

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В НАСТОЙКЕ ГОМЕОПАТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ ЗЮЗНИКА ЕВРОПЕЙСКОГО

В.И. Зверева

аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

О.А. Семкина

к.фарм.н., зав. научно-организационного отдела,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: semkinaolga@gmail.com

О.Л. Сайбель

к.фарм.н., зав. отделом стандартизации и сертификации,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы фенольных соединений в настойке гомеопатической матричной зюзника европейского травы свежей.

Ключевые слова: зюзник европейский, настойка гомеопатическая матричная, спектрофотометрический метод, розмариновая кислота, валидация.

На сегодняшний день одними из самых распространённых патологий человека, являются заболевания, связанные с дисфункцией щитовидной железы; с каждым годом число таких пациентов увеличивается. Причин этому может быть несколько, среди них неблагоприятная экологическая обстановка, недостаток йода, наследственность, стресс.

Для профилактики и лечения заболеваний щитовидной железы на фармацевтическом рынке России представлены лекарственные средства различной химической структуры и направленности действия, причем все эти препараты являются синтетическими [1].

В последние годы все больше исследователей изучают лекарственные растения на предмет их способности регулировать функции щитовидной железы. Как известно, лекарственные средства, полученные из лекарственного растительного сырья (ЛРС) легче переносятся пациентами, вызывают меньше побочных эффектов и, согласно маркетинговым исследованиям, более предпочтительны потребителями [2]. Доказанной эффективностью для нормализации функций щитовидной железы среди прочих обладают слоевища цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.), слоевища фукуса пу-

зырчатого (*Fucus vesiculosus* L.), трава зюзника европейского (*Lycopus europaeus* L.), трава дрока красильного (*Genista tinctoria* L.), листки ряски малой (*Lemna minor* L.) [3].

Мировая практика в области здравоохранения показывает возросший интерес к гомеопатическому методу лечения, что подтверждается постоянным ростом числа гомеопатических препаратов в аптеках и увеличением частоты назначения врачами гомеопатических лекарственных средств для профилактики и комплексного лечения заболевания. Среди преимуществ гомеопатических лекарственных препаратов перед синтетическими можно отметить такие, как отсутствие привыкания и аллергических реакции в связи с тем, что используются малые дозы лекарственных веществ, а также достаточно низкий риск возникновения побочных явлений [4].

Одним из наиболее перспективных источников для получения лекарственного препарата, нормализующего функции щитовидной железы, является зюзник европейский (*Lycopus europaeus* L.) семейства яснотковые (*Lamiaceae*). Изучение фармацевтического рынка лекарственных препаратов растительного происхождения Европы и США показало перспективность разработки жидкой

лекарственной формы, а именно настойки гомеопатической матричной (НГМ). В настоящее время в Европе, выпускается гомеопатический препарат на основе зюзника европейского под названием «Thyreogutt® mono» (Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Германия), который показан в виде капель или таблеток при умеренных формах гипертиреоза, а также при нарушениях менструального цикла и масталгии. Эффективность препаратов травы зюзника европейского была подтверждена как российскими, так и зарубежными исследователями [5].

В этой связи актуальным представляется создание отечественной НГМ зюзника европейского, которая будет использоваться для разработки на ее основе гомеопатических препаратов, нормализующих функции щитовидной железы. Неотъемлемым

этапом создания лекарственной субстанции является решение вопросов стандартизации.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения суммы фенольных соединений в НГМ зюзника европейского.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила НГМ зюзника европейского, полученная из свежей травы культивируемого зюзника европейского (урожай 2015 г.) методом мацерации с использованием спирта этилового 86% (м/м) при температуре не выше 20 °С согласно ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Поскольку основной группой биологически активных веществ (БАВ) зюзника европейского являются фенольные соединения, а также с учетом ранее разработанных методик стандартизации на траву и сухой экстракт, полученный из данного сырья, для количественного определения предложен метод спектрофотометрии [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики количественного определения БАВ было установлено, что в диапазоне длин волн от 300 до 400 нм спиртовое извлечение из НГМ зюзника европейского имеет максимум поглощения при длине волны 327 ± 2 нм. Аналогичный максимум поглощения имеет раствор стандартного образца (СО) розмариновой кислоты (рис. 1). Следовательно, количественное определение суммы фенольных соединений в НГМ зюзника европейского можно проводить в пересчете на розмариновую кислоту.

