

На правах рукописи

ШАФИКОВА Светлана Феликсовна

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HUMULUS LUPULUS L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

29 АВГ 2013

Самара – 2013



Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Латыпова Гузель Минулловна

Официальные оппоненты:

Авдеева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, доцент, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии;

Фархутдинов Рашид Габдуллаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», профессор кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета;

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) Российской академии сельскохозяйственных наук.

Защита диссертации состоится «04» октября 2013 года в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, проспект Карла Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171).

Автореферат разослан «26» ИЮЛЯ 2013 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время все больше внимания уделяется поиску новых перспективных лекарственных растений и разработке препаратов из растительного сырья. Фитопрепараты, биологически активные добавки к пище, а также продукты питания, обогащенные растительными экстрактами, фитонутриентами, занимают значимую долю в структуре фармакологических и парафармацевтических препаратов. Интерес к этой группе препаратов достаточно высок.

Поиск дешевых и доступных источников лекарственных растений для расширения сырьевой базы РФ является актуальной задачей. В этом аспекте заслуживает внимание изучение производственных отходов сырья хмеля обыкновенного – листьев, имеющих большую вегетативную массу.

Растения рода *Humulus* L. широко распространены во флоре РФ. Соплодия хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) изучены достаточно подробно и широко применяются в официальной и народной медицине в качестве седативного, антимикробного, мочегонного, противовоспалительного средства при лечении гастритов, циститов, уретритов, заболеваниях почек, печени и желчного пузыря (Самылина И.А., Горошко О.А., 2005; Арзамасцев А.П., Алексеева М.А., Эллер К.И., 2006; Киселева Т.Л., 1993, 2010; Зузук Б.М., 2004). Используется сырье хмеля обыкновенного в пищевой и пивоваренной промышленности, в пекарном производстве.

В настоящее время в медицинской практике применяют соплодия культивируемых (независимо от сорта) или дикорастущих растений. В РФ товарное производство хмеля сосредоточено в Чувашской Республике, Республике Марий Эл, Алтайском крае, хмельники также заложены в Республике Башкортостан. Перспективными для изучения являются листья хмеля обыкновенного, которые из-за недостаточной изученности их химического состава и биологической активности используются ограниченно, например, для приготовления салатов, в народной медицине – в качестве седативного средства.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось фармакогностическое изучение листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида для оптимизации переработки сырья хмеля, выявления возможности комплексного использования в медицинской практике и пищевой промышленности.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

– проведение анализа результатов современного состояния исследований по изучению биологических, химических и фармакологических свойств хмеля обыкновенного;

– проведение сравнительного изучения химического состава листьев и соплодий некоторых сортов культивируемого и дикорастущего вида хмеля обыкновенного;

– разработка методики качественного анализа и количественного определения основных групп биологически активных веществ (БАВ) в листьях хмеля обыкновенного;

– проведение морфолого-анатомического изучения сырья листьев хмеля обыкновенного с целью определения диагностических признаков;

– разработка характеристик подлинности и показателей качества сырья «Хмеля обыкновенного листа»;

– разработка технологии густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного (ГЭЛХО), методов стандартизации ГЭЛХО и проведение предварительных биологических исследований;

– разработка проекта НД на листья хмеля обыкновенного.

Научная новизна. Проведено фармакогностическое изучение листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида, обоснована целесообразность комплексного использования сырья. Установлено наличие углеводов, аминокислот, органических кислот, фенольных соединений (дубильных веществ, кумаринов, флавоноидов, фенилпропаноидов, фенолкарбоновых кислот), терпеноидов, производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот).

Впервые проведено сравнительное изучение листьев и соплодий хмеля обыкновенного по содержанию основных групп БАВ.

Методами хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ) в листьях хмеля обыкновенного идентифицировано 17 соединений фенольной природы, из которых 7 флавоноидов (рутин, цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, кемпферол, кверцетин, лютеолин), соединение кумариновой природы (кумарин), 7 производных фенолкарбоновых кислот и фенилпропаноидов (галловая, хлорогеновая, цикориевая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая, коричная) и 2 соединения из группы дубильных веществ (танин, эпигаллокатехингаллат). Впервые в листьях хмеля обыкновенного установлено присутствие 15 веществ фенольной природы: флавоноидов (цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, рутин, лютеолин), кумари-

на, фенолкарбоновых кислот и фенилпропаноидов (галловая, хлорогеновая, цикорияевая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая, коричная), дубильных веществ (танин, эпигаллокатехингаллат). Из листьев хмеля обыкновенного впервые выделены и идентифицированы методами ЯМР¹H-, ЯМР¹³C-спектроскопии вещества β -ситостерол-3-O- β -D-глюкопиранозид, кверцетин, рутин и гиперозид.

Методом ВЭЖХ впервые в изучаемом сырье обнаружены свободные органические кислоты: щавелевая, лимонная, винная, аскорбиновая и янтарная; определено их суммарное содержание; определено наличие полисахаридов, дубильных веществ, производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот). Перегонкой с водяным паром из листьев хмеля обыкновенного выделено эфирное масло, методом хромато-масс-спектрометрии определен его компонентный состав.

