



С.І. Мазурець, С.В. Ковальов, А.М. Рудник

## ФІТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛІПОФІЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ З ЛИСТЯ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**Ключові слова:** ліпофільна фракція, хмель звичайний, жирні кислоти, хлорофіли, каротиноїди, антимікробна активність.

**Ключевые слова:** липофильная фракция, хмель обыкновенный, жирные кислоты, хлорофиллы, каротиноиды, антимикробная активность.

**Key words:** lipophilic fraction, *Humulus lupulus L.*, fatty acids, chlorophylls, carotenoids, antimicrobial activity.

Наведено результати вивчення ліпофільної фракції з листя хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*). Визначено кількісний вміст ліпофільної фракції в рослинній сировині, що склав 7%. У результаті хроматографічного аналізу і якісних реакцій встановлено наявність хлорофілів і каротиноїдів, визначено їх кількісний вміст. Вивчено жирнокислотний склад і хімічні числові показники: число омилення, кислотне, ефірне та йодне числа. В результаті мікробіологічного дослідження виявлено широкий спектр антимікробної активності.

Представлены результаты изучения липофильной фракции из листьев хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus L.*). Определено количественное содержание липофильной фракции в растительном сырье, которое составило 7%. В результате проведенного хроматографического анализа и качественных реакций установлено наличие хлорофиллов и каротиноидов, определено их количественное содержание. Изучен жирнокислотный состав и химические числовые показатели: число омыления, кислотное, эфирное и йодное числа. В результате микробиологического исследования определен широкий спектр антимикробной активности.

The work presents results of study lipophilic composition from Hop usual leaves (*Humulus lupulus L.*). We have defined the content of lipophilic fraction in the raw material, which made 7%. The availability of chlorophylls and carotenoids by means of quality reactions and TLC chromatography has been established, the quantitative contents of them has been found. We have established free fatty acids and chemical numbers: saponification number, acid, ester and iodine numbers. As a result of microbiological investigation we found out that lipophilic fraction from Hop usual leaves possesses a broad spectrum of antimicrobial activities.

Лікарська рослинна сировина (ЛРС) та фітопрепарати широко застосовуються у медичній практиці й користуються великим попитом у населення. У кожній лікарській рослині накопичуються різні за природою біологічно активні речовини (БАР), що знаходяться у збалансованому стані та забезпечують різноманіття терапевтичних ефектів.

Можна зазначити, що на сьогодні при вивченні та дослідженні ЛРС фармацевтична галузь найчастіше використовує її гідрофільну фракцію, що у вигляді настоек та екстрактів широко застосовується в медичній практиці. Менш вивченими є ліпофільні фракції (ЛФ) відомих лікарських рослин, що також мають унікальний комплекс БАР [10].

Основними діючими речовинами ЛФ є хлорофіли, каротиноїди, токофероли, сума ненасичених жирних кислот, стерини, фосфоліпіди та інші БАР, що виявляють різні види фармакологічної дії.

Ненасичені жирні кислоти (вітамін F) мають антисклеротичний та антитромботичний ефект, відіграють важливу роль у синтезі простагландинів, що, у свою чергу, регулюють артеріальний тиск. Нестача вітаміну F пригнічує ріст і репродуктивну функцію організму, що розвивається, зменшує коагуляційні властивості крові [17]. Хлорофіли виявляють антимікробну активність і стимулюють кровотворення. Каротиноїди та токофероли використовують як антиоксидантні речовини. Ці пігменти у медицині та косметології застосовують у якості протизапальних, рано-загоюючих і антибактеріальних засобів [14,15,19,21–23].

За біологічними властивостями фосфоліпіди та фітостерини подібні до поліненасичених жирних кислот. Вони мають здатність знижувати вміст холестерину у крові. Фосфоліпіди також беруть участь у бар'єрній, транспортній і рецепторних функціях, входять до складу біологічних мембран [11].

