

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОДНОЙ И ВОДНО-СПИРТОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ СЫРЬЯ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПРЕДПОСЕВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

С.Н. Шиш

науч. сотрудник, отдел биохимии и биотехнологии растений,
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск)
E-mail: svetlana.shysh@gmail.com

А.Г. Шутова

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел биохимии и биотехнологии растений,
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск)

Ж.Э. Мазец

к.б.н., кафедра общей биологии и ботаники, Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка

Проведен сравнительный анализ содержания полифенолов, флавоноидов, аминокислот, моно- и дисахаридов в экстрактах *Calendula officinalis* L. сорта «Махровый 2000», полученных при использовании разных экстрагентов. Установлены сдвиги в накоплении полифенолов и каротиноидов в соцветиях и жирных кислот в семенах после предпосевной химической и физической обработки.

Ключевые слова: соцветия календулы, семена календулы, спиртовые экстракты, водные экстракты, полифенолы, флавоноиды, каротиноиды, аминокислоты, жирно-кислотный состав, электромагнитное излучение, аминолевулиновая кислота.

Поиск способов повышения качества сырья возделываемых в Беларуси лекарственных растений является актуальным направлением современных исследований. По данным Министерства сельского хозяйства и продовольствия Беларуси, в первой десятке основных лекарственных культур находится календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.). Традиционно используют цветочные корзинки календулы, собранные после полного распускания. Фармакологические свойства лекарственных препаратов из цветков календулы обусловлены содержащимися в них флавоноидами, каротиноидами и сапонинами [1]. Из сырья производят настойки, мази, настои, масла, так как соцветия оказывают противовоспалительное, успокаивающее, бактерицидное, обезболивающее, кроветворное, кровоочистительное, регулирующее иммунитет и обменные процессы действие. Кроме того, препараты календулы обладают кардиотоническим и гипотензивным эффектом, легким сахароснижающим действием и др. [2–5].

Однако в литературе описан преимущественно состав водно-спиртовых или спиртовых экстрактов из соцветий календулы. Водные экстракты, как правило, отличаются своим составом и

практически не изучены, хотя экстракция растительного сырья водой происходит при заваривании фиточаёв, травяных сборов и при изготовлении настоев.

Фармацевтически значимым является масло из соцветий календулы, которое применяется для лечебных целей и рекомендуется как противовоспалительное средство, предназначенное для лечения трудно заживающих ран, язв, пролежней, варикозного расширения вен, ушибов, сыпи и экзем [5]. Масло из семян календулы имеет также ряд положительных свойств. Поскольку в нем содержатся ацилглицериды ненасыщенных кислот, оно рекомендовано для использования в качестве пленкообразующего компонента в красках [6]. Ацилглицериды редких конъюгированных кислот, являющиеся весьма ценными биологически активными соединениями, определяют уникальность масла из семян календулы. В наибольшем количестве в нем встречаются триацилглицериды календовой кислоты (18:3, 8 *транс*, 10 *транс*, 12 *цис*) [7]. Следовательно, семена календулы также могут быть использованы при создании фитопрепаратов целевого назначения, что расширит область применения данного растения, повысит экономиче-

скую эффективность его возделывания и позволит более полноценно использовать потенциал этого лекарственного растения.

Не менее важно изучение вопросов, связанных с направленным регулированием биосинтеза целевых метаболитов для повышения качества лекарственного сырья. Это особенно актуально на дерново-подзолистых почвах в условиях умеренных широт, где возделывание лекарственных растений не всегда является успешным с точки зрения накопления в сырье необходимого количества биологически активных веществ. Для этих целей может быть эффективна предпосевная обработка с использованием низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) в различных частотных режимах и экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в низких и сверхнизких концентрациях.

Цель работы – сравнение состава водных и водно-спиртовых экстрактов из сырья календулы лекарственной и жиронуклеотинового состава из ее семян после различных видов предпосевной обработки: ЭМИ миллиметрового диапазона и экзогенной АЛК в низких и сверхнизких концентрациях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась *Calendula officinalis* L. сорта белорусской селекции «Махровый 2000». Растения этого сорта отличаются кустистостью, сильно облиственные. Высота их 60–70 см. Лист зеленый, опушенный. Соцветие средней плотности, диаметром 7,9 см, расположено на верхушках стебля и боковых побегах, среднее количество соцветий на одном растении 25–32 штук, на цветоносе одно соцветие. Цветок сильно махровый, ярко-оранжевой окраски. Цветонос прочный.

