

УДК 615.322:582.734.4:581.45]07[

АНАЛИЗ ГОМЕОПАТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БАРБАРИСА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Н.С. Терешина*, А.А. Абрамов, А.А. Маркарян*

(кафедра радиохимии; e-mail: Aaa@radio.chem.msu.ru)

Разработаны методики определения алкалоидов *Berberis vulgaris* в матричной гомеопатической настойке и многокомпонентных гомеопатических препаратах. Методом ВЭЖХ с помощью диодно-матричного детектора изучен алкалоидный состав настойки. Обнаружено 13 соединений, установлена чистота пиков в трехмерных координатах (время – интенсивность поглощения – длина волны). Проведена количественная оценка суммы алкалоидов в настойке (от 0,20 до 0,60%), из которых на долю берберина приходится 38–42%. Разработаны методики хроматографических «отпечатков пальцев» для определения подлинности гомеопатических препаратов барбариса.

В научной медицине препараты барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris* L., семейство *Berberidaceae*) применяют при хронических заболеваниях печени и желчного пузыря, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, воспалении верхних дыхательных путей, туберкулезе и маточных кровотечениях в послеродовом периоде. В гомеопатической практике препараты барбариса используют при почечно-каменной болезни и других заболеваниях мочеполовой системы, заболеваниях печени, надпочечников, кожи, подагрических, ревматических и нервных заболеваниях, а также при заболеваниях кожи [1, 2]. В гомеопатических разведениях настойка входит в более чем 80 гомеопатических препаратов. Барбарис относится к числу лучших лекарственных растений во всех странах мира, где он произрастает.

В гомеопатии для приготовления матричных настоек применяется только один вид барбариса – обыкновенный. Используют высушенную кору корней, подземных и наземных частей растения, свежие зрелые плоды.

По литературным данным, в высушенных плодах барбариса содержится до 5% сахаров и 6–7% яблочной кислоты, а также лимонная и виннокаменная кислоты. Листья, собранные в июне, содержат в пересчете на абсолютно сухое сырье алкалоиды, дубильные вещества, глюкозид арбутин (до 22%), галловую кислоту и свободный гидрохинон (2–4%), а также эфирное масло. Корневища и корни содержат до 25–27% дубильных веществ, алкалоиды, глюко-

зид бергенин (4,5%), фенолы, сахара (глюкозу и сахарозу), декстрин и другие вещества [3–7]. Алкалоиды локализуются в основном в коре [3, 7, 8]. Согласно литературным данным, активными компонентами настойки являются в основном алкалоиды, относящиеся к трем химическим группам: протоберберина (берберин, берберубин, ятроррицин, пальматин, колумбамин и др.); бисбензилизохинолина (оксиакантин, бербамин, бербамунин и др.); апорфина (магнофлорин, вульрацин, бераульцин).

В России в качестве лекарственного растительного сырья используют высушенную кору наземных и подземных частей растения, содержащую не менее 2% алкалоидов в пересчете на берберин ($C_{20}H_{19}NO_5$). Матричную настойку готовят методом мацерации из измельченного сырья на 62%-м (по массе) этиловом спирте.

Цель исследования состояла в разработке методики определения алкалоидов в матричной гомеопатической настойке и многокомпонентных гомеопатических препаратах, содержащих разведения этой настойки.

Разработке нормативной документации на матричную настойку предшествует изучение ее состава. С этой целью в настоящее время наиболее часто используют хроматографические методы. В последние годы опубликован ряд работ, посвященных использованию метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для исследования алкалоидов в сырье и в том числе в барбарисе [4, 7, 9, 10].

Исследования по изучению алкалоидного состава настойки проводили на хроматографе “Gilson” с

*Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова.