Валидацию разработанной методики проводили по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность: сходимость и воспроизводимость методики [7, 8].

Специфичность методики характеризуется совпадением максимумов поглощения спиртового извлечения из зюзника европейского травы свежей и раствора СО розмариновой кислоты при длине волны 327 ± 2 нм.

Линейность методики определяли на семи уровнях концентраций СО розмариновой кислоты в диапазоне 2,3–10,5 мкг/мл (рис. 2). По результатам проведенных исследова-

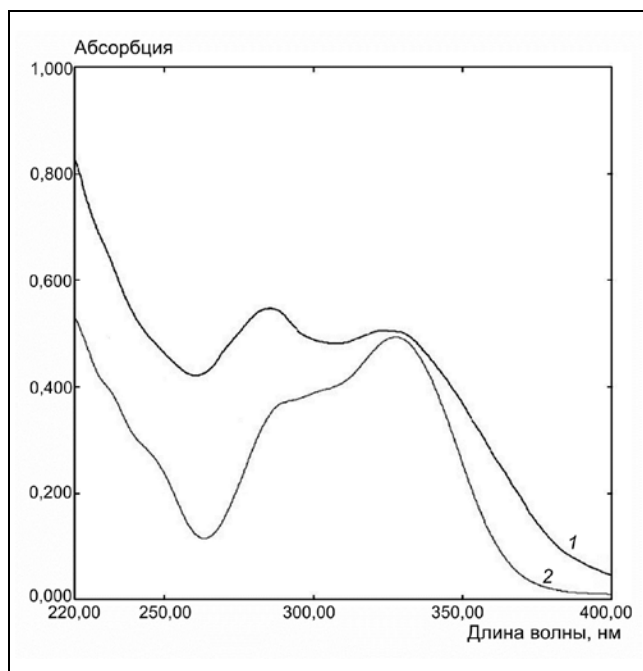


Рис. 1. Спектры поглощения спиртового извлечения из НГМ зюзника европейского (1) и раствора СО розмариновой кислоты (2)



Рис. 2. Калибровочный график СО розмариновой кислоты

ний установлено, что зависимость поглощения света от концентрации раствора носит линейный характер, коэффициент корреляции (R^2) составил 0,999, что близко к единице и соответствует критерию приемлемости (R^2 не ниже 0,995).

Правильность методики оценивали на модельных смесях трех концентраций с содержанием стандартного образца розмариновой кислоты 25, 50 и 75% от ее исходной концентрации в НГМ зюзника европейского (табл. 1). Контроль правильности проводили на основе не менее девяти результатов определений на минимум трех уровнях концентраций в пределе аналитической области (1.1, 1.2, 1.3 – к исходной концентрации розмариновой кислоты в НГМ зюзника европейского травы добавлено 25% СО розмариновой кислоты; 2.1, 2.2, 2.3 – к исходной концентрации розмариновой кислоты в НГМ зюзника европейского травы добавлено 50% СО розмариновой кислоты; 3.1, 3.2, 3.3 – к исходной

концентрации розмариновой кислоты в НГМ зюзника европейского травы добавлено 75% СО розмариновой кислоты в трех повторностях). Критерием приемлемости является процент восстановления (открываемости). В разработанной методике процент восстановления (открываемости) находится в пределах от 95,99 до 102,55%, что соответствует требованиям критерию приемлемости (от 95 до 105 %).

Сходимость разработанной методики подтверждали проведением шести параллельных определений, на основании результатов которых вычислили величину стандартного отклонения (0,0029), относительного стандартного отклонения среднего результата (коэффициента вариации) (0,81%, критерий приемлемости не более 5%) и относительной вероятной погрешности отдельного измерения ($\pm 0,85\%$). Полученные значения свидетельствуют о прецизионности методики по сходимости (табл. 2).

