



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **65078** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛИСТЯ КРОПИВИ ДВОДОМНОЇ (URTICA DIOICA L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

2

(21) u201105502

(22) 29.04.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) ГУДЗЕНКО АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ, ЦУРКАН
ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОВАЛЬЧУК
ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМА-
КОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб стандартизації листя кропиви дводомної (Urtica dioica L.) в багатокомпонентних рослин-

них сумішах, які містять в своєму складі листя кропиви дводомної, плоди глоду колючого, траву споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені та кореневища валеріани лікарської, кору крушини, кореневища лепехи та насіння льону, який **відрізняється** тим, що визначають наявність та вміст скополетину за методом високоефективної рідинної хроматографії з попередньою очисткою проби, з застосуванням твердофазної екстракції.

Корисна модель належить до галузі фармації, зокрема до фітохімії, і може бути використана для стандартизації лікарської рослинної сировини та рослинних сумішей.

Відомо, що листя кропиви дводомної широко використовуються в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складових частин багатокомпонентних рослинних лікарських засобів [1, 2].

Дана лікарська сировина має широкий спектр біологічної дії, зокрема кровоспинні, протизапальні, антиоксидантні, гіпоглікемічні властивості тощо [3-6].

За літературними даними кумарин скополетин, що міститься в рослині виявляє виражену гіпоглікемічну активність [7], тому вважалось за доцільне дослідити можливість використання цієї сполуки як маркера для визначення кропиви в рослинних сумішах.

За прототип вибрано методику кількісного визначення рослини в фармакопейній статті на листя кропиви, в якій стандартизація сировини квіток ромашки лікарської проводиться за кількісним вмістом оксикоричних кислот - хлорогенової та кофейляблучної, що проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). В прототипі хроматографування проводиться з використанням обернено-фазових колонок з застосуванням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та градієнтного режиму хроматографування [8].

Недоліки існуючого способу стандартизації сировини наступні: аналогом передбачено стандар-

тизацію моносировини листя кропиви дводомної; оксикоричні кислоти дуже поширені в рослинній сировині компоненти і тому їх не раціонально використовувати як маркери для стандартизації кропиви в рослинних сумішах [9]. І тому більш оптимальним рішенням є використання як маркера кропиви в багатокомпонентних сумішах біологічно активної речовини, яка рідко зустрічається в рослинних об'єктах, зокрема, кумарин скополетин, що міститься в кропиві та виявляє широкий спектр біологічної дії [7].

Об'єкт, який підлягає удосконаленню, - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині листя кропиви дводомної в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять листя кропиви дводомної, плоди глоду колючого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені та кореневища валеріани лікарської, кора крушини, кореневища лепехи та насіння льону. Листя кропиви дводомної широко використовуються для виготовлення як монопрепаратів, так і полікомпонентних фітозасобів, що представлені на фармацевтичному ринку України [1, 2].

Як зазначалося, в сировині квіток ромашок містяться біологічно активна речовина скополетин [8, 6]. Виходячи з цього, з застосуванням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну методику визначення скополетину в сировині листя кропиви. За розробленою методикою було проаналізовано листя кропиви різних вітчизняних виробників. Зок-

(19) **UA** (11) **65078** (13) **U**

рема, були проаналізовані наступні препарати кропиви дводомної: листя кропиви в пачках по 50 г (Виробники: ЗАТ «Ліктрави» (серії: 10111, 141010), ЗАТ ФФ «Віола» (серія 101210) та КП «Фармацевтична фабрика» (серія 10610)); Кропиви листя в

фільтр-пакетах по 1,5 г (Виробники: ЗАТ «Ліктрави» (серія 31110), ЗАТ ФФ «Віола» (серія 050810)).

Вміст скополетину в листі кропиви дводомної різних вітчизняних виробників представлений в таблиці 1.