Впервые проведено морфолого-анатомическое изучение листьев хмеля обыкновенного. Установлены диагностические признаки для определения подлинности сырья, наибольшее значение имеют многоугольные, изодиаметрические клетки верхнего эпидермиса листа со слабоизвилистыми стенками и извилистенные клетки нижнего эпидермиса. В эпидермисе обеих сторон листа отмечены волоски простые одноклеточные, головчатые и T-образные; многочисленные железки тип «яснотковые», реже булавовидные. Разработаны критерии оценки и числовые показатели, регламентирующие качество сырья «Хмеля обыкновенного листа».

Впервые проведены исследования по стандартизации листьев хмеля обыкновенного, разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин (методом спектрофотометрии по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом) и суммы ацилфлороглюцидов методом неводного титрования. Проведена валидация методики спектрофотометрического определения по показателям линейности, воспроизводимости и повторяемости.

Впервые разработана технология получения густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного (ГЭЛХО), изучена токсичность ГЭЛХО и установлена антиоксидантная активность.

Практическая значимость. Полученные результаты позволят расширить спектр представлений о морфолого-анатомических признаках, химическом составе, биологической активности листьев хмеля обыкновенного. Результаты предварительных биологических исследований являются экспериментальным обоснованием для дальнейшего углубленного изучения листьев хмеля обыкновенного с це-

люю внедрения в медицинскую практику и пищевую промышленность, что позволяет оптимизировать процесс комплексной переработки сырья хмеля.

Предложены методы стандартизации сырья по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы ацилфлороглюцидов. На основании морфолого-анатомического исследования выявлены макро- и микродиагностические признаки для определения подлинности сырья, установлены показатели качества сырья. Материалы аналитических и морфолого-анатомических исследований включены в проект ФС «Хмеля обыкновенного листа».

На основании проведенных исследований **разработаны и внедрены:**

– морфолого-анатомический анализ листьев хмеля обыкновенного (Акт внедрения в работу кафедры фармации ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» от 14 мая 2013 г.);

– методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного (Акт внедрения в работу ОКК ООО «Травы Башкирии» от 25 мая 2013 г.);

– методика количественного определения суммы ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного (Акт внедрения в работу ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» от 6 июня 2013 г.);

– материалы диссертационного исследования в работу кафедры фармакогнозии и ботаники (Акт внедрения ГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России от 25 марта 2013 г.);

– результаты диссертационного исследования в работу кафедр фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, фармацевтической технологии, химии фармацевтического факультета, управления и экономики фармации (Акт внедрения ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России от 3 июня 2013 г.);

– материалы диссертационного исследования в работу кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии (Акт внедрения ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России от 5 июня 2013 г.);

– проект ФС «Хмеля обыкновенного листа» включен в план развития предприятия ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г. Чебоксары;

– патент РФ на изобретение № 2372931 от 20.11.2009 «Антиоксидантное средство растительного происхождения».

Положения, выдвигаемые на защиту:

- результаты сравнительного изучения фитохимического состава листьев и соплодий хмеля обыкновенного;
- результаты разработки методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы ацилфлороглюцидов;
- результаты морфолого-анатомических исследований листьев хмеля обыкновенного с установлением диагностических признаков сырья;
- результаты исследований и обоснование показателей качества с целью стандартизации сырья «Хмеля обыкновенного листа»;
- результаты предварительных биологических исследований ГЭЛХО и обоснование возможности комплексной переработки сырья.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены и доложены на итоговых научных конференциях молодых ученых и студентов, итоговых научных сессиях БГМУ и отделениях медико-биологических наук Уфимского филиала ИЦ РАН «Химия и медицина» (Уфа, 2006; 2008); на 3-й международной научной конференции «Актуальные проблемы регионоведения» (Курск, 2008); на научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии (Пермь, 2011); на научно-практической конференции молодых ученых-медиков, организованной Воронежским, Курским, Казанским медицинскими университетами (Казань, 2012); на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики» (Владикавказ, 2013).

Личный вклад автора. Автор принимал участие в выборе направления исследования, постановке цели и задач. Диссертантом проведен информационно-аналитический поиск результатов современных исследований по изучению объектов; выполнены фитохимические, микродиагностические и биологические исследования. Под руководством научного руководителя осуществлен анализ полученных экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, сделаны выводы. Доля автора в сборе, анализе и обобщении информации является определяющей. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено научное обоснование и обобщение полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует форме специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты диссертационной работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 3 и 6 паспорта фармакогнозии.

Связь задач исследования с планами научной работы. Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств» (государственная регистрация № 01200707996).

Публикации. Основные результаты исследования отражены в 15 научных работах, из них 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК, и одном патенте на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, характеризующей объекты и методы исследования, экспериментальной части (трех глав), общих выводов, списка литературы и приложений. В тексте содержится 38 таблиц, 46 рисунков. Список цитируемой литературы включает 155 источников, из них 32 – на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, определены цель и задачи исследования, показана научная и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе (обзоре литературы) приведены сведения, отражающие современное состояние изучения хмеля обыкновенного, его применение в научной и народной медицине. Обоснована актуальность выбора объектов и направлений проведения настоящего исследования.

Во второй главе приведены объекты и методы исследований.

Материалы третьей главы отражают результаты изучения качественного и количественного состава различных групп БАВ листьев и соплодий хмеля обыкновенного.

