

© Коллектив авторов, 2003

О. А. Запорожец¹, Е. А. Крушинская¹, В. Н. Барвинченко²,
Н. А. Липковская², В. К. Погорелый²

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ В ПРЕПАРАТАХ ЭХИНАЦЕИ

¹ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко;

² Институт химии поверхности Национальной Академии Наук Украины, Киев.

В последнее время ведущее место по объему продаж среди растительных лекарственных средств занимают препараты на основе растений рода эхинацея (*Echinacea Moench*), обладающие иммуностимулирующим, противовоспалительным, ранозаживляющим, антимикробным и противовирусным действием [1, 2]. Тем не менее, до сих пор отсутствуют простые и надежные методики контроля качества препаратов эхинацеи (Э). Для большинства фитопрепаратов нет необходимости идентифицировать и определять каждый компонент, поскольку значительный биологический эффект часто бывает обусловлен синергетическим действием целого ряда ингредиентов, включая неидентифицированные в следовых количествах [3, 4]. Для контроля качества продукции и методов ее стандартизации целесообразнее определять одно или несколько веществ в каждой из групп биологически активных веществ растения, обуславливающих фармакологический эффект. Одна из основных групп биоактивных соединений Э включает гидроксикоричную (кофейную) кислоту и ее производные (ПГК) — конъюгаты с сахарами, хинной и винной кислотами [1, 3, 4]. Гидроксикоричная кислота (ГК) обладает антибактериальным, противогрибковым и антиоксидантным действием [5], а цикориевая кислота играет ключевую роль в обеспечении иммуностимулирующего действия препаратов Э [1, 3, 4]. Не удивительно, что именно методики определения суммарного содержания ПГК были предложены для стандартизации контроля качества препаратов Э.

Для контроля качества “Настойки корневищ с корнями эхинацеи пурпурной” в ВФС [6] используется метод титриметрии. Однако, в этом случае определяется сумма всех карбоновых кислот, а не только имеющих иммуномодулирующее действие (ПГК). Более избирательной является методика определения ПГК (в пересчете на цикориевую кислоту) по собственному поглощению в УФ-области [7], включенная в ФС на “Траву эхинацеи пурпурной” [8] и ВФС на “Корневища с корнями эхинацеи пурпурной” [9]. Принципиальными недостатками данного метода являются невысокие избирательность и надежность. Это связано с тем, что светопоглощение раствора при 330 нм, являющееся аналитическим сигналом, обусловлено наличием не только ПГК, но и продуктов их окисления — хинонов, также поглощающих в этой области [10]. Например,

результаты анализа настойки эхинацеи методом, предложенным в [7], показывают, что содержание ПГК в препаратах с не просроченным и просроченным сроком годности практически одинаково, что вызывает сомнение. Следует также отметить, что цикориевая кислота в настоящее время не может применяться в качестве стандарта, так как она не отвечает нормативным требованиям [11].

Поскольку иммуномодулирующее действие Э обусловлено наличием именно ПГК, актуальной является задача их избирательного определения в присутствии других окрашенных веществ, содержащихся в фитопрепаратах. Для повышения избирательности и спектрофотометрического определения ПГК в лекарственных препаратах Э необходимо было выбрать реагент, который бы в данных условиях селективно взаимодействовал с ПГК. Известно, что ГК и ее производные обладают свойствами как карбоновых кислот, так и полифенолов. Легко гидролизующиеся ионы металлов образуют комплексы с такими соединениями, но не реагируют с продуктами их окисления [12]. Предложен метод спектрофотометрического определения ГК с хлористым цирконием, однако он характеризуется длительностью анализа и неудовлетворительной воспроизводимостью результатов [13]. В настоящей работе изучено взаимодействие $Al(III)$ с ГК, выбранной нами в качестве стандарта, с целью разработки методики спектрофотометрического контроля качества препаратов Э.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

Гидроксикоричную кислоту очищали перекристаллизацией ее препарата (“Реахим”) из горячей дистиллированной воды ($T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) и сушили до постоянного веса при $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Раствор ГК с концентрацией 0,2 г/л получали растворением точной навески препарата в дистиллированной воде. Раствор $AlCl_3$ (0,50 М) и NH_4Cl (10 %) готовили растворением навесок препаратов (“Реахим”) в 0,01 М HCl и дистиллированной воде, соответственно. Все реактивы, использованные в работе, соответствовали квалификации ч.д.а.

