее разнообразным по флавоноидному составу оказалось извлечение, полученное путем экстракции 20% пропанолом-1 и включавшее в себя восемь соединений. Остальные извлечения содержали от двух до шести флавоноидов. Мангаслин, рутин, изокверцитрин и флавоноид 4 отсутствовали в извлечении, полученном при

Таблица 3 – Зависимость относительного содержания, площадей хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от объемной доли пропанола-1

Название флавоноида	Объемная доля пропанола-1, %				
	20	40	60	80	100
Относительное содержание, %					
Тифанеозид	43±2	38±2	53±2	54±2	58±3
Мангаслин	1,4±0,1	0,4±0,1	5,3±0,3	-	-
Рутин	12±1	13±1	6,7±0,5	-	-
Изокверцитрин	1,5±0,1	-	2,6±0,2	-	-
Нарциссин	34±1	42±2	28±1	45±1	42±4
Флавоноид 3	2,8±0,3	-	2,2±0,3	0,2±0,1	-
Флавоноид 4	0,7±0,1	-	-	-	-
Изорамнетин-3-глюкозид	5,4±0,5	6,5±0,4	2,5±0,3	1,0±0,2	-
Площадь хроматографического пика					
Тифанеозид	2859±33	1684±23	1319±25	2511±10	54±8
Нарциссин	2256±16	1837±18	700±18	940±12	39±8
Сумма	6715±45	4396±56	2487±34	4688±45	92±7
Концентрация, мкг/мл					
Рутин	13±1	2,1±0,1	17±1	-	-
Изокверцитрин	34±2	24±2	6,6±1,1	-	-

экстракции 80% пропанолом-1, по сравнению с экстракцией 20% пропанолом-1, что обуславливало более низкое значение суммы флавоноидов во втором максимуме экстракции.

Характер экстракции суммы флавоноидов в зависимости от объемной доли пропанола-1 преимущественно определялся тифанеозидом.

Максимальные площади хроматографических пиков тифанеозида, нарциссина и изокверцитрина (в отличие от рутина) наблюдались при практически одинаковых объемных долях метанола, этанола и пропанола-1. Метанол, этанол и пропанол-1 селективно экстрагировали тифанеозид, нарциссин, рутин и изокверцитрин, суммарное относительное содержание которых составило 95%, 80% и 100% соответственно, по сравнению с водой (71%), которая извлекала большее относительное содержание изорамнетин-3-глюкозида (14%).

Из таблицы 4 видно, что максимальное суммарное значение площадей хроматографических пиков флавоноидов приходилось на экстракцию 60% ацетоном (первый максимум экстракции). Дальнейшее увеличение объемной доли этого экстрагента приводило к снижению суммарного значения. Второй максимум экстракции, который на 11% (отн.) меньше по сравнению с пер-

вым, наблюдали при объемной доле ацетона 20%. Значения суммы флавоноидов в первом и втором максимумах экстракции статистически значимо не отличались ( $p=0,42$  по t-критерию Стьюдента). Максимальная площадь хроматографического пика тифанеозида приходилась на экстракцию 20% и 60% ацетоном, нарциссина – 60% ацетоном, рутина и изокверцитрина – 20% ацетоном.

Полученные извлечения содержали от трех до пяти флавоноидов. Наиболее разнообразными по флавоноидному составу оказались извлечения, полученные при экстракции 20% и 40% ацетоном. Отсутствие значимых отличий между максимумами экстракции 20% и 60% ацетоном обусловлено разнородным характером экстракции нарциссина (60% ацетон) и рутина с изокверцитрином (20% ацетон), а также практически одинаковыми площадями хроматографических пиков тифанеозида в извлечениях, полученных при экстракции 20% и 60% ацетоном.

Характер экстракции суммы флавоноидов в зависимости от объемной доли ацетона преимущественно определялся тифанеозидом.

ГФ РБ (первая методика), Европейская, Британская и Украинская фармакопеи рекомендуют для экстракции флавоноидов из календулы цветков и одновременного гидролиза гликозидов



использовать 100% ацетон с добавлением хлористоводородной кислоты *P* и гексаметилентетрамина *P*. Однако из таблицы 4 видно, что 100% ацетон извлекал в 42 раза меньше флавоноидов, чем 60% ацетон, что указывало на отсутствие полноты извлечения флавоноидов из данного сырья фармакопейным экстрагентом – 100% ацетоном.