В четвертой главе представлены материалы по исследованию морфологических и микродиагностических признаков, товароведческих показателей листьев хмеля обыкновенного, разработке проектов НД на лекарственное растительное сырье «Хмеля обыкновенного листья».

В пятой главе приведены экспериментальные данные по разработке технологии ГЭЛХО, методов стандартизации, результаты изучения его биологической активности.

В приложении приводятся материалы, подтверждающие практическую значимость проведенных исследований (акты внедрения, патент РФ, проект ФС).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектами исследований явились образцы листьев и соплодий хмеля обыкновенного различных сортов, культивируемых на территории Чувашской Республики («Ранний», «Крылатский» и «Подвязный»), предоставленные ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г. Чебоксары; дикорастущего хмеля, собранного в различных районах Республики Башкортостан в 2006–2012 годах.

1. Сравнительное изучение качественного и количественного состава биологически активных веществ листьев и соплодий хмеля обыкновенного. Предварительное фитохимическое изучение листьев хмеля обыкновенного показало наличие углеводов, аминокислот, органических кислот, фенольных соединений (дубильных веществ, флавоноидов, кумаринов, фенилпропаноидов и фенолкарбоновых кислот), эфирных масел, производных ацилфлороглюцидов.

Установлено содержание в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного следующих групп БАВ: полисахаридов – 2,54 и 2,65%; свободных органических кислот – 2,45 и 2,60%; дубильных веществ – 2,69 и 2,60%; эфирного масла – 0,35 и 1,14% соответственно.

Исследован аминокислотный состав листьев хмеля обыкновенного. Установлено присутствие 14 аминокислот, преобладающими являются: валин, пролин, глицин, аргинин, лизин, фенилаланин. Суммарное содержание свободных аминокислот составляет в листьях хмеля 15,08 мг/100 мг, в соплодиях – 16,81 мг/100 мг.

Хроматографически в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного методами ТСХ (на пластинках «Sorbfil» марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия) и «Silufol» марки UV-254 и UV-366 (Чехия) и ВЭЖХ (хроматограф фирмы «Gilston», Франция, с последующей обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром для «Windows») обнаружены и идентифицированы с использованием стандартов фирм «Fluka», «Sigma», «ISN» (США) органические кислоты: щавелевая, лимонная, винная, аскорбиновая и янтарная.

С использованием различных методов анализа (ТСХ, ВЭЖХ, ЯМР¹H-, ЯМР¹³C-спектроскопии) установлен качественный состав фенольных соединений. В листьях хмеля обыкновенного идентифицировано 17 фенольных соединений, в соплодиях хмеля – 19 фенольных соединений. Общими являются флавоноиды (рутин, цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, кверцетин, кемпферол, лютеолин), кумарин, производные фенолкарбоновых кислот и фенилпропаноидов (галловая, хлорогеновая, цикориевая, кофейная, неохлорогено-

новая, феруловая, коричная) и дубильные вещества (танин, эпигаллокатехин-галлат), но соплодия хмеля содержат дополнительно 2 фенольных соединения: кумарин умбеллиферон, дубильное вещество – эпикатехин (табл. 1).

Таблица 1

Фенольные соединения листьев и соплодий хмеля обыкновенного, идентифицированные методом ВЭЖХ

Группа БАВ	Листья хмеля обыкновенного	Соплодия хмеля обыкновенного
Флавоноиды	Рутин Цинарозид Гиперозид Лютеолин-7-гликозид Кверцетин Кемпферол Лютеолин	Рутин Цинарозид Гиперозид Лютеолин-7-гликозид Кверцетин Кемпферол Лютеолин
Дубильные вещества	Танин ЭГКГалат	Танин ЭГКГалат Эпикатехин
Кумарины	Кумарин	Умбеллиферон Кумарин
Фенолокислоты	Галловая кислота	Галловая кислота
Фенилпропаноиды	Коричная кислота Кофейная кислота Феруловая кислота Хлорогеновая кислота Цикориевая кислота Неохлорогеновая кислота	Коричная кислота Кофейная кислота Феруловая кислота Хлорогеновая кислота Цикориевая кислота Неохлорогеновая кислота

Впервые проведено препаративное разделение экстрактивных веществ из листьев хмеля обыкновенного методом адсорбционной колоночной хроматографии. Для элюирования использовали смеси растворителей, а именно хлороформ-спирт этиловый в различных соотношениях. В качестве сорбентов был использован силикагель L 40/100 мкм (Wolem). Для контроля отсутствия примесей в полученных соединениях использовали метод ТСХ.

В результате были выделены 4 индивидуальных вещества. Методами УФ-, ЯМР¹H-, ЯМР¹³C –спектроскопии (ЯМР-спектрометр высокого разрешения «Bruker Avance III 500 MHz») были идентифицированы вещества β-ситостерол-3-О-β-D-глюкопиранозид, кверцетин, рутин и гиперозид.

Наличие производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот) в сырье хмеля обыкновенного проводили методом кондуктометрии и качественной реакцией (с использованием 1% раствора ацетата свинца). В листьях хмеля обыкновенного впервые определено наличие производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот). Методом титрования определено содержание суммы ацилфлороглюцидов, составляющее в листьях хмеля 12,80%, в соплодиях – 17,60%. Определение α -кислот, наиболее значимых из всех производных ацилфлороглюцидов в пищевой и пивоваренной промышленности, проводили методом кондуктометрии.

