

На правах рукописи

Афанасьева Полина Валериевна

**КОМПЛЕКСНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
(*CALENDULA OFFICINALIS L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2017

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент **Куркина Анна Владимировна**

Официальные оппоненты:

Белоногова Валентина Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, заведующий кафедрой

Буланова Анджела Владимировна – доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», кафедра физической химии и хроматографии, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск

Защита состоится «___» _____ 2017 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, проспект К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета Д 208.085.06,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В соответствии с Указами Президента Российской Федерации «Стратегии лекарственного обеспечения населения до 2025 года» и «Стратегии развития фармацевтической промышленности до 2020 года», импортозамещение лекарственных препаратов для страны становится более значимо. Фитопрепараты обладают рядом преимуществ по сравнению с лекарственными средствами синтетического происхождения: относительно низкий риск развития аллергии, более мягкий терапевтический эффект, достаточно широкий спектр терапевтического действия и безопасность (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007; Самылина И.А. и др., 2003; 2010).

Одним из наиболее известных лекарственных растений является календула лекарственная (ноготки лекарственные, *Calendula officinalis* L.), которая массово культивируется в Российской Федерации, причем в виде сортов, отличающихся высокой продуктивностью («Кальта», «Рыжик» и др.). Обширный спектр фармакологической активности цветков календулы (противовоспалительные, регенерирующие, антимикробные, желчегонные, отхаркивающие свойства) обоснован наличием разнообразных классов биологически активных веществ, а именно: каротиноидов, флавоноидов (гликозиды кемпферола, кверцетина и изорамнетина), сапонинов. Данный фактор делает календулу высокоперспективным ресурсом новых лекарственных растительных препаратов.

В настоящее время на территории РФ получают лишь один вид лекарственного растительного сырья, являющийся фармакопейным – цветки календулы. При этом огромное количество фитомассы растения (до 90%) не используется в медицинской практике.

Наряду с этим, в Европе трава календулы является фармакопейным видом лекарственного растительного сырья. Также литературный обзор показал интерес ряда отечественных и зарубежных ученых (Вечерко Л.П. 1971-1973, Wirginia Janiszowska W., 2005) к изучению корней календулы лекарственной в связи с содержащимися в них тритерпеновыми сапонинами, обуславливающими отхаркивающее действие, что свидетельствует об актуальности комплексного изучения данного растения.

Кроме того, актуальным является создание высокопродуктивной базы календулы лекарственной.

Актуальным является и вопрос стандартизации фармакопейного вида цветков календулы лекарственной сорта «Кальта», культивируемой на территории Самарской области. Необходим пересмотр и доработка методов качественного и количественного анализа, отвечающих современным требованиям.

Помимо фитохимических методов остро стоит и вопрос диагностики новых видов сырья методом морфолого-анатомического анализа. Таким образом, очевидна необходимость проведения сравнительного морфолого-анатомического исследования для выявления видовых

диагностических признаков для подземной и надземной части календулы лекарственной.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день представлены методики стандартизации цветков календулы и фитопрепаратов данного растения с использованием различных аналитических методов, однако они не лишены ряда недостатков. Кроме того, морфолого-анатомические признаки цельного и измельченного сырья календулы лекарственной, диагностические признаки некоторых частей растения изучены в недостаточной степени.

Методики, применяемые в анализе сырья и препаратов календулы лекарственной, не всегда основаны на особенностях химического состава календулы лекарственной, поэтому в недостаточной степени специфичны. Так, в разделе «Подлинность» ФС.2.5.0030.15 (ГФ Российской Федерации XIII издания) предусматривается определение рутина в испытуемом сырье, однако доминирующим и диагностически значимым флавоноидом данного сырья является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина). В разделе «Количественное определение» представлен анализ флавоноидов, однако не предусмотрено количественное определение ведущей группы БАС – каротиноидов, тем более, что определение β -каротина предусмотрено в разделе «Подлинность» ГФ Российской Федерации XIII издания.

В научной литературе отображены результаты исследований по возможности использования остатков производства лекарственных средств из цветков календулы, однако до сих пор задача сбережения ресурсов не решена в полном объеме (Бурцева И.В. и др., 2004).

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является комплексное фармакогностическое исследование календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) по обоснованию методов стандартизации сырья и фитопрепаратов ноготков.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Морфологическое и анатомическое изучение целевых лекарственных растительных объектов (плоды, корни).
2. Изучение химического состава надземной и подземной частей ноготков в сравнительном аспекте (плоды, цветки, стебли, листья, корни).
3. Модификация методик качественного анализа цветков ноготков лекарственных.
4. Модификация методик количественного анализа цветков ноготков лекарственных.
5. Изучение показателей качества цветков календулы лекарственной.
6. Исследование фармакологического действия фитопрепаратов на основе календулы лекарственной.
7. Научное обоснование состава и методики получения сиропов ноготков лекарственных.
8. Разработка методик качественного анализа сиропов ноготков лекарственных.

9. Разработка методик количественного анализа сиропов на основе календулы лекарственной.
10. Изучение показателей сиропов календулы лекарственной.
11. Разработка проекта ФС на цветки календулы лекарственной.

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование корней календулы лекарственной позволило впервые выявить диагностические признаки, характерные для данного вида сырья.

Обоснованы методики анализа цветков и препаратов календулы лекарственной, основанные на определении действующих и диагностических веществ (нарциссина и β -каротина) методами ТСХ, УФ-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

Изучение химического состава надземной и подземной частей календулы лекарственной предоставило возможность обосновать рациональность их комплексного применения.

Разработаны состав и способ получения лекарственного препарата на основе цветков календулы лекарственной - «Календулы лекарственной цветков сиропа».

Научная новизна диссертационных исследований подтверждена патентом № 2095227 Российской Федерации (2015) «Способ определения соответствия хроматографических пиков одному и тому же компоненту и устройство для его осуществления» и патентом № 2599016 Российской Федерации (2016) «Способ количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной».

Теоретическая и практическая значимость работы.

Модифицированы методики количественного определения флавоноидов и каротиноидов методом спектрофотометрии. Модификация заключается во введении расчетных значений показателя поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$. Разработана методика количественного анализа цветков календулы лекарственной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, заключающаяся в определении доминирующего и диагностически значимого флавоноида - нарциссина.

Разработаны состав и способ получения лекарственного препарата «Календулы лекарственной цветков сироп». Определены показатели качества данного препарата, в том числе содержание суммы флавоноидов.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационных исследований, используются в учебном процессе на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», а также в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы».

