



Технический Комитет по
Стандартизации ТК 45
«Лекарственные Средства»

ВОПРОСЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ





Глубокоуважаемые читатели, коллеги!

XXI век – время бурного развития научно-технического прогресса, результаты которого используются как в повседневной жизни, так и в инновационном секторе государства. Благодаря исследованиям в области медико-биологических наук международное сообщество вышло на новый уровень технологий создания лекарственных средств, их адресной доставки в клетки-мишени, при относительно быстром периоде выведения из организма и минимизации нежелательных явлений.

В настоящее время перед регуляторными органами сферы обращения лекарственных средств стоит острая задача по разработке и внедрению современной системы обеспечения качества, затрагивающий все этапы жизненного цикла лекарственного препарата и отвечающей вызовам времени.

Научно-практический журнал «Вопросы обеспечения качества лекарственных средств» выпускается с 2013 года периодичностью 4 номера в год и является печатным органом Технического комитета «Лекарственные средства» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Ростандарт). Основная цель периодического издания заключается в доведении до научной и профессиональной общественности современных публикаций, посвященных актуальным вопросам нормативно-правового регулирования сферы обращения лекарств, обеспечения их качества, фармацевтического анализа, фармакологии, технологии лекарственных препаратов, экономической оценки фармакотерапии основных нозологий, подготовки и повышении квалификации кадров для фармацевтической отрасли.

Приглашаем всех заинтересованных специалистов к сотрудничеству в наполнении контента журнала и надеемся, что материалы, представленные на страницах нашего издания, будут интересны и полезны для представителей отечественного здравоохранения и фармацевтической отрасли, а также широкого круга специалистов, работающих в сфере обращения лекарственных средств.

С уважением,

Главный редактор, профессор

А.А. Маркарян

Зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

ISSN №2309-6039

ПИ № ФС 77-53661
от 10 апреля 2013 года

© **НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ «ВОПРОСЫ
ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»**

Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного согласия редакции

Адрес редакции: 115088 Москва, ул. Шарикоподшипниковская, д. 9.

РООИ «Здоровье человека»

Ответственный секретарь:

Красильникова

Ксения Алексеевна

Корректор: Дидевич Алексей

Владимирович

Верстка: Ермакова Екатерина

Владимировна

Тел.: 8 (926) 917 61 71

E-mail: journal@humanhealth.ru

www.humanhealth.ru

Индекс в каталоге Агентства «Роспечать» (Издания органов научно-технической информации) по России: 57958

Издательство

РООИ «Здоровье человека»

E-mail: izdat@humanhealth.ru

Полиграфическое

сопровождение:

типография «Московский

печатный двор»

Тел.: (495) 7816411, (495) 5455812,

www.printyard.ru.

Тираж 3000 экз.

Заказ №1715

ISSN 2309-6039 №4 (9) 2015

ВОПРОСЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

JOURNAL OF PHARMACEUTICALS QUALITY ASSURANCE ISSUE

Научно-практический журнал
Центральное рецензируемое издание
Выходит ежеквартально с августа 2013 года
A Quarterly Edition. Published since August 2013

Главный редактор



А.А. Маркарян,
д-р фарм. наук, профессор

Заместители главного редактора



И.В. Маев, д-р мед. наук,
профессор, чл.-кор. РАН



Е.И. Саканян,
д-р фарм. наук, профессор

Ответственный секретарь – К.А. Красильникова, канд. фарм. наук

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Арзамасцев Е.В., д.м.н., профессор (Москва)
Березкин И.М., к.м.н. (Москва)
Борисов А.А., д.ф.н., (Санкт-Петербург)
Вольская Е.А., к.и.н. (Москва)
Глазкова Т.Ю., к.т.н., доцент (Москва)
Даргаева Т.Д., д.ф.н., профессор (Москва)
Дурнев А.Д., д.м.н., профессор, чл.-кор. РАН (Москва)
Евдокимова О.В., д.ф.н. (Москва)
Косова И.В., д.ф.н., профессор (Москва)

Лопатухин Э.Ю., к.ф.н. (Москва)
Лоскутова Е.Е., д.ф.н., профессор (Москва)
Лякина М.Н., д.ф.н. (Москва)
Максимкина Е.А., д.ф.н., профессор (Москва)
Сокольская Т.А., д.ф.н., профессор (Москва)
Солонина А.В., д.ф.н., профессор (Пермь)
Цындымеев А.Г., к.ф.н. (Москва)
Щекин Д.А. (Москва)
Ягудина Р.И., д.ф.н., профессор (Москва)



УДК: 543.544.5.068.7:615.074

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ В СУХОМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ (ЦВЕТКАХ) *CALENDULA OFFICINALIS* L.