Таблица 1. Результаты определения контроля правильности методики

Вариант опыта	Найдено, мкг	Добавлено СО, мкг	Ожидаемое значение, мкг	Полученное значение, мкг	Абсолютная ошибка, мкг	Выход, %
1.1	148,00	37,00	185,00	185,39	0,39	100,21
1.2	190,00	47,50	237,50	227,98	-9,52	95,99
1.3	180,00	45,00	225,00	228,42	3,42	101,52
2.1	149,00	74,50	223,50	226,14	2,64	101,18
2.2	189,00	94,50	283,50	281,91	-1,59	99,44
2.3	180,00	90,00	270,00	271,89	1,89	100,70
3.1	148,00	111,00	259,00	258,69	-0,31	99,88
3.2	189,00	141,75	330,75	339,18	8,43	102,55
3.3	179,00	134,25	313,25	304,51	-8,74	97,21
Среднее значение выхода, %				99,85		

Таблица 2. Результаты определения сходимости методики

№ п/п	Длина волны, нм	Абсорбция, отн.ед.	Содержание розмариновой кислоты в анализе, %
1	327,20	0,513	0,3469
2	328,20	0,526	0,3556
3	327,60	0,521	0,3523
4	328,10	0,518	0,3502
5	328,20	0,519	0,3509
6	327,00	0,520	0,3516

Воспроизводимость методики количественного определения определяли три аналитика на девяти повторностях образца зюзника европейского

го травы свежей настойки гомеопатической матричной, приготовленных независимо друг от друга в течение трех дней (табл. 3).

Таблица 3. Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости методики

Аналитик	Повторности	Образец 1	Образец 2	Образец 3
1	1	0,3469	0,3556	0,3516
	2	0,3421	0,3523	0,3502
	3	0,3448	0,3529	0,3509
Среднее значение содержания розмариновой кислоты в анализе, %		0,350		
Стандартное отклонение, %		0,00429		
Коэффициент вариации, %		1,23		

Полученные значения коэффициента вариации не превышают 2%, что позволяет считать внутрилабораторную воспроизводимость результатов приемлемой.

ВЫВОДЫ

Разработанная методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в НГМ зюзника европейского является валидной по показателям: специфичность, линейность, правильность (точность), внутрилабораторная прецизионность (сходимость и воспроизводимость методики). Данная методика может быть использована при составлении проекта ФС на «Зюзника европейского настойка гомеопатическая матричная».

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств / <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
2. Зверева В.И., Семкина О.А., Грибкова Е.И., Тертичная Ю.М., Назарова Е.А., Фадеев Н.Б. Обоснование целесообразности использования экстракта травы зюзника

- европейского с целью разработки пероральных лекарственных форм // Сб. «Молодые ученые и фармация XXI века». М.: ФГБНУ ВИЛАР. 2014. С. 256–261.
3. Кравченко В.Н., Георгиянц В.А., Владимиров И.Н. и др. Изучение влияния лекарственных растений на функцию щитовидной железы // Вестник ВГМУ. 2014. Т. 13. № 4. С. 149–154.
4. Киселева Е.В., Недобега Е.И. Эволюция производства гомеопатических лекарственных препаратов // Традиционная медицина. 2008. № 3(14). С. 12–15.
5. Алефиров, А.Н., Сивак К.В. Антитиреоидный эффект экстрактов *Lycopus europaeus L.* (Lamiaceae) у крыс с экспериментальным тиреотоксикозом // Растительные ресурсы. 2009. Т. 45. Вып. 2. С. 117–122.
6. Зверева В.И., Лаптинская П.К., Сайбель О.Л., Сидельников Н.И. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенольных соединений в зюзника европейского экстракте сухом // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2015. № 4(9). С. 9–14.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. Т. 1–3. М., 2015. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>. [Дата обращения: 10.01.2017 г.].
8. Береговых В.В., Аладышева Ж.И., Самылина И.А. Валидация в производстве лекарственных средств // Фармация. 2008. № 3. С. 10–12.