Из таблиц 3 и 4 видно, что относительное содержание флавоноидов значительно изменялось в зависимости от объемных долей пропанола-1 и ацетона.

Из таблицы 5 видно, что максимальное суммарное значение площадей хроматографических пиков флавоноидов приходилось на экстракцию

Таблица 4 – Зависимость относительного содержания, площадей хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от объемной доли ацетона

Название флавоноида	Объемная доля ацетона, %				
	20	40	60	80	100
Относительное содержание, %					
Тифанеозид	46±2	44±2	40±2	49±2	37±2
Рутин	16±1	16±2	12±1	13±1	6,5±0,7
Изокверцитрин	1,1±0,1	0,7±0,1	-	-	-
Нарциссин	31±2	34±2	42±2	33±1	57±2
Изорамнетин-3-глюкозид	6,1±0,5	5,6±0,7	5,6±0,6	5,5±1,2	-
Площадь хроматографического пика					
Тифанеозид	2657±34	2276±23	2627±34	2033±22	49±7
Нарциссин	1769±44	1775±26	2713±38	1372±26	90±10
Сумма	5763±45	5199±67	6498±65	4178±25	155±11
Концентрация, мкг/мл					
Рутин	122±3	109±3	106±3	73±3	-
Изокверцитрин	2,6±0,1	1,6±0,2	-	-	-

Таблица 5 – Зависимость относительного содержания, площадей хроматографических пиков и концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от объемной доли диметилсульфоксида

Название флавоноида	Объемная доля диметилсульфоксида, %				
	20	40	60	80	100
Относительное содержание, %					
Тифанеозид	41±2	42±2	42±2	42±2	27±2
Мангаслин	2,2±0,3	2,3±0,5	2,0±0,1	1,9±0,2	1,6±0,4
Рутин	14±1	14±1	13±1	14±1	15±2
Изокверцитрин	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1	1,4±0,2
Нарциссин	35±2	32±2	33±1	33±2	46±2
Флавоноид 3	2,3±0,5	3,2±0,4	3,2±0,4	3,3±0,3	5,3±0,7
Изорамнетин-3-глюкозид	5,0±0,3	5,2±0,6	5,4±0,3	5,3±0,6	4,0±0,5
Площадь хроматографического пика					
Тифанеозид	2656±34	2450±36	2646±56	2311±34	992±16
Нарциссин	2307±34	1913±48	2100±45	1853±23	1703±22
Сумма	6542±56	5900±112	6294±116	5612±67	3703±38
Концентрация, мкг/мл					
Рутин	119±3	112±2	109±3	103±2	74±2
Изокверцитрин	3,1±0,3	2,7±0,3	2,9±0,3	2,9±0,2	2,1±0,3

20% диметилсульфоксидом (первый максимум). Извлечения, полученные при экстракции диметилсульфоксидом в диапазоне объемных долей от 40% до 100%, содержали меньше суммы флавоноидов. Второй максимум экстракции, который на 3,8% (отн.) меньше по сравнению с первым, наблюдали при объемной доле диметилсульфоксида 60%. Суммарные значения в первом и втором максимумах экстракции статистически значимо не отличались ( $p=0,80$  по t-критерию Стьюдента). Максимальная площадь хроматографического пика тифанеозидов наблюдалась при экстракции 20% и 60% диметилсульфоксидом, нарциссина, рутина, изокверцитрина – 20% диметилсульфоксидом.

Извлечения, полученные при экстракции диметилсульфоксидом в различных объемных долях, содержали семь флавоноидов. Отсутствие значимых отличий между максимумами экстракции 20% и 60% диметилсульфоксидом обусловлено тем, что относительное содержание флавоноидов при извлечении данными объемными долями диметилсульфоксида практически не изменялось (не более  $\pm 2\%$ ).

Характер экстракции суммы флавоноидов в зависимости от объемной доли диметилсульфоксида преимущественно определялся тифанеозидом.

Указанные в таблице 6 экстрагенты извлекали только тифанеозид и нарциссин. Наибольшее суммарное значение площадей хроматографических пиков этих веществ приходилось на экстракцию бутанолом-1.

