© Коллектив авторов, 2004

М. А. Алексеева[1,2], К. И. Эллер[2], А. П. Арзамасцев[1]

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ХМЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

[1] Московская Медицинская Академия им. И. М. Сеченова,
[2] ГУ НИИ питания РАМН, Москва

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus*, *Cannabinaceae*) — многолетнее двудомное травянистое растение, произрастающее в Европе, Азии и Северной Америке [1]. В качестве сырья используют высушенные соплодия (шишки, *Strobili lupuli*) культивируемого или дикорастущего многолетнего растения хмеля обыкновенного [2]. По данным литературы хмель является богатым источником соединений полифенольной природы, относящихся к таким классам, как флавонолгликозиды, пренилированные флавоноиды и производные дигидроксикоричной кислоты.

Установлен широкий спектр фармакологического действия флавоноидов. Биологические активные добавки (БАД) и лекарственные препараты на основе флавоноидов, наряду с Р-витаминной активностью, обладают желчегонными, гепатопротекторными, противоязвенными, спазмолитическими, диуретическими, антимикробными и противовирусными свойствами [3]. Особо следует отметить пренилфлавоноиды, обладающие помимо вышеперечисленных фармакологических свойств, антипролиферативными и антиканцерогенными свойствами [4 – 6]. Хмель является почти единственным источником таких пренилированных флавоноидов, как ксантогумол и изоксантогумол, встречающихся в хмеле в виде агликонов [4]. Производные дигидроксикоричной (кофейной) кислоты обладают иммуностимулирующей и противовоспалительной активностью [7].

До настоящего времени опубликовано сравнительно немного работ, где делались попытки провести корреляцию разнообразных фармакологических свойств препаратов хмеля с содержанием в нем различных полифенольных компонентов [8]. Одной из причин этого является недостаточность сведений о составе полифенолов хмеля. Целью настоящей работы является определение качественного и количественного состава полифенольных соединений хмеля с использованием методов ВЭЖХ, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии.

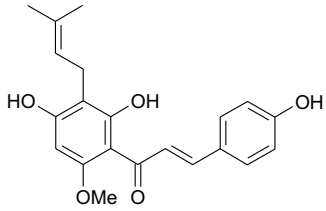
Экспериментальная часть

Аппаратура и материалы

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе “Agilent 1100” (США) с УФ-детектором на диодной матрице (УФ-ДМ) и флуориметрическим детектором (ФЛД).

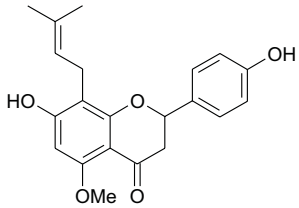
Спектрофотометр Agilent 8453 (Hewlett-Packard, Германия), позволяющий проводить измерения при длинах волн 190 – 1100 нм.

1. Стандартный образец ксантогумола (Xanthohumol), “Alexis biochemicals” (Alexis USA San Diego, CA 92121/USA).



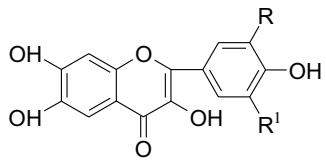
6′-О-метил-3′-пренилхалконарингенин

2. Стандартный образец изоксантогумола (Isoxanthohumol), “Alexis biochemicals” (Alexis USA San Diego, CA 92121/USA).



6-О-метил-8-пренилнарингенин

3. Стандартный образец кверцетина дигидрата (Quercetin dihydrate), “Sigma-Aldrich Chemie Gmbh.” USA.
2-(3,4-Дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4Н-1-бензопиран-4-ондигидрат.



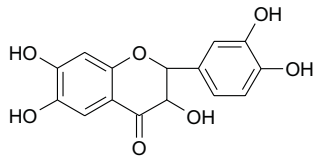
Кверцетин R = OH; R^1 = H
Кемпферол R = R^1 = H
Изорамнетин R = OCH_3; R^1 = H
Мирицетин R = R^1 = OH

4. Стандартный образец кемпферола (Kaempferol), “Indofine Chemical Company, Inc.” USA.
3,5,7-Тригидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он.

5. Стандартный образец изорамнетина (Isoramnetin), “Indofine Chemical Company, Inc.” USA.
3,5,7-Тригидрокси–2-(3′-О-метил-4′-гидроксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он.

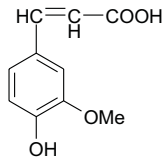
6. Стандартный образец мирицетина “Sigma-Aldrich Chemie Gmbh. “ USA.
3,3′,4′,5,5′,7-Гексагидроксифлавон.

7. Стандартный образец дигидрокверцетина, “Sigma-Aldrich Chemie Gmbh. “ USA.



3,3′,4′,5,7-Пентагидроксифлавон

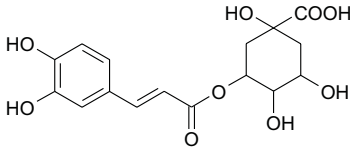
8. Стандартный образец феруловой кислоты, “Sigma-Aldrich Chemie Gmbh. “ USA.



