

В.М. Коваль¹, Л.В. Вронська²

Визначення екстракту ехінацеї у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіною та екстрактом ехінацеї пурпурової

¹Вінницький національний медичний університет ім. Пирогова,

²Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

Ключові слова: ехінацея пурпурова, екстракт, хроматографія, кафтарова кислота, цикорієва кислота.

Ключевые слова: эхинацея пурпурная, экстракт, хроматография, кафтаровая кислота, цикориевая кислота.

Key words: *Echinacea purple extract, chromatography, kaftaric acid, chicoric acid.*

Запропоновані ТШХ- і ВЕРХ-методици для визначення екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіною і екстрактом ехінацеї. У якості маркерів для ідентифікації і кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової запропоновано кафтарову і цикорієву кислоти.

Предложены ТСХ- и ВЭЖХ-методици для определения экстракта эхинацеи пурпурной в таблетках цинка аспарагината с кислотой аскорбиновой и экстрактом эхинацеи. В качестве маркеров для идентификации и количественного определения экстракта эхинацеи пурпурной предложено кафтаровую и цикориевую кислоты.

TLC and HPLC-method for determination of the Echinacea purple extract in tablets of zinc aspartate with ascorbic acid and Echinacea purple extract have been proposed. Kaftaric and chicoric acid have been suggested as markers for the Echinacea purple extract identification and assay.

Рослини роду *Echinacea (L.) Moench* знайшли широке застосування у медицині. Важливе значення мають ехінацея пурпурова, ехінацея вузьколиста і ехінацея біла [1]. Особливої популярності вони набули як імуномодулятори природного походження. Механізм дії препаратів ехінацеї визначається комплексом унікальних біологічно активних речовин (БАР) і є дуже складним, та, як і в більшості випадків з рослинними препаратами, до кінця невизначеним і суперечливим [2].

З введенням монографії на корені ехінацеї пурпурової у третью доповненні Державної фармакопеї України [3], до певної міри стало вирішеним питання підходу до контролю їх якості, зокрема вибрано маркерні речовини для ідентифікації і кількісного аналізу. Введення монографії на настойку ехінацеї вирішило питання контролю якості даного готового лікарського засобу, проте запропонований підхід не завжди може бути застосований при аналізі інших препаратів ехінацеї пурпурової в зв'язку з неселективністю використаної фотометричної реакції [3]. Автори [4] зробили спробу стандартизації ехінацеї пурпурової у багатокомпонентних рослинних сумішах за вмістом кислоти цикорієвої, проте з огляду на вимоги ДФУ до коренів ехінацеї пурпурової запропонований підхід не може застосовуватись. Тому необхідною є розробка об'єктивних і селективних методик ідентифікації і кількісного визначення БАР екстракту ехінацеї пурпурової.

Мета роботи

Розробка методик ідентифікації і кількісного визначення біологічно активних речовин екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіною і екстрактом ехінацеї пурпурової та встановлення критеріїв їх якості.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використано методи тонкошарової (ТШХ) і

високоєфективної рідинної (ВЕРХ) хроматографії. Для досліджень методом ТШХ застосовували хроматографічні пластинки Silica gel 60 F₂₅₄ («Merck», Німеччина), хроматографічну камеру «САМАГ», приладу для нанесення проб Linomat 5 («САМАГ», Швейцарія), лампу для перегляду хроматограм в ультрафіолетовому світлі «САМАГ». Для ВЕРХ-досліджень використовували рідинний хроматограф Agilent 1200 з детектором діодна матриця («Agilent», США).

Для ідентифікації і кількісного визначення використовували стандартні зразки фенолкарбонових кислот: хлорогенова кислота (Fluka), кавава кислота (Fluka), розмаринова кислота (Fluka), цикорієва кислота (фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ ДФУ)), кафтарова кислота (Sigma) і стандартний зразок аскорбінової кислоти (Sigma). Точні наважки стандартних взірців розчиняли у відповідних об'ємах 70% спирту етилового.

Використовували реактиви (етилацетат, кислоту мурашину безводну, аміноетиловий ефір дифенліборної кислоти, макрогол 400, кислоту ортофосфорну, ацетонітрил) кваліфікації чистоти, що відповідає вимогам ДФУ для відповідних методів аналізу, розчини реактивів готували за методиками ДФУ [5].

Хроматографічні характеристики речовин у методі ТШХ розраховували за формулами відповідно до [6], а в методі ВЕРХ – відповідно до [5].

