

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк
УДК 615.32+581.1]-08

ПІДХОДИ ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ ШИШОК ХМЕЛЮ ТА ПРЕПАРАТІВ НА ЇЇ ОСНОВІ

© М. Б. Чубка

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: наведено результати ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у різних зразках шишок хмелю, запропоновані якісні та кількісні критерії якості цієї сировини.

Ключові слова: шишки хмелю, флавоноїди, ідентифікація, кількісне визначення, стандартизація.

Вступ. В зв'язку із значним розширенням асортименту лікарських засобів (ЛЗ) рослинного походження, питання стандартизації лікарської рослинної сировини (ЛРС) та препаратів на її основі є актуальною проблемою сучасної фармації.

Прикладом такої ЛРС є шишки хмелю (*Humulus lupulus L.*), які здавна використовували в народній медицині [1]. Завдяки різноманітному складу біологічно активних речовин (БАР), шишки хмелю проявляють різносторонню фармакологічну дію [2-4], що дозволяє використовувати екстракти цієї ЛРС в складі різних ЛЗ (наприклад, Уролесан, Ново-пасит, Валокардин).

Раніше лише в Європейській Фармакопеї [5], а зараз і в монографії Державної Фармакопеї України (ДФУ), на "Хмелю шишки" запропоновано використовувати метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) для ідентифікації в сировині лупулонів, гумулонів та ксантогумолу [6]. Разом з цією ідентифікацією у третьому доповненні до ДФУ запропоновано випробування на вміст речовин, що екстрагуються 70 % об/об спиртом, втрати в масі при висушуванні (не більше 13 %), загальної золи (не більше 12 %), сторонніх домішок (не більше 4 % плодів, 10 % інших сторонніх органів рослини, 1 % сторонніх часток) [6]. Проте кількісне визначення окремих компонентів чи груп БАР не передбачено, хоча дана ЛРС вміщує також інші класи БАР [7-9].

Тому метою нашої роботи стало запропонувати можливі підходи до стандартизації даної сировини, визначити якісні та кількісні критерії її доброякісності.

Методи дослідження. Для дослідження використовували промислові зразки шишок хмелю вітчизняних фармацевтичних фабрик. Наявність флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у шишках хмелю підтверджували методом ТШХ. Кількісний вміст суми флавоноїдів визначали методом диференціальної спектрофотометрії до та після гідролізу флавоноїдів.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів методом диференціальної спектрофотометрії (без попереднього гідролізу) у шишках хмелю в перерахунку на рутин

Випробуваний розчин. 1 г (точна наважка) перетертої сировини поміщають у конічну колбу місткістю 100 мл зі шліфом, додають 40 мл 70 % спирту етилового і нагрівають зі зворотним холодильником впродовж 30 хв на водяній бані. Після охолодження спиртового вилучення його фільтрують в мірну колбу місткістю 50 мл, промивають колбу з сировиною тим же спиртом, долучаючи отримані розчини до фільтрату та доводячи об'єм вилучення до 50 мл.

5,0 мл досліджуваного спиртового вилучення поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину 95 % спиртом етиловим до позначки, перемішують.

Компенсаційний розчин. 5,0 мл досліджуваного спиртового вилучення поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл та доводять об'єм розчину 95 % спиртом етиловим до позначки, перемішують.

Розчин стандартного зразка рутину. 0,05 г (точна наважка) стандартного зразка рутину (Sigma) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл 95 % етанолу, розчиняють та доводять об'єм розчину 95 % етанолом до позначки і перемішують.

Розчин порівняння. 1,0 мл розчину стандартного зразка рутину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину 95 % спиртом етиловим до позначки, перемішують.

Компенсаційний розчин. 1,0 мл розчину стандартного зразка рутину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл та доводять об'єм розчину 95 % спиртом етиловим до позначки, перемішують.

Оптичну густину випробуваного розчину і розчину порівняння вимірюють через 30 хв після приготування при довжині хвилі 412 нм віднос-

но компенсаційних для кожного з розчинів відповідно.