Методология и методы исследования. Методология построена на изучении и обобщении данных отечественных и зарубежных авторов по фармакогностическому изучению календулы лекарственной, оценке степени разработки и актуальности указанной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

В качестве объектов исследования использовались надземная и подземная части представителей календулы лекарственной сорт «Кальта», заготовленные в различные фазы вегетации в Самарской области, а также препараты, полученные из цветков календулы лекарственной. Исследования осуществляли с использованием цифровой микроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии, газожидкостной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. Помимо этого, в работе применялись различные гистохимические и пробирочные реакции на определенные группы БАС. Математическую обработку данных проводили с применением компьютерных программ согласно методике, которая описана в ГФ РФ XIII издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационное исследование выполнено согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Полученные результаты морфологического и анатомического изучения плодов и корней календулы лекарственной.
2. Результаты фитохимического исследования различных органов календулы лекарственной.
3. Результаты изучения и разработки методик качественного и количественного анализов календулы лекарственной.
4. Результаты изучения и разработки способа получения лекарственного препарата на основе цветков календулы лекарственной («Календулы лекарственной цветков сироп»).
5. Результаты исследований по стандартизации лекарственных препаратов на основе цветков календулы лекарственной и разработке методик их количественного анализа.
6. Разработанные показатели качества цветков календулы лекарственной, а также разработанного лекарственного препарата – «Календулы лекарственной цветков сироп».
7. Результаты исследования фармакологической активности препаратов на основе цветков календулы лекарственной.

Степень достоверности. Достоверность результатов проведенного научного исследования подтверждена эмпирическими данными, полученными с использованием микроскопического метода, актуальных

физико-химических и спектральных методов: ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ГЖХ, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различных химических превращений.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на III и IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2015; 2016); на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения «Молодые ученые - медицине» (Самара, 2013; 2014; 2015; 2016); на Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» (Пенза, 2011); на VIII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы использования и охраны природных ресурсов России» (Самара, 2012; 2015); на XII Всероссийском молодежном самарском конкурсе-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2014).

Проведение диссертационного исследования фрагментарно осуществлялось в рамках конкурса У.М.Н.И.К.-2012.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 30 научных работ, из них 11 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ и 2 патента РФ на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Результаты работы применяются в образовательном процессе на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре управления и экономики фармации Самарского государственного медицинского университета, в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы» и ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Персональное участие автора заключается в выполнении исследований по изучению морфологических, анатомических и гистологических особенностей строения надземной и подземной частей календулы лекарственной, выявлении их диагностических признаков. Исследован и проанализирован химический состав различных частей календулы лекарственной, определена химическая структура соединений, которые были выделены из сырья в виде индивидуальных веществ. Произведена модификация методик анализа цветков календулы лекарственной и препаратов данного растения. Предложены методики анализа сиропов календулы лекарственной. Определена динамика накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной в период вегетации. Разработаны состав и технология получения препарата – «Календулы лекарственного цветков сироп». Для препаратов календулы установлена фармакологическая активность. Автором разработаны методики качественного и количественного анализа фитопрепаратов методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии. Автором предложен проект ФС «Календулы лекарственной цветки».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2 - «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 - «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 - «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и 6 - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Объем и структура работы. Диссертация представлена на 174 страницах машинописного текста, изложенные данные иллюстрированы 40 рисунками и представлены 25 таблицами. Работа состоит из введения, литературного обзора, объектов и методов исследования, 4 глав, в которых указаны результаты собственных исследований, итогов выполненного исследования, рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы, который включает в себе 203 источника, в том числе 139 отечественных и 64 иностранных.

Во введении указана актуальность темы исследования, представлены цель и задачи, сформулированы научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования, описаны основные положения, выносимые на защиту, а также сведения о публикациях и апробации работы.

В главе 1 проанализирован литературный обзор о состоянии исследований отечественных и зарубежных авторов в области изучения календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.). В представленной главе приведены существующие данные о химическом составе различных частей календулы лекарственной, по использованию сырья ноготков в конвенциональной и альтернативной медицине. Изложены аспекты стандартизации сырья календулы лекарственной, используемые в Российской Федерации и в других странах.

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. Описаны методики установления подлинности и количественной оценки содержания БАС в сырье и препаратах календулы лекарственной.

В главе 3 уделено внимание морфологическому и анатомическому изучению плодов и подземной части календулы лекарственной.

В главе 4 приводятся результаты фитохимических исследований различных частей календулы лекарственной. Описаны результаты выделения индивидуальных БАС из цветков календулы лекарственной, установлена их структура.

В главе 5 изложены результаты разработки методик качественного анализа сырья ноготков лекарственных, методик определения количественного содержания БАС в сырье календулы лекарственной, а также выявление динамики накопления БАС в листьях и стеблях календулы лекарственной.

Глава 6 включает в себя исследования по разработке состава и методов стандартизации сиропа цветков календулы лекарственной, а также анализ оценки определенного фармакологического действия произведенных фитопрепаратов календулы.

Диссертационная работа завершается итогами, полученными в результате проведенных исследований, общими выводами, рекомендациями, перспективами дальнейшей разработки темы и списком литературы.

В приложениях указаны проект фармакопейной статьи «Календулы лекарственной цветки», патент РФ № 2095227 «Способ определения соответствия хроматографических пиков одному и тому же компоненту и устройство для его осуществления», патент РФ № 2599016 «Способ количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили образцы сырья – цветки, листья, стебли, плоды и корни календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), произрастающие на территории Самарской области. Образцы сырья были собраны в различные периоды вегетации растения в период с июня по сентябрь. Исследованию подлежали лекарственные препараты – настойка цветков календулы лекарственной (1:10), настойка цветков календулы лекарственной (1:5), настой цветков календулы лекарственной, жидкий экстракт цветков календулы лекарственной (1:2) на 70% спирте, жидкий экстракт цветков календулы лекарственной (1:2) на 40% спирте, фильтр-пакеты «Календула лекарственная» а также индивидуальные вещества, выделенные из цветков календулы лекарственной: нарциссин, 3-О-β-D-глюкопиранозид изорамнетина, 3-О-α-L-рамнопиранозид изорамнетина, 3-О-*n*-кумароилхинная кислота и календулозид К.

Морфолого-анатомическое исследование проводили с использованием цифровых микроскопов «Motic DM-111» и «Motic DM-39» с увеличениями x20, x40, x100, x400. Кроме того, использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе «Альтами ЛЮМ -2» (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: 420-550 нм.

Изучение химического состава цветков календулы лекарственной проводили методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием силикагеля марки «L 40/100 мкм» и «L 100/250 мкм»

(Чехия), сефадекса «LN-20» (Швеция) и полиамида марки «Woelm» (Германия).

