

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ШЛЯХИ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК, ОТРИМАНИХ ЕКСТРАГУВАННЯМ ШРОТУ ШИШОК ХМЕЛЮ

Досліджено кількісний та якісний склад поліфенольних сполук густого 70 %-го водно-етанольного екстракту зі шроту шишок хмелю, серед яких ідентифіковано галову, хлорогенову, кавову, кумаринову, ферулову, коричну органічні кислоти та флавоноїди: рутин, гесперидин, мірицетин, морин, катехін, кемпферол та кверцетин. Визначено суму амінокислот та основні мікро- та макроелементи та запропоновано основні показники для стандартизації субстанції, зокрема: опис, вміст етанолу, сухий залишок, вміст флавоноїдів і мікробіологічна чистота. Проведено експериментальні дослідження з вивчення антимікробної, антиоксидантної та фотопротекторної активності, отримані результати підтверджують доцільність його використання у складі косметичних та мийних засобів.

Ключові слова: шрот, шишки хмелю, поліфенольні сполуки, флавоноїди, консерванти, біологічна активність, косметичні засоби.

Вступ. Використання біологічно активних сполук природного походження є актуальним для використання в різних галузях промисловості. Одним із перспективних джерел біологічно активних сполук для отримання субстанцій природного походження є відходи рослинної сировини.

Тенденції останнього часу – це введення в косметичні рецептури екстрактів рослин, водоростей, солей. Зростає популярність використання виділених та очищених біологічно активних сполук рослинних екстрактів [1]. Для застосування отриманих екстрактів у складі косметичних засобів потрібно вивчити хімічний склад і стандартизацію основних показників якості субстанції, зокрема, встановити допустимі межі кількісного вмісту основних груп хімічних речовин.

Мета роботи – стандартизація екстракту зі шроту шишок хмелю та обґрунтування шляхів його використання.

Під час розроблення способу вторинної перероблення шроту шишок хмелю використано дані з вивчення хімічного складу, обґрунтування вибору екстрагенту та дослідження кінетики екстрагування поліфенольних сполук [2, 3]. Оптимальними умовами для отримання екстракту з високим вмістом флавоноїдів є екстрагування шроту 70 %-вою водно-етанольною сумішшю методом настоювання.

Матеріали та методи. Попередні дослідження вмісту біологічно активних сполук у шроті шишок хмелю свідчать про високий вміст сполук поліфенольної природи, тому в екстракті визначали поліфенольні сполуки та флавоноїди. Загальний вміст поліфенольних сполук визначено методом спектрофотометрії з реактивом Фоліна-Чокальтеу [4]. Оптичну густину розчину виміряно на спектрофотометрі за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Для побудови стандартної кривої використано концентрації галової кислоти від 0,01 мг/мл до 0,001 мг/мл.

Для визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів використовували реакцію комплексоутворення з алюмінію хлоридом методом спектрофотометрії

на спектрофотометрі Cary 50 Varian [4]. Вміст суми флавоноїдів (мг/мл) у перерахунку на рутин обчислюють за формулою

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 25}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2},$$

де: A – оптична густина випробовуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину СЗ рутину; m_0 – маса СЗ рутину, г.

Ідентифікацію органічних кислот та флавоноїдів у густому екстракті проведено на рідинному хроматографі Agilent з УФ-детектором. Рухома фаза В: ацетонітрил, швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки – 25 °С, час хроматографування – 95 хв. Для повної оцінки корисних властивостей субстанції природного походження важливе значення має вивчення вмісту макро- та мікроелементів. Отже, у густому екстракті зі шроту шишок хмелю методом атомно-абсорбційної спектрометрії на спектрометрі фірми Varian моделі AA 240 Z з ефектом Займана, оснащеним графітовою піччю, визначено вміст макро- та мікроелементів [5].

Кількісне визначення амінокислот проведено методом спектрофотометрії у видимому спектрі за відомою реакцією утворення забарвленого продукту амінокислот з нінгідрином. Одним з важливих показників якості є сухий залишок екстракту, значення якого для густого екстракту повинно бути не менше 70 %, та вміст етанолу, який повинен бути не більше 15 %, методики визначення цих показників наведено у [6, 7].

Для обґрунтування вибору шляхів застосування досліджено біологічну активність комплексу хімічних речовин, які містяться в отриманих екстрактах зі шроту шишок хмелю, а саме: антиоксидантна, фотопротекторна та антимікробна активності. Для оцінки антиоксидантної активності (АОА) застосовано метод, що ґрунтується на реакції 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразила (DPPH) [4]. Антиоксидантну активність обчислювали за формулою

$$AOA(\%) = 100(A_0 - A)/A_0,$$

де: A_0 – оптична густина розчину DPPH у метанолі з концентрацією 2,2 мг/100 мл; A – оптична густина розчину досліджуваного екстракту.

