

УДК 615.322: 547.972 +543.544

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЦВЕТКОВ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ (*TAGETES PATULA* L.)

© В.А. Куркин*, А.Е. Савельева, А.В. Куркина

Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская,
89, Самара, 443099 (Россия), e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Одним из перспективных источников флавоноидов являются цветки бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*), или Сложноцветные (*Compositae*). Цель исследования – разработка подходов к стандартизации цветков бархатцев отклоненных, заключающихся в определении подлинности данного сырья и количественного определения биологически активных соединений. В результате проведенного сравнительного хроматографического исследования в цветках бархатцев отклоненных различных сортов обнаружено наличие флавоноидов с использованием детекции при длине волны 254 и 366 нм и до, и после проявления спиртовым раствором алюминия хлорида (AlCl₃). В водно-спиртовых извлечениях различных сортов форм подтверждено наличие патулетина и патулитрина. С использованием колоночной хроматографии на силикагеле L 40/100 выделены два флавоноидных вещества – патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавонон) и патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавонона), идентификацию которых проводили с помощью УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии. В системе растворителей хлороформ-этанол-вода (26 : 16 : 3) патулетин и патулитрин имеют величины R_f около 0.7 и 0.4 соответственно. Выявлено, что именно патулитрин является доминирующим флавоноидом в цветках бархатцев отклоненных и определяет характер кривой поглощения электронных спектров водно-спиртового извлечения из данного сырья. Обосновано, что при проведении количественного анализа суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных целесообразно осуществлять пересчет содержания действующих веществ на доминирующий и диагностически значимый флавоноид – патулитрин. Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах цветков бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от 4.36±0.02 до 11.71±0.05% (в пересчете на патулитрин).

Ключевые слова: бархатцы отклоненные, *Tagetes patula* L., цветки, флавоноиды, патулитрин, спектрофотометрия, хроматографический анализ, стандартизация.

Введение

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) широко используется в современной фармацевтической промышленности для получения целого ряда лекарственных растительных препаратов, эффективных при лечении многих заболеваний и оказывающих минимальные побочные эффекты [1–3]. Особый интерес представляет ЛРС, содержащее флавоноиды, благодаря широкому спектру фармакологической активности [4–6].

Одним из перспективных источников флавоноидов являются цветки бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*), или Сложноцветные (*Compositae*). Бархатцы отклоненные не являются в настоящее время фармакопейным видом [7]. Лекарственные препараты в России на основе данного растения не зарегистрированы. В литературе для цветков бархатцев описаны такие фармакологические свойства, как антимикробное действие, ранозаживляющая и антиоксидантная активность [8–11]. Известно,

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Савельева Анна Евгеньевна – аспирант, e-mail: savelieva1997@mail.ru

Куркина Анна Владимировна – доктор фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, e-mail: a.v.kurkina@samsmu.ru

что помимо флавоноидов растения рода Бархатцы (*Tagetes* L.) являются перспективным источником таких биологически активных соединений, как простые фенолы, эфирное масло, витамины (каротиноиды), дубильные вещества [12–19]. В этой связи, на наш взгляд, бархатцы отклоненные представляют интерес как потенциальное лекарственное растение.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Интерес к бархатцам отклоненным связан также с многообразием его сортовых форм. Однако имеющиеся на данный момент научные работы не полностью охватывают разнообразие сортовых форм бархатцев. Многие исследователи, в том числе зарубежные ученые, как правило, не указывают в исследованиях принадлежность объекта к конкретному сорту [20–24].

В литературе описана методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на кверцетин [13]. При этом определено, что содержание флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных достигает $9.43 \pm 0.07\%$ в пересчете на патулетин. Однако принимая во внимание трудоемкость и многостадийность данной методики, актуальным является совершенствование методов стандартизации цветков бархатцев отклоненных, в частности, методик определения подлинности сырья и методик оценки количественного содержания действующих веществ, в частности, флавоноидов, в цветках различных сортовых форм бархатцев отклоненных.

Цель исследования – разработка подходов к стандартизации цветков бархатцев отклоненных, заключающихся в определении подлинности данного сырья и количественного определения биологически активных соединений – флавоноидов.

Экспериментальная часть

Материалом исследования являлись соцветия бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) (сорта «Мандарин», «Оранжевый чемпион», «Скарлет София», «Оранжевое пламя», «Красная парча», «Малыш Гармония» и «Красный герой»), собранные в августе-сентябре 2018 и 2019 гг. в Ботаническом саду Самарского университета в период массового цветения и плодоношения растения.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли с использованием хроматографических пластинок «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и системах растворителей: хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3), *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2), хлороформ – этанол (4 : 1). Детекцию веществ на хроматограмме осуществляли при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=254$ нм и $\lambda=366$ нм (до и после проявления раствором алюминия хлорида). В качестве метода исследования также использовали дифференциальную спектрофотометрию. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190–500 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм.

