

Рекомендована д.ф.н., професором І.А.Єгоровим

УДК 615.322:633.812.533

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ШИШОК ХМЕЛЮ

О.Ю.Григорчук, О.І.Тихонов, Л.В.Вронська

Національна фармацевтична академія України
Тернопільська державна медична академія ім. І.Горбачевського

Запропонований оптимальний екстрагент флавоноїдів та поліфенолів із шишок хмелю як сировини для фармацевтичних препаратів. Розроблені методики ідентифікації флавоноїдів методом тонкошарової хроматографії. Представлені результати кількісного спектрофотометричного визначення суми флавоноїдів та суми поліфенолів.

В останні роки спостерігається зростання захворювань центральної нервової та серцево-судинної систем. Широкий спектр синтетичних психотропних засобів не виключає застосування препаратів, одержаних з рослинної сировини. Для виробництва психотропних лікарських засобів рослинного походження широко застосовуються: валеріана лікарська, меліса лікарська, хміль звичайний [9]. Віддавна шишки хмелю застосовувались у народній медицині [6], офіційне застосування вони мали в пивоварінні. На сьогодні шишки хмелю використовуються в таких лікарських препаратах, як "Уролесан", "Валокардин", "Валоседан". Контроль діючих речовин у шишках хмелю здійснювався згідно з ДЕСТами і не передбачив нормування активно діючих речовин. Без розробки відповідної нормативно-технічної документації неможливе використання шишок хмелю в науковій медицині України.

Метою нашого дослідження є розробка методу ідентифікації та кількісного визначення активно діючих речовин шишок хмелю як сировини для фармацевтичних препаратів.

Експериментальна частина

Приготування екстракту шишок хмелю. Точну наважку (1 г) сировини, подрібненої і просіяної крізь сито з отворами діаметром 2 мм, поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл, заливали 30 мл екстрагенту (вода і розчини спирту етилового з вмістом останнього 20, 30, 40, 50, 70 і 90%) та нагрівали на киплячому водяному огрівнику протягом 1 год із зворотним холодильником. Вміст колби охолоджували і фільтрували через паперовий фільтр "синя стрічка" під вакуумом, переносили сировину на фільтр та промиваючи колбу і сировину двома порціями екстрагенту по 10 мл. Фільтрат кількісно переносили в мірну колбу місткістю 50 мл, доводячи об'єм фільтрату до мітки екстрагентом. Одержані екстракти застосовували для ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів та поліфенолів.

Для ідентифікації діючих речовин шишок хмелю застосовували метод тонкошарової хроматографії з використанням пластинок фірми "Merck" розміром 10x20 см з шаром силікагелю марки G60 F254 та пластинок Silufol. В якості рухомої фази використовували системи розчинників: бутанол-1-ацетатна кислота-вода (30:5:10), етилацетат-ацетатна кислота-вода (5:1:1) [2], хлороформ-метанол-вода (80:20:3), бензол-ацетатна кислота (5:2). Отримані хроматограми обробляли спиртовим розчином алюмінію хлориду, нагрівали в сушильній шафі протягом 2-3 хв при температурі 100-105°C і переглядали при $\lambda=365$ нм.

Кількісне визначення суми флавоноїдів виконували спектрофотометричним методом [3], вимірюючи поглинання комплексної сполуки флавоноїдів із алюмінію хлоридом в перерахунку на рутин.

Методика кількісного визначення флавоноїдів

У колбу місткістю 25 мл поміщали 5,0 мл екстракту, додавали 5,0 мл 70% спирту етилового, 5,0 мл спирту ізопропілового і 3,0 мл 5% розчину алюмінію хлориду спиртового, нагрівали на киплячому водяному огрівнику до кипіння, охолоджували до кімнатної температури, додавали 0,1 мл кислоти ацетатної льодяної, доводили розчин 70% спиртом етиловим до мітки і перемішували.

Вимірювали оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 407 нм в кюветі з товщиною шару 10,0 мм, використовуючи в якості розчину порівняння розчин, який містить 5 мл препарату, 5 мл 70% спирту етилового, 5 мл спирту ізопропілового та обробленого аналогічно досліджуваному розчину.

Паралельно вимірювали оптичну густину розчину стандартного зразка (СЗ) рутину, приготовленого наступним чином: в мірну колбу місткістю

Таблиця 1

Результати кількісного визначення вмісту компонентів в екстрактах шишок хмелю

Вміст спирту етилового в екстрагенті, %	Вміст флавоноїдів, %	Вміст поліфенолів, %	Екстрактивні речовини, %
0	0,23	2,00	0,40
20	0,35	2,24	0,42
30	0,42	2,43	0,44
40	0,48	2,60	0,45
50	0,55	2,95	0,46
70	0,58	2,50	0,38
96	0,32	1,17	0,19

25 мл поміщали 1,0 мл 0,05% розчину СЗ рутину, додавали 5,0 мл 70% спирту етилового, 5,0 мл спирту ізопропілового, 3,0 мл 5% розчину хлориду алюмінію і нагрівали на киплячому водяному огрівнику до кипіння, охолоджували до кімнатної температури, додавали 0,1 мл кислоти ацетатної льодяної і доводили об'єм розчину 70% спиртом етиловим до мітки та перемішували, використовуючи в якості розчину порівняння розчин, який містить 1,0 мл 0,05% розчину СЗ рутину, 5,0 мл 70% спирту етилового, 5,0 мл спирту ізопропілового, обробленого, як описано вище.

Вміст суми флавоноїдів (X) у сировині в перерахунку на рутин, у відсотках визначали за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W)},$$

де: A_0 і A_1 — оптичні густини розчинів СЗ рутину та досліджуваного;

m_0 і m_1 — маси наважок рутину та шишок хмелю, які брали для приготування розчинів СЗ рутину та екстракту, г;

W — втрата в масі при висушуванні шишок хмелю, %.

Визначення суми поліфенолів у шишках хмелю проводили спектрофотометричним методом із використанням реактиву Фоліна з перерахунком на кислоту кофейну.

Методика кількісного визначення поліфенолів

3,0 мл одержаного екстракту поміщали в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили до мітки водою; 5,0 мл одержаного розчину відбирали в конічну колбу місткістю 50 мл, додавали 1,50 мл реактиву Фоліна і 25,0 мл 20% розчину натрію карбонату та перемішували. Вимірювали оптичну густину отриманого розчину при довжині хвилі 708 нм у кюветі з товщиною поглинаючого шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 3,0 мл 50% розчину спирту етилового, обробленого аналогічно досліджуваному.

Паралельно вимірювали оптичну густину 3,0 мл розчину кислоти кофейної (0,014 г кофейної кис-

лоти розчиняли в 25,0 мл 50% розчину спирту етилового), обробленого аналогічно досліджуваному.

Вміст суми поліфенолів (X) у шишках хмелю, в перерахунку на кислоту кофейну, у відсотках розраховували за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 200 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W)},$$

де: A_0 і A_1 — оптичні густини розчинів кислоти кофейної та досліджуваного;

m_0 і m_1 — маси наважок кислоти кофейної та шишок хмелю, які брали для приготування розчинів кислоти кофейної та екстракту, г;

W — втрата в масі при висушуванні шишок хмелю, %.

Спектрофотометричні дослідження проводили на спектрофотометрі GBC UV/VIS 916 (Австралія).

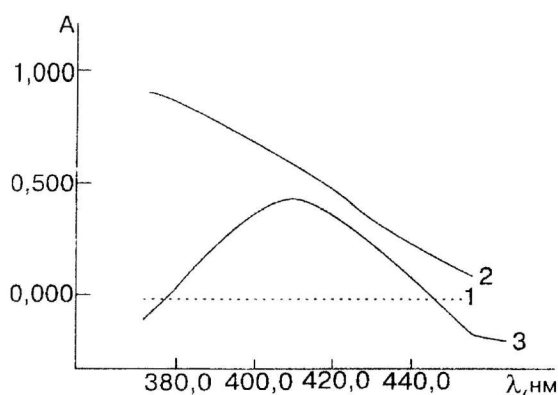
Результати та їх обговорення

Останні наукові дослідження [4, 7, 12] хімічного складу шишок хмелю вказують на наявність цілого комплексу біологічно активних речовин, серед яких значне місце за різноманітністю і кількісним вмістом посідають поліфенольні сполуки, зокрема: флавонолові глікозиди, фенолкарбонові кислоти та їх похідні, антоціанідини, кумарини, вільні кислі феноли та ін.

Виділення із сировини активно діючих речовин пов'язане із вилученням як полярних (типу глікозидів), так і неполярних (типу агліконів) представників флавоноїдів [10, 14], а також широкого спектру поліфенольних сполук. Вибір екстрагенту для отримання екстракту із шишок проводили з врахуванням зазначеного фактора, а також відповідно до вимог наступного фармакологічного застосування шишок [1, 5]. Таким чином, екстракцію досліджували водою та спиртовими розчинами із вмістом спирту етилового 20, 30, 40, 50, 70 і 96%. Результати досліджень вмісту суми флавоноїдів та поліфенолів в екстрактах шишок хмелю представлені в табл. 1. З представлених даних видно, що найбільшу суму флавоноїдів, поліфенолів та екстрактивних речовин дає 50% розчин спирту етилового.

Для кількісного визначення флавоноїдів ми використали реакцію утворення комплексних сполук флавоноїдів з алюмінію хлоридом [15]. Вибрана реакція не є специфічною стосовно певної структури флавону, що дає змогу використовувати її для визначення суми флавоноїдів.

Отримані екстракти шишок хмелю містили, в залежності від складу екстрагенту, більшу чи меншу кількість гідрофільних і гідрофобних речовин. Їх наявність зумовлювала появу сильної опалесценції у вимірюваних розчинах після додавання водно-спиртового розчину алюмінію хлориду та наступного нагрівання проби. У водних екстрактах та екстрактах з малим вмістом етанолу опалесценція



- 1 - розчин порівняння (прийняти за нуль)
- 2 - розчин екстракту шишок хмелю з алюмінію хлоридом (розчин порівняння — спирт)
- 3 - розчин екстракту шишок хмелю з алюмінію хлоридом (розчин порівняння — екстракт шишок хмелю)

Рис. 1. Електронні спектри поглинання.

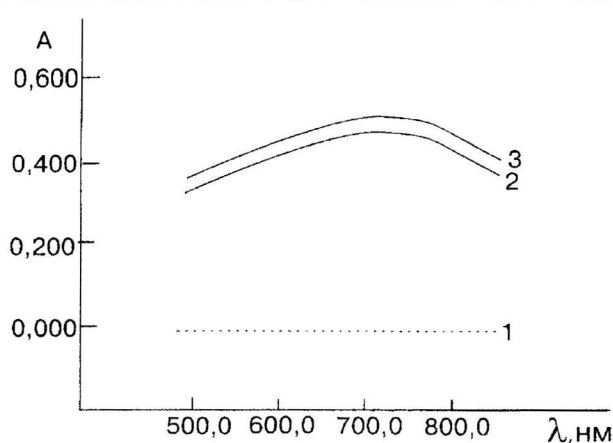
була особливо значною. Опалесценції можна було позбутися лише фільтруванням. Оскільки фільтрування водно-спиртових розчинів на стадії фотометрування не дуже бажане при кількісному визначенні, то ми запропонували додатково вводити невелику кількість ізопропанолу до досліджуваних розчинів. У результаті його додавання до розчину проби вдалося повністю позбутися опалесценції вимірюваних розчинів.

Для врахування особливостей комплексоутворення флавоноїдів з алюмінію хлоридом у присутності ізопропанолу у вимірюваний розчин рутину також додавали ізопропанол. Електронні спектри поглинання стандартного розчину рутину та досліджуваного розчину шишок хмелю в присутності ізопропанолу наведені на рис. 1.

Результати кількісного визначення вмісту компонентів в екстрактах шишок хмелю представлені в табл. 1. Показано, що розчини із вмістом 40-70% спирту етилового вилучають найбільшу кількість флавоноїдів: 0,48-0,58%.

Кількісне визначення суми фенольних сполук в отриманих екстрактах проводили методом Фоліна. Встановлено, що при додаванні до розчину проби реактиву Фоліна в присутності розчину натрію карбонату утворюється комплексна сполука, яка характеризується максимумом поглинання при 711 ± 2 нм (відносно води). При використанні в якості розчину порівняння реактиву Фоліна у присутності натрію карбонату, в спектрі комплексної сполуки з'являється більш чіткий максимум при довжині хвилі 708 ± 2 нм.

Згідно з повідомленнями [8, 13] шишки хмелю містять ряд фенолкарбонових кислот, зокрема кислоту кофейну. Дослідження електронних спектрів поглинання водно-спиртового розчину кислоти кофейної з реактивом Фоліна у присутності натрію карбонату дали можливість вибрати її в



- 1 - розчин порівняння (прийняти за нуль)
- 2 - розчин екстракту шишок хмелю з реактивом Фоліна
- 3 - розчин кислоти кофейної з реактивом Фоліна

Рис. 2. Електронні спектри поглинання.

ролі стандарту для перерахунку вмісту поліфенолів. Електронні спектри поглинання досліджуваних розчинів екстрактів та розчину кислоти кофейної в умовах визначення поліфенолів, наведені на рис. 2, вказують на подібність характеру спектрів і співпадання максимумів поглинання.

Результати визначення вмісту поліфенолів, наведені в табл. 1, вказують, що найбільша їх кількість екстрагується 40-70% розчином спирту етилового — 2,50-2,95%.

У відповідності з вимогами до фармакопейних статей на рослинну сировину кількісним показником якості сировини може бути вміст екстрактивних речовин. Проведені нами дослідження вказують на те, що максимальна кількість екстрактивних речовин вилучається 40-50% розчином спирту етилового (табл. 1). Таким чином, за вмістом екстрактивних речовин в екстракті шишок хмелю можна оцінювати їх якість, придатність для виробництва лікарських засобів.

Ідентифікація шишок хмелю

Як було встановлено при дослідженні кількісного вмісту флавоноїдів та поліфенолів, найкращим екстрагентом для їх вилучення є 50% розчин спирту етилового. Тому екстракти шишок хмелю на 50% розчині спирту етилового використовували для хроматографічного дослідження складу флавоноїдів.

Щоб позбутися частини екстрагованих речовин і уникнути перевантаження хроматографічного шару супутніми речовинами, нами запропоновано попередньо випаровувати 10,0 мл екстракту до сухого залишку та розчиняти його у 2,0 мл суміші метанол-вода (7:3) [11]. Одержаний розчин фільтрували і наносили 25,0 мкл фільтрату.

Найбільш чітко розділення вилучених флавоноїдів отримане при використанні в якості рухомої фази системи розчинників етилацетат-ацетат-

Таблиця 2

Хроматографічні характеристики флавоноїдів шишок хмелю, які вилучаються водно-спиртовим розчином

Флавоноїд	Пластика Merck		Пластика Silufol	
	R _f	Колір	R _f	Колір
Не ідентифіковано	0,11	Жовто-коричневий	0,11	Жовто-коричневий
Рутин	0,20	Жовтий	0,30	Жовтий
Не ідентифіковано	0,28	Жовтий	0,38	Жовтий
Не ідентифіковано	0,41	Жовтий	0,56	Яскраво-жовтий
Не ідентифіковано	0,53	Яскраво-жовтий	0,60	Яскраво-жовтий
Кверцетин	0,92	Жовто-зелений	0,94	Жовто-зелений

на кислота-вода (5:1:1). Результати досліджень наведені в табл. 2. В усіх використовуваних си-

стемах підтверджена наявність в екстрактах рутину і кверцетину. Як свідчать проведені дослідження, обидва типи хроматографічних пластинок можуть застосовуватися для ідентифікації флавоноїдів у шишках хмелю.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано проводити оцінку якості шишок хмелю за вмістом флавоноїдів, поліфенолів та екстрактивних речовин.