Результати та їх обговорення

Селективним і експресним методом і найчастіше використовуваним для ідентифікації БАР у лікарській рослинній сировині (ЛРС) та препаратах на її основі, залишається тонкошарова хроматографія. У монографії на корені ехінацеї пурпурової пропонується ідентифікувати ряд БАР, проте тим же методом ВЕРХ доводиться принципова відмінність трьох використовуваних видів ехінацеї – білої, вузьколистої і пурпурової, зокрема

для останньої притаманна наявність цикорієвої і кафтарової кислот. Маркери, запропоновані у монографії на корені ехінацеї, не є широко доступними стандартними речовинами, тому розглянуто можливість використати 2 фенолкарбонові кислоти у якості маркерів для ТШХ-ідентифікації екстракту ехінацеї у складі досліджуваних таблеток. Екстракт ехінацеї, використаний при створенні таблеток, попередньо досліджували на тотожність екстрактові саме ехінацеї пурпурової через наявність зазначених гідроксикоричних кислот. Тому ці речовини обрано для ідентифікації і кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї пурпурової.

Як відомо, вибір рухомої фази у хроматографії завжди важливіший від вибору нерухомої. Випробувано ряд складів рухомих фаз, використовуваних при ТШХ-дослідженнях фенолкарбонових кислот і флавоноїдів. Найефективніше розділення БАР екстракту коренів ехінацеї пурпурової (цикорієвої і кафтарової кислот) з іншими гідроксикоричними кислотами і кислотою аскорбіновою спостерігали при застосуванні рухомої фази кислота мурашина безводна – вода – етилацетат (6:9:90). На отриманих хроматограмах спостерігали чітко розділені зони, а результати визначення деяких хроматографічних характеристик досліджуваних БАР наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Хроматографічні характеристики гідроксикоричних кислот і кислоти аскорбінової у системі розчинників кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р (6:9:90)

Речовина	R_f	Коефіцієнт розділення	Число теоретичних тарілок
Кислота аскорбінова	0,29	62	3136
Кислота хлорогенова	0,32	74	4096
Кислота кафтарова	0,37	109	5476
Кислота цикорієва	0,76	264	23104
Кислота розмаринова	0,80	287	25600
Кислота кавова	0,82		26896

Наведені у таблиці 1 дані вказують на придатність дослідженої системи розчинників для ідентифікації кафтарової і цикорієвої кислот як маркерів БАР екстракту ехінацеї пурпурової за наявності кислоти аскорбінової та деяких інших фенолкарбонових кислот методом ТШХ. Отже, ідентифікацію екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї пропонуємо проводити за кислотою кафтаровою і цикорієвою відповідно до поданої нижче методики.

Методика ідентифікації екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагінату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї

Випробуваний розчин. 0,6 г порошку розтертих таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 15 мл спирту (70% об/об), витримують в ультразвуковій

бані протягом 15 хв, доводять об'єм розчину спиртом (70% об/об) до позначки, перемішують і фільтрують.

Розчин порівняння. 0,5 мг кислоти кафтарової і 0,5 мг кислоти цикорієвої розчиняють у 25,0 мл спирту (70% об/об).

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо смугами по 10 мм наносять 20 мкл випробуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру з сумішшю розчинників кислота мурашина безводна – вода – етилацетат (6:9:90). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають з камери.

Висушування. Сушать на повітрі, а потім витримують за температури від 100 до 105°C протягом 2 хв.

Виявлення. Теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, сушать на повітрі. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Результати. На хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися (у порядку зростання R_f): блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті кафтаровій ($R_f = 0,37$); блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті цикорієвій ($R_f = 0,76$).

На хроматограмі випробуваного розчину мають виявлятися 2 зони (кислоти кафтарової і кислоти цикорієвої) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією, і зона кислоти аскорбінової ($R_f = 0,29$) нижче зони кислоти кафтарової на хроматограмі розчину порівняння. Може виявлятися інша зона блакитної або синьої флуоресценції (кислота кавова ($R_f = 0,82$)).

Послідовність зон на хроматограмах випробуваного розчину та розчину порівняння наведено на рис. 1.