Экстракцию осуществляли хлороформом, смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях, спиртом этиловым 95%. Для анализа извлечений из сырья, субстанций, выделенных веществ и лекарственных препаратов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Россия). Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах «Specord 40» (Analytik Jena) и СФ-2000 (СКБ Спектр) в кюветах с толщиной слоя 10 мм. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц). Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного источника от 100 до 250 °С.

ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе «Biotronic»; хроматографическая колонка «Phenomenex Luna» C18(2) (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм), элюент А – метанол; элюент В - 0,01 М КН₂РO₄, подкисленный Н₃РO₄ до рН 3,00±0,01, расход подвижной фазы - 0,6 мл/мин, объем инжектируемой пробы 20 мкл. Режим элюирования – градиентный, трехступенчатый: элюент А 10% - 9 мин; подъем до 50% за 1 мин, 30 мин - 70% А. Рабочая длина волны - 254 нм. ГЖХ-анализ проводили на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (ЗАО «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и газовом хроматографе «Цвет-500» с ПИД. Газом-носителем являлся водород, со скоростью 1 мл/мин. Использовали капиллярные кварцевые колонки VF-1 фирмы Varian, США (30м× 0,32мм× 0,5мкм) с полидиметилсилоксановой неполярной фазой и капиллярную колонку INNOWAX фирмы Agilent Technologies, США (30м*0,32мм*0,5мкм) с полярной неподвижной фазой ПЭГ-20М.

Получение настойки и экстрактов осуществляли методом модифицированной дробной мацерации. Получение сиропа проводили в соответствии с классическими правилами фармацевтической технологии.

Проводили исследования диуретической и антимикробной активности разработанных лекарственных препаратов на основе цветков календулы лекарственной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучение вопросов морфолого-анатомической диагностики корней и плодов календулы лекарственной

Морфолого-анатомическому анализу подвергали воздушно-сухое сырье календулы лекарственной: плоды и корни. К основным диагностическим признакам сырья «Календулы лекарственной плоды» относятся характерные особенности выростов (рисунок 1), очертаний поперечных сечений, структуру экзокарпия с многочисленными одно- и многорядными трихомами, а также наличие опорных пучков в паренхиме в мезокарпия, состоящей из особых крупных клеток с лигнифицированной оболочкой.



Рисунок 1. Морфология плодов календулы

А – плоды календулы, сорт «Кальта»; Б – схематический рисунок плодов рода *Calendula*. Обозначения: 1 – *Calendula officinalis*; 2 – *Calendula arvensis*; 3 – *Calendula denticulate*

К характерным особенностям сырья «Календулы лекарственной корня» можно отнести: наличие в коровой части корня пигментированного слоя клеток с бурым липофильным протопластом, наличие в коровой части корня скоплений кристаллических включений инулина (рисунок 2).

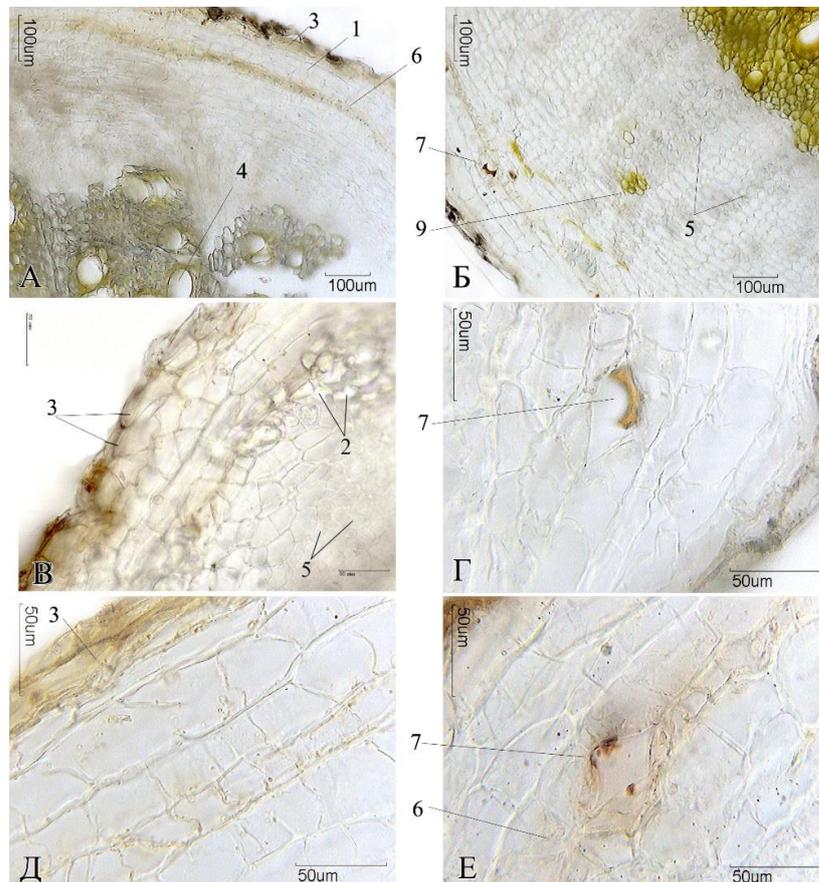


Рисунок 2. Кóровая часть корня календулы лекарственной (d=2мм)

А, Б – лигнифицированные ткани корня календулы (поперечный срез, окраска 10% раствором сернокислого анилина, x100); В, Г – кóровая часть корня (поперечный срез, x400); Д, Е – поперечный срез корня (кóровая часть), окраска раствором Судана III, (x400). Обозначения: 1 - паренхима коры; 2 - слой клеток кóровой паренхимы с кристаллическими включениями; 3 - пробка; 4- сосуд ксилемы; 5 - ткани флоэмы; 6 - пигментированный слой; 7 - клетка с пигментом; 8 - паренхима сердцевинного луча; 9 – лигнифицированные клетки паренхимы

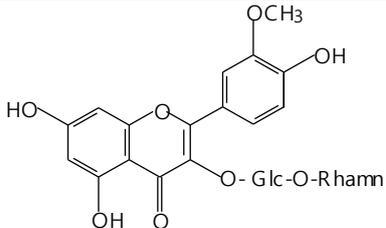
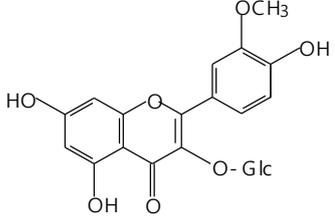
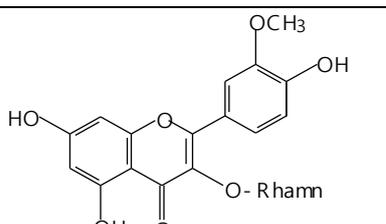
К особенностям корней также относятся: наличие рядов уплощенных радиально расположенных клеток флоэмы с тонкими целлюлозными стенками и наличие хорошо визуализируемых неодревесневших лучей первичной двулучевой ксилемы.

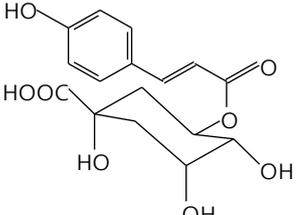
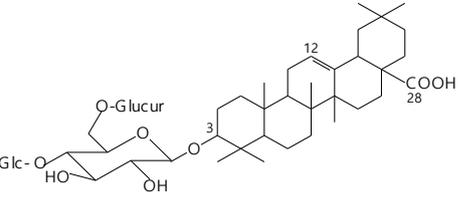
2. Фитохимическое исследование различных органов календулы лекарственной

С целью обоснования подходов к качественному анализу и количественному определению содержания биологически активных соединений (БАС) цветков календулы лекарственной было проведено выделение БАС методом колоночной хроматографии. Для определения химической структуры нами использовались методы ^1H -, ^{13}C -ЯМР, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результаты химических превращений.

В результате проведенных исследований впервые из цветков календулы в индивидуальной форме был выделен 3-О-[(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкуронопиранозил] - β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (календулозид К), из лекарственного сорта «Кальта», культивируемого в Самарской области, - 3-О-β-D-глюкопиранозид изорамнетина, 3-О-α-L-рамнопиранозид изорамнетина и 3-О-*n*-кумароилхинная кислота. Кроме того, из цветков календулы был выделен диагностический и доминирующий флавоноид нарциссин (таблица 1).

Таблица 1. Физико-химические и спектральные характеристики соединений, выделенных из цветков календулы лекарственной

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1.	Нарциссин $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$		Кристаллы желтого цвета, т. пл. 173-175° (водный спирт), λ_{max} EtOH 263, 276 нм
2.	3-О-β-D-глюкопиранозид изорамнетина $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$		Кристаллы желтого цвета, т.пл. 220-223 °С (водный спирт), λ_{max} EtOH 260, 269 нм, 360 нм
3.	3-О-α-L-рамнопиранозид изорамнетина $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Желтое кристаллическое вещество, λ_{max} EtOH 258, 267 нм, 358 нм

4.	3- <i>O-n</i> -кумароилхинная кислота C ₁₆ H ₁₈ O ₈		Светло-желтое аморфное вещество (вода), λ_{\max} EtOH 284, 315 (пл) нм
5.	Календулозид К 3- <i>O</i> -[(1→4)- β -D-глюкопиранозил-(1→6)- β -D-глюкуронопиранозил]- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉		Кристаллы белого цвета из этилового спирта

3. Фитохимическое исследование различных органов календулы лекарственной

Электронный спектр водно-спиртового извлечения из цветков календулы лекарственной, культивируемой в Самарской области (рисунок 3), имеет характерный максимум при $\lambda_{\max}=256\pm 2$ нм (флавоноиды), а также максимум и «плечо» в области 330-350 нм (флавоноиды и гидроксикоричные кислоты) и характерный максимум поглощения каротиноидов при $\lambda_{\max}=450\pm 2$ нм (рисунок 4). В спектры извлечений из листьев, стеблей, плодов и корней вклад вносят преимущественно гидроксикоричные кислоты. Кроме того, вклад в кривую поглощения извлечения из корней календулы вносят, предположительно, тритерпеновые сапонины.

Характеристики количественного содержания суммы флавоноидов, а также содержания каротиноидов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание важнейших БАС календулы лекарственной

Образец	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин и абсолютно сухое сырье
Цветки	4,37% \pm 0,04%	63,10 мг% \pm 3,56%
Листья и стебли	0,45% \pm 0,06%	2,92 мг% \pm 3,97%
Плоды	0,11% \pm 0,05%	0,34 мг% \pm 3,50%
Корни	-	0,09 мг% \pm 3,48%

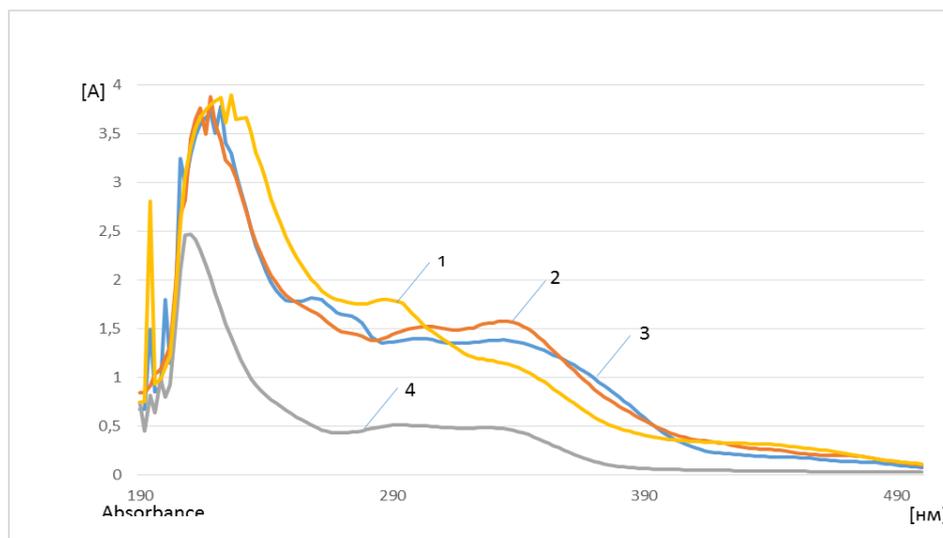


Рисунок 3. Электронный спектр растворов водно-спиртового извлечения из цветков, плодов, корней, листьев и стеблей календулы
 Обозначения: 1 - плоды; 2 – листья и стебли; 3 - цветки; 4 – корни

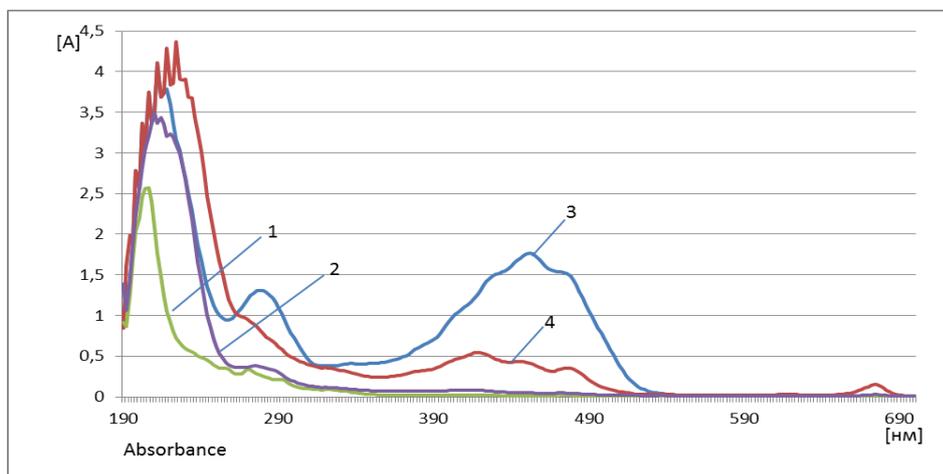


Рисунок 4. Электронный спектр растворов гексанового извлечения цветков, плодов, корней, листьев и стеблей календулы
 Обозначения: 1 - корни; 2 - плоды; 3 - цветки; 4 – листья и стебли