Calendula officinalis L. выращивалась на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». Соцветия собирали в июле месяце 2013–2016 гг. Перед посевом семена обрабатывали ЭМИ в шести частотных режимах в Институте ядерных проблем БГУ:

Режим 1 (53,57–78,33 ГГц, время обработки – 20 мин), Режим 2 (64,0–66,0 ГГц, время обработки – 12 мин), Режим 3 (64,0–66,0 ГГц, время обработки – 8 мин), Режим 4 (64,0–66,0 ГГц, время обработки – 20 мин), Режим 5 (53,57–78,33 ГГц, время обработки – 12 мин), Режим 6 (53,57–78,33 ГГц, время обработки 8 мин), а также АЛК в микро- и нанокон-

центрациях (АЛК 1 – $10^{-6}\%$, АЛК 2 – $10^{-7}\%$, АЛК 3 – $10^{-9}\%$, АЛК 4 – $10^{-11}\%$) [8].

Биохимический анализ водно-спиртовых и спиртовых экстрактов сырья проводили спектрофотометрически по стандартной методике [9] и методом ВЭЖХ [8, 10]. Для выделения каротиноидов использовали ацетоновую экстракцию по Ермаковой [9]; оценку количественного содержания проводили спектрофотометрически, а также методом ВЭЖХ [11]. Для идентификации соединений водного экстракта соцветий и масла из семян календулы использовали метод ЯМР. Спектры ЯМР водных растворов регистрировали на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500, 126 и 202 МГц для ядер ^1H , ^{13}C и ^{31}P соответственно, при температуре 293 К [12]. Запись спектров осуществляли в «количественном» режиме. Протонные и фосфорные спектры накапливались в течение 10 мин, а углеродные – 12 ч. Все экспериментальные данные получали и обрабатывали с помощью пакета программ XWIN – NMR 3.5.

Для идентификации соединений в экстрактах в аналогичных условиях записывали спектры ряда индивидуальных аминокислот, сахаров, жирных кислот. Повторность опытов трехкратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате биохимического анализа спиртовых экстрактов календулы сорта «Махровый 2000» с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии установлено количественное и качественное содержание фенольных соединений, флавоноидов и каротиноидов. Для изучаемого сорта характерно наличие 11 флавоноидов, среди них лидируют нарцисин, тифаниозин и календофлавозид; в составе каротиноидов преобладают β -каротин и лютеин. Данные по количественному составу перечисленных соединений представлены в табл. 1.

Показано, что предпосевные обработки приводят к повышению содержания полифенолов в соцветиях, преимущественно этот сдвиг идет, по нашему мнению, за счет увеличения фракции флавоноидов, что подтверждается в том числе и данными таблицы. В результате полевых опытов (с 2014 по 2016 гг.) выявлено изменение соотношения в накоплении полифенолов в контроле и опыте в разные вегетационные периоды, при этом стабильное повышение содержания фенольных соединений на протяжении трех лет отмечено при обработке АЛК 1.

В результате анализа водных экстрактов соцветий календулы сорта «Махровый 2000» методом ЯМР, идентифицировано ~ 60 моль% соединений.

Среди них 11 аминокислот и 5 моносахаридов: β-фруктопираноза, β-фруктофураноза, α-фруктофуранозы, β-глюкопиранозы и α-глюкопиранозы (табл. 2).

Таблица 1. Содержание основных целевых метаболитов в соцветиях календулы сорта «Махровый 2000»

Вид воздействия	Сумма полифенолов, г/100 г				Сумма флавоноидов, г/100 г			
	Среднее	В том числе по годам			Среднее	В том числе по годам		
		2014	2015	2016		2014	2015	2016
Контроль	1,84	1,34	1,71	2,46	1,92	2,33	0,769	2,65
АЛК 1	2,04	1,43	2,16	2,53	2,55	2,49	2,34	2,83
АЛК 2	1,93	1,56	2,23	1,99	2,38	2,97	2,14	2,03
АЛК 3	1,96	1,51	2,25	2,12	2,22	2,23	2,22	2,23
АЛК 4	1,76	1,65	1,75	1,89	2,09	3,19	1,48	1,62
Режим 1	1,97	1,53	2,01	2,38	2,03	2,00	1,44	2,66
Режим 2	1,88	1,5	1,85	2,28	2,03	2,10	1,54	2,45
Режим 3	1,83	1,23	1,79	2,46	1,82	1,73	1,73	2,00
Режим 4	1,48	–	1,91	2,54	1,33	–	1,72	2,26
Режим 5	1,54	–	1,95	2,68	1,52	–	2,19	2,38
Режим 6	1,43	–	1,91	2,38	1,16	–	1,61	1,86

Примечание: * – в таблице приведены средние значения по выборкам; «–» – содержание не определялось.