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, Germany) и КФК-3 в кюветах с толщиной слоя $l = 1\text{ см}$, рН

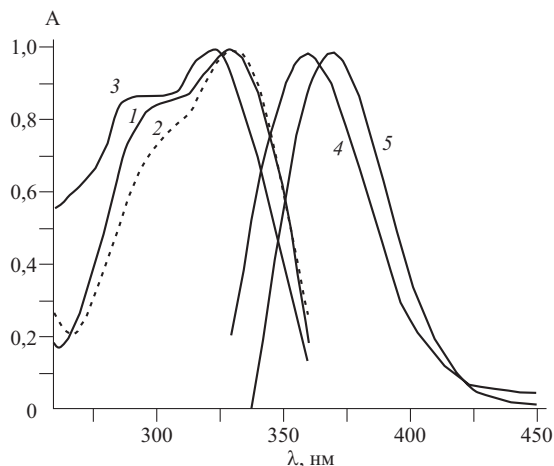


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения водных растворов ГК (1, 4), цикориевой кислоты (согласно [10]) (2) и настойки эхинацеи (3, 5) в отсутствие (1 – 3) и в присутствии (4, 5) Al(III). $C_{Al(III)} = 0,045$ моль/л

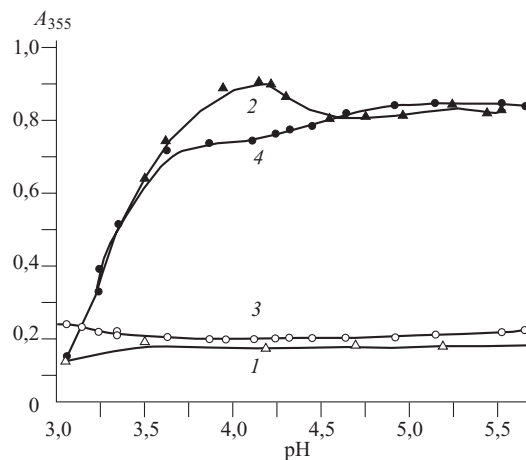


Рис. 2. Зависимость светопоглощения раствора ГК (1, 2) и настойки эхинацеи (3, 4) в отсутствие (1, 3) и в присутствии (2, 4) Al(III) от pH раствора. $C_{ГК} = 8,0$ мг/л, $C_{H_2O} = 1,2$ об. %, $C_{Al(III)} = 0,045$ моль/л, $l = 1$ см

растворов контролировали с помощью стеклянного электрода иономера универсального ЭВ-74.

Методика исследования

Для исследования зависимости светопоглощения раствора комплекса алюминия (III) с ПГК от pH в колбу на 25 мл вносили 1,0 мл 0,2 г/л раствора ГК или 0,3 мл настойки Э, 2,3 мл 0,5 М раствора $AlCl_3$, создавали необходимые значения pH введением 10 %-го раствора NH_4Cl и регистрировали оптическую плотность A_{355} .

Для изучения зависимости величины оптической плотности от концентрации Al(III) в раствор вносили 0,25 мл 0,2 г/л раствора ГК, 0,08 – 6,0 мл 0,5 М раствора $AlCl_3$, раствор NH_4Cl до pH 4,8 и регистрировали A_{355} .

Для построения градуировочного графика в 25 мл раствора вносили 0,1 – 10,0 мл 0,02 г/л раствора ГК, 2,3 мл 0,5 М раствора $AlCl_3$, раствор NH_4Cl до pH 4,8 и регистрировали A_{355} в кюветках толщиной 1 см.

Результаты и их обсуждение

Выбор стандартного вещества рекомендуется проводить, исходя из его доступности и наличия типичных свойств, характерных для анализируемого объекта. В данном случае таким свойством является свето-

поглощение в УФ и видимой области спектра. Спектральные характеристики более доступных по сравнению с цикориевой кислотой ПГК коричневой и хлорогеновой кислот существенно отличаются от свойств экстракта Э [4]. Из рис. 1 видно, что спектр поглощения раствора ГК (кривая 1) в целом аналогичен спектру цикориевой кислоты (кривая 2), приведенному в литературе [10], и спектру настойки Э (кривая 3). Это свидетельствует о том, что поглощение настойки Э в этой области, в основном, обусловлено цикориевой кислотой и другими ПГК. Спектры поглощения раствора ГК и водного экстракта Э в присутствии Al(III) (рис. 1, кривые 4 и 5, соответственно) также практически совпадают. Батохромный сдвиг максимума поглощения растворов при введении ионов металла обусловлен комплексообразованием Al(III) и ПГК в растворе. На основании сходных свойств и совпадения спектров поглощения ГК и цикориевой кислоты в отсутствие и в присутствии Al(III), доступности препарата ГК и легкости его очистки перекристаллизацией из водного раствора ГК была выбрана в качестве стандартного вещества при спектрофотометрическом определении суммарного содержания ПГК в препаратах Э. В качестве аналитической полосы поглощения была использована длина волны при 355 нм, что соответствует максимуму поглощения комплекса ГК и Al(III).

