МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

МИХАЙЛЕНКО ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.27:615.322:582.579.2:581.192:581.5

ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОКУСУ ПОСІВНОГО ТА РОСЛИН РОДУ ІРИС: ПЕРСПЕКТИВИ КОМПЛЕКСНОГО ВИКОРИСТАННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ВИРОЩУВАННЯ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Реферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фармацевтичних наук

Львів – 2024

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України

Науковий консультант: доктор фармацевтичних наук, професор
ГЕОРГІЯНЦ ВІКТОРІЯ АКОПІВНА
Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
МАРЧИШИН СВІТЛАНА МИХАЙЛІВНА
Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, завідувач кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою

доктор фармацевтичних наук, професор
КАРПЮК УЛЯНА ВОЛОДИМИРІВНА
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, професор кафедри фармакогнозії та ботаніки

доктор фармацевтичних наук, професор
ОДИНЦОВА ВІРА МИКОЛАЇВНА
Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, професор кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки

Захист відбудеться «___» _____ 2024 р. о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитись на офіційному сайті https://nauka.meduniv.lviv.ua та в науковій бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Реферат розіслано «___» _____ 2024 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, професор Ірина ДРАПАК

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. У сучасних дослідженнях ключовим інструментом є дотримання вимог доказової фармації. З цієї точки зору проблема одержання рослинних лікарських препаратів зі стабільним складом діючих компонентів стає дедалі актуальнішою у системі охорони здоров'я. Для досягнення якості й ефективності препаратів рослинного походження необхідно слідувати фіторингу для досягнення стабільного складу та вмісту БАР, шляхом поєднання новітніх наукових досліджень та технології задня повного використання діючих речовин рослин та одержання ЛРС (Bionorica©, 2024). Відповідно до цього одним з критеріїв отримання якісної рослинної сировини є підбір належних умов вирощування рослин, які базуються на дослідженні впливу екологічних факторів навколишнього середовища на накопичення БАР видами рослин (Kumar, 2018). Хімічний склад рослини, наявність і кількість діючих речовин схильні до значних коливань і залежать від багатьох факторів (Ramakrishna, 2011). Одна і та ж рослина може містити різні хімічні сполуки в різних кліматичних і географічних зонах (Liu, 2016). Вміст БАР в рослинах схильний до змін в залежності від: виду, сорту і стадії вегетації рослин; виду ґрунту, її фізичних властивостей і хімічного стану; географічного розташування району зростання; кліматичних умов; технології обробки сировини; екологічних факторів антропогенної дії.

Порівняння хімічного складу сировини, вирощеної у різних кліматичних умовах, сприяє оптимізації культивування ЛР для отримання якісної сировини. ВООЗ розробила керівні принципи «Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження» (GACP) (Collection Practices, 2003; Association, 2010), за умов дотримання рекомендацій GACP є можливість одержання якісних рослинних продуктів з однорідним та стабільним складом. Асоціація EUROPAM адаптувала рекомендації для забезпечення можливості простежуваності ЛРС та контролю її якості (Association, 2016). В Україні Настанову «СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012 Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження» було введено у 2013 р. (Наказ МОЗ України № 118 від 14.02.2013), але не всі підприємства дотримуються її, так як для її впровадження необхідно проводити комплексні дослідження рослин: від дослідження хімічного складу до стандартизації умов вирощування.

Завдяки лікувальним властивостям крокусу посівного (*Crocus sativus* L. або шафран) та рослин роду Ірис, комерційний попит на рослинну сировину постійно на підйомі як на європейському, так і на світовому ринку. Рослини мають давню історію застосування у якості протизапальних, протиракових, гепатопротекторних засобів, тощо. Є джерелами ізофлавоноїдів, флавоноїдів, тритерпеноїдів, ксантонів, апокаротиноїдів, амінокислот тощо (Anaeigoudari, 2023; Iwashina, 2020; Singab, 2016). Крім того, для рослин властиве широке вирощування в України. Таким чином комплексне фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис з метою досягнення стабільного вмісту маркерних сполук у рослинній сировині та впровадження рослин у фармацевтичну практику є актуальним.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946). Крім цього, фрагменти дисертаційного дослідження виконані в рамках гранту International Cooperation Add-on Project (MAGIC), 108WFDG310121 (2019–2020).