Таблиця 1

Вміст скополетину в досліджуваних препаратах листя кропиви дводомної

№ п/п	Препарат листя кропиви дводомної	Виробник, № серії	Вміст скополетину у (в %) в перерахунку на висушену сировину
1	Кропиви листя в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 10111	0,2470±0,0118
2	Кропиви листя в пачці по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 141010	0,2333±0,0123
3	Кропиви листя в пачці по 50 г	ЗАТ ФФ «Віола», серія 101210	0,1757±0,0093
4	Кропиви листя в пачці по 50 г	КП «Фармацевтична фабрика», серія 10610	0,2361±0,0108
5	Кропиви листя в фільтр-пакетах по 1,5 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 31110	0,2796±0,0139
6	Кропиви листя в фільтр-пакетах по 1,5 г	ЗАТ ФФ «Віола», серія 050810	0,3464±0,01631

Згідно з даними, представленими в таблиці, в усіх пробах був ідентифікований та кількісно визначений кумарин скополетин. Вміст скополетину в досліджуваній сировині лежить в межах від 0,1757±0,0093 % до 0,3464±0,01631 % в перерахунку на висушену сировину.

Процес ідентифікації та кількісного визначення скополетину як компонента сировини листя кропиви дводомної в багатокомпонентних рослинних сумішах полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення скополетину як компонента кропиви дводомної та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини листя кропиви дводомної в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності скополетину і визначення його вмісту. Таким чином, забезпечується можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина листя кропиви дводомної.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення скополетину як компонента листя кропиви за допомогою методу ВЕРХ в присутності біологічно активних речовин інших рослин. Це досягається застосуванням твердофазної екстракції для очищення досліджуваних розчинів від заважаючих речовин. При цьому використовується градієнтне елюювання з використанням водно-ацетонітрильної рухомої фази, застосування якої дозволяє добитися розділення піків скополетину кропиви дводомної та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: 5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: листя кропиви дводомної - 1 г, плодів глоду колючого - 1 г, кореневих лепехи - 1 г, трави споришу - 1 г, кори крушини - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, плодів

шипшини - 1 г, коренів та кореневих валеріани лікарської - 1 г, кори крушини - 1 г, насіння льону - 1 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 45 хвилин. Після цього, екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводять ще раз, та доводять об'єм витяжок до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 10 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активованій (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 25 % етилового спирту. Пробу із патрону вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

По 5 мкл досліджуваного розчину та розчину стандарту скополетину поперемінно хроматографують в наступних умовах: колонка С18 Х-Тегга, розміром 250 мм × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм; температура колонки - 35 °С; довжина хвилі детектування - 344 нм; швидкість потоку рухомої фази - 1 мл/хв; об'єм проби, що вводився, - 5 мкл; рухома фаза: 0-1 хв: ізократичне елюювання 100 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об./об.); 1-26 хв: градієнтне елюювання від 100 % до 70 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об./об.) та від 0 % до 30 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об./об.); 26-30 хв: градієнтне елюювання від 70 % до 20 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об./об.) та від 30 % до 80 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об./об.);

30-35 хв: ізократичне елюювання 20 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об./об.) та 80 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об./об.); 35-51 хв: ізократичне елюювання 100 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об./об.).

Вміст скополетину в досліджуваній багатокомпонентній рослинній суміші (в %) обчислюється за наступною формулою:

$$X = \frac{A_{\text{пр}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot m_{\text{пр}} \cdot (100 - W)};$$

де $A_{\text{пр}}$ - площа піку скополетину на хроматограмі досліджуваного розчину;

$A_{\text{ст}}$ - площа піку скополетину на хроматограмі стандартного розчину скополетину;

$C_{\text{ст}}$ - концентрація скополетину в стандартному розчині, г/мл;

$m_{\text{пр}}$ - наважка досліджуваної суміші, г;

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування стандартного розчину: 0,01 г (точна наважка) достовірного стандарту скополетину вміщують в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 15 мл метанолу, доводять метанолом до мітки та перемішують. 1 мл отриманого розчину вміщують в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять до мітки метанолом та перемішують.

На хроматограмі досліджуваного розчину повинний бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку скополетину на хроматограмі стандартного розчину.

На підставі експериментальних даних для сировини листя кропиви дводомної нами рекомендовано граничний вміст для скополетину - не менше 0,15 % у перерахунку на висушену сировину.

