

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ГОМЕОПАТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ НАСТОЙКЕ ИЗ СВЕЖИХ ПОБЕГОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA* LEDEB.)

Т.Л. Киселева, А.В. Чаузова, А.А. Жогова

НИЦ НО «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов» (г. Москва),
НИИ Питания РАМН (г. Москва)

The method of total flavonoid content quantitative determination development in the fresh shoots of siberrian fir homoeopathic mother tincture

T.L. Kiseleva, A.V. Chauzova, A.A. Zhogova

The Research centre of the Professional Association of Naturotherapists (Moscow, Russia),
The Institute of nutrition (Moscow, Russia)

РЕЗЮМЕ

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на стандартный образец рутина в гомеопатической матричной настойке пихты сибирской. Относительная ошибка единичного определения с 95 % доверительной вероятностью составляет $\pm 3,2$ %. опыты с добавками стандартного образца рутина доказали отсутствие систематической ошибки методики.

Ключевые слова: пихта сибирская, *Abies sibirica* Ledeb., гомеопатическая матричная настойка, сумма флавоноидов, спектрофотометрия.

RESUME

There was developed the method of the quantitative determination of the total flavonoids in the homoeopathic mother tincture of Siberrian fir calculated on the rutin. The relative error of single determination with 95% confidence probability is $\pm 3,2\%$. Experiments with additions of a standard sample of rutin proved the absence of the systematic error.

Keywords: Siberrian fir, *Abies sibirica* Ledeb., homoeopathic mother tincture, total flavonoid content, spectrophotometry.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с ФЗ №61 «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.10 г. гомеопатические препараты подлежат государственной регистрации при наличии нормативной документации (НД) на сырье, гомеопатическую матричную настойку (ГМН) и препарат [6, 7] и внесению в Государственный реестр лекарственных средств (ЛС) [7].

Гомеопатические монопрепараты из свежеобранного сырья пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) были разрешены к применению в гомеопатической практике на территории РФ в соответствии с Приказом МЗ МП № 335 от 29.11.95 г. [4], однако проведенный нами анализ отечественной НД показал, что в РФ отсутствуют фармакопейные статьи (ФС)

на свежие молодые побеги пихты сибирской, являющиеся сырьем в гомеопатии, и ГМН из них.

Проведенный нами анализ гомеопатических Фармакопей Германии [10], Франции [11] и Великобритании [9] позволили установить, что сырье пихты сибирской и ГМН из него не входит ни в одну из них. Поэтому актуальными являются исследования по разработке методов стандартизации свежеобранного сырья пихты сибирской и ГМН из него, с учетом необходимости гармонизации требований к лекарственным средствам и исходному ЛРС, используемому в гомеопатии и аллопатии [2].

В результате проведенного информационно-аналитического исследования нами было установлено, что в сырье пихты сибирской преоб-

ладающими группами биологически активных веществ (БАВ) являются флавоноиды и эфирные масла. В результате предпринятой попытки выделения эфирного масла из ГМН фармакопейным методом перегонки с водяным паром были получены следовые количества эфирного масла, недостаточные для достоверного определения его количественного содержания. Поэтому в качестве одного из критериев доброкачественности нами было предложено нормирование количественного содержания суммы флавоноидов в исследуемой ГМН.

Целью настоящего исследования являлась разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в ГМН пихты сибирской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Свежесобранные молодые побеги пихты сибирской для получения ГМН были заготовлены на территории г. Москвы (в Ботаническом саду МГУ) в июне 2009 года. ГМН готовили в НИЦ НО «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов» в соответствии с методом 3 общей ФС «Настойки матричные гомеопатические» [5] (сырье содержит эфирные масла и смолы, а потеря в массе при высушивании составляет менее 60 %).

Количественное содержание суммы флавоноидов определяли с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии. Измерения проводили на спектрофотометре модели U-2800 фирмы Hitachi (Япония). В качестве стандартного образца (СО) использовали

рутин фирмы «Fluka» (каталожный № 84082; содержание основного вещества – 90 %).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И РЕЗУЛЬТАТЫ

При разработке методики использовали реакцию комплексообразования со спиртовым раствором алюминия хлорида. В результате образования комплекса наблюдается bathochromный сдвиг первой полосы поглощения основных флавоноидов от 330–350 до 390–410 нм. Эта область достаточно удалена от спектров поглощения других фенольных соединений (фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества и др.), что позволяет исключить их влияние на количественное определение флавоноидов. Кроме того, применение дифференциального способа спектрофотометрирования позволяет проводить определения суммы флавоноидов непосредственно в ГМН, так как при этом исключается влияние сопутствующих окрашенных веществ растения (хлорофилла, каротиноидов, производных антрацена и др.) [3, 8].

При разработке методики были подобраны оптимальные условия фотометрической реакции комплексообразования суммы флавоноидов матричной настойки со спиртовым раствором $AlCl_3$. Исследовались следующие параметры: область максимального поглощения света комплексом, количество настойки, взятой на анализ, концентрация и количество спиртового раствора $AlCl_3$, необходимые для полного связывания суммы флавоноидов в комплексное соединение, зависимость светопоглощения фотометрируемых соединений от времени [8]. При регистрации оптической плотности продуктов реакции комплексообразования при различных длинах волн нами были получены УФ-спектры, представленные на рис. 1.

Параллельно регистрировали оптическую плотность комплекса СО рутин со спиртовым раствором $AlCl_3$. Область максимального светопоглощения рутина находится в пределах 410 ± 2 нм. На рис. 1 показано, что область максимального светопоглощения комплекса суммы флавоноидов в матричной настойке (409 ± 2 нм) и максимум поглощения комплекса СО рути-

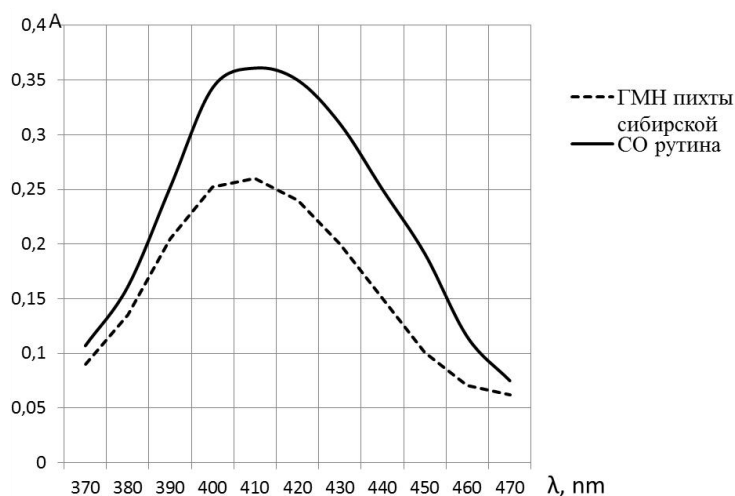


Рис. 1 Дифференциальные спектры поглощения продуктов реакции комплексообразования суммы флавоноидов ГМН пихты сибирской и раствора СО рутин с 1 % спиртовым раствором $AlCl_3$

на со спиртовым раствором $AlCl_3$ близки. Поэтому в методике количественного определения суммы флавоноидов в исследуемой ГМН оптическую плотность предложено регистрировать при длине волны 410 нм, а расчет процентного содержания суммы флавоноидов проводить в пересчете на СО рутина.

В дальнейших исследованиях было изучено влияние количества настойки, концентрации и количества раствора $AlCl_3$ на полноту протекания реакции комплексообразования. Результаты исследования приведены в табл. 1–3 (приведены средние значения 5 определений). Аликвоту выбирали с таким расчетом, чтобы оптическая плотность принимала значение от 0,3 до 0,5.

На основании полученных данных были выбраны оптимальные условия проведения фотометрической реакции. Было решено использовать 0,2 мл настойки и 1 мл 1% раствора $AlCl_3$.

Для изучения зависимости светопоглощения от времени фотометрической реакции регистрировали оптическую плотность раствора через каждые 5 мин. На основании полученных данных построен график (рис. 2).

Проведенное исследование позволило установить, что в течение 25–30 мин. идет процесс образования комплекса, при этом оптическая плотность растет. При дальнейшем наблюдении какого-либо значительного роста оптической плотности не происходит, что соответствует на графике почти горизонтальному участку. Поэтому в методике количественного определения суммы флавоноидов регистрацию оптической плотности целесообразно осуществлять через 30 мин. после добавления реактива.

Методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в ГМН пихты сибирской

0,2 мл отфильтрованной ГМН пихты сибирской помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 1% раствора алюминия хлорида, доводят объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны

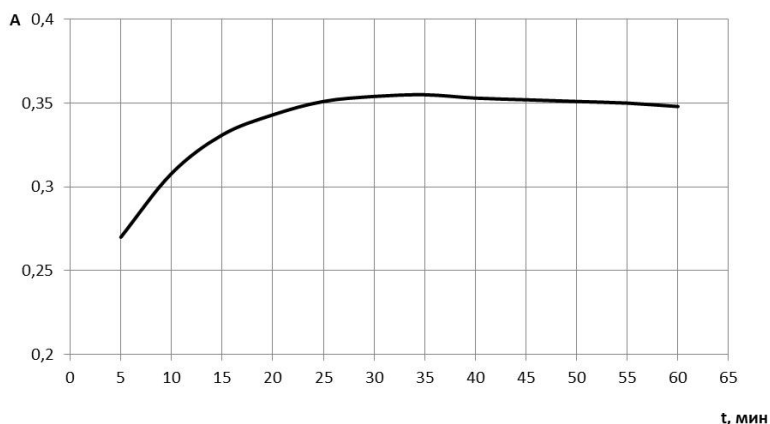


Рис. 2 График зависимости оптической плотности от времени фотометрической реакции комплексообразования суммы флавоноидов ГМН пихты сибирской с 1% спиртовым раствором $AlCl_3$

Таблица 1

Влияние количества ГМН пихты сибирской на полноту протекания реакции комплексообразования (среднее из 5 определений)

Количество настойки, мл	Оптическая плотность (D)
0,1	0,128
0,2	0,349
0,3	0,519

Таблица 2

Влияние концентрации спиртового раствора $AlCl_3$ на полноту протекания реакции комплексообразования (среднее из 5 определений)

Концентрация раствора $AlCl_3$, %	Оптическая плотность (D)
1	0,355
2	0,351
3	0,348

Таблица 3

Влияние количества спиртового раствора $AlCl_3$ на полноту протекания реакции комплексообразования (среднее из 5 определений)

Количество раствора $AlCl_3$, мл	Оптическая плотность (D)
1	0,368
2	0,349
3	0,358

410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий состав: в мерную колбу на 25 мл помещают 0,2 мл настойки, одну каплю кислоты уксусной, доводят объем раствора до метки 95 % спиртом и перемешивают. Параллельно измеряют оптическую плотность 0,05 % раствора СО рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору с одним уточнением: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора СО рутина. В качестве раствора сравнения используют следующий состав: в мерную колбу на 25 мл помещают 1 мл 0,05 % спиртового раствора рутина, одну каплю кислоты уксусной разведенной, доводят объем раствора до метки 95 % спиртом и перемешивают.

Примечание: *Приготовление раствора СО рутина.* Около 0,05 г (точная навеска) рутина («Fluka», каталожный №84082), предварительно высушенного при температуре 130–135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл 95 % спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане. Охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 95 % спиртом до метки и перемешивают. Срок хранения раствора – 1 месяц.

Содержание суммы флавоноидов (X), в процентах в пересчете на СО рутина рассчитывают по формуле:

$$X(\%) = \frac{D \times m_0 \times V_0 \times 25 \times 100\%}{D_0 \times 100 \times 25 \times V}, \text{ где:}$$

D - оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 - оптическая плотность раствора СО рутина;
 V - объем настойки, взятой на анализ;
 V_0 - объем раствора СО рутина, взятого на анализ, мл;
 m_0 - масса навески СО рутина, г.

Результаты опытов с добавками СО рутина для ГМН пихты сибирской

Определено флавоноидов (в сумме) в образце настойки (мг)	Добавлено рутина (мг)	Суммы флавоноидов (мг)		Ошибка определения	
		должно быть	определено	абс. (мг)	отн. (%)
0,3720	0,0925	0,4645	0,4658	+0,0013	+0,3
0,3720	0,1850	0,5570	0,5749	+0,0179	+3,2
0,3720	0,2780	0,6500	0,6702	+0,0202	+3,1
0,3720	0,3700	0,7420	0,7240	-0,0180	-2,4

Таблица 4

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов ГМН пихты сибирской

χ	n	f	$S\chi$	P (%)	t (P;f)	Δx	$\epsilon, \%$	$\epsilon_3, \%$
0,186	7	6	0,0024	95	2,447	0,0059	$\pm 3,2$	$\pm 1,9$

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Для проверки воспроизводимости разработанной методики были рассчитаны ее метрологические характеристики. Определение суммы флавоноидов проводили в одном лабораторном образце ГМН в 7 независимых повторностях. Метрологические характеристики методики представлены в табл. 4.

Как видно из данных табл. 4, относительная ошибка единичного определения с 95 % доверительной вероятностью составляет $\pm 3,2 \%$, что свидетельствует о воспроизводимости методики. Кроме того, относительная ошибка при проведении анализа в трех повторностях не превышает $\pm 1,9 \%$, поэтому в методике рекомендуется проводить анализ в трех повторностях.

Отсутствие систематической ошибки методики доказано при помощи опытов с добавками СО рутина. Результаты представлены в табл. 5.

Данные табл. 5 указывают на отсутствие систематической ошибки методики, так как относительная ошибка опытов с добавками при проведении анализа в трех повторностях находится в пределах ошибки единичного определения и составляет не более $\pm 3,2 \%$.

Таким образом, нами разработана методика количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в ГМН пихты сибирской, основанная на реакции комплексообразования суммы флавоноидов со спиртовым раствором $AlCl_3$. Содержание суммы флаво-

ноидов в ГМН из сырья пихты сибирской, заготовленного в г. Москве, составляет $0,19 \pm 0,01 \%$ (в пересчете на СО рутина). Полученные результаты показывают возможность их использования для стандартизации ГМН из свежесобранного сырья пихты сибирской.

Таблица 5

ЛИТЕРАТУРА

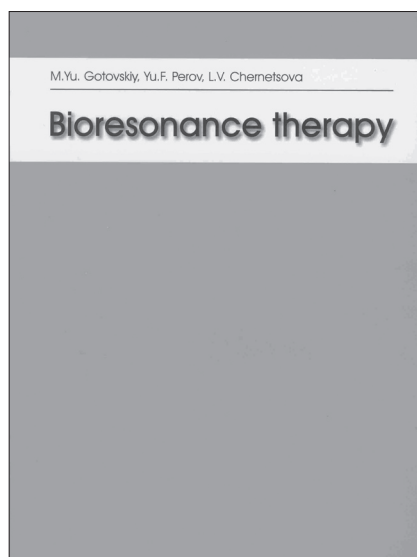
1. Государственная Фармакопея СССР: 11 изд., Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
2. Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М.: Изд-во профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
3. Минаева С.А., Шимоница Л.Л. Флавоновые гликозиды. Методы выделения, очистки, разделения и анализа: Методические разработки. – Ленинград, 1991. – С. 5–27.
4. Номенклатура гомеопатических лекарственных средств. Приложение №2 к Приказу МЗ и МП РФ от 29 ноября 1995 г. №355 «Об использовании метода гомеопатии в практическом здравоохранении» // Гомеопатический метод лечения и практическое здравоохранение. Сборник нормативных документов и информационных материалов. – М.: МЗ РФ, 1996. – 327 с.
5. ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные».
6. Сборник методических рекомендаций по стандартизации лекарственных средств/ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Росздравнадзора. – М.: Издательский дом «Пеликан», 2006. – С. 294–310.
7. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 27.07.2010) «Об обращении лекарственных средств».
8. Фомичева Е.А. Количественное определение флавоноидов в гомеопатической настойке чистотела методом спектрофотометрии // Фармация. – 2001. – Т. 50. – №5. – С. 13–15.
9. British Homoeopathic Pharmacopoea. – London: Stars, 1993. – Vol. 1. – 150 p.
10. Homöopathisches Arzneibuch. – 1. Ausgabe 1978. – Gesatausgabe. – Diese Gesatausgabe nach der Neufassung 1985 enthält die Teibande HAB 4. Nachtrag 1985. – Amtliche Ausgabe. – Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart Govi – Verlag GmbH. Frankfurt. – 928 s.
11. Pharmacopée Française. – 10 edition, 6 supplement: Monographues de souches pour preparations homoeopathiques. – Paris: Luegeb, 1989. – 686 p.

Адрес автора

Д.ф.н. Киселева Т.Л.

НИЦ НО «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов»

KiselevaTL@yandex.ru.ru



ISBN 978-5-87359-090-2

<http://www.imedis.at>

Gotovskiy M. Yu., Perov Yu. F., Chernetsova L. V.
BIORESONANCE THERAPY. 2nd ed., Moscow, Russian Federation: IMEDIS; 2010.

This book is an authorized and completely revised translation of the Russian edition published and copyrighted 2010 by Imedis publishing, Moscow, Russian Federation.

Two years passed after the first edition of the book, which aroused great interest among specialists. During this time, considerable experience in effective use of bioresonance therapy in clinical practice has been accumulated.

The second edition describes a wider number of issues relating to the practical application of exogenous bioresonance therapy, provides information on equipment for bioresonance therapy, the technology for its application in the treatment process, methods of preparation of bioresonance preparations. Besides substantially revised and supplemented with new information, is 2nd chapter on the clinical application of bioresonance therapy.

The new edition takes into account suggestions and criticisms that were made of the previous edition of the book.

The authors hope that the book will be useful for physicians of all specialties that use in their practice the method of bioresonance therapy.

The authors gratefully take all comments and suggestions relating to the new edition of the book.