

Разработка подходов к стандартизации травы монарды дудчатой

А.С. Лапина, В.А. Куркин

Самарский государственный медицинский университет;
Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лапина Анастасия Сергеевна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. Тел.: +7 (960) 821-07-72. E-mail: nstjlapina@rambler.ru

Куркин Владимир Александрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Монарда дудчатая (*Monarda fistulosa* L.) – североамериканский вид растения семейства яснотковых (*Lamiaceae*). Актуальность изучения монарды объясняется высоким бактерицидным действием, которое превышает таковое у некоторых антибиотиков. Кроме того, сырье монарды оказывает противовоспалительное, фунгицидное, антигельминтное, спазмолитическое, иммуномодулирующее, антисеборейное действие. Несмотря на разнообразие фармакологического действия, сырье монарды дудчатой не является фармакопейным и в России, и за рубежом. Для введения травы монарды дудчатой в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, включая разработку нормативной документации, подтверждающей качество лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой.

Материал и методы. Объектом исследования служила трава монарды дудчатой, заготовленная в июле 2016–2018 гг. в Ботаническом саду Самарского университета. Спектрофотометрическое определение и получение УФ-спектров извлечений выполняли на спектрофотометре «Spesod 40» (Analytik Jena).

Результаты. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца цинарозида при аналитической длине волны 394 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,23\%$. С помощью разработанной методики проанализировали ряд образцов травы монарды дудчатой. Содержание суммы флавоноидов в образцах сырья варьирует от $3,92 \pm 0,4$ до $4,28 \pm 0,1\%$ (в пересчете на цинарозид).

Заключение. Для стандартизации травы монарды дудчатой предложена спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов. В качестве нижнего предела рекомендовано содержание суммы флавоноидов не менее $3,0\%$.

Ключевые слова: монарда дудчатая, *Monarda fistulosa* L., трава, стандартизация, флавоноиды, спектрофотометрия, цинарозид.

Для цитирования: Лапина А.С., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации травы монарды дудчатой. Фармация, 2019; 68 (4): 11–16. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-04-02>

ELABORATION OF APPROACHES TO STANDARDIZING WILD BERGAMOT (*MONARDA FISTULOSA* L.) HERB

A.S. Lapina, V.A. Kurkin

Samara State Medical University, 89, Chapaevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lapina Anastasia Sergeevna – postgraduate Department of pharmacognosy with botany and the basics of phytotherapy, Samara State Medical University. Tel.: +7 (960) 821-07-72. E-mail: nstjlapina@rambler.ru

Kurkin Vladimir Alexandrovich – doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University. Tel.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

SUMMARY

Introduction. Wild bergamot (*Monarda fistulosa* L.) is a North American species of the plant of the family *Lamiaceae*. The relevance of the study of wild bergamot is due to the high bactericidal effect exceeding that of some antibiotics. In addition, the wild bergamot raw material has anti-inflammatory, fungicidal, anthelmintic, antispasmodic, immunomodulatory, and antiseborrheic activities. Despite a variety of pharmacological effects, the wild bergamot raw material is not pharmacopoeial in both Russia and foreign countries. For introduction of wild bergamot herb into the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, it is necessary to conduct a set of pharmacognostic studies, including the development of regulatory documentation confirming the quality of medicinal plant raw material.

Objective: to develop a procedure for the quantitative determination of the amount of flavonoids in the wild bergamot herb.

Material and methods. The object of the investigation was wild bergamot herb harvested in the Samara University Botanical Garden in July 2016–2018. The UV spectra of its extracts were spectrophotometrically measured and obtained on a Specod 40 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany).

Results. A procedure was developed to quantify the amount of flavonoids in the wild bergamot herb with the differential spectrophotometric method using the state standard sample of cynaroside at an analytical wavelength of 394 nm. The error of a measurement at a 95% confidence interval is $\pm 2.23\%$. The developed procedure was used to analyze a number of wild bergamot herb samples. The amount of flavonoids in the raw material samples ranged from $3.92 \pm 0.4\%$ to $4.28 \pm 0.1\%$ (in terms of cynaroside).