П.К. Лаптинская, аспирант, млад. научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва, polinalaptinskaya@gmail.com

Л.П. Воронина, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник, факультет почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, luymila.voronina@gmail.com

Б.Ц. Зайчик, канд. техн. наук, научный сотрудник группы «Аналитическая биохимия» ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва, zaitchik@inbi.ras.ru

В.Н. Ташлицкий, канд. хим. наук, старший научный сотрудник, химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, tashlitsky@genebee.msu.ru

Проведены исследования по разработке методики качественного и количественного определения каротиноидов в цветках *Calendula officinalis* L. методом ВЭЖХ для идентификации и определения содержания данного класса веществ в растительном сырье. Образцы цветков, используемые для методической работы, отобраны с растений, выращенных в 2013–2014 годах в одинаковых условиях при наличии двух различных агрохимических фонов.

Ключевые слова: *Calendula officinalis* L., Календула лекарственная, каротиноиды, определение каротиноидов, метод ВЭЖХ, хроматография.

В последние годы исследование биологически активных веществ, в том числе каротиноидов, извлекаемых из растительного сырья, получило новое направление с появлением современных методов анализа состава лекарственных растений. Одним из таких методов, позволяющих определять

не только общее количество каротиноидов в растении, но и их фракционный состав, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Изучение состава каротиноидов растений приобретает все большую актуальность ввиду их физиологической активности. Каротиноиды входят в состав препаратов, применяемых при лечении воспалительных процессов, ушибов, ожогов, заболеваний сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, помимо этого проведены исследования по изучению противоопухолевой активности данного класса веществ [1,2,3]. Внимание исследователей обращено на проблемы получения качественного сырья, содержащего каротиноиды. Наиболее распространенный путь получения каротиноидов – экстракция из растительного материала, в качестве которого часто используются цветки Календулы лекарственной (*Calendula officinalis*), являющейся доминантой в промышленности данного направления. Для получения качественного сырья в промышленных масштабах необходимо учесть множество факторов, среди которых:

выбор вида растения, позволяющего получить максимальное количество каротиноидов, условий произрастания (свойства почвы, влажность, температурный и световой режимы, питание растений, др.), сроков посева и сбора [4].

Метод ВЭЖХ позволяет с высокой достоверностью оценить изменение биохимического состава растения под воздействием различных факторов, что может позволить корректировать условия выращивания растений и оценивать качество получаемого промышленного сырья. Основными проблемами является отсутствие в литературе ссылок на стандартизованные методики и отсутствие полного описания существующих методов ВЭЖХ, применяемых при работе с каротиноидами. Каждая методика создается исследователями индивидуально и заново [5,6,7], что осложняет работу с опубликованными результатами исследований и снижает вероятность их корректного воспроизводства. Разработка методики определения каротиноидов, включающей в себя полную информацию по условиям проведения, будет способствовать развитию контроля качества сырья, цветков *Calendula officinalis L.*

Цель работы: разработать методику определения состава каротиноидов в цветках Календулы лекарственной на основе ВЭЖХ метода идентификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработка методики и ее подтверждение проводились на образцах цветков Календулы лекарственной сорта «Кальта» (оранжевая; сорт селекции ФГБНУ ВИЛАР), отобранных в 2013–2014 гг. Растения выращены в вегетационных опытах указанных годов на черноземе обыкновенном (место отбора: Воронежская обл., «Каменная степь») с применением различных доз азотного (в форме

соли NH_4NO_3) и цинкового (препарат E-Zn-15 компании Dissolvine) удобрений, схема внесения которых для обоих годов одинакова (вариант 1: без применения удобрений; вариант 2: N – 35 мг/кг почвы, Zn – 50 мг/кг почвы).