Верхня частина пластинки	
<i>Кислота цикорієва:</i> зеленкувато-блакитна флуоресціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота кавова) зеленкувато-блакитна флуоресціююча зона (кислота цикорієва)
<i>Кислота кафтарова:</i> блакитна флуоресціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота кафтарова) фіолетова флуоресціююча зона (кислота аскорбінова)
Розчин порівняння	Випробуваний розчин

Рис. 1. Схема хроматограми в умовах ідентифікації екстракту ехінацеї після обробки розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і макрогону при перегляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Кількісне визначення фенолкарбонових кислот у ГЛЗ частіше всього проводять спектрофотометрично, як, наприклад, для настойки ехінацеї пурпурової [3], застосовуючи сумарні фотометричні реакції для отримання забарвленої сполуки. За наявності кислоти аскорбінової, як у нашому випадку, запропонована [3] реакція фенолкарбонових кислот з молібден-нітритним реактивом не може бути використана, оскільки аскорбінова кислота також дає цю реакцію. Тому для визначення екстракту

Таблиця 2

Схема градієнта елюювання при кількісному визначенні фенолкарбонових кислот екстракту ехінацеї пурпурової

Час, хв	Рухома фаза А, (% об/об)	Рухома фаза В, (% об/об)
0	90	10
0–13	90 → 78	10 → 22
13–14	78 → 60	22 → 40
14–20	60	40

Придатність хроматографічної системи:

– коефіцієнт розділення: не менше 5 для піків кислоти кавової та кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння.

Визначають піки кислоти хлорогенової та кислоти кавової, використовуючи хроматограму розчину порівняння. Визначають піки кислоти кафтарової та кислоти цикорієвої, використовуючи відносні часи утримування і схему хроматограми, наведену на рис. 1824.-1 у [3].

Вміст кислоти кафтарової (X_1) у відсотках від вмісту екстракту ехінацеї у таблетках обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{A_1 \cdot 0,881 \cdot b}{2 \cdot A_0 \cdot m \cdot a} \cdot 100$$

Вміст кислоти цикорієвої (X_2), у відсотках від вмісту екстракту ехінацеї у таблетках обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{A_2 \cdot 0,695 \cdot b}{2 \cdot A_0 \cdot m \cdot a} \cdot 100$$

де A_1 – площа піка кислоти кафтарової на хроматограмі випробовуваного розчину;

A_0 – площа піка кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння;

A_2 – площа піка кислоти цикорієвої на хроматограмі випробовуваного розчину;

a – декларований вміст екстракту ехінацеї у таблетці, г;

b – середня маса таблетки, г;

m – маса наважки порошку розтертих таблеток, г;

0,695 – коефіцієнт перерахунку для кислоти цикорієвої в описаних умовах хроматографування;

0,881 – коефіцієнт перерахунку кислоти кафтарової за кислотою хлорогеновою в описаних умовах хроматографування.

Використано ряд колонок з октадецилсилильним силікагелем (AquaPerfect C18, XTerra C18). Найкращі значення коефіцієнтів симетрії та коефіцієнтів розділення піків кислоти хлорогенової і кислоти кавової на хроматограмі розчину порівняння отримано на колонці XTerra C18. Час утримування піка кислоти хлорогенової і відносні часи утримування піків кислоти кафтарової і кислоти цикорієвої при застосуванні описаного градієнту найближчі до запропонованих у ДФУ [3] отримано при використанні колонки XTerra C18.

ехінацеї у таблетках цинку аспарагіату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї обрано метод ВЕРХ. Серед апробованих хроматографічних систем вибір зупинено на описаній у монографії «Ехінацеї пурпурової корені», оскільки використовуючи фармакопейні методики можна скоротити об'єм валідаційних робіт.

Дослідження умов пробопідготовки дали змогу запропонувати спирт (70 % об/об) для розчинення БАР проби; ультразвукову обробку протягом 15 хв для підвищення ефективності вилучення БАР екстракту з порошку розтертих таблеток; кінцеве розбавлення випробовуваного розчину і розчину порівняння розчином, що містить рухому фазу А і рухому фазу В у співвідношенні 90:10, що дало змогу покращити симетрію хроматографічного піка кислоти кафтарової. Отже, для кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагіату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї запропонована методика подана нижче.

Методика кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагіату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї

Випробовуваний розчин. 1,20 г порошку розтертих таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 30 мл спирту (70% об/об) Р, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв і доводять об'єм розчину спиртом (70% об/об) Р до 50,0 мл. Отриману суспензію перемішують і витримують декілька хвилин до осадження видимих твердих частинок, фільтрують.

2,0 мл отриманого фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 5 мл і доводять об'єм розчином, що містить рухому фазу А і рухому фазу В у співвідношенні 90:10, до позначки та перемішують.

Розчин порівняння. 10,0 мг стандартного зразка кислоти хлорогенової і 10,0 мг стандартного зразка кислоти кавової розчиняють у спирті (70% об/об) Р, витримують в ультразвуковій бані протягом 15 хв і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл. 1,0 мл отриманого розчину доводять розчином, що містить рухому фазу А і рухому фазу В у співвідношенні 90:10, до об'єму 25,0 мл.