Для выделения флавоноидов использовали колоночную хроматографию на силикагеле L 40/100 (Чехия) с последующей перекристаллизацией (чистота веществ подтверждалась физико-химическими константами и данными УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии). Для этих целей нами было получено извлечение из 150 г цветков бархатцев отклоненных сорта «Оранжевое пламя» с помощью 70% этилового спирта в соотношении 1 : 5, которое упаривали под вакуумом, наносили на силикагель L 40/100 и высушивали. В качестве элюентов использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в соотношениях 99 : 1, 98 : 3, 97 : 5, 93 : 7, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20, 70 : 30 и 60 : 40. Элюаты делили на фракции примерно одинакового объема (по 200 мл), затем упаривали под вакуумом.

Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта соотношении 60 : 40, выделили доминирующее вещество с величиной R_f около 0.4, а из фракций, где в качестве элюата выступала смесь хлороформа и этилового спирта в соотношении 93 : 7, выделили вещество с величиной R_f около 0.7.

Идентификацию выделенных соединений проводили на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР ^1H получали на приборе «JNM-ECX 400» (399.78 МГц), спектры ЯМР ^{13}C – на приборе «JNM-ECX 400» (100.52 МГц).

Обсуждение результатов

В результате хроматографических исследований нами были выделены вещества, идентифицированные как патулитрин (1) и патулетин (2) (рис. 1). Полученные результаты УФ- и ^1H -ЯМР-спектроскопии коррелируют с литературными данными [16]. При этом нами впервые были определены ^{13}C -ЯМР-спектры для данных соединений.

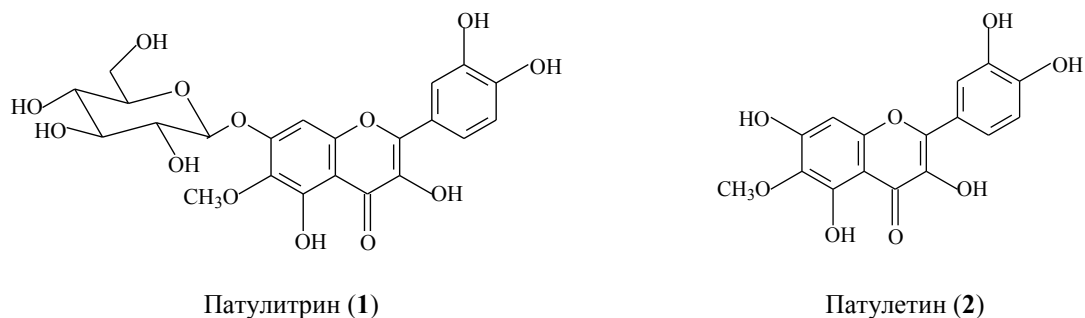


Рис. 1. Структурные формулы флавоноидов цветков бархатцев отклоненных

Патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона) (1). Кристаллическое вещество ярко-желтого цвета состава $C_{22}H_{22}O_{13}$ с т. пл. 250-252 °С (спирт этиловый). УФ-спектр: λ_{\max}^{EtOH} 266, 382 нм; + NaOAc 266, 384 нм; + NaOAc + H_3BO_3 272, 400 нм; + $AlCl_3$ 276, 382 пл., 443 нм; + $AlCl_3$ + HCl 275, 382 пл., 438 нм; + NaOMe 303, 373, 445 (пл.) нм.

1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.47 (1H, с, 5-ОН-группа), 9.48 (3H, уш. с, 3-ОН-группа, 7-ОН-группа и 4'-ОН-группа), 7.70 (1H, д, 2.5 Гц, Н-2'), 7.52 (1H, дд, 2.5 и 8.5 Гц, Н-6'), 6.92 (1H, с, Н-8), 6.88 (1H, д, 8.5 Гц, Н-5'), 5,11 (1H, д, J = 7,12, Н-1'' глюкопиранозы), 3,75 (3H, с, OCH₃ при С-6), 3,3-4,6 (6H глюкопиранозы).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO- d_6 , δ_c , м.д.): 176.66 (С-4), 156.89 (С-7), 151.94 (С-5), 151.58 (С-9), 148.43 (С-4'), 148.22 (С-3'), 145.49 (С-3), 135.31 (С-6'), 132.32 (С-2'), 122.39 (С-1'), 120.56 (С-6), 116.08 (С-2), 115.93 (С-5'), 104.12 (С-10), 100,64 (С-1'' глюкозы), 77,75 (С-5'' глюкозы), 77,20 (С-3'' глюкозы), 73.72 (С-2'' глюкозы), 70,08 (С-4'' глюкозы), 61.15 (С-6'' глюкозы), 60.86 (CH₃O при С-6).

Патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавонон) (2). Кристаллическое вещество ярко желтого цвета состава $C_{16}H_{12}O_8$; т.пл. 265-267 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{\max}^{EtOH} λ_{\max}^{EtOH} 264, 296 пл., 378 нм; +NaOAc 268, 382 +NaOAc + H_3BO_3 270, 396; + $AlCl_3$ 274, 381 пл., 438 нм; + $AlCl_3$ + HCl 275, 381 пл., 436 нм; + NaOMe 328, 368 пл., 428 (пл.) нм.