Экстрагирующая способность изучаемых в работе абсолютных растворителей уменьшалась в ряду: вода > метанол > диметилсульфоксид > этанол > бутанол-1 > этилацетат > бутанол-2 > ацетон > пропанол-1 > пропанол-2.

При помощи дисперсионного анализа оценили влияние природы и объемной доли исследуемых экстрагентов на площади хроматографических пиков флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков. Его результаты приведены в таблице 7.

Из таблицы 7 видно, что диэлектрическая проницаемость, динамическая вязкость, температура кипения и объемные доли изучаемых экстрагентов в растворах статистически значимо ( $p<0,05$ ) влияли на площади хроматографических пиков флавоноидов. Наибольшее влияние на площади хроматографических пиков суммы флавоноидов, тифанеозидов и нарциссина оказывала объемная доля этанола, т.к. для этого фактора рассчитаны наименьшие значения уровней значимости. Поэтому при проведении этаноль-

Таблица 6 – Зависимость относительного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков, от природы экстрагента

Название флавоноида	Пропанол-2	Бутанол-1	Бутанол-2	Этилацетат
Тифанеозид	69 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	96 $\pm$ 3	100
Нарциссин	31 $\pm$ 3	3,8 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 1,2	-
Площадь хроматографического пика				
Сумма	72 $\pm$ 6	1837 $\pm$ 56	769 $\pm$ 34	1156 $\pm$ 42

Таблица 7 – Результаты дисперсионного анализа влияния природы и объемной доли экстрагентов на площади хроматографических пиков флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков

Исследуемый фактор Название флавоноида	Уровень значимости (p)							
	Диэлектрическая проницаемость ( $\epsilon$ )	Динамическая вязкость ( $\eta \cdot 10^3$ , Па·с)	Температура кипения, °C	Объемная доля метанола	Объемная доля этанола	Объемная доля пропанола-1	Объемная доля ацетона	Объемная доля диметилсульфоксида
Тифанеозид	6 $\times 10^{-4}$	4 $\times 10^{-4}$	1 $\times 10^{-3}$	2 $\times 10^{-6}$	6 $\times 10^{-10}$	1 $\times 10^{-2}$	5 $\times 10^{-3}$	1 $\times 10^{-4}$
Нарциссин	1 $\times 10^{-2}$	1 $\times 10^{-2}$	2 $\times 10^{-2}$	2 $\times 10^{-5}$	2 $\times 10^{-10}$	3 $\times 10^{-2}$	8 $\times 10^{-3}$	9 $\times 10^{-8}$
Рутин	9 $\times 10^{-2}$	3 $\times 10^{-2}$	7 $\times 10^{-3}$	1 $\times 10^{-2}$	3 $\times 10^{-3}$	4 $\times 10^{-2}$	6 $\times 10^{-2}$	3 $\times 10^{-2}$
Изокверцитрин	27 $\times 10^{-2}$	4 $\times 10^{-4}$	1 $\times 10^{-3}$	6 $\times 10^{-2}$	2 $\times 10^{-2}$	10 $\times 10^{-2}$	6 $\times 10^{-2}$	4 $\times 10^{-3}$
Сумма	9 $\times 10^{-4}$	8 $\times 10^{-4}$	1 $\times 10^{-3}$	3 $\times 10^{-6}$	4 $\times 10^{-10}$	1 $\times 10^{-2}$	5 $\times 10^{-3}$	4 $\times 10^{-6}$

ной экстракции флавоноидов из календулы цветков необходимо строго соблюдать правила разведения этанола с целью получения его раствора нужной объемной доли.

Объемную долю этанола можно считать наиболее критическим фактором экстракции флавоноидов из календулы цветков.

Пропанол-1 с диэлектрической проницаемостью, близкой к ацетону, но в шесть раз более вязкий и в 1,7 раза менее летучий, извлекал на 41% (отн.) меньше суммы флавоноидов, чем ацетон. Однако экстракция пропанолом-1 оказалась более воспроизводимой в сравнении с экстракцией ацетоном ( $RSD_{\text{пропанол-1}}=1\%$ ;  $RSD_{\text{ацетон}}=16\%$ ).

Пропанол-1 с диэлектрической проницаемостью и вязкостью, близкими к пропанолу-2, но в 1,2 раза менее летучий, извлекал на 22% (отн.) больше суммы флавоноидов, чем пропанол-2 ( $RSD_{\text{пропанол-2}}=9\%$ ).