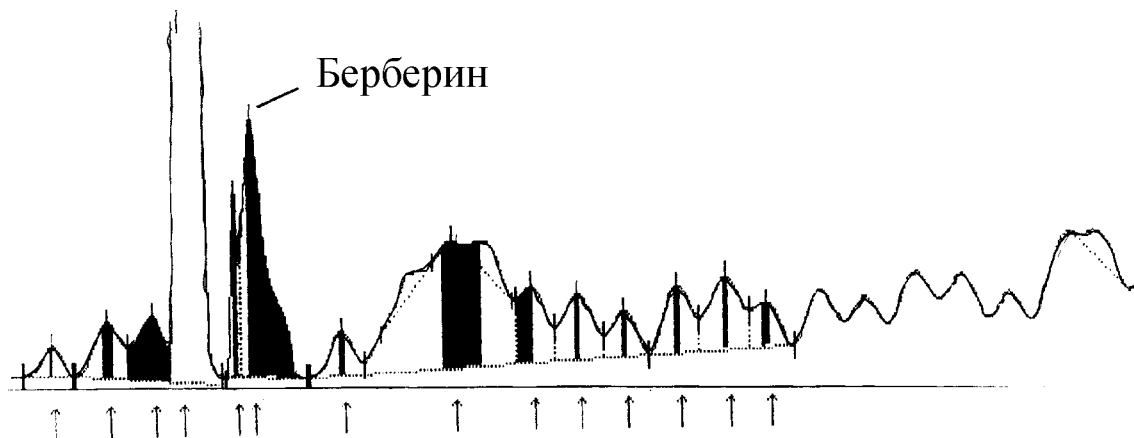


Рис. 1. ВЭЖХ гомеопатической матричной настойки барбариса (колонка “Luna C-18” (4,6×150 мм; подвижная фаза – 0,02 М раствор калия дигидрофосфата с рН 2,0 (А); ацетонитрил–вода, 80:20 (В); ацетонитрил–вода, 85:15 (А–В); 800 мкл/мин; детектор – диодно-матричный; интервал длин волн 200–400 нм)

последующей компьютерной обработкой результатов исследований (программа “Мультихром” для “Windows”). В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка “Luna C-18” (4,6×150 мм) с градиентной подачей подвижной фазы. В качестве подвижных фаз были использованы: 0,02 М раствор калия дигидрофосфата с рН 2,0 (А); ацетонитрил–вода, 80:20 (В); ацетонитрил–вода, 85:15 (А–В). Скорость подачи элюента 800 мкл/мин, продолжительность анализа 15,1 мин. Для детектирования использовали УФ-детектор (длина волны 264 нм) и диодно-матричный детектор (ДНД) [11].

Условия диодно-матричного детектирования были следующими:

Для определения чистоты пика: шкала поглощения 0,1–1,0, интервал длин волн 200–400 нм, время анализа 10 мин, фиксируемый минимум площади пика от 0,0001 интенсивности поглощения в мин.

Для выбора длины волны: интервал 1 с, шкала поглощения 0,001–0,0011, интервал длин волн 200–400 нм, время анализа 10 мин.

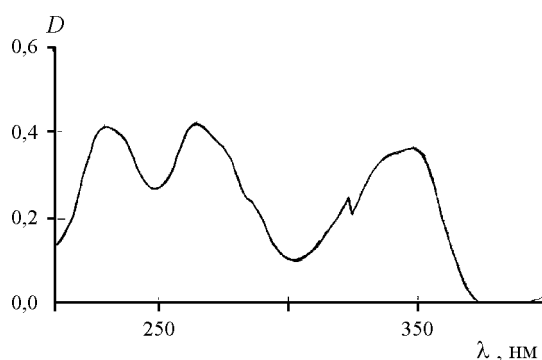


Рис. 2. УФ-спектр поглощения раствора берберина в метаноле

С помощью ДНД исследован состав гомеопатической настойки барбариса, чистота выделенных пиков в трехмерных координатах (время–интенсивность поглощения–длина волны). Полученный абсорбционный график и хроматограмма ВЭЖХ гомеопатической матричной настойки барбариса показали наличие 13 веществ. На рис. 1 показан пример анализа берберина. Чистый пик закрасен в черный цвет. Спектр, полученный для вершины пика, сравнивается со спектром стандарта (рис. 2).

При исследовании чистоты пиков и их спектральных характеристик обнаружено, что 6 пиков имеют значительную степень поглощения. По спектральным характеристикам и временам удерживания они определены как колумбамин, пальматин, ятроррицин, берберин, бербамин и оксиакантин (таблица [9, 10, 12–14]).