Conclusion. A spectrophotometric method for quantifying the amount of flavonoids was proposed for the standardization of wild bergamot herb. The flavonoid amount of less than 3.0% was recommended as the lower limit.

Key words: wild bergamot, *Monarda fistulosa* L., herb, standardization, flavonoids, spectrophotometry, cynaroside.

For citation: Lapina A.S., Kurkin V.A. Elaboration of approaches to standardizing wild bergamot (*Monarda fistulosa* L.) herb. Farmatsiya (Pharmacy), 2019; 68 (4): 11–16. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-02>

Введение

Монарда дудчатая – *Monarda fistulosa* L., семейство яснотковых *Lamiaceae*, – культивируемое декоративное пряно-ароматическое растение [1]. В траве монарды дудчатой содержится эфирное масло, главными компонентами которого являются тимол и карвакрол. Кроме того, в траве растения содержатся фенольные соединения, основные из них – флавоноиды [2, 3]. За счет эфирного масла трава монарды применяется в качестве противовоспалительного, антимикробного средства. Трава монарды оказывает также фунгицидное, антигельминтное, спазмолитическое, иммуномодулирующее, антисеборейное действие [4, 5, 6].

Наряду с эфирным маслом, существенный вклад в фармакологический эффект вносят флавоноиды [7]. Считаем, что в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов, необходимо определение не только содержания эфирного масла, но и действующих веществ гидрофильной природы, к которым относят флавоноиды данного растения.

Показана возможность количественного определения в траве монарды суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 390 нм. Извлечение получали методом трехкратной экстракции спиртом этиловым 70%. При этом содержание флавоноидов в пересчете на рутин в сырье составляло $0,48 \pm 0,01\%$. Существует также метод определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин [7]. В качестве экстрагента был выбран 50% спирт этиловый, соотношение сырье–экстрагент – (1:30), аналитическая длина волны – 398 нм, использована двукратная экстракция в течение 30 мин. Согласно этой методике, содер-

жание суммы флавоноидов в монарде дудчатой было $1,57 \pm 0,02\%$. Принимая во внимание противоречивость в подходах к количественному определению флавоноидов в траве монарды дудчатой, актуально продолжать исследования в этом направлении.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой.

Материал и методы

Объектом исследования служила трава монарды дудчатой, заготовленная в июле 2016–2018 гг. в Ботаническом саду Самарского университета. Спектрофотометрическое определение флавоноидов и получение УФ-спектров извлечений проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena).

Результаты и обсуждение

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой изучали УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из сырья (рис. 1, 2). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения монарды дудчатой установлен батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов как у цинарозида (рис. 3). Изучение УФ-спектров ГСО цинарозида показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 394 нм (см. рис. 3). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из травы монарды дудчатой в дифференциальном варианте обнаруживается при длине волны 394 нм максимум поглощения (рис. 4), который соответствует максимуму спиртового раствора цинарозида. Таким образом, цинарозид может быть использован в методике анализа в качестве ГСО.

Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов установлены оптимальные условия экстракции флавоноидов в траве монарды дудчатой: экстрагент – 60% этиловый спирт; соотношение сырье–экстрагент – 1:50; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин (табл.1).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60%

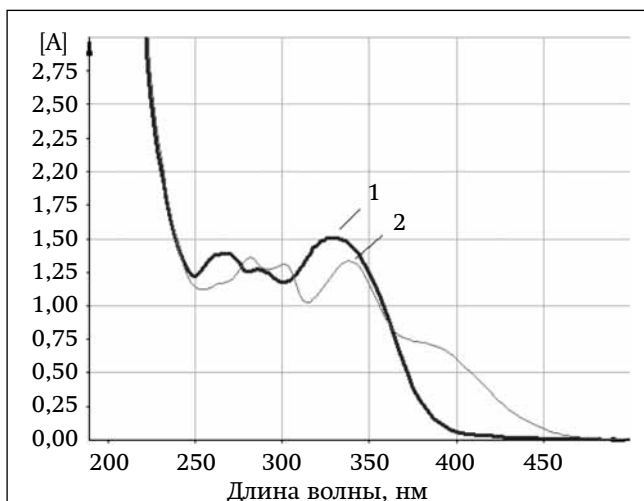


Рис. 1. УФ-спектры водно-спиртового извлечения из травы монарды дудчатой (1) и извлечения с добавлением алюминия хлорида (2)

