

МІНІСТЕРСТВО ОБОРОНИ УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКА ВІЙСЬКОВО-МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

На правах рукопису

ДОБРОВОЛЬНИЙ ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 615.014.2:615.45:615.322:582.635.38

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ СУПЛІДЬ
ХМЕЛЮ В ЯКОСТІ АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО
ІНГРЕДІЄНТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

Спеціальність 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи
та судова фармація

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Науковий керівник:
Шматенко Олександр Петрович,
доктор фармацевтичних наук,
професор

Київ 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ НАПРЯМКИ РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ПОРУШЕНЬ ГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСУ ЕСТРОГЕННОЇ ПРИРОДИ	13
1.1. Сучасні тенденції у лікуванні та профілактиці захворювань, що пов'язані з порушеннями гормонального балансу естрогенної природи	13
1.2. Фітоестрогени: визначення, хімічна структура та номенклатура	16
1.3. Естрогенна активність поліфенольних сполук суплідь хмелю та перспективи створення лікарських засобів на їх основі	18
1.4. Досягнення в технології одержання екстрактів суплідь хмелю, що проявляють естрогенну активність	25
1.5. Методи екстрагування рослинної сировини та їх вплив на загальну ефективність процесу одержання активного фармацевтичного інгредієнта	28
1.6. Належні практики у виробництві фармацевтичних продуктів рослинного походження	33
Висновки до розділу 1	35
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	36
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	36
2.1. Теоретичне обґрунтування компонентного складу сухого екстракту суплідь хмелю	36
2.2. Характеристика об'єктів дослідження	37
2.3. Методи досліджень	41
2.3.1. Фізико-хімічні методи дослідження	41
2.3.1.1. Визначення сухого залишку	41
2.3.1.2. Визначення втрати у масі при висушуванні	42
2.3.1.3. Ідентифікація	42

	3
2.3.1.4. Кількісне визначення	45
2.3.2. Технологічні методи досліджень	52
2.3.2.1. Дослідження динаміки екстрагування рослинної сировини	52
2.3.3. Фармакологічні методи досліджень	54
Висновки до розділу 2	59
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ	60
3.1. Дослідження та визначення оптимальних умов екстрагування ліпофільної фракції суплідь хмелю з метою її видалення з сировини	60
3.2. Дослідження та визначення оптимальних умов екстрагування пренілових флавоноїдів із знежиреної сировини хмелю	68
3.3. Дослідження впливу попередньої термічної обробки суплідь хмелю на кількісний вміст пренілових флавоноїдів у сухому екстракті	72
3.4. Дослідження та визначення сорту хмелю у якості вихідної сировини сухого екстракту	78
3.5. Визначення способу упарювання та сушки екстракту суплідь хмелю	84
3.6. Дослідження впливу концентрації етанолу у екстрагенті на екстрагування пренілових флавоноїдів	88
3.7. Дослідження впливу тривалості зберігання суплідь хмелю на стабільність пренілових флавоноїдів у сухому екстракті	91
Висновки до розділу 3	93
РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ДОСЛІДНО-ПРОМИСЛОВОГО РЕГЛАМЕНТУ ТА ВАЛІДАЦІЯ ПРОЦЕСУ	95
4.1. Розробка дослідно-промислового регламенту та трансфер технології одержання сухого екстракту хмелю у виробництво	95
4.2. Розробка схеми валідації процесу одержання сухого екстракту хмелю	99
Висновки до розділу 4	104
РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ ТА РОЗРОБКА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ	105

5.1. Розробка специфікації сухого екстракту суплідь хмелю	105
5.2. Розробка проекту методів контролю якості сухого екстракту суплідь хмелю	107
5.3. Дослідження стабільності сухого екстракту суплідь хмелю	110
Висновки до розділу 5	115
РОЗДІЛ 6. РЕЗУЛЬТАТИ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ	116
6.1. Доклінічне дослідження впливу активних компонентів екстракту хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику	116
6.1.1. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на біохімічні показники у щурів з метаболічним синдромом	116
6.1.2. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на показники гемостазу у щурів з метаболічним синдромом	119
6.1.3. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан центральної нервової системи щурів з метаболічним синдромом	120
6.1.4. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан серцево-судинної системи щурів з метаболічним синдромом	122
Висновки до розділу 6	125
ВИСНОВКИ	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
ДОДАТКИ	144

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- БАР – біологічно-активна речовина
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
- ГЗТ – гормонозамісна терапія
- ДФУ – Державна фармакопея України
- ЕР – естрогеновий рецептор
- ЄФ – Європейська фармакопея
- ЛЗ – лікарський засіб
- МКЯ – методики контролю якості
- МС – метаболічний синдром
- ПАТ – публічне акціонерне товариство
- СЗ – стандартний зразок
- СОП – стандартна операційна процедура
- ТШХ – тонкошарова хроматографія
- ФЕ - фітоестроген
- ЦНС – центральна нервова система
- 6-PN – 6-пренілнарінгенін
- 8- PN – 8-пренілнарінгенін
- DMX – десметилксантохумол
- DER – (drug to extract ratio) співвідношення «сировина:екстракт»
- ЕМА - Європейська медична агенція
- GACP - Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження
- GMP – Належна виробнича практика
- IX - ізоксантохумол
- X - ксантохумол

ВСТУП

Актуальність теми. Перспективним напрямком практичного застосування фітоестрогенів є лікування розладів, що пов'язані із віковими порушеннями синтезу естрогенів. Фітоестрогени зі схожим механізмом дії з еднотенним естрадіолом здатні впливати на гормональну сферу організму. Традиційними засобами застосування фітоестрогенів в клінічній практиці є природні біофлавоноїди геністеїн, даїдзеїн та куместрол, фітоестрогенна дія яких на даний час встановлена [79, 87, 104, 105].

З аналізу літературних даних відомо, що основним методом лікування та профілактики гіпоестрогенії є гормонозамісна терапія. Проте, зазначений метод має цілий ряд суттєвих побічних ефектів [99].

Сучасні фармакологічні дослідження підтверджують, що найбільш потужним з відомих фітоестрогенів є преніловий флаванон суплідь хмелю (*Humulus lupulus L.*) 8-пренілнарінгенін [30, 74, 89].

Фактором ризику застосування 8-пренілнарінгеніну, як потужного фітоестрогену, є можлива проліферація ракових клітин молочної залози. Вагомою перевагою застосування екстрактів суплідь хмелю (*Humulus lupulus L.*) є фармакологічні властивості інших складових його поліфенольної фракції. Завдяки широкому спектру механізмів інгібування канцерогенезу ксантохумолом, проліферативна активність 8-пренілнарінгеніну може бути врівноважена антипроліферативною активністю ксантохумолу [123].

Схожий механізм дії фітоестрогенів з еднотенним естрадіолом вимагає аналізу ймовірності стимуляції ними канцерогенезу в гормон-залежних органах та тканинах. В цьому напрямку предметом розгляду безпечності застосування фітоестрогенів є здатність геністеїну та даїдзеїну до стимуляції гіперпластичних процесів в ендометрії [60].

Необхідно враховувати те, що не існує оптимальної технології сухого екстракту хмелю, що характеризується високим вмістом фармакологічно-

активних пренілованих флавоноїдів та високим виходом екстрактивних речовин [122, 123].

Таким чином, в цьому аспекті визріла і набула актуальності розробка концептуального науково-практичного підходу одержання сухого екстракту суплідь хмелю, що полягає в обґрунтуванні технології сухого екстракту суплідь хмелю та його кількісного складу, а також дослідження впливу фармако-технологічних факторів на стабільність та якість активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ), вивчення фармакологічних властивостей одержаного екстракту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Української військово-медичної академії (номер державної реєстрації № 0114U003806) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України (Протокол № 80 від 17.04.2013 р.)

Мета і задачі дослідження. Мета роботи - наукове обґрунтування та розробка технології стандартизованого сухого екстракту суплідь хмелю для профілактики та лікування розладів, обумовлених дефіцитом естрогенів або порушенням їх метаболізму.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести аналітичну оцінку літературних даних з метою виявлення перспективи застосування фітоестрогенів в медичній практиці;
- визначити та включити в розробку сорти хмелю з високим вмістом фенольних сполук;
- розробити концептуальну технологічну схему одержання екстракту з врахуванням існуючих підходів та раціональності її імплементації в промислове виробництво;
- дослідити та визначити оптимальні умови технологічних операцій з послідуною розробкою загальної технології сухого екстракту;
- розробити специфікацію та критерії контролю якості продукту;

- розробити дослідно-промисловий регламент на виробництво сухого екстракту суплідь хмелю та апробувати технологію в умовах промислового виробництва;

- узагальнити результати фармакологічних досліджень властивостей сухого екстракту хмелю;

- вивчити стабільність сухого екстракту в процесі виробництва з метою встановлення умов зберігання та терміну придатності.

Об`єкти дослідження. Сухі екстракти та водно-спиртові витяги селекційних сортів суплідь хмелю із контрольованим кількісним вмістом ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнарінгеніну, 6-пренілнарінгеніну; супліддя хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*) селекційних сортів «Ксанта», «Чаклун», «Руслан»; екстрагенти (н-гептан, н-гексан, водно-етанольні розчини різних концентрацій).

Предмет дослідження. Склад та технологія сухого екстракту суплідь хмелю як активного фармацевтичного інгредієнту лікарських засобів.

Методи дослідження. У ході виконання дисертації використані: бібліосемантичний – для узагальнення аналізу літературних і власних експериментальних даних; фармако-технологічні, біофармацевтичні, фізико-хімічні та фармакологічні методи досліджень – для обґрунтування складу та технології сухого екстракту суплідь хмелю; математико-статистичний – для дослідження оптимальних параметрів процесу екстрагування.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у науковому обґрунтуванні, розробці складу та технології сухого екстракту хмелю з підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів, яка включає проведення послідовних операцій: попередня термічна обробка суплідь хмелю (*Humulus lupulus*), видалення ліпофільних речовин екстракцією н-гексаном, екстрагування знежиреної сировини водно-етанольним екстрагентом, упарювання та висушування водно-спиртового витягу у вакуумі.

Вперше проведено комплексне системне дослідження з визначення оптимального сорту хмелю, як вихідної сировини, умов видалення

ліпофільних речовин з сировини та умов екстрагування пренілових флавоноїдів із знежиреної сировини.

Виявлено вплив тривалості зберігання вихідної сировини та термічних процесів стадій упарювання і сушки на кількісні показники сухого екстракту хмелю.

Розроблено специфікацію та методи контролю якості сухого екстракту хмелю, вивчено його стабільність, визначено умови зберігання та термін придатності.

Застосовано та експериментально підтверджено ефективність попередньої обробки вихідної сировини водяною парою, як технологічного інструменту підвищення вмісту фармакологічно-активних компонентів в кінцевому продукті.

Доклінічними дослідженнями фармакологічної активності сухого екстракту суплідь хмелю встановлено виражений вплив його на основні чинники кардіо-метаболічного ризику в умовах дефіциту естрогенів.

Експериментально підтверджено виражену фармакотерапевтичну дію отриманого екстракту, в результаті визначення його якісного та кількісного складу.

За одержаними результатами проведених досліджень з розробки технології отримання сухого екстракту хмелю, збагаченого преніловими флавоноїдами естрогенної дії, подано заявку на отримання патенту України на корисну модель (№ а 2014 03446).

Практичне значення одержаних результатів. У результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено технологію сухого екстракту суплідь хмелю із стандартизованим вмістом 8-пренілнарінгеніну, як основного компонента з відомою терапевтичною активністю. Одержані результати науково-практичних досліджень є фундаментальною основою для оптимізації системних технологічних принципів розробки сухого екстракту суплідь хмелю як АФІ для лікарських засобів з метою лікування та

профілактики патологічних станів, що викликані дефіцитом естрогенів або порушеннями регуляції їх метаболізму.

Розроблено дослідно-промисловий регламент на виробництво препарату «Хмелю суплідь екстракт сухий». Технологію препарату апробовано в умовах промислового виробництва на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ».

Розроблено та апробовано в умовах лабораторії ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» проект методів контролю якості «Хмелю суплідь екстракт сухий».

Фрагменти роботи впроваджено до навчального процесу кафедри промислової фармації Національного фармацевтичного університету (акт від 2014 р.); кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт від 2014 р.); кафедри військової фармації Української військово-медичної академії (акт від 2015 р.); кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО імені П. Л. Шупика (акт від 2014 р.); кафедри технології ліків і біофармації ЛНМУ ім. Данила Галицького (акт від 2015 р.).

Промислове виробництво сухого екстракту суплідь хмелю апробовано і впроваджено на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (акт від 2015 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею.

У комплексному дослідженні, над яким працював творчий колектив співавторів публікацій, дисертантом особисто отримані такі результати:

- здійснено інформаційний пошук, проаналізовано та узагальнено аналіз літературних даних з питань щодо перспективи застосування фітоестрогенів в медичній практиці;

- обґрунтовано методичний підхід у виборі методів досліджень;

- встановлено оптимальний сорт хмелю як вихідної сировини;

- розраховано та запропоновано дози тест-зразка, узгоджено протокол дослідження та напрацьовано необхідну кількість екстракту хмелю для проведення експерименту;

- досліджено і визначено оптимальні технологічні параметри на всіх стадіях виробництва;

- проведено фізико-хімічний аналіз рослинної сировини та отриманих зразків екстрактів;

- вивчено стабільність прелінових флавоноїдів в сухому екстракті та встановлено вплив тривалості зберігання вихідної сировини на якість екстракту.

Постановка завдань, обговорення отриманих результатів, формулювання основних положень та висновків здійснені за участю наукового керівника. Результати випробувань статистично оброблені, систематизовані та проаналізовані дисертантом. Персональний внесок в усіх опублікованих із співавторами наукових працях (О. П. Шматенком, А. С. Шаламаєм, Л. В. Безпалько, В. Л. Савицьким, В. В. Страшним, Л. В. Проценко, Р. І. Рудиком, Ю. О. Слободянюком, С. О. Фесенком) вказується за текстом дисертації, а також в авторефераті у списку опублікованих праць. Дисертант висловлює глибоку подяку всім співавторам публікацій за плідну спільну співпрацю.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на республіканських та міжнародних конференціях: VII Національний з'їзд фармацевтів України (Харків, 2010); IV Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 2014), науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Харків, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 10 робіт, з яких 6 наукових статей (в тому числі – 5 статей у фахових виданнях, 1 – у закордонному науково-метричному виданні), подано заявку на отримання патенту України на корисну модель (№ а 2014 03446), 3 тези доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на **160** сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту – **127** сторінок), складається зі вступу, шести розділів, висновків, 7 додатків. Дисертація ілюстрована **27** рисунками і **13** таблицями. Список використаних джерел містить 130 посилань, з яких 100 іноземних авторів.

РОЗДІЛ 1

ОСНОВНІ НАПРЯМКИ РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ПОРУШЕНЬ ГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСУ ЕСТРОГЕННОЇ ПРИРОДИ

1.1. Сучасні тенденції в лікуванні та профілактиці захворювань, що пов'язані з порушеннями гормонального балансу естрогенної природи

Важливу роль в організмі жінки відіграють статеві гормони. Їх надмірна або недостатня кількість однаково небезпечні, так як порушення гормонального балансу призводить до небезпечних розладів.

За своєю хімічною природою жіночі статеві гормони, або естрогени, є C18-стероїдами з ароматичним кільцем та гідроксильною групою біля третього атому вуглецю. Існує три фізіологічно-важливих естрогени: естрон, естрадіол та естріол (рис. 1.1).

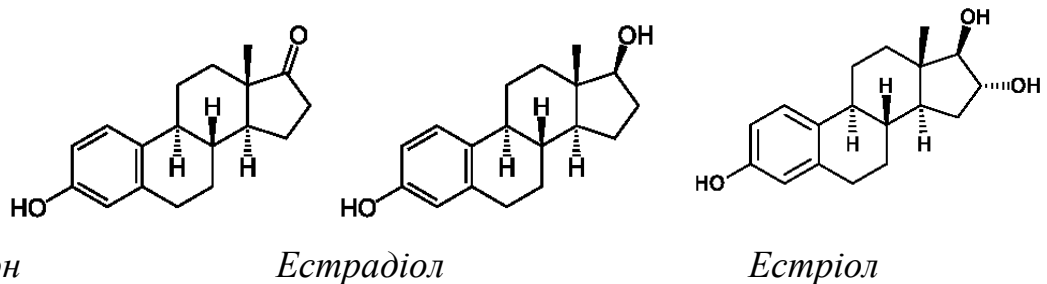


Рис. 1.1. Структура естрогенів

У дорослому жіночому організмі естрогени виробляються фолікулами яєчників, плацентою (в період вагітності) та частково корою надниркових залоз.

Естрадіол – найбільш активний та головний естроген, що синтезується в яєчниках. У середньому, в яєчниках жіночого організму репродуктивного віку продукується декілька сотень мікрограм естрадіолу на добу, при цьому тривалість напівжиття даного гормону складає біля трьох годин. Окрім

естрогенів, фолікул яєчника секретує і ряд інших статевих гормонів, основним з яких є андростендіон.

Естрогени чинять багаточисельний вплив на жіночий організм. Їх основне призначення, спільно з прогестероном та гонадотропінами, полягає у контролі розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи та забезпеченні всього комплексу заходів, які направлені на підготовку жіночого організму до вагітності, виношування плоду та пологам. До даного комплексу заходів відносяться: розвиток вторинних статевих ознак, поява статевого потягу, забезпечення виходу яйцеклітини у статеві шляхи та можливість її запліднення після овуляції, структурні зміни у тканинах статевої системи, збереження кислого середовища, розвиток молочних залоз та інше.

Окрім цього, естрогени беруть участь у регуляції метаболізму кісткової тканини (підтримка міцності та запобігання резорбції кісток), видільної системи (регуляція водно-сольового обміну), а також серцево-судинної (зниження рівня ліпідів у крові та захист від атеросклерозу) та нейроендокринної систем.

Негативний вплив естрогенів проявляється у стимуляції канцерогенезу у гормонзалежних органах та тканинах. В якості ключових індукторів та провідників внутрішньоклітинних проліферативних сигналів, естрогени (головним чином естрадіол) за певних умов здатні стимулювати ріст доброякісних та злоякісних пухлин в епітелії молочної залози, ендометрії та шийці матки, епітелії та ендотелії слизових оболонок.

Тривалість репродуктивного життя жіночого організму обмежена. Протягом 10-15 років жіночий організм перебуває у фізіологічному періоді - клімактерії, фазі життя жінки між фертильним періодом та старістю. Продовж клімактеричного періоду на фоні загальних вікових змін, переважають інволюційні процеси у репродуктивній системі. Даний перехідний період жінки характеризується виразними гормональними змінами, результатом яких є припинення флуктуації яєчникових гормонів,

припиняються менструації, тобто настає менопауза. При цьому з'являється дефіцит естрогенних гормонів, головним продуцентом яких є фолікулярні клітини яєчника. Дані зміни впливають на фізіологічний та психологічний стан жінки. Біля 40-60% жінок у періменопаузі зазначають типові вазомоторні та психоемоційні симптоми, об'єднані у термін «клімактеричний синдром». До останнього відноситься цілий комплекс наслідків, таких як зниження фізичної та розумової працездатності, інтересу до життя, психоемоційні зсуви. Пізніше виникають обмінні порушення, які проявляються в трофічних змінах уrogenітального тракту, метаболічних змінах ліпідного спектру крові, які відповідальні за підвищення частоти серцево-судинних захворювань і, нарешті, розвиток постменопаузального остеопорозу. Результатом збільшення тривалості життя людини у розвинутих країнах з'явилося збільшення кількості жінок, які знаходяться у періоді менопаузи біля 30 років. У зв'язку із цим виникла проблема найближчих та віддалених наслідків, що виникають через вікове вимкнення менструальної функції [26].

Так як менопауза є гормонодефіцитним станом, «золотим стандартом» лікування та профілактики порушень, пов'язаних з гормональним дисбалансом естрогенної природи, є гормонозамісна терапія [25].

Не дивлячись на те, що ГЗТ є основним методом лікування та профілактики порушень, даний метод має цілий ряд побічних наслідків: підвищений ризик злоякісних утворень ендометрію, матки, молочної залози, ризик захворювань жовчного міхура та судинного тромбозу, інфаркту міокарда, алергічні реакції, а також збільшення маси тіла, надлишкового росту волосся, на обличчі та тілі. При цьому у 15-20% пацієнток ГЗТ не викликає необхідного позитивного ефекту [99].

У лікуванні та профілактиці симптомів клімаксу, альтернативою ГЗТ виступають рослинні лікарські засоби, терапевтично-активними компонентами яких є речовини естрогеноподібної дії – фітоестрогени [87, 104].

1.2. Фітоестрогени: визначення, хімічна структура та номенклатура

Фітоестрогени – це будь-які речовини рослинного походження або метаболіти, які можуть моделювати або імітувати дію ендогенних естрогенів, зазвичай шляхом зв'язування з естрогенними рецепторами. Класичне визначення естрогенів відноситься до речовин, які спричиняють естрогенні ефекти на центральну нервову систему, викликають еструс та стимулюють ріст статевого тракту у самиць тварин. Сучасне визначення ФЕ застосовується до біологічно-активних сполук рослинного походження, для яких естрогенні ефекти при їх введенні у організм проявляються за наступними механізмами [75, 79, 84, 93]:

- взаємодія з естрогенними рецепторами для модуляції експресії естрогензалежних генів;
- інгібування ферментів, що задіяні у біосинтезі та метаболізмі естрогенів;
- модуляція біосинтезу гормонів щитовидної залози;
- інгібування протеїнкіназ та взаємодія з компонентами клітинного циклу, у тому числі проліферації, диференціації та апоптозу;
- інгібування топоізомерази;
- антиоксидантні реакції.

У залежності від хімічної структури ФЕ поділяються на дві основні групи: флавоноїди та нефлавоноїди (рис. 1.2). До групи флавоноїдів належать більшість відомих і найпотужніших ФЕ, які у свою чергу утворюють три класи фенольних сполук: куместани, пренілові флавоноїди та ізофлавоїди. До групи нефлавоноїдів належать ФЕ класу лігнанів [87, 91].

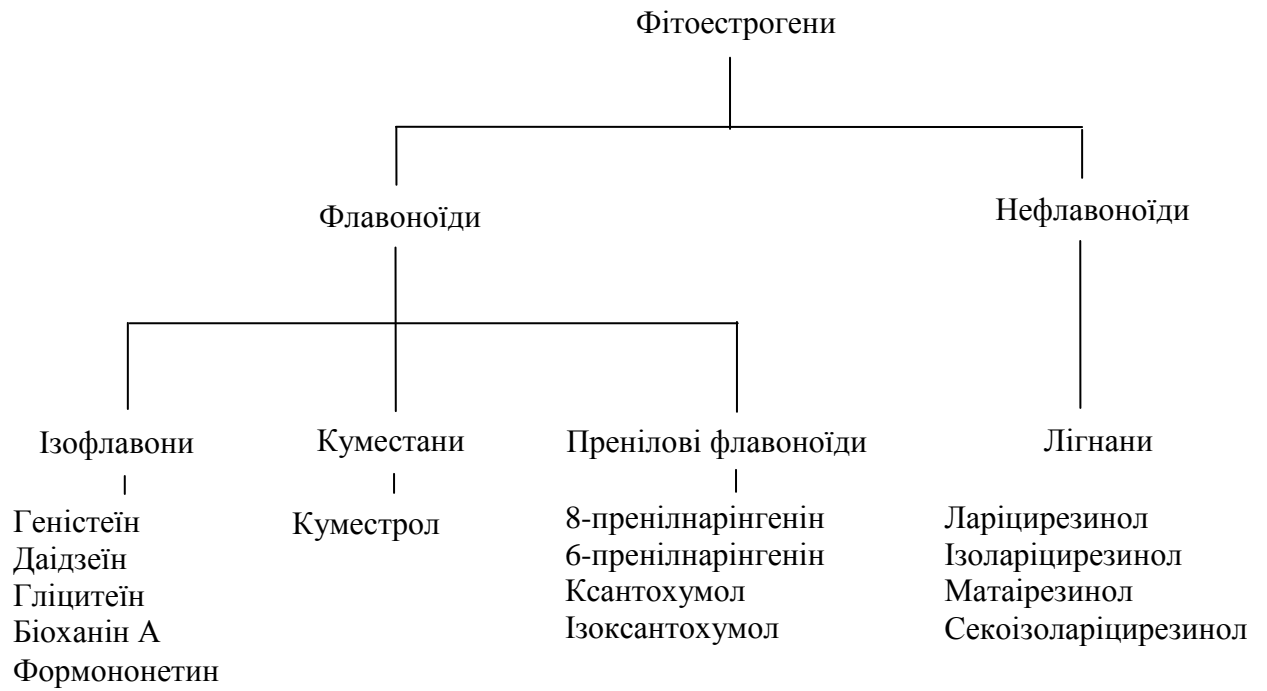
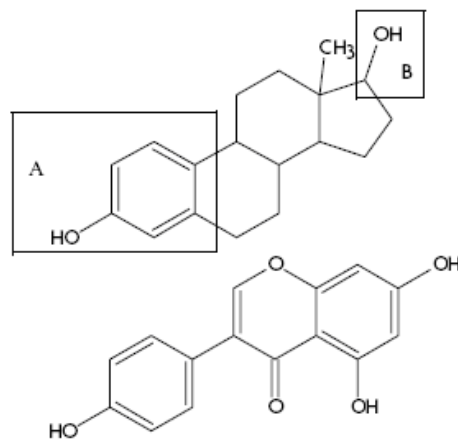


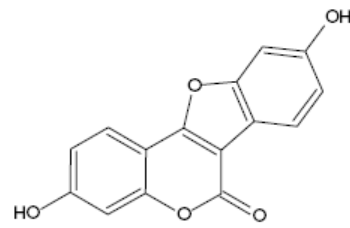
Рис. 1.2. Схематичний зв'язок між групами ФЕ та найменування їх основних представників

Фармакологічна активність ФЕ пов'язана схожістю їх хімічної структури зі структурою ендogenous естрогену естрадіолу. Структури всіх чотирьох класів ФЕ містять фенольний (Блок А) та гідроксильний (Блок В) фрагменти. Наявність даних фрагментів та відстань між ними є схожою до структури естрадіолу (рис. 1.3) [51, 87, 91, 92, 94].

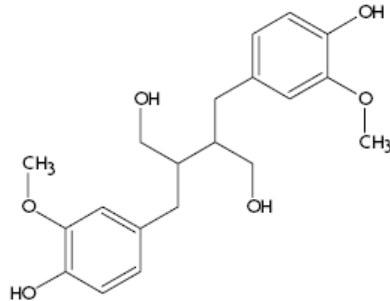


Естрадіол

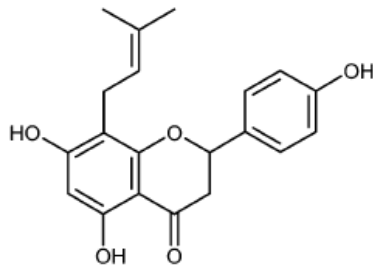
Геністеїн



Куместрол



Секоізоларіцирезинол



8-пренілнарінгенін

Рис. 1.3. Структурна подібність ФЕ до естрадіолу

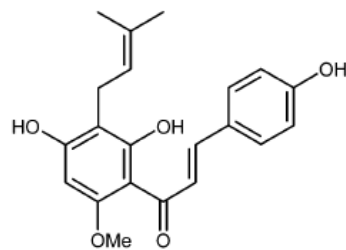
Спорідненість та виняткова стабільність дифенольної структури ФЕ з структурою естрадіолу дозволяє зв'язуватись ФЕ з ЕР. Однак, даний вплив є не єдиним механізмом, що обумовлює ефекти ФЕ, так як багато з них можуть бути не пов'язані з естрогенними властивостями вищезазначених сполук [76, 92, 110, 113].

1.3. Естрогенна активність поліфенольних сполук суплідь хмелю та перспективи створення ЛЗ на їх основі

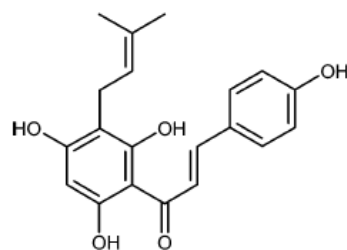
Супліддя хмелю (*Humulus lupulus L.*) впродовж багатьох століть використовуються в якості консерванту та ароматизатору при виробництві пива. Проте, дане використання хмелю не є єдиним. Завжди існувало припущення, що супліддя хмелю та продукти на його основі володіють потужною естрогенною активністю. Так, хмельові ванни традиційно застосовують при лікуванні гінекологічних розладів, а екстракти хмелю здатні ефективно зменшувати приливи у менопаузальних жінок [47, 58].

Естрогенну активність хмелю пов'язували із пренілованим халконом ксантохумолом, але експериментального підтвердження даної дії немає. Початкові наукові дослідження естрогенної активності хмелю призвели до суперечливих висновків. Деякі ранні дослідження звітували про досить високу його активність, а інші взагалі не фіксували естрогеноподібної дії об'єкту. Ймовірно, дані розбіжності стосовно потенційної активності хмелю пов'язані із варіабельністю природи екстрактів та застосованих до них кількісних методів аналізу [39, 40, 95, 178, 125, 127, 129].

Подальші дослідження естрогенної активності екстрактів хмелю *in vitro* встановили, що дана активність обумовлена саме полярною поліфенольною фракцією. ВЕРХ фракціонування зазначених полярних екстрактів хмелю показала, що основна активність (>95%) пов'язана з відносно-неполярною поліфенольною фракцією, основними конститuentами якої є два пренілованих халкона: десметилксантохумол та ізоксантохумол і три пренілованих флаванони: ізоксантохумол, 6-пренілнарінгенін та 8-пренілнарінгенін (рис. 1.4). Ізоляція індивідуальних компонентів цієї фракції встановила, що основна естрогенна активність належить 8-PN. Щодо інших компонентів, то 6-PN проявляв дуже слабку естрогенну активність (<1/100 до 8-PN), IX був слабоактивний у визначенні на клітинах Ishikawa (\approx 1/100 до 8-PN) та неактивний у дріжджових клітинах. Ксантохумол (X), який до цього вважався «естрогеном хмелю», взагалі був неактивний в обох визначеннях [74].



Ксантохумол (X)



Десметилксантохумол (DMX)

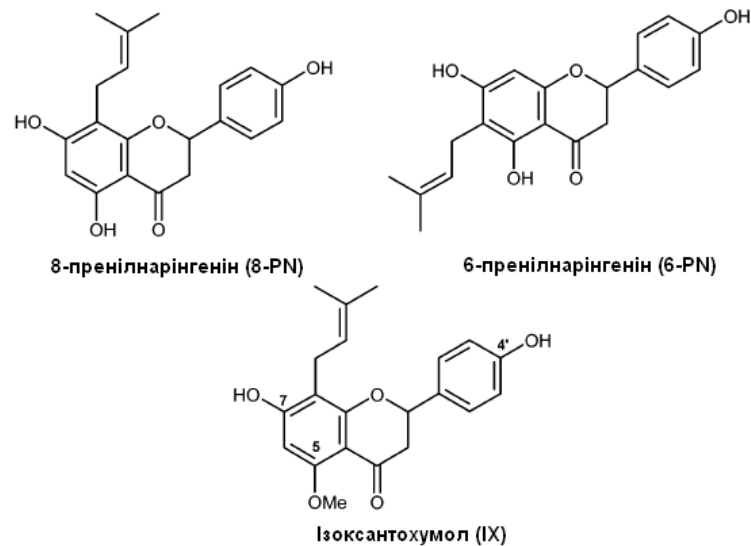


Рис. 1.4. Структура основних пренілованих поліфенолів хмелю

На сьогоднішній день існує велика зацікавленість у дослідженнях, спрямованих на оцінку ФЕ стосовно співвідношення користь-ризик. Враховуючи потенційний вплив 8-PN на організм людини та його високу естрогенну активність, необхідними постали дослідження природи активності даної сполуки у комбінації *in vivo* та *in vitro* та здатності зв'язування 8-PN з обома ізоформами ER α та ER β . Крім того, так як 8-PN містить хіральний центр в C(2) та може існувати як в (*R*)- так і в (*S*)- формах. Естрогенна активність даних енантіомерів також має бути вивчена [79].

Дослідження порівняльної естрогенної активності природного та напівсинтетичного 8-PN показали еквівалентну активність об'єктів. 8-PN виявив потужнішу естрогенну активність *in vitro* у порівнянні із іншими відомими ФЕ [74, 89].

Розділення 8-PN хіральною ВЕРХ показало приблизно однакові кількості енантіомерів як в природній, так і в напівсинтетичній сполуці. Обидва енантіомера продемонстрували схожу естрогенну активність. Енантіомери 8-PN конкурували з естрадіолом по зв'язуванню з ER α та ER β , встановивши відносну зв'язувальну здатність [65, 89].

Визначення рецепторного зв'язування *in vitro* продемонструвало, що 8-PN проявляє в 2 рази більшу зв'язувальну здатність з ER α , ніж з ER β та те, що 8-PN є найсильнішим агоністом ER α рослинного походження з відомих до

сьогодні. Його агонізм до $ER\alpha$ є у 10 разів більшим за куместрол, у 100 разів більшим за геністеїн та лише у 70 разів слабший за 17β -естрадіол. Транс-активаційний аналіз також продемонстрував у 3,6 разів більшу естрогенну активність 8-PN на $ER\alpha$, ніж на $ER\beta$, що є сильним контрастом з переважною активацією $ER\beta$ куместролом та геністеїном. Таким чином, імітуючи ефекти ендогенних гормонів, 8-PN може бути природнім селективним модулятором ER з багатообіцяючим потенціалом у лікуванні різних естроген-дефіцитних станів [30].

Експериментальні дані, одержані у ряді наведених досліджень, підтверджують те, що 8-PN є найбільш потужним з відомих фітоестрогенів, активність якого проявляється через рецептор-опосередкований механізм. Він однаково сильно з'єднується з обома ізоформами ER , проте у контрасті із іншими відомими ФЕ, 8-PN є більш селективним до $ER\alpha$. Маючи схожі профілі з ендогенним естрадіолом, 8-PN може повторювати його ефекти, хоч у залежності від систем дослідження та реакційних умов, його активність є у 5-100 разів слабшою за 17β -естрадіол. Крім того, ряд *in vitro* та *in vivo* досліджень демонструють поряд із потужною естрогенною активністю здатність 8-PN до антиандрогенної активності, інгібування ангиогенезу та метастазів, запобігання руйнування кісткової тканини. Зазначені властивості ФЕ хмелю, характеризують його як потенційну основу для «рослинної» альтернативи ГЗТ. Відповідно, виникає потреба у дослідженнях, спрямованих на оцінку співвідношення користь-ризик відносно впливу конститuentів хмелю на організм людини. [31, 32, 37, 89, 94, 101].