Вода *P* и водные растворы (20% метанол, 60% этанол, 20% пропанол-1, 60% ацетон, 20% диметилсульфоксид) лучше извлекали флавоноиды из календулы цветков, чем 100% соответствующие органические экстрагенты. Однако экстрагирующая способность диметилсульфоксида ( $\epsilon=47$ ;  $\eta \cdot 10^3=2,47$  Па·с), метанола ( $\epsilon=32,6$ ;  $\eta \cdot 10^3=0,55$  Па·с) и этанола ( $\epsilon=24,3$ ;  $\eta \cdot 10^3=1,10$  Па·с) в отношении суммы флавоноидов календулы цветков статистически значимо ( $p=0,16$ ;  $0,27$ ;  $0,53 > 0,05$  по *t*-критерию Стьюдента) не отличалась от аналогичного параметра 20% диметилсульфоксида, 20% метанола и 60% этанола соответственно.

Для оценки статистической значимости различий между максимумами экстракции флавоноидов из календулы цветков для различных объемных долей экстрагентов провели *t*-тест. Его результаты представлены в таблице 8.

Из таблицы 8 видно, что между максимальными суммарными значениями площадей хроматографических пиков флавоноидов в извлечениях, полученных из календулы цветков при помощи воды и различных объемных долей метанола, этанола, пропанола-1, ацетона и диметилсульфоксида, статистически значимые различия отсутствовали ( $p>0,05$ ), т.е. добавление воды к используемому органическому экстрагенту нивелировало исходную разницу в экстракции флавоноидов 100% экстрагентами. Суммарные значения площадей хроматографических пиков флавоноидов в извлечении, полученном при экстракции 60% этанолом, статистически значимо ( $p=0,03<0,05$  по *t*-критерию Стьюдента) меньше, чем в извлечении, полученном при экстракции 20% пропанолом-1.

Рассчитали массовую долю суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид. При экстракции водой данный процент составил  $0,46 \pm 0,03\%$ , 60% этанолом –  $0,40 \pm 0,04\%$ , 20% метанолом –  $0,61 \pm 0,04\%$ , 20% пропанолом-1 –  $0,69 \pm 0,04\%$ , 60% ацетоном –  $0,67 \pm 0,04\%$  и 20% диметилсульфоксидом –  $0,67 \pm 0,04\%$ .

Эти значения превышали нижнюю границу содержания суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в календуле цветках согласно ГФ РБ – не менее 0,4%. При экстракции 60% этанолом массовая доля данной группы биологически активных веществ (БАВ) составила от 0,35% до 0,44%, т.е. значения из нижней части данного диапазона рассматриваемой фармакопейной норме не соответствовали. Поэтому использовать различные объемные доли этанола при количественном определении флавоноидов в календуле цветках нерационально, т.к. этанольная экстракция не позволяет достичь полноты извлечения данной группы БАВ из сырья. Однако ряд фармакопейных

Таблица 8 – Результаты оценки статистической значимости различий по *t*-тесту между максимумами экстракции суммы флавоноидов для различных объемных долей экстрагентов

	Вода	20% метанол	60% этанол	20% пропанол-1	60% ацетон	20% диметилсульфоксид
Вода	-	0,45	0,76	0,36	0,41	0,42
20% метанол	0,45	-	0,15	0,52	0,63	0,64
60% этанол	0,76	0,15	-	0,03	0,07	0,09
20% пропанол-1	0,36	0,52	0,03	-	0,79	0,89
60% ацетон	0,41	0,63	0,07	0,79	-	0,97
20% диметилсульфоксид	0,42	0,64	0,09	0,89	0,97	-

методик для количественного определения суммы флавоноидов в календуле цветках предлагает использовать экстракцию этанолом в различных объемных долях: 50% – вторая методика ГФ РБ [8] и 70% – методика ФС.2.5.0030.15 РФ [9].

Учитывая, что фармакопейные экстрагенты (100% ацетон, этанол в различных объемных долях) не в полной мере извлекали флавоноиды из календулы цветков, то пересмотр и совершенствование методик анализа этой группы БАВ в календуле цветках становится перспективным направлением исследований.

