

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВ В КОРНЕВИЦАХ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

Э.А. Балагозян, В.А. Куркин\*, докт. фарм. наук, профессор,  
О.Е. Правдивцева, докт. фарм. наук  
Самарский государственный медицинский университет;  
443099, Самара, ул. Чапаевская, 89

\*E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Разработаны методика обнаружения эргостерина в корневищах крапивы двудомной и спектрофотометрическая методика количественного определения в сырье суммы стериновых соединений.

**Ключевые слова:** крапива двудомная, *Urtica dioica* L., корневища с корнями, стериновые соединения, эргостерин, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия.

Одна из актуальных проблем современной медицины – эффективная терапия аденомы предстательной железы [7]. До сих пор основным способом лечения аденомы предстательной железы является оперативное вмешательство. Однако все большее значение приобретают консервативные методы лечения этого заболевания, среди которых существенное место занимает фитотерапия [3, 4].

Крапива двудомная (*Urtica dioica* L., сем. крапивные *Urticaceae*) — одно из самых известных и популярных лекарственных растений, входящих в мировые фармакопеи, а также в фармакопею нашей страны [2, 5, 6, 10, 11]. В России лекарственным сырьем крапивы двудомной являются листья как источник витамина  $K_1$  (филлохинон). За рубежом кроме листьев применяются корневища с корнями крапивы двудомной в качестве источника препаратов, обладающих противоопухолевой активностью («Простафортон», «Базотон») [4, 5].

Химический состав сырья крапивы двудомной достаточно богат и содержит стеринны ( $\beta$ -ситостерин, эргостерин), лектины, полисахариды, аминокислоты и другие вещества [6, 9]. Но до сих пор остается не ясно, какая именно группа биологически активных соединений (БАС) корневищ с корнями крапивы обуславливает специфическое антинеопластическое действие, характерное для препаратов, созданных на основе данного сырья. Большинство авторов считают, что этим действием обладают вещества стероидной природы [3, 5, 7].

Цель настоящих исследований — разработка качественного и количественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной как перспективного источника противоопухолевых лекарственных средств.

#### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовались корневища с корнями крапивы двудомной, заготовленные в 2010–2014 гг. в Самарской области. Для изучения состава БАС корневищ с корнями крапивы двудомной был получен жидкий экстракт методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 95%. Выбор экстрагента был обусловлен тем, что вещества стероидной природы являются липофильными соединениями. Предварительное исследование методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) показало наличие веществ стероидной природы в извлечениях из сырья, полученных на основе спирта этилового высокой концентрации (рис. 1). В результате последующего упаривания жидкого экстракта образовался густой экстракт корневищ с корнями крапивы, который применялся для дальнейшего анализа.

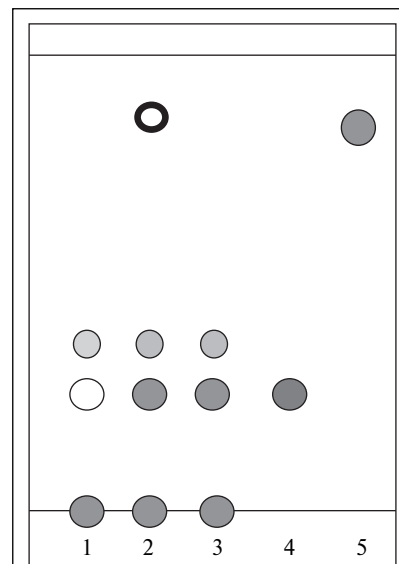
С целью выделения основных БАС из полученного экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной осуществляли разделение веществ методом адсорбционной колоночной хроматографии. Густой экстракт наносили на силикагель марки «для хроматографии» (силикагель КСКГ Фр. 0,04–0,10 мм). В качестве элюента использовали хлороформ и смесь хлороформа и этилового спирта в различных сочетаниях (с последовательным увеличени-

ем объема последнего). При первичном разделении веществ было получено свыше 50 фракций. Процесс разделения и состав фракций контролировали с помощью метода ТСХ в системе хлороформ — этиловый спирт (9:1). Пластинки детектировали в видимом и УФ-свете с длиной волны 254 и 366 нм. В результате ТСХ-анализа были отобраны фракции, в которых детектировался компонент стероидной природы. Из данных фракций путем перекристаллизации и дополнительной гель-хроматографии было выделено кристаллическое вещество белого цвета, не растворимое в воде и растворимое в спирте этиловом 96%. На основании данных УФ-,  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии ( $m/z$  398) оно было идентифицировано как эргостерин. Вещество на хроматограммах детектировалось в виде пятна с  $R_f$  около 0,6. Пятно окрашивалось в характерный для стероидов синий цвет при обработке 10% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) с последующим нагреванием при температуре  $100^\circ\text{C}$ , не флуоресцировало в УФ-свете (см. рис. 1).