За вказаних вище умов було проаналізовано досліджувані розчини, приготовлені наступним чином:

Модельна суміш без вмісту листя кропиви.

5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: плодів глоду колючого - 1 г, кореневищ лепехи - 1 г, трави споришу - 1 г, кори крушини - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, плодів шипшини - 1 г, коренів та кореневищ валеріани лікарської - 1 г, кори крушини - 1 г, насіння льону - 1 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 45 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводять ще раз, та доводять об'єм витяжок до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 10 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції "Superclean Ic-

18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 25 % етилового спирту. Пробу із патрону вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Екстракт листя кропиви.

1 г (точна наважка) подрібненої сировини листя кропиви дводомної вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 45 хвилин. Після цього, екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводять ще раз, та доводять об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 10 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 25 % етилового спирту. Пробу із патрона вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Хроматограми стандартного розчину, екстракту листя кропиви, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту листя кропиви представлені на фіг. 1, фіг. 2, фіг. 3 та фіг. 4 відповідно.

За даних умов аналізу пік скополетину має час виходу біля 16,7 хвилин (фіг. 1).

На хроматограмах екстракту листя кропиви та досліджуваного розчину присутній пік скополетину (фіг. 2 та фіг. 3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту листя кропиви (фіг. 4) - даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять листя кропиви дводомної, плоди глоду колючого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені та кореневища валеріани лікарської, кора крушини, кореневища лепехи та насіння льону, присутність та вміст листя кропиви дводомної можна визначати за наявністю та кількісним вмістом кумарину скополетину.

Корисна модель дає можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини листя кропиви дводомної в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять листя кропиви дводомної, плоди глоду колючого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені та кореневища валеріани лікарської, кора крушини, кореневища лепехи та насіння льону за наявністю та вмістом скополетину як фізіологічно активного компонента, що присутній в листі кропиви дводомної. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та корисній моделі наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика способів стандартизації листя кропиви дводомної

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	хлоровенова кислота, кофеїл-яблучна кислота	Моносировина листя кропиви дводомної	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації моно-сировини листя кропиви дводомної
2	Корисна модель	Скополетин	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: листя кропиви дводомної, плоди глоду колючого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені та кореневища валеріани лікарської, кора крушини, кореневища лепехи та насіння льону	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей листя кропиви дводомної

Перелік посилань:

1) Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 1. / За ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. - К: Моріон, 2007. - 1128 с.

2) Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 2. / За ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. - К: Моріон, 2007. - 1126 с.

3) Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. Гродзінський А.М. - К.: Головна ред. УРЕ, 1989. - 544 с.

4) Gulcin I., Küfrevioglu O., Oktay M., Büyükkuroglu M. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) // J. Ethnopharmacol. - 2004. - Vol. 90(2-3). P. 205-215.

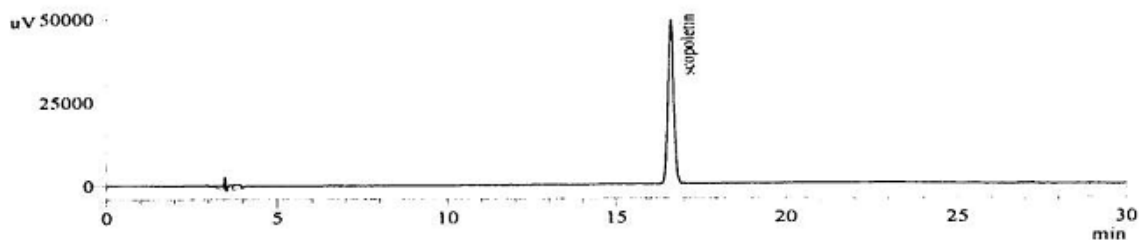
5) Terzi A, Yildiz F, Çoban S, Taşkın A, Bitiren M, Aksoy N. Protective effect of *Urtica dioica* on liver injury induced by hepatic ischemia reperfusion injury in rats // *Düzce Med J.* - 2010. Vol. 12. P. 43-47.