Для установления оптимальных условий определения ПГК было изучено светопоглощение растворов ГК в присутствии Al(III) в зависимости от pH раствора, концентрации алюминия хлорида и концентрации ГК.

Установлено, что максимальная оптическая плотность раствора ГК в присутствии Al(III) наблюдается при pH 3,7 – 5,5 (рис. 2, кривая 2). Оптимальным для определения ГК и ПГК является pH 4,5 – 5,5, т.к. в таких условиях поглощение практически не зависит от pH раствора, что улучшает воспроизводимость анализа. В этом диапазоне pH практически не меняется и поглощение настойки Э (НЭ) в присутствии $AlCl_3$ (рис. 2, кривая 4). В дальнейших экспериментах зна-

Таблица 1
Результаты определения гидроксикоричной кислоты в стандартных растворах ($n = 5, P = 0,95$)

Концентрация гидроксикоричной кислоты, мг/л	
Введено	Найдено $x \pm \Delta x$
0,20	$0,20 \pm 0,02$
1,20	$1,20 \pm 0,02$
4,0	$4,03 \pm 0,04$
8,0	$8,0 \pm 0,1$

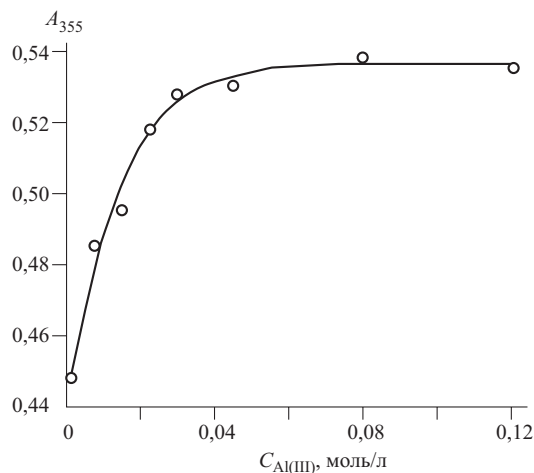


Рис. 3. Зависимость светопоглощения раствора ГК от концентрации Al(III). $C_{ГК} = 2,0$ мг/л, pH $4,8 \pm 0,1$, $l = 3$ см

чение pH в растворе $4,8 \pm 0,1$ создавали с помощью NH_4Cl .

Изучение зависимости аналитического сигнала от содержания Al(III) в растворе показало, что оптимальной для определения ГК является его концентрация 0,045 моль/л (рис. 3). Лучшими с этой точки зрения соединениями алюминия являются хлорид или сульфат. Использование $Al(NO_3)_3$ нежелательно вследствие окислительных свойств нитрат-иона.

В оптимальных условиях окраска раствора при взаимодействии Al(III) с ПГК возникает сразу после смешивания растворов и устойчива в течение, как минимум, полутора часов. Зависимость аналитического сигнала от концентрации ГК в растворе линейна в диапазоне 0,1 – 8,0 мг/л ГК.

Уравнение градуировочного графика:

$$A_{355} = (0,002 \pm 0,001) + (0,0841 \pm 0,0005)C_{ГК}(\text{мг/л}),$$

$$r = 0,9998.$$

Предел обнаружения составляет 0,1 мг/л ГК.

Для оценки метрологических характеристик разработанной методики проанализированы стандартные растворы ГК. Результаты приведены в табл. 1. Видно, что разработанная методика характеризуется удовлетворительными надежностью и воспроизводимостью.

Таблица 2

Результаты определения суммарного содержания ПГК (в пересчете на гидроксикоричную кислоту, мг/л) в препарате “Настойка корневищ с корнями эхинацеи пурпурной (серия 14.05.99)” по собственному поглощению согласно [7] и предложенным методом ($n = 3$, $P = 0,95$)

Продолжительность хранения препарата (месяцев)*	Найдено, мг/л	
	методом [7]	предложенным методом
10	1120 ± 11	601 ± 10
30	642 ± 5	123 ± 3

* Согласно аналитическому паспорту срок годности препарата — 24 месяца.