При экстракции 20% метанолом, 20% пропанолом-1, 60% ацетоном и 20% диметилсульфоксидом массовая доля суммы флавоноидов в пересчете на рутин в среднем составила 4,0%, 4,5%, 4,3% и 4,4% соответственно, что превышало или было сопоставимо с массовой долей в диапазоне от 1,1% до 4,7% согласно работам [10-12] и больше в сравнение со значениями (от 1,1% до 1,7%) [16-18]. Значит, экстракция водно-этанольными растворами, параметры которой приводятся в литературе, менее эффективна в сравнении с экстракцией водными растворами метанола, пропанола-1, ацетона и диметилсульфоксида.

Концентрация суммы флавоноидов в пересчете на рутин при экстракции 80% метанолом; 60%, 96% этанолом и 100% пропанолом-1 составила в среднем 507; 515; 462 и 12 мкг/мл соответственно. Данные работы [22] подтверждают, что больше флавоноидов экстрагируется 80% метанолом и 96% этанолом в сравнении со 100% пропанолом-1.

С учетом отсутствия статистически значимой разницы в количественных характеристиках экстракции флавоноидов вышеуказанными объемными долями экстрагентов для выявления оптимального экстрагента изучали воспроизводимость экстракции суммы флавоноидов ( $n=6$ ).  $RSD_{\text{вода}}=22\%$ ;  $RSD_{20\%\text{метанол}}=13\%$ ;  $RSD_{60\%\text{этанол}}=12\%$ ;  $RSD_{20\%\text{пропанол-1}}=3,6\%$ ;  $RSD_{60\%\text{ацетон}}=8,8\%$  и  $RSD_{80\%\text{диметилсульфоксид}}=11\%$ . Наименьшие значения  $RSD$  (менее  $<10\%$ ) рассчитаны для экстракции 20% пропанолом-1 и 60% ацетоном, т.е. экстракция этими растворами имела лучшую воспроизводимость.

Ряд авторов считает, что фенольные кислоты являются второй группой фенольных соединений, обуславливающих фармакологические свойства извлечений из календулы цветков [1, 10-12]. Поэтому при выборе оптимального экстрагента также определяли концентрацию этой

группы БАВ. В извлечениях, полученных при экстракции *водой Р*, содержалось в среднем 1038 мкг/мл (хлорогеновая, феруловая и 2 неидентифицированные гидроксикоричные кислоты), 20% метанолом – 313 мкг/мл (хлорогеновая и одна неидентифицированная гидроксикоричная кислоты), 60% этанолом – 134 мкг/мл (хлорогеновая, феруловая и две неидентифицированные гидроксикоричные кислоты), 20% пропанолом-1 – 359 мкг/мл (хлорогеновая кислота), 60% ацетоном – 510 мкг/мл (хлорогеновая, п-кумаровая и феруловая кислоты) и 20% диметилсульфоксидом – 176 мкг/мл (хлорогеновая, п-кумаровая и феруловая кислоты). Наибольшее разнообразие состава и содержание гидроксикоричных кислот наблюдали при экстракции *водой Р* и 60% ацетоном.

Массовая доля фенольных кислот при экстракции 60% этанолом составила в среднем 0,67%, что сопоставимо с данными работы [12] и превышает результаты, опубликованные в статье [10].

Помимо флавоноидов и гидроксикоричных кислот изучаемые растворители экстрагировали неидентифицированные соединения со временем удерживания, не превышающим 3,0 мин. Данные вещества элюировались с хроматографической колонки в зоне «мертвого времени». Их относительное содержание (от суммы всех хроматографических пиков, детектируемых на хроматограммах) в среднем составило 23%, 13%, 30%, 12%, 22% и 13% соответственно. Наименьшее относительное содержание этих соединений наблюдали при экстракции 20% метанолом, 20% пропанолом-1 и 20% диметилсульфоксидом.

Учитывая высокие показатели экстракции флавоноидов и гидроксикоричных кислот, хорошую воспроизводимость экстракции и отнесение данного растворителя к 3 классу по степени риска (малотоксичные растворители), в дальнейших исследованиях для экстракции флавоноидов из календулы цветков при их количественном определении рекомендовано использовать 60% ацетон.

## Заключение

В исследуемых извлечениях из календулы цветков содержались от одного до восьми флавоноидов. Подтверждено наличие тифанеозида, мангаслина, изорамнетин-3-глюкозида, нарциссина, рутина и изокверцитрина. Доминирующими флавоноидами являлись производные изорамнетина – тифанеозид и нарциссин. Характер

экстракции суммы флавоноидов определялся доминирующими соединениями и зависел от природы и объемной доли в растворах экстрагентов.