Об'єкт дослідження – ліпофільна фракція з листя хмелю звичайного. Хмель звичайний (*Humulus lupulus*, *Cannabaceae*) – дуже поширена дикоросла рослина, яку широко культивують для потреб харчової промисловості.

Традиційно для отримання лікувальних засобів використовують лише шишки хмелю, хімічний склад яких дуже різноманітний. Виражені седативні властивості хмелю зумовили його введення до складу відомих лікарських препаратів: Уролесан, Валокордин, Корвалдин, Валоседан, а також багатьох зборів [5,12,13,16].

Хімічний склад листя хмелю звичайного вивчено недостатньо. За даними спеціалізованої літератури, вони містять органічні кислоти, амінокислоти, полісахариди, дубильні речовини, аскорбінову кислоту. Фенольні сполуки у листі хмелю представлені флавонолглікозидами, катехінами, лейкоантоціанідинами та фенолкарбоновими кислотами [2,7–9]. Зважаючи на різноманітний хімічний склад, запропоновано використання такого нетрадиційного виду лікарської сировини, як листя хмелю звичайного.

### МЕТА РОБОТИ

Для раціонального використання та комплексної переробки листя хмелю звичайного доцільно отримати та вивчити ліпофільну фракцію з цієї сировини.



## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Листя хмелю збирали протягом усього періоду вегетації у Харківській і Житомирській областях. Ліпофільну фракцію отримували вичерпною екстракцією в апараті Соскета [3,4].

Виявлення каротиноїдів, хлорофілів і токоферолів проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Sorbfil» і «Silufol» в одновимірному й двовимірному варіантах у системах розчинників: гексан – ацетон (6:2; 6:4; 8:2) та у хлороформі. Після хроматографування пластинку висушували під тягою і переглядали у видимому й УФ-світлі до і після обробки специфічними реагентами.

Для визначення якісного складу ЛФ використовували тривимірну флуоресцентну спектроскопію (3DF-спектроскопію), яку останнім часом використовують для аналізу сумішей, що містять флуоресцюючі компоненти. 3DF-спектри, що мають вигляд поверхні, яка характеризується функцією  $I=f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}})$ , реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах.

Визначено хімічні числові показники ЛФ з листя хмелю: кислотного, йодного, ефірного числа та числа омилення. Визначення проводили за загальновідомими методиками [3,4,18].

Кількісне визначення каротиноїдів і хлорофілів проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину отриманого розчину визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 450 нм та 670 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння був хлороформ.

Жирнокислотний склад аналізували методом газорідної хроматографії метилових ефірів жирних кислот на хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором «Shimadzu GC-14B». Ідентифікацію метилових ефірів здійснювали за часом утримання піків стандартною сумішшю. Вміст жирних кислот обчислювали у відсотках від їх суми [3,23,24].

З метою комплексного використання сировини здійснено дослідження антимікробної активності ліпофільного екстракту з листя хмелю звичайного. Для визначення антибактеріальної активності використовували метод дифузії в агар з використанням наступних тест-мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885/653. У якості живильного середовища використовували агар Мюллера-Хінтона. Рівень антибактеріального ефекту оцінювали за діаметром зони затримки росту мікроорганізму навколо лунки з внесеним препаратом, оцінюючи його за наступною шкалою: діаметр зони затримки росту мікроорганізму <14–15 – стійкий штам; 15–18 – слабо чутливий штам; >18 – чутливий штам [1].

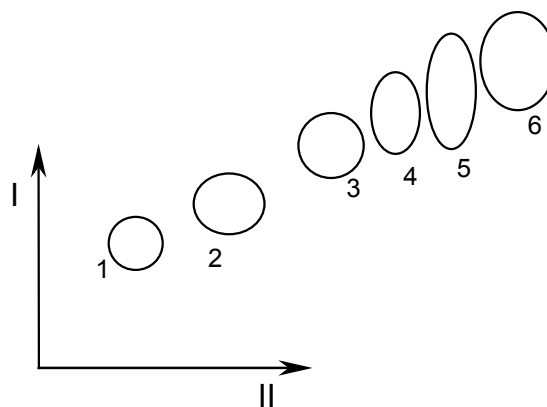
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для отримання ліпофільної фракції 10,0 г подрібненого листя хмелю вичерпно екстрагували хлороформом в апараті Соскета. Отриманий хлороформний екстракт упарювали до видалення екстрагенту та зважували. Визначали відсотковий вміст ЛФ у сировині, що склав 7%.