Вміст суми флавоноїдів у сировині (X), у відсотках в перерахунку на рутин та суху сировину, розраховували за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A_x \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot m_{\text{нав}} \cdot (100 - W)},$$

де A_x – оптична густина випробуваного розчину; m_0 – маса наважки стандартного зразка рутину, в г; A_0 – оптична густина стандартного розчину рутину з алюміній хлоридом; $m_{\text{нав}}$ – маса наважки сировини, в г; W – вміст вологи у сировині, у %.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів з використанням диференціальної спектрофотометрії (після попереднього гідролізу) у шишках хмелю.

Вихідний розчин: у круглодонну колбу місткістю 100 мл, відважують 1 г (точна наважка) сировини, подрібненої і просіяної через сито діаметром 2 мм, додають 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну Р (5 г/л), 25 мл ацетону Р і 7,0 мл хлористоводневої кислоти Р1. Кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують рідину через фільтр "синя стрічка" у мірну колбу місткістю 100 мл. Витягнення повторюють ще два рази по 25 мл ацетону Р, кожного разу, прокип'ятивши зі зворотним холодильником 10 хв, промивають колбу і фільтр ацетоном Р і доводять ацетоном Р до позначки.

20,0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку місткістю 100 мл, додають 20 мл води Р і 15 мл етилацетату Р, струшують протягом 15 хв. Після розділення шарів, нижній (водний) шар зливають у конічну колбу, місткістю 50 мл, а верхній (органічний) зливають у конічну колбу місткістю 100 мл і закривають корком. Екстракцію водного шару повторюють 2 рази по 15 мл етилацетату Р за вказаних вище умов. Об'єднані етилацетатні витягнення кількісно, за допомогою 25 мл води Р, переносять назад у ділильну лійку і струшують 2 рази з водою Р, по 25 мл і 50 мл, відповідно, протягом 5 хв. Етилацетатні витягнення фільтрують через фільтр "біла стрічка" з 5 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл (фільтр з натрію сульфатом безводним Р попередньо змочують етилацетатом Р). Лійку промивають 10 мл етилацетату Р і доводять вміст в мірній колбі до позначки тим самим розчинником.

Випробуваний розчин: 10,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 1,0 мл реактиву алюмінію хлориду Р і доводять до позначки 5 % (об/об) розчином оцтової кислоти льодяної Р в метанолі Р.

Компенсаційний розчин: 10,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, доводять до мітки 5 % (об/об) розчином оцтової кислоти льодяної Р в метанолі Р.

Оптичну густина випробуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування при довжині хвилі (421 ± 4) нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст суми флавоноїдів (X) у сировині у відсотках в перерахунку на гіперозид суху сировину та розраховують із застосуванням питомого показника поглинання комплексу гіперозиду з алюміній хлоридом – $A_{1\text{см}}^{1\%} = 500$ за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot 125}{m_{\text{нав}} \cdot (100 - W)},$$

де A_x – оптична густина випробуваного розчину; $m_{\text{нав}}$ – маса наважки сировини, в г; W – вміст вологи у сировині, у %.

Результати й обговорення. Дослідження флавоноїдів та гідроксикоричних кислот проводили в метанольних та етанольних вилученнях з сировини до та після проведення гідролізу глікозидних фракцій флавоноїдів до відповідних агліконів. Одержані розчини наносили на хроматографічну пластинку Silica gel F₂₅₄ фірми "Merck" і хроматографували в системі розчинників етилацетат Р – оцтова кислота льодяна Р – вода Р (5:1:1). Для проявлення пластинки використовували розчин 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р в метанолі Р та розчин 50 г/л макроголу 400 Р в метанолі Р. Пластинку переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. В результаті проведених досліджень, підтверджена наявність у шишках хмелю рутину ($R_f=0,26$), кверцетину ($R_f=0,94$) та хлорогенової кислоти ($R_f=0,18$).

Кількісне визначення флавоноїдів у шишках хмелю проводили методом диференціальної спектрофотометрії за реакцією комплексоутворення з алюміній хлоридом. Дана реакція дає можливість визначати суму флавоноїдів. Як компенсаційний розчин використовували вихідний розчин відповідного вилучення без додавання відповідних реактивів, що запобігає впливу супутніх та забарвлених речовин. Для кількісного визначення флавоноїдів отримували етанольні та водно-етанольні вилучення з сировини. При порівнянні положення максимуму поглинання та вигляду диференціальних спектрів флавоноїдів у етанольних вилученнях шишок хмелю (рис. 1) із диференціальним спектром рутину (412 ± 2 нм) в умовах кількісного визначення (рис. 2) є очевидним, що рутин є переважаючим флавоноїдом в шишках хмелю, тому суму флавоноїдів у різних