При УФ-спектроскопии в среде концентрированной серной кислоты эргостерин имел выраженный максимум поглощения при длине волны  $=328\pm 2$  нм (рис. 2). Спектроскопия в среде этилового спирта (96%) выявила его оптическую прозрачность, что тоже характерно для веществ стероидной природы.

С нашей точки зрения, именно эргостерин вносит основной вклад в кривую поглощения окрашенного комплекса густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной, в УФ-спектре которого также обнаруживается максимум поглощения при длине волны  $328\pm 2$  нм (рис. 3).

В основу методики количественного определения суммы стероидных соединений была взята реакция взаимодействия



**Рис. 1.** Схема тонкослойной хроматограммы стероидов и водно-спиртовых извлечений из корневищ с корнями крапивы двудомной. 1 — извлечение 40% этиловым спиртом; 2 — извлечение 70% этиловым спиртом; 3 — извлечение 95% этиловым спиртом; 4 — раствор эргостерина; 5 — раствор  $\beta$ -ситостерина

концентрированной серной кислоты с тритерпеновыми соединениями [1, 8]. Проведенные исследования позволили оптимизировать описанную в литературе методику путем исключения стадии выпаривания на водяной бане, сократить время, необходимое для проведения анализа, а также повысить точность методики (табл. 1).

При оптимизации был получен ряд извлечений, для которых использовали разные условия экстрак-

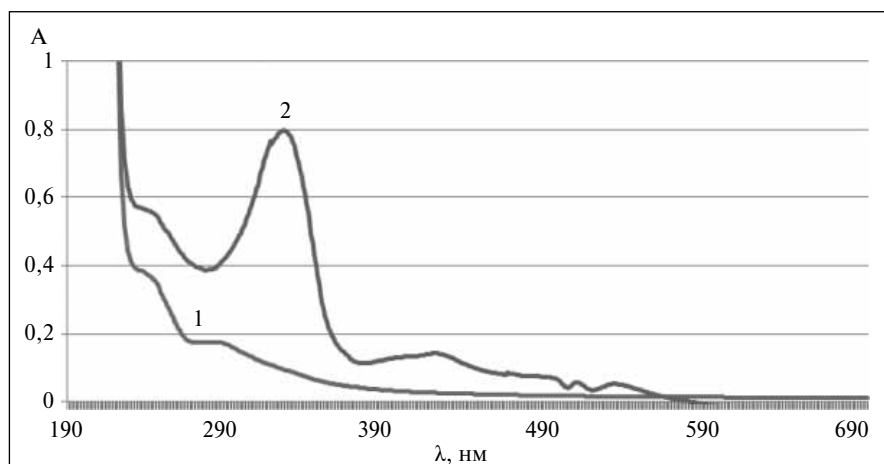
ции (время, соотношение сырье – экстрагент, концентрация этилового спирта). Установлено лучшее условие для извлечения стеринов, а именно экстракция 70% этиловым спиртом при соотношении сырье–экстрагент 1:100 (табл. 2). Для количественного определения суммы стериновых соединений в корневищах с корнями крапивы двудомной была выбрана прямая спектрофотометрия с использованием раствора РСО эргостерина в качестве стандарта.