Методом ВЭЖХ проведена количественная оценка суммы алкалоидов в настойке в пересчете на берберин. Содержание алкалоидов в настойке в зависимости от их содержания в сырье колеблется от 0,20 до 0,60%, из которых на долю берберина приходится 38–42%. Чувствительность метода составляет 0,1 мкг, а линейная зависимость соблюдается в интервале 0,1–0,8 мкг в расчете на берберин.

Для гомеопатических препаратов общепринятым методом определения подлинности является так называемый метод “отпечатков пальцев”, при котором на хроматограмме оцениваются не отдельные классы соединений, а совокупность биологически активных веществ (БАВ). Тонко-слоистую хроматографию гомеопатической настойки барбариса проводили на пластинках, покрытых силикагелем (*Сорбфил*) в подвижных фазах: *n*-бутиловый спирт–кислота уксусная

Результаты исследования качественного состава гомеопатической матричной настойки барбариса с помощью диодно-матричного детектора

Вещество	Время удерживания
Колумбамин	0 мин 48 с
Пальматин	1 мин 12 с
Ятроррицин	2 мин 00 с
Берберин	2 мин 12 с
Бербамин	3 мин 54 с
Оксиакантин	4 мин 36 с

ледяная—вода (БУВ) (40:10:10); хлороформ—метиловый спирт (19:1). Зоны на хроматограмме были обнаружены при дневном свете, в УФ-свете при 365 нм и модифицированным реактивом Драгендорфа. В качестве веществ сравнения использовали сульфат хинина и бисульфат берберина. Наибольшее количество зон (8) получено в первой подвижной фазе, из которых три зоны относятся к алкалоидам. Метод “отпечатков пальцев” применим также для определения подлинности комплексных гомеопатических препаратов, содержащих настойку барбариса в гомеопатических разведениях. Ввиду малого содержания активных компонентов (менее 10^{-5}) в готовых лекарственных формах и большого количества БАВ, число которых может достигать нескольких десятков, метод ТСХ в ряде случаев является наиболее доступным и информативным для целей стандартизации.

В качестве объектов исследования были использованы препараты в разных лекарственных формах. Были разработаны методики для капель гомеопатических: “ЭДАС-129” состава *Berberis vulgaris* C3, *Lycopodium clavatum* C12, *Cholesterinum* C6, *Phosphorus* C3, *Mercurius dulcis* C6; “Холедиус” состава *Berberis vulgaris* D3, *Chelidonium majus* D3, *Carduus marianus* D3, *Podophyllum peltatum* D6. Из твердых лекарственных форм изучены гранулы гомеопатические “Иов-нефролит” состава *Berberis vulgaris* D3, *Lycopodium clavatum* D12, *Cantharis* D6; таблетки гомеопатические состава *Taraxacum officinale* C4, *Carduus marianus* C4, *Chelidonium majus* C4, *Berberis*

vulgaris D3. На примере основного доминирующего компонента *Berberis vulgaris* исследовано влияние степени разведения, соотношение разведений и компонентного состава БАВ препарата. В качестве растворов сравнения для метода “отпечатков пальцев” использованы матричные настойки, входящие в состав препаратов. В качестве подвижной фазы использована упомянутая ранее и наиболее универсальная смесь растворителей для разделения веществ БУВ (40:10:10). Исследованы особенности выделения БАВ из лекарственной формы для оценки ее подлинности. Если для капель достаточно концентрирования, то для таких лекарственных форм, как гранулы и таблетки, необходим подбор растворителя, максимально извлекающего БАВ и не растворяющего вспомогательные вещества (лактозу, сахарозу), которые мешают определению. Установлено, что при одних и тех же разведениях настойки барбариса в гранулах и таблетках хроматограммы исследуемых растворов имеют отличия. На хроматограмме исследуемого раствора гранул обнаружено 9 зон адсорбции, 7 из которых принадлежат матричной настойке *Berberis vulgaris*, а две зоны соответствуют аминокислотам настойки *Cantharis*. На хроматограмме таблеток обнаружено 4 зоны, из которых лишь 3 соответствуют зонам настойки барбариса. Наиболее сложным является определение подлинности препаратов, содержащих БАВ одних классов. Например, матричные настойки *Chelidonium majus* (чистотел большой) и *Berberis vulgaris*, входящие в состав капель “Холедиус”, содержат алкалоиды группы изохинолина. При использовании этих настоек в качестве растворов сравнения получена хроматографическая картина “отпечатков пальцев”, на которой три зоны со значениями $R_f < 0,25$, $\sim 0,25$ и $0,50$ аналогичны зонам настойки барбариса, а три зоны со значениями $R_f \sim 0,30$, $\sim 0,40$ и $\sim 0,90$ аналогичны зонам настойки чистотела. Полученные хроматограммы позволяют оценить подлинность препаратов по доминирующим компонентам.