Содержание α -кислот в изучаемых образцах соплодий хмеля обыкновенного составило 7,80%; в листьях хмеля обыкновенного содержание α -кислот методом кондуктометрии не обнаружено.

Методом перегонки с водяным паром получено эфирное масло, определено его количественное содержание, которое составляет в листьях хмеля – 0,35%, а в соплодиях – 1,14%. Впервые в листьях хмеля обыкновенного методом хромато-масс-спектрометрии (газовый хроматограф «Hewlett-Packard 5890», масс-селективный детектор MSD HP-5973 A), основанном на сравнении времени удерживания и масс-спектров с соответствующими данными библиотеки масс-спектрометрических данных каталогов «HP Chem Station», содержащей библиотеку масс-спектров на 250 тысяч соединений. Идентифицированы характерные для соплодий хмеля компоненты эфирных масел α -кубебен, кариофиллен, α -кариофиллен и α -гумулен (табл. 2), (рис. 1, 2).

Таким образом, исследуемые образцы листьев хмеля обыкновенного уступают соплодиям по количественному содержанию эфирных масел, а по качественному составу практически не отличаются от соплодий. Отличаются листья хмеля обыкновенного от соплодий по содержанию производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот). Ввиду отсутствия α -кислот, имеющих значение для пищевой и пивоваренной промышленности, листья хмеля обыкновенного не могут быть рекомендованы в качестве их источника.

По качественному и количественному содержанию аминокислот, органических кислот, полисахаридов и полифенольных соединений листья хмеля не уступают соплодиям хмеля обыкновенного, что говорит о возможности использования первых в качестве перспективного источника получения БАВ.

Сравнительный анализ компонентного состава эфиромасличного
комплекса листьев и соплодий хмеля обыкновенного

Название соединения	Время удерживания, мин.	
	листья	соплодия
2-Ундеканон	—	5,36
Копаен	—	5,93
α -кубобен	5,93	5,93
Кариофиллен	6,21	6,20
α -кариофиллен	6,39	6,38
α -гумулен	6,39	6,39
Нафтален, 1,2,3,4,4а,5,6,8а-октагидро-7-метил-4-метилен-1-(1-метилэтил)	6,46	6,45
Нафтален, декагидро-4а-метил-1-метилен-7(1-метилэтилиден)	6,60	6,55
2(4Н)Бензофуранон,5,6,7,7а-тетрагидро-4,4,7а-триметил	6,82	—
Кариофиллена оксид	7,06	—

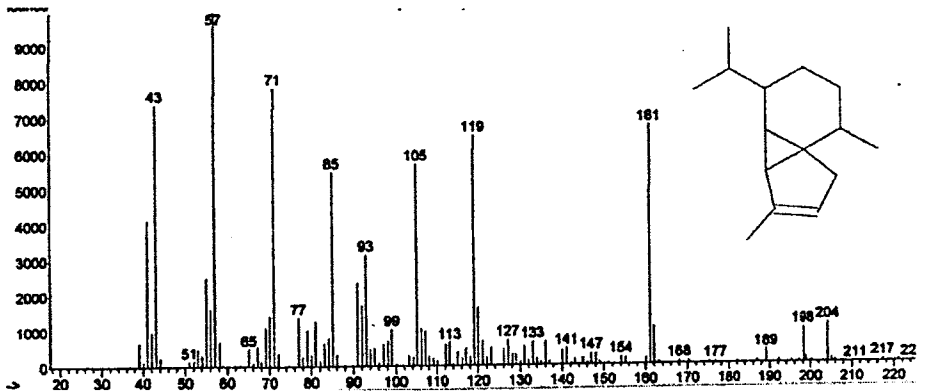


Рис. 1. Масс-спектр и структура α -кубобена

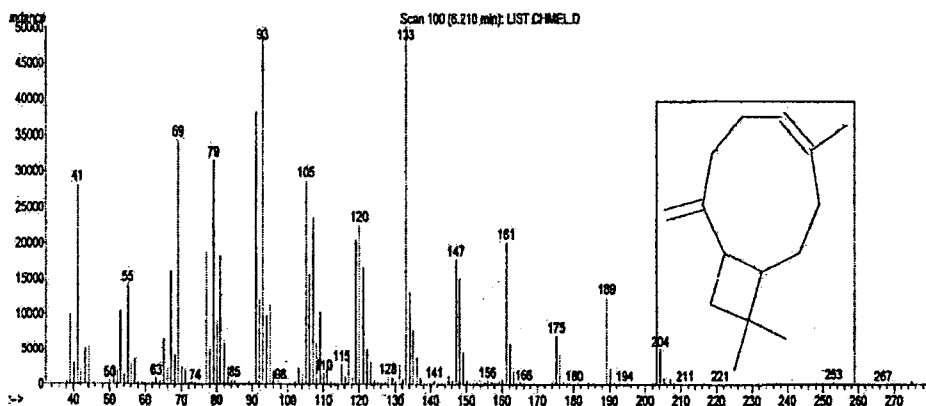


Рис. 2. Масс-спектр и структура карофиллена

2. Исследования подлинности и показателей качества листьев хмеля обыкновенного. Перспектива комплексной переработки сырья хмеля обыкновенного делает необходимым разработку показателей качества и характеристики подлинности листьев хмеля обыкновенного.

2.1. Морфолого-анатомические исследования листьев хмеля. В результате морфологического исследования были выявлены диагностически значимые признаки листьев хмеля обыкновенного. Сырье представляет собой смесь отдельных и измельченных листьев с черешками и кусочками стеблей. Стебель округлой формы, с крючкообразными шипами. В местах прикрепления листьев имеются узлы. Стебли у основания имеют заполненную сердцевину, выше – полые. Листья пальчатораздельной или сердцевидной формы, неравнопильчато-зазубренные по краю, жилкование листьев сетчатое. На нижней стороне листьев видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пластинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками. Черешок округлой формы, заполненный внутри, с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. Окраска сырья светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового цвета с промежуточными оттенками. Запах специфический хмелевой. Вкус водного извлечения может быть кислым, слегка горьковатым или горьким, вяжущим.

Проведенные анатомические исследования позволили выявить общие микродиагностические признаки листьев хмеля обыкновенного.

Клетки верхнего эпидермиса листа многоугольные, изодиаметрические, реже со слабоизвилистыми стенками, иногда вытянутые, длиной 37–60 мкм, шириной 23–52 мкм. Клетки нижнего эпидермиса многоугольные, со слабоизвилистыми стенками, длиной 42–90 мкм, шириной 22–52 мкм. Кутикула с обеих сторон тонкая, местами продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая.

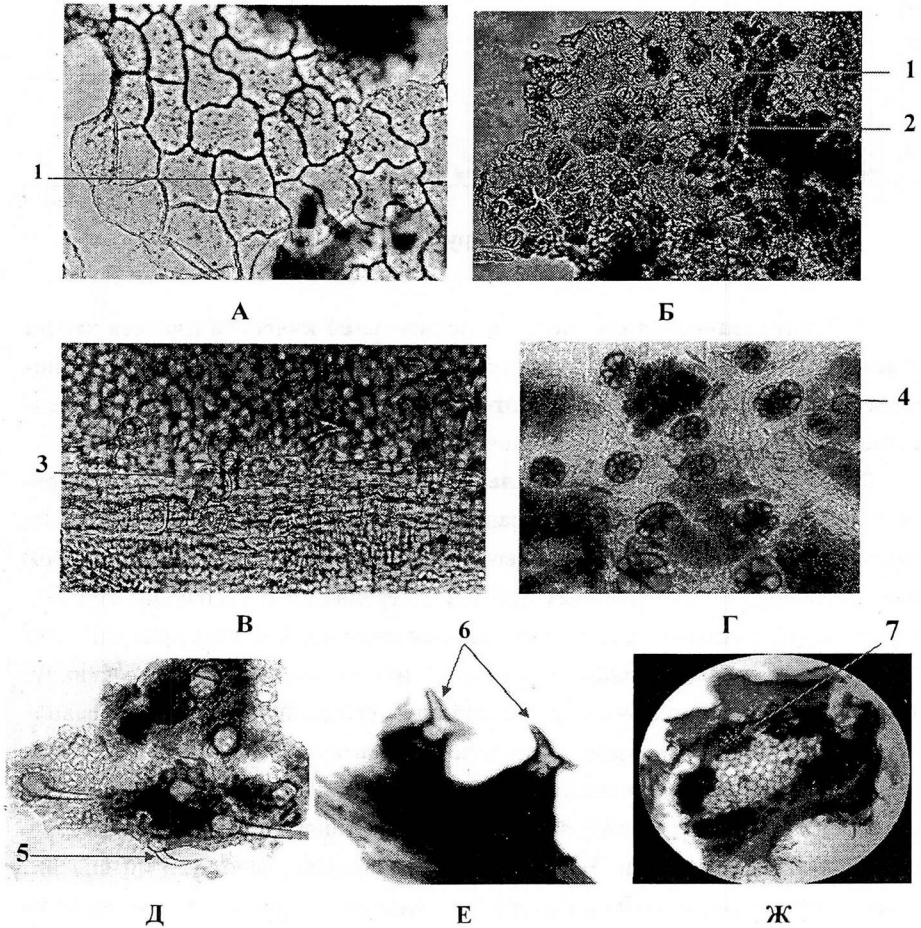


Рис. 3. Фрагменты листа хмеля обыкновенного (увел. x 400)

А, Г – верхний эпидермис листа; Б, В, Д – нижний эпидермис листа; Е – фрагмент эпидермиса черешка листа; Ж – поперечный срез черешка листа. Обозначения: 1 – клетки эпидермиса, 2 – устьице, 3 – головчатый волосок, 4 – железки, 5 – простой волосок, 6 – Т-образный волосок, 7 – проводящие пучки.

На обеих сторонах листа расположены устьица овальной или округлой формы аномоцитного типа, отмечены волоски простые одноклеточные, головчатые, шиповидные, реже многоклеточные. В эпидермисе листа хмеля отмечено наличие железок тип «яснотковые». Также имеются булавовидные железки.

При изучении черешка листа хмеля нами выявлено наличие однослойного эпидермиса, клетки которого прозенхимной формы. В эпидермисе черешка хмеля обыкновенного отмечены простые одноклеточные волоски, Т-образные многоклеточные волоски, булавовидные железки. В поперечном срезе черешок округлой формы, заполненный внутри, с желобком с лицевой стороны листа, с 5 пучками коллатерального типа, расположенных полукругом (рис. 3).