Таблица 2. Содержание аминокислот и основных сахаров в водном экстракте (D₂O) соцветий календулы сорта «Махровый 2000», моль%

Основные компоненты	Годы сбора			
	2013	2014	2015	2016
Аланин	1,0	0,9	0,8	0,5
γ-аминомасляная кислоты	2,2	1,3	0,8	1,3
Аспарагин*	4,8	3,6	2,7	3,2
Валин*	1,1	1,1	1,1	0,5
Глутамин	3,1	3,1	2,2	1,3
Изолейцин*	0,9	0,9	0,5	0,6
Лейцин*	0,9	0,9	0,4	0,6
Пролин	6,8	7,7	6,1	10,2
Тирозин	0,3	0,5	0,5	0,2
Треонин*	0,8	0,8	0,7	0,2
Фенилаланин*	1	0,9	1	0,6
β-фруктопираноза	21,9	21,7	21,7	24,4
Сумма сахаров	37,4	38,5	43,2	50,5

Примечание: * – незаменимые аминокислоты.

Отмечено, что преобладающими аминокислотами в соцветиях календулы являются пролин и аспарагин, а из моносахаридов больше всего фруктозы (β -фруктопиранозы). Достаточно высокое суммарное содержание аминокислот в водных экстрактах календулы позволяет рассматривать ее как перспективное средство для использования при заболеваниях, сопровождающихся белковой недостаточностью. Экстракты, полученные с использованием дистиллированной и дейтерированной воды из соцветий разных урожаев сорта «Махровый 2000» по количеству идентифицированных соединений отличаются незначительно, а значит, условия вегетационного периода не оказывают явного негативного влияния на качество растительного сырья календулы.

Установлено, что семена календулы содержат 25% масла. Основные компоненты масла – триацилглицериды, представленные конъюгированной календовой, линолевой и насыщенными кислотами, идентифицированы с помощью ЯМР-анализа. Кроме того, в масле из семян присутствуют в незначительных количествах еще две конъюгированные жирные кислоты, которые обозначили как x1 и x2. Отнесение химических сдвигов для сигналов триацилглицеридов линолевой, пальмитиновой и стеариновой кислоты дано в работе R. Sacchi [13]. Химические сдвиги сигналов календовой кислоты в литературе не найдены. Их отнесение было проведено при помощи корреляционной спектроскопии, а результаты представлены в работе [12].

Количественный анализ показал, что в масле семян календулы сорта «Махровый 2000» содержится: 52,6% календовой кислоты, 24,6% линолевой кислоты, 17,5% насыщенных кислот, 2,1 и

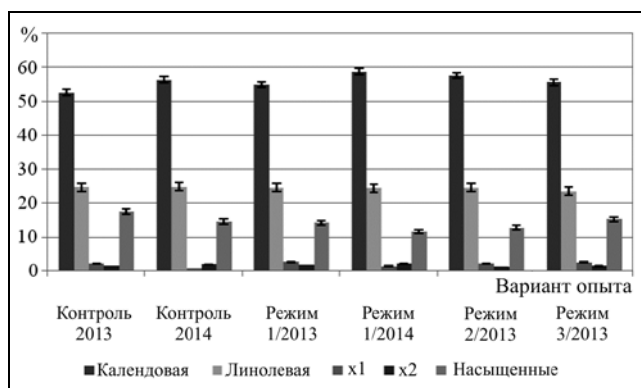
1,4% конъюгированных жирных кислот x1 и x2 соответственно. Также было проанализировано влияние ЭМИ на состав и количество жирных кислот (рисунок).

По результатам двухлетних экспериментов (2013–2014 гг.) установлено, что обработка семян календулы ЭМИ приводит к увеличению количества ненасыщенных жирных кислот.

ВЫВОДЫ

1. Проведенная в 2013–2016 гг. комплексная оценка сырья из календулы лекарственной сорта «Махровый 2000», выращенной на опытном участке Центрального ботанического сада НАН Беларуси, показала, что качественный и количественный составы водных и спиртовых экстрактов календулы лекарственной сорта «Махровый 2000» значительно отличаются по составу. В спиртовых и водно-спиртовых экстрактах данного сорта главными действующими веществами являются флавоноиды (нарцисин, тифаниозин и календофлавозид).
2. В водных экстрактах преобладают моносахариды (до 50%) и аминокислоты (пролин и аспарагин). В качестве перспективного источника конъюгированных кислот для фармацевтических препаратов могут рассматриваться семена календулы ввиду высокого содержания в них календовой кислоты.
3. На основании многолетних исследований по изучению влияния предпосевных обработок на качество лекарственного сырья выявлено, что аминолевулиновая кислота в концентрации 1×10^{-6} % вызывает достоверное увеличение содержания флавоноидов, в то время как эффект от остальных обработок в разные вегетационные периоды нивелируется факторами среды.