витягах розраховували у перерахунку на рутин (табл. 1). Для вивчення впливу концентрації спирту етилового як оптимального екстрагента флавоноїдів із шишок хмелю на кількісний вміст флавоноїдів готували вилучення на спирті етилово-

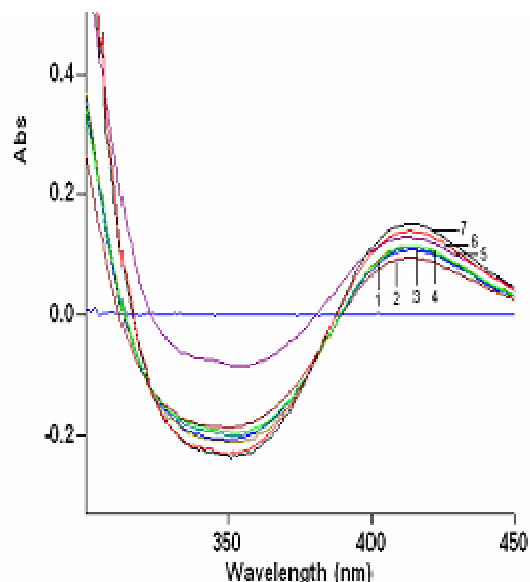


Рис. 1. Диференціальні електронні спектри поглинання в умовах кількісного визначення флавоноїдів в етанольних вилученнях з шишок хмелю із вмістом спирту: 1 – 40 %, 2 – 30 %, 3 – 50 %, 4 – 60 %, 5 – 95 %, 6 – 70 %, 7 – 80 %.

Аналізуючи результати кількісного визначення суми флавоноїдів у водно-етанольних вилученнях з різною концентрацією спирту етилового, наведені в таблиці 1, можна зробити висновок про доцільність використання 70 – 80 % спирту етилового як оптимального екстрагента флавоноїдів із даної сировини.

Кількісний вміст флавоноїдів визначали у різних промислових зразках шишок хмелю, ви-

му різної концентрації (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 95 %) (рис. 1). Усі вилучення отримували шляхом кип'ятіння наважки сировини із водно-етанольним розчином відповідної концентрації на водяній бані із зворотним холодильником.

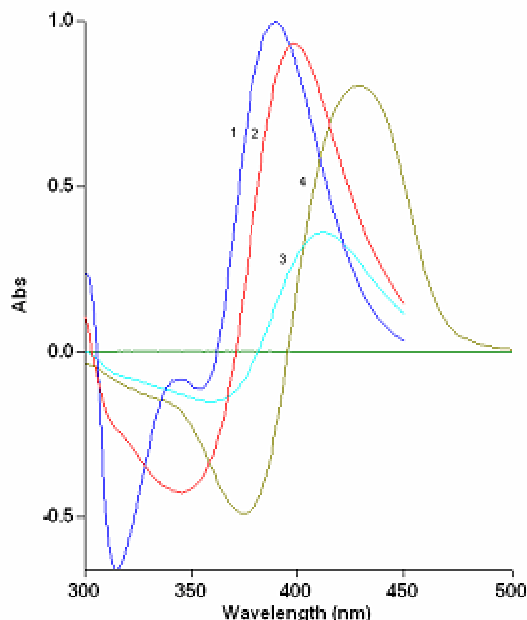


Рис. 2. Диференціальні електронні спектри поглинання стандартних розчинів флавоноїдів з алюміній хлоридом в умовах кількісного визначення: 1 – апігеніну ($\lambda_{\text{макс.}} = 390$ нм); 2 – лютеолін-7-глюкозиду ($\lambda_{\text{макс.}} = 398$ нм); 3 – рутину ($\lambda_{\text{макс.}} = 412$ нм); 4 – кверцетину ($\lambda_{\text{макс.}} = 429$ нм).

користовуючи 70 % спирт етиловий для вилучення флавоноїдів із сировини. Максимуми поглинання комплексу флавоноїдів із алюміній хлоридом для водно-етанольних вилучень усіх зразків сировини (рис. 3) відповідають максимуму поглинання відповідного комплексу стандартного зразка рутину (рис. 2) – $\lambda_{\text{макс.}} = 412 \pm 2$ нм, а тому суму флавоноїдів розраховували у перерахунку на рутин (табл. 2).