Виходячи із обґрунтованої практичної зацікавленості у пренілованих флавоноїдах хмелю, зокрема в 8-PN, дослідниками було звернуто увагу на головне харчове джерело даних компонентів – пиво. В залежності від технологічного процесу пивоваріння та використаного сорту хмелю, концентрація даних сполук в продукті може досягати 4 мг/л. Відомо, що домінуючим пренілованим флавоноїдом у сировині є халкон X (до 1% мас/мас), проте в процесі варіння суслу відбувається термічна ізомеризація,

внаслідок якої більша частина X трансформується в IX (рис. 1.5). Як результат, основним пренілфлавоноїдом пива є IX, концентрації якого коливаються від 500 мкг/л (лагер/пілснер) до 4 мг/л (міцний ель). Щодо іншого халкону DMX, то внаслідок термічної ізомеризації він трансформується до 8-PN та 6-PN (рис. 1.5) у варіабельних співвідношеннях між собою. Хоча максимальна концентрація 8-PN у пиві може досягати 100 мкг/л, загальна естрогенність напою є у 500-1000 разів нижча в порівнянні з небезпечною концентрацією, визначеною на щурах *in vivo* (≈ 100 мг/л). Крім того, сучасне масове виробництво пива застосовує екстракти хмелю, а не цільну його сировину, що суттєво знижує або виключає вміст 8-PN в кінцевому продукті [50, 64, 74, 89, 97, 108, 109].

Представлена здатність пренілфлавоноїдів хмелю до термічної ізомеризації (циклізації) є важливим фактором в процесі розробки технологічного процесу одержання фармакологічно-активної субстанції. Проте, не менш важливим, є необхідність вивчення їх можливої біотрансформації в організмі.

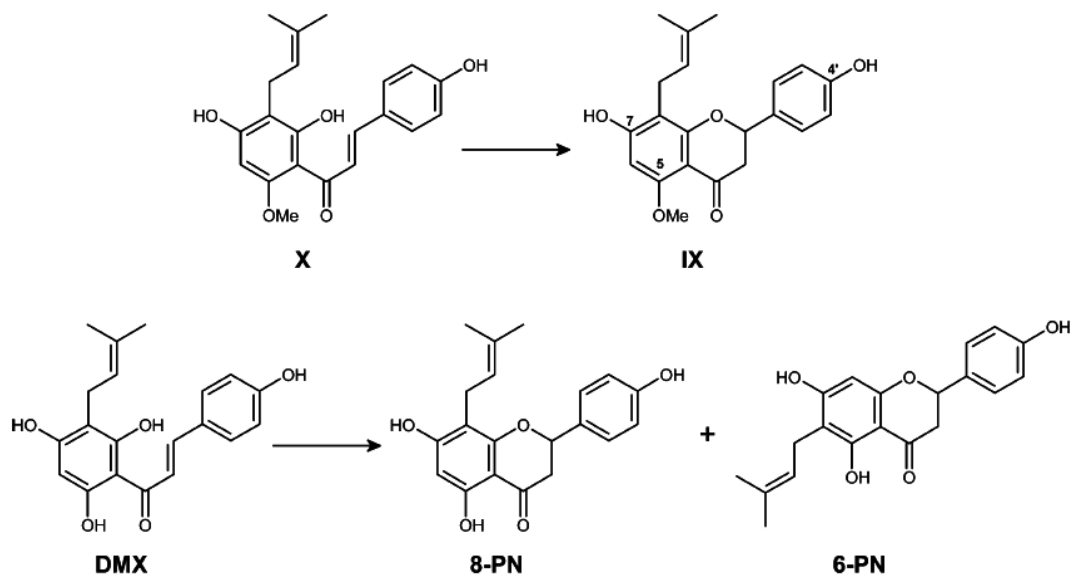


Рис. 1.5. Термічна ізомеризація пренілованих халконів хмелю

Важливим фактором, що впливає на біодоступність та активність ФЕ, є їх метаболічний шлях після прийому всередину. Після досягнення товстої кишки, флавоноїди у залежності від їх структури частково деградують, що

призводить до зниження біодоступності. Однак, для окремих ФЕ описано, що мікробіологічна трансформація у товстій кишці може навпаки підвищувати їх біологічну активність. Нещодавно аналогічне явище було зафіксовано і для пренілованих флавоноїдів хмелю. Враховуючи здатність бактеріальних ензимів товстої кишки людини до каталізу багатьох реакцій, зокрема, деметилюванню, підвищення естрогенної активності продуктів хмелю після введення у організм можна пояснити біологічною трансформацією 8-PN з IX шляхом O-деметилювання останнього. Підтвердженням даного припущення є результати ряду *in vitro* та *in vivo* досліджень які свідчать, що в залежності від індивідуальних особливостей мікрофлори кишечника людини, конверсія IX може майже у 10 разів підвищувати концентрацію наявного 8-PN, що дозволяє сміливо віднести дану сполуку до про-естрогенів і має бути обов'язково враховано при створенні лікарських засобів [35, 73, 84, 109, 114].

У той час, як вже попередньо було зазначено, 8-PN є найбільш потужним з відомих ФЕ, інший поліфенол хмелю X продемонстрував широкий спектр інгібуючих механізмів на ініціацію, розвиток та прогресуючий стан канцерогенезу [41, 46, 124].

Аналізуючи вищезазначену потужну естрогенну активність 8-PN та схожість його профілів з ендогенним естрадіолом, даний поліфенол потенційно здатен викликати розвиток гормон-залежних ракових пухлин. Враховуючи більшу селективність зв'язування 8-PN з ER α та домінуючу присутність даної ізоформи рецептора в молочній залозі, фактором ризику застосування 8-PN є можлива проліферація ракових клітин цього органу. Проте, широкий спектр механізмів інгібування канцерогенезу X, проліферативна активність 8-PN може бути врівноважена антипроліферативною активністю X.

Підтвердженням даного припущення є результати досліджень відносно впливу даних сполук на проліферацію ракових клітин молочної залози MFC-7. Згідно одержаних даних, підвищення концентрації 8-PN, дійсно, призводило до посилення проліферації. Однак, дослідниками було

несподівано встановлено, що додавання низьких концентрацій X до кожної концентрації 8-PN при відповідному співвідношенні між компонентами менше 10:1 стимулює проліферацію ракових клітин викликану 8-PN. Додавання ж більших концентрацій X, а саме у співвідношенні між X та 8-PN не менше 10:1, значно інгібувало проліферацію ракових клітин молочної залози MFC-7. Таким чином, дослідниками було зроблено висновок, що можлива проліферативна активність викликана 8-PN, може бути пригнічена або навіть нейтралізована присутністю X. Однак, ефективне інгібування проліферації досягається у тому випадку, коли вагове співвідношення у певному продукті між X та 8-PN становить щонайменше 10:1 [123].

До публікації, щодо ідентифікації 8-PN як потужного ФЕ, було проведено лише одне клінічне дослідження стосовно естрогенних властивостей хмелю. Незважаючи на те, що автори цього плацебо-контрольованого дослідження і звітують про ефективність препарату щодо лікування приливів, досліджуваний об'єкт не був стандартизований по жодному сучасному стандарту, що не дає змоги об'єктивно оцінити ефективність певного компонента або групи компонентів хмелю на загальний ефект [74].

Перше проспективне, рандомізоване, подвійне-сліпе плацебо-контрольоване дослідження по застосуванню екстракту хмелю для послаблення менопаузальних дискомфортів було проведено у 2006 році. Об'єктом даного дослідження був стандартизований по вмісту 8-PN сухий екстракт хмелю у капсулах, одержаний водно-етанольним розчинником з попередньо екстрагованої надкритичним CO₂ сировини. Результати засвідчили більш виражений ефект при лікуванні 100 мкг 8-PN та не встановили залежності «доза-відповідь». Автори дослідження прийшли до висновку, що щоденний прийом екстракту хмелю стандартизованого за вмістом 8-PN ефективно впливає на вазомоторні симптоми та інші дискомфортні стани менопаузи [33].

Рандомізоване, подвійне-сліпе, плацебо-контрольоване, перехресне пілотне дослідження стандартизованого екстракту хмелю у добовій дозі 8-PN 100 мкг на послаблення менопаузальних дискомфортів встановило, що в той час, коли перший період лікування продемонстрував схожі результати зниження менопаузальних дискомфортів в обох досліджуваних групах, результати другого періоду лікування свідчили про перевагу стандартизованого екстракту хмелю над плацебо. Таким чином, препарати на основі екстракту хмелю стандартизованого по вмісту 8-PN, можуть бути цікавою альтернативою у полегшенні вазомоторних порушень [34].

Наведені результати досліджень пренілованих флавоноїдів хмелю свідчать про перспективність одержання з сировини активного фармацевтичного інгредієнта, що буде наділений потужною естрогенною активністю, притаманною 8-PN, у гармонійному поєднанні з хемопревентивною протираковою активністю X. Особливу увагу слід приділяти також кількісному вмісту у препараті IX, тому що дана сполука здатна конвертуватись до 8-PN під дією мікрофлори кишечника, що збільшує естрогенну активність продукту. Враховуючи це, при розробці лікарських засобів на основі поліфенолів хмелю, як рослинної альтернативи ГЗТ, слід враховувати активність та властивості даних компонентів. Крім того, для успішності та достовірності наступних досліджень та відповідного впровадження у клінічну практику, препарати хмелю мають обов'язково бути стандартизованими по зазначеним активним конститuentам.

1.4. Досягнення у технології одержання екстрактів суплідь хмелю, що проявляють естрогенну активність

На сьогоднішній день описано декілька способів одержання екстрактів хмелю із підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів, основні з яких наведені нижче.

Відомим способом отримання екстракту хмелю, збагаченого преніловим флавоноїдами X, IX, 6-PN та 8-PN є спосіб, що включає наступні стадії [122]:

1. Екстрагування сировини хмелю за допомогою C_5-C_7 алканів чи надкритичного CO_2 з метою видалення гідрофобних речовин;
2. Екстрагування водою залишку сировини, отриманого на стадії 1 для видалення гідрофільних речовин при температурі в межах 60-95 °С;
3. Екстрагування залишку сировини, отриманого на стадії 2 водно-етанольним розчинником.

Під час екстракції водою на стадії 2, концентрації IX, 6-PN та 8-PN у отриманих екстрактах зростали з підвищенням температури. Слід зазначити, що запропонований метод одержання екстракту хмелю передбачає ряд додаткових технічних рішень. Так, для забезпечення ефективності екстрагування на кожній із зазначених стадій, автори способу застосовували диспергування сировини у екстрагенті з наступним постійним перемішуванням екстракційного середовища. У свою чергу, створення такої динамічної умови як диспергування, вимагає проведення спеціалізованих операцій розділення утворених дисперсних систем (золів) на кожній із стадій, що значно ускладнює загальний технічний аспект запропонованого методу одержання екстракту хмелю. У залежності від умов виділення, вихід пренілових флавоноїдів X, IX, 8-PN та 6-PN з сировини становив у межах 0,609-0,756%; 0,026-0,083%; 0,011-0,027%; 0,049-0,095% відповідно. Вагове співвідношення $8-PN/(8-PN+6-PN) \times 100\%$ у кожному зі зразків екстрактів знаходилось у межах 18-25%, вагове співвідношення між X та 8-PN у межах 25,4 - 67,7.

Інший відомий спосіб отримання екстракту хмелю, збагаченого 8-пренілнарінгенином (8-PN), з естрогенною та антипроліферативною дією, включає наступні основні стадії [123]:

1. Застосування для сировини хмелю реакції ізомеризації в інертній атмосфері у водному лужному середовищі, у межах концентрацій калію

гідроксиду (мас/об%) 0,1, 0,5, 1, 1,5 при температурі у межах між кімнатною та 60⁰С, та протягом часу у проміжку 0,25-4,0 год.;

2. Екстрагування залишку органічними розчинниками, вибраними з групи спиртів, водних сумішей спиртів, кетонів, водних сумішей кетонів або ефірів та їх сумішей або підлуженою водою.

Автори даного способу одержання відзначають довільну послідовність наведених стадій, але описують проведення попереднього екстрагування хмелю або хміль-продукту за допомогою рідкого або надкритичного CO₂, або неполярним органічним розчинником з метою видалення гідрофобних речовин та використання в якості вихідної сировини будь-яких різновидів обробленого хмелю (в т.ч. екстрактів).

Обов'язковою умовою вищенаведеного способу одержання екстракту хмелю є витримування вагового співвідношення між X та 8-PN щонайменше у межах від 10 до 30, адже саме даний діапазон співвідношення передбачає врівноваження можливої проліферативної активності 8-PN антипроліферативною активністю X. Крім того, автори передбачають змішування екстракту, одержаного вищезгаданим методом, з екстрактом збагаченим X. Зростання співвідношення $8\text{-PN}/(8\text{-PN}+6\text{-PN})\cdot 100\%$ у екстракті більше за 50% призводить до суттєвого зменшення співвідношення між X та 8-PN. Вихід пренілових флавоноїдів X, IX, 8-PN та 6-PN з сировини до і після ізомеризації у 5% розчині калію гідроксиду у воді становили 0,332%, 0,014%, 0,004%, 0,013% та 0,018%, 0,329%, 0,012%, 0,004% відповідно. Співвідношення $8\text{-PN}/(8\text{-PN}+6\text{-PN})\cdot 100\%$ до та після ізомеризації становило 23% та 73%. При цьому вагове співвідношення між X до 8-PN було 84,8 та 1,5. Таким чином, отримано екстракт збагачений 8-PN, із ваговим співвідношенням $8\text{-PN}/(8\text{-PN}+6\text{-PN})\cdot 100\%$ не меншим 50%.

З наведених способів отримання екстрактів хмелю, збагачених преніловими флавоноїдами з естрогенною дією, видно, що за технічним вирішенням винаходи переважанні складними технологічними методами виконання окремих стадій або ж виходи пренілових флаванонів,

залишаються у кількісних величинах не оптимальними та не з найкращим співвідношенням активних речовин, а саме X та 8-PN.

1.5. Методи екстрагування рослинної сировини та їх вплив на загальну ефективність процесу одержання активного фармацевтичного інгредієнта

Технологія виробництва активних фармацевтичних інгредієнтів з лікарської рослинної сировини залежить від форми кінцевого продукту. Для настоянок, загальна технологічна схема включає мінімальний набір основних стадій: підготовку сировини, екстрагування, відстоювання, фільтрування, пакування. Для густих екстрактів, у технологічному ланцюзі додається стадія упарювання витягу. Термічні процеси, що супроводжують видалення екстрагентів з випарюваних витягів, призводять до деструкції БАР, тому зазначений процес у фітохімічному виробництві проводять в умовах вакууму. Виробництво сухих екстрактів має найбільш повний, з застосованих у виробництві рослинних препаратів, набір стадій [71, 81, 98, 103].

Сушка екстрактів має враховувати термолабільну природу рослинних сполук, тому повинна протікати швидко (розпилювальна сушка), або при ощадливих температурних умовах (ліофільна сушка та вакуумна сушка). Вибір способу сушки є надзвичайно важливим етапом в розробці технології АФІ, адже від обраного способу залежить не тільки кількісні характеристики продукту, а й його фармако-технологічні властивості. Саме кристалічний або аморфний стан порошку є фактором впливу на сипучість, гігроскопічність, розчинність та пресування сухого екстракту [44, 82, 116, 130].

Зі всього переліку стадій процесу одержання екстрактів, найбільш важливою стадією є стадія екстрагування. На даній стадії процесу формується набір БАР та їх концентрація у кінцевому продукті, а також обумовлюється направленість його фармакологічної дії [56, 62, 63, 66, 67, 69, 102, 119].

На теперішній час фармацевтична промисловість використовує ряд методів екстрагування рослинної сировини. Найбільш застосовними є перколяція, реперколяція, циркуляційне екстрагування, мацерація, ремацерація, екстрагування протитоком з перемішуванням. В останній час значної популярності набувають технічно складні методи ультразвукової, мікрохвильової, над- та докритичної CO₂ екстракції. Кожен з вищеперерахованих методів мають суттєві недоліки: тривалість процесу, енергоємність, не повне виснаження сировини, висока вартість обладнання, що у сукупності впливають на собівартість продукту [43, 48, 55, 72, 78, 90, 107, 112, 117, 128].

Класична перколяція, що полягає у проціджуванні екстрагенту скрізь рослинний матеріал, включає три послідовних стадії: намочування сировини (4-5 год.) , настоювання (24-48 год.) та безпосередньо перколяцію. Більш статична модифікація екстракційних методів – мацерація та її різновиди, до сьогодні є основними застосовуваними методами у процесі виготовлення рослинних препаратів (екстрактів, настоек, витягів) та лікарських засобів на їх основі. Але зазначений метод екстрагування, як і перколяційні методи є недостатньо ефективним. Головними критеріями негативної оцінки, є неповнота переносу активних компонентів з сировини та тривалість стадії одержання витягу [21].

Основним важливим фактором ефективності екстрагування та рушійної сили процесу є різниця концентрацій біологічно-активних речовин у рослинній сировині та у екстрагенті: чим вона більша, тим інтенсивніше речовини дифундують з сировини в розчинник. Як наслідок, мацерація в будь яких її модифікаціях принципово не здатна підтримувати постійну різницю концентрацій, так як при настоюванні дана різниця поступово скорочується до встановлення її рівноваги, після чого процес масо-переносу БАР у екстракт сповільнюється та зупиняється. З цим фактором пов'язана довга тривалість як мацераційних, так і класичних перколяційних процесів,

для інтенсифікації яких застосовують перекачування витягів з одного перколятора у іншій та/або заливання свіжих порцій екстрагенту [21].

У якості альтернативного методу екстрагування може бути застосовано метод фільтраційної екстракції. Принцип даного методу виділення БАР з рослинної сировини базується на підтримці постійної різниці концентрацій БАР у екстрагенті та екстрагованій сировині - рушійної сили екстракції, як масообмінного процесу. Зазначена підтримка різниці концентрацій забезпечується непереривною подачею свіжих порцій екстрагенту у екстракційне середовище та рівномірне його проходження скрізь шар екстрагованої сировини. Таким чином, метод фільтраційної екстракції здатен забезпечувати максимальне і направлене вилучення БАР з сировини у поєднанні з високою швидкістю процесу. Крім того, умовою ефективного використання даного методу екстрагування є належна підготовка вихідної сировини, яка передбачає руйнування клітинних структур для додаткової інтенсифікації процесу [1, 2, 14, 22, 23, 24, 27, 28].

Фільтраційні екстрактори є циліндричними ємностями, у яких у нижній частині вмонтована перфорована поверхня, яка покрита відповідним фільтрувальним матеріалом. Загальна будова фільтраційного екстрактора представлена на рисунку 1.6.

Процес екстрагування за даним методом включає наступні послідовні етапи: завантаження рослинної сировини; подачу екстрагента з верхньої частини екстрактора у шар сировини; видалення повітря з екстракційного середовища під тиском екстрагенту та утворення «дзеркала»; власне екстракцію з поступовим проходженням екстрагенту крізь шар сировини та фільтрувального матеріалу, вихід рідкого екстракту через нижню частину екстрактора та його збір у приймальну ємність.

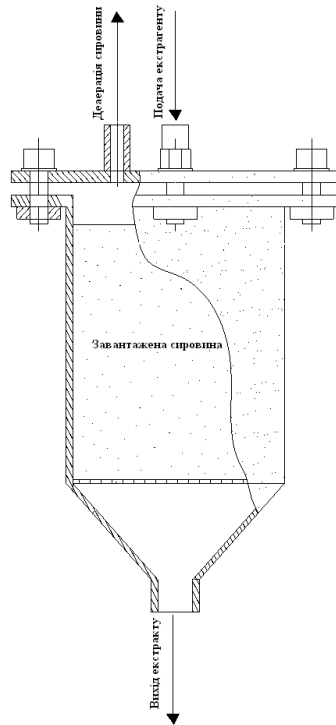


Рис. 1.6. Загальна будова фільтраційного екстрактора

Згідно результатів власних порівняльних досліджень ефективності екстрагування трави кропиви собачої в умовах реперколяції та фільтраційної екстракції, було визначено значну перевагу останнього.

Щодо оцінки екстрагуючої ефективності методу реперколяції, як одного з найбільш ефективних різновидів перколяції, достатньо розглянути результати власних порівняльних досліджень. Експеримент полягав у порівнянні ефективності застосування батареї з трьох перколяторів та фільтраційного екстрактора об'ємом 500 літрів, на стадії одержання водно-спиртового витягу, при промисловому виробництві густого екстракту трави кропиви собачої.

Одержанні дані (табл. 1.1.) засвідчили, що процес із використанням на стадії екстрагування методу фільтраційної екстракції дозволяє одержати продукт із більшим виходом (складає близько 20%) та більшим вмістом активних речовин (складає близько 1,6%). Це доводить не ефективність використання методу реперколяції у аналогічному процесі. При ньому показник виходу є нижчим (складає близько 18%), вміст активних речовин на 35% нижчий за аналогічний при фільтраційній екстракції (складає близько

1%). Показовим також є загальна тривалість технологічного процесу, яка склала 164 години з використанням реперколяції та 24 годин із використанням фільтраційної екстракції.

Таблиця 1.1

Порівняльні дані ефективності технологічного процесу при застосуванні методів фільтраційної екстракції та реперколяції

Показник	Реперколяція	Фільтраційна екстракція
Завантажено сировини на серію (сировина однієї партії, кг)	90,0 (3 * 30)	100,0
Загальний об'єм екстрагенту, л	1200,0	1200,0
Тривалість стадії екстрагування, год	156,0	12,0
Тривалість стадії упарювання (паралельно із стадією екстрагування)	16,0	16,0
Загальна тривалість технологічного процесу, год.	164,0	24,0
Вихід готового продукту (в перерахунку на вміст води 25%),	17,7	20,1
Вміст в густому екстракті суми флавоноїдів в перерахунку на рутин та суху речовину, %	1,06	1,64

Особливо слід відмітити, що використання методу фільтраційної екстракції дозволяє проведення упарювання рідкого витягу паралельно екстрагуванню, так як безперервність подачі екстрагенту забезпечує постійну наявність рідкого витягу. Даний фактор дозволяє суттєво скоротити загальний час виробничого процесу та зменшити кількість вихідного екстрагенту, оскільки одержаний відгін відразу передають на рецикл.

Порівнюючи результати ефективності технологічного процесу із застосуванням вищенаведених методів виділення БАР з рослинної сировини, очевидним є перевага у застосуванні методу фільтраційної екстракції.

Враховуючи низький вміст пренілових флавоноїдів у вихідній сировині хмелю та необхідність їх значного концентрування у кінцевому продукті, застосування такого ефективного методу як фільтраційна екстракція є доцільним стратегічним вирішенням.

1.6. Належні практики у виробництві фармацевтичних продуктів рослинного походження

Для забезпечення не тільки якості, а й безпеки та ефективності продуктів рослинного походження важливо чітко визначити стадії їх виробництва. Визначення першої стадії, з якої починається виробничий процес, дозволяє правильно встановити відповідність нормативному документу: GACP чи GMP [20, 120].

Для лікарських рослин, які культивуються або збираються дикорослими та які можуть бути використані у необробленому або обробленому (різані або подрібнені) вигляді, перша критична стадія виробничого процесу, де починають застосовуватись керівництва GMP, має бути чітко визначена. Обґрунтування даного вибору має бути точно визначено та задокументовано. Для таких процесів як екстракція, ферментація та очистка дане логічне обґрунтування має бути індивідуально встановлено для кожного конкретного випадку [120].

Дикорослий збір/культивація та/або збір врожаю лікарських рослин мають виконуватись відповідно до керівництва GACP або національного керівництва. Зазвичай, обробка після збору врожаю, що включає первинну різку, відповідає керівництву GACP. Якщо у подальшому подрібнення застосовується у технологічному процесі, то дана стадія повинна відповідати вимогам GMP. Якщо різка та подрібнення у значній мірі знижують вірогідність виявлення фальсифікації або переплутування рослинних матеріалів, застосування GMP може бути поширене і на дані стадії. У випадку, коли активний фармацевтичний інгредієнт складається виключно з подрібнених рослин, застосування вимог GMP починається з фізичної обробки, що слідує за первинною різкою та подрібненням і включає стадію пакування. Коли активним фармацевтичним інгредієнтом є екстракт, принципи GMP застосовують до будь-якої виробничої стадії, що слідує за обробкою після збору врожаю. У випадку, коли кінцевий рослинний продукт

одержують шляхом ферментації, виробнича стадія, що відповідає GMP, починається з первинної різки та подрібнення [120].

Таким чином, імплементація вимог керівництв GACP та GMP відносно виробництва рослинних ЛЗ поширюється на весь цикл її виробництва. Дотримання даних вимог на чітко визначених стадіях процесу дозволить гарантувати якість, безпеку та ефективність рослинного ЛЗ.

Висновки до розділу 1

1. Із узагальнюючого аналізу літературних джерел витікає, що дефіцит естрогенів впливає на фізіологічний та психологічний стан жінки із наступним виникненням відповідних патологічних станів.

2. «Золотим стандартом» лікування та профілактики порушень, пов'язаних з гормональним дисбалансом естрогенної природи, є гормональна замісна терапія. Проте даний метод має цілий ряд побічних наслідків.

3. Альтернативою ГЗТ може бути застосування фітоестрогенів - речовин рослинного походження або метаболітів зі схожою із ендогенним естрадіолом структурою та механізмом фармакологічної дії.

4. Найбільш потужним з відомих фітоестрогенів є 8-пренілнарінгенін (8-PN) – преніловий флаванон суплідь хмелю (*Humulus lupulus L.*), активність якого проявляється через рецептор-опосередкований механізм із переважною селективністю до зв'язування із ER α .

5. О-деметилування пренілових флавоноїдів під дією мікрофлори кишечника людини призводить до метаболічної трансформації IX в 8-PN та зростанню концентрації у організмі останнього.

6. Враховуючи потужну естрогеноподібну дію 8-PN та ризик проліферації ракових клітин молочної залози, присутність у екстракті X здатна врівноважити проліферативну активність 8-PN у ваговому співвідношенні між X та 8-PN не менше 10:1.

7. Розробка технології екстракту хмелю із стандартизованим вмістом фармакологічно-активних пренілованих флавоноїдів є перспективним напрямком одержання АФІ лікарських засобів у лікуванні та профілактиці різних естроген-дефіцитних станів.

8. Враховуючи низький вміст пренілових флавоноїдів у вихідній сировині та необхідність їх значного концентрування у кінцевому продукті, існує необхідність у застосуванні вискооефективного методу екстрагування, зокрема, фільтраційної екстракції.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Теоретичне обґрунтування компонентного складу сухого екстракту суплідь хмелю та технології його одержання

Метою нашої дисертаційної роботи стала розробка технології сухого екстракту суплідь хмелю, як АФІ лікарських засобів.

Попередньо описані фармакологічні властивості пренілових флавоноїдів суплідь хмелю спонукали на те, що результатом розробки технології екстракту хмелю в якості АФІ лікарських засобів для регулювання вікових гормональних клімактеричних порушень мав бути продукт із наступними головними критеріями якості [8]:

- а) стандартизованим вмістом 8-PN, як речовини, що обумовлює фармакологічну дію АФІ;
- б) кількісно – визначеним вмістом X, як антипроліферативного агента;
- в) кількісно – визначеним вмістом IX, як компонента про-естрогенної дії;
- г) забезпеченим ваговим співвідношенням між X та 8-PN не менше 10:1 для пригнічення можливої проліферативної активності, викликаної 8-PN;
- д) кінцевий продукт мав характеризуватися підвищеним вмістом зазначених пренілових флавоноїдів та мати форму сухого екстракту.

У основу дисертаційної роботи було покладено задачу науково обґрунтувати та експериментально довести такий спосіб отримання екстракту хмелю, збагаченого преніловими флаванонами з естрогенною дією, у якому зміною умов виконання операцій забезпечилось би зростання кількісного вмісту екстрактивних речовин з сировини хмелю в поєднанні із оптимальним вмістом пренілових флавоноїдів у екстракті як фармакологічно-активної субстанції для виробництва лікарського засобу.

Для вирішення поставлених задач нами було розроблено план експериментальних робіт, який включав наступні етапи:

- 1) залучення у якості вихідної рослинної сировини сорти хмелю із початковим високим вмістом фенольних сполук;
- 2) розробку концептуальної технологічної схеми одержання екстракту з урахуванням існуючих підходів та раціональності її імплементації у промислове виробництво;
- 3) дослідження та визначення оптимальних умов технологічних операцій з послідуною розробкою загальної технології одержання сухого екстракту та її апробація в умовах промислового виробництва;
- 4) розробку специфікації та методів контролю якості продукту;
- 5) узагальнення результатів фармакологічних досліджень властивостей сухого екстракту хмелю;
- б) дослідження стабільності сухого екстракту з метою обґрунтування терміну його придатності та умов зберігання.

2.2. Характеристика об'єктів дослідження

Хміль звичайний (*Humulus lupulus L.*), селекційний сорт Ксанта -- ДСТУ 7067-2009

Оригінатор/Заявник: Інститут сільського господарства Полісся УААН; дата внесення у реєстр: 2008 рік; номер авторського свідоцтва: №08690.

Показники якості суплідь хмелю (*Strobili lupuli*)

Тип сировини	гіркий (проміжний)
Вміст гірких речовин (загальні смоли),%	20,0-25,0
Вміст альфа-кислот, %	7,0-10,5
Вміст бета-кислот, %	6,5-10,0
Коефіцієнт бета/альфа	0,75-0,9
Кількість ефірної олії, мг/100 г	1,0-1,5
Вміст загальних поліфенолів, %	5,0-7,5

Ксантохумол, % 0,7-0,9

Хміль звичайний (*Humulus lupulus L.*), селекційний сорт Руслан - ДСТУ 7067-2009

Оригіатор/Заявник: СП ВО «Агропромсервіс», Інститут сільського господарства Полісся УААН; дата внесення в реєстр: 2003 рік; номер авторського свідоцтва: №1749.

Показники якості суплідь хмелю (*Strobili lupuli*)

Тип сировини	гіркий (проміжний)
Вміст гірких речовин (загальної смоли),%	26,0-30,0
Вміст альфа-кислот, %	8,5-11,0
Вміст бета-кислот, %	7,0-9,5
Коефіцієнт бета/альфа	0,6-0,9
Кількість ефірної олії, мг/100 г	2,0-3,0
Вміст загальних поліфенолів, %	5,5-7,5
Ксантохумол, %	0,9-1,1

Хміль звичайний (*Humulus lupulus L.*), селекційний сорт Чаклун - ДСТУ 7067-2009

Оригіатор/Заявник: Інститут сільського господарства Полісся УААН; дата внесення в реєстр: 2008 рік; номер авторського свідоцтва: №08691.

Показники якості суплідь хмелю (*Strobili lupuli*)

Тип сировини	гіркий (проміжний)
Вміст гірких речовин (загальної смоли),%	20,0-25,0
Вміст альфа-кислот, %	6,5-9,0
Вміст бета-кислот, %	5,0-8,0
Коефіцієнт бета/альфа	0,75-0,9
Кількість ефірної олії, мг/100 г	1,0-1,5
Вміст загальних поліфенолів, %	5,5-7,5

Ксантохумол, %

0,65-0,9

n-Гептан (n-Heptane) нормальний еталонний - ГОСТ 25828-83



IUPAC: гептан



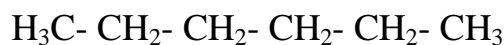
М. м: 100,2 г/моль

Відносна густина: 0,6836-0,6840 г/см³

Температура кипіння при 101,3 кПа від 98,3⁰С до 98,5⁰С.

Безбарвна прозора рідина без осаду, легкозаймиста. Практично не розчинний у воді, змішується з етанолом та ефіром.

n-Гексан (n-Hexane) хімічно чистий - ТУ 2631-003-05807999-98



IUPAC: гексан



М. м: 86,18 г/моль

Відносна густина: 0,6596-0,6599 г/см³

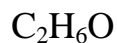
Температура кипіння при 101,3 кПа від 68,5⁰С до 68,9⁰С.

Безбарвна, займиста рідина. Практично не розчинний у воді, змішується з етанолом та ефіром.

Етанол (96%) (Ethanolum 96 per centum) – ДФУ 1.1, с. 339-343



IUPAC: етанол



М. м: 46,07 г/моль

Відносна густина: 0,805-0,812 г/см³

Безбарвна, прозора, летка, легкозаймиста рідина, гігроскопічна. Змішується з водою та метиленхлоридом. Точка кипіння близько 78⁰С.

Вода очищена (Aqua purificata) – ДФУ 1.4, с. 389-391



IUPAC: оксидан

М.м. 18,02 г/моль

Вода очищена — це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними., якщо немає інших зазначень і дозволів компетентного уповноваженого органу.