2.2. Разработка методики качественного обнаружения флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного. Для определения качественного анализа сырья листьев хмеля обыкновенного нами был предложен метод хроматографии в тонком слое сорбента, на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) в системе растворителей: этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода (5:1:1) и детектированием пластинки в УФ-свете. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее трех зон адсорбции, одна из которых на уровне зоны РСО рутина с $R_f = 0,33$, вторая с R_s около 0,68, третья с R_s около 0,56.

2.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного. Для объективной оценки качества сырья листьев хмеля обыкновенного разработаны методики количественного определения доминирующих групп БАВ. Для количественного определения суммы флавоноидов нами применен спектрофотометрический метод, основанный на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в среде 70% спирта этилового с добавлением кислоты уксусной. Определены оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов из листьев хмеля обыкновенного: степень измельчения сырья – 1–3 мм, экстрагент – 70% спирт этиловый, нагревание на кипящей водяной бане – 45 мин., соотношение сырье:экстрагент – 1:10. Подобраны концентрация (8%) и объем алюминия хлорида (10 мл). Устойчивое окрашивание извлечений с хлоридом алюминия наступает через 30 мин. и сохраняется в течение 1,5 часов, максимум светопоглощения – 410 ± 2 нм. Расчет содержания суммы флавоноидов проводили в пересчете на рутин (рис. 4, табл. 3).

Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 1,40%. Содержание суммы флавоноидов в листьях хмеля колеблется от 1,64 до 3,23%.

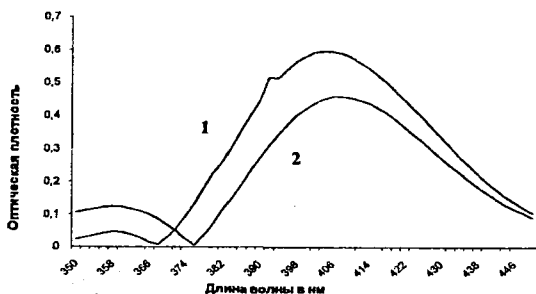


Рис. 4. Дифференциальные спектры поглощения комплексов спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного и раствора рутина с 8% раствором алюминия хлорида в кислой среде
1 – спиртовое извлечение листьев хмеля обыкновенного, 2 – рутин.

Таблица 3

Метрологическая характеристика метода количественного определения суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) в листьях хмеля обыкновенного

Образцы сырья	Метрологические характеристики							
	n	x ср.	S ²	S	P, %	t (P,f)	Δx	Е отн., %
Сорт «Ранний»	5	3,05	0,0009342	0,03056	95	2,78	0,038	1,25
Сорт «Крылатский»	5	2,36	0,0005823	0,02413	95	2,78	0,030	1,27
Сорт «Подвязный»	5	2,66	0,0008857	0,02976	95	2,78	0,037	1,40
Собранное в Уфимском районе РБ	5	3,23	0,001035	0,03217	95	2,78	0,040	1,24
Собранное в Давлекановском районе РБ	5	2,97	0,0008385	0,02896	95	2,78	0,036	1,21

Установлена норма содержания суммы флавоноидов для листьев хмеля не менее 1,5%. Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили по показателям правильности, прецизионности, специфичности, линейности. Установлено, что разработанная методика воспроизводима, доступна, не требует дорогостоящих реактивов.

2.4. Количественное определение суммы производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот). Для количественного определения суммы производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот) использовали метод неводного титрования со спиртовым раствором калия едкого 0,01М. Согласно полученным экспериментальным данным содержание производных ацилфлороглюцидов в разных образцах сырья колеблется от 11,8 до 12,8%. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 2,48% (табл. 4).

Таблица 4

Метрологическая характеристика метода количественного определения суммы ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного

Образцы сырья	n	x ср.	S ²	S	P, %	t (P,f)	Δx	Е отн., %
Сорт «Ранний»	5	11,8	0,04751	0,2179	95	2,78	0,271	2,30
Сорт «Крылатский»	5	12,3	0,04928	0,2219	95	2,78	0,276	2,24
Сорт «Подвязный»	5	12,8	0,06501	0,2549	95	2,78	0,317	2,48
Собранное в Уфимском районе РБ	5	12,4	0,04612	0,2148	95	2,78	0,267	2,15
Собранное в Давлекановском районе РБ	5	12,6	0,05862	0,2421	95	2,78	0,301	2,39

Установлена норма содержания производных ацилфлороглюцидов для листьев хмеля обыкновенного – не менее 10%.

Для установления доброкачественности сырья «Хмеля обыкновенного листья» определены числовые показатели: содержание золы общей не более 12,0%; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не более 3,5%; влажность – не более 13%. Эти числовые показатели включены в проект ФС «Хмеля обыкновенного листья».

3. Разработка технологии густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного. В результате проведенных исследований удалось установить, что наиболее рациональным типом экстракта, обеспечивающим максимальный выход полифенольных соединений и суммы ацилфлороглюцидов, является ГЭЛХО. Изучены и определены оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов: экстрагент – 70% спирт этиловый, степень измельчения сырья – 1–3 мм, соотношение сырье:экстрагент – 1:10, а также технологические характеристики сырья листьев хмеля обыкновенного: насыпная масса, угол естественного откоса, коэффициент поглощения, степень набухания в воде и в 70% спирте этиловом.

Выбор оптимальных параметров экстрагирования сырья контролировали по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы производных ацилфлороглюцидов. В результате сравнительных исследований (методами бисмацерации, перколяции и реперколяции) в качестве оптимального метода экстрагирования была выбрана перколяция. С учетом подобранных оптимальных условий и изучения выхода БАВ на различных стадиях технологического процесса, разработан способ получения ГЭЛХО в лабораторных условиях. Этот способ включает в себя следующие основные стадии: измельчение сухого сырья листьев хмеля обыкновенного; получение спиртового извлечения; очистка спиртового извлечения; сгущение спиртового извлечения.

Полученный экстракт представляет собой густую вязкую массу темно-зеленого цвета с приятным специфическим запахом, горьковатого вкуса, умеренно растворим в воде, спирте этиловом, не растворим в эфире, хлороформе, бутаноле, этилацетате.

Методами ТСХ, ВЭЖХ установлен компонентный состав фенольных соединений ГЭЛХО; определено наличие 17 соединений: флавоноиды (рутин, цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, кверцетин, кемпферол, лютеолин), кумарин, фенолкарбоновые кислоты и фенилпропаноиды (галловая, хлорогеновая, цикориевая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая, коричная), дубильные вещества (танин, эпигаллокатехингаллат).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах ГЭЛХО составляет от 3,3 до 6,5%. Содержание производных ацилфлороглюцидов в разных образцах ГЭЛХО колеблется от 15,3 до 17,9%.

Таким образом, нами были подобраны оптимальные условия экстрагирования для сырья листьев хмеля обыкновенного и получения ГЭЛХО.

Экспериментальные исследования по изучению биологической активности ГЭЛХО выполнялись на белых мышах. Изучение острой токсичности ГЭЛХО в дозе до 3000 мг/кг (максимальная доза) показало низкую токсичность экстракта, что позволило отнести его к классу практически нетоксичных соединений.

Изучение антиоксидантной активности методом хемилюминесценции с помощью хемилюминометра «ХЛМ-003» позволило установить, что при добавлении в модельные системы (генерирующая активные формы кислорода и с желточными липопротеидами) раствора ГЭЛХО происходит дозозависимое угнетение основных параметров хемилюминесценции – светосуммы свечения и амплитуды свечения. В обеих модельных системах было установлено прямое антиоксидантное действие раствора ГЭЛХО, что дает основание рекомендовать его в качестве эффективного антиоксидантного средства для профилактики и лечения патологических состояний, сопровождающихся активацией свободнорадикальных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнительное изучение качественного и количественного состава основных групп БАВ в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида. Методами ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии, хромато-масс-спектрометрии, ЯМР¹H-, ЯМР¹³C-спектроскопии исследован качественный состав листьев хмеля обыкновенного. Установлено наличие углеводов, аминокислот, органических кислот, фенольных соединений (дубильных веществ, флавоноидов, кумаринов, фенилпропаноидов и фенолкарбоновых кислот), эфирных масел, производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот). Впервые в листьях хмеля обыкновенного идентифицированы органические кислоты – щавелевая, лимонная, винная, аскорбиновая и янтарная; определено их количественное содержание.

2. Методами ТСХ, ВЭЖХ, ЯМР¹H-, ЯМР¹³C-спектроскопии в листьях хмеля обыкновенного идентифицировано 17 соединений фенольной природы. Впервые для листьев хмеля обыкновенного установлено присутствие 15 веществ фенольной природы: флавоноидов (цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, рутин, лютеолин), кумарина, фенолкарбоновых кислот и фенилпропаноидов (галловая, хлорогеновая, цикориевая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая, коричная), дубильных веществ (танин, эпигаллокатехингаллат). Впервые из листьев хмеля обыкновенного были выделены вещества β -ситостерол-3-O- β -D-глюкопиранозид, кверцетин, рутин и гиперозид.

3. Выделено эфирное масло и изучен его качественный состав методом хромато-масс-спектрометрии. Впервые в листьях хмеля обыкновенного идентифицированы характерные для соплодий хмеля компоненты эфирных масел α -кубобен, кариофиллен, α -кариофиллен и α -гумулен.

4. Проведено морфолого-анатомическое изучение и выявлены диагностические признаки, позволяющие провести дифференциальную диагностику сырья «Хмеля обыкновенного листья»: стебель округлой формы с крючкообразными шипами, у основания заполненный, выше – полый; черешок округлой формы, заполненный внутри, с желобком с лицевой стороны листа, с 5 пучками коллатерального типа, расположенными полукругом; клетки верхнего эпидермиса листа многоугольные, изодиаметрической формы, реже со слабоизвилистыми стенками, клетки нижнего эпидермиса более извилистостенны. В эпидермисе обеих сторон листа обнаруживаются волоски простые одноклеточные, головчатые и Т-образные; характерны многочисленные железки тип «яснотковые», реже булавовидные.

5. Впервые для сырья «Хмеля обыкновенного листья» разработаны методики качественного анализа флавоноидов методом ТСХ и спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин; оптимизирована методика определения суммы ацилфлороглюцидов (горьких кислот) методом титрования. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в изучаемых образцах составило от 1,64 до 3,23%, суммы ацилфлороглюцидов от 11,8 до 12,8%. Установлены нормы содержания суммы флавоноидов не менее 1,5%, суммы ацилфлороглюцидов – не менее 10%.

