

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

## РОЗРОБКА МЕТОДІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

**Ключові слова:** хміль звичайний, стандартизація, сухий екстракт, флавоноїди, фенольні сполуки

Розробка методів стандартизації – один з основних напрямів у дослідженні лікарської рослинної сировини (ЛРС) та отриманих з неї фітопрепаратів. Вимоги щодо розробки нормативних документів, які регламентують якість ЛРС, потребують кількісного визначення основних діючих речовин [8, 9, 13].

Одною з перспективних лікарських рослин, яка містить великий комплекс біологічно-активних речовин, є хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.) родини Коноплевих (*Cannabaceae*). Упродовж багатьох століть хміль культивується практично в усіх країнах помірнього клімату, зокрема у Франції, Англії, Чехії, на півдні Німеччини тощо. В Україні основну заготівлю сировини здійснюють у Житомирській, Рівненській та Волинській областях [1, 11, 12].

Хміль звичайний широко застосовують у різних сферах життєдіяльності людини. У фітотерапії при багатьох захворюваннях часто використовують хміль звичайний як лікарську сировину. Виражені седативні властивості хмелю зумовили його введення до складу відомих лікарських препаратів: уролесан, валокордин, корвалдін, валоседан, а також у складі багатьох зборів [14]. Хміль також використовують у народній медицині в якості анальгетичного, противиразкового, седативного та снодійного засобів. Крім цього, у пивоваренній промисловості різноманітні сорти надають пиву своєрідний аромат та смак, сприяють його зберіганню. У хлібопекарній промисловості його використовують в якості стимулятора процесів бродіння [1, 12].

Традиційно для одержання лікувальних засобів використовують лише шишки хмелю, хімічний склад яких дуже різноманітний. Вони містять ефірну олію (1–3 %), до складу якої входять гумулен, мірцен, фарнезен,  $\beta$ -каріофілен. Основну частку шишок становлять гіркі та смолисті речовини. Компонентами гіркої смоли (11–20 %) є  $\alpha$ - та  $\beta$ -хмельові кислоти – похідні ацилфлороглюцину: гумулон, когумулон, лупулон, колупулон тощо. Серед інших фенольних сполук – кумарини, флавоноїди, катехіни, дубильні речовини. Крім цього наявні вітаміни групи В, аскорбінова кислота, токофероли та речовини, що діють як естрогенні гормони [1, 12, 15]. Хімічний склад листя хмелю звичайного вивчено недостатньо. За літературними даними, вони містять органічні кислоти, амінокислоти, полісахариди, дубильні речовини, аскорбінову кислоту. Фенольні сполуки у листі хмелю представлені флавонол-глікозидами, катехінами, лейкоантоціанідинами та фенолкарбонowymi кислотами [1, 10].

Зважаючи на різноманітний хімічний склад, нами запропоновано використання такого нетрадиційного виду лікарської сировини, як листя хмелю звичайного.

Розроблено спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з листя хмелю звичайного (далі – Екстракт) та отримано патент щодо способу одержання комплексу біологічно активних речовин рослинного походження з протизапальною та антиоксидантною активністю, які можуть бути використані в якості лікарських субстанцій для одержання засобів у різних лікарських формах [3].

У центральній науково-дослідній лабораторії (ЦНДЛ) НФАУ під керівництвом проф. Л.В. Яковлевої виявлено антиоксидантну та протизапальну ефективність одержаного Екстракту. За результатами проведених досліджень встановлено, що даний Екстракт є високоєфективним антиоксидантом, який не роз'єднує процеси окиснення та фосфорилювання мітохондрій печінки щурів у системі *in vitro*.

Протизапальну активність Екстракту вивчали на моделі карагенінового запалення та змозанового набряку в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг. В якості препарату порівняння вико-

ристано «Альтан». Аналіз одержаних даних свідчить про виражену протизапальну активність Екстракту, який вірогідно знижував розвиток набряку у порівнянні з контрольною групою. У дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг Екстракт виявляє протизапальну активність на рівні препарату порівняння [3].