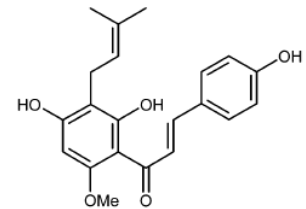
Екстракти суплідь хмелю селекційних сортів Ксанта, Руслан, Чаклун в формі водно-спиртового витягу та сухого екстракту із контрольованим кількісним вмістом наступних компонентів:

Ксантохумол (Xanthohumol)

$C_{21}H_{22}O_5$

IUPAC: (E)-1-[2,4,-дигідрокси-6-метокси-3-(3-метилбут-2-етил)феніл]-3-(4-гідроксифеніл) проп-2-ен-1-он

М.м. 354,40 г/моль

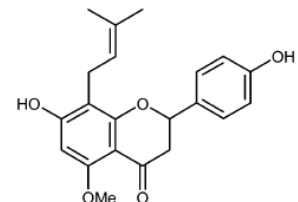


Ізоксантохумол (Isoxanthohumol)

$C_{21}H_{22}O_5$

IUPAC: 7-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-5-метокси-8-(3-метилбут-2-еніл)-2,3-дигідрохромен-4-он

М.м. 354,40 г/моль

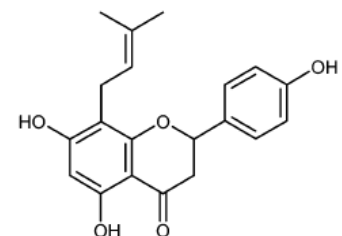


8-пренілнарінгенін (8-prenylnaringenin)

$C_{20}H_{20}O_5$

IUPAC: (2S)-5,7-дигідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-8-(3-метилбут-2-еніл)-2,3-дигідрохромен-4-он

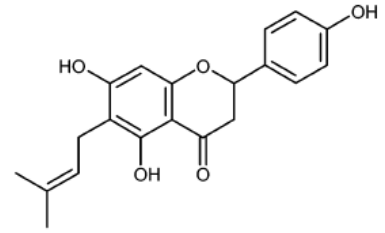
М.м. 340,37 г/моль



6- пренілнарінгенін (6-prenylnaringenin)C₂₀H₂₀O₅

IUPAC: (2S)-5,7-дигідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-6-(3-метилбут-2-еніл)-2,3-дигідрохромен-4-он

М.м. 340,37 г/моль



Приготування водно-етанольних розчинів, що використовувались в якості екстрагентів, проводили з використанням алкоголетричних таблиць, наведених у методиці ДФУ 2.9.1.

Реактиви, що використовувались при проведенні фізико-хімічних досліджень, були приготовлені згідно методики ДФУ 4.1.1. Реактиви.

2.3. Методи досліджень**2.3.1. Фізико-хімічні методи дослідження.**

При виконанні роботи були використані сучасні фармако-технологічні, фізико-хімічні, біофармацевтичні та фармакологічні методи досліджень.

2.3.1.1. Визначення сухого залишку.

Визначення сухих залишків у зразках рідких екстрактів суплідь хмелю проводили згідно ДФУ 2.8.16.

5,0 мл рідкого екстракту поміщали у зважений бюкс, випаровували на водяній бані та сушили при температурі від 100⁰С до 105⁰С протягом 3 годин. Бюкс охолоджували у ексікаторі при кімнатній температурі протягом 30 хв. та зважували.

Вміст сухого залишку ω (%), у зразках рідких екстрактів, одержаних при певному співвідношенні «сировина:екстракт», розраховували за формулою:

$$\omega = \frac{m_3 \times 100}{V_a}, \quad (2.1)$$

де: m_3 - маса сухого залишку після висушування аліквоти зразку рідкого екстракту, г;

V_a – об'єм аліквоти зразку рідкого екстракту, мл.

Вихід екстрактивних речовин D (%) з екстрагованої рослинної сировини на стадії, розраховували за формулою:

$$D = \frac{\omega \times V}{m_c}, \quad (2.2)$$

де: V - загальний об'єм одержаного екстракту, мл;

ω – сухий залишок у одержаному екстракті, %;

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

2.3.1.2. Визначення втрати в масі при висушуванні екстрактів.

Визначення втрати у масі при висушуванні зразків сухих екстрактів проводили згідно ДФУ, 2.8.17.

0,50 г здрібненого у тонкий порошок сухого екстракту поміщали у зважений та висушений бюкс, сушили у сушильній шафі при температурі від 100°C до 105°C протягом 3 годин. Охолоджували у ексікаторі при кімнатній температурі над *фосфором (V) оксидом P* та зважували. Втрату у масі при висушуванні W (%) в екстрактах розраховували за формулою:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \quad (2.3)$$

де: m_1 – маса бюксу з екстрактом до висушування, г;

m_2 – маса бюксу з екстрактом після висушування, г;

2.3.1.3. Ідентифікація.

Випробування проводили методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27), використавши за основу методику ідентифікації хумулонів, лупулінів та X, описану у монографії «Хмелю шишки» ДФУ [6].

Якісний аналіз рідких екстрактів, одержаних на стадії знежирення сировини:

Випробовуваний розчин. 10 мл зразку рідкого екстракту одержаного після екстрагування сировини хмелю н-гексаном або н-гептаном, фільтрували через паперовий фільтр.

Розчин порівняння. 1,0 мг судану оранжевого Р, 2,0 мг куркуміну Р і 2,0 мг диметиламінобензальдегіду Р розчиняли у 20 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F₂₅₄ Р.

Рухома фаза: кислота оцтова безводна Р – етилацетат Р – циклогексан Р (2:38:60).

Об'єм проби випробовуваного розчину, що наноситься: 20 мкл смугами, при вмісті сухого залишку у випробовуваному розчині у межах 1,5-2,0 %.

У випадку, коли сухий залишок у випробовуваному розчині мав відмінне від зазначеного значення, об'єм проби для нанесення перераховували за формулою індивідуально:

$$V_{TS} = \frac{1,5 \div 2,0}{\omega} \times 20, \quad (2.4)$$

де: V_{TS} - необхідний об'єм проби випробовуваного розчину, що наноситься, мкл;

ω – сухий залишок у випробовуваному розчині, %.

Розрахований об'єм випробовуваного розчину наносили смугами, але не більше 100 мкл.

Об'єм проби розчину порівняння, що наноситься: 20 мкл смугами

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення А: в УФ-світлі при довжині хвилі 254 нм.

Результати А: на хроматограмі розчину порівняння мали виявлятися 3 зони поглинання; у нижній чверті – слабка зона куркуміну, дещо нижче середини – зона диметиламінобензальдегіду та вище – зона судану оранжевого. На хроматограмі випробовуваного розчину мала виявлятися така сама кількість зон поглинання, на тому самому рівні, що і на хроматограмі розчину порівняння; на рівні зони куркуміну – слабка зона ксантохумолу; близько зони диметиламінобензальдегіду – зони, відповідні хумулонам; близько зони судану оранжевого – зони, відповідні лулулонам.

Виявлення В: в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Результати В: на хроматограмі випробовуваного розчину зони, відповідні лупулонам, мали виявляти синю флуоресценцію; зони, відповідні хумулонам, - коричневу флуоресценцію; зона, відповідна ксантохумолу, - темно-коричневу флуоресценцію.

Якісний аналіз сухих екстрактів хмелю:

Випробовуваний розчин. До 1,0 г зразку сухого екстракту хмелю додавали 10 мл суміші вода Р – метанол Р (3:7), струшували протягом 15 хв і фільтрували через паперовий фільтр.

Розчин порівняння. 1,0 мг судану оранжевого Р, 2,0 мг куркуміну Р і 2,0 мг диметиламінобензальдегіду Р розчиняли у 20 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р.

Рухома фаза: кислота оцтова безводна Р – етилацетат Р – циклогексан Р (2:38:60).

Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення А: в УФ-світлі при довжині хвилі 254 нм.

Результати А: на хроматограмі розчину порівняння мали виявлятися 3 зони поглинання; у нижній чверті – слабка зона куркуміну; дещо нижче середини – зона диметиламінобензальдегіду та вище – зона судану оранжевого. На хроматограмі випробовуваного розчину мала виявлятися така сама кількість зон поглинання, на тому самому рівні, що і на хроматограмі розчину порівняння; на рівні зони куркуміну – зона ксантохумолу; близько зони диметиламінобензальдегіду – зони відповідні хумулонам; близько зони судану оранжевого – зони, відповідні лупулонам.

Виявлення В: в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Результати В: на хроматограмі випробовуваного розчину зони, відповідні лупулонам, мали виявляти синю флуоресценцію; зони відповідні хумулонам - коричневу флуоресценцію; зона, відповідна ксантохумолу - темно-коричневу флуоресценцію.

За *результатами A та B* на хроматограмі випробовуваного розчину допустима відсутність зон, відповідних лупулонам та хумулонам, що пов'язано з ефективним видаленням ліпофільної фракції на стадії знежирення сировини.

2.3.1.4. Кількісне визначення.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN в зразках рідких та сухих екстрактів, одержаних водно-етанольними екстрагентами, проводили методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29) за валідованими методиками. В методі кількісного визначення був використаний підхід визначення даних сполук з використанням вторинних стандартів [96].

Кількісне визначення X, IX, 8-PN та 6-PN з використанням ВЕРХ/MS/MS методу для ідентифікації піків.

Метод 1:

Випробовуваний розчин. 150 мг сухого екстракту поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняли у 70 мл *метанолу P* і витримували на ультразвуковій бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи. Доводили об'єм розчину *метанолом P* до позначки і перемішували.

Розчин центрифугували протягом 5 хв при 12000 об/хв.

Надалі використовували надосадову рідину.

Розчин порівняння (a). 25,0 мг *СЗ кверцетину* поміщали у колбу місткістю 25 мл, розчиняли у 10 мл *метанолу P*, доводили об'єм розчину *метанолом P* до позначки і перемішували. 0,5 мл одержаного розчину поміщали у колбу місткістю 10 мл, доводили *метанолом P* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (b). 20,0 мг *СЗ нарінгеніну* поміщали у колбу місткістю 100 мл, розчиняли у 70 мл *метанолу P*, доводили об'єм розчину *метанолом P* до позначки і перемішували. 0,5 мл одержаного розчину поміщали у колбу місткістю 10 мл, доводили *метанолом P* до позначки і перемішували.

Метод 2:

Випробовуваний розчин. 150 мг сухого екстракту поміщали у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у 35 мл *метанолу Р* і витримували на ультразвуковій бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи. Доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин центрифугували протягом 5 хв при 12000 об/хв.

Надалі використовували надосадову рідину.

Розчин порівняння (а). 25,0 мг *СЗ кверцетину* поміщали у колбу місткістю 25 мл, розчиняли у 10 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували. 1,0 мл одержаного розчину поміщали у колбу місткістю 10 мл, доводили *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (b). 20,0 мг *СЗ нарінгеніну* поміщали у колбу місткістю 100 мл, розчиняли у 70 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували. 1,0 мл одержаного розчину поміщали у колбу місткістю 10 мл, доводили *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Метод 3:

Випробовуваний розчин. 1,0 мл рідкого екстракту поміщали у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин центрифугували протягом 5 хв при 12000 об/хв.

Надалі використовували надосадову рідину.

Приготування *розчинів порівняння (а) та (b)* здійснювали аналогічно методу 1.

Ідентифікацію піків X, IX, 8-PN та 6-PN проводили за мас-спектрами, застосовуючи поділ потоку 1:50 на Мас- та УФ- детектори, порівнюючи одержані результати з літературними даними [49].

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Ultimate 3000 з УФ- та MS/MS- детектором за таких умов:

- колонка Purospher STAR RP 18-е розміром (250 x 4,0) мм, з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза А: 0.25 % об/об кислоти мурашиної Р;
- рухома фаза В: 0.25 % об/об кислоти мурашиної Р в ацетонітрилі Р;
- швидкість рухомої фази: 1 мл/хв;
- детектування при довжині хвилі 290 нм та 370 нм;
- температура колонки: 50 °С;
- Інжекція: 20 мкл.

Програма градієнта:

Час, хв	А, %	В, %
0	80	20
3	80	20
3→25	60	40
25→37	60	40
37→55	40	60
55→56	10	90
56→70	10	90

Після закінчення градієнту колонку урівноважували початковим складом градієнту не менше 15 хв.

Порядок виходу піків на хроматограмах розчинів порівняння: кверцетин, нарінгенін.

Вміст X визначали порівнянням площі піку X на хроматограмі випробовуваного розчину по відношенню до площі піку кверцетину на хроматограмі розчину порівняння, використовуючи коефіцієнт перерахунку $K=0,5834$, при довжині хвилі 370 нм.

Вміст IX, 8-PN, 6-PN визначали порівнянням площі піків IX, 8-PN, 6-PN на хроматограмі випробовуваного розчину по відношенню до площі піку нарінгеніну на хроматограмі розчину порівняння, використовуючи коефіцієнт перерахунку $K=1,296$, при довжині хвилі 290 нм.

Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи:

25,0 мг *СЗ кверцетину* поміщали у колбу місткістю 25 мл, розчиняли у 10 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

15,0 мг *СЗ нарінгеніну* поміщали у колбу місткістю 100 мл, розчиняли у 70 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

20,0 мл розчину *СЗ кверцетину* та 20,0 мл розчину *СЗ нарінгеніну* поміщали у колбу місткістю 50 мл, доводили *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо коефіцієнт розділення піків, розрахований з хроматограми *розчину для перевірки придатності хроматографічної системи*, становив не менше 5,0.

Вміст в сухому екстракті Х, ІХ, 8-РН, 6-РН в перерахунку на суху речовину у відсотках, розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{S \times m_0 \times P \times K \times b \times 100 \times 100}{S_0 \times m_1 \times 100 \times (100 - W)}, \quad (2.5)$$

де: S – площа піку Х, або ІХ, або 8-РН, або 6-РН;

S_0 – площа піку кверцетину або нарінгеніну;

m_1 – маса наважки сухого екстракту, г;

m_0 – маса наважки *СЗ кверцетину* або наважки *СЗ нарінгеніну*, г;

P – вміст кверцетину в *СЗ кверцетину* (99.7) або

вміст нарінгеніну в *СЗ нарінгеніну* (95.06), %;

K - коефіцієнт перерахунку;

b – розбавлення;

W – втрата у масі при висушуванні сухого екстракту, %.

Вміст у рідкому екстракті Х, ІХ, 8-РН, 6-РН у перерахунку на суху речовину у відсотках, розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{S \times m_0 \times P \times K \times b \times 100 \times 100}{S_0 \times \omega \times 100}, \quad (2.6)$$

де: S – площа піку Х, або ІХ, або 8-РН, або 6-РН;

S_0 – площа піку кверцетину або нарінгеніну;

ω – вміст сухого залишку у рідкому екстракті, %;

m_0 – маса наважки *СЗ кверцетину* або наважки *СЗ нарінгеніну*, г;

P – вміст кверцетину у *СЗ кверцетину* (99.7) або

вміст нарінгеніну у *СЗ нарінгеніну* (95.06), %;

K - коефіцієнт перерахунку;

b – розбавлення.

Кількісне визначення X, IX, 8-PN та 6-PN з використанням СЗ сухого екстракту суплідь хмелю для ідентифікації піків.

Випробовуваний розчин. Приготування розчину проводили аналогічно методу 1, кількісного визначення з використанням ВЕРХ/MS/MS для ідентифікації піків.

Розчин порівняння для ідентифікації піків. 15 мг *СЗ сухого екстракту суплідь хмелю для ідентифікації піків* поміщали у мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняли у 7 мл *метанолу Р* і витримували на ультразвуковій бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи. Доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин центрифугували протягом 5 хв при 12000 об/хв.

Надалі використовували надосадову рідину.

Розчин порівняння (а). 25,0 мг *СЗ кверцетину* поміщали у колбу місткістю 25 мл, розчиняли у 10 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (b). 15,0 мг *СЗ нарінгеніну* поміщали у колбу місткістю 100 мл, розчиняли у 70 мл *метанолу Р*, доводили об'єм розчину *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (с). 1,0 мл розчину порівняння (а) та 1,0 мл розчину порівняння (b) поміщали у колбу місткістю 50 мл, доводили *метанолом Р* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (d). 20,0 мл розчину порівняння (a) та 20,0 мл розчину порівняння (b) поміщали у колбу місткістю 50 мл, доводили метанолом *P* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння (e). 3,0 мл розчину порівняння (a) та 3,0 мл розчину порівняння (b) поміщали у колбу місткістю 50 мл, доводили метанолом *P* до позначки і перемішували.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Ultimate 3000 з УФ-детектором за умов та програми градієнта, аналогічних визначенню з використанням ВЕРХ/MS/MS методу для ідентифікації піків.

Хроматографували по 20 мкл розчинів порівняння (c), (d) та (e). Визначали площі піків нарінгеніну при 290 нм та кверцетину при 370 нм.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо коефіцієнт розділення піків, розрахований з хроматограми розчину порівняння (d), кверцетину та нарінгеніну, становив не менше 5,0.

Будували калібрувальні графіки, відкладаючи приведену концентрацію кверцетину (нарінгеніну) на осі абсцис і відповідні площі піків на осі ординат.

Визначали рівняння лінійної залежності:

$$S = a \times C_{\text{пр}} + b, \quad (2.7)$$

де: *S* – площа аналізованого піку (кверцетину або нарінгеніну);

*C*_{пр} – приведена концентрація аналізованої речовини (кверцетину або нарінгеніну);

a – тангенс кута нахилу прямої;

b – точка перетину з віссю ординат.

Приведену концентрацію кверцетину розраховували за формулою:

$$C_{\text{пр}} = \frac{m_{01} \times P \times K_1 \times V_{\text{ал}}}{25 \times 50 \times 100}, \quad (2.8)$$

де: *m*₀₁ – маса наважки *СЗ* кверцетину, мг;

P – вміст кверцетину в *СЗ* кверцетину, %;

$V_{ал}$ – об'єм аліквоти розчину порівняння (а), взятого для приготування розчинів порівняння (с), (d) та (е), мл.

K_1 – коефіцієнт перерахунку кверцетин/Х.

При використанні *СЗ кверцетину* $K_1= 0,5834$.

При використанні *СЗ кверцетину* в формі дигідрату $K_1= 0,893$.

Приведену концентрацію нарінгеніну розраховували за формулою:

$$C_{пр} = \frac{m_{02} \times P \times K_2 \times V_{ал}}{25 \times 50 \times 100}, \quad (2.9)$$

де: m_{02} – маса наважки *СЗ нарінгеніну*, мг;

P – вміст нарінгеніну у *СЗ нарінгеніну*, %;

$V_{ал}$ – об'єм аліквоти розчину порівняння (b), взятого для приготування розчинів порівняння (с), (d) та (е), мл;

K_2 – коефіцієнт перерахунку нарінгенін/ІХ, 8-РН, 6-РН, 1,296.

Хроматографували розчин для ідентифікації піків та випробовуваний розчин.

На хроматограмі випробовуваного розчину ідентифікували піки, що відповідають Х, ІХ, 8-РН, 6-РН, використовуючи хроматограму розчину для ідентифікації піків (рис. 2.1).

Вміст Х у сухому екстракті у перерахунку на суху речовину у відсотках, розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{(S_i - b) \times 1000000}{a \times m_1 \times (100 - W)}, \quad (2.10)$$

де: S_i – середнє значення площ піків Х, розраховане із хроматограм випробовуваного розчину;

b – точка перетину з віссю ординат (Y), визначена з калібрувальної кривої кверцетину;

a – тангенс кута нахилу прямої, визначений з калібрувальної кривої кверцетину;

m_1 – маса наважки сухого екстракту, мг;

W – втрата в масі при висушуванні сухого екстракту, %.

Вміст IX, 8-PN, 6-PN у сухому екстракті у перерахунку на суху речовину у відсотках, розраховували за формулою:

$$X_n = \frac{(S_i - b) \times 1000000}{a \times m_1 \times (100 - W)}, \quad (2.11)$$

де: S_i – середнє значення площ піків IX або 8-PN або 6-PN, розраховане із хроматограм випробовуваного розчину;

b – точка перетину з віссю ординат (Y), визначена з калібрувальної кривої нарінгеніну;

a – тангенс кута нахилу прямої, визначений з калібрувальної кривої нарінгеніну;

m_1 – маса наважки сухого екстракту, мг;

W – втрата в масі при висушуванні сухого екстракту, %.

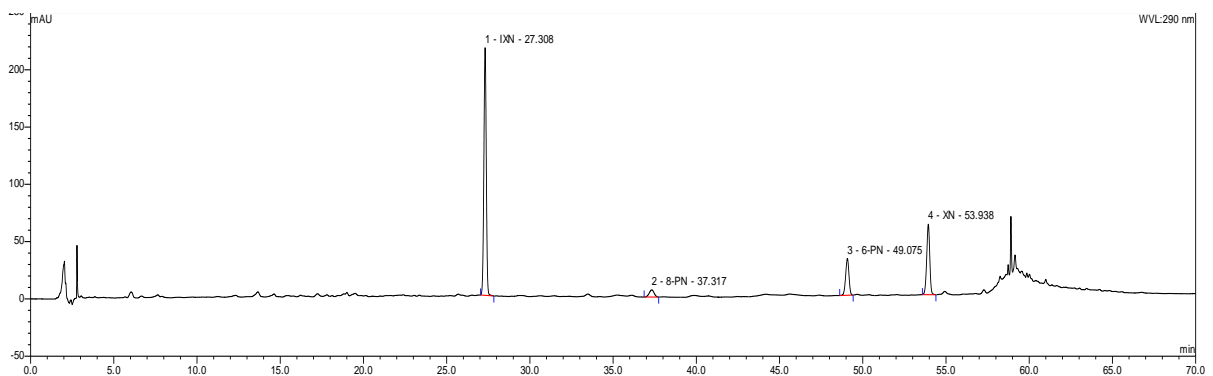


Рис. 2.1. Хроматограма розчину для ідентифікації піків

2.3.2. Технологічні методи досліджень

2.3.2.1. Дослідження динаміки екстрагування рослинної сировини

Визначення вмісту сухого залишку A_n у окремих порціях рідких екстрактів V_n , одержаних при відповідному DER , г.

Розрахунок вмісту сухого залишку A_n проводили за формулою:

$$A_n = \frac{\omega_n \times V_n}{100}, \quad (2.12)$$

де: V_n – об'єм окремо зібраної порції рідкого екстракту, одержаного із кроком співвідношення DER 1:1, мл;

ω_n – сухий залишок у окремо зібраній порції рідкого екстракту n , %.

Визначення вмісту сухого залишку B_n у сумарних екстрактах V_{n+1} , одержаних при відповідному DER на стадії, г.

Розрахунок вмісту сухого залишку B_n у сумарних екстрактах V_{n+1} , одержаних на стадії проводили за формулою:

$$B_n = \sum_{n=1}^n A_n, \quad (2.13)$$

де: A_n - сухий залишок у окремо зібраній порції екстракту V_n , г.

Визначення вмісту сухого залишку C_n у сумарних екстрактах V_{n+1} , одержаних при відповідному DER на стадії, %.

Розрахунок вмісту сухого залишку C_n у сумарних екстрактах V_{n+1} , одержаних на стадії проводили за формулою:

$$C_n = \frac{B_n}{V_{n+1}} \times 100, \quad (2.14)$$

де: V_{n+1} - об'єм сумарного екстракту на стадії, мл;

B_n – вміст сухого залишку у сумарних екстрактах V_{n+1} , г.

Визначення виходу екстрактивних речовин (абсолютно сухого екстракту) D_n з екстрагованої сировини на кожній зі стадій екстрагування при відповідному DER, %

Розрахунок виходу екстрактивних речовин (абсолютно сухого екстракту) D_n проводили за формулою:

$$D_n = \frac{B_n}{m_c} \times 100, \quad (2.15)$$

де: m_c – маса рослинної сировини використаної для екстрагування, г;

B_n – вміст сухого залишку в сумарних екстрактах V_{n+1} , г.

Визначення вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN G_n у сумарних екстрактах V_{n+1} , одержаних при відповідному співвідношенні DER, %.

Розрахунок вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN G_n проводили за формулою:

$$G_n = \frac{\sum_{n=1}^n X_n \times A_n}{B_n}, \quad (2.16)$$

де: X_n – вміст X або IX або 8-PN або 6-PN в зразках окремо зібраних порцій рідких екстрактів, одержаних із кроком DER 1:1, %;

A_n - сухий залишок у окремо зібраній порції екстракту V_n , г;

B_n – вміст сухого залишку у сумарних екстрактах V_{n+1} , г.

Визначення виходу X, IX, 8-PN та 6-PN L_n на кожній зі стадій екстрагування відповідним екстрагентом у динаміці зміни DER, %

Розрахунок виходу X, IX, 8-PN та 6-PN L_n проводили за формулою:

$$L_n = \frac{G_n \times D_n}{100}, \quad (2.17)$$

де: G_n – вміст X або IX або 8-PN або 6-PN у сумарних екстрактах V_{n+1} , %;

D_n – вихід екстрактивних речовин з екстрагованої сировини, на кожній зі стадій екстрагування при відповідному DER, %.

2.3.3. Фармакологічні методи досліджень.

Доклінічне дослідження екстракту суплідь хмелю проводили на базі відділу експериментальної фармакології та токсикології Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського Національної академії медичних наук України» під керівництвом д. біол. наук, с.н.с. Горбенко Н. І.

Мета та характер дослідження

Метою дослідження було визначення впливу активних компонентів екстракту хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику за умов тривалого внутрішньошлункового введення оварієктомованим самицям щурів із метаболічним синдромом [4].

Дослідження було проведено на моделі постменопаузального метаболічного синдрому, індукованого комбінованою (високожировою та високовуглеводною) дієтою у оварієктомованих щурів.

Дизайн дослідження

Обґрунтування вибору тест-системи

Щури є загальноприйнятим видом лабораторних тварин для моделювання метаболічного синдрому та гіпоестрогенії.

Характеристика тест-системи

Вид – щури.

Лінія – Вістар.

Стать – самиці.

Вік – статтевозрілі.

Маса тіла – 150 - 200 г.

Загальна кількість – 30 тварин.

Джерело одержання – віварій ДУ «Інститут проблем ендокринної патології» ім. В. Я. Данилевського НАМНУ.

Період акліматизації – 15 діб.

Індивідуальна ідентифікація – індивідуальні мітки.

Метод розподілу за групами – групи повинні бути рівноцінні за кількістю тварин, віком та масою.

Кількість тварин у клітці – 3.

Розміри клітки – 60x40 см.

Матеріал клітки – пластмаса.

Стандартний раціон – збалансований корм (комбікорм, соковиті корма, поварена сіль, жири) ad libitum.

Джерело води – питна вода з поїлок.

Підстилка – тирса листвяних дерев.

Температура повітря – 20-25 °С.

Вологість повітря – 50-55 %.

Характеристика тест-зразка

Назва: Сухий екстракт суплідь хмелю

Вміст АФІ: 8-PN у перерахунку на суху речовину 0,057%.

Лікарська форма: сухий екстракт (субстанція).

Фармакологічна група: метаболічні препарати.

Характеристика референс-зразка

Назва: «Прогінова», Вayer (серія № 23039E)

Вміст АФІ: 1 драже містить 2 мг естрадіолу валеріату.

Лікарська форма: драже по 2 мг.

Фармакологічна група: гормони статевих залоз. Код АТС G03C A03.

Спосіб введення тест-зразка і його обґрунтування

Для оцінки специфічної дії тест-речовини використовували шлях введення, який є ідентичний тому, що рекомендується для клінічного застосування. Виходячи з цього, у даному експерименті тест-речовину та препарат порівняння вводили внутрішньошлунково за допомогою зонду у вигляді водної суспензії. Перед введенням тест-речовин щури голодували протягом ночі [10].

Рівні доз тест-зразка, їх обґрунтування

Дози активного компонента хмелю – 8-PN були відібрані, базуючись на даних літератури, згідно яким клінічні дослідження проводились із застосуванням компонентів хмелю у дозі 100 мкг на добу із розрахунку на 8-пренілнарінгенін. Використовуючи формулу зворотної екстраполяції добової дози з людини на щура, була встановлена мінімальна доза 20 мкг/кг маси тіла. В якості максимальної була обрана доза, що у 10 раз перевищує мінімальну та дозволяє відтворити естрогенний ефект, подібний до дії препарату порівняння 17 β -естрадіолу в дозі 0,2 мкг/кг маси тіла [34, 45].

Таким чином, в даному дослідженні тест-зразок вводили у дозах 20 та 200 мкг/кг маси тіла (із розрахунку на 8-PN), а референс-зразок - 200 мкг/кг маси тіла.

Частота, тривалість введення, обґрунтування

Тест-зразок та препарат порівняння вводили експериментальним тваринам із метаболічним синдромом один раз на добу протягом одного місяця, починаючи з п'ятого тижня після індукції МС. Група оварієктомованих щурів з МС отримувала розчинник (дистильовану воду) за аналогічною схемою. Використання тест-зразка протягом місяця вважалось достатнім для прояву його фармакологічного ефекту [45].

План експерименту

Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двосторонньої оварієктомії у статевозрілих щурів під легким ефірним наркозом.

Після акліматизації, доекспериментального нагляду та зважування, тварин розподіляли по групах та наносили індивідуальні мітки. Клітки, у яких розміщали тварин, маркували. Розподіл тварин по групах наведений у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин по групах

№ групи	Група	Кількість тварин	Доза тест- та референс-речовин, мкг/кг маси тіла
1	Інтактний контроль	6	-
2	Гіпоестрогенія+МС + розчинник	6	-
3	Гіпоестрогенія+МС + екстракт хмелю	6	20 мкг/кг із розрахунку на 8-PN
4	Гіпоестрогенія+МС + екстракт хмелю	6	200 мкг/кг із розрахунку на 8-PN
5	Гіпоестрогенія+МС + «Прогінова»	6	200 мкг/кг із розрахунку на естрадіолу валеріат

Метаболічний синдром у оварієктомованих щурів (група №2, 3, 4, 5) моделювали протягом восьми тижнів за допомогою висококалорійної (високожирової та високовуглеводної) дієти, яка складалася із 15 % жиру, 25 % сахарози, 1 % жовчних кислот та 59,0 % стандартної їжі. Контрольні (неоварієктомовані) щури (група №1) протягом восьми тижнів отримували стандартну дієту віварію: комбікорм, соковиті

корми, поварена сіль, жири ad libitum. Джерело води для всіх груп тварин – охолоджена кип'ячена вода у скляних поїлках.

Оскільки 8-PN був ідентифікований як основний естрогенний компонент екстракту хмелю, що проявляє максимальну здатність серед всіх відомих фітоестрогенів до зв'язування з ER α , у якості позитивного контролю було застосовано 17- β естрадіол. Останній було використано у вигляді ефіру естрадіол валеріату для підвищення його низької біодоступності за умов перорального застосування [34].

Оцінка ефективності препарату, який вивчається

Ефективність активного компоненту екстракту хмелю - 8-PN визначався за його впливом на ожиріння, вуглеводний і ліпідний обмін, оксидантний статус та продукцію ендотелій-релаксуючого фактору (оксиду нітрогену) в судинах, функціональний стан центральної нервової та серцево-судинної системи в оваріектомованих щурів із метаболічним синдромом.

Обробка результатів дослідження

Статистичний аналіз одержаних результатів був проведений методами варіаційної статистики. Визначення характеру розподілу ознаки у виборці проводився з використанням критерію Шапіро-Уїлка. Для множинних порівнянь даних з нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та застосовували метод Ст'юдента-Н'юмена-Кейлса, у інших випадках – ранговий аналіз варіацій за Крускалом-Уоллісом та апостеріорне порівняння середніх за допомогою критерію Дана. Рівень значимості для критерію Шапіро-Уїлка приймався рівним 0,01, а для інших критеріїв -0,05 (при однократному порівнянні) [5].

У випадку, коли розподілення ознак відрізнялось від нормального, результати представлялись у вигляді медіани (Me) та мінімальних і максимальних значень (min÷max).

Висновки до розділу 2

1. Теоретично обґрунтовано компонентний склад екстракту суплідь хмелю, технологію його одержання та визначено основні об'єкти досліджень. При теоретичному обґрунтуванні враховано фізико-хімічні властивості основних груп конститuentів суплідь хмелю та, насамперед, пренілових флавоноїдів.

2. Визначено спектр сучасних методів досліджень, необхідних для обґрунтування всіх етапів роботи, з метою повномасштабної розробки технології стандартизованого сухого екстракту хмелю.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ

3.1. Дослідження та визначення оптимальних умов екстрагування ліпофільної фракції суплідь хмелю з метою її видалення з сировини

Враховуючи фізико-хімічні властивості основних груп активних речовин суплідь хмелю, зокрема, властивості та вміст у вихідній сировині компонентів гіркої смоли, одержання екстракту з високим вмістом пренілових флавоноїдів потребує попереднього видалення неполярної фракції.

Метою даного етапу досліджень став пошук оптимальних умов екстрагування суплідь хмелю з максимальним звільненням з екстракту речовин ліпофільної природи. Таким чином, проміжна стадія процесу одержання активного фармацевтичного інгредієнта, збагаченого преніловими халконами та їх циклізованими флаванонами, мала бути надзвичайно важливою [3].

У якості вихідної сировини, використовували супліддя хмелю сорту «Руслан» врожаю 2012 року; екстрагенти: н-гептан та н-гексан. У якості методу екстрагування використовували метод фільтраційної екстракції при кімнатній температурі. На першому етапі дослідження попередньо подрібнену сировину у кількості 90,0 г екстрагували н-гептаном до загального DER 1:20. Загальний об'єм одержаного рідкого витягу становив 1800 мл. У процесі екстракції відбирали проби рідкого витягу із кроком DER 1:1, тобто по 90 мл кожна. Останню пробу витягу видаляли з сировини за допомогою вакууму.

У кожному з одержаних зразків визначали вміст сухого залишку, досліджували динаміку екстрагування ліпофільної фракції та ідентифікували наявність у них хумулонів і лупулонів, як основних компонентів гіркої смоли, та наявність X.

На наступному етапі дослідження, сировину у кількості 90,0 г екстрагували паралельно н-гептаном та н-гексаном із DER, що було визначене як оптимальне з попереднього експерименту та становило 1:12. Процес екстрагування сировини кожним з екстрагентів проводили у однакових умовах методом фільтраційної екстракції. До завантаженої у фільтраційний екстрактор сировини додавали екстрагент. Надалі, сировину екстрагували із рівномірною швидкістю до одержання рідкого витягу з DER 1:12. Відбір проб проводили із кожного з сумарних витягів та оцінювали за вмістом сухого залишку, виходом екстрактивних речовин з екстрагованої сировини та наявності в них хумулонів, лупулонів та X.

Вміст сухого залишку у зразках екстрактів визначали згідно методу, описаного в *підпункті 2.3.1.1* та обчислювали за формулою 2.1.

Дослідження динаміки екстрагування сировини н-гептаном до загального DER 1:20 (1800 мл) із відбором проб DER 1:1 (90 мл) полягав у розрахунку та оцінці показників згідно формул 2.12-2.15.

Обчислення вищезазначених показників проводили за допомогою програми MS Excel.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини в сумарних витягах при порівняльній екстракції н-гептаном та н-гексаном обчислювали за формулою 2.2.

Ідентифікацію і якісну оцінку екстрактів, отриманих на стадії знежирення сировини, проводили методом ТШХ (*підпункт 2.3.1.3*). У зразках рідких екстрактів визначали хумулони, лупулони та ксантохумол. Розрахунок необхідного об'єму випробовуваного розчину для нанесення обчислювали за формулою 2.4.

Відповідно до мети даного етапу дослідження, згідно якої оптимальні умови екстрагування мають забезпечити максимальне видалення речовин ліпофільної природи з сировини, було визначено основні критерії ефективності процесу. До даних критеріїв було віднесено селективність екстрагенту відносно α - та β -кислот суплідь хмелю у поєднанні з його

відносною інертністю до екстрагування халконів та їх відповідних циклізованих форм. Враховуючи неполярну природу компонентів гіркої смоли сундуча хмелю, її ефективне видалення з сировини може бути забезпечене відповідним неполярним розчинником: бензином, нефрасом, алканами, фреонами, надкритичним або докритичним CO_2 , тощо (рис. 3.1). Аналізуючи фізико-хімічні властивості, доступність неполярних органічних розчинників, їх безпеку та технологічну виправданість, у якості досліджуваних екстрагентів було обрано алкани з ряду C6-C7 [16].

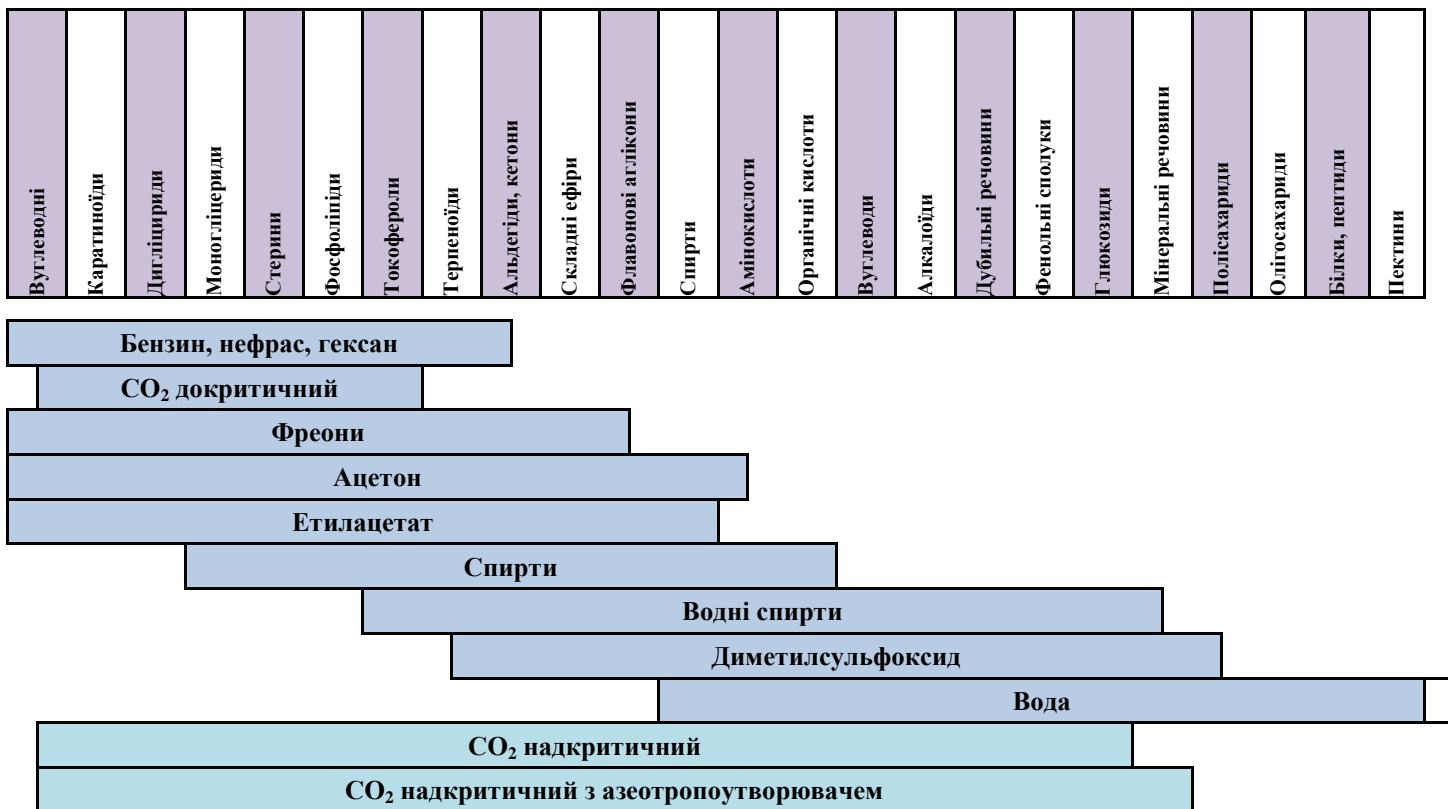


Рис. 3.1. Ряд полярності природних БАР та екстракційні властивості розчинників за Улесовим (ДНЦЛЗ)

У результаті виснажливої екстракції сировини хмелю з використанням у якості екстрагенту н-гептану до загального DER 1:20 було визначено кількісні та якісні показники процесу. Виходячи з якісних характеристик випробовуваних розчинів (n=1-20), ефективно видалення гірких кислот з сировини відбувається при екстрагуванні хмелю до DER 1:12 (рис. 3.2, 3.3, 3.4). Подальше екстрагування сировини стало недоцільним, тому що на хроматограмах випробовуваних розчинів зразків екстрактів,

одержаних із більшим співвідношенням (рис. 3.4), не виявляються зони, що відповідають зонам хумулоу (зона 2), лупулоу (зона 3) та X (зона 1).

Як видно з таблиці 3.1 вміст сухого залишку C_n при DER 1:11 становить менше 1%. Це свідчить про низьку ефективність подальшої екстракції, так як витратна частина процесу перевищує її доцільність. Поряд із цим вихід екстрактивних речовин з екстрагованої сировини D_n також не демонструє ефективної динаміки після DER 1:12. Узагальнюючі результати дослідження динаміки, можна говорити про недоцільність продовження процесу знежирення сировини хмелю із DER більшим 1:12 (табл. 3.1).

Щодо селективності застосованого екстрагенту, то судячи з інтенсивності зон хумулоу і лупулоу та інших зон, характерних для неполярних сполук (верхня частина хроматограм) на ТШХ, н-гептан виявив селективність саме до ліпофільної фракції речовин хмелю. Крім того слабка інтенсивність зони X у випробовуваних розчинах свідчить про відносну інертність гептану при екстрагуванні даного класу речовин. Одержані результати свідчать про доцільність застосування н-гептану як екстрагенту, що здатен ефективно вилучати ліпофільні речовини з суплідь хмелю, суттєво не екстрагуючи при цьому фенольні сполуки.

Визначивши оптимальні умови екстрагування суплідь хмелю н-гептаном, наступним етапом досліджень стала оцінка екстрагуючої здатності н-гексану, як більш економічно доцільного екстрагенту. Для цього експеримент здійснювали шляхом паралельного екстрагування сировини в однакових умовах н-гептаном та н-гексаном до загального співвідношення «сировина:екстракт» 1:12 з наступним визначенням кількісних та якісних показників обох процесів.

Таблиця 3.1

**Характеристики динаміки екстрагування ліпофільних речовин з суплідь хмелю при виснажливій екстракції
н-гептаном**

№ зразку	DER	Об'єм окремої порції екстракту V_n , мл	Об'єм сумарного екстракту V_{n+1} на стадії, мл	Вміст сухого залишку, ω_n , %	Вміст сухого залишку, A_n , г	Вміст сухого залишку, B_n , г	Вміст сухого залишку, C_n , %	Вихід екстрактивних речовин, D_n , %
1	1:1	90	90	1,534	1,381	1,381	1,53	1,53
2	1:2	90	180	1,422	1,280	2,660	1,48	2,96
3	1:3	90	270	1,290	1,161	3,821	1,42	4,25
4	1:4	90	360	1,184	1,066	4,887	1,36	5,43
5	1:5	90	450	1,062	0,956	5,843	1,30	6,49
6	1:6	90	540	1,056	0,950	6,793	1,26	7,55
7	1:7	90	630	0,918	0,826	7,619	1,21	8,47
8	1:8	90	720	0,754	0,679	8,298	1,15	9,22
9	1:9	90	810	0,604	0,544	8,842	1,09	9,82
10	1:10	90	900	0,324	0,292	9,133	1,01	10,15
11	1:11	90	990	0,244	0,220	9,353	0,94	10,39
12	1:12	90	1080	0,190	0,171	9,524	0,88	10,58
13	1:13	90	1170	0,186	0,167	9,691	0,83	10,77
14	1:14	90	1260	0,156	0,140	9,832	0,78	10,92
15	1:15	90	1350	0,144	0,130	9,961	0,74	11,07
16	1:16	90	1440	0,128	0,115	10,076	0,70	11,20
17	1:17	90	1530	0,128	0,115	10,192	0,67	11,32
18	1:18	90	1620	0,088	0,079	10,271	0,63	11,41
19	1:19	90	1710	0,086	0,077	10,348	0,61	11,50
20	1:20	90	1800	0,178	0,160	10,508	0,58	11,68

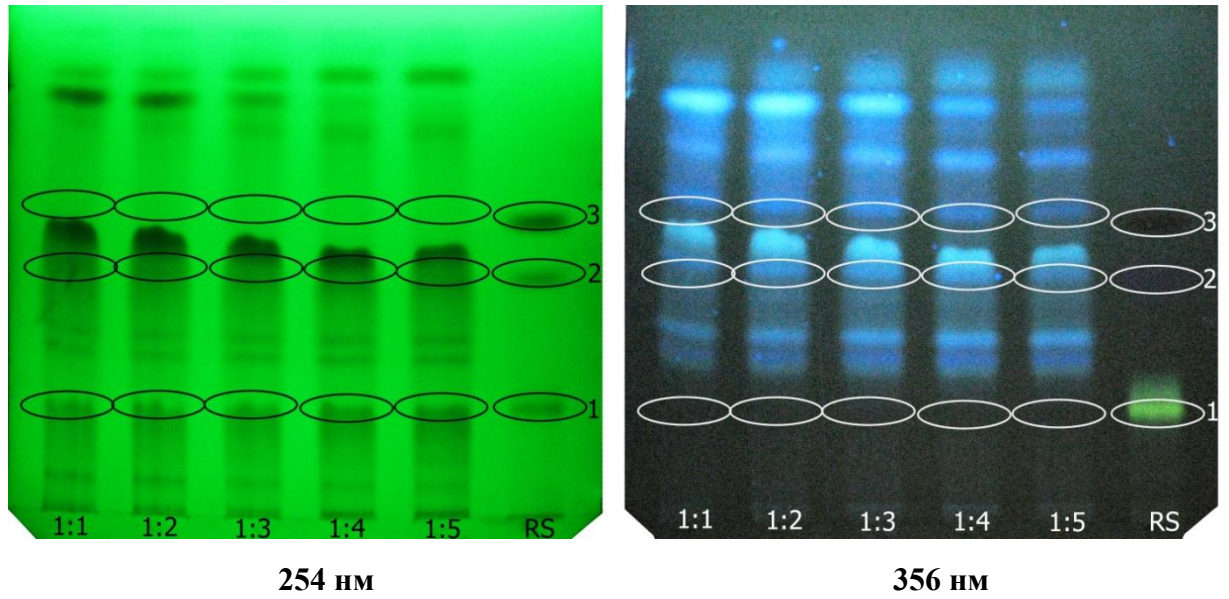


Рис. 3.2. Хроматограми зразків рідких екстрактів суплідь хмелю, одержаних з використанням н-гептану у співвідношеннях «сировина:екстракт» від 1:1 до 1:5

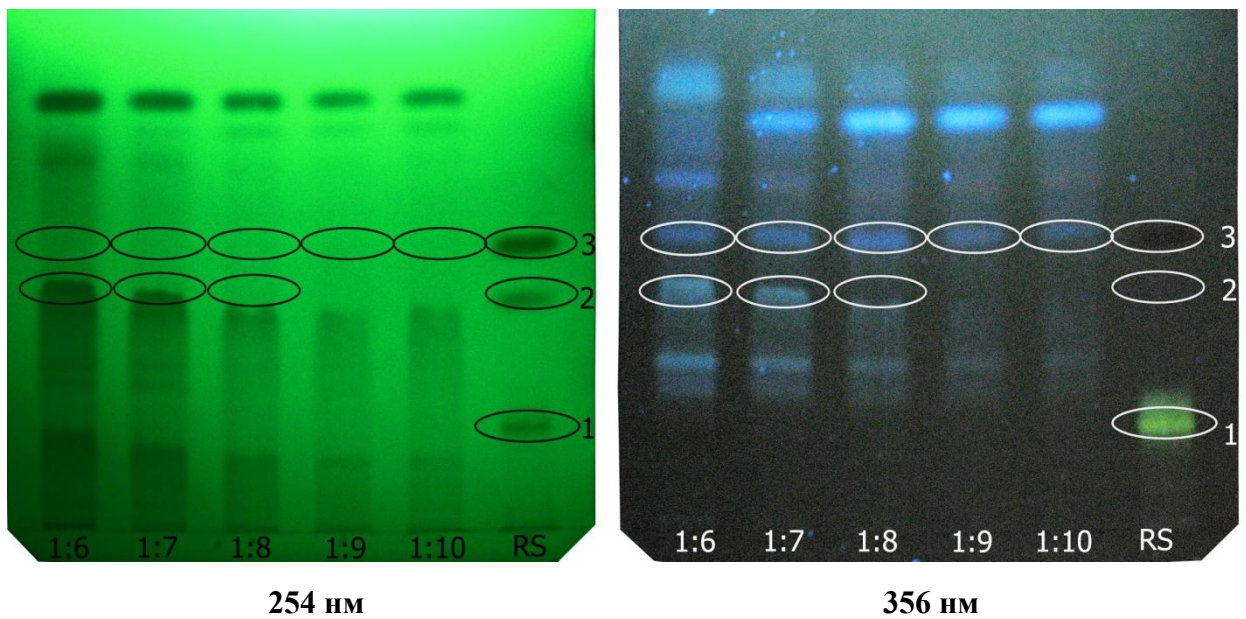


Рис. 3.3. Хроматограми зразків рідких екстрактів суплідь хмелю, одержаних з використанням н-гептану у співвідношеннях «сировина:екстракт» від 1:6 до 1:10

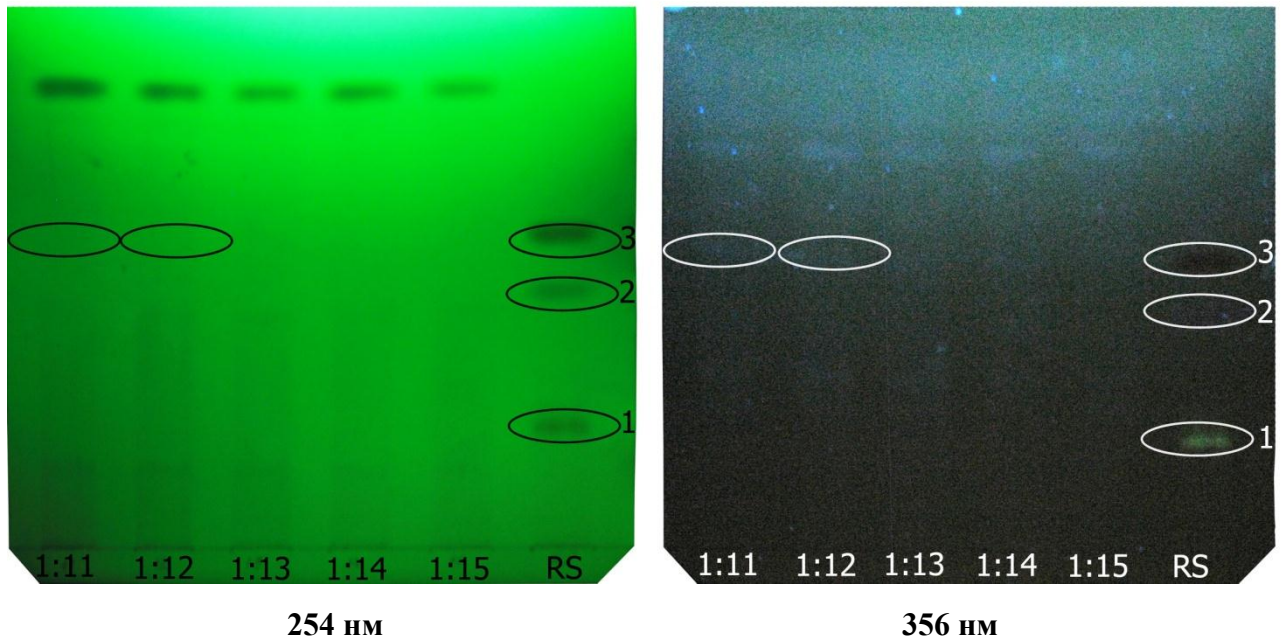


Рис. 3.4. Хроматограми зразків рідких екстрактів суплідь хмелю, одержаних з використанням н-гептану у співвідношеннях «сировина:екстракт» від 1:11 до 1:15

Одержані результати свідчать про рівноцінну ефективність екстрагування обома екстрагентами. Підтвердженням для цього висновку є експериментальні данні про вміст сухих залишків та вихід екстрактивних речовин (табл. 3.2) у поєднанні із ідентифікацією хумулому, лупулому та Х (рис. 3.5).

Таблиця 3.2

Характеристики екстрагування ліпофільних речовин з суплідь хмелю н-гептаном та н-гексаном за однакових умов процесу

Екстрагент	DER	Сухий залишок ω , %	Вихід екстрактивних речовин, D, %
н-гептан	1:12	0,846	10,15
н-гексан	1:12	0,842	10,10

Таким чином, близькість результатів щодо критеріїв оцінки ефективності екстрагенту, а саме його селективність відносно α - та β -кислот у поєднанні з відносною інертністю до екстрагування фенольних сполук свідчать про доцільність застосування н-гексану у якості більш дешевої альтернативи н-гептану.

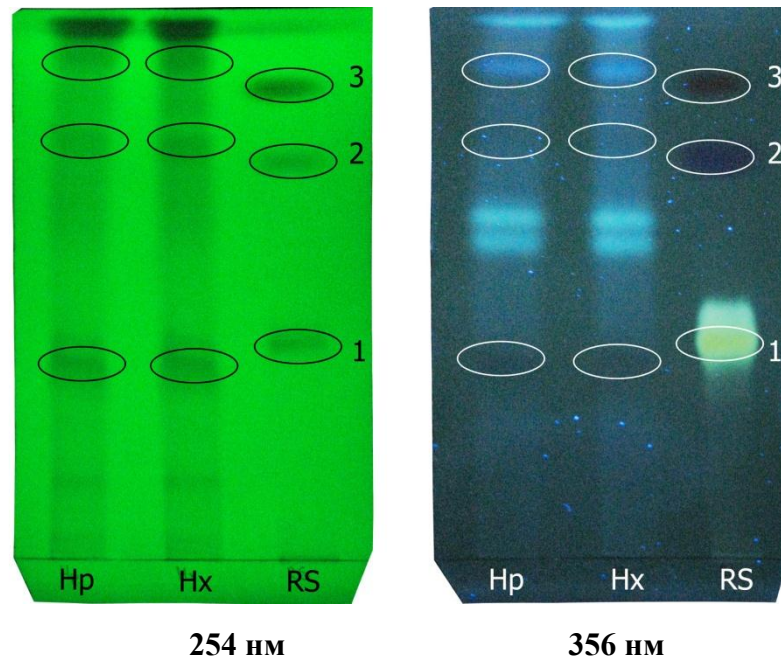


Рис. 3.5. Хроматограми зразків рідких екстрактів суплідь хмелю, одержаних з використанням н-гептану та н-гексану у співвідношеннях «сировина:екстракт» 1:12

Таким чином, максимальне видалення із сировини ліпофільних речовин спостерігається при використанні у якості екстрагентів алканів з ряду С6-С7. На даній проміжній стадії процесу одержання активного фармацевтичного інгредієнта, збагаченого халконами та їх похідними, екстрагування зазначеними алканами лежить у співвідношенні «сировина:екстракт» не менше 1:12. Пріоритетним є застосування н-гексану, як більш дешевої сировини. Дані умови забезпечують ефективне видалення компонентів гіркої смоли хмелю, завдяки відносній екстрагуючій інертності досліджених екстрагентів до фенольних сполук. Одержаний за таких умов екстракт характеризується виходом екстрактивних речовин у межах 10% та ідентифікованою наявністю компонентів гіркої смоли (α - та β - кислот суплідь хмелю). Разом з тим, якісні характеристики одержаного ліпофільного екстракту свідчать про можливість його застосування у подальших дослідженнях з розробки нових препаратів. Запропонована роздільна схема

екстрагування активних речовин хмелю є перспективною в аспекті комплексної переробки суплідь хмелю.

3.2. Дослідження та визначення оптимальних умов екстрагування пренілових флавоноїдів із знежиреної сировини хмелю

Метою даного етапу досліджень став пошук оптимальних умов екстрагування попередньо знежиреної сировини хмелю на шляху одержання екстракту з підвищеним вмістом X, IX, 8-PN, 6-PN [7].

Враховуючи те, що зазначені пренілові флавоноїди є сполуками середньо-полярної природи, для ефективного їх виділення у якості екстрагенту нами було обрано 70% водний розчин етанолу. Приготування водно-спиртових розчинів необхідної концентрації, проводили шляхом змішування певних об'ємів спирту та води очищеної.

У якості вихідної сировини використовували супліддя хмелю сорту «Руслан» врожаю 2012 року, н-гексан, етанол 96% та воду очищену. Для екстрагування використовували метод фільтраційної екстракції. Екстрагування сировини здійснювали у два ступені при кімнатній температурі.

З метою максимального видалення з сировини ліпофільних речовин, на першому ступені попередньо подрібнену сировину у кількості 90,0 г було екстраговано н-гексаном. Як було зазначено у *підрозділі 3.1* екстрагування н-гексаном проводили до загального DER 1:12. Після завершення екстрагування шрот перевантажували з екстрактора у випарну колбу. Потім максимально видаляли залишки екстрагенту шляхом його відгону у роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та у робочому діапазоні вакууму 200-45 мбар протягом 1 години.

На другому ступені попередньо оброблений напівпродукт хмелю (шрот) у кількості 70,0 г завантажували у екстрактор та екстрагували 70% етанолом до загального співвідношення DER 1:20 (1400 мл). Збір водно-спиртового витягу проводили окремими порціями із кроком DER 1:1 (70 мл).

У кожному з одержаних зразків визначали вміст сухого залишку, вміст X, IX, 8-PN, 6-PN та досліджували динаміку екстрагування знежиреної сировини.

Вміст сухого залишку у зразках екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.1*, та обчислювали за формулою 2.1.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у окремо зібраних зразках водно-спиртових витягів проводили згідно методу 3, *підпункта 2.3.1.4* з використанням ВЕРХ/MS/MS для ідентифікації піків. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках екстрактів обчислювали за формулою 2.6.

Дослідження динаміки екстрагування знежиреної сировини водно-етанольним екстрагентом полягав у розрахунку та оцінці показників згідно формул 2.12-2.17.

Обчислення вищезазначених показників проводили за допомогою програми MS Excel.

Вивчення умов екстрагування знежиреної сировини хмелю полягало в загальній оцінці характеру зміни вмісту сухого залишку, виходу екстрактивних речовин, кількісного вмісту у окремих та загальних порціях екстрактів пренілових флавоноїдів (X, IX, 8-PN, 6-PN) від зміни DER та вихід досліджуваних поліфенолів з екстрагованої сировини. Одержані дані представлені у таблиці 3.3.

Характер зміни досліджуваних показників вивчали за допомогою діаграм їх взаємозалежності (рис. 3.6, 3.7).

Експериментальні дані вмісту сухого залишку та X, IX, 8-PN, 6-PN у окремих порціях рідких екстрактів (рис. 3.6, табл. 3.3) свідчать про характерні зміни зазначених показників у залежності від співвідношення «сировина:екстракт». При збільшенні даного співвідношення від 1:1 до 1:20, сухий залишок ω_n та кількісний вміст у окремих порціях екстрактів X_n ксантохумолу та ізоксантохумолу поступово зменшуються. Екстрагування 8-пренілнарінгеніну та 6-пренілнарінгеніну характеризується поступовим накопиченням сполук у порціях екстрактів X_n з наступним зменшенням їх

вмісту у динаміці збільшення співвідношення «сировина:екстракт». Зазначені характерні особливості екстрагування пов'язані з динамічним зниженням сухого залишку при збільшенні співвідношення «сировина:екстракт» та різним кількісним співвідношенням досліджуваних конститuentів на різних етапах екстракції.

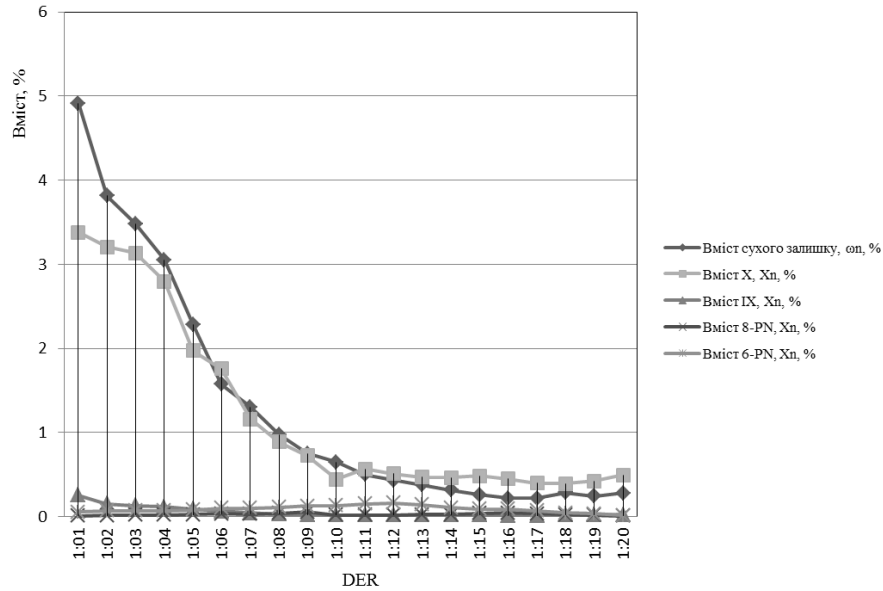


Рис. 3.6. Кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN та сухого залишку у окремих порціях рідких екстрактів при відповідному DER

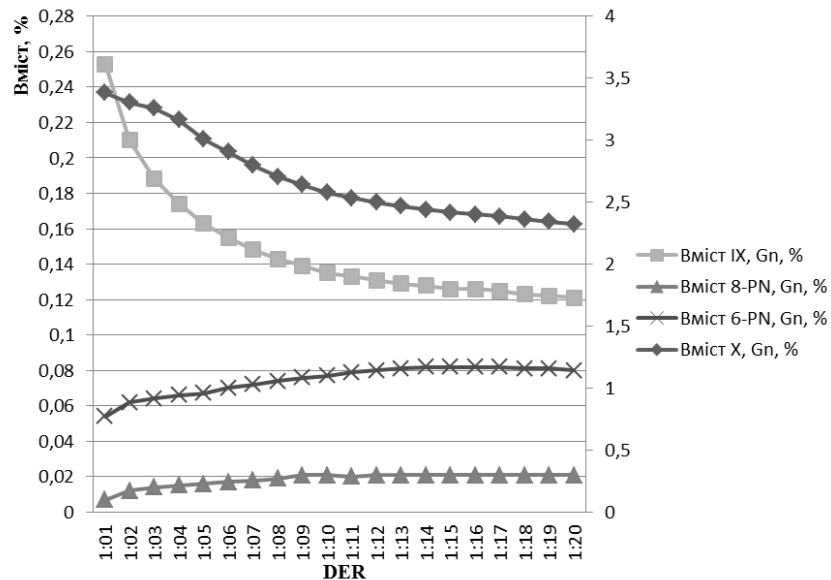


Рис. 3.7. Кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN у загальних рідких екстрактах при відповідному DER

Таблиця 3.3

Експериментальні дані процесу екстрагування

№ зразку	DER	Об'єм окремої порції екстракту V _п , мл	Об'єм сумарного екстракта V _{п,г} на стадії, мл	Вміст сухого залишку, оп, %	Вміст сухого залишку, Ал, г	Вміст сухого залишку, Вп, г	Вміст сухого залишку, Сп, %	Вихід екстрактивних речовин, D _в , %	Вміст X, X _в , %	Вміст IX, X _в , %	Вміст 8-PN, X _в , %	Вміст 6-PN, X _в , %	Вміст X, G _в , %	Вміст IX, G _в , %	Вміст 8-PN, G _в , %	Вміст 6-PN, G _в , %	Вихід X, Ln, %	Вихід IX, Ln, %	Вихід 8-PN, Ln, %	Вихід 6-PN, Ln, %
1	1:1	70	70	4,912	3,438	3,438	4,9120	4,91	3,382	0,253	0,007	0,054	3,382	0,253	0,007	0,054	0,166	0,012	0,000	0,003
2	1:2	70	140	3,814	2,670	6,108	4,3630	8,73	3,204	0,155	0,017	0,073	3,304	0,210	0,012	0,062	0,288	0,018	0,001	0,005
3	1:3	70	210	3,484	2,439	8,547	4,0700	12,21	3,136	0,133	0,018	0,070	3,256	0,188	0,014	0,064	0,398	0,023	0,002	0,008
4	1:4	70	280	3,054	2,138	10,685	3,8160	15,26	2,795	0,115	0,020	0,071	3,164	0,174	0,015	0,066	0,483	0,026	0,002	0,010
5	1:5	70	350	2,286	1,600	12,285	3,5100	17,55	1,971	0,091	0,025	0,079	3,009	0,163	0,016	0,067	0,528	0,029	0,003	0,012
6	1:6	70	420	1,574	1,102	13,387	3,1873	19,12	1,758	0,068	0,034	0,099	2,906	0,155	0,017	0,070	0,556	0,030	0,003	0,013
7	1:7	70	490	1,302	0,911	14,298	2,9180	20,43	1,162	0,043	0,032	0,103	2,795	0,148	0,018	0,072	0,571	0,030	0,004	0,015
8	1:8	70	560	0,974	0,682	14,980	2,6750	21,40	0,888	0,032	0,041	0,114	2,708	0,143	0,019	0,074	0,579	0,031	0,004	0,016
9	1:9	70	630	0,752	0,526	15,506	2,4613	22,15	0,728	0,026	0,054	0,125	2,641	0,139	0,021	0,076	0,585	0,031	0,005	0,017
10	1:10	70	700	0,650	0,455	15,961	2,2802	22,80	0,444	0,022	0,018	0,132	2,578	0,135	0,021	0,077	0,588	0,031	0,005	0,018
11	1:11	70	770	0,502	0,351	16,313	2,1185	23,30	0,568	0,021	0,020	0,151	2,535	0,133	0,020	0,079	0,591	0,031	0,005	0,018
12	1:12	70	840	0,432	0,302	16,615	1,9780	23,74	0,513	0,020	0,022	0,163	2,498	0,131	0,021	0,080	0,593	0,031	0,005	0,019
13	1:13	70	910	0,380	0,266	16,881	1,8551	24,12	0,468	0,018	0,023	0,142	2,466	0,129	0,021	0,081	0,595	0,031	0,005	0,020
14	1:14	70	980	0,318	0,223	17,104	1,7453	24,43	0,463	0,018	0,026	0,108	2,440	0,128	0,021	0,082	0,596	0,031	0,005	0,020
15	1:15	70	1050	0,260	0,182	17,286	1,6463	24,69	0,486	0,020	0,039	0,092	2,419	0,126	0,021	0,082	0,597	0,031	0,005	0,020
16	1:16	70	1120	0,220	0,154	17,440	1,5571	24,91	0,447	0,017	0,043	0,093	2,402	0,126	0,021	0,082	0,598	0,031	0,005	0,020
17	1:17	70	1190	0,220	0,154	17,594	1,4785	25,13	0,396	0,016	0,036	0,072	2,384	0,125	0,021	0,082	0,599	0,031	0,005	0,021
18	1:18	70	1260	0,288	0,202	17,795	1,4123	25,42	0,393	0,018	0,026	0,046	2,362	0,123	0,021	0,081	0,600	0,031	0,005	0,021
19	1:19	70	1330	0,246	0,172	17,968	1,3509	25,67	0,424	0,022	0,021	0,035	2,343	0,122	0,021	0,081	0,601	0,031	0,005	0,021
20	1:20	70	1400	0,282	0,197	18,165	1,2975	25,95	0,494	0,025	0,012	0,017	2,323	0,121	0,021	0,080	0,603	0,031	0,005	0,021

Аналіз кількісного вмісту кожного з пренілових флавоноїдів у загальних екстрактах G_n (рис. 3.7, табл. 3.3), одержаних при певному співвідношенні DER, свідчить про рівномірність їх екстрагування з сировини. Починаючи з співвідношення 1:9, екстрагування 8-пренілнарінгеніну (G_n) набуває сталого характеру.

Особливо важливим показником є вихід 8-пренілнарінгеніну (L_n) з сировини. Важливість даного показника полягає у його демонстрації ефективності процесу екстракції терапевтично-активного компонента. Крім того, за допомогою даного показника можливо розрахувати кількість дозованих форм, у які входить АФІ. Так, починаючи з DER 1:9 вихід 8-пренілнарінгеніну (L_n) становить 0,005%, тобто подальше екстрагування даного компонента не набуває зростання (табл. 3.3).

Загальний аналіз експериментальних даних дозволяє зробити висновок, що співвідношення DER, при якому процес екстракції забезпечує оптимальний вміст у екстракті ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнарінгеніну та 6-пренілнарінгеніну, лежить в межах 1:9-10. Екстракт, одержаний при зазначеному співвідношенні, характеризується середнім вмістом X 2,61%, IX 0,14%, 8-PN 0,02%, 6-PN 0,08% та виходом екстрактивних речовин 22,80-22,15%. Середні значення виходу X, IX, 8-PN, 6-PN з екстрагованої сировини становлять 0,587%, 0,031%, 0,005%, 0,018% відповідно. Таким чином, екстрагування знежирених суплідь хмелю водно-етанольним екстрагентом при співвідношення DER 1:10 здатне забезпечити ефективне та раціональне проведення процесу екстракції.