1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.54 (1H, с, 5-ОН-группа), 10.65 (1H, с, 7-ОН-группа), 9.56 (1H, с, 4'-ОН-группа), 9.32 (1H, с, 3-ОН-группа), 7.64 (1H, д, 2.5 Гц, Н-2'), 7.50 (1H, дд, 2.5 и 8.5 Гц, Н-6'), 6.85 (1H, д, 8.5 Гц, Н-5'), 6.48 (1H, с, Н-8), 3,73 (3H, с, OCH₃ при С-6).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO- d_6 , δ_c , м.д.): 176.56 (С-4), 157.50 (С-7), 152.27 (С-5), 151.84 (С-9), 148.24 (С-4'), 147.46 (С-3'), 145.49 (С-3), 135.31 (С-6'), 132.32 (С-2'), 122.39 (С-1'), 120.56 (С-6), 116.08 (С-2), 115.93 (С-5'), 104.12 (С-10), 60.52 (CH₃O при С-6).

По результатам проводимых нами хроматографических исследований выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. В качестве стандартов использовались не только вещества, выделенные из цветков бархатцев отклоненных, а также кверцетин, описанный ранее для цветков бархатцев отклоненных, причем этот флавоноид изучен в данной в работе в качестве потенциального стандартного образца при разработке методики определения подлинности сырья, так как кверцетин имеет значение R_f около 0.7, соответствующее значению R_f патулетина.

Определено, что наиболее информативными являются хроматограммы, полученные в системе растворителей: хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3), просматриваемые при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ (рис. 2 и 3).

Было отмечено, что патулетин и кверцетин имеют практически одинаковое значение R_f , однако значительно отличаются между собой по окраске свечения при просмотре при длине волны 366 нм – светло-желтая и ярко-зеленая соответственно (после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ кверцетина наблюдается усиление флуоресценции и изменения ее окраски с желтой на ярко-зеленую) (рис. 3).

Нами были проанализированы водно-спиртовые извлечения из цветков бархатцев отклоненных семи различных сортов. Методом ТСХ в присутствии растворов стандартных образцов подтверждено наличие патулетина и патулетина в извлечениях из всех образцов изучаемых нами сортов (рис. 4).

С использованием метода ТСХ установлено, что доминирующим флавоноидом во всех сортах цветков бархатцев отклоненных является патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона) (рис. 4).

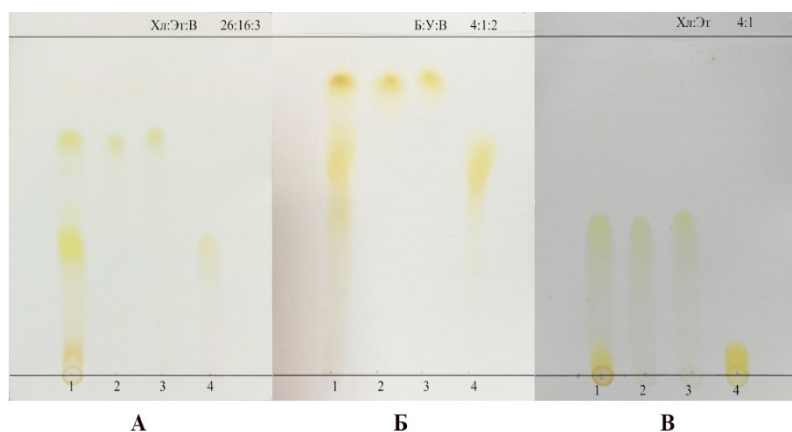


Рис. 2. Хроматограмма анализа водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных: А – в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3), Б – в системе растворителей *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2), В – в системе растворителей хлороформ – этанол (4 : 1). Обозначения: 1 – настойка цветков бархатцев отклоненных сорта «Оранжевое пламя»; 2 – патулетин; 3 – кверцетин; 4 – патулитрин

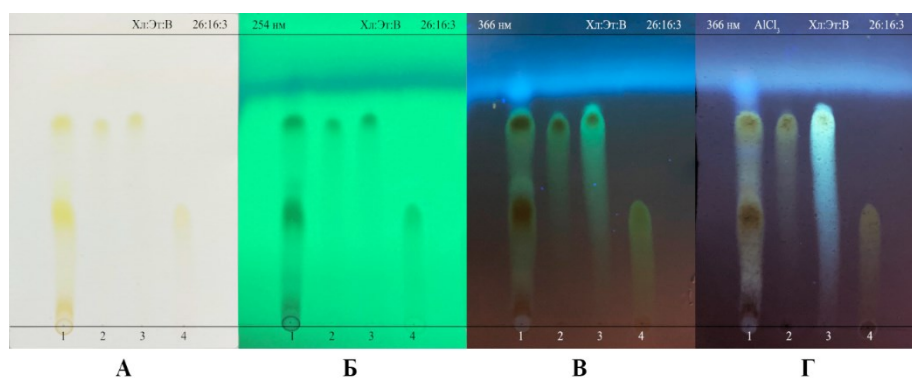


Рис. 3. Хроматограмма анализа водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (26 : 16 : 3): А – до проявления, Б – детекция в УФ-свете при длине волны 254 нм, В – детекция в УФ-свете при длине волны 366 нм, Г – детекция в УФ-свете при длине волны 366 нм после обработки спиртовым раствором AlCl_3 . Обозначения: 1 – настойка цветков бархатцев отклоненных сорта «Оранжевое пламя»; 2 – патулетин; 3 – кверцетин; 4 – патулитрин

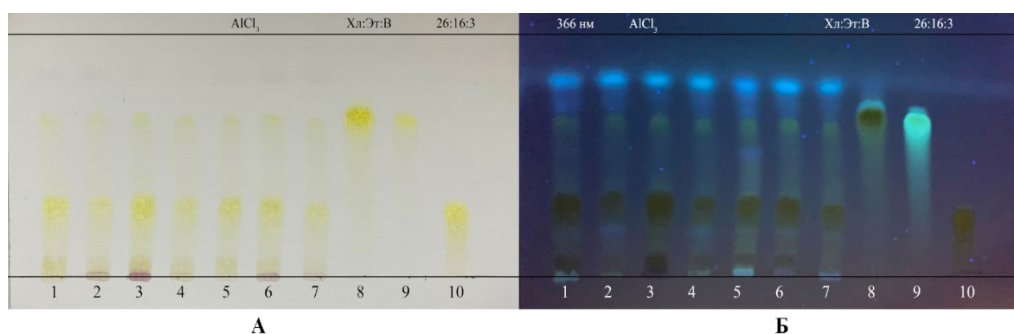


Рис. 4. Хроматограмма анализа водно-спиртовых извлечений цветков бархатцев отклоненных различных сортов в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (26 : 16 : 3): А – при проявлении спиртовым раствором алюминия хлорида, Б – детекция в УФ-свете при длине волны 366 нм после обработки спиртовым раствором AlCl_3 . Обозначения: 1 – сорт «Мандарин»; 2 – сорт «Красный герой»; 3 – сорт «Скарлет София»; 4 – сорт «Оранжевый чемпион»; 5 – сорт «Малыш Гармония»; 6 – сорт «Красная парча»; 7 – сорт «Оранжевое пламя»; 8 – патулетин; 9 – кверцетин; 10 – патулитрин

Методика проведения ТСХ-анализа: Около 1.0 г сырья, измельченного до величины частиц 3 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 70%, нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

Около 0.005 г кверцетина растворяют в 10 мл спирта 96% и перемешивают (раствор стандартного образца (СО) кверцетина).

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 5 мкл раствора СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 60 мин смесью растворителей хлороформ – этиловый спирт – вода (26 : 16 : 3) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80–90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, обрабатывают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, сушат в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 3–5 мин и просматривают в УФ-сети при длине волны 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: 2 зоны адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией на уровне и ниже адсорбции СО кверцетина.

С целью разработки методики количественного анализа суммы флавоноидов в данном сырье нами были проведены спектрофотометрические исследования водно-спиртовых извлечений из цветков бархатцев отклоненных, а также патулитрина.

Нами установлено, что оптимальные условия экстракции флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных: экстрагент – 70% этиловый спирт; соотношение «сырье – экстрагент» – 1 : 50; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 45 мин, степень измельчения сырья – 3 мм (табл. 1).

При изучении спектральных характеристик было выявлено, что именно патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона) определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных (рис. 5). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, как и в случае патулитрина (рис. 5). При этом наблюдается четкая корреляция кривых поглощения водно-спиртового извлечения из цветков и патулитрина и в присутствии спиртового раствора алюминия хлорида (рис. 6).

Таблица 1. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из цветков бархатцев отклоненных

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельченности сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
40	1 : 50	60	2	5.88±0.04
50	1 : 50	60	2	6.02±0.04
60	1 : 50	60	2	6.63±0.04
70	1 : 50	60	2	7.79±0.05
80	1 : 50	60	2	7.74±0.05
96	1 : 50	60	2	6.95±0.04
Время экстрагирования				
70	1 : 50	30	2	7.24±0.04
70	1 : 50	45	2	8.10±0.04
70	1 : 50	60	2	8.02±0.04
70	1 : 50	90	2	7.43±0.04
70	1 : 50	120	2	7.11±0.03
Степень измельченности				
70	1 : 50	45	1	7.43±0.05
70	1 : 50	45	2	7.95±0.05
70	1 : 50	45	3	8.30±0.05
Соотношение сырье : экстрагент				
70	1 : 30	45	3	8.07±0.05
70	1 : 50	45	3	8.30±0.05
70	1 : 100	45	3	8.26±0.05

Дифференциальные кривые электронных спектров раствора водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных имеет максимум в области 428–434 нм (рис. 7), который практически соответствует максимуму поглощения спиртового раствора патулитрина (дифференциальный вариант) (рис. 8).

Следовательно, целесообразным является при проведении количественного анализа цветков бархатцев отклоненных осуществлять пересчет суммы флавоноидов в сырье на патулитрин.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных.