Таким образом, разработаны методики определения алкалоидов барбариса обыкновенного в матричной гомеопатической настойке методом ВЭЖХ и методики определения подлинности многокомпонентных гомеопатических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Потопальский А.И., Петличная Л.И., Ивасивка С.В.* Барбарис и его препараты в биологии и медицине. Киев, 1986.
2. *Реквег Г.Г.* Гомеопатическая антигоммотоксикология. Систематизированное практическое лекарствоведение. Смоленск, 1997.

3. *Pitea M., Petcu P., Goina T., Preda N.* Dunnschichtchromatographische untersuchungen der alkoaloide von *Berberis vulgaris*. // *Planta medica*. 1972. **21**. N 2. S. 177.
4. *Lu C.H., Chen J.M., Xiao H.G.* Determination of alkaloids in the roots of *Berberis* genus plants by HPLC with varied wavelength. // *Yaohue Xuebao*. 1995. **30**. N 4. P. 280.
5. *Юсупов М.М., Каримов А., Лутфуллин К.Л.* Исследование алкалоидов *Berberis vulgaris*. XII. // *Химия природных соединений*. 1990. № 1. С. 128.
6. *Найдович Л.П., Трутнева Е.А., Толкачев О.Н., Васильева В.Д.* Химический состав отечественных видов семейства *Berberidaceae*. Взаимосвязь химической структуры и фармакологической активности // *Фармация*. 1976. **XXV**. № 4. С. 33.
7. *Ma Z., Yang G., Li Ch., Han Y., Li K.* On resources of the pharmaceutical plants of Gansu *Berberis*. II. Determination of alkaloids in the different parts of *Sankezhen* // *Zhongcaoyao*. 1994. **25**. N 3. P. 149.
8. *Gao L., Ma Z., Gong J.* Berberine contents from different parts of five barberry (*Berberis L.*) // *Zhonggeaoyao*. 1997. **28**. N 2. P. 83.
9. *Cimpar G., Gocan S.* Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches // *J. Lig. Chromatogr. and Relat. Technol.* 2002. **25**. N 13. P. 2225.
10. *Tsai P.-L., Tsai T.-H.* HPLC determination of berberine in medicinal herbs and a related traditional Chinese medicine // *Anal. Lett.* 2002. **35**. N 15. P. 2459.
11. *Хубер Л.* Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. М., 1993.
12. *Glasby J.S.* Encyclopedia of the alkaloids. Vol. 1, 2. N.Y.;L., 1975. .
13. *Guha K.P.* Bisbensylisoquinoline alkaloids // *J. Natural Products*. 1979. **42**. N 1.
14. *Shamma M.* The Isoquinoline Alkaloids. Chemistry and Pharmacology. N.Y.;L., 1972.

Поступила в редакцию 02.06.05

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE BERBERIS HOMOEOPATHIC PREPARATIONS

N.S. Teryoshina, A.A. Abramov, A.A. Markarian

(Division of radiochemistry)

Procedures of determination of alkaloids of *Berberis vulgaris* in the matrix homoeopathic tincture and in the multi component homoeopathic preparations have been developed. Composition of tincture containing alkaloids has been studied by HPLC with help of diode array multi-wavelength detector. 13 compounds have been revealed and the purity of their peaks in tridimensional coordinates (time – intensity of absorption – wavelength) has been determined. Quantitative estimation of total alkaloids in the tincture (from 0.20 to 0.60 %) has been fulfilled. The content of berberine from this amount is about 38–42 %. Methods of chromatographic “finger prints” for determination of identity of homoeopathic preparation of *Berberis* are disclosed.