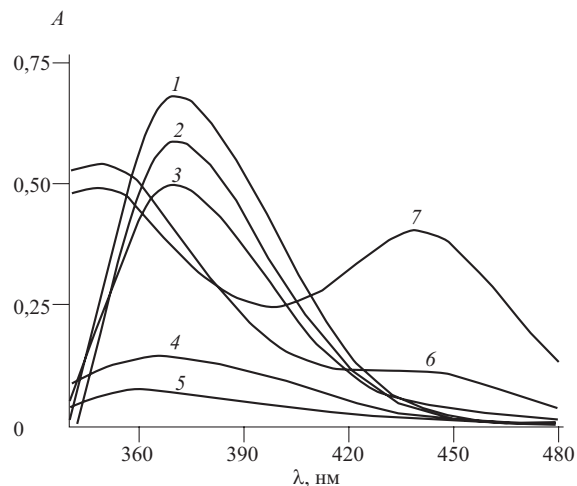


Рис. 4. Спектры поглощения препаратов эхинацеи (1 – 5) и модельных растворов, содержащих ГК и кверцетин в соотношениях 2:1 (6) и 10:1 (7) в присутствии Al(III). Концентрация препарата эхинацеи в анализируемом растворе, об. %: “Экстракт эхинацеи пурпурной жидкий” (Лубныфарм, серия 21100) — 0,48 (1), “Настойка корневищ с корнями эхинацеи пурпурной” (Киев, Серии 03.02.01 и 05.03.96) — 1,2 (2, 5), “Иммунал” (Словения, серии 1102810В и 43045009А) — 1,2 (3, 4). $C_{ГК} = 3,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{кверцетин}$, моль/л: $1,75 \cdot 10^{-5}$ (6), $3,5 \cdot 10^{-6}$ (7). $C_{Al(III)} = 0,045$ моль/л, pH $4,8 \pm 0,1$, $l = 1$ см

При анализе препаратов Э необходимо учитывать собственное поглощение компонентов, не образующих комплексы с Al(III) (в частности, продуктов окисления ПГК). Устранить влияние “фона” можно путем измерения поглощения раствора против раствора сравнения, содержащего все те же компоненты, что и исследуемый, кроме Al(III).

В табл. 2 приведена статистическая обработка результатов определения ПГК (в пересчете на ГК) в настойке Э в зависимости от продолжительности хранения. Видно, что с течением времени, вследствие окисления и разложения растительного комплекса, в т.ч. ПГК, уменьшается общая интенсивность поглощения настойки, причем наличие в ней других окрашенных соединений обуславливает отсутствие прямой пропор-

Таблица 3
Результаты определения суммарного содержания ПГК (в пересчете на гидроксикоричную кислоту, мг/л) в настойках корневищ с корнями эхинацеи пурпурной (1 – 6), экстракте эхинацеи пурпурной жидком (7) и препарате Иммунал (8 – 9) ($n = 3$, $P = 0,95$)

Лекарственный препарат	Производитель, № серии	Срок годности	Содержание ПГК, мг/л
1	Киев, 05.03.96	III 1997	95 ± 6
2	Киев, 14.05.99	V 2001	123 ± 3
3	Киев, 21.10.00	X 2002	65 ± 5
4	Киев, 03.02.01	II 2003	407 ± 9
5	Тернополь, 25.10.01	XI 2003	229 ± 7
6	Тернополь, 18.08.01	IX 2003	361 ± 4
7	Лубныфарм, 21100	XII 2002	1800 ± 20
8	Лек д.д. “Любляна”, Словения, 4304509А	IX 2001	170 ± 9
9	Лек д.д. “Любляна”, Словения 1102810В	X 2002	369 ± 8

циональности для зависимости ΔA — $\Delta C_{\text{ПГК}}$, что не учитывается при определении ПГК по собственному поглощению настойки методом [7]. Результаты, полученные с использованием разработанной методики, учитывающей собственное поглощение препарата, свидетельствуют об уменьшении с течением времени концентрации ПГК, и, соответственно, иммуномодулирующей активности препарата, почти в 5 раз, тогда как согласно [7] — лишь в 1,7.