Таблиця 1. Результати спектрофотометричних досліджень етанольних вилучень із шишок хмелю на вміст флавоноїдів ($P=0,95$; $n=5$)

Концентрація спирту етилового в розчині, який використовували для отримання витягу, %	Вміст флавоноїдів у перерахунку на рутин, %
20	0,319 ± 0,006
30	0,322 ± 0,006
40	0,325 ± 0,006
50	0,330 ± 0,006
60	0,419 ± 0,008
70	0,519 ± 0,010
80	0,532 ± 0,010
95	0,479 ± 0,009

Для аналізу флавоноїдоносної сировини ДФУ пропонує визначати суму флавоноїдів після проведення гідролізу усіх флавоноїдів-глікозидів до агліконів, екстракції утворених агліконів етилацетатом з наступним їх комплексоутворенням з алюміній хлоридом.

В зв'язку з цим, кількісний вміст флавоноїдів у різних зразках шишок хмелю визначали і після

гідролізу. Відповідні спектри поглинання для різних зразків сировини в умовах кількісного визначення флавоноїдів після попереднього гідролізу представлено на рисунку 4. Усі отримані спектри мають максимум поглинання за довжини хвилі (421 ± 2) нм, а спектр, який відповідає зразку № 3, має додаткове плече при 440 – 450 нм.

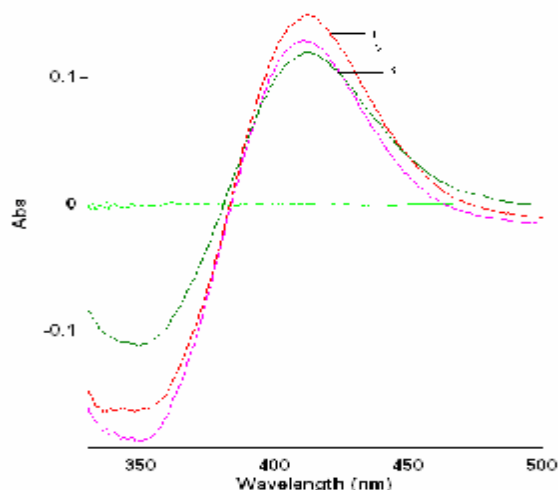


Рис. 3. Диференціальні електронні спектри поглинання комплексів флавоноїдів з алюміній хлоридом для різних зразків шишок хмелю (1 – зразок 1; 2 – зразок 2; 3 – зразок 3).

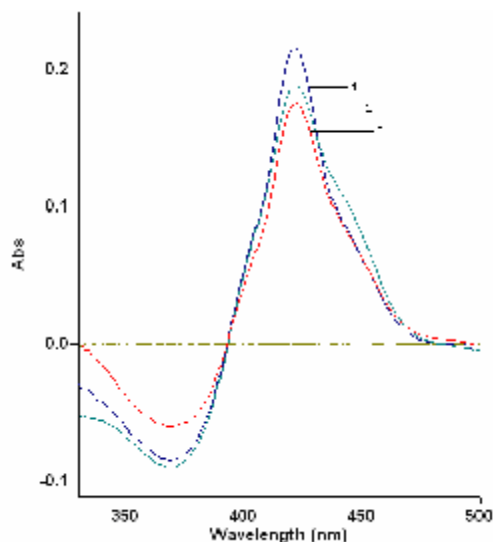


Рис. 4. Диференціальні електронні спектри поглинання комплексів флавоноїдів (після попереднього гідролізу) з алюміній хлоридом для різних зразків шишок хмелю: 1 – зразок 2; 2 – зразок 3; 3 – зразок 1.