4-Гидрокси-3-метоксикоричная кислота.

9. Стандартный образец хлорогеновой кислоты (Chlorogenic acid), “Sigma-Aldrich Chemie Gmbh. “ USA.

1,3,4,5-Тетрагидроксициклогексан карбоновая кислота 3-(3,4-дигидроксициннамат)



Объекты анализа:

Humulus lupulus, шишки хмеля “сборный”, урожай 2000 г., Россия.

1. Определение суммы полифенольных соединений (по галловой кислоте).

1.1. Экстракция.

1,0 г измельченного сырья шишек хмеля помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, заполненную до половины дистиллированной водой, нагретой до 40 °С, и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 45 – 60 мин, периодически подогревая колбу. Далее объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

1.2. Определение суммарного содержания фенольных соединений методом Фолина – Чокальтеу [9].

Полифенольные соединения окисляются реактивом Фолина – Чокальтеу, состоящим из смеси фосфорно-вольфрамовой $H_3PW_{12}O_{40}$ и фосфорно-молибденовой кислот $H_3PMo_{12}O_{40}$, который, в свою очередь, восстанавливается в смесь окислов вольфрама (W_8O_{23}) голубого цвета и молибдена (Mo_8O_{23}). Абсорбция раствора при 750 нм пропорциональна содержанию фенольных соединений. В качестве полифенольного стандарта используют галловую кислоту.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл экстракта, 50 мл дистиллированной воды, 5 мл реактива Фолина – Чокальтеу, 20 мл раствора углекислого натрия. Доводят до метки дистиллированной водой. Перемешивают до получения однородной смеси. Выдерживают 30 мин и определяют абсорбцию при 750 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см по отношению к контрольному раствору, приготовленному с дистиллированной водой вместо исследуемого экстракта.

2. Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин [9].

2.1. Экстракция.

1,0 г измельченного сырья шишек хмеля кипятят в 30 мл 90 % этилового спирта на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и экстракцию повторяют еще раз. Объединенную смесь охлаждают, фильтруют и доводят объем до 100 мл 90 % этанолом.

2.2. Условия проведения колориметрического анализа.

По 1,0 мл стандартного раствора рутина и исследуемого образца смешивают с 1,0 мл хлорида алюминия и 5 мл дистиллированной воды. Смесь инкубируют при комнатной температуре 30 мин и измеряют оптическую плотность полученных растворов при 415 нм. Для приготовления раствора сравнения используют разбавленный в дистиллированной воде 10 % хлорид алюминия.

Принцип колориметрического метода, основанного на взаимодействии с алюминий хлоридом, заключается в том, что реагент образует кислотоустойчивые комплексы с С-4 кетогруппой и/или с С-3 или С-5 гидроксильной группой флавонов и флавонолов, имеющие максимумы поглощения в диапазоне длин волн 415 – 440 нм.

3. Определение флавонолов и дигидрофлавонолов в хмеле обыкновенном [9].

3.1. Экстракция.

3,0 г измельченного сырья шишек хмеля помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 80 мл смеси метанол – вода – соляная кислота (60:12:8) и кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 1 – 1,5 ч. Гидролиз проводят в присутствии аскорбиновой кислоты. Экстракт охлаждают, фильтруют. Объем экстракта доводят водой до 100 мл.

3.2. Условия ВЭЖХ.

Подвижная фаза: метанол – *о*-фосфорная кислота (53 – 47), pH 2,6. Скорость подачи 1 мл/мин. Колонка: 150 × 4,6 мм Zorbax Eclipce XDB C_8.

Кверцетин, кемпферол, мирицетин и изорамнетин детектируются при длине волны 370 нм; дигидрокверцетин 270 нм.

4. Определение пренилхалконов и пренилфлаванонов в хмеле обыкновенном.

4.1. Экстракция А.

2,0 г шишек хмеля экстрагируют ацетоном (50 мл) 1 ч при встряхивании. Ацетонный экстракт фильтруют и упаривают в вакууме на ротационном испарителе. К остатку добавляют 50 мл метанола, нагревают при кипении с обратным холодильником. Метанольный раствор выдерживают 24 ч при – 20 °С для осаждения основной части смолистых веществ и других липофильных составляющих. Центрифугируют, супернатант отделяют и фильтруют.

4.2. Экстракция Б.

2,0 г шишек хмеля экстрагируют хлороформом (50 мл) 1 ч при встряхивании. Хлороформный экстракт фильтруют и упаривают в вакууме на ротационном испарителе. К остатку добавляют 50 мл метанола, нагревают при кипении с обратным холодильником. Метанольный раствор выдерживают 24 ч при – 20 °С для осаждения основной части смолистых веществ и

Таблица 1

Полифенольный состав хмеля обыкновенного

Компонент	Содержание в	
	%	г/кг
Сумма полифенольных соединений	2, 8	28
Сумма флавоноидов по рутину	1,5	15
Флавонолы	0,16	1,6
Кверцетин	0,1	1,0
Кемпферол	0,06	0,6
Изорамнетин	—	—
Мирицетин	—	—
Дигидрофлавонолы		
Дигидрокверцетин	0,25	2,5
Пренилхалконы		
Ксантогумол	0,2	2,0
Пренилфлаваноны		
Изоксантогумол	0,005	0,05
Производные 3,4-дигидроксикоричной кислоты	0,082	0,82
Феруловая кислота	0,014	0,14
Хлорогеновая кислота	0,033	0,33
Кафтаровая кислота в пересчете на феруловую	0,035	0,35

других липофильных составляющих. Центрифугируют, супернатант отделяют и фильтруют.