Авторы выражают благодарность зав. лаб. физико-химических методов исследования ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», к.х.н. Е.Д. Скаковскому за помощь в проведении ЯМР анализа экстрактов семян календулы, к.ф.-м.н. В.Н. Родионовой и другим сотрудникам лаборатории радиофизических исследований НИИ ЯП БГУ за помощь в проведении физических обработок семян, а также к.б.н. П.С. Шабуне за помощь в проведении ВЭЖХ экстрактов календулы.



Динамика состава жирных кислот масла из семян календулы под влиянием ЭМИ

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркина А.В., Афанасьева П.В., Куркина В.А., Платонов И.А., Павлова Л.В. ВЖЭХ-анализ нарциссина в цветках календулы лекарственной // Фармация. 2016. Т. 65. № 4. С. 30–34.
2. Николайчук Л.В. Целительная сила растений. Рецепты лечения и питания. Мн.: ООО «Красико-Принт». 2002. 352 с.
3. Государственная фармакопея РБ. Т. 2. Статья «Календула цветки (нототков цветки)». Молодечно: «Победа». 2016. 1236 с.
4. Лубсандоржиева П.Б. Антиоксидантная активность экстрактов *Calendula officinalis* L. // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 123–126.
5. Путьрский И.Н., Прохоров В.Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений. Мн.: Книжный дом. 2000. С. 150–154.
6. Дэйнека В.И. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья // Материалы II Всерос. конф. Барнаул. 2005. С. 636–639.
7. Yuan G.F., Chen X.E., Li D. Conjugated linolenic acid and their bioactivities: a review // Food Funct. 2014. Jul 25. V. 5. № 7. P. 1360–1368
8. Шии С.Н. Особенности биосинтеза целевых метаболитов в сырье календулы лекарственной под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения ЭМИ и сверхнизких концентраций экзогенной 5-АЛК // Сб. научн. трудов Междунар. науч.-практич. конф. «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» М.: Щербинская типография. 2016. С. 360–364.
9. Ермакова А.И. Методы биохимического исследования растений. Ленинград: ВО «Агроиздат». 1987. С. 101–111.
10. ГФ РБ. Т. 2. Гинкго листья (количественное определение). Молодечно: Победа. 2008. 333 с.
11. Mieko Kimura, Delia Rodriguez-Amaya Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of g-carotene // Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2003. V. 62. № 1. P. 21–26.
12. Шии С.Н. Применение ЯМР для анализа масла семян календулы (*Calendula officinalis* L.) // Междунар. конф. «Молодежь в науке – 2015». Прил. к журн. «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». В 5 ч. Ч. 1. Серия химических наук. Минск: Беларуская навука. 2016. С. 85–89.
13. Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. ¹H and ¹³C-NMR of virgin olive oil. An overview // Magn. Reson. Chem. 1997. № 35. P. 133–145.

Поступила 16 февраля 2017 г.

EFFICIENCY OF WATER AND WATER-ALCOHOL EXTRACTION OF CALENDULA OFFICINALIS RAW BY USING VARIOUS KINDS OF PRESOWING PROCESSING

© Authors, 2017

S.N. Shysh

Research Scientist, SSI Central Botanical Gardens, NAS of Belarus (Minsk)

E-mail: svetlana.shysh@gmail.com

H.G. Shutava

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, SSI Central Botanical Gardens, NAS of Belarus (Minsk)

Z.E. Mazets

Ph.D. (Biol.), Belarusian State Pedagogical University named M. Tank (Minsk)

Calendula officinalis L. is widely used in medicine, since a large number of therapeutic properties of its inflorescences. Preferably the composition of hydroalcoholic extracts of marigold inflorescences describes in literature. As a rule the aqueous extracts are differ in their composition and practically haven't been studied. The goal of this work was to compare the composition of the aqueous and aqueous-alcoholic extraction of raw materials of calendula and fatty acid composition of its seeds after different types of pre-treatment: electromagnetic radiation (EMR) and 5-aminolevulinic acid (ALA). The object of the study was *C. officinalis* «Terry in 2000». A low power level of EMR for pre-processing (10 mW) in two frequency bands: 1) 64.0 -66.0 GHz; 2) 53,57-78,33 GHz, with exposures of 20, 12 and 8 minutes, and ALA in micro- and nanoconcentrations have been used.