**Методика количественного анализа суммы стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной.** Около 1 г (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до  $\pm 0,01$  г. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане при умеренном кипении в течение 30 мин. Далее закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

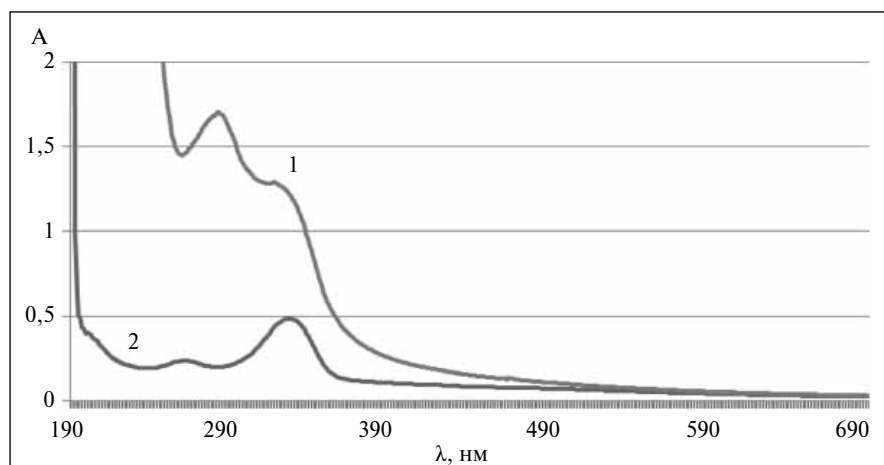
1 мл полученного извлечения помещают в градуированную пробирку емкостью 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70°C в течение 1 ч (термостатирование). Содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

При использовании рабочего стандартного образца эргосте-



**Рис. 2.** Электронные спектры растворов эргостерина (1:200): 1 – спиртовой раствор; 2 – в среде серной кислоты



**Рис. 3.** Электронные спектры густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной (1:30): 1 – спиртовой раствор; 2 – в среде серной кислоты

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ МЕТОДИКИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СТЕРИНОВ**

Условия анализа	Содержание суммы стеринов в пересчете на эргостерин, %
Выпаривание и термостатирование	3,14±0,05
Термостатирование без выпаривания	3,31±0,05
Без выпаривания и термостатирования	2,91±0,04

рина расчет результатов количественного определения содержания суммы стеринов в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье (X) выполняются по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора стандартного образца; m – точная навеска сырья, г; m<sub>0</sub> – точная навеска эргостерина, г; W – влажность сырья, %.

При отсутствии рабочего стандартного образца эргостерина расчет содержания суммы стеринов осуществляется по экспериментально установленному значению удельного показателя поглощения (1250):

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{1250 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; m – точная навеска анализируемого образца, г; W – влажность сырья, %. 1250 – удельный показатель поглощения эргостерина.

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ПОЛНОТУ ИЗВЛЕЧЕНИЯ СУММЫ СТЕРИНОВ ИЗ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ**

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение ЛРС: экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы стеринов, %
60	1 : 30	60	2,84±0,03
70			2,67±0,04
95			2,260±0,035
70	1 : 30	30	2,280±0,035
		60	2,980±0,046
		90	2,350±0,036
70	1 : 30	60	2,360±0,036
	1 : 50		2,940±0,035
	1 : 100		3,27±0,05

Таблица 3

**МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ СТЕРИНОВ В КОРНЕВИЩАХ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ**

n	f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
11	10	3,37	0,0232	95	2,23	+0,052	+1,54

*Приготовление раствора эргостерина.* Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца эргостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты, нагревают на водяной бане при температуре 70°С в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают.

Результаты статистической обработки представлены в табл. 3. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет ±1,54%.

**Выводы**

1. Из корневищ с корнями крапивы двудомной выделено индивидуальное биологически активное соединение стериновой природы, идентифицированное на основании данных УФ-, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрокопии и масс-спектрокопии как эргостерин.

2. Разработана ТСХ-методика качественного обнаружения стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной.