3.3. Дослідження впливу попередньої термічної обробки суплідь хмелю на кількісний вміст пренілових флавоноїдів у сухому екстракті

Метою даного етапу досліджень став пошук технологічного шляху підвищення вмісту 8-PN у екстракті - речовини обумовлюючої загальну естрогенну активність АФІ.

Одним з таких шляхів підвищення вмісту є термічна ізомеризація. Як було зазначено у огляді, при підвищеній температурі халкони X та DMX здатні трансформуватись у відповідні флаванони: ізоксантохумол IX, 8-пренілнарінгенін 8-PN та 6-пренілнарінгенін 6-PN. Доказом цього є конверсія X у IX у процесі варіння сусла у пивоварінні. Дослідження впливу температури на вміст X у хмельовому суслі свідчать про взаємозалежність даних показників. При обробці темного сусла при температурі 60, 80, 100⁰C впродовж 90 хвилин найбільший рівень ізомеризації ксантохумолу (зниження до 30% від початкового значення) фіксували при 100⁰C. Обробка сусла при температурі 80⁰C та 60⁰C призводила до зниження концентрації X до 74,6% та 93% від початкового значення відповідно. Крім того, було встановлено, що після 20 хвилин обробки сусла при високій температурі (100⁰C), ізомеризація X набувала майже лінійного характеру [88].

Окрім термічної ізомеризації пренілові халкони піддаються ізомеризації у лужному середовищі. Речовини X та DMX, виділені зі свіжозібраних суплідь хмелю, ізомеризувались в 5% розчині калію гідроксиду у етанолі до IX, 8-PN та 6-PN із виходом 80%, 30%, 35% відповідно. Даний підхід є ефективним, проте потребує проведення послідовних додаткових операцій [70].

Таким чином, технологічним інструментом з підвищення кількісного вмісту пренілових флаванонів у кінцевому екстракті нами було обрано термічну обробку вихідної сировини водяною парою [9].

У якості вихідної сировини використовували супліддя хмелю сорту «Руслан» врожаю 2012 року, н-гексан, етанол 96% та воду очищену. Екстрагування проводили методом фільтраційної екстракції двоступенево: при кімнатній температурі з попередньою термічною обробкою вихідної сировини.

Попередньо подрібнену сировину у кількості 200,0 г поміщали в циліндричну ємність з перфорованим дном. Ємність встановлювали над водяною банею та накривали кришкою. Термічна обробка полягала у

проходженні водяної пари крізь шар сировини без контакту між фазами рідина/рослинна сировина з метою виключення екстрагування останньою. Тривалість обробки становила 1 годину. Після завершення термічної обробки сировину перевантажували у випарну колбу та максимально видаляли частково поглинуту воду шляхом її відгону у роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та робочому діапазоні вакууму 90-30 мбар протягом 1 години.

На першому ступені екстрагування сировину після термічної обробки у кількості 90,0 г було екстраговано н-гексаном до загального DER 1:12. Після завершення екстрагування шрот перевантажували з екстрактора у випарну колбу та максимально видаляли залишки екстрагенту шляхом його відгону у роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та у робочому діапазоні вакууму 200-45 мбар протягом 1 години.

На другому ступені екстрагування знежирений напівпродукт хмелю у кількості 70,0 г завантажували у екстрактор та екстрагували 70% етанолом до загального співвідношення DER 1:20. Одержаний водно-спиртовий витяг почергово упарювали та висушували у вакуумі на роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та у робочому діапазоні вакууму 80-38 мбар.

У якості об'єкту порівняння використовували екстракт, одержаний у процесі дослідження оптимальних умов екстрагування пренілових флавоноїдів. До вихідної сировини даного екстракту не було застосовано термічну обробку (спосіб одержання описаний *в підрозділі 3.2*). Зазначений водно-спиртовий витяг було почергово упарено та висушено у вакуумі на роторному випарнику Büchi R134 у аналогічних для тест-зразку умовах.

У зразках обох водно-спиртових витягів визначали вміст сухого залишку та вихід екстрактивних речовин. У кожному з одержаних сухих екстрактах визначали втрату у масі при висушуванні та кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN.

Вміст сухого залишку у зразках рідких екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.1*, та обчислювали за формулою 2.1.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини у витягах обчислювали за формулою 2.2.

Втрату у масі при висушуванні у зразках сухих екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.2*, та обчислювали за формулою 2.3.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у сухих екстрактах проводили згідно методики, описаній у *підпункті 2.3.1.4*, з використанням ВЕРХ/MS/MS для ідентифікації піків, за методом 1. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках екстрактів обчислювали за формулою 2.5.

X та DMX є пренілованими халконами і, як зазначалось раніше, при певних реакційних умовах здатні піддаватись реакції ізомеризації з утворенням відповідних флаванонів. Дослідження впливу попередньої обробки суплідь хмелю водяною парою на процес термічної ізомеризації полягав у порівнянні кількісного вмісту пренілових X, IX, 8-PN, 6-PN у екстрактах, одержаних з та без застосування парової обробки. Результати представлені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів

Показник, %	Екстракт одержаний з паровою обробкою сировини	Екстракт одержаний без парової обробки сировини
Вміст X (X_n)	1,479	2,188
Вміст IX, (X_n)	0,281	0,111
Вміст 8-PN (X_n)	0,028	0,019
Вміст 6-PN (X_n)	0,093	0,073
Вміст сухого залишку (ω)	1,2578	1,2975
Вихід екстрактивних речовин (D)	25,16	25,95
Втрата в масі при висушуванні (W)	5,75	5,90

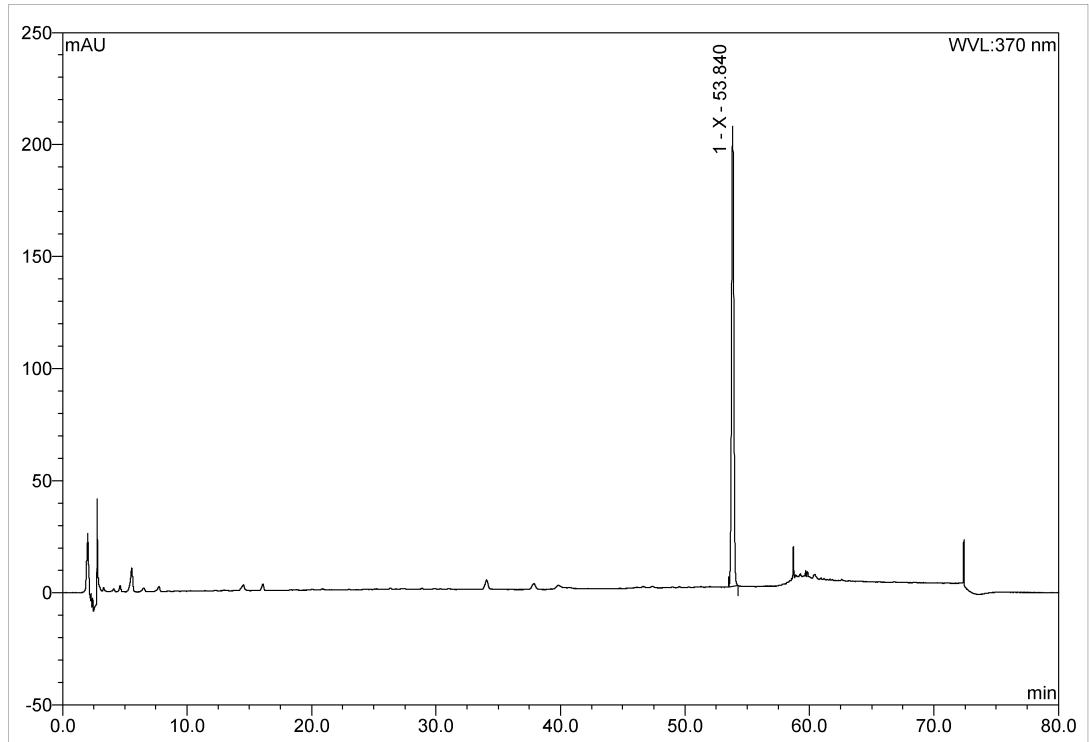


Рис. 3.8. Хроматограма сухого екстракту 1 при довжині хвилі 370 нм

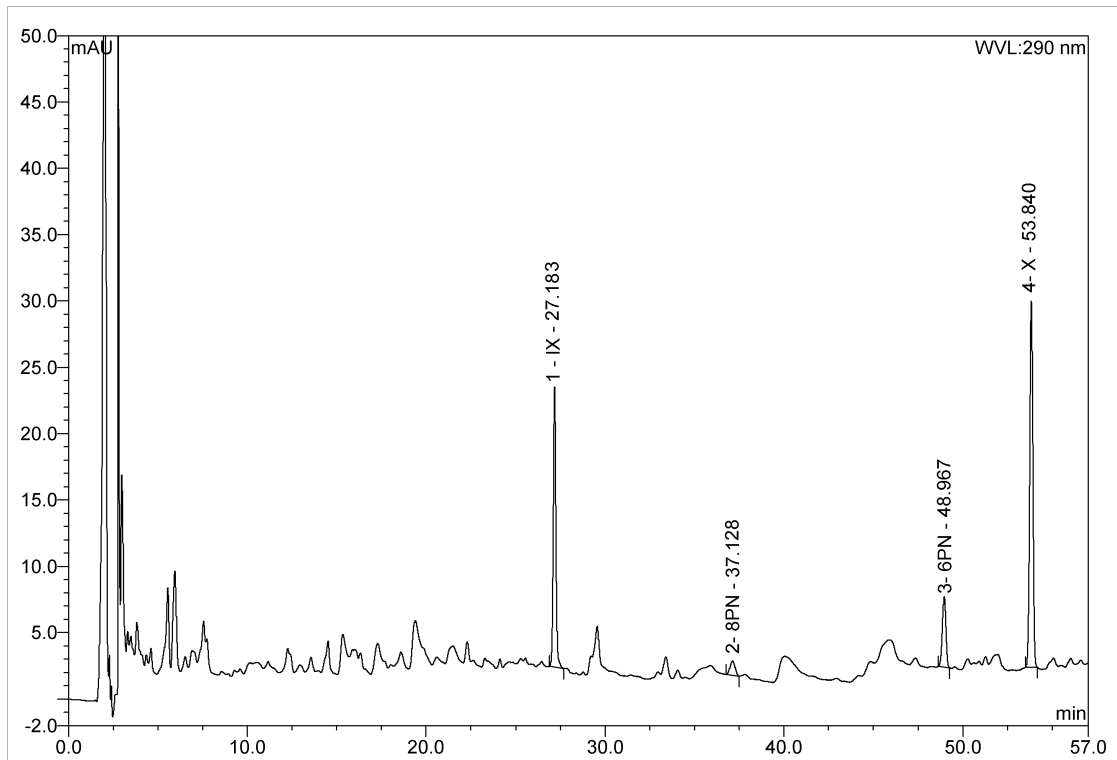


Рис. 3.9. Хроматограма сухого екстракту 1 при довжині хвилі 290 нм

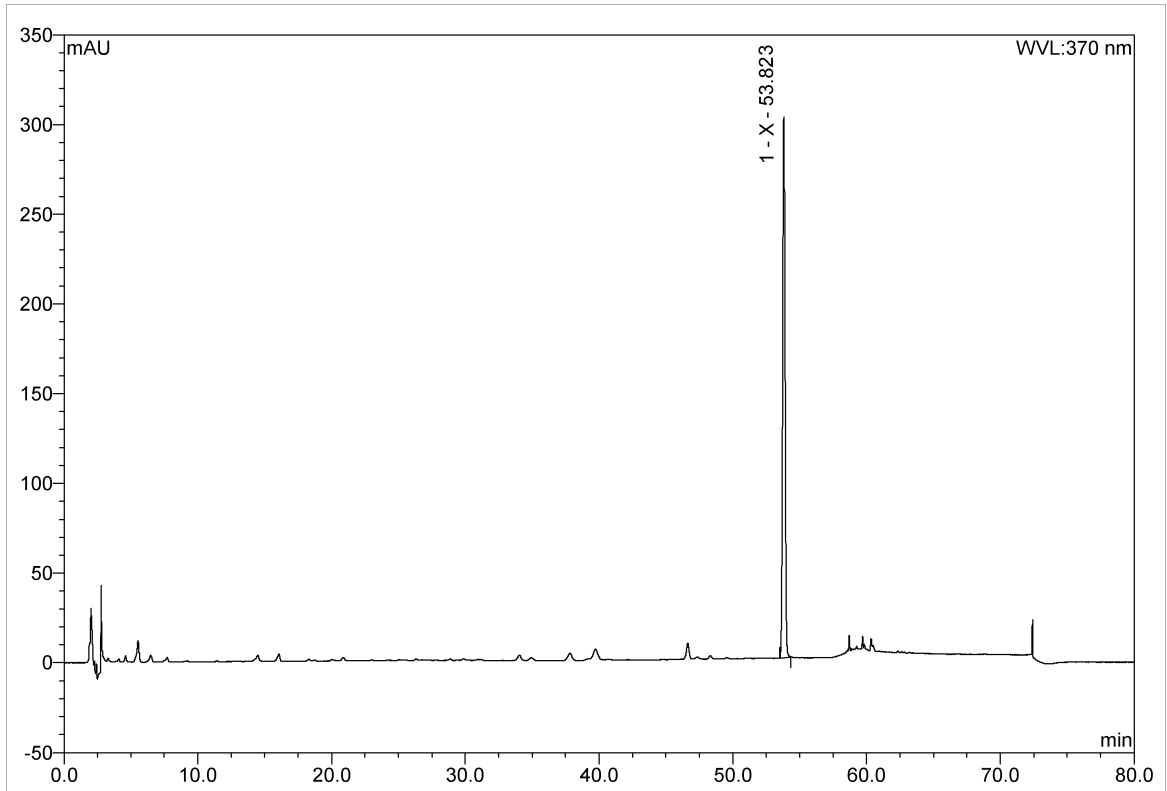


Рис. 3.10. Хроматограма сухого екстракту 2 при довжині хвилі 370 нм

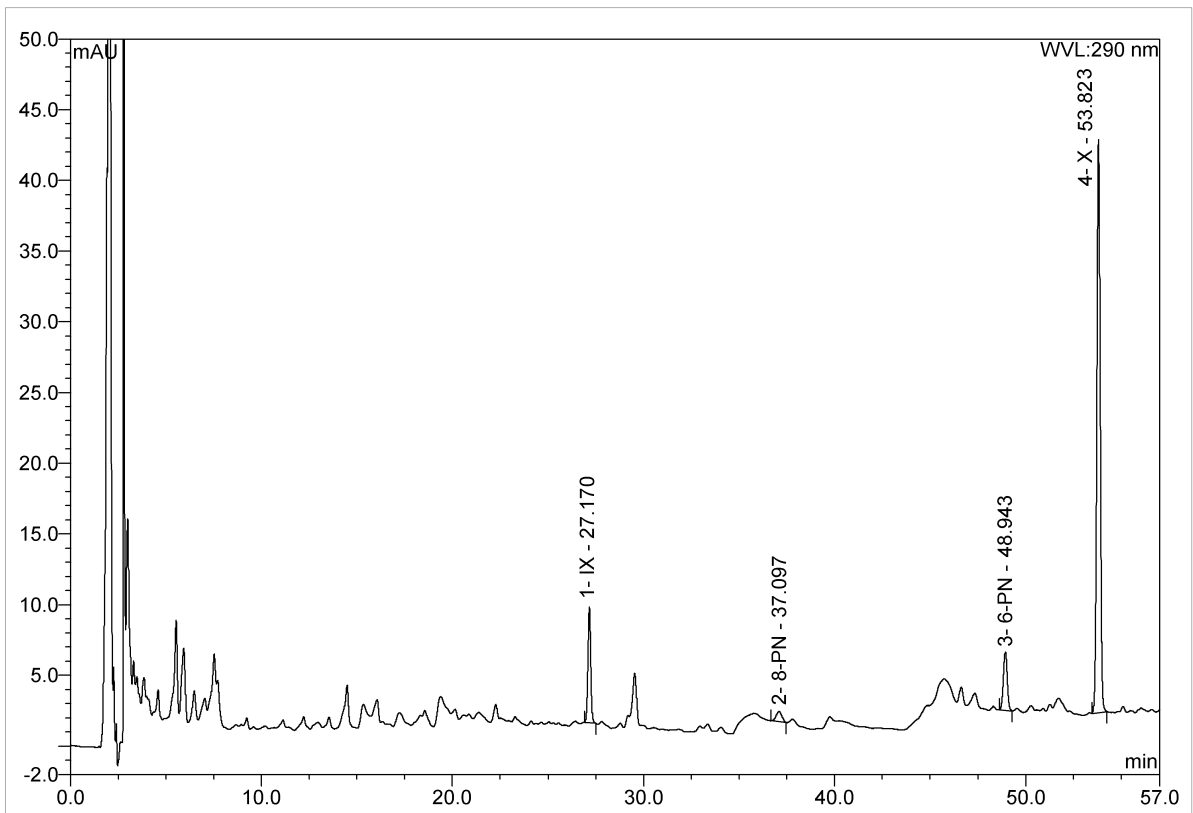


Рис. 3.11. Хроматограма сухого екстракту 2 при довжині хвилі 290 нм

Хроматограми досліджуваних екстрактів (рис. 3.8-3.11) свідчать про суттєві зміни у інтенсивності піків. Вказані зміни безпосередньо пов'язані зі зміною концентрації досліджуваних компонентів, що викликані їх структурними перетвореннями, внаслідок термічної обробки вихідної сировини. Слід зазначити значне зменшення площі піку X та збільшення площі піку IX (рис. 3.8, 3.9) на хроматограмі екстракту, одержаного з паровою обробкою, порівняно із площами піків X та IX у екстракті, одержаного без парової обробки (рис. 3.10, 3.11).

Одержані експериментальні дані демонструють характерний вплив термічної обробки сировини на кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у кінцевому продукті. За результатами, представленими у таблиці 3.4, попередня обробка суплідь хмелю водяною парою призводить до зменшення вмісту X на 32,40% та збільшення вмісту IX, 8-PN, 6-PN на 60,50%, 32,14% та 21,51% в порівнянні з вмістом даних сполук в екстракті, одержаному без попередньої парової обробки. Зазначені зміни кількісного вмісту пренілових флавоноїдів є доказом ефективності застосованої операції на ізомеризацію пренілових халконів суплідь хмелю у відповідні флаванони. Крім того, термічна ізомеризація практично не впливає на вихід екстрактивних речовин з вихідної сировини та виключає можливість часткового екстрагування X, IX, 8-PN та 6-PN у водний екстрагент.

3.4. Дослідження та визначення сорту хмелю у якості вихідної сировини сухого екстракту

Метою даного етапу досліджень стало вивчення залежності кількісного вмісту ксантохумолу (X), ізоксантохумолу (IX), 8-пренілнарінгеніну (8-PN) та 6-пренілнарінгеніну (6-PN) у кінцевому екстракті від сорту хмелю [13].

Враховуючи зацікавленість у одержанні екстракту із підвищеним вмістом флаванонів естрогеноподібної дії, зокрема 8-PN, технологічна схема одержання дослідних зразків екстрактів з різних сортів суплідь хмелю включала попередньо визначені оптимальні умови. Таким чином, процес

складався з послідовних стадій термічної ізомеризації пренілових флавоноїдів шляхом парової обробки вихідної сировини, знежирення суплідь хмелю н-гексаном із DER 1:12, екстракції знежиреної сировини 70% етанолом із DER 1:10, упарювання та сушки водно-етанольного витягу у вакуумі [3, 7, 9].

В якості вихідної сировини використані супліддя хмелю сортів «Руслан», «Ксанта», «Чаклун» врожаю 2012 року, н-гексан, етанол 96% та воду очищену. Одержання зразків екстрактів з досліджуваних сортів вихідної сировини проводили за загальним приведеним методом.

Попередньо подрібнені супліддя хмелю певного сорту у кількості 200,0 г обробляли парою на водяній бані впродовж 1 години з наступним видаленням поглинутої вологи (*підрозділ 3.3*).

Після термічної обробки, проводили екстрагування сировини при кімнатній температурі в умовах фільтраційної екстракції.

На першому ступені, оброблені супліддя хмелю в кількості 90,0 г було екстраговано н-гексаном до загального DER 1:12 з наступним видаленням залишків екстрагенту зі шроту (*підрозділ 3.3*).

На другому ступені знежирений напівпродукт хмелю (шрот) у кількості 70,0 г екстрагували 70% етанолом до загального DER 1:10, який було визначено з оптимального діапазону на етапі розробки (*підрозділ 3.2*). Одержаний водно-спиртовий витяг по чергово упарювали та висушували у вакуумі на роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та в робочому діапазоні вакууму 80-38 мбар. Перед висушуванням водно-спиртового витягу проводили визначення у ньому сухого залишку та обчислювали вихід екстрактивних речовин. У одержаному сухому екстракті визначали втрату у масі при висушуванні та кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN.

Вміст сухого залишку у зразках екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.1*, та обчислювали за формулою 2.1.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини у витягах обчислювали за формулою 2.2.

Втрату у масі при висушуванні у зразках сухих екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.2*, та обчислювали за формулою 2.3.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у сухих екстрактах проводили згідно методики, описаній в *підпункті 2.3.1.4*, з використанням ВЕРХ/MS/MS для ідентифікації піків. Визначення в екстракті з сорту хмелю «Руслан» проводили по методу 2, а визначення у екстрактах з сортів хмелю «Ксанта» та «Чаклун» по методу 3. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках екстрактів обчислювали за формулою 2.5.

Відомо, що компонентний склад біологічно-активних речовин однієї рослинної сировини варіює у залежності від її сорту. Стосовно сировини хмелю, то основним призначенням її є масове застосування у пивоварній галузі і основним показником якості сорту є вміст гірких речовин, зокрема, альфа-кислоти [15].

Метою подальшого нашого дослідження було пошук сортів хмелю з підвищеним кількісним вмістом X, IX, 8-PN та 6-PN, тому відбір сортів проводився за оптимальним вмістом X. Даний критерій вибору базувався також на тому, що саме X та DMX є попередниками IX та суми 8-PN та 6-PN відповідно. Експериментальні дані вмісту пренілових флавоноїдів у отриманих екстрактах представлені в таблиці 3.5.

За результатами, представленими в таблиці 3.5, видно що, екстракт, одержаний із суплідь сорту «Руслан» характеризується найбільшим вмістом X та сумарним вмістом X та IX. Близькість кількісних значень даних сполук із відповідними показниками у екстракті від сорту «Ксанта» свідчать про відносно близький кількісний вміст X у вихідній сировині обох сортів. Проте, вищий вміст DMX у сировині суплідь сорту «Ксанта», як прекурсор 8-PN та суми 8-PN і 6-PN, підтверджують перевагу цього сорту над іншими досліджуваними сортами. Екстракт одержаний з суплідь сорту «Чаклун»

характеризується найнижчими кількісними показниками X, IX, 8-PN, 6-PN та виходом екстрактивних речовин.

Таблиця 3.5

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів

Показник, %	Сорт «Руслан»	Сорт «Ксанта»	Сорт «Чаклун»
Вміст X (X_n)	1,517	1,451	0,377
Вміст IX, (X_n)	0,320	0,345	0,079
Вміст 8-PN (X_n)	0,023	0,057	0,015
Вміст 6-PN (X_n)	0,085	0,179	0,069
Вміст сухого залишку (ω)	2,560	2,455	2,085
Вихід екстрактивних речовин (D)	25,60	24,55	20,85
Втрата в масі при висушуванні (W)	4,97	4,11	4,85

Хроматограми досліджуваних екстрактів представлені на рисунках 3.12 - 3.17.

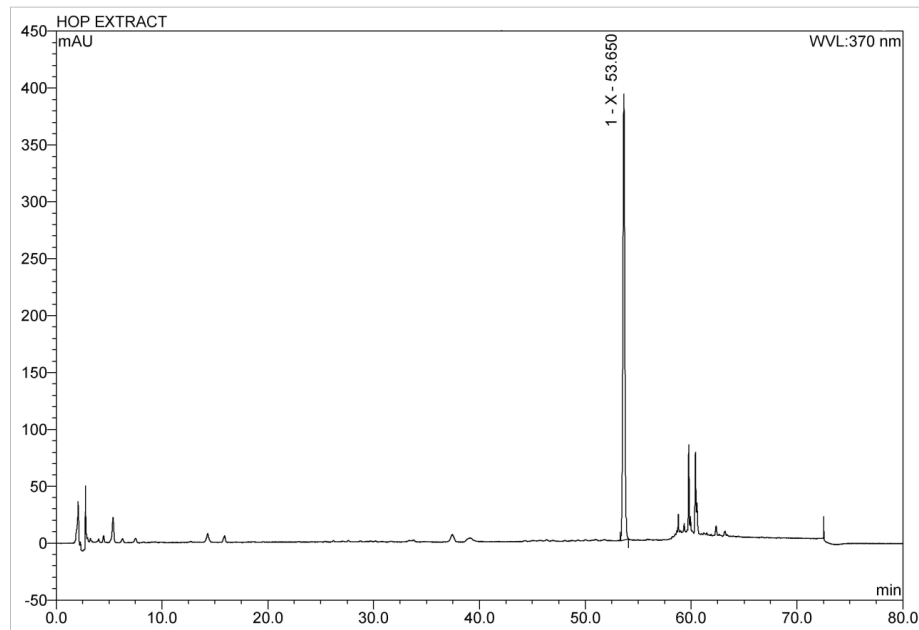


Рис. 3.12. Хроматограма сухого екстракту хмелю сорту «Руслан» при 370 нм

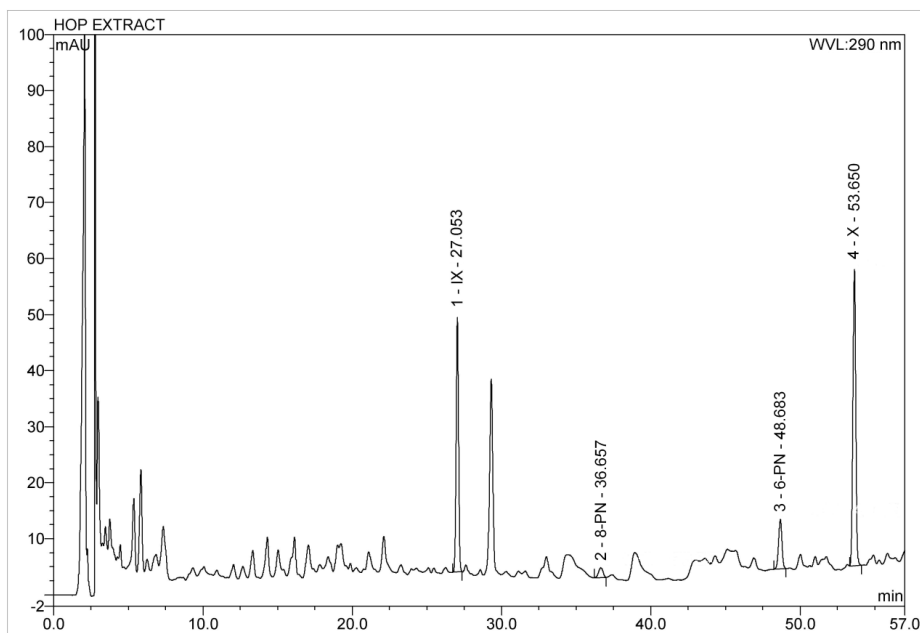


Рис. 3.13. Хроматограмма сухого экстракту хмелю сорту «Руслан» при 290 нм

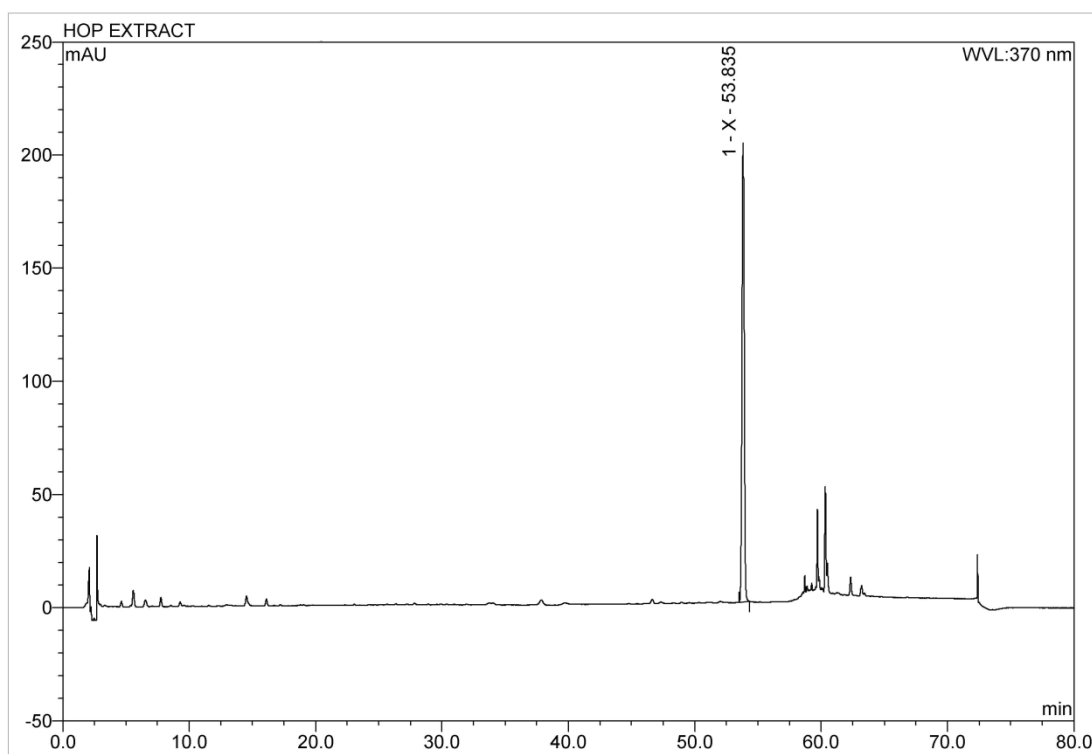


Рис. 3.14. Хроматограмма сухого экстракту хмелю сорту «Ксанта» при 370 нм

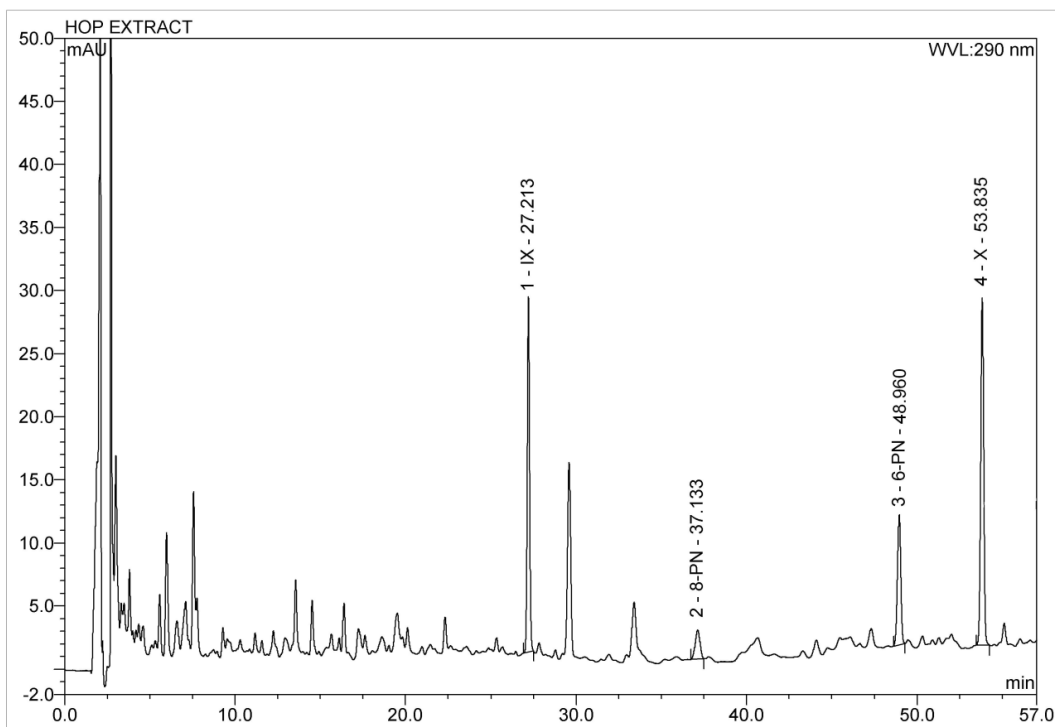


Рис. 3.15. Хроматограмма сухого экстракта хмелю сорту «Ксанта» при 290 нм

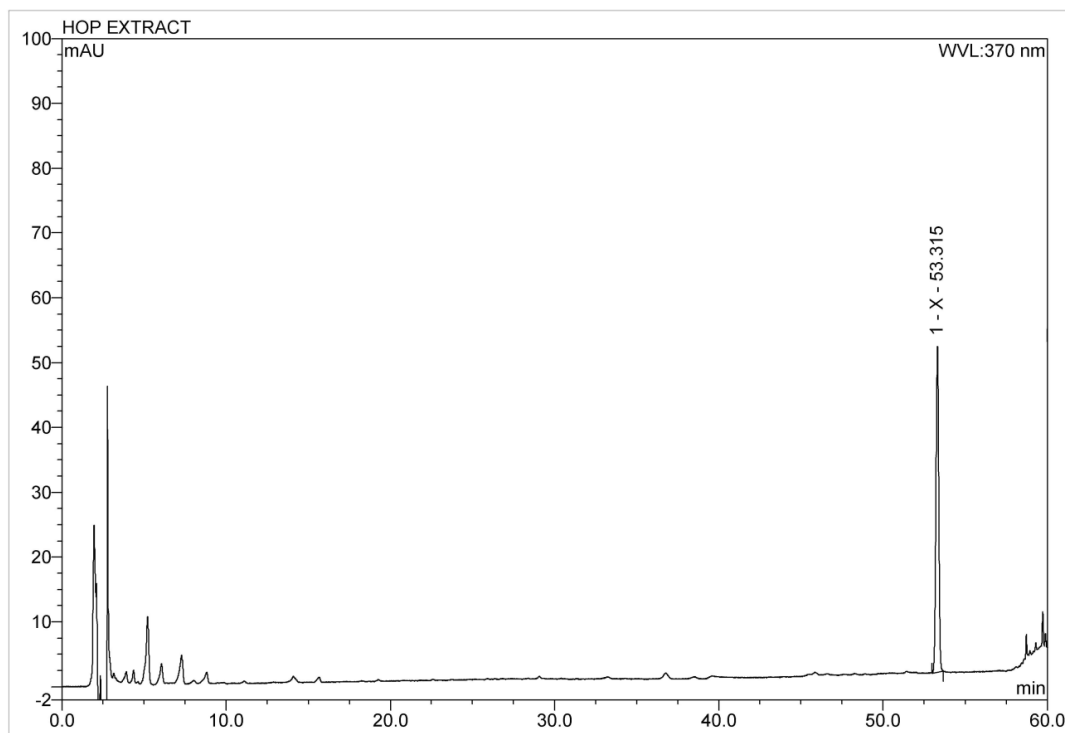


Рис. 3.16. Хроматограмма сухого экстракта хмелю сорту «Чаклун» при 370 нм

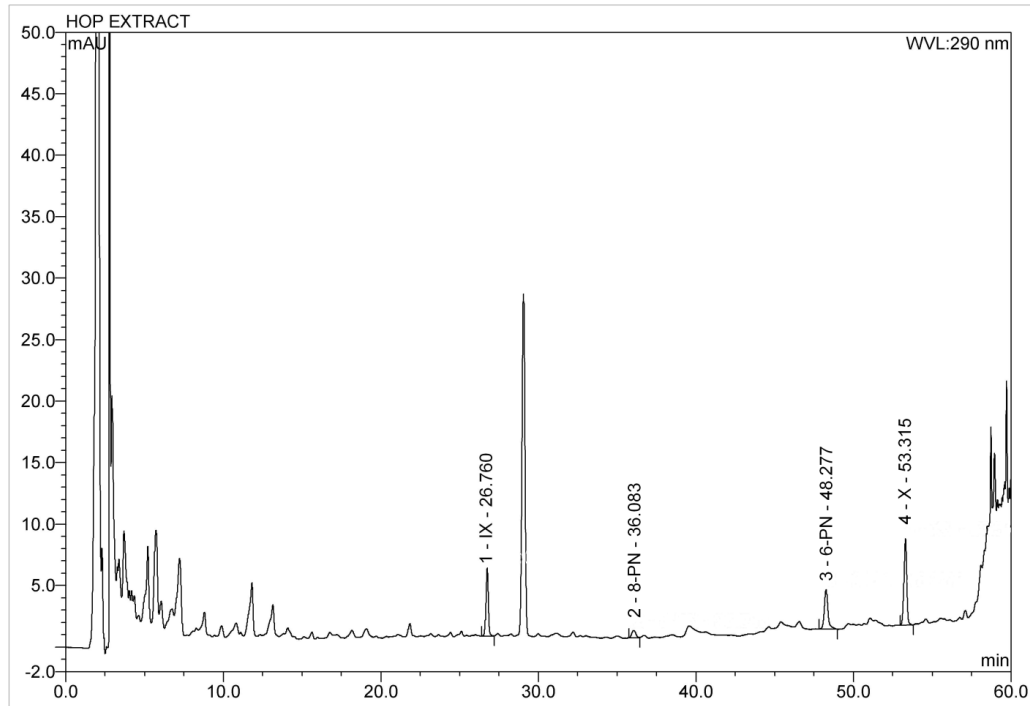


Рис. 3.17. Хроматограма сухого екстракту хмелю сорту «Чаклун» при 290 нм

Одержані результати свідчать про те, що екстракт, отриманий з суплідь хмелю сорту «Ксанта», характеризується збалансованим компонентним складом пренілових флавоноїдів та містить найбільшу кількість 8-PN, тобто є оптимальним сортом вихідної сировини для одержання екстракту з високою естрогенною активністю.

3.5. Визначення способу упарювання та сушки екстракту суплідь хмелю

Технологічний ланцюг одержання АФІ рослинного походження складається з різного набору операцій, які виконують за певними технологічними режимами. Враховуючи термолабільність більшості речовин рослинного походження, розробка технології відповідних АФІ потребує дослідження залежності їх компонентного складу на кожній зі стадій процесу, що супроводжуються нагріванням продукту [52, 54, 59, 77, 85, 86, 115].

Метою даного етапу досліджень було визначення впливу термічних процесів упарювання та сушки рідкого витягу хмелю на кількісний вміст X,

IX, 8-PN та 6-PN в сухому екстракті з метою створення алгоритму виконання зазначених операцій [53].

Об'єктами порівняння впливу термічних процесів на кількісні показники кінцевого продукту були зразки сухого екстракту та водно-спиртового витягу, одержані на етапі дослідження та вибору сорту хмелю. У якості вихідної сировини досліджуваних зразків був сорт хмелю «Ксанта» врожаю 2012 року. Відповідний опис способу одержання зразків наведено у *підрозділі 3.4*. Згідно даного способу упарювання та висушування водно-спиртового витягу проводили у вакуумі на роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та в робочому діапазоні вакууму 80-38 мбар.

Перед висушуванням водно-спиртового витягу проводили визначення у ньому сухого залишку, кількісного вмісту X, IX, 8-PN і 6-PN та обчислювали вихід екстрактивних речовин. У одержаному сухому екстракті визначали втрату у масі при висушуванні та кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN.

Вміст сухого залишку у зразку рідкого екстракту визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.1*, та обчислювали за формулою 2.1.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини у витязі обчислювали за формулою 2.2.

Втрату у масі при висушуванні у зразку сухого екстракту визначали згідно методу, описаному у *підпункті 2.3.1.2*, та обчислювали за формулою 2.3.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у водно-спиртовому витязі та сухому екстракті проводили відповідно методів 1 та 3 методики, описаній у *підпункті 2.3.1.4*, з використанням ВЕРХ/MS/MS для ідентифікації піків. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках сухого екстракту та водно-спиртового витягу обчислювали за формулами 2.5 та 2.6 відповідно.

Як було попередньо зазначено пренілові флавоноїди хмелю X, DMX, IX, 8-PN та 6-PN відносно нестійкі сполуки та при певних термодинамічних

умовах здатні до перетворень. Зокрема, халкони X та DMX піддаються термічній ізомеризації, що підтверджено конверсією X в IX в процесі варіння суслу у пивоварінні [80, 88].

Отримання сухого екстракту завжди пов'язане з застосуванням підвищених температур на стадіях упарювання та сушки витягу. Характер теплового впливу на кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN оцінювали за вмістом даних сполук в водно-спиртовому витязі перед його упарюванням та у одержаному сухому екстракті. З метою попередження можливої деструкції пренілових флавоноїдів упарювання та сушку витягу суплідь хмелю проводили у максимально бережливих, доцільних для подальшого виробництва умовах із застосуванням вакууму. Одержані дані представлені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів

Показник, %	Водно-спиртовий витяг	Сухий екстракт
Вміст X (X_n)	1,688	1,451
Вміст IX, (X_n)	0,412	0,345
Вміст 8-PN (X_n)	0,062	0,057
Вміст 6-PN (X_n)	0,208	0,179
Вміст сухого залишку (ω)	2,455	-
Вихід екстрактивних речовин (D)	24,55	
Втрата в масі при висушуванні (W)	-	4,11

Експериментальні дані, що наведені у таблиці 3.6, вказують на зменшення кількісного вмісту у сухому екстракті X, IX, 8-PN та 6-PN, порівняно із вмістом даних сполук у водно-спиртовому витязі на 14,04%, 16,26%, 8,06% та 13,94% відповідно. Це свідчить про негативний вплив упарювання та сушки рідкого витягу на кількісні характеристики сухого екстракту, навіть при застосованих зберігаючих умовах із зниженою температурою кипіння середовища у вакуумі.

Хроматограми досліджуваних зразків сухого екстракту та водно-спиртового витягу представлені на рисунках 3.14, 3.15 та 3.18, 3.19 відповідно.

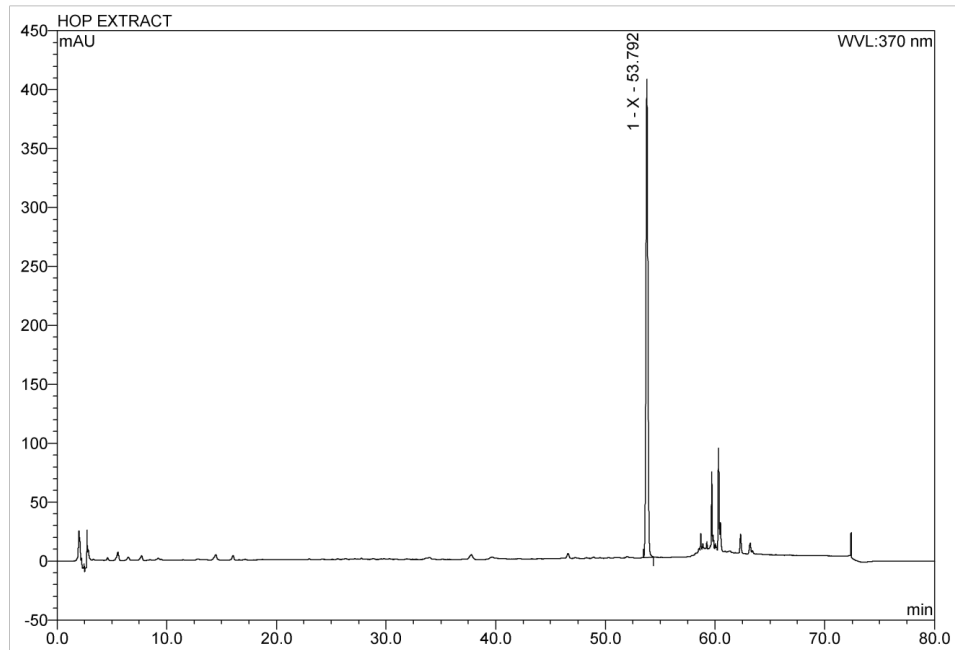


Рис. 3.18. Хроматограма водно-спиртового витягу хмелю сорту «Ксанта» при 370 нм

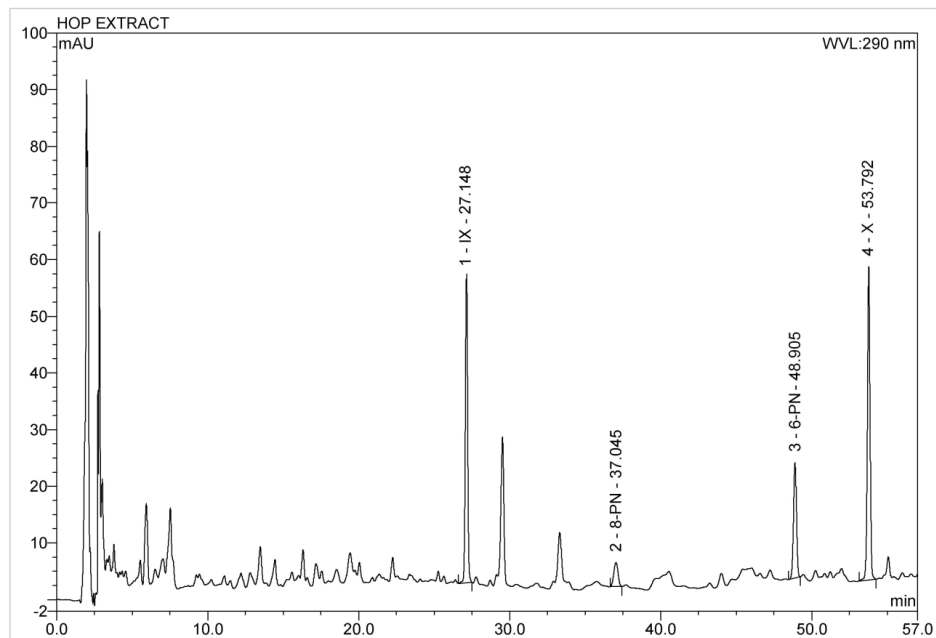


Рис. 3.19. Хроматограма водно-спиртового витягу хмелю сорту «Ксанта» при 290 нм

Хроматографічні профілі досліджуваних зразків характеризуються схожим набором основних піків та відрізняються зменшенням їх

інтенсивності, що пов'язано із вищезазначеним зменшенням кількісного вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN в одержаному сухому екстракті в порівнянні із водно-спиртовим витягом. Підвищення температури та/або зменшення глибини вакууму, тобто параметрів здатних підвищити температуру кипіння у процесі упарювання та сушки витягу, може призвести до більшого зниження кількісного вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті суплідь хмелю. Таким чином, спосіб проведення зазначених операцій має гарантувати ефективне протікання процесу у вакуумі при температурі середовища не вище 63 °С.

3.6. Дослідження впливу концентрації етанолу на екстрагування пренілових флавоноїдів

Попередньо одержані дані демонстрували суттєвий вплив ряду факторів на кількісні характеристики кінцевого продукту. Зокрема, ізомеризація пренілових флавоноїдів, сорт хмелю, умови упарювання та сушки екстракту. У зв'язку з цим, важливим моментом стала перевірка доцільності обраної концентрації етанолу у екстрагенті на стадії екстрагування знежиреної сировини [12].

Як було попередньо зазначено у *підрозділі 3.2* пренілові флавоноїди X, IX, 8-PN та 6-PN відносяться до сполук середньо полярної природи. Враховуючи практичний досвід екстрагування БАР подібної структури, у якості екстрагенту для ефективного їх видалення нами було обрано 70% етанол та визначено оптимальне DER у межах 1:9-10.

Метою даного етапу досліджень було визначення впливу концентрації етанолу у екстрагенті на ефективність екстрагування X, IX, 8-PN та 6-PN. Враховуючи природу даних сполук, у якості екстрагентів було використано 50%, 70% та 90% етанол.

У якості вихідної сировини використовували супліддя хмелю сорту «Ксанта» врожаю 2013 року, н-гексан, етанол 96% та воду очищену.

Попередньо подрібнені супліддя хмелю у кількості 200,0 г обробляли парою на водяній бані впродовж 1 години з наступним видаленням поглинутої вологи у ідентичних умовах, описаних у *підрозділі 3.3*.

Після термічної обробки проводили екстрагування сировини при кімнатній температурі в умовах фільтраційної екстракції.

На першому ступені оброблені супліддя хмелю у кількості 180,0 г було екстраговано н-гексаном до загального DER 1:12 з наступним видаленням залишків екстрагенту зі шроту. Процес проводили в ідентичних умовах, описаних у *підрозділі 3.3*.

На другому ступені, знежирений напівпродукт хмелю (шрот) у кількості 3 x 50,0 г, окремо екстрагували 50%, 70% та 90% етанолом до загального DER 1:10. Використане співвідношення було обрано з оптимального діапазону, визначеного на етапі розробки, описаній у *підрозділі 3.2*. Одержаний водно-спиртовий витяг почергово упарювали та висушували у вакуумі на роторному випарнику Büchi R134 при температурі водяної бані 60-63 °C та у робочому діапазоні вакууму 80-38 мбар.

Перед висушуванням водно-спиртових витягів проводили визначення у них сухих залишків та обчислювали вихід екстрактивних речовин. У одержаних сухих екстрактах визначали втрату у масі при висушуванні, кількісний вміст та вихід X, IX, 8-PN, 6-PN.

Вміст сухого залишку у зразках екстрактів визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.1* та обчислювали за формулою 2.1.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини у витягах обчислювали за формулою 2.2.

Втрату у масі при висушуванні у зразках сухих екстрактів визначали згідно методу, описаного в *підпункті 2.3.1.2* та обчислювали за формулою 2.3.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у сухих екстрактах проводили згідно методики, описаній в *підпункті 2.3.1.4*, використовуючи СЗ

сухого екстракту суплідь хмелю для ідентифікації піків. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках екстрактів обчислювали за формулами 2.7-2.11.

Вихід X, IX, 8-PN, 6-PN з екстрагованої сировини обчислювали за формулою:

$$L_x = \frac{X_n \times D}{100}, \quad (3.1)$$

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

D – вихід екстрактивних речовин з екстрагованої сировини, %.

Одержані результати наведені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів

Показник, %	50% етанол	70% етанол	90% 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 при висушуванні (W)	4,84	4,01	5,72

Наведені в таблиці 3.7 експериментальні дані свідчать про те, що сухий екстракт хмелю, одержаний з використанням 90% етанолу у якості екстрагенту, характеризується найбільшим вмістом X, IX, 8-PN, 6-PN. Проте, оцінюючи показники виходів даних сполук з екстрагованої сировини, очевидним постає їх поступливість аналогічним показникам виходів пренілових флавоноїдів при екстрагуванні сировини 70% та 50% етанолом. Це свідчить що застосування 90% етанолу у якості екстрагенту на другому ступені екстрагування сировини хмелю є недостатньо ефективним.

Подальший аналіз одержаних даних (табл. 3.7) демонструє підвищення показників вмісту IX та 8-PN у екстракті, одержаному з використанням 50% етанолу, у порівнянні з показниками даних сполук при застосуванні 70% етанолу. Поряд із цим використання 50% етанолу призводить до зниження

виходів X, 8-PN та 6-PN у порівнянні із використанням у якості екстрагенту 70% етанолу, що свідчить про його меншу ефективність.

Отже, вибір 70% етанолу у якості екстрагенту на другому ступені екстрагування є практично обґрунтованим. Ефективність обраної концентрації етанолу демонструють показники кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у екстракті у поєднанні із найвищим виходом 8-PN, як компонента з найбільшою естрогенною активністю та найбільшим виходом екстрактивних речовин.

3.7. Дослідження впливу тривалості зберігання суплідь хмелю на стабільність пренілових флавоноїдів у сухому екстракті

Окрім визначених оптимальних технологічних параметрів процесу одержання АФІ, вибору найбільш продуктивного сорту хмелю та екстрагентів, важливим етапом розробки було вивчення впливу часових факторів зберігання сировини хмелю на вміст пренілових флавоноїдів X, IX, 8-PN, 6-PN у кінцевому продукті. При цьому було враховано досвід використання суплідь хмелю у пивоварінні, де рекомендованим терміном придатності сировини є термін не більше 1 року, що пов'язано із суттєвим зниженням вмісту альфа-кислот впродовж зберігання [11].

Таким чином, метою даного етапу дослідження стало вивчення впливу тривалості зберігання суплідь хмелю та кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті.

Об'єктами порівняння були сухі екстракти суплідь хмелю, одержані з сировини сорту «Ксанта» врожаю 2012 та 2013 років з різною тривалістю зберігання вихідної сировини. Обидва зразки були одержані за загальною схемою виробництва у однакових умовах.

У якості першого об'єкту було використано зразок сухого екстракту, одержаного на стадії дослідження сортів хмелю (*підрозділ 3.4*). Тривалість зберігання вихідної сировини у проміжку між її виробництвом та виробництвом екстракту становив 11 місяців.

У якості другого об'єкту було використано зразок сухого екстракту, одержаного на стадії дослідження впливу концентрації етанолу на екстрагування пренілових флавоноїдів (підрозділ 3.6) – екстрагент 70% етанол. Тривалість зберігання вихідної сировини у проміжку між її виробництвом та виробництвом екстракту становив 4 місяці.

Одержані результати наведені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Кількісні характеристики досліджуваних екстрактів

Вихідна сировина: сорт/врожай	«Ксанта»/2012	«Ксанта»/2013
Вміст X у вихідній сировині на момент її виробництва, %	0,75%	0,82%
Тривалість зберігання сировини у проміжку між її виробництвом та виробництвом екстракту	11 місяців	4 місяці
Вміст X (X_n , %)	1,451	2,226
Вміст IX, (X_n , %)	0,345	0,405
Вміст 8-PN (X_n , %)	0,057	0,091
Вміст 6-PN (X_n , %)	0,179	0,261
Вміст сухого залишку (ω , %)	2,455	2,571
Вихід екстрактивних речовин (D , %)	24,55	25,71
Втрата у масі при висушуванні (W , %)	4,11	4,01

Результати, наведені в таблиці 3.8, свідчать про те, що кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті хмелю суттєво залежить від тривалості зберігання вихідної сировини. Таким чином, доцільним може бути «сезонне» виробництво екстракту із свіжозібраного врожаю хмелю або використання у виробництві сировини із терміном зберігання не більше 1 року.

Висновки до розділу 3

1. Проведено науково-експериментальну роботу з розробки технології сухого екстракту суплідь хмелю з підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів.

2. Встановлено, що ізомеризація пренілових халконів шляхом попередньої обробки суплідь хмелю водяною парою призводить до зменшення вмісту X на 32,40% та збільшення вмісту IX, 8-PN, 6-PN на 60,50%, 32,14% та 21,51%. Одержані дані свідчать про ефективність використаного підходу до збільшення вмісту пренілових флаванонів у екстракті та важливість даної стадії у технологічному процесі.

3. Визначено оптимальні умови видалення з сировини речовин ліпофільної природи, як першого ступеня екстракції. Згідно одержаних даних ефективне видалення ліпофільних речовин забезпечується екстракцією сировини н-гексаном із DER 1:12.

4. Визначено оптимальну концентрацію екстрагенту та умови екстрагування знежиреної сировини, як другого ступеня екстракції. Так, ефективним процесом видалення пренілових флавоноїдів є застосування 70% етанолу із DER 1:10.

5. Встановлено, що оптимальним сортом вихідної сировини для одержання екстракту з високою естрогенною активністю є сорт «Ксанта». Сухий екстракт, одержаний з даного сорту, характеризуються збалансованим компонентним складом пренілових флавоноїдів та містить найбільшу кількість 8-PN, як речовини обумовлюючої естрогенну активність продукту.

6. Встановлено негативний вплив термічних процесів на стадіях упарювання та сушки водно-спиртового витягу на вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті. Дані операції необхідно проводити в умовах вакууму, так як згідно експериментальних даних підвищення температури та/або зменшення глибини вакууму може призводити до зниження кількісного вмісту X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті.

7. Досліджено вплив тривалості зберігання суплідь хмелю та кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті. Згідно одержаних даних їх кількісний вміст зменшується із збільшенням терміну зберігання вихідної сировини.

8. Кількісні характеристики екстракту свідчать про доцільність розробленої технології, що підтверджується високим та достатнім для оптимального дозування у готовій лікарській формі вмістом 8-PN. Вагове співвідношення між X та 8-PN знаходиться у межах більших за 10:1, а вміст IX є високим і контрольованим та процес характеризується високим виходом готового продукту.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ДОСЛІДНО-ПРОМИСЛОВОГО РЕГЛАМЕНТУ ТА ВАЛІДАЦІЯ ПРОЦЕСУ

4.1. Розробка дослідно-промислового регламенту та трансфер технології одержання сухого екстракту хмелю у виробництво

Ключовим етапом розробки технології є її трансфер у умови промислового виробництва. Достовірні і обґрунтовані експериментальні результати були покладені у основу розробки дослідно-промислового регламенту. Даний вид технологічної документації є базою для імплементації технологічного процесу, що встановлює всі технологічні стадії та операції на етапах виробництва дослідно-промислових серій незареєстрованого (нового) АФІ та проведення перспективної валідації процесу [17, 19, 36, 98, 103, 106, 121].

Технологічна схема (рис. 4.1), опис процесу та контроль параметрів на стадіях (табл. 4.1) наведені нижче.

Підготовка виробництва

Підготовку персоналу, повітряного середовища, виробничих приміщень, технологічного обладнання, комплектів технологічного одягу для задіяного персоналу, а також приготування дезінфікуючих розчинів, виконують відповідно до затверджених стандартних операційних процедур.

Стадія 1. Підготовка сировини

У виробництві екстракту використовують сировину, що пройшла попередній контроль відділу контролю якості та відповідає всім показникам якості. Сировину беруть у виробництво після одержання відповідного дозволу - протоколів іспитів вхідного контролю. Пакувальні матеріали та друкована продукція, що використовують у виробництві, дозволена для використання лише після позитивного результату контролю відділу контролю якості. Розтарювання, подрібнення та зважування сировини проводять згідно СОП. Зважування суплідь хмелю - проводять у мішках на

вагах. Подрібнення сировини проводять на подрібнювачі ударно-ріжучої дії з розміром отворів решітки 4 мм. Подрібнену сировину зважують на вагах та передають на стадію 2.

В якості екстрагентів використовують:

- *Екстрагент 1*: н-гексан, який одержують зі складу та, за наявності, гексан-відгін зі стадії 3. Зазначений екстрагент передають на стадію 3;

- *Екстрагент 2*: 70% етанол, який одержують шляхом змішування етанолу 96% з водою очищеною, та, за наявності, спирту-відгону зі стадії 5. Зазначений екстрагент передають на стадію 4.

Стадія 2. Термічна ізомеризація

У фільтраційний екстрактор з рубашкою завантажують подрібнені супліддя хмелю з стадії 1. Завантажену сировину обробляють гострою стерильною водяною парою протягом 1 години. Після завершення термічної обробки, залишки поглиненої сировиною вологи максимально видаляють за допомогою вакууму. При охолодженні середовища нижче 60⁰С, вказану температуру підтримують шляхом подачі теплоносія в рубашку екстрактора. В якості теплоносія використовують воду, нагріту до температури 65⁰С. Тривалість процесу видалення залишків поглинутої вологи з сировини становить не більше 1 години.

Оброблену та доведену до кімнатної температури сировину в екстракторі передають на стадію 3.

Стадія 3. Видалення ліпофільних речовин

Для екстрагування термічно-оброблених суплідь хмелю з стадії 2 використовують н-гексан, одержаний із стадії 1. У екстрактор з рослинною сировиною подають за допомогою вакууму екстрагент до встановлення «дзеркала», після встановлення якого, припиняють подачу екстрагенту. Потім проводять самопливну деаерацію сировини продовж 1,0-1,5 годин. Після видалення повітря з термічно-оброблених суплідь хмелю одночасно подають екстрагент у екстрактор та відкривають випускний кран відбору

витягу. Екстрагування сировини проводять фільтраційним методом при кімнатній температурі та атмосферному тиску до зального DER 1:12.

Після завершення екстрагування, залишки екстрагенту максимально видаляють за допомогою вакууму при температурі середовища 60-63⁰С. Забезпечення термічних умов здійснюють шляхом подачі теплоносія в сорочку екстрактора. У якості теплоносія використовують воду, нагріту до температури 65⁰С. Тривалість процесу видалення не більше 1 години. По завершенню видалення залишків екстрагенту, сировину охолоджують до кімнатної температури природнім шляхом.

Знежирену та доведену до кімнатної температури сировину, у екстракторі передають на стадію 4.

Ліпофільну фракцію упарюють у роторному випарнику при температурі водяної бані у межах 60-63⁰С, діапазоні вакууму 200-45 мбар та швидкості обертання колби 60-65 об/хв. Видалення екстрагенту з витягу проводять до максимального видалення, візуально контролюючи конденсацію парів на холодильнику випарника Одержаний відгін гексану передають на стадію 1.

Стадія 4. Одержання водно-спиртового витягу

Для екстрагування знежирених суплідь хмелю з стадії 3 використовують 70% етанол, одержаний із стадії 1. У екстрактор з рослинною сировиною подають за допомогою вакууму екстрагент до встановлення «дзеркала». Після встановлення дзеркала, припиняють подачу екстрагенту у екстрактор та проводять самопливну деаерацію сировини продовж 1,0-1,5 годин. Після видалення повітря із знежирених суплідь хмелю, одночасно вмикають подачу екстрагенту у екстрактор та відкривають випускний кран відбору витягу з екстрактора. Екстрагування сировини проводять фільтраційним методом при кімнатній температурі та атмосферному тиску до зального DER 1:10.

Після завершення екстрагування залишки екстрагенту максимально видаляють за допомогою вакууму при кімнатній температурі.

Одержаний водно-спиртовий витяг передають на стадію 5.

Шрот вивантажують з екстрактора, вручну фасують у пакети поліетиленові, зважують та передають на утилізацію відповідно СОП.

Стадія 5. Упарювання водно-спиртового витягу

Упарювання водно-спиртового витягу зі стадії 4 проводять у роторному випарнику у вакуумі, у попередньо зваженій випарній колбі, при температурі водяної бані у межах 60-63⁰С, діапазоні вакууму 80-35 мбар та швидкості обертання колби 60-65 об/хв.

Після завершення концентрування встановлюють масу концентрату, шляхом зважування колби роторного випарника.

З отриманого концентрату відбирають середню пробу та встановлюють її відносну густину згідно СОП. Упарювання проводять до одержання концентрату із густиною у межах 1,045-1,050 г/см³.

Одержаний концентрат передають на стадію 6.

Одержаний спирт-відгін передають на стадію 1.

Стадія 6. Одержання сухого екстракту

Одержання сухого екстракту суплідь хмелю здійснюють шляхом висушування концентрату з стадії 5.

В зважену ребристу колбу для висушування, завантажують концентрат зі стадії 5. Колбу монтують на робоче місце роторного випарника та проводять процес висушування при температурі водяної бані 60-63⁰С, діапазоні вакууму 80-35 мбар та швидкості обертання колби 60-65 об/хв.

Одержаний сухий екстракт передають на стадію 7.

Стадія 7. Фасування, пакування та маркування сухого екстракту

Операції фасування та пакування сухого екстракту суплідь хмелю виконують на столі на вагах.

Сухий екстракт вручну, совком, засипають у подвійні пакети поліетиленові. Між двома пакетами вкладають етикетку затвердженого зразка. Внутрішній і зовнішній пакети термозварюють. На зовнішній пакет наклеюють етикетку затвердженого зразка. Контроль якості готової

продукції (у лабораторії відділу контролю якості) здійснюють згідно з МКЯ. У процесі виробництва серії препарату заповнюють протоколи виготовлення серії, які разом із протоколами випробувань вхідного контролю та протоколами очистки обладнання формують Досьє на серію. Після отримання позитивних результатів аналізу, препарат передають на центральний склад для подальшого використання.

4.2. Розробка схеми валідації процесу одержання сухого екстракту хмелю

Мета валідації: підтвердження правильності виконання технологічного процесу виробництва сухого екстракту суплідь хмелю, відповідно розробленого дослідно-промислового регламенту та дотримання персоналом контрольних параметрів виробництва (табл. 4.1).

Предмет валідації: технологічний процес виробництва сухого екстракту суплідь хмелю.

Таблиця 4.1

Контрольні параметри стадій процесу

Стадія №.	Контрольований параметр	Критерій прийнятності	Метод вимірювання
1	2	3	4
1	Специфікація з якості вихідної сировини (супліддя хмелю, н-гексан, етанол 96%, вода очищена)	Відповідність специфікації	Наявність протоколів контролю якості вихідної сировини
	Діаметр отворів сітки подрібнювача	4 мм	Візуальний контроль, маркування сітки
	Кількість одержаного екстрагенту №1	375 л	Вимірювання об'єму н-гексану
	Кількість одержаного екстрагенту №2	300 л	Вимірювання об'єму 70% етанолу
	Концентрація одержаного екстрагенту №2 при температурі 20 ⁰ С	70%	Вимірювання об'ємної концентрації за допомогою спиртометра
2	Кількість завантажених суплідь хмелю	25,0 кг	Зважування суплідь хмелю

продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2	Тривалість парової обробки	1 год	Хронометрично
	Величина вакууму при видаленні вологи	-0,8.....-0,9 кгс/см ²	Візуальний контроль вакуумметра магістралі
	Температура теплоносія в сорочку екстрактора при видаленні вологи	65 ⁰ С	Візуальний контроль індикатора температури
	Тривалість видалення вологи	1 год	Хронометрично
	Повнота видалення вологи з обробленої сировини	Відсутність вологої сировини	Візуальний контроль
3	Тривалість настоювання	1,0-1,5 год	Хронометрично
	Швидкість екстрагування	0,8-0,9 л/хв	Хронометрично
	Кількість гексанового витягу	300 л	Вимірювання об'єму гексанового витягу
	Величина вакууму при видаленні екстрагенту	-0,8.....-0,9 кгс/см ²	Візуальний контроль вакуумметра магістралі
	Температура теплоносія в сорочку екстрактора при видаленні екстрагенту	65 ⁰ С	Візуальний контроль індикатора температури
	Тривалість видалення екстрагенту	1 год	Хронометрично
	Повнота видалення екстрагенту з знежиреної сировини	Відсутність вологої сировини	Візуальний контроль
	Температура водяної бані при упарюванні	60-63 ⁰ С	Візуальний контроль індикатора температури
	Швидкість обертів колби випарника	60-65 об/хв	Візуальний контроль індикатора обертів
	Величина вакууму при упарюванні	200-45 мбар	Візуальний контроль індикатора вакууму
Кількість гексану-відгону	270-280 л	Вимірювання об'єму гексану-відгону	
4	Тривалість настоювання	1,0-1,5 год	Хронометрично
	Швидкість екстрагування	0,5-0,6 л/хв	Хронометрично
	Кількість водно-спиртового витягу	250 л	Вимірювання об'єму водно-спиртового витягу
	Маса шроту	65,0-70,0 кг	Зважування шроту
5	Температура водяної бані при упарюванні	60-63 ⁰ С	Візуальний контроль індикатора температури
	Швидкість обертів колби випарника	60-65 об/хв	Візуальний контроль індикатора обертів
	Величина вакууму при упарюванні	80-35 мБар	Візуальний контроль індикатора вакууму
	Кількість концентрату	25,0-30,0 кг	Зважування концентрату
	Густина концентрату	1,045-1,050 г/см ³	Вимірювання густини за допомогою ареометра

продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
	Кількість спирту-відгону	210-220 л	Вимірювання об'єму
	Концентрація спирту-відгону при температурі 20 ⁰ С	65-75%	Вимірювання об'ємної концентрації за допомогою спиртометра
6	Температура водяної бані при сушці	60-63 ⁰ С	Візуальний контроль індикатора температури
	Швидкість обертів колби випарника	60-65 об/хв	Візуальний контроль індикатора обертів
	Величина вакууму при сушці	80-35 мбар	Візуальний контроль індикатора вакууму
	Кількість сухого екстракту не розфасованого	5,0-8,3 кг	Зважування сухого екстракту
7	Кількість сухого екстракту розфасованого	4,7-8,0 кг	Зважування сухого екстракту
	Маркування	Відповідність етикетки затвердженому зразку, номер серії, термін придатності, маса екстракту	Візуальний контроль
	Герметичність зварювання пакетів	Рівномірність запайки шва	Візуальний контроль

Об'єм валідації: три послідовні серії рослинного препарату із стандартним розміром серії.