З метою стандартизації отриманої ліпофільної фракції

вивчено органолептичні та деякі фізико-хімічні показники [4,20]. Отриманий ліпофільний екстракт являє собою густу однорідну масу темно-зеленого кольору, має приємний ароматний запах, майже нерозчинний у воді, але розчинний у спирті (96% об/об), хлороформі, мінеральних маслах і рослинних оліях.

У результаті хроматографічного аналізу ЛФ визначено локалізацію хлорофілів за характерним зеленим забарвленням у видимому світлі та яскраво-червоною флуоресценцією в УФ-світлі ( $\lambda=366$  нм). Каротиноїди визначали у видимому світлі за жовтим або жовтогарячим забарвленням, а в УФ-світлі ( $\lambda=366$  нм) – за брунатною флуоресценцією, після обробки 2% розчином п-диметиламінобензальдегіду – рожево-фіолетовим забарвленням. Схему двовимірної ТШХ хлороформного екстракту з листя хмелю звичайного наведено на *рис. 1* [6].



*Рис. 1.* Схема двовимірної тонкошарової хроматограми ліпофільного екстракту з листя хмелю звичайного.

*Примітка:* система розчинників: I напрямком: гексан – ацетон (6:2); II напрямком: гексан – ацетон (6:4).

Отже, у ЛФ з листя хмелю встановлено наявність 2 речовин (3,4), що можна віднести до класу каротиноїдів та 4 речовин (1,2,5,6) – до хлорофілів.

Докладніше уявлення про якісний склад фракцій отримали при аналізі тривимірних спектрів флуоресценції ліпофільних екстрактів, наведених на *рис. 2*.

Вони мають серію характерних піків і можуть бути використані для ідентифікації ліпофільних екстрактів.

Так, у ЛФ з листя хмелю звичайного спостерігається серія піків у областях збудження флуоресценції  $\lambda_{\text{exc}}$  від 300 до 700 нм та випромінювання  $\lambda_{\text{em}}$  від 650 до 750 нм, характерна для суміші хлорофілів А і Б.

З метою стандартизації ЛФ визначено їх хімічні числові показники: кислотне число –  $54,17 \pm 0,69$ ; число омилення –  $69,44 \pm 1,71$ ; ефірне число –  $12,27$ ; йодне число –  $38,96 \pm 0,69$  та кількісний вміст біологічно активних речовин: хлорофілів –  $472,03 \pm 12,52$  мг% і каротиноїдів –  $237,85 \pm 3,31$  мг%.

У результаті аналізу жирнокислотного складу у ЛФ листя встановлено наявність 12 жирних кислот, з них 6 насичених і 6 ненасичених (*табл. 1*).

У найбільших кількостях у ЛФ з листя серед насичених жирних кислот містилась пальмітинова (24,51%), серед не-

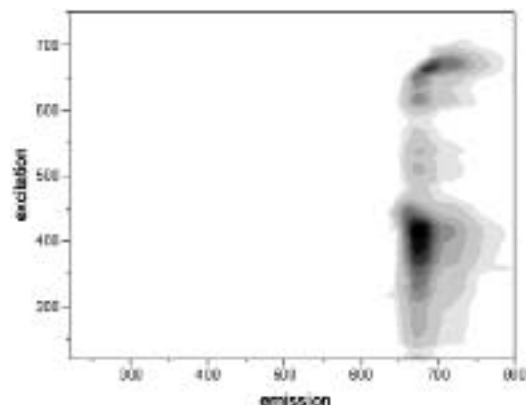
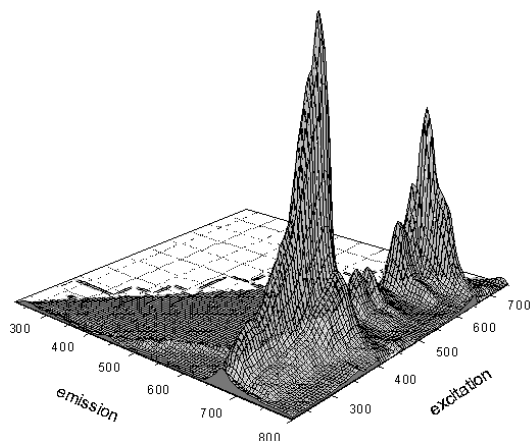