Модель системи для визначення фотопротекторної активності, ґрунтується на УФ-індукованій зміні кольору каротиноїдів екстракту паприки (*Capsicum annuum*) [4]. Рівень фотопротекторної активності визначено за візуальною зміною інтенсивності забарвлення пігментів паприки протягом всього часу опромінення. Для цього робили фотографії через 0, 30, 60, 90 та 120 хв в однакових умовах. Для оцінки антимікробної дії визначено мінімальні інгібуючі концентрації відповідно до методик, описаних в [8, 9]. У досліді використано грампозитивні та грамнегативні штами бактерій і дріжджовий грибок.

Результати дослідження. Загальний вміст поліфенольних сполук у густому екстракті становив 570 г/кг, вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин – 11 г/кг, вміст суми амінокислот – 12 г/кг густого екстракту. Результати ідентифікації основних поліфенольних компонентів екстракту методом ВЕРХ представлено на рисунку.

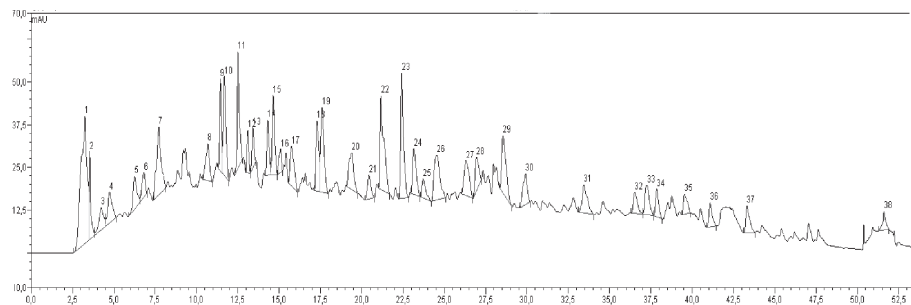


Рис. Хроматограма ВЕРХ екстракту зі шроту шишок хмелю

З 38 сполук, виявлених на хроматограмі, ідентифіковано галову, хлорогенову, кавову, кумаринову, ферулову, коричну органічні кислоти та флавоноїди: рутин, гесперидин, мірицетин, морин, катехін, кемпеферол та кверцетин. Отже, ідентифіковано 13 речовин, серед яких переважають рутин, кверцетин, гесперидин і мірицетин.

З огляду на отримані експериментальні дані визначення макро- та мікроелементів, можна зазначити, що у досліджуваному зразку міститься багато таких важливих мікроелементів, як залізо, марганець, цинк та хром, також виявлено мідь та кобальт, серед макроелементів переважає калій, дещо менше магнію та натрію. Результати дослідження загальної антиоксидантної активності методом DPPH представлено в табл. 1. Наявність антиоксидантної активності можна пояснити присутністю у складі комплексного екстракту великого вмісту поліфенольних сполук.

Табл. 1. Загальна антиоксидантна активність екстракту зі шроту шишок хмелю, визначена методом DPPH

Концентрація екстракту зі шроту шишок хмелю, мг/мл		
1,0	0,5	0,25
90,2 %	51,1 %	25,4 %

Внаслідок проведеного експерименту з вивчення фотопроєкторної активності у зразку з додаванням екстракту зі шроту шишок хмелю забарвлення пігментів паприки зберігається на 60 хв довше, порівняно зі зразком екстракту паприки. Фотозахисні властивості екстракту зі шроту шишок хмелю можна використати у складі косметичних засобів з фотопротекторною дією.

Отримані значення МБцК та МБсК для згущеного 70 %-го водно-етанольного екстракту зі шроту шишок хмелю свідчать про високу активність до грампозитивних та грамнегативних бактерій і дріжджового гриба роду *Candida* (табл. 2). Ці властивості екстракту можна використати для надання косметичним та мийним засобам антибактеріальних та антигрибкових властивостей та запобігти розмноженню мікроорганізмів у косметичному засобі під час використання.

Обговорення результатів. З огляду на отримані експериментальні дані для стандартизації густого екстракту обрано такі показники: опис, вміст етанолу, сухий залишок, вміст флавоноїдів, мікробіологічна чистота (табл. 3). [10].