Аналитическую пробу сырья бархатцев отклоненных измельчают до размера частиц 3 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до ± 0.01 . Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через рыхлый комочек ваты или фильтр с красной полосой и остужают в течение 30 мин (извлечения из цветков).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

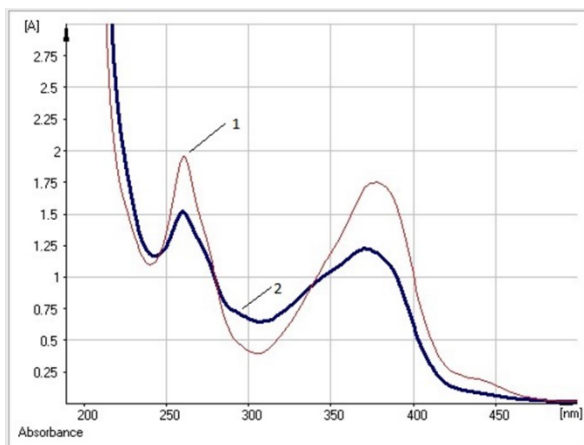


Рис. 5. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных (1) и патулитрина (2)

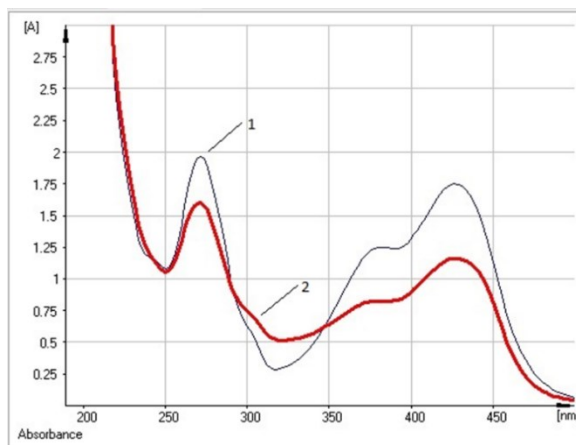


Рис. 6. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных в присутствии алюминия хлорида (1) и электронный спектр патулитрина в присутствии алюминия хлорида (2)

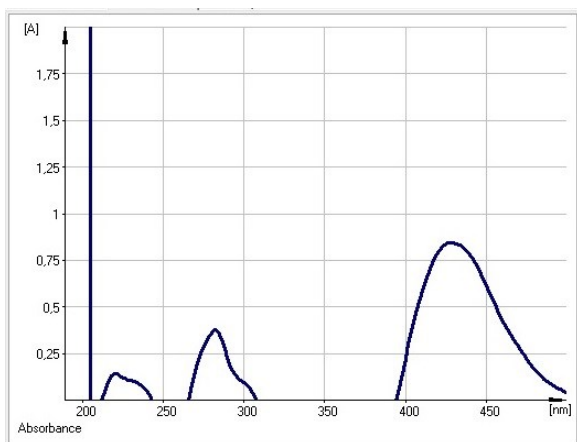


Рис. 7. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения цветков бархатцев отклоненных (дифференциальный вариант)

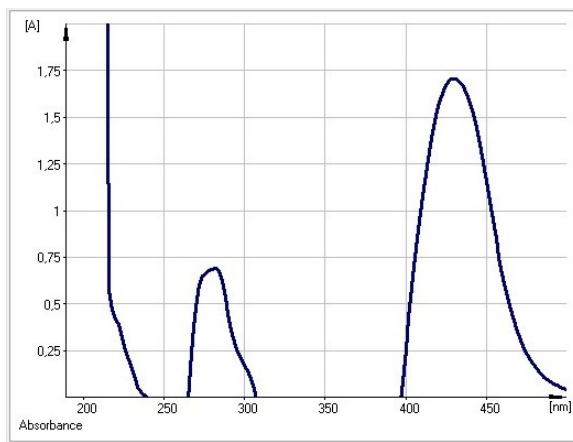


Рис. 8. Электронный спектр раствора патулитрина (дифференциальный вариант)

Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Для расчета содержания суммы флавоноидов готовят раствор стандартного образца патулитрина, добавляют к нему 3% спиртовой раствор алюминия хлорида, измеряют оптическую плотность окрашенного комплекса при аналитической длине волны 428 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета.

Примечание. *Приготовление раствора стандартного образца патулитрина.*

Около 0.02 г (точная навеска) патулитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 96% этиловом спирте. Затем содержимое колбы доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор А патулитрина). После чего 1 мл раствора А патулитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, затем доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом. Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 428 нм через 30 мин после приготовления всех растворов.

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца патулитрина; m – масса сырья, г; m_0 – масса стандартного образца патулитрина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики разработанной методики свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3.86\%$ (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов цветков бархатцев отклоненных и патулитрина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов патулитрина (с концентрациями в диапазоне от 0.0038 до 0.0625 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0.99996.

Опыты с добавками стандартного образца патулитрина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (опыты с добавками) (табл. 3).

Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных различных сортов представлены в таблице 4.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных

f	X _{ср}	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
10	8.30	0.1435	95	2.23	±0.32	±3.86

Таблица 3. Содержание суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных в зависимости от добавления патулитрина

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавлено патулитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг	Относительная, %
80.30	20.10	100.40	99.08	-1.32	-1.31
80.30	40.30	120.60	119.66	-0.94	-0.78
80.30	60.20	140.50	141.79	+1.29	+0.92

Таблица 4. Содержание суммы флавоноидов в цветках различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)

Сорт	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин и а.с.с., %
<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	11.71±0.05
<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	9.39±0.03
<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	8.25±0.03
<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	7.51±0.03
<i>T. patula</i> L. «Скарлет София»	7.21±0.03
<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	6.21±0.03
<i>T. patula</i> L. «Малыш Гармония»	4.36±0.02

Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах цветков бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от 11.71±0.05 до 4.36±0.02%. Однако содержание суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных сорта «Малыш Гармония» значительно ниже, чем у других исследуемых нами сортов (4.36±0.02%). В связи с этим следует рекомендовать в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных значение не менее 6.0%, причем в пересчете на доминирующий и диагностически значимый флавоноид – патулитрин.