3. Разработана методика количественного определения суммы стериновых соединений в корневищах с корнями крапивы двудомной, в основе которой лежит прямая спектрофотометрия при аналитической длине волны 328 нм продукта взаимодействия стериновых соединений с концентрированной серной кислотой. Содержание суммы стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной колеблется от 2,07±0,03 до 3,37±0,05%.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Генкина Г.Л., Мжелская Л.Г. Спектрофотометрия гликозидов олеаноловой кислоты и хедерагенина в концентрированной серной кислоте. *Химия природных соединений*, 1977; 2: 220–227.
- Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып. 2. М.: Медицина, 1990; 400.
- Ефремов А.П. Аденома простаты – проявление мужского климакса. *Лекарственные растения*, 2002; 3 (4): 17–21.
- Кукес В.Г. Фитотерапия с основами клинической фармакологии. М.: Медицина, 1999; 192.
- Куркин В.А. Основы фитотерапии. Самара: Офорт; СамГМУ Росздрава, 2009; 963.
- Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: Офорт, СамГМУ, 2007; 1239.
- Лопаткин Н.А., Мартов А.Г., Сивков А.В. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы. М.: Медицина, 1999; 169.
- Пономарев В.Д., Оганесян Э.Т. Спектры поглощения пентациклических тритерпеноидов в серной кислоте. *Химия природных соединений*, 1971; 2: 147–150.
- Тринеева О.В., Сливкин А.И., Дмитрива А.В. Определение суммы свободных аминокислот в листьях крапивы двудомной. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2015; 5: 19–25.
- American herbal pharmacopoeia® botanical pharmacognosy—microscopic characterization of botanical medicines. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business, 2011; 733.
- European Pharmacopoeia. 6-th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc. 2008; 1224–1225.

Поступила 30 июня 2015 г.

## DETERMINATION OF STERINS IN STINGING NETTLE (*URTICA DIOICA*) RHIZOMES AND ROOTS

**E.A. Balagozyan; Professor V.A. Kurkin, PhD; O.E. Pravdivtseva, PhD**

*Samara State Medical University; 89, Chapaevskaya St., Samara 443099*

### SUMMARY

Stinging nettle (*Urtica dioica* L.; the family *Urticaceae*) is one of the known medicinal plants. In the Russian Federation, the raw medicinal plant material of stinging nettle is considered to be leaves having a hemostatic effect. In foreign countries, stinging nettle rhizomes and roots are used to prepare anticancer drugs (Prostaforton and Bazoton). Stinging nettle rhizomes and roots were applied to isolate a sterinic compound identified as ergosterin, as evidenced by UV, <sup>1</sup>H-NMR, and mass spectroscopy.

A thin-layer chromatographic procedure was proposed for the qualitative detection of sterins in the stinging nettle rhizomes and roots. A spectrophotometric procedure was developed to quantify the sum of sterinic compounds in the stinging nettle rhizomes and roots. The sum of sterins in the stinging nettle rhizomes and roots was established to range from 2.07±0.03 to 3.37±0.05%.

**Key words:** stinging nettle, *Urtica dioica* L., rhizomes and roots, sterinic compounds, ergosterin, thin-layer chromatography, spectrophotometry.

### REFERENCES

1. Genkina G.L, Mzhel'skaja L.G. Spectrophotometry of glycosides oleanolic acid and hederagenin in concentrated sulfuric acid. *Chemistry of Natural Compounds*, 1977; 2: 220–227 (in Russian).
2. State Pharmacopoeia of the USSR, XI ed. vol. 2. Moscow: Medicina, 1990; 400 (in Russian).
3. Efremov A.P. Adenoma of the prostate – a manifestation of male menopause. *Medicinal Plants*, 2002; 3 (4): 17–214 (in Russian).
4. Kukes V.G. Phytotherapy with the basics of clinical pharmacology. Moscow: Medicina, 1999; 192 (in Russian).
5. Kurkin V.A. Basics phytotherapy. Samara: Ofort, SamGMU Roszdrava, 2009; 963 (in Russian).
6. Kurkin V.A.. Pharmacognosy. Samara: Ofort, SamGMU, 2007; 1239 (in Russian).
7. Lopatkin N.A., Martov A.G., Sivkov A.V. Benign prostatic hyperplasia. Moscow: Medicina, 1999; 169 (in Russian).
8. Ponomarev V.D., Oganessian Je.T. The absorption spectra of pentacyclic triterpenoids in sulfuric acid. *Chemistry of Natural Compounds*, 1971; 2: 147–150 (in Russian).
9. Trineeva O.V., Slivkin A.I., Dmitriva A.V. Determination of the total of free amino acids in leaves of nettle. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2015; 5: 19–25 (in Russian).
10. American herbal pharmacopoeia® botanical pharmacognosy— microscopic characterization of botanical medicines. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business, 2011; 733.
11. European Pharmacopoeia. 6-th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008; 1224–1225.