При проведенні валідаційних робіт, необхідним є виконання вимог та рекомендацій національних, міжнародних та внутрішньозаводських нормативних документів [17].

Умови, за яких процес може бути валідований:

- все критичне технологічне обладнання, системи і чисті приміщення мають бути кваліфікованими;
- вся сировина та пакувальні матеріали, що використовуються у виробничому процесі, мають бути проконтрольовані та дозволені до використання у виробництві;
- всі необхідні аналітичні методики мають бути провалідовані, а виробничий персонал – належним чином навчений.

Умови, за яких результати валідації будуть рахуватись позитивними:

- якщо дані валідації відповідатимуть критеріям прийнятності, при випуску трьох стандартних послідовних серій рослинного препарату.

Відповідно до розробленої технології, викладеній у рамках дослідно-промислового регламенту, в умовах виробництва було напрацьовано дослідно-промислову серію сухого екстракту суплідь хмелю сорту «Ксанта» врожаю 2013 р.

На стадії 4 з одержаного водно-спиртового витягу було відібрано зразок, визначено сухий залишок та обчислено вихід екстрактивних речовин. У одержаному на стадії 6 сухому екстракті визначено втрату у масі при висушуванні та кількісний вміст X, IX, 8-PN, 6-PN.

Вміст сухого залишку у водно-спиртовому витязі визначали згідно методу, описаного в *підпункті 2.3.1.1*, та обчислювали за формулою 2.1.

Вихід екстрактивних речовин з рослинної сировини обчислювали за формулою 2.2.

Втрату у масі при висушуванні у сухому екстракті визначали згідно методу, описаного у *підпункті 2.3.1.2*, та обчислювали за формулою 2.3.

Визначення кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN у сухому екстракті проводили згідно методики, описаній у *підпункті 2.3.1.4* використовуючи *СЗ сухого екстракту суплідь хмелю для ідентифікації піків*. Вміст пренілових флавоноїдів у зразках екстрактів обчислювали за формулами 2.7-2.11.

Згідно кількісних характеристик одержаного екстракту (вміст X 2,818%; IX 0,498 %; 8-PN 0,117 %; 6-PN 0,330%) та виходу екстрактивних речовин на стадії 4 (26,79%) розроблена технологія продемонструвала свою відтворюваність. Апробація розробки в умовах промислового виробництва, як одного з головних оцінювальних факторів якості її виконання пройшла ефективно. Вона підтвердила правильність та ефективність розробленої технології сухого екстракту суплідь хмелю.

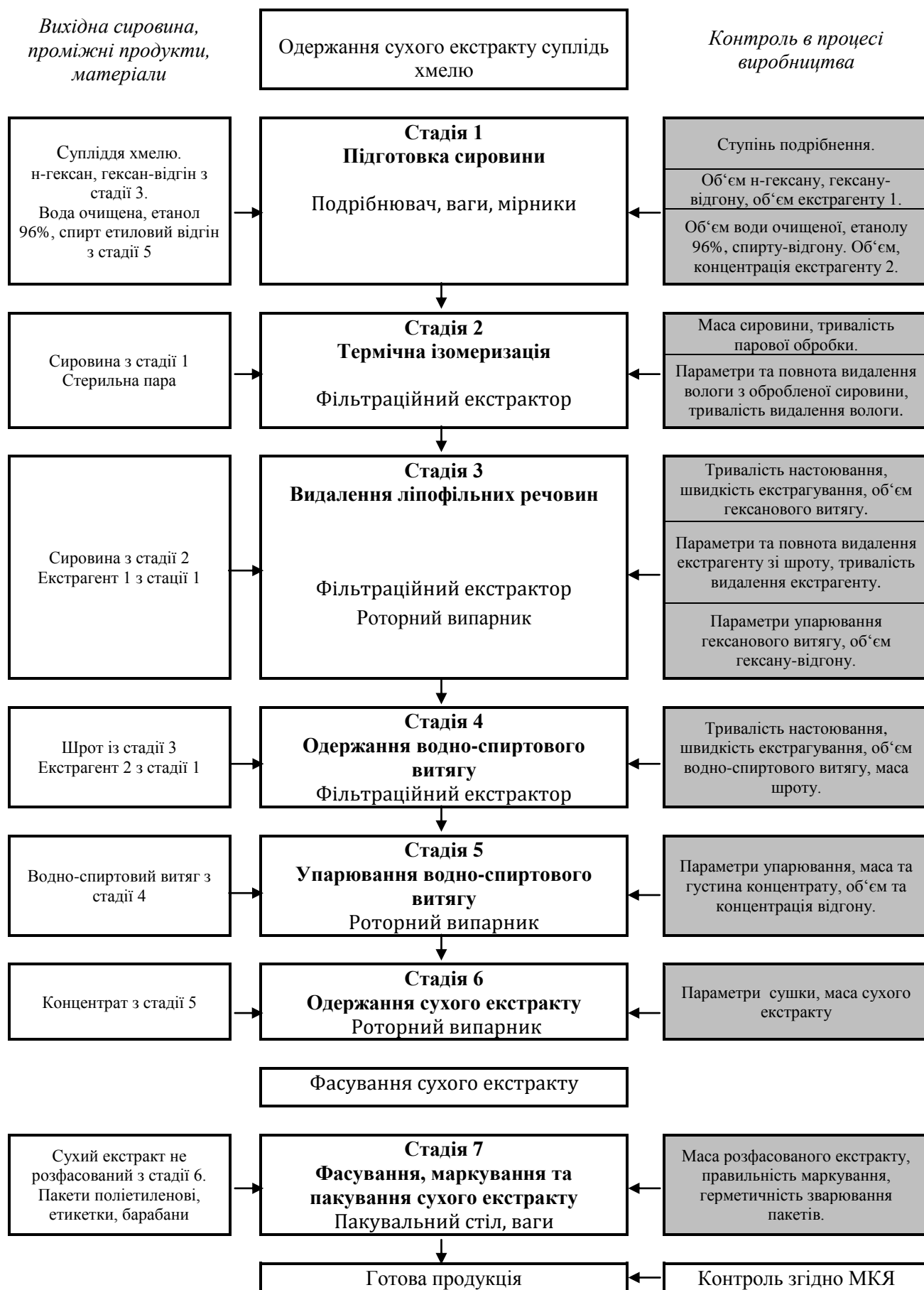


Рис. 4.1. Блок-схема виробництва сухого екстракту суплідь хмелю

Висновки до розділу 4

1. Розроблено дослідно-промисловий регламент виробництва АФІ, визначено контрольні параметри стадій процесу та розроблено схему його валідації.

2. Проведено апробацію технології сухого екстракту хмелю в умовах виробництва.

3. Кількісні характеристики сухого екстракту суплідь хмелю, одержаного за вищезазначених умов, становлять: вміст X 2,818%, вміст IX 0,498%, вміст 8-PN 0,117%, вміст 6-PN 0,330%, вихід екстрактивних речовин з сировини на стадії одержання водно-спиртового витягу 26,79%.

4. Дані валідації першої дослідно-промислової серії відповідають критеріям прийнятності, розроблена технологія є відтворюваною та перспективною для подальшої валідації.

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ ТА РОЗРОБКА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

5.1. Розробка специфікації сухого екстракту суплідь хмелю

При розробці специфікації сухого екстракту суплідь хмелю було використано рекомендації, викладені у настанові по специфікації для рослинних продуктів ЕМА та методичних рекомендацій з оцінки якості та встановлення специфікації рослинних продуктів ДП «Державний фармакологічний центр» [29, 68].

Встановлення специфікацій для рослинного препарату є частиною загальної стратегії його контролю. Дана стратегія включає контроль вихідних матеріалів і допоміжних речовин, контроль у процесі виробництва, випробування на стабільність і контроль однорідності серій препарату. Тільки при застосуванні всіх цих елементів може бути гарантована належна якість лікарського засобу. Зважаючи на те, що специфікації необхідні для підтвердження належної якості, виробник повинен надати обґрунтування включення до них та/або виключення певних показників [29].

Згідно зазначених рекомендацій, специфікація для сухого екстракту суплідь хмелю повинна враховувати:

- якість суплідь хмелю як вихідної сировини;
- вміст активної речовини(н) в екстракті, розчинників (н-гексан, етанол);
- метод отримання екстракту з рослинної сировини;
- складові - компоненти з відомою терапевтичною дією (8-PN) та активні маркери (X та IX);
- інші складові (компоненти гіркої смоли);
- умови висушування екстракту;
- профіль і стабільність компонентів;

- мікробіологічну чистоту при зберіганні;
- серії, які використовувались при доклінічних дослідженнях/клінічних випробуваннях (питання безпеки та ефективності).

Специфікація для сухого екстракту суплідь хмелю розроблялась на підставі одержаних в процесі розробки експериментальних даних, а також загальноприйнятих для рослинних препаратів показників якості. Критерії їх прийнятності базувались на даних розробки та описаних в ДФУ та ЄФ [29, 68].

Специфікація на сухий екстракт суплідь хмелю

Опис. Рослинний препарат у формі сухого екстракту, одержаний шляхом екстрагування суплідь хмелю звичайного *Humulus lupulus L.* н-гексаном та 70% етанолом. Співвідношення рослинної субстанції до нативного рослинного препарату (генуїнний DER): 3-5:1

Властивості.

Зовнішній вигляд:	порошок
Колір:	від жовтого до жовто-коричневого
Запах:	специфічний
Смак:	гіркий

Ідентифікація.

Ксантохумол (X)	
Ізоксантохумол (IX)	Метод ВЕРХ
8-пренілнарінгенін (8-PN)	
6-пренілнарінгенін (6-PN)	
Ксантохумол	
Хумулони	Метод ТШХ
Лупулони	
<u>Втрата в масі при висушуванні:</u>	Не більше 10%

Залишкові кількості розчинників:

етанол: Не більше 5000 ppm

гексан: Не більше 290 ppm

Важкі метали: Не більше 100 ppm

Пестициди: Відповідно ДФУ 2.8.13

Мікотоксини:

Афлатоксини ($B_1+B_2+G_1+G_2$) Не більше 4 мкг/кг

Афлатоксин B_1 Не більше 2 мкг/кг

Кількісне визначення (в перерахунку на суху речовину):

Ксантохумол (X) Не менше 1,0%

Ізоксантохумол (IX) Не менше 0,3%

8- пренілнарінгенін (8-PN) Від 0,05% до 0,15%

Співвідношення X/8-PN Не менше 10/1

Мікробіологічна чистота:

Загальне число аеробних мікроорганізмів ТАМС: не більше 10^4 КУО в 1 г.

Загальне число дріжджових та пліснявих грибів ТУМС: не більше 10^2 КУО в 1 г.

Грамнегативних бактерій толерантних до жовчі: не більше 10^2 в 1 г.

Відсутність *Salmonella* в 25 г.

Відсутність *Escherichia coli* в 1 г.

5.2. Розробка проекту методів контролю якості сухого екстракту суплідь хмелю

Методи контролю показників якості приведених у специфікації сухого екстракту суплідь хмелю, базувались на одержаних в процесі розробки експериментальних даних, із врахуванням вимог ДФУ і ЄФ та сучасних підходів фармацевтичного аналізу.

МК-1. Властивості.

Порошок від жовтого до жовто-коричневого кольору із специфічним запахом, гіркий.

МК-2. Ідентифікація.

МК-2.1. Випробування проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29).

На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаного при кількісному визначенні, часи утримування основних піків ксантохумолу (X), ізоксантохумолу (IX), 8-пренілнарінгеніну (8-PN) та 6-пренілнарінгеніну (6-PN) мають збігатися з часами утримування відповідних піків на хроматограмі розчину порівняння для ідентифікації піків.

МК-2.2. Випробування проводять методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27).

Методика ідентифікації наведена в підпункті 2.3.1.3.

Результати *A*: на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися 3 зони поглинання; у нижній чверті – слабка зона куркуміну, дещо нижче середини – зона диметиламінобензальдегіду та вище – зона судану оранжевого. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися така сама кількість зон поглинання, на тому самому рівні, що і на хроматограмі розчину порівняння; на рівні зони куркуміну – зона ксантохумолу, близько зони диметиламінобензальдегіду – зони відповідні хумулонам, близько зони судану оранжевого – зони відповідні лупулонам.

Результати *B*: на хроматограмі випробовуваного розчину зони відповідні лупулонам виявляють синю флуоресценцію, зони відповідні хумулонам - коричневу флуоресценцію, зона відповідна ксантохумолу - темно-коричневу флуоресценцію.

За *результатами A* та *B* допустима відсутність зон відповідних лупулонам та хумулонам на хроматограмі випробовуваного розчину, що пов'язана з ефективним видаленням ліпофільної фракції на стадії знежирення сировини.

МК-3. Втрата в масі при висушуванні. Випробування проводять згідно методики ДФУ 2.8.17. Втрата в масі при висушуванні не більше 10,0 %.

МК-4. Визначення залишкових розчинників. Випробування проводять методом газової хроматографії (ДФУ, 2.2.28) згідно методики ДФУ 2.4.24. Залишкова кількість гексану не більше 290 ppm. Залишкова кількість етанолу не більше 5000 ppm.

МК-5. Важкі метали. Випробування проводять згідно методики ДФУ 2.4.8 (метод А). Вміст важких металів не більше 100 ppm (ДФУ, ст. «Екстракти^N»). 1,000 г сухого екстракту має витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують з використанням *еталонного розчину свинцю (1 ppm Pb) P*.

МК-6. Пестициди. Випробування залишкових кількостей пестицидів проводять згідно методики ДФУ 2.8.13.

МК-7. Мікотоксини. Випробування проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29) згідно методики ДФУ 2.8.18. Вміст афлатоксину В₁ не більше 2 мкг/кг, вміст суми афлатоксинів В₁, В₂, G₁, G₂ не більше 4 мкг/кг.

МК-8. Кількісне визначення. Випробування проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2.2.29) з використанням *СЗ сухого екстракту суплідь хмелю* для ідентифікації піків X, IX, 8-PN, 6-PN.

Методика кількісного визначення наведена у підпункті 2.3.1.4.

МК-9. Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2.6.12, 2.6.31; 5.1.8 (Категорія В).

Загальне число аеробних мікроорганізмів – ТАМС - не більше 10⁴ КУО у 1 г.

Загальне число дріжджових та плісневих грибів – ТУМС - не більше 10² КУО у 1 г.

Не більше 10² грамнегативних бактерій толерантних до жовчі у грамі.

Відсутність *Salmonella* в 25 г.

Відсутність *Escherichia coli* в 1 г.

Додаткова інформація (ДІ)

ДІ-1. Упаковка

Субстанцію пакують у подвійні поліетиленові пакети.

ДІ-2. Маркування

Текст маркування вказують українською і англійською мовами.

На етикетці вказують “Україна”, “ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», його товарний знак і адресу, назву препарату англійською і українською мовами, реєстраційний номер, масу препарату у кілограмах, умови зберігання, номер серії, термін придатності.

ДІ-3. Умови зберігання

У оригінальній упаковці при температурі не вище 25⁰С, у захищеному від світла місці.

ДІ-4. Термін придатності

2 роки.

5.3. Дослідження стабільності сухого екстракту суплідь хмелю

Вивчення стабільності сухого екстракту суплідь хмелю проводилося на дослідно - промисловій серії у умовах довгострокового та прискореного зберігання, згідно положень Настанови з якості «Лікарські засоби. Випробування стабільності. Настанова 42-3.3:2004». Та рекомендацій ЕМА до даного виду досліджень [18, 100].

Умови зберігання:

Довгострокове випробування стабільності

Температура (25 ± 2)°С

Відносна вологість (60 ± 5) %

Прискорене випробування стабільності

Температура (40 ± 2)°С

Відносна вологість (75 ± 5) %

Схема випробувань:

Довгострокове випробування стабільності

Контроль показників якості через 0, 3, 6, 9, 12 місяців.

Прискорене випробування стабільності

Контроль показників якості через 0, 3, 6 місяців.

Первинна упаковка: пакет подвійний поліетиленовий.

Дата виробництва досліджуваної серії 05.03.2014 р .

Дата закладки досліджуваної серії на зберігання 14.04.2014 р.

Контроль якості сухого екстракту суплідь хмелю здійснювався згідно вимог специфікації та методів контролю якості, описаних у *підрозділах 5.1 та 5.2*.

Перед закладкою на зберігання і у процесі довгострокового та прискореного вивчення стабільності контроль рослинного препарату проводили за показниками якості, які можуть змінюватися у процесі зберігання, а саме: *властивості, ідентифікація, втрата у масі при висушуванні, кількісне визначення*. Контроль сухого екстракту за тестом „*Мікробіологічна чистота*” проводили на момент закладки та у кінці дослідження. Одержані результати довгострокового та прискореного вивчення стабільності наведені в таблицях 5.1 та 5.2 відповідно.

До суттєвих змін для АФІ відносять такі зміни, при яких досліджуваний об'єкт перестає відповідати встановленій специфікації. При аналізі даних, одержаних під час вивчення стабільності в умовах довгострокового і прискореного зберігання та наведених у таблицях 5.1 і 5.2, суттєвих змін показників якості (*властивості, ідентифікація, втрата в масі при висушуванні, кількісне визначення*) не виявлено[18].

На основі даних, одержаних при довгостроковому та прискореному вивченні стабільності сухого екстракту суплідь хмелю у пакетах подвійних поліетиленових, було встановлено, що досліджуваний рослинний препарат є

стабільним та відповідає вимогам встановленої для нього специфікації з якості.

Таблиця 5. 1

Результати довгострокового вивчення стабільності

Властивості	Ідентифікація		Втрата в масі при висушуванні, %	Кількісне визначення, %			Мікробіологічна чистота	Термін зберігання	Висновок
				X	IX	8-PN			
Порошок від жовтого до жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Метод ВЕРХ: На хроматограмі випробовуваного розчину, часи утримування основних піків X, IX, 8-PN, 6-PN мають збігатися з часами утримування відповідних піків на хроматограмі розчину порівняння для ідентифікації піків	Метод ТШХ: Наявність відповідних плям на хроматограмі відповідно до тесту	не більше 10,0	X	IX	8-PN	Загальне число аеробних мікроорганізмів – ТАМС – не більше 10000 в 1 г. Загальне число дріжджових та пліснявих грибів - ТУМС – не більше 100 в 1 г. Не більше 10 ² грамнегативних бактерій толерантних до жовчі у грамі. Відсутність Salmonella в 25 г. Відсутність Escherichia coli в 1 г	2 роки	по зберіганню
				Не менше 1,0	Не менше 0,3	0,05-0,15			
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	7,25	2,818	0,498	0,117	Відповідає	0 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	5,82	2,40	0,45	0,0990	-	3 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	5,14	2,10	0,43	0,1030	-	6 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	5,61	2,04	0,42	0,0896	-	9 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	5,98	1,95	0,41	0,0854	Відповідає	12 міс	Придатний

Таблиця 5.2

Результати прискореного вивчення стабільності

Властивості	Ідентифікація		Втрата в масі при висушуванні, %	Кількісне визначення, %			Термін зберігання	Висновок
				X	IX	8-PN		
Порошок від жовтого до жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Метод ВЕРХ: На хроматограмі випробовуваного розчину, часи утримування основних піків X, IX, 8-PN, 6-PN мають збігатися з часами утримування відповідних піків на хроматограмі розчину порівняння для ідентифікації піків	Метод ТШХ: Наявність відповідних плям на хроматографі відповідно до тесту	не більше 10,0	X	IX	8-PN	2 роки	по зберіганню
				Не менше 1,0	Не менше 0,3	0,05-0,15		
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	7,25	2,818	0,498	0,117	0 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	4,97	2,10	0,44	0,0943	3 міс	Придатний
Порошок жовто-коричневого кольору, із специфічним запахом, гіркий на смак	Відповідає	Відповідає	5,29	1,58	0,42	0,0895	6 міс	Придатний

Висновки до розділу 5

1. На підставі одержаних у процесі розробки експериментальних даних та загальноприйнятих для рослинних препаратів показників якості розроблено специфікацію для сухого екстракту суплідь хмелю. Згідно кількісних характеристик встановленої специфікації, сухий екстракт хмелю має містити не менше 1% X, не менше 0,3% IX та 0,05-0,15% 8-PN у перерахунку на суху речовину.
2. Розроблено методи контролю показників якості, приведених у специфікації, із врахуванням фізико-хімічних властивостей сухого екстракту хмелю та базуючись на сучасних підходах фармацевтичного аналізу, зокрема, ВЕРХ.
3. Експериментально досліджено стабільність сухого екстракту хмелю протягом 6 місяців у рамках прискореного та протягом 12 місяців при довгостроковому вивченні.
4. При аналізі даних, одержаних під час вивчення стабільності у умовах довгострокового та прискореного зберігання, суттєвих змін показників якості не виявлено.
5. На підставі отриманих результатів встановлено, що умовами зберігання сухого екстракту хмелю є його зберігання у подвійних пакетах поліетиленових, як первинної упаковки, при температурі не вище 25⁰С та захищеному від світла місці. Встановленим терміном придатності сухого екстракту хмелю є термін 2 роки.

РОЗДІЛ 6

РЕЗУЛЬТАТИ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ХМЕЛЮ

6.1. Доклінічне дослідження впливу активних компонентів екстракту хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику за умов дефіциту естрогенів

6.1.1. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на біохімічні показники у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів

У результаті проведених досліджень було показано, що утримування оварієктомованих щурів на висококалорійній дієті призводить до розвитку інтолерантності до глюкози, про що свідчило збільшення площі під глікемічними кривими (ППК), розрахованої за результатами внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози, у порівнянні з інтактними тваринами.

Результати тесту толерантності до інсуліну також підтверджують зниження чутливості периферичних тканин до вказаного гормону в умовах метаболічного синдрому (МС) на фоні дефіциту естрогенів.

Введення екстракту хмелю тільки у вищій дозі - 200 мкг / кг (у перерахунку на 8-пренілнарінгенін), подібно препарату порівняння естрадіолу, призводило до покращення толерантності до глюкози та зниження інсулінорезистентності у порівнянні з групою, що одержувала розчинник. Водночас, показники у цих групах не досягали рівня, що спостерігався у інтактних щурів.

Підтвердженням естроген-дефіцитного стану у експериментальних тварин, було майже десятикратне зниження відносної маси матки після двосторонньої оварієктомії. Введення естрадіолу призводило до значного її відновлення, у той час як екстракт хмелю у дозі 20 і 200 мкг/кг маси тіла не

чинив впливу на масу даного органу, що може свідчити про відсутність у тест-речовини стимулюючого ефекту на проліферативні процеси в ендометрії.

Введення екстракту хмелю тільки у вищій дозі 200 мкг / кг маси тіла, аналогічно естрадіолу, супроводжувалося істотним зниженням приросту маси тіла та вісцерального жиру. Одержаний результат узгоджується з результатами інших подібних досліджень [57, 111, 126].

Встановлено, що у тварин з метаболічним синдромом на фоні гіпоестрогенії спостерігається підвищення концентрації загальних ліпідів у сироватці крові, яке відбувається у основному за рахунок збільшення рівня тригліцеридів і загального холестерину (табл. 6.1). При цьому концентрація неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) не відрізнялася в усіх експериментальних групах.

Таблиця 6.1

Вплив активних компонентів екстракту хмелю на ліпідний профіль сироватки крові у щурів з метаболічним синдромом на фоні гіпоестрогенії, (M±SEM, n=6)

Група	Доза, мкг/кг м.т.	Загальні ліпіди, г/л	ТГ, ммоль/л	ЗХ, ммоль/л	НЕЖК, ммоль/л
Інтактний контроль	-	1,66±0,13	0,31±0,04	1,85±0,12	0,73±0,02
Гіпоестрогенія + МС+ розчинник	-	2,43±0,11 ¹⁾	0,66±0,11 ¹⁾	2,47±0,14 ¹⁾	0,73±0,06
Гіпоестрогенія + МС + екстракт хмелю	20	2,37±0,10 ¹⁾	0,54±0,10 ¹⁾	2,72±0,07 ¹⁾	0,74±0,06
Гіпоестрогенія + МС + екстракт хмелю	200	1,66±0,04 ²⁾	0,33±0,03 ²⁾³⁾	2,37±0,10 ¹⁾	0,67±0,03
Гіпоестрогенія + МС + естрадіол	200	1,64±0,15 ²⁾	0,63±0,04 ¹⁾	1,90±0,17 ²⁾	0,72±0,06

Примітки:

¹⁾ відхилення достовірне по відношенню до інтактного контролю, P<0,05;

²⁾ відхилення достовірне по відношенню до групи «гіпоестрогенія + МС + розчинник», P < 0,05;

³⁾ відхилення достовірне по відношенню до групи «гіпоестрогенія + МС + естрадіол», P < 0,05.

У тварин, які отримували екстракт хмелю тільки у вищій дозі або естрадіол, спостерігалася нормалізація вмісту загальних ліпідів у сироватці крові. Звертає на себе увагу той факт, що введення екстракту хмелю призводило до зниження гіпертригліцеридемії і не впливало на рівень загального холестерину (ЗХ), тоді як естрадіол, навпаки, зменшував концентрацію загального холестерину, практично не впливаючи на рівень тригліцеридів (ТГ) (табл. 6.1).

Встановлено, що у групі тварин з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів рівень дієнових кон'югатів у сироватці крові був на 50% вище, ніж у інтактних тварин. В цій групі також спостерігалось підвищення загальної антиоксидантної активності сироватки, що, очевидно, є реакцією адаптації на посилення вільно-радикального окислення.

Застосування екстракту хмелю тільки у дозі 200 мкг / кг маси тіла, подібно естрадіолу, призводило до значного зниження інтенсивності перекисного окислення ліпідів, індукованого метаболічним синдромом на тлі гіпоестрогенії, про що свідчило зниження концентрації дієнових кон'югатів у сироватці крові тварин. При цьому загальна антиоксидантна активність сироватки крові у цих групах залишалася підвищеною у порівнянні з аналогічним показником у інтактних тварин. Активність каталази істотно не змінювалася незалежно від дієти і забезпеченості естрогенами.

Таким чином, застосування екстракту хмелю у дозі 200 мг / кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) у щурів з гіпоестрогенією сприяє ослабленню таких проявів метаболічного синдрому, як інсулінорезистентність, інтолерантність до глюкози, вісцеральне ожиріння, гіпертригліцеридемія, оксидативний стрес та ендотеліальна дисфункція, що свідчить про перспективність його використання з метою профілактики серцево-судинної патології у жінок після менопаузи.

6.1.2. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на показники гемостазу у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів

Оскільки гормони, що входять до складу ГЗТ, мають ряд як позитивних, так і негативних впливів на стан системи гемостазу у жінок у період постменопаузи, триває пошук більш безпечних і дієвих лікарських засобів з естрогенною активністю, позбавлених несприятливого впливу на стан системи гемокоагуляції.

Метою даного фрагменту роботи було вивчення впливу активних компонентів екстракту хмелю в порівнянні з препаратом «Прогінова» на показники системи гемостазу у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів.

Збільшення рівня фібриногену в умовах дефіциту естрогенів у поєднанні з висококалорійною дієтою, може бути самостійною причиною активації системи згортання крові.

В результаті проведених досліджень встановлено, що гіпоестрогенія у поєднанні з МС призводить до достовірного збільшення концентрації фібриногену у порівнянні з інтактними тваринами.

Введення оварієктомованим щурам з МС екстракту хмелю, незалежно від дози, достовірно знижує концентрацію фібриногену у плазмі крові, що свідчить про нормалізуючу дію досліджуваної речовини на систему гемокоагуляції. Естрадіол, на відміну від тест-речовини, не впливав на досліджуваний показник у тварин з МС на фоні гіпоестрогенії.

Показано, що у щурів з МС на тлі гіпоестрогенії показник протромбінового часу (ПЧ) не зазнав змін в порівнянні з інтактним контролем. Екстракт хмелю у досліджуваних дозах також не впливав на даний показник, як і препарат порівняння естрадіолу валеріат.

Встановлено, що гіпоестрогенія у поєднанні з МС призводить до скорочення активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ), що

підтверджує наявність порушень у системі гемостазу, які можна розглядати як фактор ризику тромбозів [83].

Введення екстракту хмелю в обох дозах оваріектомованим щурам з МС аналогічно естрадіолу не приводило до достовірної зміни показника АЧТЧ.

Таким чином, екстракт хмелю у дозах 20 і 200 мкг/кг маси тіла сприяє зниженню концентрації фібриногену у тварин з МС на фоні гіпоестрогенії. При цьому, подібно препарату порівняння, досліджувані сполуки не впливали на внутрішні і зовнішні механізми згортання крові, що підтверджувалося незмінними показниками ПЧ і АЧТЧ.

Здатність екстракту хмелю у обох дозах знижувати концентрацію фібриногену у поєднанні з відсутністю впливу на вивчені показники зовнішнього і внутрішнього шляхів згортання крові, може свідчити не тільки про його нормалізуючий вплив на систему коагуляції/фібринолізу, а й про наявність у нього протизапального ефекту, який надає опосередкований позитивний вплив на систему гемостазу [38].

Таким чином, дефіцит естрогенів у поєднанні з МС призводить до дисбалансу коагуляційного гемостазу, який характеризується підвищенням рівня фібриногену і зниженням АЧТЧ.

Застосування екстракту хмелю у дозі 20 і 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) сприяє зменшенню концентрації фібриногену, що свідчить про безпеку його використання у постменопаузальних жінок з підвищеним ризиком тромбоутворення.

6.1.3. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан центральної нервової системи щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів

Метою нашого дослідження було вивчення впливу активних компонентів екстракту хмелю, який володіє естрогеноподібною активністю, на центральну нервову систему щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів [50].

В експерименті оцінювали орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів (показники «норкового рефлексу», кількість перетинів квадратів, кількість вертикальних стійок), а також їх емоційний статус (показники грумінгу, уринацій і дефекацій), використовуючи метод «відкритого поля».

Встановлено, що метаболічний синдром на фоні дефіциту естрогенів викликає зниження рухової активності у експериментальних тварин, що підтверджується зменшенням кількості перетинів квадратів порівняно з інтактною групою. Крім того, у даної групи підвищуються показники «норкового рефлексу» щодо інтактних тварин. Таким чином, можна припустити, що метаболічний синдром у щурів з гіпоестрогенією супроводжується розвитком депресивного стану.

Одержані результати підтверджуються даними експериментальних досліджень, у яких у оварієктомованих щурів посилювалась тривога (неспокій) і спостерігалась депресивна поведінка у порівнянні з молодими щурами в стадії проєструса.

Введення екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла, подібно препарату порівняння естрадіолу, послаблювало стан депресії у оварієктомованих щурів з метаболічним синдромом, про що свідчило збільшення кількості перетинів квадратів і зниження вираженості «норкового рефлексу». В той же час, застосування тест-речовини у дозі 20 мкг/кг маси тіла не впливало на орієнтовно-дослідницьку діяльність експериментальних тварин.

Встановлено, що в умовах даної моделі метаболічного синдрому у щурів з гіпоестрогенією, не спостерігається змін емоційного статусу, що підтверджується незмінною кількістю актів грумінгу, уринацій і дефекацій щодо показників інтактного контролю.

Введення активних компонентів екстракту хмелю в усіх дозах та препарату порівняння естрадіолу не впливає на досліджені показники у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів.

Таким чином, екстракт хмелю може надавати позитивний вплив на поведінкові реакції оварієктомованих щурів з метаболічним синдромом, яке, ймовірно, реалізується як за рахунок седативного впливу, так і за рахунок естрогеноподібної дії на центральну нервову систему різних компонентів хмелю.

Одержані результати дозволяють зробити висновок про те, що у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів відзначаються ознаки порушення діяльності центральної нервової системи. Так, зменшувалась кількість перетинів квадратів відкритого поля і збільшувалось число «норок», що може свідчити про розвиток депресивного стану у експериментальних тварин.

Введення активних компонентів екстракту хмелю, подібно препарату порівняння естрадіолу, призводило до зменшення депресивних симптомів у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів. Слід зазначити, що ефективною щодо впливу на показники ЦНС виявилася тільки вища доза екстракту хмелю (200 мкг/кг маси тіла з розрахунку на 8-PN), що дозволяє рекомендувати її для ослаблення психоемоційних розладів у постменопаузальних жінок з метаболічним синдромом.

6.1.4. Вплив активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан серцево-судинної системи щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів

Завданням даного фрагменту роботи було визначення впливу активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан серцево-судинної системи щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів.

У результаті проведених досліджень встановлено, що метаболічний синдром на фоні дефіциту естрогенів викликає порушення серцевого ритму у експериментальних тварин. Зміни темпу виникнення імпульсів збудження свідчать про розвиток синусової тахікардії, можливо, пов'язаної з

безпосереднім впливом пошкоджуючих чинників на синусовий вузол і підвищуючих його збудливість [42].

Введення активних компонентів екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла, подібно препарату порівняння естрадіолу, відновлювало регулярність серцевих скорочень. В той же час, застосування тест-речовини у дозі 20 мкг/кг маси тіла не впливало на порушення серцевого ритму у експериментальних тварин.

Встановлено, що амплітуда зубця Р, що відображає на ЕКГ процеси збудження передсердь, зменшується у експериментальних тварин, які отримували як активні компоненти екстракту хмелю у двох дозах, так і препарат порівняння, що також підтверджує терапевтичний ефект досліджуваних речовин на аритмію, яка розвивається в умовах дефіциту естрогенів і метаболічного синдрому. Одержані результати співпадають з результатами інших досліджень, відносно позитивного впливу ГЗТ на автономну іннервацію серцево-судинної системи.

Введення активних компонентів екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла, подібно естрадіолу, нормалізувало амплітуду зубця R, що може свідчити про позитивні ефекти препаратів на процеси внутрішньошлуночкового проведення. У той же час, застосування тест-речовини у дозі 20 мкг/кг маси тіла не впливало на досліджуваний показник.