The determination of total polyphenols and flavonoids has been performed on spectrophotometer Agilent 8453. The qualitative and quantitative definition of flavonoids has been conducted on a chromatograph Agilent 1200. The separating components of flavonoids samples has been performed on a column ZORBAX SB-Aqua C18 (3,0×100 mm, 1.8 microns). The identification of compounds of the inflorescences aqueous extract and seed oils has been evaluated by NMR spectrometer AVANCE-500 (Bruker). It was found that in the alcohol and water-alcohol extracts of this variety the main active ingredients are flavonoids (nartsisin, tifaniozin and kalendoflavozid). The monosaccharides to 50%, proline and asparagine are prevailed in aqueous extracts. It is found that ALA (10⁻⁶%) caused a significant increase in the content of flavonoids.

Key words: inflorescences, marigold seeds, alcoholic extracts, aqueous extracts, biochemical composition, polyphenols, flavonoids, carotenoids, amino acids, fatty acid composition, electromagnetic radiation, aminolevulinic acid.

REFERENCES

1. Kurkina A.V., Afanas'eva P.V., Kurkina V.A., Platonov I.A., Pavlova L.V. VZhJeH-analiz narcissina v cvetkah kalenduly lekarstvennoj // Farmacija. 2016. T. 65. № 4. S. 30–34.
2. Nikolajchuk L.V. Celitel'naja sila rastenij. Recepty lechenija i pitaniya. Mn.: OOO «Krasiko-Print». 2002. 352 s.
3. Gosudarstvennaja farmakopeja RB. T. 2. Stat'ja «Kalendula cvetki (nogotkov cvetki)». Molodechno: «Pobeda». 2016. 1236 s.
4. Lubsandorzheva P.B. Antioksidantnaja aktivnost' jekstraktov Salendula officinalis L. // Himija rastitel'nogo syr'ja. 2009. № 4. S. 123–126.
5. Putyrskij I.N., Prohorov V.N. Universal'naja jenciklope–dija lekarstvennyh rastenij. Mn.: Knizhnyj dom. 2000. S. 150–154.
6. Dejneka V.I. Novye dostizhenija v himii i himicheskoj tehnologii rastitel'nogo syr'ja // Materialy II Vseros. konf. Barnaul. 2005. S. 636–639.
7. Yuan G.F., Shen X.E., Li D. Conjugated linolenic acid and their bioactivities: a review // Food Funct. 2014. Jul 25. V. 5. № 7. R. 1360–1368
8. Shish S.N. Osobennosti biosinteza celevyh metabolitov v syr'e kalenduly lekarstvennoj pod vlijaniem nizkointensivnogo jelektromagnitnogo izluchenija JeMI i sverhnizkikh koncentracij jekzogennoj 5-ALK // Sb. nauchn. trudov Mezhdunar. nauch.-praktich. konf. «Biologicheskie osobennosti lekarstvennyh i aromatischeskih rastenij i ih rol' v medicine» M.: Shherbinskaja tipografija. 2016. S. 360–364.
9. Ermakova A.I. Metody biohimicheskogo issledovaniya rastenij. Leningrad: VO «Agroizdat». 1987. S. 101–111.
10. GF RB. T. 2. Ginkgo list'ja (kolichestvennoe opredelenie). Molodechno: Pobeda. 2008. 333 s.
11. Mieko Kimura, Delia Rodriguez-Amaya Carotenoids of tomato and tomato paste: verification of the occurrence of g-carotene // Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2003. V. 62. № 1. P. 21–26.
12. Shish S.N. Primenenie JaMR dlja analiza masla semjan kalenduly (Calendula officinalis L.) // Mezhdunar. konf. «Molodezh' v nauke – 2015». Pril. k zhurn. «Vesci Nacyjanal'naj akadzemii navuk Belarusi». V 5 ch. Ch. 1. Serija himicheskikh nauk. Minsk: Belaruskaja navuka. 2016. S. 85–89.
13. Sacchi R., Addeo F., Paolillo L. 1H and 13C-NMR of Virgin Olive Oil. An overview // Magn. Reson. chem. 1997. № 35. P. 133–145.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Аллизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavenscens* Rerelet Schmalh).

По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Анмарин (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифунгальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Гипорамин (таблетки, мазь, суппозитории, лиофилизат), рег. №№ 98/305/1; 98/305/10; 98/305/12 – противовирусное средство, получаемое из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.)

Глицирам (таблетки, гранулы), рег. №№ 76/252/7; 70/730/48; 88/542/3 – оказывает противовоспалительное стимулирующее действие на кору надпочечников, умеренно отхаркивающее средство, получаемое из корней и корневищ солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru