

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2021.52.51.002>

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДИКИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*CICHORIUM INTYBUS L.*)

О.Л. Сайбель, канд. фарм. наук, руководитель Центра химии и фармацевтической технологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

Одним из перспективных объектов исследования в направлении разработки новых лекарственных растительных средств является цикорий обыкновенный. Надземная часть этого растения может быть заготовлена как от дикорастущих растений, так и использована в качестве вторичного сырья при промышленном культивировании корней. В результате проведенных исследований установлено, что содержание суммы фенольных соединений в сырье дикорастущих растений составляет от $2,02 \pm 0,01$ до $6,25 \pm 0,29\%$, культивируемых сортов – от $3,04 \pm 0,14$ до $4,04 \pm 0,17\%$. Доминирующим соединением во всех образцах сырья является цикориевая кислота. В сырье культивируемых растений, в отличие от дикорастущих, отсутствуют оксикумарины. Изучение влияния на гуморальное звено иммунитета экстрактов, полученных из культивируемых и дикорастущих растений, показало их сопоставимую активность, что свидетельствует об отсутствии вклада оксикумаринов в данный эффект. В связи с этим для стандартизации сырья дикорастущих и культивируемых растений может быть использована методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту.

Ключевые слова: цикорий обыкновенный, трава, фенольные соединения, цикориевая кислота

Согласно стратегии развития фармацевтической отрасли Российской Федерации, одним из приоритетных направлений является проведение исследований, направленных на поиск новых активных соединений и создание на их основе эффективных лекарственных средств. Среди природных источников получения таких веществ особое место занимают растения. Биологически активные вещества (БАВ), образующиеся в процессе их вторичного метаболизма, обладают бóльшим, по сравнению с синтетическими соединениями, сродством к организму человека, при этом БАВ оказывают минимальное токсическое воздействие при выраженной фармакологической активности. В связи с этим поиск новых соединений растительного происхождения, перспективных для создания на их основе лекарственных средств, представляет интерес для исследователей в области фармацевтической разработки.

Современные требования к качеству лекарственных средств обуславливают необходимость использования научно обоснованного подхода к созданию фитопрепаратов, включающего оценку опыта народной и научной медицины, сочетающегося с установлением структуры действующих веществ, определением механизмов их фармакологического действия и возможных побочных эффектов. Базисные этапы такого подхода включают исследования химического состава

новых видов лекарственных растений, установление основных групп действующих веществ, разработку методик их качественной и количественной оценки, а также определение показателей и норм, позволяющих оценивать качество лекарственного растительного сырья.

Среди представителей отечественной флоры перспективным объектом исследования является цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) – травянистое растение семейства астровые (*Asteraceae*). Род *Cichorium* включает 6 видов (*C. endivia*, *C. glabratum*, *C. glandulosum*, *C. intybus*, *C. pumilum*, *C. spinosum*) [1], среди которых *C. intybus* является наиболее распространенным на территории РФ. Данное растение произрастает в дикорастущем виде от побережья Белого моря на севере до побережья Черного моря на юге и от Балтики на западе до Тихоокеанского побережья на востоке России [2].

Культивируемые сорта цикория обыкновенного выращивают для получения корней, которые после обжарки используются для производства «цикориевого кофе».

Надземная и подземная части цикория обыкновенного широко используются в народной медицине Китая и Монголии в качестве иммуномодулирующего, желчегонного, гепатопротекторного, гипогликемического средства, а также являются объектами научных исследований в зарубежных странах [3–6]. Данное растение (трава и корни) описано в Фармакопее Китайской Народной Республики. Экстракт травы цикория включен в состав комплексного препарата «Лив.52» (Индия).

Наиболее перспективным лекарственным растительным сырьем может служить именно надземная часть данного растения. Трава дикорастущего цикория обыкновенного удобна в заготовке в течение длительной фазы цветения (июнь – август), в случае же культивируемого растения она служит вторичным сырьем

на плантациях по заготовке корней для пищевой промышленности.

Согласно данным литературы, фармакологическая активность экстрактов надземной части цикория обыкновенного обусловлена комплексом БАВ фенольного характера, представленным гидроксикоричными кислотами, оксикумаринами и флавоноидами [3,5,7].

В связи этим **целью** нашей работы явилось изучение накопления фенольных соединений в надземной части дикорастущего и культивируемого растения для обоснования выбора методики стандартизации данного вида растительного сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служила высушенная надземная часть (трава) дикорастущего цикория обыкновенного, заготовленная в фазу массового цветения в Московской, Рязанской, Липецкой, Самарской, Тульской, Архангельской областях и Краснодарском крае в 2016–2020 гг., а также надземная часть (корневая розетка) растений, заготовленная в фазу конца вегетации первого года жизни культивируемых растений на опытных участках Ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР: сорта Spicak, (Чехия), Tid Wog (Франция), Александрит (Франция) в 2020 г.

Количественное определение суммы фенольных соединений в надземной части цикория обыкновенного проводили методом прямой спектрофотометрии на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) по ранее разработанной и валидированной методике (относительная ошибка единичного определения 4,72%). Оптическую плотность определяли в максимуме поглощения при длине волны 330 ± 2 нм. Расчет содержания суммы фенольных соединений проводили в пересчете на цикориевую кислоту и абсолютно сухое сырье, используя удельный показатель поглощения 782 [8].

Количественное определение основных фенольных соединений проводили методом ВЭЖХ-УФ с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Prominence-I LC-2030C 3D (Shimadzu) с диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке XTerra® RP18 3,5 μm 2,1 \times 150 мм Column (термостатирование при 30°C). Элюирование осуществляли при скорости потока 0,3 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали системы растворителей 0,2% раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В) в градиентном режиме элюирования: (0–20 мин. – 10% В, 20–30 мин. – 25% В, 30–40 мин. – 40% В, 40–44 мин. – 60% В, 44–48 мин. – 80% В, 48–60 мин. – 10% В). Детектирование проводили при длине волны 330 нм. Каждое определение проводили в трех повторностях.

В качестве стандартных образцов (чистота не менее 98%) использованы цикориевая кислота, хлорогеновая кислота, эскулетин и цикориин, выделенные нами ранее из надземной части дикорастущего цикория обыкновенного и идентифицированные методом ЯМР-спектроскопии.

Экстракты из сырья дикорастущего и культивируемого сырья получали путем его экстракции 70% спиртом этиловым, концентрированием, очисткой от липофильных соединений и сушкой до влажности не более 5%.

Исследование иммуномодулирующей активности на показатели гуморального звена иммунитета проводили на мышах-самцах линии F₁ (СВАхС57Bl/6) массой 18–20 г. Действие экстрактов изучали на нормальных животных, а также животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном, который вводили животным в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней.

Экстракты цикория обыкновенного вводили 1.0 и 1.1 опытными группами мышей на фоне азатиоприна и 3.0 и 3.1 опытными группами

интактных мышей в дозе 30 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 14 дней. Экспериментально-терапевтическая доза экстракта сухого цикория, равная 30 мг/кг, определена опытным путем в предварительных испытаниях на 30 мышах. В качестве препарата сравнения использовали «Иммунал» (Lec Pharma, Словения). «Иммунал» вводили 2-й опытной группе мышей на фоне азатиоприна и 4-й опытной группе интактных мышей в изоэффективной дозе 5 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 14 дней. Интактная и контрольная группы животных получали воду очищенную по аналогичной схеме. Исследования проводили на 20-й день эксперимента.

Действие экстракта цикория на состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965) [9]. Полученные результаты обрабатывали статистическим методом с помощью критерия t-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ранее проведенного фитохимического изучения методом ВЭЖХ-МС/МС было установлено, что надземная часть дикорастущего цикория обыкновенного, произрастающего на территории РФ, содержит комплекс БАВ фенольной природы, представленный оксикумаринами (эскулетин и цикориин); производными гидроксикоричной кислоты (сложными эфирами кофейной, феруловой, кумаровой кислот с органическими кислотами – винной и хинной в различных сочетаниях) и флавоноидами (гликозидами кверцетина и кемпферола). При этом доминирующими соединениями являются эскулетин и его гликозид цикориин, а также цикориевая и хлорогеновая кислоты.

Учитывая, что надземная часть дикорастущего растения представлена стеблями с листья-

ми и цветками, нами было изучено накопление суммы фенольных соединений и доминирующих соединений в различных частях травы на примере образца сырья, заготовленного в Московской области в 2020 г. (табл. 1).

В результате было показано, что наибольшее количество фенольных соединений ($7,19 \pm 0,33\%$) накапливается в стеблевых листьях, при этом доминирующим соединением этой части растения является цикориевая кислота ($0,401 \pm 0,012\%$). В цветках также установлено значительное содержание фенольных соединений ($3,74 \pm 0,17\%$), среди доминирующих соединений отмечено сравнительно высокое количество кумаринов – эскулетина ($0,030 \pm 0,001\%$) и цикориина ($0,251 \pm 0,008\%$), что характерно для растений семейства астровые.

Результаты анализа образцов сырья, заготовленного в различных регионах РФ, показали, что содержание суммы фенольных соединений составляет от $2,02 \pm 0,01$ до $6,25 \pm 0,29\%$ (табл. 2).

В свою очередь, при культивировании цикория обыкновенного для пищевой

промышленности корни заготавливают в конце первого года вегетации растения, поэтому надземная часть представлена листьями корневой розетки. Результаты анализа фенольных соединений сырья трех сортов даны в табл. 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что преобладающей среди основных метаболитов сырья культивируемых растений является также цикориевая кислота. Оксикумарины (эскулетин и цикориин) в данном сырье отсутствуют, что подтверждает их накопление в цветках на втором году жизни растения. Использование вторичного сырья промышленного выращивания корней предполагает получение надземной части от растений первого года жизни, когда цветков нет.

Дальнейшее исследование экстрактов, полученных из надземной части дикорастущего (с содержанием фенольных соединений $8,30 \pm 0,40\%$) и культивируемого цикория обыкновенного (с содержанием суммы фенольных соединений $10,42 \pm 0,48\%$), показало сопоставимые данные по влиянию на по-

Таблица 1

**СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО**

Часть растения	Сумма фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту, %	Цикориевая кислота, %	Хлорогеновая кислота, %	Эскулетин, %	Цикориин, %
Цветки	$3,74 \pm 0,17$	$0,111 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,001$	$0,251 \pm 0,008$
Стеблевые листья	$7,19 \pm 0,33$	$0,401 \pm 0,012$	$0,108 \pm 0,001$	$0,000 \pm 0,00$	$0,022 \pm 0,001$
Цветоносные стебли	$2,25 \pm 0,10$	$0,083 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,001$	$0,053 \pm 0,002$
Стебли	$1,00 \pm 0,05$	$0,030 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,001$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
Трава	$2,02 \pm 0,09$	$0,121 \pm 0,004$	$0,032 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,001$	$0,061 \pm 0,002$

Таблица 2

**СОДЕРЖАНИЕ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ОБРАЗЦАХ ТРАВЫ ДИКОРАСТУЩЕГО ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО
РАЗЛИЧНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ**