Установлено, что максимальное содержание суммы флавоноидов ($4,37\% \pm 0,04\%$) и каротиноидов ($63,10 \text{ мг}\% \pm 3,56\%$) отмечено в цветках календулы сорт «Кальта», культивируемой в Самарской области. Небольшое количество флавоноидов ($0,45\% \pm 0,06\%$) и каротиноидов ($2,92 \text{ мг}\% \pm 3,97\%$) отмечено в листьях и стеблях календулы.

Определение динамики накопления флавоноидов в листьях и стеблях календулы лекарственной

Объектами исследования служили образцы листьев и стеблей календулы лекарственной сорт «Кальта», собранные в период с июня по сентябрь в Самарской области. Содержание суммы флавоноидов определяли в пересчете на рутин по разработанной ранее методике.

Полученные спектры образцов листьев и стеблей календулы лекарственной свидетельствуют о том, что характер кривой поглощения

определяется в основном флавоноидами в любой период вегетации. Наибольшее содержание флавоноидов было отмечено в образцах, собранных в середине июля ($0,91\% \pm 0,04\%$) и середине сентября ($0,96\% \pm 0,06\%$) (рисунок 5).

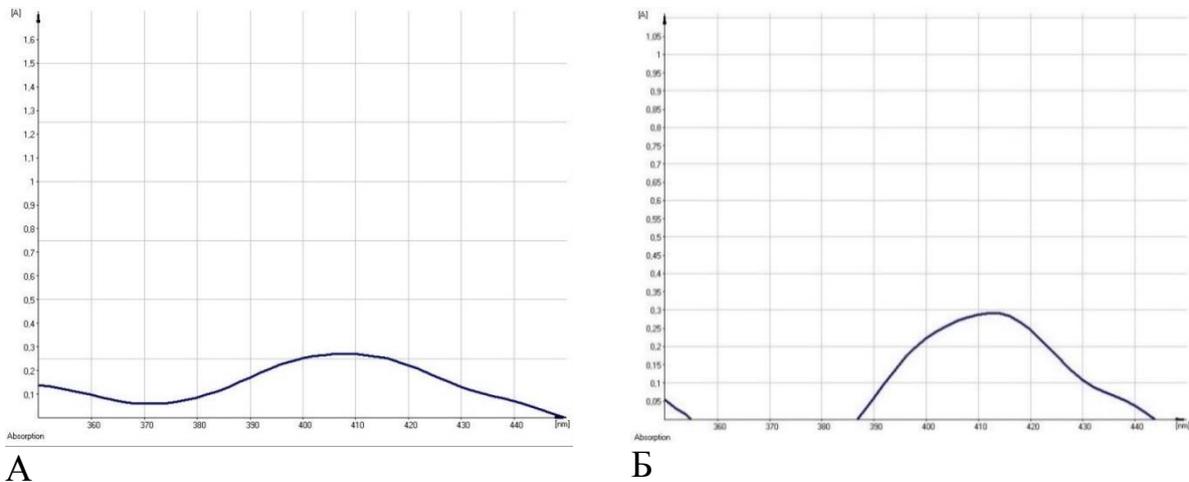


Рисунок 5. Электронные спектры водно-спиртовых извлечений из образцов листьев и стеблей календулы лекарственной

А – образец, собранный в середине июля; Б – образец, собранный в середине сентября.

Таким образом, оптимальным временем сбора листьев и стеблей календулы лекарственной является середина июля и середина сентября.

4. Совершенствование подходов к стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной

В результате проведенных исследований были внесены модификации в методики количественного анализа цветков календулы лекарственной. В случае определения суммы флавоноидов рекомендовано использовать расчетное значение удельного показателя поглощения $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ рутина, равное 240 при длине волны 412 нм. Научно обоснован методологический подход, предусматривающий определение доминирующего и диагностически значимого флавоноида – нарциссина в цветках календулы лекарственной методом ВЭЖХ, что нашло отражение в проекте ФС на ЛРС «Ноготков лекарственных цветки» (содержание нарциссина – не менее 0,5%).

В случае определения суммы каротиноидов рекомендовано использовать расчетное значение удельного показателя поглощения $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ β -каротина при длине волны 450 нм, равное 2773, вместо использования указанного в методике стандарта бихромата калия.

Кроме того, для комплексного анализа препаратов календулы на содержание флавоноидов и каротиноидов была разработана методика количественного определения суммы каротиноидов в настойке календулы.

4.1. Исследование сырья и препаратов календулы лекарственной методом ВЭЖХ

Содержание доминирующего соединения (нарциссина) в цветках цветков календулы лекарственной, установленное методом ВЭЖХ, варьирует от $0,68 \pm 0,02\%$ до $0,97 \pm 0,03\%$. Время удерживания нарциссина составило $37,42 \pm 0,10$ мин (таблица 3). При хроматографировании пробы рабочего стандартного образца нарциссина методом ВЭЖХ время удерживания анализируемого вещества составило $37,83 \pm 0,10$ мин (рисунок 6), что подтверждает корректность разделения компонентов в водно-спиртовом извлечении цветков календулы лекарственной (рисунок 6). В данных условиях в анализируемом извлечении также отмечается наличие флавоноида рутина, содержание которого составляет $0,28\% \pm 0,01\%$ (таблица 3). Время удерживания рутина составило $32,64 \pm 0,12$ мин. Кроме того, в минорных количествах обнаруживается изокверцитрин ($0,06\% \pm 0,02\%$) и кверцетин ($0,04\% \pm 0,04\%$) (таблица 3).