В результаті проведених досліджень виявлено зниження амплітуди зубця Т, що відображає процеси реполяризації шлуночків міокарда, у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів, які отримували розчинник, щодо показників у групі інтактного контролю. Зростання амплітуди або тривалості зубця Т може свідчити про розвиток ішемії в субендокардіальних шарах. Крім того, на ЕКГ деяких оварієктомованих щурів, які отримували плацебо, спостерігалась поява двофазних зубців Т, а також значне його розширення, що може бути одним з ознак порушення діастолічної функції серця.

Введення активних компонентів екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла, аналогічно препарату порівняння, підвищувало амплітуду зубця Т, а також попереджало появу широких і двофазних зубців Т. Застосування тест-речовини у дозі 20 мкг/кг маси тіла не впливало на досліджуваний показник.

Одержані результати свідчать про позитивні ефекти екстракту хмелю на процеси реполяризації тканин міокарда у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів.

Таким чином, встановлено, що у щурів з метаболічним синдромом на фоні гіпоестрогенії відзначаються зміни показників ЕКГ, що характеризують функціональну активність серцевого м'яза. Так, збільшувалась частота серцевих скорочень, процеси збудження передсердь, внутрішньошлуночкового проведення та реполяризації тканин серцевого м'яза були порушені.

Введення активних компонентів екстракту хмелю, подібно препарату порівняння естрадіолу, призводило до збереження кардіоваскулярної функції, що підтверджувалось відновленням серцевого ритму, нормалізацією інтенсивності електричної деполяризації та реполяризації передсердь і шлуночків. Виявлений кардіопротекторний ефект, можливо, реалізується за рахунок покращення ліпідного профілю, зниження інсулінорезистентності, ожиріння, оксидативного стресу, ендотеліальної дисфункції та протромботичного стану. Слід зазначити, що доза екстракту хмелю 200 мкг/кг маси тіла з розрахунку на 8-PN виявилась більш ефективною за впливом на показники ЕКГ, що дозволяє рекомендувати її для профілактики та лікування серцево-судинних ускладнень у постменопаузальних жінок з метаболічним синдромом [4].

Доклінічне дослідження гострої токсичності сухого екстракту суплідь хмелю в дозах 2500, 4000, 5000, 6000, 7000 мг/кг маси тіла встановило верхні параметри токсикометрії: LD_0) составляет 2500 мг/кг, LD_{100} , равна 7000 мг/кг LD_{50}) рассчитана на уровне 4833 мг/кг массы тела.

Висновки до розділу 6

1. Введення екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг (з розрахунку на 8-PN) у щурів з гіпоестрогенією сприяє ослабленню таких проявів метаболічного синдрому, як інсулінорезистентність, інтолерантність до глюкози, вісцеральне ожиріння, гіпертригліцеридемія, оксидативний стрес та ендотеліальна дисфункція.
2. Застосування екстракту хмелю в дозі 20 і 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) сприяє зменшенню концентрації фібриногену, що свідчить про безпеку його використання у постменопаузальних жінок з підвищеним ризиком тромбоутворення.
3. Введення екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) зменшує депресивні симптоми у щурів з метаболічним синдромом на фоні дефіциту естрогенів, нормалізуючи орієнтовно-дослідницьку діяльність.
4. Застосування екстракту хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) послаблює розвиток кардіоваскулярної дисфункції у експериментальних тварин, що підтверджується відновленням серцевого ритму, нормалізацією інтенсивності електричної деполяризації і реполяризації передсердь і шлуночків.
5. Екстракт хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-PN) по виразності досліджуваної фармакологічної дії не поступається препарату порівняння «Прогінова» в аналогічній дозі.
6. Виявлений кардіопротекторний ефект екстракту хмелю, який реалізується за рахунок покращення ліпідного профілю, зниження інсулінорезистентності, ожиріння, оксидативного стресу, ендотеліальної дисфункції та протромботичного стану, свідчить про перспективність його використання з метою профілактики та лікування серцево-судинних ускладнень у постменопаузальних жінок з метаболічним синдромом.

ВИСНОВКИ

Теоретично узагальнені та експериментально обґрунтовані наукові підходи до розробки ефективної та раціональної технології сухого екстракту суплідь хмелю із стандартизованим вмістом 8-пренілнарінгеніну як активного фармацевтичного інгредієнта лікарських засобів для профілактики та лікування патологічних станів, викликаних дефіцитом естрогенів або порушеннями їх регуляції.

1. На основі бібліосемантичного аналізу літературних даних виявлено перспективність застосування фітоестрогенів у медичній практиці. Встановлено, що найбільш потужним з відомих фітоестрогенів є преніловий флаванон суплідь хмелю (*Humulus lupulus L.*) 8-пренілнарінгенін.

2. Встановлено, що оптимальним сортом вихідної сировини для одержання екстракту з високою естрогенною активністю є сорт «Ксанта». Сухий екстракт, одержаний з даного сорту, характеризуються збалансованим компонентним складом пренілових флавоноїдів та містить найбільшу кількість 8-PN, як речовини обумовлюючої естрогенну активність продукту.

3. На підставі проведених фармако-технологічних та фізико-хімічних досліджень розроблено технологію одержання сухого екстракту суплідь хмелю, що полягає у послідовному виконанні основних стадій: термічної ізомеризації; видалення ліпофільних речовин з сировини; одержання водно-спиртового витягу, збагаченого ксантохумолом, ізоксантохумолом, 8-пренілнарінгенінном, 6-пренілнарінгеніном; упарювання водно-спиртового витягу та сушки концентрату.

Експериментально встановлено, що обробка вихідної сировини водяною парою протягом 1 години на стадії термічної ізомеризації є ефективним інструментом підвищення кількісного вмісту 8-пренілнарінгеніну як компонента, що обумовлює фармакологічну активність активного фармацевтичного інгредієнту.

Дослідженнями умов видалення з сировини речовин ліпофільної фракції визначено ефективну екстракцію сировини н-гексаном із співвідношенням «сировина: екстракт» 1:12. Згідно досліджень впливу сорту хмелю та тривалості зберігання вихідної сировини на показники якості сухого екстракту, оптимальним встановлено сорт хмелю «Ксанта» із тривалістю зберігання не більше 1 року.

4. Експериментально встановлено, що на стадії одержання водно-спиртового витягу найбільш ефективними умовами видалення пренілових флавоноїдів є екстрагування сировини 70 % етанолом із співвідношенням «сировина: екстракт» 1:10. У результаті досліджень встановлено зниження кількісного вмісту ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнарінгеніну, 6-пренілнарінгеніну у сухому екстракті під впливом термічних процесів на стадіях упарювання та сушки водно-спиртового витягу. Визначено необхідність проведення зазначених процесів в умовах вакууму при температурі середовища не більше 63 °С.

5. На підставі одержаних експериментальних даних розроблено проект специфікації з якості сухого екстракту з наступними критеріями основних показників: генуїнне співвідношення «сировина:екстракт» 3-5:1; вміст ксантохумолу – не менше 1 %; вміст ізоксантохумолу – не менше 0,3%; вміст 8-пренілнарінгеніну – 0,05-0,15%; співвідношення ксантохумол/8-пренілнарінгенін – не менше 10/1.

6. Розроблено та апробовано в умовах лабораторії ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» проект методів контролю якості «Хмелю суплідь екстракт сухий». За результатами досліджень розроблено дослідно-промисловий регламент на виробництво препарату «Хмелю суплідь екстракт сухий». Визначено контрольні параметри стадій технологічного процесу та розроблено схему його валідації. Технологію одержання активного фармацевтичного інгредієнта апробовано в умовах промислового виробництва на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ».

7. Доклінічними дослідженнями впливу активних компонентів екстракту хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику за умов дефіциту естрогенів встановлено, що екстракт хмелю у дозі 200 мкг/кг маси тіла (з розрахунку на 8-пренілнарінгенін) по виразності фармакологічної дії у аналогічній дозі не поступається препарату порівняння «Прогінова» (Bayer, Німеччина).

8. Експериментально доведена стабільність розробленого сухого екстракту суплідь хмелю при зберіганні, що дозволило встановити його термін придатності: 2 роки при температурі не вище 25⁰С у подвійних поліетиленових пакетах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вакуум-филтрационная экстракция корневищ с корнями валерианы / В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, А. С. Аммосов [и др.] // Межвуз. сб. науч. тр. и материалов 51-й науч.-практ. конф. Пермского фарм. ин-та. Пермь, 1995. – С. 98.
2. Вальцевание – перспективный способ измельчения растительного лекарственного сырья / А. С. Аммосов, Т. П. Попова, Н. В. Попова [и др.] // Актуальные вопросы фармац. науки и практи.: Тез. докл. науч.-практ. конф., посвящ. 25-летию фармац. фак-та Курского мед. ин-та. – Курск, 1991. – Часть 1. – С. 170–171.
3. Вивчення умов екстрагування речовин ліпофільної природи з суплідь хмелю / О. П. Шматенко, О. О. Добровольний, В. Л. Савицький [та ін.] // Проблеми військової охорони здоров'я. Зб. наук. праць Української військово-медичної академії. – К.: Українська військово-медична академія. – 2013. – Вип. 40. – С. 282-289.
4. Влияние фитоэстрогенов хмеля на основные факторы кардио-метаболического риска при дефиците эстрогенов / Н. И. Горбенко, О. Ю. Бориков, О. В. Иванова [та ін.] // Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: наук.-практ. конф. з між нар. уч., 2-3 бер. 2015 р.: матеріали конф. – Харків: 2015. - С. 51-52.
5. Гланс С. Медико-биологическая статистика / С. Гланс; [пер. с англ. Ю. А. Данилова]. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2009. – Доповнення 3. – 2004. – 280 с.
7. Добровольний О. О. Дослідження процесу екстрагування ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнарінгеніну та 6-пренілнарінгеніну з сировини хмелю / О. О. Добровольний, О. П. Шматенко, Ю. О. Слободянюк // Військова медицина України. – 2013. – Т. 13, № 4. – С. 86-92.

8. Добровольний О. О. Екстракти хмелю, що проявляють естрогенну та антипроліферативну активність, в якості активних субстанцій лікарських засобів / О. О. Добровольний, А. С. Шаламай // Фармація України. Погляд у майбутнє: VII Національний з'їзд фармацевтів України, 15-17 вер. 2010 р.: матеріали з'їзду. - Харків: НФаУ, 2010. – Т. 1. - С. 250.
9. Добровольный А. А. Влияние термической обработки сырья на содержание прениловых флавоноидов в экстракте хмеля / А. А. Добровольный, А. С. Шаламай, А. П. Шматенко // Фармация. – 2014. - №8. – С. 20-22.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / за ред.: чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова.- К.: Авіцена, 2001.- С.80-83.
11. Дослідження впливу тривалості зберігання суплідь хмелю на кількісний вміст пренілових флавоноїдів в сухому екстракті / О. О. Добровольний, О. П. Шматенко, А. С. Шаламай [та ін.] // Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології: VI наук.-практ. конф. з між нар. уч., 16-17 жовт. 2014 р.: матеріали конф. – Харків: НФаУ, 2014. - С. 104-105.
12. Дослідження ефективності виділення пренілових флавоноїдів з сировини хмелю (*Humulus lupulus L.*) етанолвмістними екстрагентами / О. О. Добровольний, О. П. Шматенко, А. С. Шаламай [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2015. №2. – С. 49-52.
13. Дослідження сортів хмелю як вихідної сировини екстракту з підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів / О. О. Добровольний, А. С. Шаламай, О. П. Шматенко [та ін.] // Фармацевтичний часопис. – 2014. – №2(30). – С. 11-16.
14. Извлечения как лекарственные средства / В. П. Георгиевский, В. И. Литвиненко, Ю. И. Губин [и др.] //Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы Третьего междунар. съезда. – СПб., 1999. – С. 113–115.

15. Мазурець С. І. Фармакогностичне дослідження хмелю звичайного: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармацев. наук: спец. 15.00.02 / С. І. Мазурець. – Харків, 2011. – 20 с.
16. Могилюк В. Сверхкритическая флюидная экстракция растительного сырья: перспективная технологическая платформа для фармацевтической промышленности / В. Могилюк, А. Добровольный // Фармацевтическая отрасль. – 2015. - №1(48). – С. 62-68.
17. Настанова з якості. Лікарські засоби. Валідація процесів. Настанова 42-3.5:2004/ М. Ляпунов, В. Георгієвський [та ін.]. – К.: МОЗ України, 2004. – 10 с.
18. Настанова з якості. Лікарські засоби. Випробовування стабільності. Настанова 42-3.3.2004 / В. Георгієвський, М. Ляпунов [та ін.]. – К.: МОЗ України, 2004. – 60 с.
19. Настанова з якості. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Настанова 42-4.0:2014/ М. Ляпунов, О. Безугла [та ін.]. – К.: МОЗ України, 2014. – 320 с.
20. Настанова з якості. Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження. Настанова 42-4.5.2012 / О. Середя, Л. Глущенко [та ін.]. – К.: МОЗ України, 2012. – 13 с.
21. Пономарев В. Д. Экстрагирование лекарственного растительного сырья. – М.: Медицина, 1976. – 204 с.
22. Попова Т.П. Некоторые общие закономерности извлечения действующих веществ из лекарственного сырья. Сообщ. 1. / Т. П. Попова, В. И. Литвиненко // Фармаком. – 1993. – № 1. –С. 13–15.
23. Попова Т.П. Некоторые общие закономерности извлечения действующих веществ из лекарственного сырья. Сообщ. 2. Технологические свойства лекарственного растительного сырья / Т. П. Попова, В. И. Литвиненко // Фармаком. – 1993. - № 2. - С. 8–12.
24. Пути унификации производства галеновых препаратов валерианы В. И. Литвиненко, С. В. Талашова, Т. П. Попова [и др.] // Современные аспекты

изучения лекарственных растений: сб. науч. тр. НИИФ, 1995. – Т. 34. – С. 35–40.

25. Резников А. Г. Необходима ли гормональная заместительная терапия после менопаузы? / А. Г. Резников // *Medicus Amicus*. - 2002. - № 5. - С. 4–5.

26. Резников А. Г. Эндокринологические аспекты климакса и постменопаузальных осложнений / А. Г. Резников // *Диабетик*. - 1996. - № 5-6. - С. 19-24.

27. Технологические процессы и их аппаратурное оформление в фитохимическом производстве / В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, А. С. Аммосов [и др.] // *Научные достижения и проблемы производства лекарственных средств: тез. докл. науч.-практ. конф.* – Харьков, 1995. – С. 17–18.

28. Фильтрационная экстракция и ее аппаратурное оформление / Т. П. Попова, А. С. Аммосов, В. И. Литвиненко [и др.] // *Фармаком.* – 1994. – № 2–3. – С. 43–49.

29. Чумак В. Т. Оцінка якості та встановлення специфікацій на лікарські засоби рослинного походження/традиційні лікарські засоби рослинного походження: методичні рекомендації / В. Т. Чумак, О. П. Баула. – К.: МОЗ., ДП «Державний Фармакологічний Центр», 2008. – 30 с.

30. 8-Prenylnaringenin is a potent ER alpha selective phytoestrogen present in hops and beer / O. Schaefer, M. Hümpel, K. H. Fritzemeier [et al.]// *J. Steroid. Biochem. and Mol. Biol.* – 2003. - Vol. 84, Iss. 2-3. – P. 359-360.

31. 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo / M. S. Pepper, S. J. Hazel, M. Humpel [et al.]// *J. Cell. Physiol.* – 2004. – Vol. 199, Iss. 1. – P. 98-107.

32. 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells / H. Rong, T. Boterberg, J. Maubach [et al.]// *Eur. J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 80, Iss. 9. - P. 580-585.

33. A first prospective, randomized, double-blind placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomfort / A. Heyerick, S. Vervarcke, H. Depypere [et al.]// *Maturitas*. – 2006. – Vol. 54, Iss. 2. – P. 164-175.
34. A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over pilot study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts / R. Erkkola, S. Vervarcke, S. Vansteelandt [et al.]// *Phytomedicine*. – 2010. – Vol. 17, Iss. 6. – P. 389-396.
35. Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; Conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin / S. Possemiers, A. Heyerick, V. Robbens [et al.]// *J. Agric. Food Chem.* – 2005. -Vol. 53, Iss. 16. – P. 6281–6288.
36. Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes / R. Turton, R. Bailie, W. Whiting [et al.] // - 4nd Edition. - Prentice Hall. - 2003. - 1007 P.
37. Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin / O. Zierau, C. Morrissey, R. W. G. Watson [et al.]// *Planta Med.* - 2003, - Vol. 69, Iss. 9. – P. 856-858.
38. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of 5-deprenyllupulonol C and other compounds from Hop (*Humulus lupulus* L.) / H. Akazawa, H. Kohno, H. Tokuda [et al.] // *Chem Biodivers.* – 2012. - Vol. 9, Iss. 6. – P. 1045-1054.
39. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro / C. L. Miranda, J. F. Stevens, V. Ivanov [et al.]// *J. Agric. Food Chem.* – 2000. Vol. 48, Iss. 9. – P. 3876-3884.
40. Antioxidant and radical-scavenging potential of phenolic constituents of beer / C. Gerhauser, A. Alt, A. G. Eldeen [et al.]// *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* - 2001b. – Vol. 42. – P. 18.
41. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines / C. L Miranda, J. F. Stevens, A. Helmrich [et al.]// *Food Chem. Toxicol.* – 1999. - Vol. 37, Iss. 4. – P. 271-285.

42. Association between heart rate and multiple risk factor syndrome: cross-sectional analysis of a screened cohort in Okinawa, Japan / T. Inoue, K. Iseki, C. Iseki [et al.] // *Circ. J.* – 2008. – Vol. 72, № 3. – P. 454–457.
43. Bertucco A. High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications / A. Bertucco, G. Vette // Elsevier Science, Amsterdam. – 2001. – 678 P.
44. Bott R.F. Comparative Study of the Production of Dried Extracts of Medicinal Plants by Spray and Spouted Bed Drying / R.F Bott // Internal Research Report - Program PIBIC CNPq/USP. – 2001.
45. Bottner M. Effects of long-term treatment with 8-prenylnaringenin and oral estradiol on the GH–IGF-1 axis and lipid metabolism in rats / M. Bottner, J. Christoffel, W. Wuttke // *Journal of Endocrinology.* – 2008. - **Vol.** 198. – P. 395–401.
46. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop / C. Gerhauser, A. Alt, E. Heiss [et al.]// *Mol. Cancer. Ther.* – 2002. - Vol. 1, Iss. 11. - P. 959-969.
47. Chadwick L. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with the emphasis on estrogenic properties / L. R. Chadwick, G. F. Pauli, N. R. Farnsworth// *Phytomedicine.* – 2006. – Vol. 13, Iss. 1. – P. 119-131.
48. Chan K. Supercritical carbon dioxide fluid extraction of *Hibiscus cannabinus* L. seed oil: a potential solvent-free and high antioxidative edible oil / K. Chan, M. Ismail M // *Food Chem.* – 2009. – Vol. 114, Iss. 3. – P. 970 – 975.
49. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/ L. Ceslova, M. Holcapek, M. Fidler [et al.] // *Journal of Chromatography A.* - 2009. – Vol. 1216, Iss. 43. – P. 7249–7257.
50. Coldham, N. G. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement / N. G. Coldham, M. J. Sauer// *Food Chem. Toxicol.* – 2001. – Vol. 39, Iss. 12. - P. 1211-1224.

51. Comparison of the *in vitro* estrogenic activities of compounds from hops (*Humulus lupulus*) and red clover (*Trifolium pratense*) / C. R. Overk, P. Yao, L. R. Chadwick [et al.] // J. Agric. Food. Chem. 2005. - Vol 53, Iss. 16. – P. 6246-6253.
52. Cordeiro D.S. Technical Aspects of the Production of Dried Extract of *Maytenus ilicifolia* Leaves by Jet Spouted Bed Drying / D. S. Cordeiro, W. P. Oliveira // Int. J. Pharm. – 2005. – Vol. 299, Iss. 1-2. – P. 115 - 126.
53. Dobrovolnyi O. O. The study of dependence of the prenyl flavonoids content in the hop dry extract on temperature parameters of its obtaining / O. O. Dobrovolnyi // Вісник фармації. – 2014. - № 3(79). – С. 20-24.
54. Drying Temperature Effects in Rosemary Essential Oil Content and Composition / M.C.S.G. Blanco, L. C. Ming, M.O.M. Marques [et al.] // Acta Horticulturae. – 2002. No 569. – P. 95.
55. Dunford N. Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran / N. Dunford, S. Irmak, R. Jonnala // Food Chem. – 2010. – Vol. 19, Iss 3. – P. 1246 – 1249.
56. Dung N. X. Extraction and Distillation of essential Oils, Processing, Analysis and Application of Essential Oils, / N. X. Dung, T. Dinh // - 1st Edition. - Har Krishan Bhalla & Sons Book Company. – 2005. – 59 P.
57. Effect of dietary polyphenols from hop (*Humulus lupulus* L.) pomace on adipose tissue mass, fasting blood glucose, hemoglobin A1c, and plasma monocyte chemotactic protein-1 levels in OLETF rats / K. Yui, H. Uematsu, K. Muroi [et al.] // J. Oleo Sci. – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 283– 292.
58. Effects of aqueous hop (*Humulus Lupulus* L.) extract on vascular reactivity in rats: mechanisms and influence of gender and hormonal status / H. Figard, C. Girard, F. Mougín [et al.] // Phytomedicine. – 2008. – Vol. 15, №3. –P. 185–193.
59. Emery E. Flow properties of selected pharmaceutical powders /E. Emery // Master Thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, 2008. – 95 p.
60. Estrogens, phytoestrogens, and breast cancer / R. Clarke, L. Hilakivi-Clarke, E. Cho [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 1996. - Vol. 401. – P. 63-85.

61. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms / J. Liu, J. E. Burdette, H. Xu [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 2001. – Vol. 49, Iss. 5. – P. 2472–2479.
62. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends / C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma // Crit. Rev. Biotechnol. – 2011. – - Vol. 31, Iss. 33. – P 227–249.
63. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit-A review / B. Yang, Y. Jiang, J. Shi [et al.] // Food Res. Int. – 2010. – Vol. 44, Iss. 7. – P. 1837– 1842.
64. Formation and accumulation of alpha-acids, beta-acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.) / J. De Keukeleire, G. Ooms, A. Heyerick [et al.]// J. Agric. Food Chem. – 2003. - Vol. 51, Iss. 15. - P. 4436-4441.
65. Gaffield W. Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides /W. Gaffield// Tetrahedron. – 1970. – Vol. 26, Iss. 17. - P. 4093–4108.
66. Gamse T. Lecture on Liquid-liquid Extraction and Solid-liquid Extraction / T. Gamse // - 2002. - Available at: www.iq.uva.es/separacion/archivos/SkriptumExtraction.pdf.
67. Gan C. Y. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology / C. Y. Gan, A. A. Latiff // Food Chem. – 2010. – Vol. 124, Iss. 4. – P. 1277 – 1283.
68. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products: EMEA/CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2. – London: European Medicines Agency, 2011. – 25 p.
69. Handa S. S. Traditional and Modern methods of extraction of essential oils from aromatic plants / S. S. Handa // Presentation at the training course on cultivation, post-harvesting and processing technologies of medicinal and aromatic plants in developing countries. 25-29 July 2005ICS-UNIDO organized at Bomako, Mali.

70. Hänsel R. Desmethylxanthohumol: Isolierung aus Hopfen und Cyclisierung zu Flavanonen / R. Hänsel, J. Schulz // *Archiv der Pharmazie*. – 1988. - Vol. 321, Iss. 1. – P. 37–40.
71. Harvey A. Natural products in drug discovery / A. Harvey // *Drug Discov Today*. – 2008. – Vol. 13, Iss. 19–20. – P. 894–901.
72. Herrero M. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review / M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez E // *Food Chem*. – 2006. – Vol. 98, Iss. 1. – P. 136–148.
73. Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships / A. L. Simons, M. Renouf, S. Hendrich [et al.]// *Agric. Food Chem*. – 2005. Vol. 53, Iss. 10. – P. 4258–4263.
74. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus L.*) and beer /S. R. Milligan, J. C. Kalita, A. Heyerick [et al.]//*Clin. Endocrinol. Metab*. – 1999. -Vol. 84, Iss. 6. - P. 2249-2252.
75. In vitro assays of non-steroidal phytoestrogens / L. Markiewicz L, J. Garey, M. Adlerczetz [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol*. - 1993. – Vol. 45, Iss. 5. – P. 399 - 405.
76. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta / G. G. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson [et al.]// *Endocrinology*. – 1998. – Vol. 139, Iss. 10. – P. 4252–4263.
77. Jin Y. Numerical Study of the Drying Process of Different Sized Particles in an Industrial-Scale Spray Dryer / Y. Jin, X. D. Chen // *Drying Technology*. – 2009. – Vol. 27, Iss. 3. – P. 371 - 381.
78. Kaufmann B. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction /B. Kaufmann, P. Christen // *Phytochemical Analysis*. – 2002. – Iss. 13.- P. 105-113.
79. Knight D. C. A review of the clinical effects of phytoestrogens / D. C. Knight, J. A. Eden// *Obstetrics and Gynecology*. -1996. -Vol. 87, Iss. 5 (P. 2). – P. 897–904.

80. Krofta K. The content of hop prenylflavonoids in Czech and foreign beers / K. Krofta // *Kvasny Prum.* – 2010. -Vol. 56. Iss. 1. - P. 2–9.
81. Lam K. New aspects of natural products in drug discovery / K. Lam // *Trends Microbiol.* – 2007, - Vol. 15, Iss. 6. – P. 279–289.
82. Langrish T. A. G. New engineered particles from spray dryers: research needs in spray drying / T. A. G. Langrish // *Drying Techn.* – 2007. – Vol. 25, Iss. 6. –P. 971 - 983.
83. Metabolic syndrome in postmenopausal women: the influence of oral or transdermal estradiol on inflammation and coagulation markers / M.C. Chu, M. Cushman, R. Solomon [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2008. - Vol. 199, № 5. – P. 526-537.
84. Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora / I. Rowland, H. Wiseman, T. Sanders [et al.]// *Biochem. Soc. Trans.* – 1999. – Vol. 27, No. 2. - P. 304–308.
85. Mezhericher M. Heat and mass transfer of single droplet/wet particle drying / M. Mezhericher, A. Levy, I. Borde // *Chem. Engineering Scie.* – 2008. – Vol. 63, Iss. 1. – P. 12 - 23.
86. Mujumdar A. S. Thermal drying technologies – cost effective innovation aided by mathematical modelling approach / A.S. Mujumdar, Z. H. Wu // *Drying Technology.* – 2008. – Vol. 26, Iss. 1. – P. 145-153.
87. Murkies A. L. Clinical review 92: Phytoestrogens / A. L. Murkies, G. Wilcox, S. R. Davis // *Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – Vol. 83, Iss. 2. – P. 297–303.
88. New approach to the production of xanthohumol-enriched beers / M. Karabín, L. Jelínek, T. Kinčl [et al.] // *J. Inst. Brew.* – 2013. - Vol. 119, Iss. 3. – P. 98–102.
89. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin /S. Milligan, J. Kalita, V. Pocock [et al.]// *Reproduction.* – 2002. – Vol. 123, Iss. 2. – P. 235-242.

90. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro / K. Hayat, S. Hussain, S. Abbas [et al.] // Sep. Purif. Technol. – 2009. – Vol. 70, Iss. 1. – P. 63–70.
91. Ososki A. L. Phytoestrogens: a review of the present state of research / A. L. Ososki, E. J. Kennelly // Phytother. Res. – 2003. – Vol. 17, Iss. 8. – P. 845-869.
92. Phytoestrogens: where are we now? M. L. Bingham, C. Atkinson, J. Liggins [et al.] // Brit. J. Nutr. - 1998. - Vol. 79, Iss. 5. - P. 393-406.
93. Pierson C. E. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer / C. E. Pierson // Integr. Cancer Ther. – 2003. – Vol. 2, №. 2. – P. 120–138.
94. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship / M. Kitaoka, H. Kadokawa, M. Sugano [et al.] // Planta Med. – 1998. – Vol. 64, Iss. 6. – P. 511-515.
95. Prenylflavonoids: A new class of nonsteroidal phytoestrogen (part 2) Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism / M. Miyamoto, Y. Matsushita, A. Kiyokawa [et al.]// Planta Med. – 1998. – Vol. 64, Iss. 6. – P. 516-519.
96. Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards / L. Dhooghe, T. Naessens, A. Heyerick [et al.] // Talanta. – 2010. - Vol. 83, Iss. 2. – P. 448–456.
97. Quantitation of 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.), hop products, and beers, by benchtop HPLC-MS using electrospray ionization / H. Rong, Y. Zhao, R. Lazou [et al.]// Chromatographia. -2000. – Vol. 51, Iss. 9-10. – P. 545-552.
98. Rawlins E. A. Bentley's Text book of Pharmaceutics / E. A. Rawlins // All India Travellers Booksellers Publishers & Distributors Elsevier. - 2004. -725 P.

99. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial / J. E. Rossouw, G. L. Anderson, R. L. Prentice [et al.] // *JAMA*. – 2002. – Vol. 288, №3. – P. 321–333.
100. Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products: EMA/HMPC/3636/2009. – London: European Medicines Agency, 2010. – 3 p.
101. Regulation of gene expression by 8 prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats / P. Diel, R. B. Thomae, A. Caldarelli [et al.]// *Planta Med.* – 2004. – Vol. 70, Iss. 1. – P. 39-44.
102. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm peels / P. K. Nagendra, F. A. Hassan, B. Yang // *Food Chem.* -2011. – Vol. 128, Iss. 4. – P. 1121–1127.
103. Sambamurthy K. *Pharmaceutical Engineering* / K. Sambamurthy // New Delhi: New Age International (P.) Ltd. -2007. -500 P.
104. Setchell K. D. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health / K. D. Setchell, A. Cassidy // *J. Nutr.* – 1999. – Vol. 129, № 3. – P. 758S–767S.
105. Setchell K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones / K. D. Setchell // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1998. Vol. 68, № 6. – P. 1333S–1346S.
106. Shi. J. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals, Processing Technologies* / J. Shi // Taylor and Francis, Boca Raton. – 2007. – 427 P.
107. Simsek M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from sour cherry pomace / M. Simsek, G. Sumnu, S. Sahin // *Separ. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 47, Iss, 8. – P. 1248–1254.
108. Stevens J. F. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! / J. F. Stevens, J. E. Page// *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65, Iss. 10. - P. 1317-1330.

109. Stevens, J. F. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. F. Stevens, A. W. Taylor, M. L. Deinzer // *J. Chromatogr. A.* – 1999. - Vol. 832, Iss. 1-2. - P. 97-107.
110. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist / A. C. W. Pike, A. M. Brzozowski, R. E. Hubbard [et al.] // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, Iss. 17. – P. 4608-4618.
111. Sumiyoshi M. Hop (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term / M. Sumiyoshi, Y. Kimura // *Br. J. Nutr.* – 2013. – Vol. 109, № 1. – P. 162–172.
112. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis* / M. D. Macias-Sanchez, J. M. Fernandez-Sevilla, F. G Acien Fernandez [et al.] // *Food Chem.* – 2010. – Vol. 123, Iss. 3. - P. 928–935.
113. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids / S. R. Milligan, J. C. Kalita, V. Pocock [et al.] // *Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85, Iss 12. – P. 4912-4915.
114. The prenylflavonoid isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-Prenylnaringenin in vitro and in the human intestine / S. Possemiers, S. Bolca, C. Grootaert [et al.] // *J. Nutr.* – 2006. - Vol. 136, No. 7. – P. 1862-1867.
115. Tonon, R. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying / R. Tonon, C. Brabet, M. Hubinger // *J. Food Eng.* – 2008. – Iss. 88, 411-418.
116. Ullum T. Simulation of a spray dryer with rotary atomizer: The appearance of vortex breakdown / T. Ullum // *Proceedings of the 15th International Drying Symposium.* - 2006. – P. 251-257.
117. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn) seed by response surface methodology and their structural

- characteristics / Y. Chen, H. Luo , A. Gao [et al.] // *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* -2011. – Vol. 12, Iss. 3. – P. 305–309.
118. Verzele M. 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing /M. Verzele// *J. Inst. Brew.* – 1986. - Vol. 92, Iss. 1. - P. 32–48.
119. Wang L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants / L. Wang, C. L. Weller // *Trends in Food Science & Technology.* – 2006. – Iss. 17. – P. 300–312.
120. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines – Geneva: World Health Organization European, 2007. – 72 p.
121. Wilkinson B. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways / B. Wilkinson, J. // *Nat. Chem. Biol.* - 2007. – Vol. 3, Iss. 7. – P. 379–386.
122. WO 2003/014287. Hops extracts, method for the production and use / Erdelmeier C., Koch E.: inventor(s); Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co.: applicant(s); international publication date 20.02.2003.
123. WO 2005/058336 A1. Production of hops extracts having oestrogenic and antiproliferative bioactivity / Maes F., Keukeleire D., Heyerick A.; inventor(s); Biodynamics: applicant(s); international publication date 30.06.2005.
124. Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus*) as a novel potential cancer chemopreventive agent / C. Gerhauser, A. Alt, K. Klimo [et al.]// *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* - 2001a. – Vol. 42. - P. 19.
125. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadion-induced DNA damage through induction of quinone-reductase / B. M. Dietz, Y-H. Kung, G. Liu [et al.]// *Chem. Res. Tox.* – 2005. – Vol. 18, Iss. 8. 1296-1305.
126. Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats / L. L. Legette, A. Y. Luna, R. L. Reed [et al.] // *Phytochemistry.* – 2013. – Vol. 91. – P. 236–241.
127. Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus* / N. Tabata, M. Ito, H. Tomoda [et al.] // *Phytochemistry.* - 1997 – Vol. 46, №4. – P. 683–687.

128. Xiao W. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoid from radix astragali using response surface methodology / W. Xiao, L. Han, B. Shi // *Separ. Sci. Technol.* - 2008. – Vol. 43, Iss. 3. – P. 671–681.
129. Yui K. Effects of xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet / K. Yui , A. Kiyofuji, K. Osada // *J. Oleo Sci.* –2014. –Vol. 63, №2. – P. 159–168.
130. Zbicinski I. Spray drying tower experiments / I. Zbicinski, M. Piatkowski // *Drying Technology.* – 2004. – Vol. 22, Iss. 6. – P. 1325 – 1349.

ДОДАТКИ