6) Kandis H, Karapolat S, Yildirim U, Saritas A, Gezer S, Memisogullari R. Effects of *Urtica dioica* on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats//*Clinics* (Sao Paulo). -2010. - Vol. 65 (12). - P. 1357-1361.

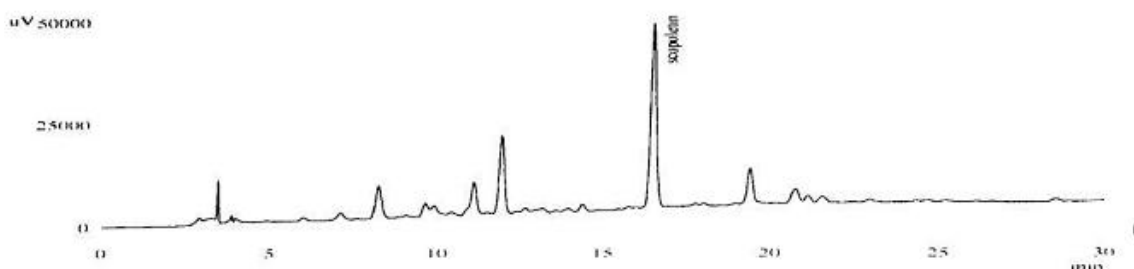
7) Zhang W., Lee J., Kim Y., Kim I., Park J., Myung C. Amelioration of insulin resistance by scopoletin in high-glucose-induced, insulin-resistant HepG2 cells // *Horm. Metab. Res.* -2010. - Vol. 42 (13). - P. 930-935.

8) Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Доповнення 3. -Х.: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2009. - 280 с.

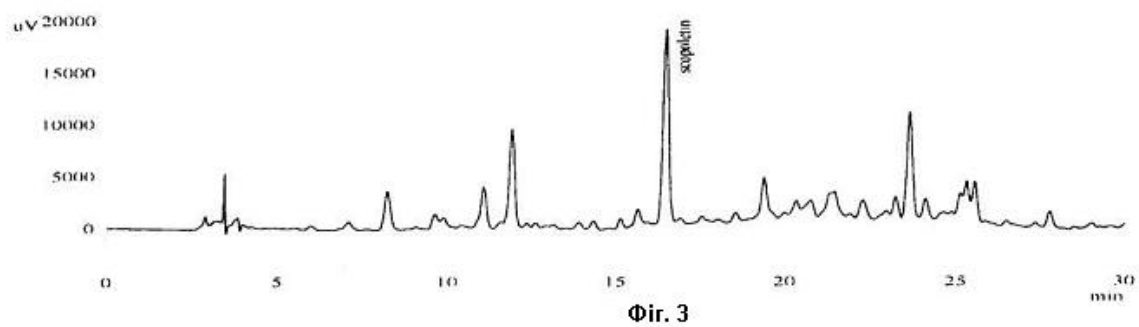
9) Растительные лекарственные средства / Максютин Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П., Погодина Л.И., Липкан Г.Н. - К.: Здоров'я, 1985. - 280 с.



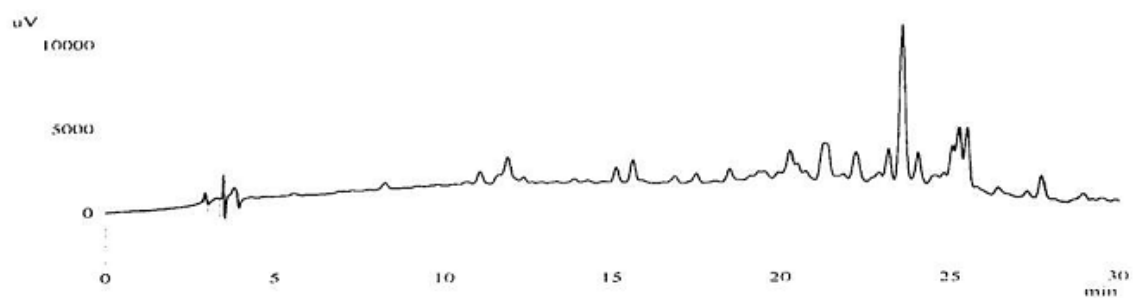
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4