Разделение, качественное и количественное определение фракций каротиноидов, содержащихся в цветках Календулы, производилось методом ВЭЖХ, основанным на статье Adela Pinteа et al. 2003 [7] с предварительным выполнением поиска оптимальной системы растворителей и внешних условий для экстракции каротиноидов из цветков Календулы, условий омыления, очистки, а также условий для проведения хроматографирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка образцов к экстрагированию

Для определения фракций каротиноидов в цветках *Calendula officinalis L.* нами была проведена предварительная подготовка образцов к экстрагированию. Каротиноиды являются соединениями, обладающими высокой светочувствительностью, поэтому на всех этапах работы с ними необходимо избегать воздействия света. Растительный материал был высушен при температуре 35°C и при отсутствии света, после чего измельчен на мельнице для помола растительных проб. Хранение образцов производилось в низкотемпературной холодильной камере.

Для химического анализа использовали точную навеску образца массой 0,1000 г. Образец был помещен в сухую ступку (охлажденную жидким азотом), далее заливался жидким азотом и растирался пестиком до состояния пудры. (В случае отсутствия жидкого азота измельчение образца проводят кварцевым песком.) Измельченный образец был перенесен в тefлоновую пробирку объемом 50 мл, изолированную от света алюминиевой фольгой.

Экстрагирование

По итогам предварительного скрининга в качестве экстрагента каротиноидов из образцов Календулы лекарственной была выбрана система растворителей «ацетон-гексан» в присутствии антиоксиданта ионола.

Были приготовлены раствор ионола ($C_{15}H_{24}O$) с концентрацией 10^{-3} моль в литре и система растворителей для экстракции «ацетон-гексан» (2 : 3, v/v) из расчета 50 мл на пробу.

В подготовленную пробирку с навеской вносился раствор ионола (0,1% по объему – 0,05 мл, для получения рабочей концентрации 10^{-6} моль), затем объем был доведен системой растворителей до 50 мл. В закрепленной на встряхивателе (ELMI Rotamix RM-1) закрытой пробирке осуществлялось ротационное перемешивание в течение 15–20 минут, после которого проводилось центрифугирование при программе 3000 об/мин в течение 4,5 минуты. Полученную надосадочную жидкость отфильтровали через воронку со стеклянным фильтром в испарительную колбу А (при этом снаружи фильтр и колба были закрыты фольгой). Промывка фильтра производилась ацетоном. Центрифугат подвергали экстрагированию еще 2 раза по описанной выше схеме с переносом фильтрата надосадочной жидкости в испарительную колбу А. С помощью вакуумного роторного испарителя произвели упаривание растворителей в испарительной колбе А при температуре 30°C, после чего смесь веществ, оставшихся в колбе, дробно по 2 мл растворили в хлороформе (конечный объем 4 мл) и перенесли в виалу из темного стекла (в таком виде можно осуществлять хранение в холодильной камере низких температур).

Омыление

Омыление экстрагированных веществ проводится 30%-ным метанольным раствором КОН. Для выполнения данного этапа полученное ранее извлечение в хлороформе упарили на роторном испарителе. Осушенную смесь

веществ растворили в 10 мл этоксиэтана (диэтилэфир) и затем внесли 1 мл приготовленного метанольного раствора 30%-го КОН. Омыление проводилось при отсутствии света в течение 12 часов, затем содержимое колбы было перенесено в делительную воронку и промыто насыщенным раствором KCl: выдерживали 20–30 минут, после чего отбрасывали образовавшуюся нижнюю фазу. Промывание системы повторялось до полного обесцвечивания нижней фазы. Верхняя фаза была количественно отобрана в затемненный шприц и пропущена через мелкопористый мембранный фильтр в испарительную колбу Б (изолирована от света фольгой). Фильтр промывался этоксиэтаном для полного переноса веществ в колбу Б. Содержимое колбы Б упарили на роторном испарителе, после чего сухой осадок растворили в 2 мл системы «ацетон-гексан» (2 : 3, v/v).

Была попытка произвести хроматографирование без предварительного омыления образца. Разрешение пиков хроматограммы было неудовлетворительным, что говорит о необходимости обязательного проведения этапа омыления, который позволяет очистить экстракт от жирных кислот, восковых эфиров и хлорофилла [8].

Подготовка к работе прибора ВЭЖХ и его параметры

Методика была разработана в 2014 г. на приборе Beckman HPLC System GOLD 126 на образцах цветков Календулы, отобранных в 2013 г. Определение проводилось методом классической обращенно-фазовой ВЭЖХ (RP-HPLC) на колонке с фазой типа C18 (Beckman Ultrasphere 5 μ m ODS column, 250 × 4,6 мм).

Были приготовлены системы элюентов линий А и Б для градиентного элюирования по схеме, предложенной Adela Pintea в 2003 г. [7] (табл. 1, 2). Перед проведением хроматографирования колонку промывали системой линии А в течение часа при ее расходе 1 мл/мин.

Таблица 1

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ, 2014 г.

Подвижная фаза А	ацетонитрил : вода (9 : 1) с 0,25% триэтиламина
Подвижная фаза В	этилацетат с 0,25% триэтиламина
Скорость потока	1 мл/мин
Температура колонки	25°C
Детектор	450 нм
Объем вводимой пробы	20 мкл

ВЭЖХ образца

Для введения пробы в хроматограф было проведено предварительное разведение: аликвоту объемом 0,1 мл перенесли в виалу из затемненного стекла, где разбавили ее в 10 раз (конечный объем 1 мл) системой «ацетон-гексан» (2 : 3, v/v). Условия и программа элюирования представлены в табл. 1, 2.

Подтверждение методики

В 2015 г. была проведена проверка методики экстракции и омыления для образцов цветков Календулы лекарственной, отобранных

Таблица 2

ПРОГРАММА ГРАДИЕНТА, 2014 г.

Время, мин	Состав подвижной фазы		Режим элюирования
	А, %	Б, %	
0 → 10	90 → 50	10 → 50	Линейный градиент
10 → 20	50 → 10	50 → 90	Линейный градиент
20 → 30	10 → 90	90 → 10	Регенерация

в 2014 г. Определение проводили при помощи ВЭЖХ системы Agilent 1100 с диодно-матричным детектором на хроматографической колонке цианопропильной модификации Nucleodur 100-5 CN-RP 5 µm, 125 × 4,6 мм. С условиями проведения анализа и программой элюирования можно ознакомиться в табл. 3, 4.

Были получены 2 серии хроматограмм, различных по разрешению и характеристикам пиков (рис. 1–4). Для хроматограмм, полученных в 2015 г., помимо бета-каротина идентифицированы: флавоксантин, лютеин, зеаксантин, рубиксантин, ликопин, альфа-каротин (рис. 3–4).

Таблица 3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ, 2015 г.

Подвижная фаза А	ацетонитрил : вода (5 : 95)
Подвижная фаза В	ацетонитрил
Скорость потока	1 мл/мин
Температура колонки	25°C
Детектор	450 нм
Объем вводимой пробы	1 мкл

Таблица 4

ПРОГРАММА ГРАДИЕНТА, 2015 г.

Время, мин	Состав подвижной фазы		Режим элюирования
	А, %	Б, %	
0 → 14	40 → 0	60 → 100	Линейный градиент
14 → 18	0	100	Изократический режим
18 → 28	0 → 40	100 → 60	Регенерация

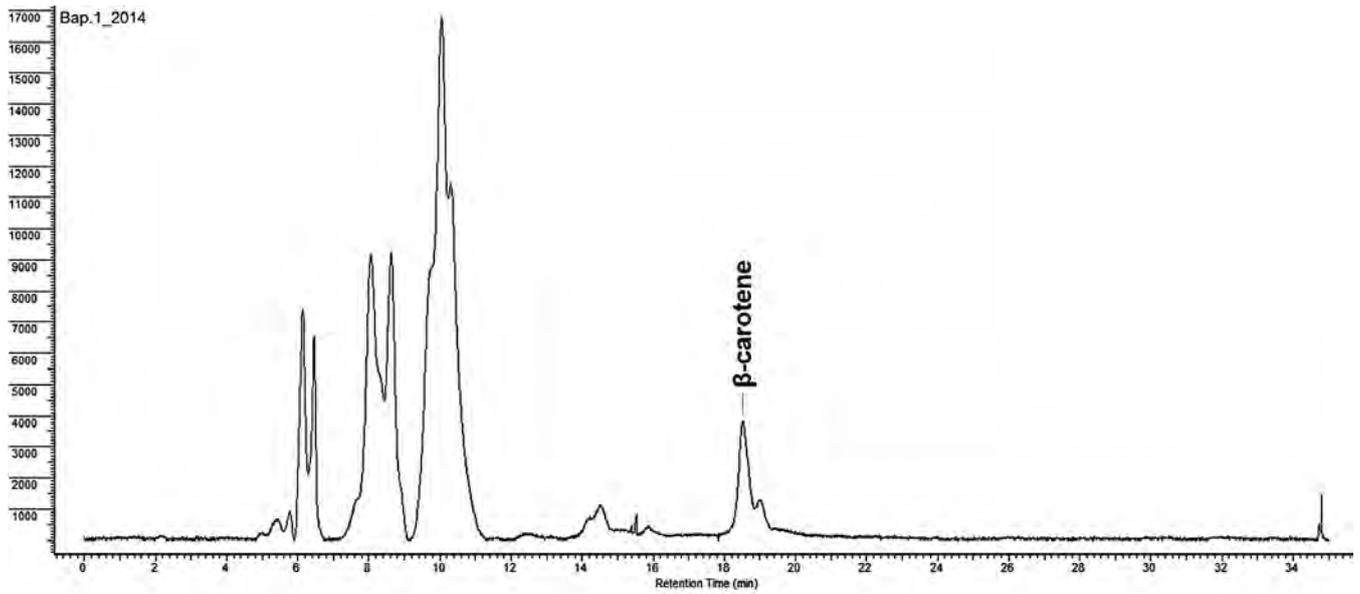


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из цветков *Calendula officinalis* L. Вариант 1. Сбор 2013 г.; колонка Beckman Ultrasphere 5 μ m ODS

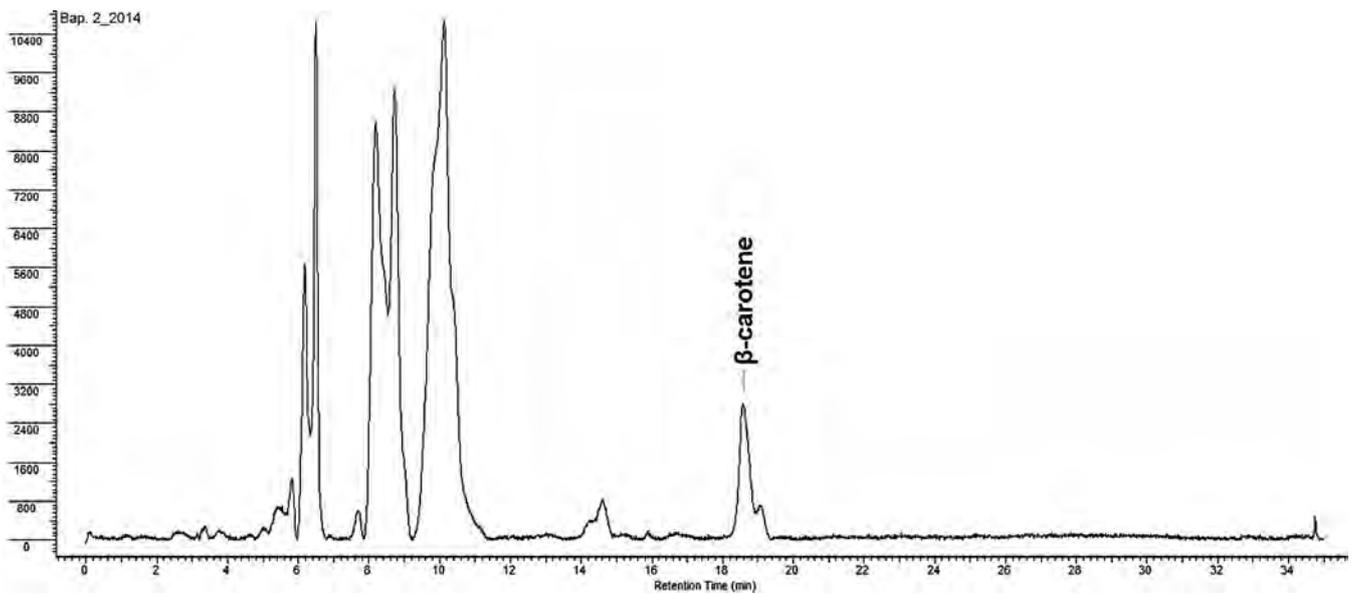


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из цветков *Calendula officinalis* L. Вариант 2. Сбор 2013 г.; колонка Beckman Ultrasphere 5 μ m ODS