Табл. 2. Мінімальні інгібуючі концентрації екстракту зі шроту шишок хмелю

Тест-мікроорганізм	Концентрація екстракту зі шроту шишок хмелю, мг/мл	
	МБК/МФК*	МІК
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	0,313	0,156
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,313	0,156
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	3,125	1,56
<i>Salmonella Abony</i> CIP 8039	6,25	3,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12,50	6,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12,50	6,25

*МБК/МФК – мінімальна бактерицидна (фунгіцидна) концентрація, МІК – мінімальна бактериостатична концентрація

Табл. 3. Показники якості густого екстракту зі шроту шишок хмелю

№ з/п	Найменування показника	Характеристика та норма
1	Опис	В'язка маса зелено-коричневого кольору
2	Вміст етанолу	Не більше 15 %
3	Сухий залишок	Не менше 70 %
4	Кількісний вміст флавоноїдів	Не менше 8 г/кг
5	Мікробіологічна чистота	Загальна кількість бактерій не більше 100 на 1 г, відсутність дріжджових і плісневих грибів, відсутність бактерій <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> та родини <i>Enterobacteriaceae</i> .

Завдяки високому вмісту поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, екстракт зі шроту шишок хмелю виявляє антирадикальну активність, що підтверджено експериментальними даними. Однією з проблем, пов'язаною з мийними засобами, є нестабільність їх забарвлення, а саме вицвітання барвників під впливом окислювальних агентів, тому введення антиоксидантів до складу мийних засобів є обов'язковим для забезпечення стійкості їх забарвлення. Для косметичних мийних засобів, шампунів, мил введення в їх рецептуру екстрактів зі шротів рослинної сировини дасть змогу вирішити це питання. Для надання шампуням зволожувальної і захисної дії до їх складу вводять білкові гідролізати. Низькомолекулярні олігопептиди і амінокислоти теж проявляють зволожувальну дію на волосся та шкіру голови.

Швидкість використання, консистенція, а також технологічні властивості мила залежать від вмісту вологи, титру та йодного числа жирних кислот. Введення високоолеїнових фракцій підвищує пластичність і розчинність мила, але спричиняє швидке згіркнення. Тому в мила з підвищеним вмістом ненасичених аліфатичних кислот вводять антиоксиданти. Серед них: багатоатомні і просторово-затруднені феноли, о-толілбігуанідин, кверцетин, лецетин, прополіс, токофероли, каротиноїди і витяжки, що їх вміщують. Синергетиками антиоксидантів є комплекси, амінокислоти, аскорбінова, сорбінова кислоти та їх солі [11].

Антимікробна активність екстракту є актуальною для запобігання розмноженню мікроорганізмів у косметичному та мийних засобах, тобто виступати в ролі консерванту. Консерванти – надзвичайно важливі компоненти косметичних композицій, завдяки яким значно зменшується ризик мікробного забруднення, яке може призвести до псування косметичного засобу. Сонцезахисні

засоби, які можуть піддаватися дії сонячних променів і тепла тривалий час, потребують серйозного захисту від мікроорганізмів. Встановлено, що похідні моносахаридів, сполучені по аномерному атому вуглецю гексоз або пентоз з флавоноїдами виявляють властивості консервантів. Наприклад, гіперозид виявляє бактерицидну та антивірусну дію, ефективний проти екзем та дерматитів, має протизапальний ефект. Рутин завдяки своїм властивостям використовують у багатьох косметичних засобах як БАР та як консервант [1].

Фотопротекторну активність можна пояснити тим, що антиоксиданти послаблюють дію УФ-опромінення на шкіру завдяки нейтралізації вільних радикалів, що утворюються у клітинах під дією УФ-променів. Особливий інтерес косметологів викликають природні антиоксиданти – біофлавоноїди, біофеноли, катехіни та ін.

Традиційно до складу косметичних та мийних засобів для забезпечення позитивного ефекту входять мікро- та макроелементи. Серед виявлених в екстракті мікроелементів важлива роль у засобах догляду за волоссям та шкірою відводиться міді, залізу, цинку, марганцю та макроелементу магнію. Мідь бере участь у синтезі колагену та еластину, пришвидшуючи процес оновлення клітин. Зменшує дію вільних радикалів. Відіграє важливу роль у збереженні природної кислотної реакції шкіри, яка важлива для її захисту від хвороботворних бактерій. Крім цього, мідь впливає на колір шкіри і волосся. Нестача заліза призводить до ламкості волосся, змін шкіри. Цинк, потрібний для підтримки нормального стану шкіри і волосся, здавна відомий у дерматології і косметології як активний протизапальний елемент, зменшує активність речовин, що підтримують процеси запалення. Надзвичайно популярним у складі косметики є марганець. Цей мікроелемент підтримує імунну систему шкірного покриву. Марганець бере участь у синтезі колагену і є його структурним компонентом. Основний результат застосування засобу, у складі якого є марганець, полягає у зменшенні "темних кіл" під очима і набряків. Нестача магнію призводить до випадання волосся, ламкості нігтів, руйнування зубів [12, 13].