Место произрастания	Год заготовки сырья	Сумма фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту, %
Московская обл., Шатурский район, с. Кривандино	2016	3,63±0,18
Тульская обл., д. Крюково	2016	3,50±0,18
Республика Башкортостан, Уфимский район	2017	4,97±0,25
Республика Башкортостан, Туймазинский район	2017	4,41±0,22
Архангельская обл., Каргопольский район	2017	2,73±0,14
Липецкая область, Галичья гора, с. Чечеры	2017	2,38±0,12
Московская область, г.о. Серпухов, д. Волково	2017	2,08±0,10
Самарская обл., Сергиевский район, п. Антоновка	2017	4,57±0,23
Курская обл.	2017	4,28±0,21
Курская обл.	2018	6,25±0,29
Рязанская обл., Рыбновский район, д. Раменки	2018	2,06±0,10
Краснодарский край, Усть-Любинский район, станица Воронежская	2019	3,98±0,19
Московская обл., г.о. Серпухов, д. Волково	2020	2,02±0,01
Краснодарский край, Динской район, станица Васюринская	2020	3,86±0,18

Таблица 3

**СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В НАЗЕМНОЙ ЧАСТИ
КУЛЬТИВИРУЕМОГО ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО**

Сорт	Сумма фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту, %	Цикориевая кислота, %	Хлорогеновая кислота, %	Эскулетин, %	Цикориин, %
Spicak	4,04±0,17	0,250±0,008	0,040±0,001	0,00±0,00	0,00±0,00
Tid Wog	3,54±0,16	0,211±0,006	0,051±0,001	0,00±0,00	0,00±0,00
Александрит	3,04±0,14	0,182±0,005	0,020±0,001	0,00±0,00	0,00±0,00

Таблица 4

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО ЦИКОРИЯ ОБЫКНОВЕННОГО
НА АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ**

Группы животных	Абсолютное число АОК на селезенку	Число АОК на 106 спленоцитов
Интактная, n=10	46199±2203	272±22
Контрольная (азатиоприн), n=10	29328±2368*	163±10*
Опытная 1.0 (азатиоприн + экстракт цикория дикорастущего), n=10	42022±3629**	252±12**
Опытная 1.1 (азатиоприн + экстракт цикория культивируемого), n=10	53517±2671**	235±15**
Опытная 2 (азатиоприн + «Иммунал»), n=10	41059±2763**	212±13**
Опытная 3.0 (экстракт цикория дикорастущего), n=10	40655±3821	244±18
Опытная 3.1 (экстракт цикория культивируемого), n=10	45321±3719	198±12
Опытная 4 («Иммунал»), n=10	39842±2546	237±21

Примечания. Различия достоверны по сравнению с данными: * – в интактной группе, ** – в контрольной группе при $p \leq 0,05$; n – количество животных в группе

казатели гуморального иммунитета в опытах *in vivo*. Оба экстракта восстанавливали показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. При введении исследуемых средств на фоне иммуносупрессии наблюдали достоверное увеличение количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 106 спленоцитов, при этом отсутствовало влияние экстрактов на показатели гуморального иммунитета у животных без иммуносупрессии.

Действие экстракта культивируемого цикория незначительно превышало действие аналогичного экстракта дикорастущего растения, что, вероятно, обусловлено более высоким содержанием фенольных соединений.

Полученные данные позволяют считать, что кумарины не влияют на иммуномодулирующую активность экстрактов надземной части цикория обыкновенного.

Таким образом, для стандартизации надземной части дикорастущего и культивируемого цикория может быть использована методика определения суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту как одного из доминирующих его метаболитов, вносящего основной вклад в иммуномодулирующее действие экстрактов его надземной части.

ВЫВОДЫ

1. Изучение распределения фенольных соединений в надземной части дикорастущего цикория обыкновенного показало, что наибольшее их количество накапливается в стеблевых листьях и цветках. При этом доминирующим метаболитом является цикориевая кислота. С учетом объема биомассы

целесообразно в качестве сырья заготавливать всю надземную часть – траву. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту в образцах травы, заготовленной в различных регионах РФ, составляет от $2,02 \pm 0,01$ до $6,25 \pm 0,29\%$. Надземная часть культивируемых сортов содержит больше фенольных соединений, чем трава дикорастущих растений, при этом доминирующим соединением также является цикориевая кислота, а оксикумарины отсутствуют.