При стандартизації флавоноїдоносної сировини за вмістом флавоноїдів, відповідно до вимог ДФУ, кількісний вміст перераховують на гіперозид, застосовуючи у розрахунках питомий показник поглинання комплексу гіперозиду з алюміній хлоридом – 500 та вимірюючи оптичну

густину в максимумі поглинання. Надалі ми проводили визначення вмісту флавоноїдів у різних зразках шишок хмелю після попереднього гідролізу флавоноїдів-глікозидів до агліконів, згідно з вимогами ДФУ. Результати дослідження наведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Результати кількісного визначення вмісту флавоноїдів у різних зразках шишок хмелю (P=0,95; n=5)

Зразок сировини	Вміст суми флавоноїдів, %	
	без гідролізу, у перерахунку на рутин	після попереднього гідролізу у перерахунку на гіперозид
Промислова серія ПП “Едель” (зразок 1)	$0,400 \pm 0,008$	$0,356 \pm 0,004$
Промислова серія ЗАТ “Ліктрави” (зразок 2)	$0,456 \pm 0,007$	$0,375 \pm 0,006$
Промислова серія ВАТ “Галичфарм” (зразок 3)	$0,667 \pm 0,013$	$0,439 \pm 0,005$

На підставі результатів проведених досліджень можна зробити висновок, що кількісний вміст флавоноїдів у різних зразках шишок хмелю відрізняється. Для з'ясування/встановлення кількісного критерію якості за показником «сума флавоноїдів» необхідно дослідити більшу

кількість зразків сировини з різних місць зростання. Проте, як свідчать наведені у таблиці 2 результати, вміст флавоноїдів, визначений за методикою з гідролізом, є порівнюваним для різних зразків сировини, а також «не менше 0,3 %» можна встановити кількісним критерієм

якості.

Висновки. 1. Ідентифіковано рутин, кверцетин та хлорогенову кислоту методом ТШХ в шишках хмелю, їх запропоновано використовувати як ідентифікаційні маркери даної сировини.

2. Кількісний вміст суми флавоноїдів у шишках хмелю потрібно перераховувати на рутин (за методикою до гідролізу) або на гіперозид (за методикою після гідролізу).

3. Оптимальним екстрагентом флавоноїдів із даної сировини визначено 70-80 % спирт етиловий, що дозволяє використовувати його для пробопідготовки у спектрофотометричній методиці кількісного визначення суми флавоноїдів.

4. Кількісним критерієм якості сировини можна закласти вміст флавоноїдів “не менше 0,3 % у перерахунку на гіперозид” і пропонувати для кількісного визначення методика з попереднім гідролізом.

Література

1. Григорчук О. Хміль у народній та науковій медицині / О. Григорчук, О. Тихонов // Фармацевтичний журнал. – 2002. – № 5. – С. 90-93.
2. Зузук Б. Хмель вьющийся (син. хмель обыкновенный). *Humulus lupulus L.* / Б. Зузук, Р. Куцик // Провизор. – 2004. – № 13. – С. 45-53.
3. Зузук Б. Хмель вьющийся (син. хмель обыкновенный). *Humulus lupulus L.* / Б. Зузук, Р. Куцик // Провизор. – 2004. – № 14. – С. 28-34.
4. Зузук Б. Хмель вьющийся (син. хмель обыкновенный). *Humulus lupulus L.* / Б. Зузук, Р. Куцик // Провизор. – 2004. – № 15. – С. 28-33.
5. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2007 – 3292 p.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство

“Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 1-ше вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2009. – 280 с.

7. Ляшенко М. Корисні речовини хмелю / М. Ляшенко, Н. Кравчук // Харчова і переробна промисловість. – 2003. – № 8-9. – С. 23-25.

8. Исследование состава шишек хмеля / О. А. Горошко, В. П. Пахомов, И. А. Самылина [и др.] // Фармация. – 2000. – № 4. – С. 48-50.

9. Григорчук О. Ю. Ідентифікація та кількісне визначення діючих речовин шишок хмелю / О. Ю. Григорчук, О. І. Тихонов, Л. В. Вронська // Вісник фармації. – 2002. – № 1. – С. 17-20.

ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ШИШЕК ХМЕЛЯ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

М. Б. Чубка

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: приведены результаты идентификации и количественного определения флавоноидов в разных образцах шишек хмеля, предложены качественные и количественные критерии качества этого сырья.

Ключевые слова: шишки хмеля, флавоноиды, идентификация, количественное определение, стандартизация.

APPROACHES TO STANDARDIZATION OF HOPS AND THEIR PREPARATIONS

M. B. Chubka

Teropil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: the results of flavonoids identification and quantitative determination in different samples of hop cones were given, qualitative and quantitative criteria of the quality of the raw material proposed.

Key words: flavonoids, Hop Strobile, qualitative determination, quantitative determination, standardization.