

УДК 543.42.062 + 582.998

ПРИМЕНЕНИЕ ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ХАМАЗУЛЕНА В ЦВЕТКАХ *MATRICARIA CHAMOMILLA*

© Т.М. Шишмарева

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6,
Улан-Удэ, 670047 (Россия), e-mail: shishmarevatm@rambler.ru

В данной работе предложена стандартизация сырья ромашки аптечной с применением пикриновой кислоты. Разработана методика количественного определения суммарного содержания хамазулена в цветках *Matricaria chamomilla* спектрофотометрическим методом. При исследовании спектра поглощения спиртового раствора эфирного масла *M. chamomilla* после обработки кислотой пикриновой установлено, что его максимум приходится на 657 нм и совпадает с таковым пикрата хамазулена. В качестве аналитической длины волны выбрана точка при 657 нм.

Для оценки правильности разработанной методики проведены эксперименты способом «введено–найдено» и установлено, что относительная ошибка не превышает 3,5%. Относительная ошибка определения в серии последовательных измерений не превышает значения 2,5%, а в серии параллельных измерений – 5,5%. Проведенный метрологический анализ показал, что методика является правильной и воспроизводимой. С помощью разработанной методики определено количественное содержание хамазулена в 6 промышленных партиях сырья. Суммарное содержание хамазулена в цветках *M. chamomilla* находится в пределах 8,49–20,05 мг%. Содержание хамазулена в цветках ромашки аптечной в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 8 мг%.

Ключевые слова: *Matricaria chamomilla* (L.) Rauschert, Asteraceae, пикриновая кислота, хамазулен, количественное определение, спектрофотометрия.

Введение

Ромашка аптечная [*Matricaria chamomilla* (L.) Rauschert] – официальное лекарственное растение сем. *Asteraceae*, соцветия которого широко используются в народной медицине в качестве противовоспалительного, спазмолитического, вяжущего, ветрогонного и слабого антисептического средства. Химический состав цветков *M. chamomilla* сложный и представлен разными классами соединений: сесквитерпены, полиины, флавоноиды, кумарины, фенолкарбоновые кислоты, полисахариды, дубильные вещества [1–4].

В России контроль качества цветков *M. chamomilla* ведется по содержанию эфирного масла [5]; за рубежом – также по содержанию эфирного масла и наличию в нем хамазулена и α -бисаболола [6, 7]. По данным литературы известна методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках ромашки аптечной спектрофотометрическим методом [8]. В работах А.В. Куркиной обоснованы методические и методологические подходы к химической стандартизации цветков ромашки аптечной с использованием спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии и ГСО рутина [9–10]. Применение хромато-масс-спектрометрии для изучения компонентного состава летучей фракции экстракта цветков ромашки аптечной показало, что экстракт содержит специфическое летучее соединение – маркер (айапанин, производное кумарина), позволяющий проводить однозначную идентификацию данного лекарственного растительного сырья [11].

Методы количественного определения хамазулена сводятся к хроматографическому разделению эфирного масла в тонком слое адсорбента с последующим колориметрическим (фотометрическим) определением хамазулена [12, 13]. Известные методики количественного определения хамазулена характеризуются значительной относительной ошибкой определения, трудоемкостью процесса и использованием в качестве стандартных образцов малодоступных реактивов.

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения суммарного содержания хамазулена в цветках *M. chamomilla* с применением пикриновой кислоты.

Шишмарева Татьяна Михайловна – научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, кандидат фармацевтических наук, e-mail: shishmarevatm@rambler.ru

Экспериментальная часть

Растительное сырье. Растительным объектом служили цветки *M. chamomilla*, приобретенные через аптечную сеть.

Общие экспериментальные условия. Спектры поглощения регистрировали на приборе CE 2011 (Cecil Instruments, USA) и СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Температуру плавления определяли на приборе для определения температуры плавления IA-9100 (Selecta, Испания). ИК-спектры снимали в таблетке с бромидом калия (1 : 100) на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 (Симекс, Россия). Эфирное масло получали из цветков *M. chamomilla* методом гидродистилляции в аппарате Клевенджера. ТСХ проводили на пластинах Sorbfil (подвижная фаза – гексан). В качестве детектора применяли 0,5% раствор KMnO_4 в 10% H_2SO_4 .