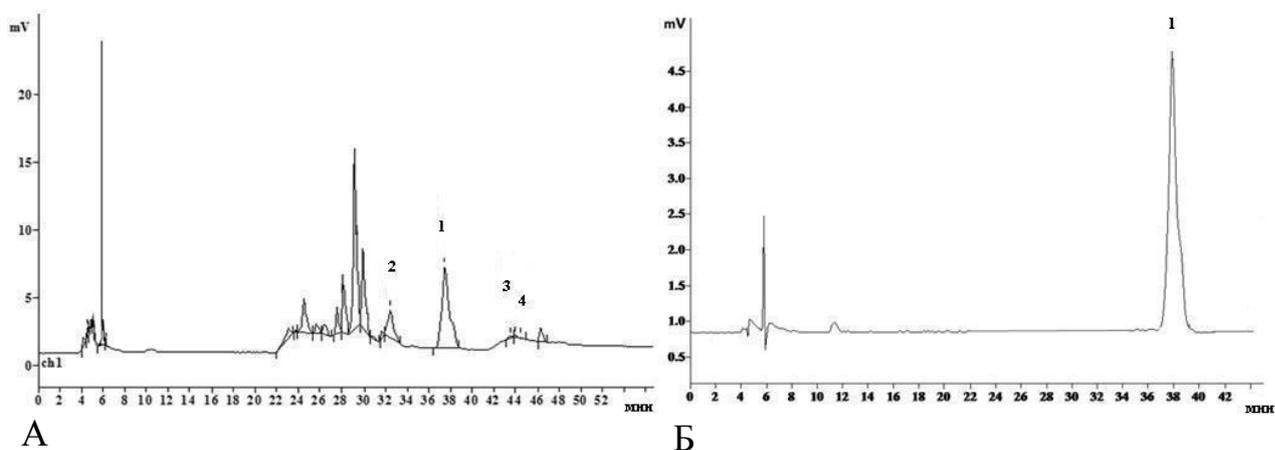


Рисунок 6. ВЭЖХ-хроматограммы водно-спиртового извлечения цветков календулы лекарственной (А) и спиртового раствора нарциссина (Б)
Обозначения: 1 - нарциссин; 2 - рутин; 3 - кверцетин; 4 – изокверцитрин

Таблица 3. Характеристика флавоноидов цветков календулы лекарственной

№ пика	Наименование флавоноида	Время удерживания	Содержание в цветках календулы, в %
1.	Нарциссин	$37,42 \pm 0,10$ мин	$0,68 \pm 0,03\%$
2.	Рутин	$32,64 \pm 0,12$ мин	$0,28\% \pm 0,02\%$
3.	Кверцетин	$43,87 \pm 0,10$ мин	$0,04\% \pm 0,002\%$
4.	Изокверцитрин	$43,46 \pm 0,13$ мин	$0,06\% \pm 0,002\%$

Методика количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной. 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 50 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Колбу закрывают пробкой, взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) при температуре 85-90 °С 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. 20 мкл полученного водно-спиртового извлечения вводится в жидкостной хроматограф. Введенную пробу хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме. Элюентная система: 0,01 М раствор KH_2PO_4 , подкисленный H_3PO_4 до рН 3,0 (буферный раствор), и метанол (90:10; 50:50; 70:30); скорость элюирования 0,6 мл/мин. Режим элюирования – градиентный, трехступенчатый: метанол – буферный раствор – 10:90; с 10-ой мин: метанол – буферный раствор – 50:50; с 30-ой мин: метанол – буферный раствор – 70:30. УФ-детектирование проводят при длине волны 254 нм. Параллельно в жидкостный хроматограф вводят 20 мкл раствора рутина и хроматографируют в тех же условиях. На хроматограмме испытуемого раствора определяют площадь пика нарциссина со временем удерживания около 37 мин и относительным временем удерживания по сравнению с пиком ГСО рутина около 1,10-1,15. Рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям. Параллельно измеряют площадь пика рутина на хроматограмме стандартного образца рутина (внешний стандарт). Рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание нарциссина в цветках календулы лекарственной в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_i \times V \times V_1 \times 100 \times 100}{S_i \times m \times V_o \times V_2 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

S – площадь пика нарциссина на хроматограмме испытуемого образца;

S_o – площадь пика на хроматограмме стандартного образца рутина;

m – навеска сырья, г;

m_o – масса ГСО рутина, г;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_o – объем раствора ГСО рутина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора ГСО рутина, мкл;

W – влажность сырья, %.

4.2. Сравнительное газохроматографическое исследование различных органов календулы лекарственной и препаратов на основе цветков данного растения

Аналізу подвергали цветки, корни, листья и стебли календулы лекарственной сорт «Кальта», собранные на территории Самарской области; препарат «Фильтр-пакеты календулы лекарственной» ОАО «Красногорсклексредства», настойку цветков календулы лекарственной 1:5 на 70% спирте.

Полученные данные сравнивают с характерными для календулы лекарственной «отпечатками пальцев». Экспериментально определены газохроматографические характеристики летучих компонентов, выделяющихся в равновесную паровую фазу из цветков, корней, листьев и стеблей календулы лекарственной, а также препаратов на ее основе. Установлено, что летучие компоненты цветков и листьев имеют близкий состав, а летучие компоненты корней существенно отличаются от летучих компонентов цветков календулы. Из массива полученных газохроматографических данных по календуле лекарственной, включающего 42 индекса удерживания летучих компонентов для неполярной фазы и 27 индексов удерживания для полярной фазы, выбраны характеристические летучие компоненты, имеющие по два или более совпадения индексов удерживания при переходе от одного объекта исследования к другому.

На основании определения основных летучих компонентов каждого из объектов исследования, относительное содержание которых $A_{i,отн.} \geq 1\%$, для идентификации этих объектов и оценки их подлинности построены диаграммы-образы. Показано близкое соответствие диаграмм летучих компонентов цветков и листьев для колонки с неполярной неподвижной фазой и диаграмм летучих компонентов цветков и фильтр-пакетов для колонки с полярной неподвижной фазой.

В качестве маркеров цветков календулы предложено использовать три компонента с наибольшим содержанием в паровой фазе ($A_{i,отн.} = 24,67\%$; $17,68\%$; $11,89\%$) и с индексами удерживания на неполярной фазе: 460 ± 5 , 547 .

5. Создание лекарственного препарата на основе цветков календулы лекарственной и обоснование подходов к его стандартизации

В результате проведенных технологических и аналитических исследований обоснована целесообразность создания сиропа на основе цветков календулы лекарственной с целью применения препарата в педиатрической практике.

Разработан способ получения сиропов цветков календулы лекарственной. Методики качественного анализа были разработаны и апробированы для сиропа цветков календулы лекарственной. Использование ТСХ-анализа возможно после проведения предварительной пробоподготовки (обработки сиропа равным объемом ацетона, с последующим отбором ацетоновой фазы, высушиванием, растворением в спирте этиловом и нанесением на

хроматограмму). Методика УФ-спектроскопии также была адаптирована для лекарственной формы – сиропа.

Количественное содержание флавоноидов в сиропе цветков календулы лекарственной в пересчете на рутин должно составлять не менее 0,02%.