Мета роботи – комплексне фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис, аналіз впливу екологічних чинників на якість вихідної сировини та імплементація принципів GACP для теоретичного та експериментального обґрунтування сучасної методології та підходів до одержання культивованої та дикорослої ЛРС та субстанцій зі стабільним вмістом БАР; обґрунтування маркерів та одержання стандартних речовин для контролю якості; визначення перспектив комплексної переробки сировини за результатами фармакологічних досліджень. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

- провести аналіз законодавчої бази України та країн ЄС щодо виробництва ЛРЗ зі застосуванням рекомендації ВООЗ GACP. Узагальнити дані про хімічні складові та фармакологічні профілі рослин роду Крокус та Ірис із залученням баз даних: NCBI-PubMed, Web of Knowledge, Science direct, Wiley online library;
- спланувати методологію дослідження з урахуванням досягнення сталого композиційного складу ЛРС та підходу QbD для одержання якісних рослинних субстанцій; виявити та систематизувати ризики якості за допомогою діаграми Ісікави та методом FMEA, запропоновувати шляхи їх попередження та усунення; сформувати стратегію досліджень із виявлення Q-маркерів сировини та екстрактів з використанням HerbMars підходу;
- провести первинний скринінг сировини видів рослин роду Крокус та Ірис для визначення перспективних видів;
- провести порівняльне дослідження хімічного складу приймочок крокусу посівного (шафран) з різних регіонів України та з різних країн світу з урахуванням впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез БАР; запропоновувати методи аналізу для запобігання фальсифікації сировини; одержати екстракти з приймочок, стандартизувати їх та дослідити їх фармакологічну активність; розробити структуру монографії для контролю якості шафрану з метою впровадження до ДФУ;
- дослідити побічні продукти виробництва шафрану – листя, оцвітини, неякісних бульбоцибулин крокусу посівного, вивчити їх хімічний склад, встановити основні параметри стандартизації; одержати рослинні екстракти, виділити індивідуальні речовини, провести фармакологічний скринінг;
- провести дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР у кореневищах та листі рослин роду Ірис; оцінити вплив екологічних факторів на вміст основних метаболітів; обґрунтувати оптимальні терміни заготівлі

сировини; одержати екстракти з сировини і. угорського, і. сибірського, і. строкатого, вдосконалити методику виділення речовини з кореневищ і. угорського, встановити їх будову, вивчити фармакологічну активність враховуючі залежність «структура – активність»;

- розробити СОП вирощування крокусу посівного, ірису угорського та сортів ірисів в Україні відповідно до рекомендацій GACP ВООЗ для забезпечення якості та простежуваності сировини; апробувати екологічні методи передпосівної обробки (електромагнітне поле, вакуум, холодна плазма) та підживлення (монокомпонентне мінеральне збагачення ґрунту) на біосинтез БАР у рослинах для імплементації у фармацевтичну галузь.

Об'єкт дослідження. Комплексне порівняльне фармакогностичне вивчення лікарської рослинної сировини крокусу посівного та рослин роду Ірис.

Предмет дослідження. Аналіз та імплементація настанови ВООЗ GACP для забезпечення якості та простежуваності ЛРС. Дизайн експерименту, ідентифікація, визначення вмісту БАР сировини рослин роду Крокус та Ірис, визначення речовин-маркерів із різних груп (апокаротиноїдів, фенольних сполук, терпеноїдів) з крокусу посівного та видів ірисів; вивчення впливу кліматичних та едафічних факторів на накопичення БАР у сировині; дослідження впливу абіотичних стресів на продуктивність та компонентний склад сировини; параметри стандартизації перспективних видів ЛРС та субстанцій, технологічні параметри одержання рослинних екстрактів, їх хімічний склад, фармакологічна активність.