2. Предположительно, именно производные гидроксикоричной кислоты и цикориевая кислота как основной компонент этой группы БАВ вносят основной вклад в иммуномодулирующее действие надземной части дикорастущего и культивируемого растения. Данное обстоятельство позволяет использовать методику количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту для оценки качества данного сырья по показателю «Количественное определение». По результатам анализа образцов сырья различных мест заготовки и культивируемых сортов норма содержания по данному показателю может быть установлена на уровне не менее 2%.

Исследования выполнены в рамках реализации плана научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме №FNSC-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм»

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Cichorium / Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. 2007–2020. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/42456.html> (дата обращения: 08.01.2021).*
2. Семенухин И.Д., Семенухин В.И. *Энциклопедия лекарственных растений, возделываемых в России, том II.* – М., 2015. – 312 с.
3. Kanj D., Raafat K., El-Lakany A., Baydoun S., Aboul-Ela M. *Phytochemical Compounds of Cichorium intybus by Exploring its Antioxidant and Antidiabetic Activities // Pharmacognosy Journal.* – 2019. – Vol. 11. – P. 248–257. DOI: 10.5530/pj.2019.11.39.
4. Guo-Yu Li, Jing-Kai Gu. *Hepatoprotective effect of Cichorium intybus L., a traditional Uighur medicine, against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats // World J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 20(16). – P. 4753–4760. DOI: 10.3748/wjg.v20.i16.4753.
5. Renée A. Street, Jasmine Sidana, Gerhard Prinsloo. *Cichorium intybus: Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology // Complementary and Alternative Medicine.* – Volume 2013, Article ID 579319, 13 pages. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/579319>.
6. *Medical importance of Cichorium intybus – A review Prof Dr Ali Esmail Al-Snafi // IOSR Journal of Pharmacy.* – 2016. – Vol. 6. – Iss. 3. – P. 41–56.
7. Mulinacci N., Innocenti M., Gallori S., Romani A., G. la Marca, Vincieri F.F. *Optimization of the chromatographic determination of polyphenols in the aerial parts of Cichorium intybus L. // Chromatographia.* 2001. V. 54(7). P. 455–461. DOI: 10.1007/BF02491199.
8. *Государственная фармакопея РФ XIV издания. Федеральная электронная медицинская библиотека Министерства здравоохранения Российской Федерации. ФС.2.5.0000.15 «Эхинацеи пурпурной трава».* – Москва. 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/feml>.
9. Cunningham A.J. *A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells // Nature.* – 1965. – Vol. 207. – №5001. – P. 1106–1107.

JUSTIFICATION AND CHOICE OF METHOD HERB CICHORY STANDARDIZATION (*CICHORIUM INTYBUS* L.)

O.L. Saybel

«All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants», Moscow, Russia

*The chicory (*Cichorium intybus* L.) is one of promising objects in research and direction of new herbal medicinal products and development of its. The aerial part of this plant can be harvested both from wild plants and used as a secondary raw material in the industrial cultivation of roots. This plant material contains a complex of phenolic compounds. As a result of the studies, it was found that the content of the sum of phenolic compounds in the raw material of wild plants is from 2.02 ± 0.01 до $6,25 \pm 0,29\%$, cultivated varieties from 3.04 ± 0.14 to $4.04 \pm 0.17\%$. Cichoric acid is the dominant compound in all samples. Oxycoumarins are absent in the raw materials of cultivated plants, but it contains in wild ones. Study of effect extracts obtained from cultivated and wild plants showed their comparable activity on the humoral link of immunity, which indicates the absence of the contribution of oxycoumarins to this effect. In this regard, the standardization technique of quantitative determination of the phenolic compounds in calculation on cichoric acid in wild and cultivated plants raw materials is could be used.*

Keywords: *Chicorium intybus* L., herbs, phenolic compounds, chicory acid