Экстрагирующая способность абсолютных экстрагентов в отношении флавоноидов календулы цветков уменьшалась в ряду: вода > метанол > диметилсульфоксид > этанол > бутанол-1 > этилацетат > бутанол-2 > ацетон > пропанол-1 > пропанол-2. Экстрагирующая способность пропанола-1 и ацетона уступала их водным растворам. Экстрагирующая способность метанола, этанола и диметилсульфоксида сопоставима с их водными растворами.

Максимальные суммарные значения площадей хроматографических пиков флавоноидов наблюдались при экстракции из календулы цветков 20% метанолом, 20% пропанолом-1, 60% ацетоном и 20% диметилсульфоксидом и составили в среднем от 0,61% до 0,69% в пересчете на гиперозид и от 4,0% до 4,5% в пересчете на рутин. Для дальнейшего количественного определения флавоноидов в календуле цветках рекомендован 60% ацетон.

Качественный и количественный состав извлечений подвергался изменениям в зависимости от природы и объемной доли в растворах экстрагентов. Диэлектрическая проницаемость, динамическая вязкость, температура кипения экстрагентов, объемные доли метанола, этанола, пропанола-1, ацетона и диметилсульфоксида статистически значимо ( $p < 0,05$ ) влияли на площади хроматографических пиков флавоноидов календулы цветков. Наиболее критическим фактором являлась объемная доля этанола.

## Литература

1. *Calendula officinalis* L., flos [Electronic resource] // Assessment report for the development of community herbal monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the community list / Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). – Mode of access: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2009/12/WC500018122.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2009/12/WC500018122.pdf). – Date of access: 09.07.2018.
2. *tabletki.by* : [официальный сайт]. – Минск, [2010–2018]. – Режим доступа: <http://tabletki.by>. – Дата доступа: 09.07.2018.
3. Реестр лекарственных средств Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rceth.by/refbank/>. – Дата доступа: 09.07.2018.
4. Афанасьева, П. В. Перспективы комплексного использования сырья календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / П. В. Афанасьева, А. В. Куркина // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. – 2014. – Т. 16, № 5. – С. 980–982.
5. *European Pharmacopoeia* [Electronic resource]. – 9th ed. – Mode of access: <http://www.edqm.eu/>. – Date of access: 09.08.2017.
6. *British Pharmacopoeia* [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.pharmacopoeia.com/>. – Date of access: 09.08.2017.
7. Нагідок квітки // Державна Фармакопея України. – Харків, 2008. – Допов. 2. – С. 511–512.
8. Календулы цветки (ноготков цветки) // Государственная фармакопея Респ. Беларусь : в 2 т. – Молодечно : Победа, 2016. – Т. 2 : Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – С. 1236–1237.
9. Ноготков лекарственных цветки [Электронный ресурс] // *Pharmacopoeia.ru* : [сайт]. – Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0030-15-nogotkov-lekarstvennyh-tsvetki/>. – Дата доступа: 02.07.2018.
10. Кашенко, Н. И. Спектрофотометрический анализ фенольных соединений календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). Ревизионное исследование существующих методов / Н. И. Кашенко, Д. Н. Оленников // Бутлеров. сообщ. – 2014. – Т. 37, № 1. – С. 146–155.
11. Кашенко, Н. И. Количественный анализ фенольных соединений в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) методом микроколоночной ВЭЖХ / Н. И. Кашенко, Д. Н. Оленников // Бутлеров. сообщ. – 2013. – Т. 36, № 12. – С. 66–74.
12. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations // D. N. Olennikov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017 Aug. – Vol. 18, N 8. – P. E1685.
13. Обоснование новых подходов к стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной [Электронный ресурс] / А. В. Куркина [и др.]. – Современ. проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21546>. – Дата доступа: 02.07.2018.
14. Куркин, В. А. Разработка методик стандартизации цветков ноготков / В. А. Куркин, О. В. Шарова // Фармация. – 2007. – № 8. – С. 11–13.
15. HPLC-Analysis of narcissin in flowers of *Calendula officinalis* / V. A. Kurkin [et al.] // *J. Med. Plants Studies*. – 2015. – Vol. 3, N 6. – P. 16–18.
16. Петрова, Д. Н. Совершенствование методов анализа ряда флавоноидсодержащих растений : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Д. Н. Петрова. – Казань, 2015. – 180 с.
17. Использование спектрофотометрии в анализе промышленных образцов лекарственного растительного сырья / А. А. Сорокина [и др.] // Фармация. – 2012. – № 4. – С. 43–44.
18. Stepwise injection spectrophotometric determination of flavonoids in medicinal plants / M. T. Falkova [et al.] // *Anal. Letts.* – 2014. – Vol. 47, N 6. – P. 970–982.
19. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts / G. S. Cetkovic [et al.] // *APTEFF*. – 2003. – Vol. 34. – P. 93–102.
20. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia / G. Rigane [et al.] // *Intern. Food Research J.* – 2013. – Vol. 20, N 6. – P. 3001–3007.
21. Feasibility of Cultivation *Calendula* as a Dual Purpose Industrial Oilseed and Medicinal Crop / R.W. Wilen [et al.] // *ISHS Acta Horticulturae* 629 : XXVI International

- Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plant. – Toronto, Canada, 2004. – P. 199–206.
22. Butnariu, M. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry / M. Butnariu, C. Z. Coradini // Chem. Cen. J. – 2012 Apr. – Vol. 6. – P. 35.
  23. Краткий справочник физико-химических величин / под ред. А. А. Равделя, А. М. Пономаревой. – СПб., 2003. – 240 с.
  24. Лукашов, Р. И. Факторы, влияющие на водно-спиртовую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадско-

- го / Р. И. Лукашов // Рецепт. – 2018. – Т. 21, № 1. – С. 10–25.
25. Моисеев, Д. В. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ / Д. В. Моисеев, Г. Н. Бузук, В. Л. Шелюто // Химико-фармацевт. журн. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 35–38.
  26. Mabry, T. J. The systematic identification of flavonoids / T. J. Mabry, K. R. Markhan, M. B. Thomas. – Berlin : Springer-Verland, 1970. – 354 p.
  27. Harborne, J. B. The Flavonoids / J. B. Harborne, H. Mabry, T. J. Mabry. – New York : Acad. Press, 1975. – 1204 p.

Поступила 18.07.2018 г.  
Принята в печать 25.09.2018 г.

## References

1. *Calendula officinalis* L., flos [Electronic resource]. In: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report for the development of community herbal monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the community list. Mode of access: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2009/12/WC500018122.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2009/12/WC500018122.pdf). Date of access: 09.07.2018.
2. tabletka.by: [ofits sait]. Minsk, RB; [2010–2018]. Rezhim dostupa: <http://tabletka.by>. Data dostupa: 09.07.2018.
3. Register of medicines of the Republic of Belarus [Elektronnyi resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.rceth.by/refbank/>. Data dostupa: 09.07.2018. (In Russ.)
4. Afanas'yeva PV, Kurkina AV. Prospects of complex use of raw materials of *calendula officinalis* (*Calendula officinalis* L.). Izv Samar Nauch Tsentra Ros Akad Nauk. 2014;16(5):980–2. (In Russ.)
5. European Pharmacopoeia [Electronic resource]. 9th ed. Mode of access: <http://www.edqm.eu/>. Date of access: 09.08.2017.
6. British Pharmacopoeia [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.pharmacopoeia.com/>. Date of access: 09.08.2017.
7. Marigold flowers. V: Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Kharkiv, Ukraine; 2008. Dopov 2. P. 511–2. (In Russ.)
8. *Calendula* flowers (marigold flowers). V: Gosudarstvennaia farmakopeia Resp. Belarus': v 2 t. Molodechno, RB: Pobeda; 2016. T 2: Kontrol' kachestva substantsii dlia farmatsevticheskogo ispol'zovaniia i lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia. P. 1236–7. (In Russ.)
9. Marigold medicinal flowers [Elektronnyi resurs]. Pharmacopoeia.ru: [sait]. Rezhim dostupa: <http://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0030-15-nogotkov-lekarstvennyh-tsvetki/>. Data dostupa: 02.07.2018. (In Russ.)
10. Kashchenko NI, Olennikov DN. Spectrophotometric analysis of phenolic compounds of *calendula officinalis* (*Calendula officinalis* L.). Audit study of existing methods. Butlerov Soobshch. 2014;37(1):146–55. (In Russ.)
11. Kashchenko NI, Olennikov DN. Quantitative analysis of phenolic compounds in marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) using HPLC microcolonies. Butlerov Soobshch. 2013;36(12):66–74. (In Russ.)
12. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Akobirshoeva A, Zilfikarov IN, Vennos C. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations. Int J Mol Sci. 2017 Aug;18(8):E1685. doi: 10.3390/ijms18081685.