Рис. 2. 3DF-спектри та їх проекції на площину збудження/емісії.

**Результати вивчення жирнокислотного складу**

Таблиця 1

Назва жирної кислоти	Загальна формула	Вміст, % від суми
<b>Насичені кислоти</b>		
Лауринова	C <sub>12:0</sub>	4,66
Міристинова	C <sub>14:0</sub>	-
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	24,51
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	2,31
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	3,04
Бегенова	C <sub>22:0</sub>	-
Лігноцерінова	C <sub>24:0</sub>	2,99
Монтанова	C <sub>28:0</sub>	4,04
<b>Ненасичені кислоти</b>		
Додеценінова	C <sub>12:1</sub>	3,19
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	2,18
Олеїнова	C <sub>18:1</sub>	2,74
Лінолева	C <sub>18:2</sub>	8,31
Ліноленова	C <sub>18:3</sub>	37,05
γ-Ліноленова	C <sub>18:3n6-12</sub>	-
α-Ліноленова	C <sub>18:3n9-15</sub>	-
5,9-тетракозадієнова	C <sub>24:2</sub>	4,97
Сума насичених кислот		41,56
Сума ненасичених кислот		58,44

**Результати визначення чутливості мікроорганізмів до ліпофільної фракції з листя хмелю звичайного**

Таблиця 2

Досліджуваний зразок	Діаметр зони затримки росту (мм)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Ліпофільна фракція з листя	19	19	19	0	16

насичених кислот – ліноленова (37,05%), сумарний вміст ненасичених жирних кислот складає 58,44%, що дає змогу прогнозувати F-вітамінну активність ліпофільного комплексу.

Результати здійснених мікробіологічних досліджень показали, що досліджуваний зразок проявляє широкий спектр

протимікробної активності як відносно грам-негативних (*E. coli*), так і грам-позитивних мікроорганізмів (*S. aureus*, *B. subtilis*), також протигрибкову активність стосовно *C. albicans* (табл. 2).

**ВИСНОВКИ**

Вперше отримано ліпофільну фракцію з листя хмелю звичайного, вивчено їх якісний склад і визначено кількісний вміст біологічно активних речовин: хлорофілів – 472,03±12,52 мг%, каротиноїдів – 237,85±3,31 мг%, відповідно. Вихід ЛФ склав з листя близько 7,0 %.

З метою стандартизації ліпофільної фракції визначено їх хімічні числові показники: кислотне число – 54,17±0,69; число омилення – 69,44±1,71; ефірне число – 12,27; йодне число – 38,96±0,69.

Методом газорідинної хроматографії встановлено якісний склад і кількісний вміст жирних кислот у ліпофільному екстракті. У найбільших кількостях містились пальмітинова (24,51%) та ліноленова (37,05%) кислоти.