Попередній фітохімічний та фармакогностичний аналізи проводили методом паперової хроматографії та за допомогою характерних кольорових реакцій. Аналізи показали наявність в Екстракті фенольних сполук, таких як флавоноїди, кумарини, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини, що гідролізуються, тощо. Характерними флавоноїдними глікозидами є моно-, ди- та триглікозиди кверцетину та кемпферолу. Флавоноїдні сполуки зарекомендували себе як антиоксиданти і мембраностабілізуювальні речовини. Дослідження флавоноїдів і фенольних сполук проводили за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів аналізу [2, 4–6, 9, 16, 17]. Як відомо, галова кислота та її депсиди входять до складу дубильних речовин, що гідролізуються, та виявляють протизапальні, антимікробні та антивірусні властивості.

Метою даної роботи є стандартизація даного Екстракту з листя хмелю звичайного. Зважаючи на досліджену протизапальну активність Екстракту, було доцільним провести стандартизацію за показниками «флавоноїди» та «фенольні сполуки» [7, 9].

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання: провести попередній фітохімічний та фармакогностичний аналізи та розробити методики кількісного визначення основних діючих речовин, таких як фенольні сполуки та флавоноїди.

#### *Експериментальна частина*

*Опис.* Отриманий Екстракт з листя хмелю звичайного – аморфний, гігроскопічний порошок зеленувато-коричневого кольору зі специфічним приємним запахом.

*Розчинність.* Екстракт добре розчинний у воді, погано – у 50 % та 70 % спирті та не розчиняється у 96 % спирті, хлороформі, бутанолі та етилацетаті.

*Ідентифікація.* До 5 мл розчину А, приготовленого для кількісного визначення, додають 1 мл розчину заліза окисного хлориду; з'являється зелено-брунатне забарвлення (фенольні сполуки).

До розчину в пробірці додають 3 мл 2 % розчину алюмінію хлориду спиртового і переглядають в УФ-світлі за довжиною хвилі 366 нм; спостерігається зеленувато-жовта флуоресценція (флавоноїди).

*Кількісне визначення.* 0,6 г (точна наважка) Екстракту поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють при нагріванні у 28 мл води, доводять об'єм розчину 96% спиртом до позначки і перемішують. Отриманий мутний розчин, в якому утворився гелеподібний осад полісахаридів, відфільтровують крізь паперовий фільтр (розчин А).

Кількісні визначення флавоноїдів та фенольних сполук проводили спектрофотометричним методом на СФ-46 [3].

*Флавоноїди.* 8 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 8 мл 2 % розчину алюмінію хлориду спиртового, доводять об'єм розчину 96% спиртом до позначки і перемішують.

Через 45 хв вимірюють оптичну густину одержаного розчину при довжини хвилі 405 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

В якості розчину порівняння використовують розчин, який містить 8 мл розчину А, 8 крапель розведеної оцтової кислоти, доведений у мірній колбі місткістю 50 мл до позначки 96 % спиртом.

Вміст суми флавоноїдів ( $X_1$ ) в Екстракті у перерахунку на рутин і суху речовину (%) обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m \cdot 8 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 5000}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де: А – оптична густина випробуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина ДСЗ рутину;

$m$  – маса наважки, г;  
 $m_0$  – маса ДСЗ рутину, г;  
 $W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст суми флавоноїдів у Екстракті, у перерахунку на рутин і суху речовину, становив 1,39 %. Диференціальний спектр поглинання комплексів розчину рутину (1) та флавоноїдів сумарного екстракту з листя хмелю звичайного (2) представлені на рис. 1.

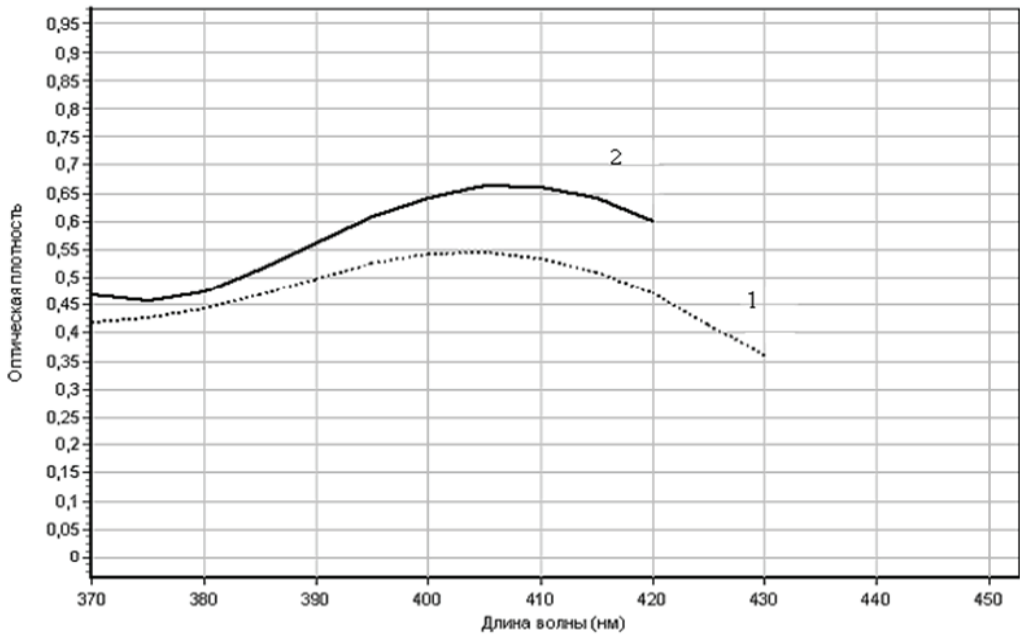


Рис. 1. Диференціальний спектр поглинання комплексів розчину рутину (1) та флавоноїдів сумарного екстракту з листя хмелю звичайного (2)

**Визначення фенольних сполук.** 1 мл розчину А поміщують у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину 50 % спиртом до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. В якості розчину порівняння використовують 50 % спирт.

Вміст суми фенольних сполук ( $X_2$ ) у препараті у перерахунку на галову кислоту і суху речовину (%) обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{A \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 5000}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де:  $A$  – оптична густина випробуваного розчину;  
 $A_0$  – оптична густина розчину ФСЗ ДФУ галової кислоти;  
 $m$  – маса наважки, г;  
 $m_0$  – маса ФСЗ ДФУ галової кислоти, г;  
 $W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст суми фенольних сполук в Екстракті у перерахунку на галову кислоту і суху речовину становив 6,0 %. Диференціальний спектр поглинання комплексів розчину галової кислоти (1) та фенольних сполук сумарного екстракту з листя хмелю звичайного (2) представлені на рис. 2.

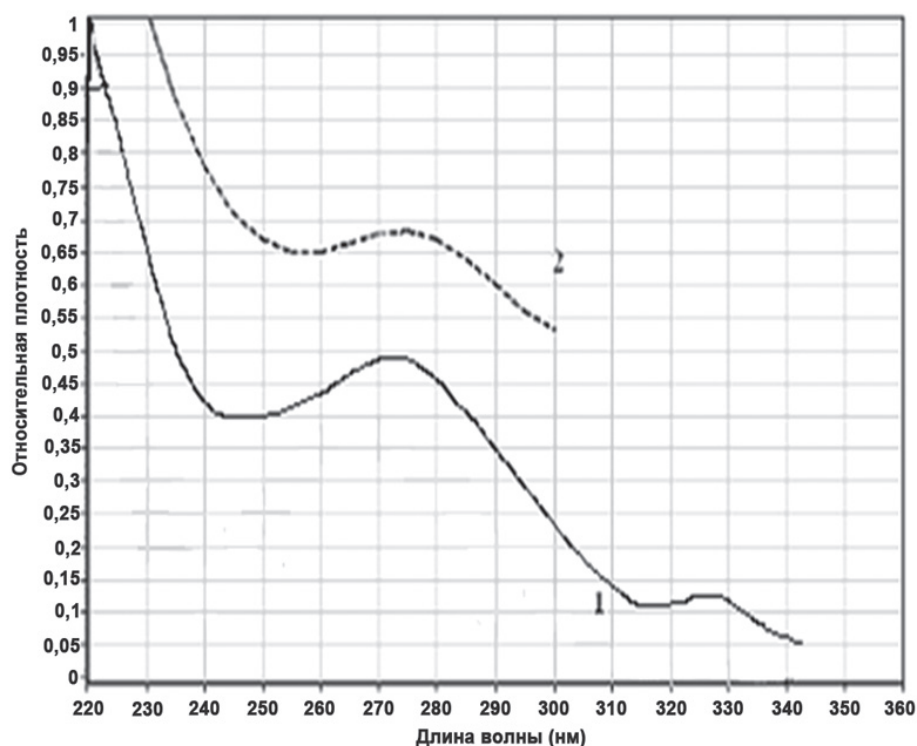


Рис. 2. Диференціальний спектр поглинання комплексів розчину галлової кислоти (1) та фенольних сполук сумарного екстракту з листя хмелю звичайного (2)

*Примітки:* 1. Приготування 2 % розчину алюмінію хлориду спиртового. 2,0 г алюмінію хлориду шестиводного (ГОСТ 3759-75, х.ч. або ч.д.а.) поміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 40 мл 96 % спирту, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до позначки і перемішують. Термін придатності розчину – 1 місяць.

2. Приготування розчину ДСЗ рутину. 0,05 г (точна наважка) ДСЗ рутину (ФС 42-2508-87), висушеного при температурі 130–140 °С, розчиняють при нагріванні на водяній бані у 80 мл 70 % етанолу в мірній колбі місткістю 100 мл і після охолодження доводять об'єм розчину 70 % етанолом до позначки. Термін придатності розчину – 1 місяць.

#### В и с н о в к и

1. Розроблено методики стандартизації та наведено їх обґрунтування для одержаного сухого екстракту з листя хмелю звичайного.

2. Встановлено, що вміст суми флавоноїдів у Екстракті має бути не менше ніж 1,30 %, вміст суми фенольних сполук – не менше ніж 6,0 %.

1. Беленовская Л.М., Буданцев А.Л. // Растительные ресурсы. – 2008. – Т. 44. – № 2. – С. 132–154.

2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

3. Декларацийний патент № 27271. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з протизапальною та антиоксидантною активністю / Ковальов С.В., Ковальов В.М., Берестова С.І., Малоштан Л.М., Гладченко О.М., Уланова В.А., Єфременко Е.А. – Опубл. Бюл. № 17 від 25.10.2007.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.

5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.

6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 1-е вид. – Доповнення 3. – 2009. – 280 с.

7. Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Ковальов В.М., Комісаренко А.М., Тимченко М.М. // Фармаком. – 2002. - № 2. - С. 1-6.

8. Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасын Е.К., Хованская Н.П., Воловик В.Г., Георгиевский В.П. // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 27–35.

9. Котова Э.Э., Котов А.Г., Хованская Н.П. / Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 35–41.

10. Латыпова Г.М., Пупыкина К.А., Закиева С.В. // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 198–200.

11. Ліпкан Т.М. // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 3-4. – С. 37–40.

12. Ляшенко Н.И., Михайлов Н.Г., Рудык Р.И. Физиология и биохимия хмеля. Монография. – Житомир: «Полиссия», 2004. – 408 с.

13. Матющенко Н.В., Степанова Т.А. // Фармация. – 2003. – № 2. – С. 16–18.

14. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М.: АстраФармСервис, 1996. – 1296 с.

15. Chadwick L.R, Pauli G. F., Farnsworth N.R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties // Phytomedicine. 2006 January ; 13 (1–2): 119–131.

16. European Pharmacopoeia. – 5<sup>th</sup> ed. – Sup. 5.6. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2005. – 2905 p.

17. European Pharmacopoeia. – 6<sup>th</sup> ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. – 3308 p.

Надійшла до редакції 14.03.2011.

*С.И.Мазурец, С.В.Ковалев*

#### РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

**Ключевые слова:** хмель обыкновенный, стандартизация, сухой экстракт, флавоноиды, фенольные соединения

Разработаны методики стандартизации сухого экстракта, полученного из листьев хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.). Количественное содержание суммы флавоноидов в экстракте должно быть не менее 1,30 %, содержание суммы фенольных соединений – не менее 6,0 %.

*S.I.Mazurets, S.V.Kovalyov*

#### ELABORATION FOR STANDARTIZATION METHODS OF DRY HOP PLANT (*HUMULUS LUPULUS* L.) LEAVES EXTRACT

**Key words:** hops (*Humulus lupulus* L.), standartization, dry extract, flavonoids, phenol compounds

## S U M M A R Y

Standardization methodics of dry extract which is derived from hop plant (*Humulus lupulus* L.) leaves were elaborated. The number of flavonoids sum in the Extract has to be not less than 1.30% and the number of phenol compounds has to be not less than 6 %.