Fig. 1. UV spectra of aqueous alcoholic extract from wild bergamot (*Monarda fistulosa* L.) herb and its extract added by aluminum chloride (2)

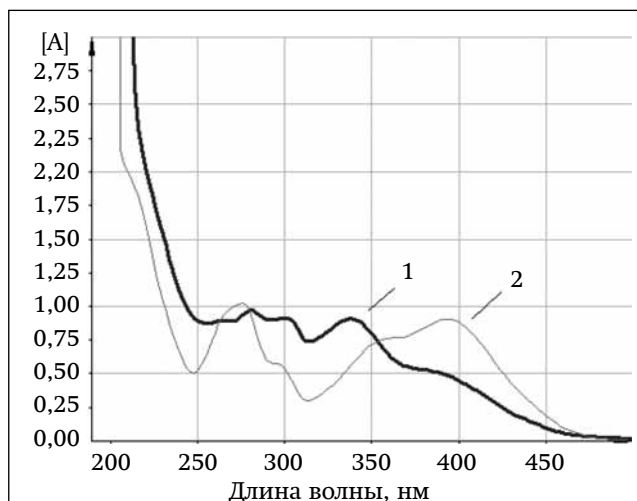


Рис. 2. УФ-спектры водно-спиртового извлечения из травы монарды дудчатой с добавлением алюминия хлорида (1) и раствора цинарозида с добавлением алюминия хлорида (2)

Fig. 2. UV spectra of aqueous alcoholic extract from wild bergamot herb added by aluminum chloride (1) and cynaroside solution and aluminum chloride (2)

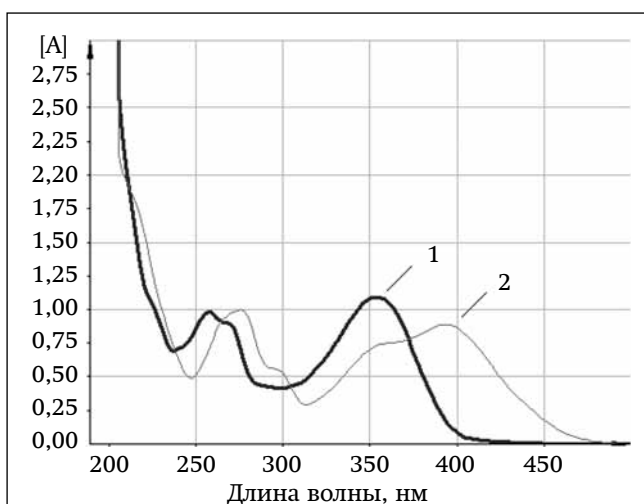


Рис. 3. УФ-спектры спиртового раствора цинарозида (1) и раствора цинарозида с добавлением алюминия хлорида (2)

Fig. 3. UV spectra of alcoholic solution of cynaroside (1) and cynaroside solution added by aluminum chloride (2)