Поступила 22 февраля 2017 г.

THE DEVELOPMENT AND THE VALIDATION OF THE METHOD TO QUANTIFY THE AMOUNT OF THE PHENOLIC COMPOUNDS IN *LYCOPUS EUROPAEUS L.* TINCTURE HOMEOPATHIC MATRIX

© Authors, 2017

V.I. Zvereva

Post-graduate Student, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

O.A. Semkina

Ph.D. (Pharm.), Academic Secretary, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: semkinaolga@gmail.com

O.L. Saibel

Ph.D. (Pharm.), Head of Department of Standardization and Certification,
All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

One of the most common pathologies of the human today are diseases associated with the dysfunction of the thyroid gland, and every year the number of such patients increases. The reasons may be unfavorable environmental conditions, lack of iodine, heredity, stress. In recent years, more and more researchers study medicinal plants for their ability to regulate a thyroid function. In addition, in recent years the global practice of health shows the increased interest in the homeopathic method of treatment. Today proven efficacy for the normalization of thyroid function among others has the *Lycopus europaeus* L. herb fresh tincture homeopathic matrix. In this work the development and the validation of the methods to quantify the amount of phenolic compounds in the *Lycopus europaeus* L. herb fresh tincture homeopathic matrix were studied. The obtained experimental data allow evaluating developed the method to quantify the amount of phenolic compounds in the terms of rosmarinic acid in the *Lycopus europaeus* L. herb fresh tincture homeopathic matrix positive in the parameters: specificity, linearity, correctness (accuracy), intra-laboratory precision (repeatability and reproducibility of the technique). This method can be used in the preparation of the draft normative document on «*Lycopus europaeus* L. herb fresh tincture homeopathic matrix».

Key words: *Lycopus europaeus* L., herb fresh tincture homeopathic matrix, spectrophotometric method, rosmarinic acid, validation.

References

1. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv / <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
2. Zvereva V.I., Semkina O.A., Gribkova E.I., Tertichnaja Ju.M., Nazarova E.A., Fadeev N.B. Obosnovanie celesoobraznosti ispol'zovaniya jekstrakta travy zjuznika evropejskogo s cel'ju razrabotki peroral'nyh lekarstvennyh form // Sb. «Molodye uchenye i farmacija XXI veka». M.: FGBNU VILAR. 2014. S. 256–261.
3. Kravchenko V.N., Georgijanc V.A., Vladimirova I.N. i dr. Izuchenie vlijaniya lekarstvennyh rastenij na funkciju shhitovidnoj zhelezy // Vestnik VGMU. 2014. T. 13. № 4. S. 149–154.
4. Kiseleva E.V., Nedobega E.I. Jevoljucija proizvodstva gomeopateskih lekarstvennyh preparatov // Tradicionnaja medicina. 2008. № 3(14). S. 12–15.
5. Alefirov, A.N., Sivak K.V. Antitireoidnyj jeffekt jekstraktov *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae) u krysa s jeksperimental'nym tireotoksikozom // Rastitel'nye resursy. 2009. T. 45. Vyp. 2. S. 117–122.
6. Zvereva V.I., Laptinskaja P.K., Sajbel' O.L., Sidel'nikov N.I. Razrabotka i validacija metodiki kolichestvennogo opredelenija summy fenol'nyh soedinenij v zjuznika evropejskogo jekstrakte suhom // Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennyh sredstv. 2015. № 4(9). S. 9–14.
7. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izdaniya. T. 1–3. M., 2015. [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.femb.ru/feml>. [Data obrashhenija: 10.01.2017 g.].
8. Beregovyh V.V., Aladysheva Zh.I., Samylina I.A. Validation in drug manufacture // Pharmacy. 2008. № 3. S. 10–12.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavenscens* Rerel et Schmalh). По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Анмарин (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифунгальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru