

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИДІЛЕННЯ ПРЕНІЛОВИХ ФЛАВОНОЇДІВ ІЗ СИРОВИНИ ХМЕЛЮ (*HUMULUS LUPULUS L.*) ЕТАНОЛВМІСНИМИ ЕКСТРАГЕНТАМИ

Ключові слова: супліддя хмелю, пренілові флавоноїди, екстрагент, естрогенна активність

Позитивні результати фармакологічних досліджень естрогенної активності поліфенольної фракції хмелю, зокрема її складових – ксантохумолу (X), ізоксантохумолу (IX), 6-пренілнарінгеніну (6-PN) та найбільш потужного з відомих фітоестрогенів – 8-пренілнарінгеніну (8-PN), визначили перспективність розроблення технології екстракту з підвищеним вмістом зазначених сполук як активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) [1].

Досконала технологія одержання екстракту визначеного складу є рушійним фактором в фармацевтичному розробленні готової лікарської форми вітчизняного лікарського засобу для профілактики та лікування естрогендефіцитних станів.

Оригінальний препарат із стандартизованим вмістом 8-PN як компонента, зумовлюючого загальну активність субстанції, посяде належне місце серед засобів для гормонозамісної терапії вікових клімактеричних порушень у жінок.

Аналізуючи результати попередніх досліджень, які виявили суттєвий вплив низки факторів на показники якості АФІ суплідь хмелю – видалення ліпофільних речовин як баластної фракції, ізомеризації пренілових флавоноїдів, сорту хмелю, умов упарювання та сушки екстракту, важливим завданням стало дослідження впливу концентрації етанолу в екстрагенті на ефективність кількісного вилучення X, IX, 8-PN та 6-PN з термічно обробленої та знежиреної сировини хмелю [2, 3, 4].

Беручи до уваги хімічну природу X, IX, 8-PN, 6-PN та результати попередніх власних досліджень з визначення оптимальних умов екстрагування цих сполук, як екстрагенти використовували 50%-й, 70%-й та 90%-й (об/об) розчини етанолу [5].

Мета роботи – дослідження впливу концентрації етанолу в екстрагенті на загальний вихід екстрактивних речовин, вихід та кількісний вміст пренілових халконів та флаванонів X, IX, 8-PN та 6-PN в одержуваних екстрактах, що дасть змогу визначити оптимальну концентрацію екстрагента та ефективність його екстрагувальної здатності для промислового виробництва АФІ.

Матеріали та методи дослідження

Вихідною сировиною слугували супліддя хмелю сорту «Ксанта» (виробник – Інститут сільського господарства Полісся НААН України) врожаю 2013 р., n-гексан, спирт етиловий ректифікат та вода очищена.

Одержання зразків екстрактів із застосуванням 50%-го, 70%-го та 90%-го (об/об) розчинів етанолу як досліджуваних екстрагентів сировини хмелю здійснювали за загальним нижченаведеним методом.

З метою підвищення кількісного вмісту в кінцевому екстракті 8-PN як компонента, зумовлюючого фармакологічну активність АФІ, подрібнені супліддя хмелю обробляли водяною парою впродовж 1 год з наступним видаленням поглинутої вологи з сировини. Згідно з власними дослідженнями, застосований підхід є ефективним інструментом тер-

мічної ізомеризації халконів X та десметилксантохумолу (DMX) у відповідні флаванони IX, 8-PN, 6-PN. Оброблені супліддя хмелю екстрагували методом фільтраційної екстракції в два етапи за кімнатної температури. На першому етапі оброблену парою сировину звільняли від ліпофільної фракції шляхом її екстрагування *n*-гексаном. Екстракцію цим алканом виконували до загального співвідношення сировина:екстракт 1:12 з наступним видаленням залишків екстрагента зі шроту [3]. На другому етапі знежирений напівпродукт хмелю (шрот) окремо екстрагували 50%-м, 70%-м та 90%-м (об/об) розчинами етанолу до загального співвідношення сировина:екстракт 1:10 [5]. Одержаний водно-спиртовий витяг почергово упарювали та висушували у вакуумі на роторному випарнику Büchi R 134 (Швейцарія) за температури водяної бані 60–63 °C та в робочому діапазоні вакууму 80–38 мбар [4].

Перед висушуванням водноспиртових витягів визначали в них сухі залишки та обчислювали вихід екстрактивних речовин. В одержаних сухих екстрактах визначали втрату в масі під час висушування, кількісний вміст та вихід X, IX, 8-PN, 6-PN відповідно до методик ДФУ [6].

Вихід екстрактивних речовин з екстрагованої рослинної сировини обчислювали за формулою (1):

$$D = \frac{\omega V}{m_c} \quad (1)$$

де V – об'єм одержаного витягу, мл;

ω – сухий залишок в одержаному витязі, %;

m_c – маса рослинної сировини, використаної для екстрагування на стадії, г.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN в одержаних сухих екстрактах виконували методом рідинної хроматографії. В методі кількісного визначення застосовано підхід визначення цих сполук з використанням вторинних стандартів [7].

Хроматографування здійснювали за допомогою рідинного хроматографа Ultimate 3000 (Німеччина) з УФ-детектором за температури 50 °C. Як рухомі фази використовували розчини 0,25%-ї (об/об) кислоти мурашиної P (рухома фаза A) та 0,25%-ї (об/об) кислоти мурашиної P в ацетонітрилі P (рухома фаза B). Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв. Колонка Purospher STAR RP 18-e (5 мкм) 250 × 4,0 мм. Об'єм інжекції – 20 мкл. Детектування – за довжини хвилі 370 нм (X) та 290 нм (IX, 8-PN, 6-PN). Програма градієнта: 0 хв, 80:20 (A:B); 3 хв, 80:20; 3 → 25 хв, 60:40; 25 → 37 хв, 60:40; 37 → 55 хв, 40:60; 55 → 56 хв, 10:90. Визначення X робилили за кверцетином, визначення IX, 8-PN, 6-PN – за нарінгенином.

Ідентифікацію піків здійснювали за тих самих умов, з використанням розчину СЗ сухого екстракту суплідь хмелю для ідентифікації піків.

Вихід X, IX, 8-PN, 6-PN із екстрагованої сировини обчислювали за формулою (2):

$$L_x = \frac{X_n D}{100} \quad (2)$$

де X_n – вміст X, або IX, або 8-PN, або 6-PN в сухому екстракті, %

D – вихід екстрактивних речовин з екстрагованої сировини, %.

Результати дослідження та обговорення

Одержані результати наведено в таблиці.

Одержані експериментальні дані свідчать про те, що сухий екстракт хмелю, отриманий з використанням як екстрагента 90%-го (об/об) розчину етанолу, характеризується найбільшим вмістом X, IX, 8-PN, 6-PN. Проте, показники виходів цих сполук з екстрагованої сировини хмелю поступаються аналогічним показникам виходів пренілових флавоноїдів у разі екстрагування 70%-м та 50%-м (об/об) розчинами етанолу. Це свідчить, що застосування 90%-го (об/об) розчину етанолу на другому етапі екстрагування є недостатньо ефективним.

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів хмелю

Показник	50%-й етанол	70%-й етанол	90%-й етанол
Вміст X (X_n , %)/Вихід X (L_x , %)	2,002/0,458	2,226/0,572	2,731/0,452
Вміст IX (X_n , %)/Вихід IX (L_x , %)	0,457/0,105	0,405/0,104	0,544/0,090
Вміст 8-PN (X_n , %)/Вихід 8-PN (L_x , %)	0,095/0,022	0,091/0,023	0,115/0,019
Вміст 6-PN (X_n , %)/Вихід 6-PN (L_x , %)	0,255/0,058	0,261/0,067	0,347/0,057
Вміст сухого залишку (ω , %)	2,289	2,571	1,655
Вихід екстрактивних речовин (D , %)	22,89	25,71	16,55
Втрата в масі під час висушування (W , %)	4,84	4,01	5,72

П р и м і т к а: кількісних вміст (X, IX, 8-PN, 6-PN) зазначено у перерахунку на суху речовину.

Подальший аналіз одержаних даних демонструє підвищення показників вмісту IX та 8-PN в екстракті, одержаному з використанням 50%-го (об/об) розчину етанолу як екстрагента порівняно з показниками вмісту цих сполук в екстракті, одержаному з використанням 70%-го (об/об) розчину етанолу. Поряд із цим, використання 50%-го (об/об) водноетанольного екстрагента призводить до зниження виходів X, 8-PN та 6-PN порівняно з використанням як екстрагента 70%-го (об/об) етанолу, що свідчить про його меншу ефективність.

Отже, вибір 70%-го (об/об) розчину етанолу як екстрагента на другому етапі екстрагування є оптимальним та експериментально обґрунтованим. Ефективність екстрагувальної здатності обраної концентрації етанолу демонструють показники кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN в екстракті в поєднанні із найвищим виходом 8-PN, як компонента з найбільшою естрогенною активністю, та найвищим виходом екстрактивних речовин.

В и с н о в о к

Досліджено вплив концентрації етанолу в екстрагенті на ефективність екстрагування пренілових халконів та флаванонів із сировини хмелю та встановлено, що найбільш ефективним екстрагентом є 70%-й (об/об) розчин етанолу, його оптимальна екстрагувальна здатність оцінена за найвищими виходами 8-пренілнarinгеніну та екстрактивних речовин із сировини та за сукупними кількісними показниками вмісту пренілових халконів та флаванонів в одержаному екстракті.

Перспективою дослідження є врахування одержаних результатів в подальшому розробленні технології промислового виробництва екстракту суплідь хмелю як активного фармацевтичного інгредієнта.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Schaefer O., Hümpel M., Fritze K. H. et al. 8-Prenylnaringenin is a potent ER alpha-selective phytoestrogen present in hops and beer // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2003. – V. 84, Iss. 2–3. – P. 359–360.
2. Добровольний О. О., Шаламай А. С., Шматенко О. П., Проценко Л. В. Дослідження сортів хмелю як вихідної сировини екстракту з підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів // Фармац. часопис. – 2014. – №2 (30). – С. 11–16.
3. Шматенко О. П., Добровольний О. О., Савицький В. Л., Страшний В. В. Вивчення умов екстрагування речовин ліпофільної природи з суплідь хмелю / Проблеми військової охорони здоров'я. Зб. наук. праць Української військово-медичної академії. – К.: Українська військово-медична академія, 2013. – Вип. 40. – С. 282–289.
4. Dobrovolnyi O. O. The study of dependence of the prenyl flavonoids content in the hop dry extract on temperature parameters of its obtaining // News of Pharmacy. – 2014. – N 3(79). – P. 20–24.
5. Добровольний О. О., Шматенко О. П., Слободянюк Ю. О. Дослідження процесу екстрагування ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнarinгеніну та 6-пренілнarinгеніну з сировини хмелю // Військова медицина України. – 2013. – Т. 13, № 4. – С. 86–92.
6. Державна фармакопея України. – 1-ше вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2004. – Доп. 1. – 520 с.
7. Dhooche L., Naessens T., Heyerick A. et al. Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules in secondary standards // Talanta. – 2010. – V. 83, Iss. 2. – P. 448–456.

Надійшла до редакції 15. 01. 2015.

А. А. Добровольный¹, А. П. Шматенко², А. С. Шаламай¹, В. В. Руденко²

¹ ПАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», г. Киев

² Украинская военно-медицинская академия, г. Киев

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРЕНИЛОВЫХ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ СЫРЬЯ ХМЕЛЯ (*HUMULUS LUPULUS* L.) ЭТАНОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЭКСТРАГЕНТАМИ

Ключевые слова: соплодия хмеля, преңиловые флавоноиды, экстрагент, эстрогенная активность

АННОТАЦИЯ

Разработка технологии сухого экстракта хмеля в качестве активного фармацевтического ингредиента предусматривала детальное изучение и определение факторов, которые способны влиять на качественные характеристики готового продукта.

Целью работы было исследование влияния концентрации этанола в водноспиртовом экстрагенте на эффективность экстракции преңиловых флавоноидов на втором этапе экстракции предварительно термически обработанных и обезжиренных соплодий хмеля.

Исследуемые образцы экстрактов получали по общей технологической схеме, которая включала такие стадии: термическую изомеризацию преңиловых халконов в соответствующие преңиловые флаваноны, удаление веществ липофильной природы экстракцией термически обработанного сырья *n*-гексаном, экстракцию обезжиренного сырья этанолсодержащим экстрагентом, упаривание и сушку водноэтанольного извлечения в вакууме. Операции экстрагирования выполняли методом фильтрационной экстракции. В качестве экстрагентов на втором этапе экстракции использовали 50%-й, 70%-й та 90%-й (об/об) растворы этанола.

Эффективность исследуемого водноспиртового экстрагента оценивали по выходу экстрактивных веществ, выходу и количественному содержанию ксантохумола, изоксантохумола, 8-преңилнарингенина, 6-преңилнарингенина в полученных сухих экстрактах. В качестве метода количественного определения использовали ВЭЖХ.

По результатам исследования наибольшую эффективность продемонстрировал 70%-й (об/об) этанол, его экстракционная способность оценена по наибольшим показателям выхода 8-преңилнарингенина (0,023%) и выхода экстрактивных веществ (25,71%), а так же совокупным показателям содержания ксантохумола (2,226%), изоксантохумола (0,405%), 8-преңилнарингенина (0,091%), 6-преңилнарингенина (0,261%) в сухом экстракте.

O. O. Dobrovolnyi¹, O. P. Shmatenko², A. S. Shalamay¹, V. V. Rudenko²

¹ PJSC SIC «Borshchahivskiy Chemical Pharmaceutical Plant», Kyiv

² Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv

STUDY OF EXTRACTION EFFICIENCY OF PRENYLATED FLAVONOIDS FROM HOPS RAW (*HUMULUS LUPULUS* L.) BY THE ETHANOL CONTAINING EXTRACTION SOLVENTS

Key words: hop cones, prenylated flavonoids, extraction solvent, estrogenic activity

ABSTRACT

Development of technology of the hop dry extract as APIs provided for a detailed study and identification of factors that can affect the quality characteristics of the finished product.

The goal of this study was to investigate the effect of ethanol concentration in the water alcohol extraction solvent on the extraction efficiency of prenylated flavonoids from the thermal pretreated and fat-free hop cones.

The investigated samples of extracts obtained according to the general process scheme which included the following steps: thermal isomerization of prenylated chalcones to corresponding prenylated flavanones, removal of lipophilic compounds from thermal pre-treated raw material by *n*-hexane extraction, extraction of the defatted raw material by the ethanol containing extraction solvent, evaporation and drying of water-ethanol extract in vacuum. Extraction steps were performed using filtration extraction method. As extraction solvents on the second extraction step were 50%, 70% and 90% (vol.) ethanol solutions.

Efficacy of water-ethanol extraction solvents was evaluated by the yield of extractable matter, yield and quantitative content of the xanthohumol (X), isoxanthohumol (IX), 8-prenylnaringenin (8-PN) and 6-prenylnaringenin (6-PN) in the obtained dry extracts. The HPLC method was used for assay.

According to the study 70% (vol.) ethanol showed the highest efficiency, its extraction ability was evaluated by the highest yield of 8-PN (0,023%) and yield of extractable matter (25,71%) as well as aggregate content of xanthohumol (2,226%), isoxanthohumol (0,405%), 8-prenylnaringenin (0,091%) and 6-prenylnaringenin (0,261%) in the dry extract.

Електронна адреса для листування з авторами: dobrovolny_bhfv@mail.ru