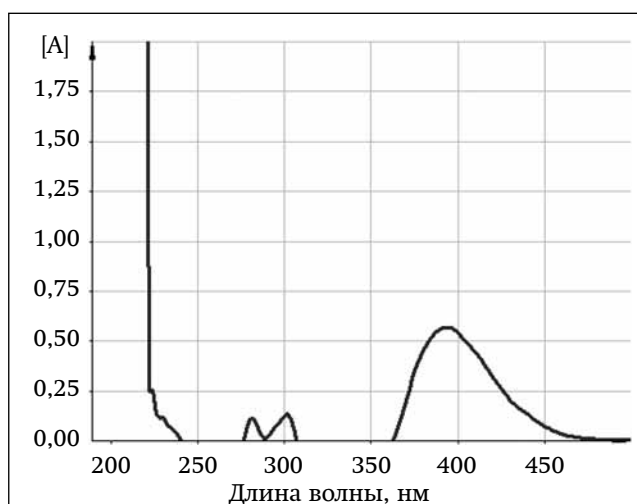


Рис. 4. УФ-спектр водно-спиртового извлечения из травы монарды дудчатой (дифференциальный вариант)

Fig. 4. UV spectrum of aqueous alcoholic extract from wild bergamot herb (a differential version)

этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

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 спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 394 нм через 40 мин после приготовления. Раствором сравнения служит раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

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

$$x = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО цинарозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО цинарозида, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия стандартного образца цинарозида целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 350.

$$x = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 350 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО цинарозида, г; 350 – удельный показатель поглощения (E) ГСО цинарозида при 394 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Примечание: Приготовление раствора стандартного образца цинарозида. Около 0,025 (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А цинарозида). 5 мл раствора А цинарозида помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б цинарозида). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 394 нм. Раствором сравнения служит следующий раствор: 5 мл раствора А цинарозида помещают в мерную кол-

Влияние различных факторов на полноту извлечения суммы флавоноидов из травы монарды дудчатой

Influence of various factors on the complete extraction of the amount of flavonoids from wild bergamot herb

Таблица 1

Table 1

| Экстрагент | Соотношение сырье: экстрагент | Время экстракции, мин | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье, % |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------|--|
| 40% этиловый спирт | 1:30 | 60 | 2,80 \pm 0,02 |
| 50% этиловый спирт | | | 3,39 \pm 0,03 |
| 60% этиловый спирт | | | 4,16 \pm 0,03 |
| 70% этиловый спирт | | | 3,41 \pm 0,03 |
| 80% этиловый спирт | | | 3,25 \pm 0,03 |
| 96% этиловый спирт | | | 1,24 \pm 0,04 |
| 60% этиловый спирт | 1:30 | 30 | 4,64 \pm 0,02 |
| | | 45 | 4,79 \pm 0,01 |
| | | 90 | 4,52 \pm 0,02 |
| | | 120 | 4,49 \pm 0,01 |
| | 1:50 | 45 | 4,08 \pm 0,02 |
| | | 60 | 4,28 \pm 0,01 |
| 1:100 | 45 | 4,59 \pm 0,02 | |

бу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б цинарозида).

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки полученных данных свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,23$ %.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы монарды дудчатой и цинарозида с алюминия хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,00520 до 0,02080 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99997. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора цинарозида с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору. Средний процент восстановления составил 98%.

По разработанной методике проанализировали образцы травы монарды дудчатой (табл. 3). Установлено, что содержание суммы флавоноидов варьирует от 3,92 до 4,28%. Таким образом, в качестве нижнего предела для сырья данного растения можно рекомендовать содержание суммы флавоноидов не менее 3,0%.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации травы монарды дудчатой путем определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 394 нм в пересчете на цинарозид.

Заключение

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды

Таблица 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой

Table 2

Metrological characteristics of procedure for quantifying the amount of flavonoids in the wild bergamot herb

| f | \bar{X} | S | P, % | t (P, f) | $\pm X$ | E, % |
|----|-----------|--------|------|----------|-------------|------------|
| 10 | 4,28 | 0,4722 | 95 | 2,23 | $\pm 0,095$ | $\pm 2,23$ |

Таблица 3

Содержание суммы флавоноидов в траве монарды дудчатой

Table 3

The amount of flavonoids in wild bergamot herb

| Характеристика образца сырья (место и время заготовки) | Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье, % |
|---|--|
| Ботанический сад Самарского университета (июль 2016 г.) | 3,92 \pm 0,40 |
| Ботанический сад Самарского университета (июль 2017 г.) | 4,28 \pm 0,10 |
| Ботанический сад Самарского университета (июль 2018 г.) | 4,26 \pm 0,20 |