Колонка:

– розмір 0,25 м × 4,6 мм;

– *нерухома фаза* – силікагель октадецилсилильний для хроматографії Р (5 мкм);

– *температура* 35°C.

Рухома фаза:

– *рухома фаза А:* кислота фосфорна Р – вода Р (1:999);

– *рухома фаза В:* ацетонітрил Р (табл. 2).

Швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв.

Детектування спектрофотометрично за довжини хвилі 330 нм.

Об'єм інжекції 10 мкл.

Відносні часи утримування до кислоти хлорогенової (час утримування кислоти хлорогенової близько 7 хв): кислоти кафтарової – близько 0,8; кислоти кавової – близько 1,2; кислоти цикорієвої – близько 2,3.

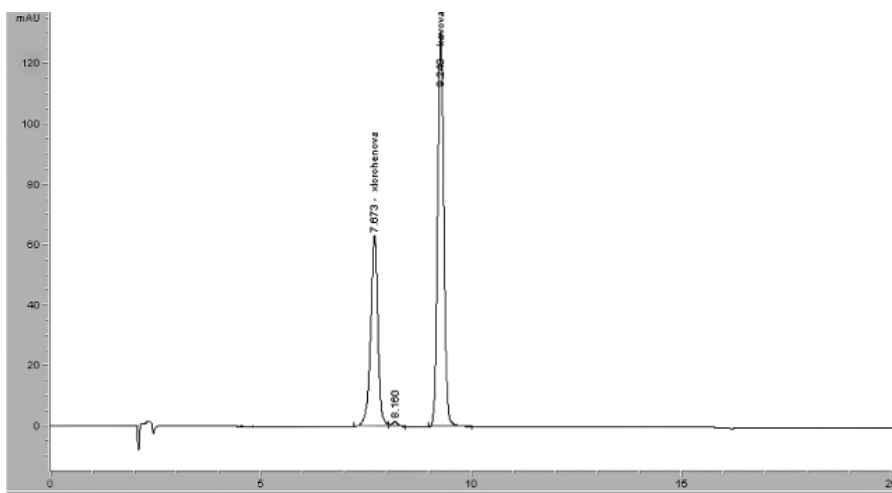


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння в умовах кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової (час утримування кислоти хлорогенової – 7,673 хв, кислоти кавової – 9,248 хв).

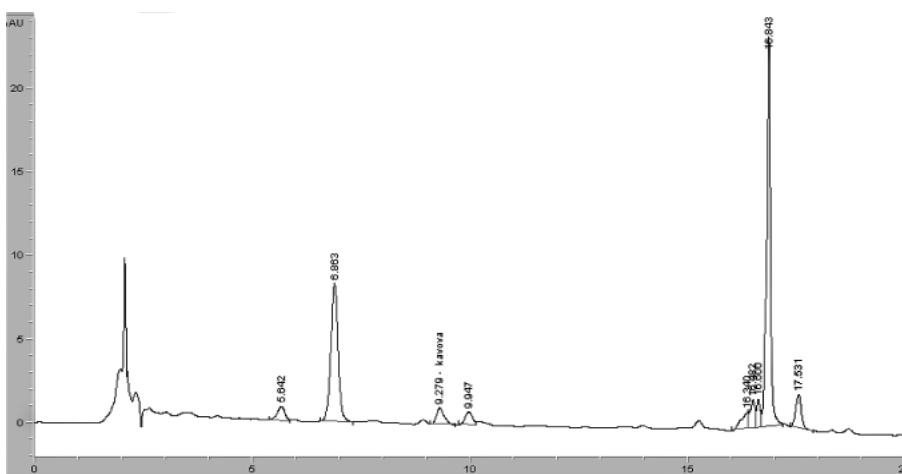


Рис. 3. Хроматограма випробовуваного розчину в умовах кількісного визначення екстракту ехінацеї пурпурової (час утримування кислоти кафтарової – 6,863 хв, кислоти цикорієвої – 16,843 хв).

На рис. 2, 3 наведені хроматограми розчину порівняння і випробовуваного розчину, отримані згідно запропонованої методики на колонці XTerra C18.