Выводы

1. Проведенное сравнительное хроматографическое исследование позволило выявить наличие флавоноидов (патулетина и патулитрина) в водно-спиртовых извлечениях из цветков бархатцев отклоненных семи различных сортов.

2. Наиболее информативными являются хроматограммы, полученные в системе растворителей: хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3), просматриваемые при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида.

3. Кверцетин целесообразно использовать в качестве стандартного образца в методике определения подлинности цветков бархатцев отклоненных методом ТСХ, так как этот флавоноид имеет значение R_f 0.70, соответствующее значению R_f патулетина, являющегося наряду с патулетинном диагностически значимым компонентом сырья данного растения.

4. С использованием колоночной хроматографии из цветков бархатцев отклоненных выделены патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавоноид) и патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавоноид), идентифицированные на основании данных УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии.

5. Выявлено, что именно патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавоноид) является доминирующим флавоноидом в цветках бархатцев отклоненных и определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из данного растительного сырья.

6. При проведении количественного анализа суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных целесообразно делать пересчет содержания действующих веществ на доминирующий и диагностически значимый флавоноид – патулитрин.

7. Определено, что содержание суммы флавоноидов в цветках исследуемых сортов бархатцев отклоненных варьирует от до 4.36±0.02 до 11.71±0.05%.

8. Разработаны методики определения подлинности сырья методом ТСХ и количественного анализа суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных.

Список литературы

1. Ершова И.Б., Осипова Т.Ф. Фитотерапия острых респираторных вирусных заболеваний // Актуальная инфектология. 2016. №4 (13). С. 73–81. DOI: 10.22141/2312-413x.4.13.2016.91460.
2. Куркина А.В., Галямова В.Р., Куркин В.А., Авдеева Е.В. Возможности фитотерапии при заболеваниях системы пищеварения // Фармация и фармакология. 2016. Т. 4. №2 (15). С. 26–40. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-2(15)-26-40.
3. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Правдивцева О.Е., Браславский В.Б. Современная фитотерапия как наука и учебная дисциплина в медицинском и фармацевтическом образовании // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. №5 (65). С. 149–152.
4. Зайцева Е.Н., Дубищев А.В., Куркин В.А. Анализ влияния рутина и гравитационного воздействия на выделительную функцию почек // Наука и инновации в медицине. 2016. №4. С. 47–50.

5. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации коры ореха черного // Аспирантский вестник Поволжья. 2020. №1–2. С. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136.
6. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. Самара, 2012. 290 с.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. I–IV. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
8. Ломкина Е.М., Червонная Н.М., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Тюренков И.Н. Влияние экстракта бархатцев на заживление ран при сахарном диабете // Фармация. 2016. Т. 65. №3. С. 37–39.
9. Папаяни О.И., Духанина И.В., Сергеева О.Е. Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14. №5(3). С. 742–744.
10. Николаевский В.В. Ароматерапия: справочник. М., 2000. 366 с.
11. Холикова О., Азонов Д.А., Ганиев Х.А. Влияние эфирного масла бархатцев мелкоцветковых (*Tagetes patula* L.) на некоторые биохимические процессы при токсическом гепатите // Colloquium-journal. 2019. №11-2 (35). С. 49–52. DOI: 10.24411/2520-6990-2019-10309.
12. Малюгина Е.А., Мазулин А.В., Смойловская Г.П. Определение количественного содержания основных биологически активных компонентов в соцветиях *Tagetes patula* L. // Научные труды SWorld. 2015. Т. 18. №2 (39). С. 48–52.
13. Подгорная Ж.В. Исследование цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) с целью получения биологически активных соединений: дисс. ... канд. фарм. наук. Пятигорск, 2008.
14. Самосудова И.Е., Бойко Н.Н., Цветков З.Е. Подбор экстрагента для оптимального извлечения суммы биологически активных веществ из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. М., 2019. С. 315–319.
15. Червонная Н.М. Аминокислотный и элементный состав извлечения из соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.), полученного 40% спиртом этиловым // Традиционная и инновационная наука: история, современное состояние, перспективы. 2017. С. 134–138.
16. Червонная Н.М., Андреева О.А., Аджихметова С.Л., Оганесян Э.Т. О содержании фенольных соединений в соцветиях бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Химия растительного сырья. 2018. №3. С. 91–98. DOI: 10.14258/jcrpm.2018033714.
17. Червонная Н.М., Андреева О.А., Харченко И.И. О содержании дубильных веществ в соцветиях бархатцев распростертых // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2016. №26 (247). С. 147–151.
18. Червонная Н.М., Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Сенченко С.П., Боровский Б.В. Способ получения стандарта патулетина из соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Т. 19. №6. С. 132–137.
19. Червонная Н.М., Харченко И.И., Аджихметова С.Л., Мыкоц Л.П., Андреева О.А., Оганесян Э.Т. Определение некоторых физико-химических свойств пектиновых веществ из шрота соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Фармация и фармакология. 2017. Т. 5. №3. С. 267–282. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282.
20. Benea A., Ciobanu C., Cojocaru-Toma M., Ciobanu N. Determination of carotenoids in extracts from species of *Tagetes* and *Calendula* // The Moldovan Medical Journal. 2020. Vol. 63. N4. Pp. 23–26. DOI: 10.5281/zenodo.4016806.
21. Deepshikha K., Yashodhara V. Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Tagetes patula* // Annual Research & Review in Biology. 2017. Vol. 13. N6. Pp. 1–8. DOI: 10.9734/ARRB/2017/34349.
22. Gongadze M., Machavariani M., Erukidze M., Gogia N., Iobadze M., Chkhikvishvili I. French marigold (*Tagetes patula* L.) flower extract protects kidney cells from inflammation in vitro // Georgian Med. News. 2019. Vol. 297. Pp. 154–157.
23. Meurer M.C., Mees M., Mariano L.N., Boeing T., Somensi L.B., Mariott M.M., Da Silva R.D., Dos Santos A.C.D., Longo B., França T.C.S., Klein-Junior L., de Souza P., de Andrade S.F., da Silva L.M. Hydroalcoholic extract of *Tagetes erecta* L. flowers, rich in the carotenoid lutein, attenuates inflammatory cytokine secretion and improves the oxidative stress in an animal model of ulcerative colitis // Nutrition research. 2019. Vol. 66. Pp. 95–106. DOI: 10.1016/j.nutres.2019.03.005.
24. Nawale S., Padma Priya K., Pranusha P., Ganga Raju M. Data of antihyperlipidaemic activity for methanolic extract of *Tagetes patula* Linn. flower head along with piperine, as bioavailability enhancer // Data in Brief. 2018. Vol. 21. Pp. 587–597. DOI: 10.1016/j.dib.2018.10.022.

Поступила в редакцию 27 февраля 2021 г.

После переработки 28 марта 2021 г.

Принята к публикации 29 августа 2022 г.

Для цитирования: Куркин В.А., Савельева А.Е., Куркина А.В. Разработка подходов к стандартизации цветков бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) // Химия растительного сырья. 2022. №4. С. 219–229. DOI: 10.14258/jcrpm.2022049243.

Kurkin V.A.*, Saveleva A.E., Kurkina A.V. DEVELOPMENT OF METHODS OF STANDARDIZATION OF FLOWERS OF SPREADING MARIGOLD (*TAGETES PATULA* L.)

Samara State Medical Universit, ul. Chapaevskaya, 89, Samara, 443099 (Russia), e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

The spreading marigold (*Tagetes patula* L.), the family Aster (*Asteraceae*), or Composite (*Compositae*), is a prospective source of flavonoids. The aim of the study is to develop methods of standardization of marigold flowers rejected, consisting in determining the identity of this raw material and the quantitative determination of biologically active compounds. As a result of a comparative chromatographic study, the presence of flavonoids was detected upon detection at a wavelength of 254 and 366 nm and before and after reaction with an alcohol solution of aluminum chloride. The presence of patuletin and patulitrin was confirmed in extracts of different varietal forms of *Tagetes patula* L.. Using column chromatography on silica gel L 40/100, two flavonoid substances were isolated patuletin (3,5,7,3',4'-pentahydroxy-6-methoxyflavone) and patulitrin (7-O-β-D-glucopyranoside of 3,5,7,3',4'-pentahydroxy-6-methoxyflavone), which have been identified by UV-, ¹H-NMR -, ¹³C-NMR-spectroscopy and mass spectrometry, as well as acid hydrolysis. In the solvent system chloroform- ethanol-water (26 : 16 : 3) R_f values of patuletin and patulitrin are about 0.7 and 0.4, respectively. It was found that patulitrin is the main flavonoid in the flowers of spreading marigold and determines the character of the absorption curve of the electronic spectra of water-alcohol extraction from this raw material. During the quantitative analysis of the total flavonoids in the flowers of spreading marigold, it is necessary to recalculate the content of active substances to the dominant and diagnostically significant flavonoid patulitrin. It was determined that the content of the total flavonoids in the studied samples of flowers of different varieties of the spreading marigold varies from 4.36±0.02% to 11.71±0.05% (calculated on patulitrin).

Keywords: Spreading marigold, *Tagetes patula* L., flowers, flavonoids, patulitrin, spectrophotometry, chromatographic analysis, standardization.