дудчатой методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием ГСО цинарозида при аналитической длине волны 394 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,23$ %. Содержание суммы флавоноидов в сырье колеблется от 3,92 до 4,28%. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать для травы монарды дудчатой нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 3,0%.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

- Харченко В.А., Беспалько Л.В., Гинс В.К., Гинс М.С., Байков А.А. Монарда – ценный источник биологически активных соединений. Овощи России, 2015; 1 (26): 31–5.
- Опарин Р.В., Покровский Л.М., Высочина Г.И., Ткачев А.В. Исследование химического состава эфирного масла *Monarda fistulosa* L. и *Monarda didyma* L., культивируемых в условиях Западной Сибири. Химия растительного сырья, 2000; 3: 19–24.

3. Федотов С.В. Эфирные масла монард видов *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda citriodora* Cervantes ex Lag., их хемотипы и биологическая активность. Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада, 2015; 141: 131–47.

4. Жилиякова Е.Т., Новиков О.О., Науменко Е.Н. и др. Исследование низкомолекулярных биологически активных соединений растительного происхождения как перспективных агентов для профилактики и лечения себореи. Кубанский научный медицинский вестник, 2010; 8 (122): 68–72.

5. Науменко Е.Н., Жилиякова Е.Т., Новиков О.О., Кричковская Л.В., Ванхин О.А. Исследование противовоспалительной активности суппозиторий «Монавитол» *in vivo*. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация, 2012; 20 (22-1): 195–8.

6. Шагалиева Н.Р. Экспериментальное обоснование методик качественного и количественного анализа нового комплексного лекарственного фитопрепарата для челюстно-лицевой хирургии и стоматологии. Аспирантский вестник Поволжья, 2011; 5–6: 276–9.

7. Красюк Е.В., Пупыкина К.А. Качественный анализ и разработка методики количественного определения флавоноидов в видах монарды, интродуцируемых в Республике Башкортостан. Медицинский вестник Башкортостана, 2016; 5: 70–7.

fistulosa L. essential oil and *Monarda didyma* L. cultivated in the conditions of Western Siberia. Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2000; 3: 19–24 (in Russian).

3. Fedotov S.V. *Monarda* essential oils of *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda citriodora* Cervantes ex Lag. their chemotypes and biological activity. Sbornik nauchnykh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada, 2015; 141: 131–47 (in Russian).

4. Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Naumenko E.N. et al. Research of low-molecular biologically active phytochemicals as perspective agents for preventing and treatment of seborrhea. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik, 2010; 8 (122): 68–72 (in Russian).

5. Naumenko E.N., Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Krichkovskaya L.V., Vankhin O.A. The search of anti-inflammatory activity of suppositories «Monavitol» *in vivo*. Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya, 2012; 20 (22-1): 195–8 (in Russian).

6. Shagalieva N.R. The experimental grounds of approaches to qualitative and quantitative analysis of a new complex phyto-preparation medicine for maxillofacial surgery and dentistry. Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya, 2011; 5-6: 276–9 (in Russian).

7. Krasnyuk E.V., Pupykina K.A. Qualitative analysis and development of methods of quantification of flavonoids in *Monarda* species introduced in the Republic of Bashkortostan. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana, 2016; 5: 70–7 (in Russian).

References

1. Kharchenko V.A., Bepalko L.V., Gins V.K., Gins M.S., Baikov A.A. *Monarda* – a valuable source of biologically active compounds. *Ovoshchi Rossii*, 2015; 1 (26): 31–5 (in Russian).
2. Oparin R.V., Pokrovskii L.M., Vysochina G.I., Tkachev A.V. The investigation of the chemical composition of the *Monarda*

Поступила 28 сентября 2018 г.

Received 28 September 2018

Принята к публикации 20 ноября 2018 г.

Accepted 20 November 2018