Визначено широкий спектр протимікробної активності ліпофільної фракції.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бактеріологічний контроль поживних середовищ: інформ. лист МОЗ України № 05. 4 / 1670, К., 2001. – 36 с.
2. Беленовская Л.М. Компонентный состав и биологическая активность *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*): обзор результатов исследований последних десятилетий / Л.М. Беленовская, А.Л. Буданцев // Растительные ресурсы. – 2008. – Т. 44, №2. – С. 132–154.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – С. 335.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – 556 с.
5. Зюзук Б.М. Хмель вьющийся / Б.М. Зюзук, Р.В. Куцик // Про-визор. – 2004. – №13. – С. 28–31.
6. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам: В 2-х частях. / Под ред. О. Микеша. – М.: Мир, 1982. – 781 с.
7. Латыпова Г.М. Разработка показателей качества листьев хмеля обыкновенного / Г.М. Латыпова, К.А. Пупыкина, С.В. Закиева // Вестник ОГУ. – 2009. – №6. – С. 198–200.
8. Ліпкан Т.М. Хмель звичайний – лікарська та харчова рослина / Т.М. Ліпкан // Фітотерапія в Україні. – 2000. – №3–4. – С. 37–40.



9. *Лобацкий Е.П.* Хмелеводство / *Е.П. Лобацкий*. – М.: Колос, 1993. – 287 с.
10. Оптимізація технології екстракції ліпофільних комплексів з лікарської рослинної сировини. 1. Вибір екстрагенту / *Гарна С.В., Ветров П.П., Русинов О.І., Георгіяц В.А.* // Запорозький медичний журнал. – 2010. – Т. 12, №3. – С. 92–94.
11. *Припутіна Л.С.* О значении жиров в нашем питании / *Л.С. Припутіна, О.В. Передерий* // Здоровье и питание. – 1998. – №1. – С. 8–10.
12. *Соколов С.Я.* Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей / *Соколов С.Я.* – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 976 с.
13. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. – М.: АстраФармСервис, 1996. – 1296 с.
14. *Тернинко І.І.* Фітохімічне вивчення ліпофільних фракцій з трави *Calendula officinalis (L.)* та *Chamomilla recutita (L.)* / *І.І. Тернинко, В.С. Кисличенко* // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV, № . – С. 82–85.
15. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: Підручник для студентів / за ред. *В.М. Ковальова*. – Х.: Вид-во НФаУ «Прапор», 2000. – 704 с.
16. *Чуракова Г.В.* Влияние липофильной фракции хмеля обыкновенного на гемодинамику бодрствующих крыс при про-филактическом введении / *Г.В. Чуракова, А.Е. Бондаренко, А.В. Крикова* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2005. – №1. – С. 54–56.
17. *Bunnell R.H.* The Vitamins / *R.H. Bunnell*. – New York, 1967. – 200 p.
18. European Pharmacopoeia. – 4<sup>th</sup> ed. – Strasbourg, 2001. – 2416 p.
19. *Golf B.* Botanica / *B. Golf, I. Lynton, B. Segall*. – Koehnemann, 1999. – 1020 p.
20. *Livingston A.I.* Rapid analysis of xanthophylls and carotene in dried plant materials / *A.I. Livingston* // J. Assoc. Offic. Anal. Chem. – 1986. – Vol. 69, №6. – P. 1017–1019.
21. *Moerman D.E.* Medicinal plants of Native America / *D.E. Moerman* // Ann. Arbor. – 1986. – Vol. 1. – P. 531–534.
22. *Moerman D.E.* Medicinal plants of Native America / *D.E. Moerman* // Ann. Arbor. – 1986. – Vol. 2. – P. 535–910.
23. *Vladimirov Yu.A.* Natural antioxidant / *Yu.A. Vladimirov; ed. by L. Parker*. – New York, 1996. – P. 125–241.
24. *Wagner H.* Plant drug analysis / *H. Wagner; S. Bladt*. – Berlin: Springer, 2001. – 384 p.

**Відомості про авторів:**

Мазурець С.І., к. фарм. н., асистент каф. фармакогнозії НФаУ.

Ковальов С.В., к. фарм. н., доцент каф. фармакогнозії НФаУ.

Рудник А.М., к. фарм. н., асистент каф. фармакогнозії НФаУ.

**Адреса для листування:**

Мазурець Світлана Ігорівна, м. Харків, вул. Блюхера, 4, каф. фармакогнозії НФаУ.

Тел.: (0572) 67 92 08.

E-mail: s\_berestova@ukr.net

Поступила в редакцію 27.03.2012 г.