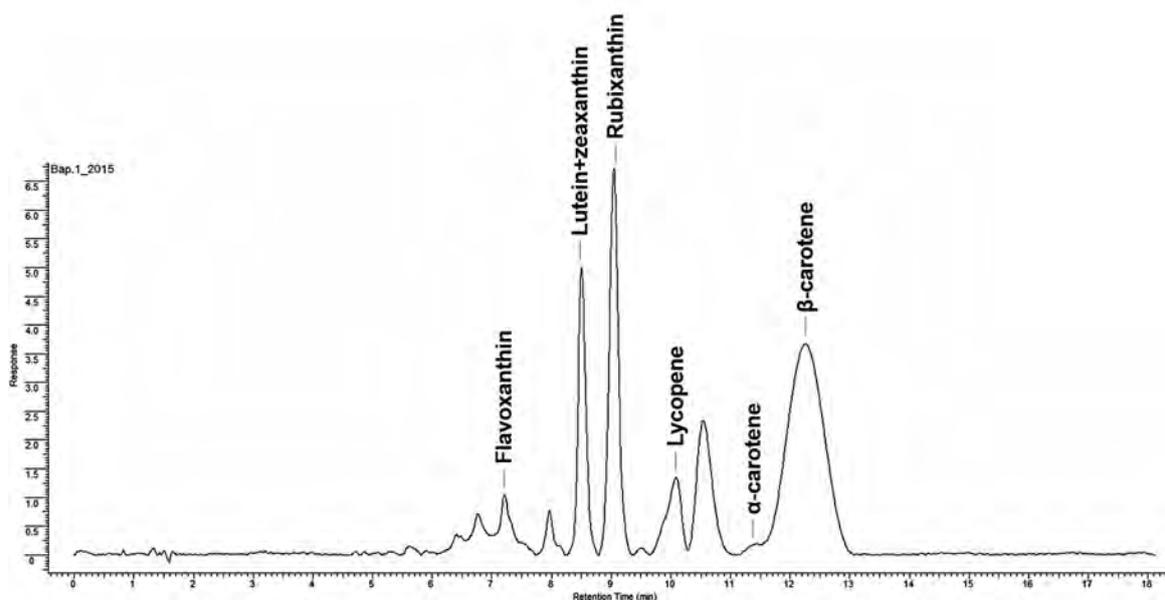


Рис. 3. Хроматограмма извлечения из цветков *Calendula officinalis* L. Вариант 1. Сбор 2014 г.; колонка Nucleodur 100–5 CN-RP 5 μm

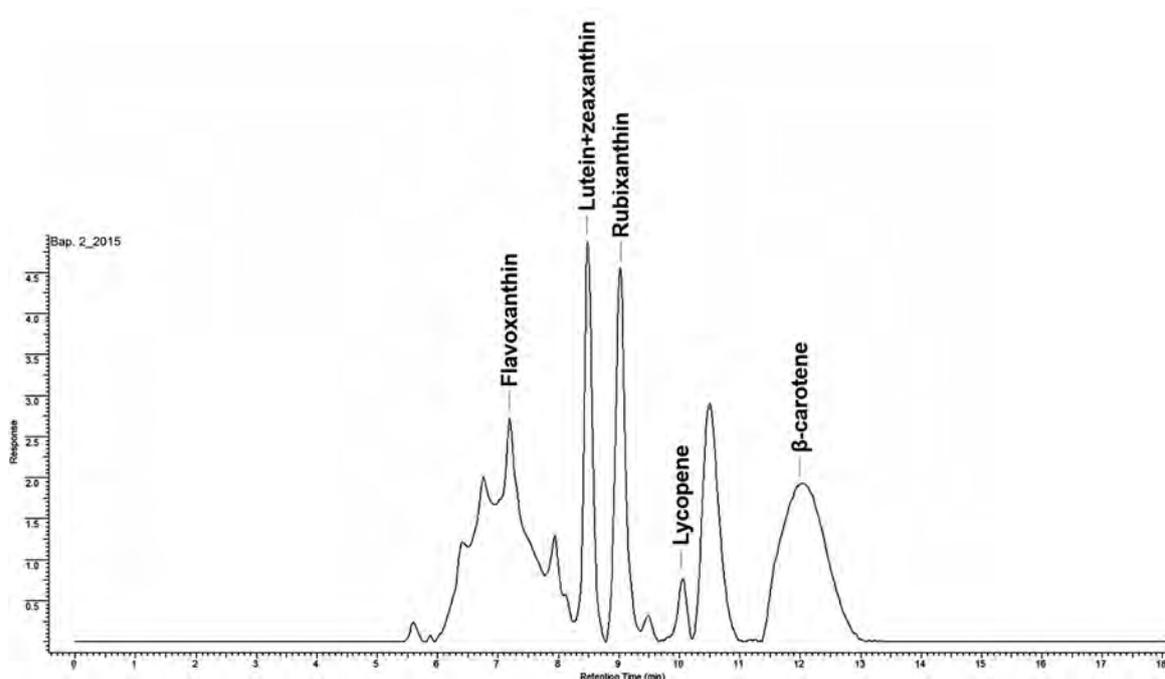


Рис. 4. Хроматограмма извлечения из цветков *Calendula officinalis* L. Вариант 2. Сбор 2014 г.; колонка Nucleodur 100–5 CN-RP 5 μm

ВЫВОДЫ

Предложенный метод экстракции с последующим этапом омыления позволяет наиболее селективно выделить каротиноиды из цветков

Календулы лекарственной для определения качественного и количественного состава данных веществ методом ВЭЖХ.

Хроматограммы извлечений из цветков *Calendula officinalis* L., полученные на колонке

цианопропильной модификации Nucleodur 100-5 CN-RP 5 μm , 125 \times 4,6 мм, обладают лучшим разрешением пиков за счет более высокой селективности стационарной фазы системы к определяемым веществам.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Голубкина Н.А. Биологическое значение каротиноидов / Н.А. Голубкина, О.Н. Пышная, Н.В. Бондарева // *Овощи России*. – 2010. – № 2 (8). – С. 26–40.
2. Малявина В.В. Перспективы расширения спектра медицинского применения бета-каротина / В.В. Малявина, Е.А. Швидко, А.М. Сампиев // *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2010. – № 3-4 (117-118). – С. 122–125.
3. Поляков Н.Э., Лёшина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // *Успехи химии*. – 2006. – № 12 (75). – С. 1175–1192.
4. Sedghi M., Pirzad A., Amanpour-Balaneji B. Light absorption and carotenoid synthesis of Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.) in response and potassium varying levels // *Not. Sci. Biol.* – 2011. – 3 (1). – P. 46–70.
5. Deli J., Matus Z., Toth G. Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis* // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – 48. – P. 2793–2796.
6. Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2005. – 69 (11). – P. 2122–2128.
7. Pinteа A., Bele C., Andrei S., Socaciu C. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers // *Acta Biologica Szegediensis*. – 2003. – 47 (1–4). – P. 37–40.
8. Курегян А.Г., Печинский С.В. Способ получения каротиноидов из растительного сырья // *Современная медицина: актуальные вопросы: Материалы XXI международной заочной научно-практической конференции* – Новосибирск: Изд. «СибАК», 2013. – С. 94–100.

STUDY HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF CAROTENOIDS IN DRY PLANT MATERIAL (FLOWERS) OF CALENDULA OFFICINALIS L.

P.K. Laptinskaya¹, L.P. Voronina²

¹ Federal state budgetary scientific Institution «All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants», Russia, Moscow, polinalaptinskaya@gmail.com

² Moscow State University, Department of Soil Science, Moscow, luydmila.voronina@gmail.com
B.Ts. Zaitcik, Russian Academy of Sciences, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow, zaitchik@inbi.ras.ru
V.N. Tashlitsky, Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, tashlitsky@genebee.msu.ru

Conduct research to development of a methodology for quantitative and qualitative analysis of carotenoids in flowers of *Calendula officinalis* L. by HPLC method to identify and evaluate the content of this class of substance in plant material. Flowers samples grown in 2013 and 2014 under similar conditions at two different agrochemical backgrounds.

Key words: pot marigold, carotenoids, determination of carotenoids, HPLC, chromatography.

ISSN 2309-6039



9 772309 603770 >