Получение хамазулена пикрата. Раствор 2 мл эфирного масла *M. chamomilla* в 5 мл гексана наносили на колонку с Al_2O_3 (50 г; 3×20 см), элюировали гексаном. Элюат голубого цвета собирали, концентрировали и рехроматографировали на колонке с SiO_2 (L 100/400, 50 г, 3×20 см). Элюирование проводили гексаном. Элюаты голубого цвета, объединяли и отгоняли весь гексан под вакуумом (ТСХ R_f 0.67). Выделенный хамазулен растворяли в 5 мл 95% этаноле, нагревали до температуры 80 °С и смешивали с 5 мл горячего 10% раствора кислоты пикриновой в 95% этаноле. Полученную смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 мин и оставляли при температуре 0–2 °С. Через 15–20 мин смесь отфильтровывали и выпавший осадок перекристаллизовывали из 95% этанола.

Пикрат хамазулена. $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_7\text{N}_3$. $T_{\text{пл}}$ 115–117 °С (этанол). УФ-спектр, λ_{max} (этанол): 242, 284, 340, 657 нм. $E_{1\text{см}}^{1\%}$ (657 нм, 95% этанол) 23,0±1,36. ИК-спектр, см^{-1} : 635, 706, 733, 777, 821, 915, 939, 964, 1027, 1080, 1145, 1278, 1310, 1340, 1367, 1431, 1544, 1604, 1632, 2872, 2934, 2969, 3109.

Микроколоночная ВЭЖХ-УФ (МК-ВЭЖХ-УФ). Условия: колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, Ø 5 мкм; Metrohm AG); подвижная фаза: 0,2 М LiClO_4 в 0,006 М HClO_4 (А), MeCN (В); градиентный режим (% В): 0–10 мин 50–100%, 10–15 мин 100%; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор, λ 284 нм.

Методика количественного определения суммарного содержания хамазулена в цветках M. chamomilla. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1,0 мм. Около 15,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 1000 мл и приливают 600 мл воды очищенной. К колбе прикрепляют через переходник обратный холодильник с аллонжем, опущенным в делительную воронку вместимостью 50 мл с 1 мл гексана. Колбу с содержимым нагревают на плитке до кипения и поддерживают температуру, при которой скорость стекания дистиллята составляет 60–65 капель в минуту в течение 3 ч. После окончания перегонки в перегонную колбу вносят 5 мл гексана, после чего дистилляцию продолжают еще 10 мин. После расслоения слоев в приемнике гексановый слой переносят в круглодонную колбу вместимостью 50 мл и отгоняют растворитель на вакуумном испарителе при температуре не выше 80 °С. К остатку эфирного масла приливают 5 мл 10% раствора кислоты пикриновой в 95% этаноле, реакционную смесь нагревают до кипения. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки 95% этанолом. Оптическую плотность раствора измеряют через 3 ч на спектрофотометре при длине волны 657 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 10% раствор кислоты пикриновой в 95% этаноле, выдержанный в тех же условиях, что и реакционная смесь.

Суммарное содержание хамазулена (X , мг%) в пересчете на абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot k^V}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m} \cdot \frac{100}{100 - W} \cdot K \cdot 1000,$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; k^V – коэффициент разбавления исследуемого раствора (25); $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный коэффициент погашения пикрата хамазулена в 95% этаноле при длине волны 657 нм (23,0); m – масса навески сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; K – коэффициент пересчета на хамазулен (0,446); 1000 – коэффициент пересчета в мг%.

Приготовление раствора сравнения пикриновой кислоты. 5 мл 10% раствора кислоты пикриновой в 95% этаноле помещают в грушевидную колбу вместимостью 50 мл, нагревают до кипения, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки 95% этанолом.

Метрологический анализ результатов проводили согласно рекомендациям Государственной фармакопеи и др. [5, 14–17].

Обсуждение результатов

Хамазулен – единственный окрашенный компонент эфирного масла *M. chamomilla*, хотя в более строгом смысле его нельзя назвать компонентом, так как он является артефактом, представляющим конечный продукт, в который переходят проазуленовые соединения в процессе гидродистилляции. Обладая интенсивным синим цветом, он вполне пригоден в качестве аналитического компонента при количественном анализе эфирного масла, но, несмотря на это, следует указать на значительный недостаток хамазулена как стандартного вещества. Агрегатное состояние данного соединения – жидкость, что затрудняет процесс проведения ряда аналитических процедур (взятие навесок, построение градуировочного графика и др.). Для устранения этого недостатка нами рассмотрено использование кристаллических производных данного соединения. Известно, что азулены дают стабильные кристаллические соединения с пикриновой и стифниновой кислотами. Исходя из соображений экономичности и безопасности, нами был выбран пикрат хамазулена (ПХ). Химически процесс получения производного довольно прост. На основании данных УФ- и ИК-спектроскопии полученный продукт является ПХ (рис. 1 и 2), а не смесью исходных компонентов (хамазулен, пикриновая кислота). Согласно данным МК-ВЭЖХ-УФ после перекристаллизации ПХ обладает чистотой 96–98%; содержание примеси кислоты пикриновой не превышало 0,5–1,0% (рис. 2).

При исследовании спектра поглощения спиртового раствора эфирного масла *M. chamomilla* после обработки кислотой пикриновой установлено, что его максимум приходится на 657 нм и совпадает с таковым ПХ (рис. 3). Растворы кислоты пикриновой в данной области спектра собственным поглощением не обладают, поэтому не влияют на характер спектральных кривых. В качестве аналитической длины волны выбрана точка при 657 нм.

Линейность оптической плотности в диапазоне 0,2–0,7 опт. ед. наблюдается для растворов ПХ с концентрациями 0,14–0,47 мг/мл. Уравнение линейной регрессии для градуировочного графика имеет вид: $D = 1,51 \cdot x - 0,0126$ ($K_{\text{инстр}}$ 0,98).

При определении оптимальных параметров гидродистилляции измельченного сырья *M. chamomilla* (табл. 1) установлено, что максимальное содержание эфирного масла достигается при использовании в качестве дистилляционной среды воды очищенной.

Использование растворов неорганических солей неоправданно: при незначительном увеличении выхода эфирного масла (5–7%) появлялись дополнительные проблемы с эвакуацией содержимого перегонной колбы, как например, при охлаждении растворы кальция хлорида дают прочную корку солей. При соотношении сырье – экстрагент 1 : 40 в условиях кипения равновесие наступало через 3 ч. В реакции образования комплекса ПХ используется 5 мл 10% раствора кислоты пикриновой в 95% этаноле, что обеспечивает максимальный выход ПХ. Устойчивость комплекса ПХ наступала через 3 ч и оставалась постоянной в течение 24 ч.

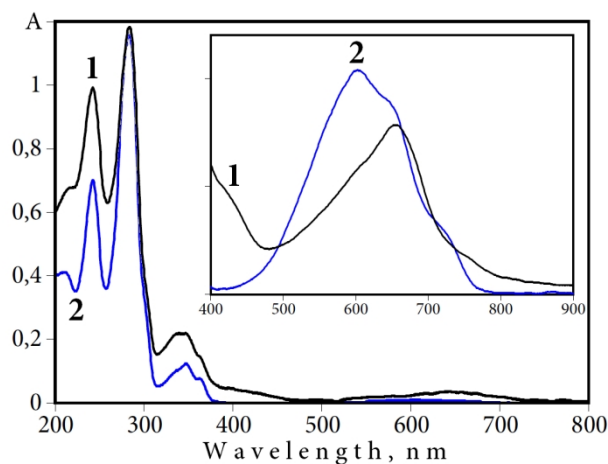


Рис. 1. Спектры поглощения растворов ПХ (1) и хамазулена (2) в 95% этаноле.

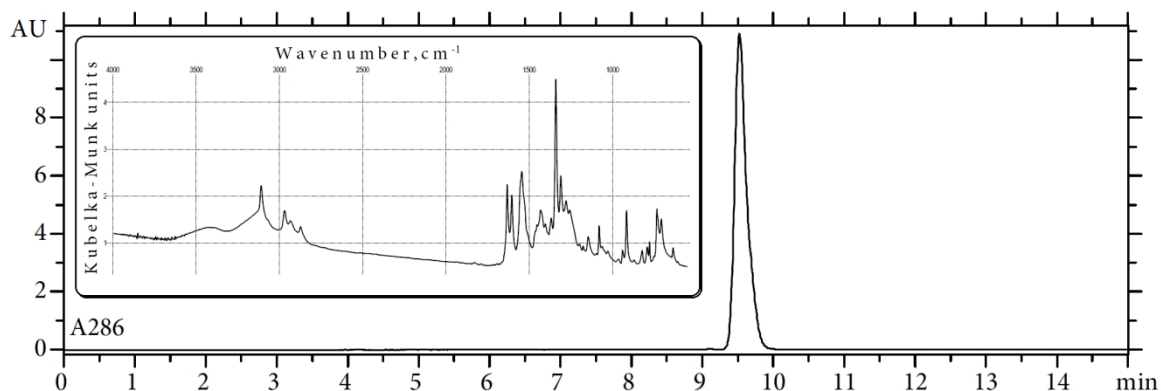


Рис. 2. Хроматограмма раствора ПХ в ацетонитриле ($c = 2$ мг/мл). На врезке – ИК-спектр ПХ в таблетке с КВг

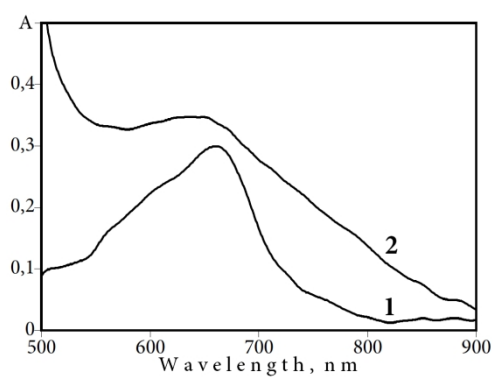


Рис. 3. Спектры поглощения растворов ПХ (1) и образца эфирного масла (2) в 95% этаноле

Таблица 1. Выбор оптимальных условий гидродистилляции измельченного сырья *M. chamomilla*

Условия гидродистилляции	Суммарное содержание хамазулена, мг%
Тип экстрагента	
вода	13,54
40% раствор хлорида натрия	15,02
Время гидродистилляции, мин	
30	2,89
60	6,62
90	9,20
120	11,19
150	12,34
180	14,06
210	14,46
240	15,03
300	15,24
Соотношение сырье : экстрагент	
1 : 20	7,93
1 : 30	13,26
1 : 40	14,42
1 : 50	14,06
1 : 60	12,62

Оценку правильности разработанной методики проводили с использованием метода «введено – найдено», используя добавки хамазулена в исходное растительное сырье. При исследовании методики способом «введено – найдено» установлено, что относительная ошибка не превышает 3,5% (табл. 2).

Метрологические характеристики разработанной методики выявляли в серии последовательных и параллельных определений (табл. 3). Относительная ошибка определения в серии последовательных и параллельных измерений не превышала значений 2,5 и 5,5% соответственно.

С помощью разработанной методики определено количественное содержание хамазулена в 6 коммерческих партиях сырья (табл. 4). Установлено, что для разных производителей значения составили 8,49–20,05 мг%.

Таблица 2. Результаты эксперимента способом «введено-найдено»

Содержание хамазулена в аликвоте, мг	Введено хамазулена, мг	Должно быть хамазулена, мг	Найдено хамазулена, мг	Ошибка	
				Абсолютная, мг%	Относительная, %
13,93	0,71	14,64	14,15	-0,49	3,40
13,93	1,43	15,36	15,78	+0,42	2,70
13,93	2,14	16,07	15,80	-0,27	1,69

Таблица 3. Метрологические характеристики разработанной методики в серии последовательных (А) и параллельных определений (В)

	<i>n</i>	\bar{x} , %	S ²	S _x	P	t _{p,t}	±Δx, %	E, %
А	9	13,93	0,170	0,137	95	2,36	0,32	2,33
В	10	16,17	1,386	0,372	95	2,26	0,84	5,20

Таблица 4. Содержание хамазулена в коммерческих партиях сырья *M. chamomilla*

Производитель (серия)	Содержание хамазулена, мг%
ЗАО «СТ-Медифарм», г. Москва (150914)	8,49–9,26
ООО «Zamona Rano», Республика Узбекистан (070614)	11,30–13,45
ООО «Травы Башкирии» (091014)	11,80–14,71
ООО «ЛекС+», г. Химки (120815)	15,49–17,29
ООО «Фарм-Продукт», г. Барнаул (050515)	16,13–17,43
ОАО «Красногорсклексредства», г. Красногорск (240614)	19,17–20,05

Выводы

С помощью разработанной методики определено количественное содержание хамазулена в 6 промышленных партиях сырья. Установлено, что для разных производителей суммарное содержание хамазулена в цветках *M. chamomilla* находится в пределах 8,49–20,05 мг%. Содержание хамазулена в *M. chamomilla* в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 8 мг%.

Список литературы

1. Горин А.Г., Яковлев А.И. Пектовая кислота из полисахаридного комплекса цветков *Matricaria chamomilla* // Химия природных соединений. 1971. №4. С. 515–516.
2. Горин А.Г., Яковлев А.И. Полисахариды *Matricaria chamomilla*. Моносахаридный состав полисахаридного комплекса // Химия природных соединений. 1974. №2. С. 137–141.
3. Коновалова О.А., Рыбалко К.С. Биологически активные вещества ромашки аптечной // Растительные ресурсы. 1982. Вып. 1. С. 116–127.
4. Четверня С.А. Сравнительное изучение фенолов соцветий двух видов *Matricaria* L. // Растительные ресурсы. 1986. Вып. 3. С. 373–377.
5. Государственная фармакопея СССР. XI изд., вып. 1. М., 1987. 335 с.
6. Gasic O., Lukic V., Nikolic A. Chemical study of *Matricaria chamomilla* L.–II // Fitoterapia. 1983. Vol. 54. Pp. 51–55.
7. Holzl J., Demuth G. Influence of ecological factors on the composition of the essential oil and the flavones in *Matricaria chamomilla* of different origin // Planta Medica. 1975. Vol. 27. P. 37.
8. Бубенчикова В.Н., Кондратова Ю.А. Разработка методик качественного и количественного определения флавоноидов в сырье ромашки аптечной // Кубанский научно-медицинский вестник. 2006. №10. С. 19–21.
9. Куркина А.В. Актуальные аспекты стандартизации лекарственных растений, содержащих флавоноиды // Бюллетень сибирской медицины. 2011. №5. С. 150–153.
10. Куркина А.В. Современная стандартизация как методологическая основа рационального использования ресурсов лекарственных растений, содержащих флавоноиды // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, №1 (9). С. 2253–2256.

11. Разживин Р.В., Решетняк В.Ю., Кузьменко А.Н., Нестерова О.В., Попков В.А. Применение хромато-масс-спектрометрии для изучения компонентного состава фармакопейных видов лекарственного растительного сырья // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 2009. Т. 50, №1. С. 67–70.
12. Ognianov I., Lesseva I. Method for the quantitative determination of azulene in *Matricaria chamomilla* oil // Доклады Болгарской АН. 1956. Т. 9, вып. 3. С. 33–39.
13. Stahl E. Thin layer chromatography for characterization of pharmacopeia drugs. 5. Chamomile flowers flores Chamomillae // Arzneimittel-Forschung. 1969. Vol. 19. N11. Pp. 1892.
14. Александров Ю.И., Беляков В.И. Погрешность и неопределенность результата химического анализа // Журнал аналитической химии. 2002. Т. 57. №2. С. 118–129.
15. Смагунова А.Н. Способы оценки правильности результатов анализа // Журнал аналитической химии. 1997. Т. 52. С. 1022–1029.
16. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М., 1994. 268 с.
17. Харитонов Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). Кн. 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. М., 2003. 559 с.

Поступило в редакцию 23 января 2015 г.

После переработки 29 июня 2016 г.

Shishmareva T.M. APPLICATION OF PICRIC ACID FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHAMAZULENE CONTENT IN *MATRICARIA CHAMOMILLA* FLOWERS

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, ul. Sakh'yanovoy, 6, Ulan-Ude, 670047 (Russia), e-mail: shishmarevatm@rambler.ru

In this paper the standardization of raw of *Matricaria chamomilla* with application of picric acid is proposed. The technique of quantitative determination of chamazulene content in *Matricaria chamomilla* flowers with spectrophotometric method is developed. In the study of the absorption spectrum of an alcoholic solution of essential oil of *Matricaria chamomilla* after treatment by picric acid revealed that its maximum occurs at 657 nm and coincides with that of picrate chamazulene. The point at 657 nm is chosen as analytical wavelengths.

Experiments are conducted of "added-found" method to assess the accuracy of the developed technique and found that the relative error no more than 3,5%. The relative error of determination in series of successive measurements is no more than 2,5%, and in series of parallel measurements – 5,5%. Metrological analysis showed that the method is accurate and reproducible. The quantitative determination of chamazulene content defined in 6 batches of industrial raw materials using the developed technique. The total of chamazulene content in *Matricaria chamomilla* flowers is between 8,49–20,05 mg%. The chamazulene content in *Matricaria chamomilla* flowers in terms of absolutely dry raw material should be at least 8 mg%.

Keywords: *Matricaria chamomilla* (L.) Rauschert, Asteraceae, picric acid, chamazulene, quantitative determination, spectrophotometry.

References

1. Gorin A.G., Iakovlev A.I. *Khimiia prirodnikh soedinenii*, 1971, no. 4, pp. 515–516. (in Russ.).
2. Gorin A.G., Iakovlev A.I. *Khimiia prirodnikh soedinenii*, 1974, no. 2, pp. 137–141. (in Russ.).
3. Konovalova O.A., Rybalko K.S. *Rastitel'nye resursy*, 1982, no. 1, pp. 116–127. (in Russ.).
4. Chetvernina S.A. *Rastitel'nye resursy*, 1986, no. 3, pp. 373–377. (in Russ.).
5. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. XI izdanie*. [State Pharmacopoeia of the USSR. XI edition], vol. 1. Moscow, 1987, 335 p. (in Russ.).
6. Gasic O., Lukic V., Nikolic A. *Fitoterapia*, 1983, vol. 54, pp. 51–55.
7. Holzl J., Demuth G. *Planta Medica*, 1975, vol. 27, p. 37.
8. Bubenchikova V.N., Kondratova Iu.A. *Kubanskii nauchno-meditsinskii vestnik*, 2006, no. 10, pp. 19–21. (in Russ.).
9. Kurkina A.V. *Biulleten' sibirskoi meditsiny*, 2011, no. 5, pp. 150–153. (in Russ.).
10. Kurkina A.V. *Izvestiia Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2012, vol. 14, no. 1 (9), pp. 2253–2256. (in Russ.).
11. Razzhivin R.V., Reshetniak V.Iu., Kuzmenko A.N., Nesterova O.V., Popkov V.A. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 2. Khimiia*, 2009, vol. 50, no. 1, pp. 67–70. (in Russ.).
12. Ognianov I., Lesseva I. *Doklady Bolgarskoi AN*, 1956, vol. 9, no. 3, pp. 33–39.
13. Stahl E. *Arzneimittel-Forschung*, 1969, vol. 19, no. 11, pp. 1892.
14. Aleksandrov Iu.I., Beliakov V.I. *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 2002, vol. 57, no. 2, pp. 118–129. (in Russ.).
15. Smagunova A.N. *Zhurnal analiticheskoi khimii*, 1997, vol. 52, pp. 1022–1029. (in Russ.).
16. Derffel' K. *Statistika v analiticheskoi khimii*. [Statistics in analytical chemistry]. Moscow, 1994, 268 p. (in Russ.).
17. Kharitonov Iu.Ia. *Analiticheskaiia khimiia (analitika). Kn. 2. Kolichestvennyi analiz. Fiziko-khimicheskie (instrumental'nye) metody analiza*. [Analytical chemistry (analyst). Bk. 2. Quantitative analysis. Physical and chemical (instrumental) methods of analysis]. Moscow, 2003, 559 p. (in Russ.).

Received January 23, 2015

Revised June 29, 2016