Висновки. Внаслідок проведеної роботи запропоновано показники якості для стандартизації густого екстракту зі шроту шишок хмелю. Перевірено доцільність його використання у складі косметичних і мийних засобів, яка підтверджена результатами проведених експериментальних досліджень з вивчення антимікробної, антиоксидантної та фотопротекторної активності. Отже, обраний спосіб екстрагування забезпечує отримання комплексів біологічно активних сполук з повним збереженням їх природних властивостей.

Література

1. Самуйлова Л.В. Косметическая химия : учебник. – В 2-ух ч. – Ч. 1: Ингредиенты / Л.В. Самуйлова, Т.В. Пучкова. – М.: Изд-во "Школа косметических химиков", 2005. – 336 с.
2. Павлюк І.В. Оптимізація процесу використання лікарської рослинної сировини / І.В. Павлюк, Н.С. Стадницька, І. Ясічка-Місяк, П.П. Вечорек, В.П. Новіков // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2015. – Вип. 25.6. – С. 216-220.
3. Павлюк І.В. Дослідження кінетики екстрагування флавоноїдів зі шроту шишок хмелю / І.В. Павлюк, Н.С. Стадницька, В.П. Новіков // Східно-Європейський журнал передових технологій. – 2015. – № 5/11(77). – С. 36-41. DOI: 10.15587/1729-4061.2015.50965.

4. Pavlyuk I. A Study of the Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from Wild Carrot (*Daucus carota* L.) Seeds Waste / I. Pavlyuk, N. Stadnytska, I. Jasicka-Misiak, B. Górka, P.P. Wiczorek and V. Novikov // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – № 6 (2). – Pp. 603-611.

5. ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов / Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии, сертификации. – Минск : Изд-во стандартов. – 2003.

6. Державна фармакопея України. – Вид. 2-ге, [перероб. та доп.]. – Харків : Вид-во "Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", 2011. – 540 с.

7. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарев. – М.: Изд-во "Медицина". – 1976. – 202 с.

8. N 167, 05.04.2007, Наказ, Вказівки, Міністерство охорони здоров'я України Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів".

9. Лабинская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. – М.: Изд-во "Медицина", 2004. – 576 с.

10. European Directive for Cosmetic Products 76/768/EEC; The New EC Cosmetics regulation 1223/2009.

11. Плетев М.Ю. Косметико-гигиенические моющие средства / М.Ю. Плетев. – М.: Изд-во "Химия", 1990. – 272 с.

12. Полова Ж.М. Використання нанорозмірних мікроелементів як активних складових косметичних препаратів / Ж.М. Полова, В.П. Попович, П.В. Глуховський // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики : зб. наук. праць. – 2012. – № 1 (8). – С. 74-77.

13. Башкірова Л. Біологічна роль деяких есенційних макро- та мікроелементів (огляд) / Л. Башкірова, А. Руденко // Ліки України : зб. наук. праць. – 2004. – № 10. – С. 59-65.

Павлюк І.В., Стадницька Н.Є., Новіков В.П. Стандартизація і пути використання комплексу біологічески активних соединений, полученных экстрагированием шрота шишек хмеля

Исследован количественный и качественный состав полифенольных соединений густого 70 %-го водно-этанольного экстракта со шрота шишек хмеля, среди которых идентифицированы органические кислоты и флавоноиды: рутин, гесперидин, миррицетин, морин, катехин, кемпферол и кверцетин. Определена сумма аминокислот и основные микро- и макроэлементы и предложены основные показатели для стандартизации субстанции, в частности: описание, содержание этанола, сухой остаток, содержание флавоноидов и микробиологическая чистота. Проведены экспериментальные исследования по антимикробной, антиоксидантной и фотопротекторной активности, полученные результаты подтверждают актуальность его использования в составе косметических и моющих средств.

Ключевые слова: шрот, шишки хмеля, полифенольные соединения, флавоноиды, консерванты, биологическая активность, косметические средства.

Pavlyuk I.V., Stadnytska N.Y., Novikov V.P. Standardization and Ways to Use Biologically Active Compounds Obtained by Hop Cones Waste Extraction

Quantitative and qualitative composition of polyphenolic compounds of the thick 70 % water-ethanol extract of the hop cones meal is studied. Among them there were identified gallic, chlorogenic, coffee, coumarin, ferulic and cinnamon organic acids and flavonoids such as rutin, hesperidium, myricetin, morin, catechin, kaempferol and quercetin. Main macro and microelements were also defined. Key standardisation indicators such as description, content of ethanol, dry trace, content of flavonoids and microbiological purity were proposed. An experimental research on antimicrobial, antioxidant and photo protective activity was made. The obtained results confirm the advisability of extract use as a part of the cosmetics and detergents.

Keywords: waste, hop cones, preservatives, biological activity, cosmetics, extraction.