Определено влияние препаратов календулы на выделительную функцию почек лабораторных животных. Однократное внутривенное введение настойки календулы (1:5) в дозе 50 мкл/кг за 4 ч эксперимента вызвало достоверное возрастание всех исследуемых параметров выделительной функции почек по отношению к спиртовому контролю: диуреза – на 75%, натрийуреза – на 81%, калийуреза – на 59%, креатининуриза – на 35%.

В тоже время спустя 24 ч данные лекарственные препараты проявили себя несколько слабее. Так, показатели выделительной функции почек при однократном внутривенном введении настойки календулы промышленного производства в дозе 50 мкл/кг за 24 ч опытного периода были сравнимы с контрольными значениями.

Для разработанных лекарственных препаратов: настой цветков календулы (1:20); настойка цветков календулы (1:10) на 70%; а также лабораторные образцы настойки цветков календулы (1:5) на 70% спирте, жидкого экстракта цветков календулы (1:2) на 40% спирте; жидкого экстракта цветков календулы (1:2) на 70% спирте определены показатели антимикробной активности в отношении некоторых штаммов микроорганизмов, а именно: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных диссертационных исследований научно обоснована целесообразность использования всех органов календулы лекарственной в качестве источника БАС для создания отечественных лекарственных препаратов. Кроме того, обоснована стандартизация цветков календулы лекарственной с определением качественного и количественного содержания диагностического и доминирующего флавоноида нарциссина.

Выводы

1. В результате морфологического и анатомического исследования корней календулы лекарственной (сорт «Кальта»), выявлены характерные особенности строения корней календулы как высокоперспективного источника новых лекарственных растительных средств. Были отмечены следующие диагностически значимые признаки, которые необходимы для того, чтобы подтвердить подлинность корней календулы: присутствие пигментированного слоя клеток с бурым протопластом липофильной природы в коровой части корня; присутствие скоплений включений инулина кристаллического типа в коровой части корня; присутствие уплотненных клеток флоэмы, радиально расположенных рядами, имеющих тонкие целлюлозные стенки; присутствие лучей первичной двулучевой ксилемы, которые

являются достаточно визуализируемыми и неодревесневшими. К особенностям плодов календулы лекарственной можно отнести особенности очертаний поперечных сечений, структуру экзокарпия с многочисленными одно- и многорядными трихомами, а также наличие опорных пучков в паренхиме мезокарпия, состоящей из особых крупных клеток с лигнифицированной оболочкой. Признаки, которые были выявлены позволяют доподлинно провести идентификацию исследуемого вида ЛРС.

2. Проведено комплексное фитохимическое исследование различных органов календулы, которое позволило выявить в цветках, листьях, стеблях и корнях различных групп БАС – флавоноидов, фенилпропаноидов, каротиноидов и сапонинов. В качестве оптимального времени сбора листьев и стеблей календулы лекарственной выбраны середина июля и середина сентября, поскольку именно в эти периоды вегетации отмечено максимальное содержание суммы флавоноидов.
3. Проведено исследование цветков календулы лекарственной методом ВЭЖХ. Разработана методика количественного определения содержания нарциссина, являющегося доминирующим и диагностически значимым флавоноидом цветков календулы лекарственной.
4. В качестве маркеров цветков календулы рекомендуется использовать три компонента с максимальным содержанием в паровой фазе ($A_{i,отн.} = 24,67\%; 17,68\%; 11,89\%$) и с индексами удерживания на неполярной фазе: $460 \pm 5, 547$.
5. Внесены уточнения в методики количественного определения суммы флавоноидов и каротиноидов в цветках ноготков лекарственных, заключающиеся в введении удельных показателей поглощения $E^{1\%}_{1cm}$ для рутина и β -каротина. Разработана методика количественного определения содержания суммы каротиноидов в настойке календулы лекарственной методом спектрофотометрии. Разработана методика количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной с использованием метода ВЭЖХ. Разработана методика газохроматографического определения летучих компонентов равновесной паровой фазы календулы лекарственной и лекарственных препаратов на ее основе, заключающаяся в определении профиля («отпечатка пальца») календулы лекарственной.
6. Обоснованы способ получения и состав сиропа цветков календулы лекарственной. Разработаны методики качественного анализа данного препарата и количественного определения БАС. Рекомендуемое содержание суммы веществ флавоноидов в пересчете на рутин в сиропе календулы лекарственной должно составлять не менее 0,02 %.
7. Для разработанных лекарственных препаратов цветков календулы лекарственной определены параметры диуретической и антимикробной

активности. Особую широкую направленность антибактериальной активности имеет настой цветков календулы, по отношению *Pseudomonas aeruginosa* более активным извлечением является настойка (1:10) на 70% спирте.

8. На основе результатов фармакогностических исследований разработан проект ФС «Календулы лекарственной цветки».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды, флавоноиды и каротиноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих фенилпропаноиды, флавоноиды и каротиноиды, а также разработки методик анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья, отвечающих современным требованиям. Кроме того, важным является научное обоснование комплексного использования растительных ресурсов в медицинской и фармацевтической практике. В процессе проведения исследований большое значение придается использованию современных методов анализа и приборной базы, а также изучению фармакологических эффектов лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Афанасьева, П.В. Перспективы создания высокопродуктивной сырьевой базы календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, В.А. Куркин, О.В. Шарова, Л.Е. Вельмисева // **Известия Самарского научного центра РАН.** – 2012. – Т.14. - № 1-9. – С. 2249–2252.
2. Афанасьева, П.В. Перспективы комплексного использования календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина // **Известия Самарского научного центра РАН.** – 2014. – Т.14. - № 5-2. – С. 980–982.
3. Афанасьева, П.В. Актуальные аспекты комплексного использования календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / П.В. Афанасьева // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2014. - № 5-6. – С. 152-154.
4. Афанасьева, П.В. Обоснование новых подходов к стандартизации сырья и препаратов календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.А. Куркин, И.А. Платонов, // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 5; URL:<http://www.science-education.ru/128-21546>.