2. Встановлено, що 50% розчин спирту етилового є оптимальним екстрагентом флавоноїдів, поліфенолів із шишок хмелю. Тому отримання екстракту шишок для ідентифікації та кількісного визначення компонентів необхідно проводити цим розчином.

3. Розроблені методики ідентифікації флавоноїдів у шишках хмелю методом тонкошарової хроматографії та спектрофотометричні методики кількісного визначення суми флавоноїдів та суми поліфенолів. Запропоновано суму флавоноїдів перераховувати на рутин, а суму поліфенолів — на кислоту кофейну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Годованный А.А. Хмель и его использование. — К., 1990. — 335 с.
2. Горошко О.А., Пахомов В.П., Самылина И.А., Никулина И.Н. // Фармация. — 2000. — №4. — С. 48-50.
3. Доронин Р.А., Гребенюк С.М., Плаксин Ю.М., Ларин В.А., Анализ качества экстракта хмеля спектрофотометрическим методом. — М., 1997: Тез. докл. — С. 22.
4. Дячок В., Грошовий Т., Любченко В., Любченко В. // Харчова і переробна промисловість. — 1999. — №9. — С. 11.
5. Кагановский Б.М., Рейтман И.Г. // Раст. ресурсы. — 1980. — Т. 16, №3. — С. 459-465.
6. Ляшенко Н.И. Химический состав эфирных масел хмеля. В кн.: Хмелеводство. — К.: "Урожай", 1975. — С. 73-79.
7. Прокопенко О.П. // Фармац. журн. — 1986. — №1. — С. 132-133.
8. Церевитинов О.Б. Спектральные методы исследования пищевых продуктов. В сб.: Современные методы исследования качества пищевых продуктов. — М., 1976. — 275 с.
9. Biende Martin. // Brauindustrie. — 1999. — 84, №9. — P. 502-507.
10. De Cooman L., Everaert E. // Phytochemical Analysis. — 1998. — Vol. 9, №3. — P. 145-150.
11. European Pharmacopoea. — 1999. — P. 795.
12. Glasby J. S. Encyclopaedia of the Alkaloides. New York and London: Plenum Press, 1990. — Vol. 2. — P. 1423.
13. Hlavacek F., Lhotsky A. Pivovarstvi. — Praha, SNTL Nakladatelstvi technicke literatury, 1972. — 622 s.
14. Hopfen der Ernte 1999 Rueckstandsfrei. // Brauwelt. — 2000. — Bd. 140, №4. — P. 37.
15. Pusz G., Copacz M., Copacz S. // Flawonoidy i ich zastosowanie. — Rzeszow. — 2000. — S. 71-97. eratury, 1972. — 622 s.

УДК 615.322:633.812.533

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ШИШЕК ХМЕЛЯ
 О.Ю.Григорчук, А.И.Тихонов, Л.В.Вронская
 Предложен оптимальный экстрагент флавоноидов и полифенолов из шишек хмеля как сырья для фармацевтических препаратов. Разработанные методики идентификации флавоноидов методом тонкослойной хроматографии. Представлены результаты количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов и суммы полифенолов.

UDC 615.322:633.812.533

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCES OF HOP CONES
 O.Yu.Grygorchuk, A.I.Tikhonov, L.V.Vronskaya
 The optimum extraction agent for phlavanoides and polyphenols from hop cones as a raw materials for the medicinal preparations have been proposed. The methods for flavonoids identification in hop cones by thin-layer chromatography have been elaborated. It has been presented the results of spectrophotometric sum quantitative determination of flavonoids and of polyphenols.