Известно [1], что в этанольном экстракте эхинацеи наряду с ПГК в соизмеримых количествах присутствуют и другие природные полифенолы — флавоноиды (гликозиды апигенина, лютеолина, кемпферола, кверцетина и др.), обладающие значительным поглощением в области $\lambda = 320 - 380$ нм [10]. На примере кверцетина нами изучено влияние флавоноидов на результаты определения ПГК в препаратах Э. Кверцетин, как и ПГК, образует комплекс с Al(III), но его максимум поглощения находится при 433 нм [14]. На рис. 4 представлены спектры поглощения модельных растворов, содержащих ГК и кверцетин в различных соотношениях (кривые 1, 2), и препаратов Э (кривые 3 – 5) в присутствии Al(III). Видно (кривые 1, 2), что даже при соотношении концентрации ГК:кверцетин = 10:1 в спектре отчетливо проявляется полоса поглощения комплекса кверцетина с Al(III). В то же время, спектры поглощения настоек Э в присутствии Al(III) не имеют максимума в этой области, что свидетельствует об отсутствии кверцетина и других флавоноидов. Это можно объяснить тем, что при разбавлении настойки или другого препарата в процессе пробоподготовки примерно в 80 раз концентрация спирта уменьшается с 40 до 0,5 %, что приводит к осаждению флавоноидов, плохо растворимых в воде. Полученные данные свидетельствуют о том, что флавоноиды Э не мешают определению ПГК в водно-спиртовых фитопрепаратах данным методом.

Определение ПГК в препаратах эхинацеи

2,5 мл водно-спиртового препарата Э вносят в колбу емкостью 25 мл, разбавляют дистиллированной водой до метки, перемешивают и отфильтровывают через бумажный фильтр. Аликвотную часть 1,0 мл полученного раствора вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2,3 мл 0,5 М раствора AlCl_3

или $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 10 %-ый раствор NH_4Cl для создания pH $4,8 \pm 0,1$ и доводят раствор водой до метки. Полученный раствор перемешивают и измеряют его оптическую плотность на спектрофотометре (или фотоэлектроколориметре) при 355 нм в кювете с толщиной слоя $l = 1$ см относительно раствора сравнения, содержащего все те же компоненты, кроме Al(III). Содержание ПГК определяют в пересчете на ГК по градуировочному графику в координатах “ $A_{355} - C_{\text{ГК}}$ ”.

В табл. 3 представлены результаты определения ПГК в водно-спиртовых препаратах и препарате “иммунал” различных производителей. Правильность полученных результатов подтверждена методом добавок стандарта в препарат. Видно, что содержание ПГК, а значит, и биологическая активность препарата, изменяется в широких пределах даже в продукции одного предприятия, что еще раз подтверждает актуальность проблемы стандартизации препаратов Э.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Серeda, Г. Ф. Моисеева, *Фармаком*, № 3, 13 – 23 (1998).
2. V. K. Pogorelyi, V. V. Turov, V. N. Barvinchenko, et al., in: *Chemistry, Physics and Technology of Surfaces*, issue 4 – 6, 301 – 320 (2001).
3. R. Rawls, *C&EN*, Sept. 23, 53 – 60 (1996).
4. Л. М. Лысоченко, А. Г. Котов, Ю. В. Подпружников и др., *Провизор*, № 6, 37 – 38 (1999).
5. А. В. Симонян, *Хим.-фарм. журн.*, 27(2), 21 – 27 (1993).
6. ВФС 42У-100 / 38-194-96 на Настойку корневищ с корнями эхинацеи пурпурной.
7. В. А. Куркин, О. И. Авдеева, Е. В. Авдеева и др., *Растительные ресурсы*, вып. 2, 34, 81 – 85 (1998).
8. ФС 42-2371-94 на Траву эхинацеи пурпурной.
9. ФС 42-У-44 / 4-663-00 на Корневища с корнями эхинацеи пурпурной.
10. В. А. Барабой, *Биологическое действие растительных фенольных соединений*, Наукова думка, Киев (1976), с. 168.
11. В. П. Георгиевский, А. И. Гризодуб, в кн.: *Технология и стандартизация лекарств*, ООО “РИРЕГ”, Харьков (1996).
12. И. М. Коренман, *Фотометрический анализ. Методы определения органических веществ*, Химия, Москва (1975).
13. В. В. Беликов, М. С. Шрайбер, *Фармация*, № 1, 66 – 72 (1970).
14. В. В. Беликов, Т. В. Точкова, *Фарм. журн.*, № 5, 40 – 44 (1973).

Поступила 12.11.02