5. Афанасьева, П.В. Обоснование подходов к фармацевтическому анализу сырья и препаратов календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина // **Научно-информационный межвузовский журнал Аспирантский вестник Поволжья.** – 2015. – № 5-6, Часть II. – С. 323-326.
6. Афанасьева, П.В. Оптимизация подходов к стандартизации фитопрепаратов на основе календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, В.А. Куркин, А.В. Куркина // **Известия Самарского научного центра РАН.** – 2015. – Т.17. – № 5(3). – С. 930–934.
7. Афанасьева, П.В. Газохроматографические профили летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственных растений «календула лекарственная», «зверобой продырявленный», «пижма обыкновенная» / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, Н.В. Ермакова, Ю.А. Арутюнов, Л.А. Онучак // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2015. – Т.16. – № 1. – С. 17–28.
8. Афанасьева, П.В. Обоснование новых подходов к стандартизации цветков календулы лекарственной и препаратов на основе данного сырья / П.В. Афанасьева, А.В. // **Сеченовский вестник.** – 2016. – № 2(24). – С. 18–20.
9. Афанасьева, П.В. Изучение диуретической активности препаратов на основе цветков календулы лекарственной / П.В. Азнагулова, В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев // **Бюллетень Сибирской медицины** – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 51-57.
10. Афанасьева, П.В. Морфолого-анатомическое исследование корней календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // **Медицинский альманах.** – 2016. – № 1(41). – С. 124–126.
11. Афанасьева, П.В. ВЭЖХ-анализ нарциссина в цветках календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.А. Куркин, И.А. Платонов, Л.П. Павлова // **Фармация.** – 2016. – Т.65. – № 4. – С. 30–34.
12. Афанасьева, П.В. Фитохимическое исследование соцветий календулы лекарственной различных сортов образцов / П.В. Афанасьева, В.А. Куркин, О.В. Шарова // **Материалы международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: Модернизация и инновационное развитие страны».** – Пенза, 2011. – С. 80-82.
13. Афанасьева, П.В. Количественное определение содержания флавоноидов в соцветиях календулы лекарственной, культивируемой в Пензенской области / П.В. Афанасьева, В.А. Куркин, О.В. Шарова, Л.Е. Вельмисева, А.В. Федоров // **Материалы V международной конференции «Фармация и общественное здоровье».** – Екатеринбург, 2012. – С. 176-180.
14. Афанасьева, П.В. Исследования по разработке лекарственной формы «Суппозитории календулы» / П.В. Афанасьева, О.В. Шарова, Н.Н. Желонкин // **Материалы Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств.** – Харьков, 2013. – С. 127-128.
15. Афанасьева, П.В. Химико-фармацевтическое исследование по разработке суппозиторий на основе цветков календулы лекарственной / П.В. Афанасьева // **Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине».** Аспирантские чтения – 2013. – Самара, 2013. – С. 262-265.
16. Афанасьева, П.В. Технологические подходы к разработке и анализу суппозиторий на основе календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, О.В. Шарова // **Сборник материалов IV Всероссийской конференции**

с международным участием «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды». – Чебоксары, 2014. – С. 112-113.

17. Афанасьева, П.В. Анатомо-морфологическое исследование корней календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) / П.В. Афанасьева // Материалы конференции с международным участием «Молодые ученые 21 века – от современных технологий к инновациям». Аспирантские чтения. – Самара, 2014. – С. 250-251.

18. Афанасьева, П.В. Спектрофотометрическое исследование сырья и препаратов календулы лекарственной с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // Сборник конкурсных докладов XII Всероссийского молодежного Самарского конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике. – Самара, 2014. – С. 378-381.

19. Афанасьева, П.В. Новые подходы к оценке качества сырья календулы лекарственной / П.В. Афанасьева // Материалы XIV международной научно-практической конференции «Студенческая медицинская наука XXI века посвященная 80-летию образования ВГМУ». – Витебск, 2014. – С. 112-113.

20. Афанасьева, П.В. Исследования соцветий перспективной популяции календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, Д.А. Куштель, Г.В. Мельникова, О.И. Никифорова // Сборник материалов IX международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2015. – С. 496-499.

21. Афанасьева, П.В. Сравнительный анализ подходов к стандартизации календулы лекарственной в различных фармакопеях / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, О.В. Шарова, Н.А. Язрикова // Тезисы докладов III научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» Приложение к журналу Сеченовский вестник. – 2015. - №1(19). – С. 112-114.

22. Афанасьева, П.В. Газохроматографические спектры удерживания летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственного растения календула / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, Л.А. Онучак, Ю.И. Арутюнов, Н.В. Ермакова, И.Ю. Михайлов // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященная памяти профессора М.С. Вигдергауза. – Самара, 2015. – С. 40.

23. Афанасьева, П.В. Разработка новых подходов к стандартизации календулы лекарственной / П.В. Афанасьева // Материалы докладов научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые XXI века – от идеи к практике». Аспирантские чтения. – Самара, 2015. – С. 156-158.

24. Афанасьева, П.В. Рациональные подходы к стандартизации цветков календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина // Сборник трудов третьей научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые в фармации XXI века» ВИЛАР. – Москва, 2015. – С. 164-169.

25. Афанасьева П.В. Изучение острой токсичности и диуретической активности препарата на основе цветков календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев // Сборник трудов третьей научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые в фармации XXI века» ВИЛАР. – Москва, 2015. – С. 170-174.

26. Афанасьева, П.В. Разработка сиропов на основе препаратов цветков календулы лекарственной / П.В. Афанасьева // Книга материалов научно практической конференции «Аспирантские чтения – 2016». – Самара, 2016. -С. 205-206.
27. Афанасьева, П.В. Исследование по разработке методик анализа сиропа календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.А. Куркин // Тематический сборник научных статей «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики». – Уфа, 2016. – С. 16-18.
28. Афанасьева, П.В. Новые подходы к стандартизации ноготков / П.В. Афанасьева // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки». – Пермь, 2016. – С. 44-46.
29. Афанасьева, П.В. Определение антимикробной активности извлечений цветков календулы лекарственной / П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.А. Куркин, А.В. Лямин, А.В. Жестков // Фармация и фармакология. – 2016. – Т.4. - № 2(15). – С. 60–70.
30. Afanaseva P.V. HPLC-Analysis of narcissin in flowers of *Calendula officinalis*. / P.V. Afanaseva, V.A. Kurkin, A.V. Kurkina, I.A. Platonov, L.V. Pavlova // Journal of Medicinal Plants Studies. - 2015. - No 3(6). P. 16-18.

Патенты

1. Патент РФ на изобретение 2556759. – GO1N30/02 (заявка № 2014133928 от 18.08.2014). «Способ определения соответствия хроматографических пиков одному и тому же компоненту и устройство для его осуществления» / Ю.И. Арутюнов, Л.А. Онучак, Н.В. Ермакова, П.В. Афанасьева, И.Ю. Михайлов. – Решение о выдаче патента 25.12.2015 г.
2. Патент РФ на изобретение 2599016. – A61K36/28 (заявка № 2014123333/28 от 06.06.2014). «Способ количественного определения нарциссина в цветках календулы лекарственной» / В.А. Куркин, А.В. Куркина, П.В. Афанасьева. – Решение о выдаче патента 18.06.2015 г.