References

1. Yershova I.B., Osipova T.F. *Aktual'naya Infektologiya*, 2016, no. 4 (13), pp. 73–81. DOI: 10.22141/2312-413x.4.13.2016.91460. (in Russ.).
2. Kurkina A.V., Galyamova V.R., Kurkin V.A., Avdeyeva Ye.V. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2016, vol. 4, no. 2 (15), pp. 26–40. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-2(15)-26-40. (in Russ.).
3. Kurkin V.A., Avdeyeva Ye.V., Kurkina A.V., Pravdivtseva O.Ye., Braslavskiy V.B. *Meditinskij vestnik Bashkortostana*, 2016, vol. 11, no. 5 (65), pp. 149–152. (in Russ.).
4. Zaytseva Ye.N., Dubishchev A.V., Kurkin V.A. *Nauka i innovatsii v meditsine*, 2016, no. 4, pp. 47–50. (in Russ.).
5. Zimenkina N.I., Kurkin V.A. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*, 2020, no. 1–2, pp. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136. (in Russ.).
6. Kurkina A.V. *Flavonoidy farmakopeynykh rasteniy: monografiya*. [Flavonoids of pharmacopoeial plants: monograph]. Samara, 2012, 290 p. (in Russ.).
7. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. I–IV. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (in Russ.).
8. Lomkina Ye.M., Chervonnaya N.M., Kurkin D.V., Volotova Ye.V., Bakulin D.A., Oganessian E.T., Andreyeva O.A., Tyurenkov I.N. *Farmatsiya*, 2016, vol. 65, no. 3, pp. 37–39. (in Russ.).
9. Papayani O.I., Dukhanina I.V., Sergeyeva O.Ye. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2012, vol. 14, no. 5(3), pp. 742–744. (in Russ.).
10. Nikolayevskiy V.V. *Aromaterapiya: spravochnik*. [Aromatherapy: A Handbook]. Moscow, 2000, 366 p. (in Russ.).
11. Kholikova O., Azonov D.A., Ganiyev Kh.A. *Colloquium-journal*, 2019, no. 11-2 (35), pp. 49–52. DOI: 10.24411/2520-6990-2019-10309. (in Russ.).
12. Malyugina Ye.A., Mazulin A.V., Smoylovskaya G.P. *Nauchnyye trudy SWorld*, 2015, vol. 18, no. 2 (39), pp. 48–52. (in Russ.).
13. Podgornaya Zh.V. *Issledovaniye tsvetkov barkhattsev rasprostertykh (Tagetes patula L.) s tsel'yu polucheniya biologicheskii aktivnykh soyedineniy: diss. ... kand. farm. nauk.* [Study of flowers of prostrate marigolds (*Tagetes patula* L.) in order to obtain biologically active compounds: diss. ... cand. farm. Sciences]. Pyatigorsk, 2008. (in Russ.).
14. Samosudova I.Ye., Boyko N.N., Tsvetkov Z.Ye. *Sovremennyye tendentsii razvitiya tekhnologiy zdorov'ya i obrazovaniya v XXI veke*. [Modern trends in the development of health saving technologies]. Moscow, 2019, pp. 315–319. (in Russ.).
15. Chervonnaya N.M. *Traditsionnaya i innovatsionnaya nauka: istoriya, sovremennoye sostoyaniye, perspektivy*, 2017, pp. 134–138. (in Russ.).
16. Chervonnaya N.M., Andreyeva O.A., Adzhiakhmetova S.L., Oganessian E.T. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 91–98. DOI: 10.14258/jcprm.2018033714. (in Russ.).
17. Chervonnaya N.M., Andreyeva O.A., Kharchenko I.I. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*, 2016, no. 26 (247), pp. 147–151. (in Russ.).
18. Chervonnaya N.M., Oganessian E.T., Andreyeva O.A., Senchenko S.P., Borovskiy B.V. *Zhurnal nauchnykh statey Zdorov'ye i obrazovaniye v XXI veke*, 2017, vol. 19, no. 6, pp. 132–137. (in Russ.).
19. Chervonnaya N.M., Kharchenko I.I., Adzhiakhmetova S.L., Mykots L.P., Andreyeva O.A., Oganessian E.T. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 267–282. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282. (in Russ.).

* Corresponding author.

20. Benea A., Ciobanu C., Cojocaru-Toma M., Ciobanu N. *The Moldovan Medical Journal*, 2020, vol. 63, no. 4, pp. 23–26. DOI: 10.5281/zenodo.4016806.
21. Deepshikha K., Yashodhara V. *Annual Research & Review in Biology*, 2017, vol. 13, no. 6, pp. 1–8. DOI: 10.9734/ARRB/2017/34349.
22. Gongadze M., Machavariani M., Enukidze M., Gogia N., Iobadze M., Chkhikvishvili I. *Georgian Med. News*, 2019, vol. 297, pp. 154–157.
23. Meurer M.C., Mees M., Mariano L.N., Boeing T., Somensi L.B., Mariott M.M., Da Silva R.D., Dos Santos A.C.D., Longo B., França T.C.S., Klein-Junior L., de Souza P., de Andrade S.F., da Silva L.M. *Nutrition research*, 2019, vol. 66, pp. 95–106. DOI: 10.1016/j.nutres.2019.03.005.
24. Nawale S., Padma Priya K., Pranusha P., Ganga Raju M. *Data in Brief*, 2018, vol. 21, pp. 587–597. DOI: 10.1016/j.dib.2018.10.022.

Received February 27, 2021

Revised March 28, 2021

Accepted August 29, 2022

For citing: Kurkin V.A., Saveleva A.E., Kurkina A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 219–229. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2022049243.