У запропонованих умовах хроматографування досліджено поведінку кислоти аскорбінової. Встановлено, що вона не детектується при довжині хвилі 330 нм, тому не заважає визначенню екстракту ехінацеї пурпурової. Для вивчення поведінки цинк аспарагіату в обраних умовах хроматографували його насичений розчин у спирті (70% об/об), перед хроматографуванням розбавлений (як і всі розчини) сумішшю рухомих фаз А і В, що відповідала складу рухомої фази на нульовій хвилині градієнта. Ви-

явлено, що цинк аспарагіат у запропонованих умовах не детектується, а отже, не заважає визначенню БАР екстракту ехінацеї пурпурової. Інші активні фармацевтичні інгредієнти таблеток не впливають на кількісне визначення екстракту ехінацеї, а отже, запропонована методика є селективною.

За отриманими хроматограмами розчину порівняння і випробовуваного розчину розраховували деякі хроматографічні характеристики піків використуваних і визначуваних речовин (табл. 3), значення яких вказують на придатність хроматографічної системи.

Таблиця 3

Хроматографічні характеристики гідроксикоричних кислот в умовах ВЕРХ-визначення екстракту ехінацеї пурпурової

Речовина	Час утримування, хв	Коефіцієнт розділення	Коефіцієнт симетрії	Число теоретичних тарілок
Кислота хлорогенова	7,6	6,49	1,10	16154
Кислота кавова	9,2		0,92	23407
Кислота кафтарова	6,9	44,55	1,05	14980
Кислота цикорієва	16,8		1,18	90060

Результати визначення фенолкарбонових кислот екстракту ехінацеї пурпурової методом ВЕРХ (n=5, P=0,95)

Зразок	Вміст		
	Кислоти кафтарової, %	Кислоти цикорієвої, %	Сумарний вміст фенолкарбонових кислот, %
Екстракт ехінацеї пурпурової	0,39 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,85 ± 0,01
Модельна суміш	0,40 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,86 ± 0,01
Таблетки*	*0,39 ± 0,01	*0,45 ± 0,02	*0,84 ± 0,01

Примітка: * – вміст БАР у таблетках (у %) розраховували відносно до декларованого вмісту екстракту ехінацеї у таблетках.

У досліджених умовах хроматографування проаналізовано екстракт ехінацеї пурпурової, модельна суміш з активних інгредієнтів, що входять до складу аналізованих таблеток у співвідношенні, що відповідає складу у ГЛЗ, і таблетки цинку аспарагіату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї пурпурової. Результати визначення кислоти кафтарової і кислоти цикорієвої у зазначених зразках наведено у *таблиці 4*.

Як впливає з результатів кількісного визначення, запропонована методика пробопідготовки і кількісного визначення може бути використана для аналізу сухого екстракту ехінацеї пурпурової і ГЛЗ, що його містить.

Висновки

1. Ідентифікаційними і кількісними маркерами екстракту ехінацеї пурпурової у таблетках цинку аспарагіату з кислотою аскорбіновою і екстрактом ехінацеї доцільно обрати кислоту кафтарову і цикорієву.

2. Для ідентифікації БАР екстракту ехінацеї доцільно застосовувати метод ТШХ з використанням рухомої фази кислота мурашина безводна – вода – етилацетат (6:9:90) та кафтарової і цикорієвої кислот як речовин-свідків.

3. Для стандартизації вмісту екстракту у таблетках запропоновано кількісне визначення кислоти кафтарової і кислоти цикорієвої методом ВЕРХ з використанням кислоти хлорогенової як зовнішнього стандарту.

Список літератури

1. *Мамчур Ф.І.* Хімічний склад, фармакологічні властивості рослин роду *Echinacea* (Asteraceae) / Ф.І. Мамчур, Б.М. Зузук, А.А. Василюшин // Фарм. журнал. – 1993. – №2. – С. 38–40.
2. *Куцик Р.В.* Імунокоригуючі і протизапальні властивості біологічно активних речовин рослин роду *Echinacea* Moench / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук, О.В. Рибак // Провізор. – 1999. – №4. – С. 40–45.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. –
4. *Гудзенко А.В.* Стандартизація ехінацеї пурпурової у багатокомпонентних рослинних сумішах / А.В. Гудзенко, Т.В. Ковальчук, О.О. Цуркан // Фарм. журнал. – 2009. – №1. – С. 130–135.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
6. *Васильєв В.П.* Аналітична хімія / Васильєв В.П. – М.: Дрофа, 2004. – 322 с.

Відомості про авторів:

Коваль В.М., здобувач, асистент каф. фармації ВНМУ ім. М.І. Пирогова.
Вронська Л.В., к. хім. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського.

Адреса для листування:

Коваль Василь Миколайович. 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, каф. фармації ВНМУ ім. М.І. Пирогова.
E-mail: koval_vm@ukr.net

Надійшла в редакцію 11.06.2012 р.