4.3. Экстракция В.

1,0 г измельченного сырья экстрагируют 5,0 мл воды для набухания клеток в течение 1 ч при встряхивании. Далее добавляют 5,0 мл гексана, 5,0 мл ацетона и сульфат аммония для высаливания. Центрифугируют, отбирают аликвоту.

4.4. Условия проведения хроматографии.

Неподвижная фаза: 150 × 4,6 мм Zorbax Eclipce XDB C_8 (USA). Подвижная фаза: ацетонитрил – метанол – 1 % водный раствор муравьиной кислоты (35:32:33). Халконы детектируются по УФ-поглощению при длине волны 370 нм, флаваноны детектируются на длине волны 290 нм. Поскольку изоксантогумол обладает флуоресценцией с максимумами возбуждения 290 нм и эмиссии 410 нм, для повышения селективности и чувствительности количественная оценка изоксантогумола проводилась по данным флуориметрического детектирования.

5. Определение фенольных кислот - производных дигидроксикоричной кислоты [9].

5.1. Экстракция.

1,0 г измельченного сырья шишек хмеля помещают в колбу вместимостью 100 мл и прибавляют 50 мл смеси метанол — вода (7:3). Экстракцию проводят при нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин. Экстракт охлаждают, фильтруют. Объем экстракта доводят водой до 50 мл.

5.2. Условия проведения хроматографии.

Подвижная фаза: ацетонитрил — 0,05М NaH_2PO_4 pH 2,6 (15:85). Скорость подачи 1,0 мл/мин.

Таблица 2

Количественное содержание ксантогумола и изоксантогумола в хмеле сборном при различных видах экстракции.

Исследуемые соединения	Экстракция, г/кг				
	В[1]	А[1] ацетон	А[2] ацетон	Б[2] хлороформ	Б[1] хлороформ
Ксантогумол	1,0	1,0	2,0	2,0	1,2
Изоксантогумол	0,02	0,04	0,05	0,05	0,03

[1] Измельченное сырье.
[2] Не измельченное сырье.

Результаты и их обсуждение

Из табл. 1 видно, что основными полифенольными соединениями хмеля обыкновенного являются пренилированный халкон ксантогумол 0,2 % и дигидрофлавонол дигидрокверцетин 0,25 %. Ксантогумол может рассматриваться как индикаторный флавоноид хмеля и его содержание может служить критерием качества сырья и БАД на основе хмеля. Флавонолы представлены кверцетином и кемпферолом и их сумма составляет 0,16 % (для сравнения их содержание в сырье Гинкго билоба около 0,9 %). По сравнению с соцветиями эхинацеи (суммарное количество производных дигидроксикоричной кислоты 5,9 %), в хмеле содержится относительно небольшое количество фенольных кислот — приблизительно 0,1 %.

Учитывая важность содержания пренилфлавоноидов (ксантогумол и изоксантогумол) с точки зрения фармакологических свойств хмеля, нами было проведено исследование полноты их экстракции различными смесями расторителей. Как видно из табл. 2, максимальное извлечение пренилированных флавоноидов достигается при экстракции цельного сырья смесями на основе хлороформа или ацетона (по схеме эстракций А и Б).

ЛИТЕРАТУРА

1. J. F. Stevens, C. L. Miranda, D. R. Buhler, and M. L. Deinzer, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **56**(4), 136 – 145 (1998).
2. В. С. Феденко, *Физиол. и биохим. культурн. раст.*, **32**(3), 236 – 239 (2000).
3. В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, Е. В. Авдеева и др., *Современные аспекты изучения лекарственных растений*, Москва (1995), сс. 151 – 157.
4. Noriko Tabata, Minako Ito, Hiroshi Tomoda and Satoshi Omura, *Phytochemistry*, **46**(4), 683 – 687 (1997).
5. *Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище*, Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, Москва (2004).
6. J. F. Stevens, M. Ivancic, and M. L. Deinzer, *Phytochemistry*, **44**(8), 1575 – 1585 (1997).
7. A. Forster, B. Beck and R. Schmidt, *Hop polyphenols. Hopfenrundschau International*, 68 – 74 (1999).
8. S. Bhattacharya, S. Virani, M. Zavro, and G. J. Haas, *Economic Botany*, **57**(1), 118 – 125 (2003).
9. *Фармакогнозия*, Атлас Н. И. Гринкевич, Е. Я. Ладыгина (ред.), Медицина, Москва (1989), сс. 173 – 176.

Поступила 18.12.03