6. Установлены числовые показатели доброкачественности сырья: содержание общей золы не более 12,0%; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, не более 3,5%; влажность не более 13%.

7. Разработана технология получения и методы стандартизации густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного с содержанием суммы флавоноидов в пересчете на рутин 3,3–6,5%, производных ацилфлороглюцидов 15,3–17,9%.

8. Результаты биологических исследований показали, что густой экстракт из листьев хмеля обыкновенного отнесен к классу практически нетоксичных соединений, методом хемилюминесценции определена его антиоксидантная активность.

9. На основании экспериментальных данных, полученных в ходе морфолого-анатомических, химических и аналитических исследований, разработан проект ФС «Хмеля обыкновенного листья».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Латыпова, Г.М. Сравнительный анализ качественного состава полифенольных соединений листьев и соплодий хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, С.Ф. Шафикова, Д.Ф. Галимова // **Традиционная медицина**. – 2011. – № 5 (28). – С. 243–248.

2. Латыпова, Г.М. Исследования по содержанию горьких кислот сырья хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, Г.В. Аюпова, В.Н. Бубенчикова, Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова, С.Ф. Шафикова // **Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация**. – 2012. – № 10 (129). Выпуск 18/2. – С. 65–69.

3. Латыпова, Г.М. Исследование факторов, влияющих на процесс экстракции надземной части хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, Г.В. Аюпова, С.Ф. Шафикова, Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова, Г.Р. Иксанова // **Традиционная медицина**. – 2012. – № 5 (28). – С. 148–154.

4. Латыпова, Г.М. Определение содержания альфа-кислот в сырье хмеля обыкновенного методом кондуктометрии / Г.М. Латыпова, Г.В. Аюпова, В.А. Катаев, В.К. Гумерова, С.Ф. Шафикова, Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2013. – № 1. – С. 4–8.

5. Шафикова, С.Ф. Исследования содержания органических кислот в сырье хмеля обыкновенного / С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 86–88.

6. Латыпова, Г.М. Исследование эфирного масла сырья хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, С.Ф. Шафикова, Р.Я. Давлетшина, В.А. Катаев // **Башкирский химический журнал**. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 89–95.

7. Шафикова, С.Ф. Сравнительное изучение качественного состава флавоноидов в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного методом тонкослойной хроматографии / С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова // **Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики: Материалы Всероссийской научно-практической конференции** / Под ред. канд. фарм. наук, доц. В.А. Морозова; Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова. Владикавказ: Изд-во СОГУ, 2013. – С. 220–225.

8. Шафикова, С.Ф. Получение густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного / С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова, Р.Я. Давлетшина, В.А. Катаев // **Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Сетевое издание** – 2013. – № 2. – С. 75–83.

9. Шафикова, С.Ф. Микроскопическое исследование листьев хмеля обыкновенного / С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова, Р.Я. Давлетшина, В.А. Катаев // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Сетевое издание – 2013. – № 2. – С. 84–89.

10. Шафикова, С.Ф. Сравнительное изучение качественного состава фенол-карбоновых кислот в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного / С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Сетевое издание – 2012. – № 2. – С. 458–463.

11. Утарбаева, Г.Х. Изучение фармакологических свойств экстракта листьев хмеля обыкновенного / Г.Х. Утарбаева, Г.М. Латыпова, Д.Ф. Галимова, С.Ф. Шафикова, Г.Р. Иксанова // Медицинский вестник Башкортостана. Приложение – 2012. – № 6. – С. 258–261.

12. Галимова, Д.Ф., Сравнительное изучение методов экстрагирования сырья хмеля обыкновенного / Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова, С.Ф. Шафикова // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых-медиков, организованной Воронежским, Курским, Казанским медицинскими вузами. – Казань, 2012. – С. 36–37.

13. Галимова, Д.Ф. Определение технологических свойств и числовых показателей сырья хмеля обыкновенного флоры Башкортостана / Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова, С.Ф. Шафикова, Г.М. Латыпова, Г.В. Аюпова, Р.Я. Давлетшина // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии. – Пермь, 2011. – С. 197–200.

14. Латыпова, Г.М. Исследование количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта хмеля обыкновенного листьев / Г.М. Латыпова, С.В. Закиева, З.М. Искандарова, С.Ф. Шафикова // Актуальные проблемы регионоведения: труды 3-й международной научной конференции. – Курск, 2008. – С. 120–123.

15. Пат. 2372931 Российская Федерация, МПК⁵¹ А61К 36/185, А61Р 43/00. Антиоксидантное средство растительного происхождения / Латыпова Г.М., Шафикова С.Ф. [и др.]; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО БГМУ Росздрава. – № 2008125593/15; заявл. 23.06.08; опубл. 20.11.09, Бюл. № 32. – 10 с.

ШАФИКОВА Светлана Феликсовна

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*HUMULUS LUPULUS L.*)**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.
ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»
450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293, тел. (347) 250-81-20, тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 28.06.2013 г.
Формат 60x84/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.
Усл. печ. л. 1,4. Уч. изд. л. 1,03.
Тираж 100. Заказ № 786.