13. Kurkina AV, Afanas'yeva PV, Kurkin VA, Platonov IA, Pavlova LV. Substantiation of new approaches to standardization of raw materials and drugs of *calendula officinalis* [Elektronnyi resurs]. Sovremen Problemy Nauki Obrazovaniia. 2015;(5). Rezhim dostupa: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21546>. Data dostupa: 02.07.2018. (In Russ.)
14. Kurkin VA, Sharova OV. Development of methods of standardization of marigold flowers. Farmatsiia. 2007;(8):11–3. (In Russ.)
15. Kurkin VA, Kurkina AV, Afanasyeva PV, Platonov IA, Pavlova LV. HPLC-Analysis of narcissin in flowers of *Calendula officinalis*. J Med Plants Studies. 2015;3(6):16–8.
16. Petrova DN. Improvement of methods of analysis of a number of flavonoid-containing plants: dis ... kand farm nauk: 14.04.02. Kazan, RF; 2015. 180 p. (In Russ.)
17. Sorokina AA, Marakhova AI, Fedorovskiy NN, Belous TI. The use of spectrophotometry in the analysis of industrial samples of medicinal plant raw materials. Farmatsiia. 2012;(4):43–4. (In Russ.)
18. Falkova MT, Pushina MO, Bulatov AV, Alekseeva GM, Moskvina LN. Stepwise injection spectrophotometric determination of flavonoids in medicinal plants. Anal Letts. 2014;47(6):970–82.
19. Četković GS, Đilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Tumbas VT. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. APTEFF. 2003;34:93–102.
20. Rigane G, Ben Younes S, Ghazghazi H, Ben Salem R. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. Intern. Food Research J. 2013;20(6):3001–7.
21. Wilen RW, Barl B, Slinkard AE, Bandara MS. Feasibility of Cultivation *Calendula* as a Dual Purpose Industrial Oilseed and Medicinal Crop. In: ISHS Acta Horticulturae 629: XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plant. Toronto, Canada; 2004. P. 199–206.
22. Butnariu M, Coradini CZ. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. Chem Cen J. 2012 Apr;6:35. doi: 10.1186/1752-153X-6-35
23. Ravdel' AA, Ponomareva AM, red. Brief reference book of physical and chemical quantities. Saint-Petersburg, RF;

2003. 240 p. (In Russ.)
24. Lukashov R.I. Factors affecting the water-alcohol extraction of flavonoids from the herb of the canadian goldenrod. Retsept. 2018;21(1):10-25. (In Russ.)
25. Moiseev DV, Buzuk GN, Shelyuto VL. Identification of flavonoids in plants by HPLC. Khimiko-Farmatsevt Zhurn. 2011;45(1):35-38. (In Russ.)
26. Mabry TJ, Markhan KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Berlin, Germany: Springer-Verland; 1970. 354 p.
27. Harborne JB, Mabry H, Mabry TJ. The Flavonoids. New York, USA: Acad Press; 1975. 1204 p.

Submitted 18.07.2018

Accepted 25.09.2018

**Сведения об авторах:**

Лукашов Р.И. – к.ф.н., доцент кафедры стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, [ORCID 0000-0001-5234-6319](https://orcid.org/0000-0001-5234-6319).

**Information about authors:**

*Lukashov R.I. – Candidate of Pharmaceutical Sciences, associate professor of the Chair of Standardization of Medicinal Agents with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.*

[ORCID 0000-0001-5234-6319](https://orcid.org/0000-0001-5234-6319).

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК. E-mail: [r\\_lukashov@mail.ru](mailto:r_lukashov@mail.ru) – Лукашов Роман Игоревич.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Standardization of Medicinal Agents with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining E-mail: [r\\_lukashov@mail.ru](mailto:r_lukashov@mail.ru) – Raman I. Lukashov.