Методи дослідження. Використання підходу QbD для планування експерименту. Для ідентифікації ризиків застосовані методи мозкового штурму і побудови діаграми Ісікави, а для кількісної оцінки ризиків використаний метод аналізу видів і наслідків відмов (FMEA). Якісний склад і кількісний вміст БАР та рослинних субстанцій визначали методами хроматографії (ПХ, ТШХ, ВЕТШХ, ГХ/МС, ВЕРХ із діодно-матричним детектором (ДМД), ультрафіолетовим детектором (УФ), УЕРХ з мас-детектором (МС)), абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій ділянках, титриметрії, атомно-абсорбційної спектроскопії, гравіметрії. Речовини виділяли методом колонкової хроматографії. Для встановлення їх будови використовували фізичні (визначення показника заломлення, оптичного обертання, температури плавлення), хімічні (проведення хімічних реакцій, реакцій дезметилювання, метилування, лужного, кислотного, ферментативного гідролізу), фізико-хімічні методи (^{1}H-, ^{13}C-ЯМР-, NOESY, HSQC і HMBC-спектроскопія, мас-спектрометрія, ІЧ-, УФ-спектроскопія, елементний аналіз, ПХ і ТШХ, препаративна, колонкова хроматографія на силікагелі) методи. Анатомічну будову сировини вивчали методом світлової мікроскопії. Технологічні методи включали підбір технології та екстрагенту. Прогнозування біологічної активності БАР проводили методами *in silico* (ChemGPS-NP; молекулярний докінг за допомогою програмного забезпечення SCIGRESS, ліцензія 742F6852C191), дослідження антиоксидантної активності – методом ВЕРХ-ABTS *in vitro*. Фармакологічні дослідження проводили *in vivo* та *in vitro*. Для обробки експериментальних даних були використанні ієрархічний аналіз, метод Спірмена та метод головних компонентів

у програмі Past 4.03. Валідація розроблених методик, статистична обробка проводилась за вимогами ДФУ та програм Microsoft Office.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено дослідження умов зростання/вирощування та систематичне фармакогностичне дослідження сировини крокусу посівного та рослин роду Ірис; теоретично та практично обґрунтовано перспективні джерела ЛРС зі стабільним вмістом БАР для подальшого дослідження та створення вітчизняних ЛРЗ на їх основі. Сформульовані науково-методологічні підходи до контролю якості ЛРС при дотриманні концепції QbD.

Уперше проведено системну оцінку ризиків для якості виробництва рослинних екстрактів, включаючи вирощування та обробку рослинних матеріалів, процес екстракції та вибір розчинників, на прикладі крокусу посівного, результати дозволили обґрунтувати критичні фактори процесу отримання готового продукту, запропонувати коригувальні дії.

Уперше проведено порівняльний аналіз впливу факторів навколишнього середовища на накопичення БАР у 57 зразках шафрану з 13 країн світу та 16 популяцій видів рослин роду Ірис флори України, Литви та Латвії.

Уперше застосовано монокомпонентне живлення при культивуванні 6 сортів ірисів вітчизняної колекції для впливу на вторинні метаболіти. Відмічене збільшення вмісту фенольних сполук у листі та кореневищах ірисів. Вперше досліджено позитивний влив передпосівної обробки (холодна плазма, вакуум, електромагнітне поле) крокусу посівного бульбоцибулин на вміст кроцинів у шафрані, та фенольних сполук у листі та оцвітині рослини.

Уперше розроблено оригінальну методику одержання стандартних робочих зразків пікрокроцину, транс-4GG, транс-2G, транс-3Gg.

Уперше використано техніку подрібнення приймочок крокусу посівного та кореневищ видів ірисів у рідкому азоті для збільшення виходу речовин.

Розроблено оригінальну методику ВЕРХ для виявлення колхіцину у рослинній сировині крокусу посівного.

Запропоновано оригінальний експрес-метод ВЕТШХ для кількісного визначення шафраналю, кроцину, пікрокроцину у приймочках к. посівного.

З використанням методу колонкової хроматографії на силікагелі, вперше було виділено 16 речовин з оцвітини українського крокусу посівного та вдосконалено методику виділення речовин з кореневищ ірису угорського, в результаті чого, було виділено 30 речовин та встановлено їх структуру із використанням методів 1D та 2D NMR спектроскопії.

Вперше створено оригінальну базу противірусних та протигрипозних клінічних препаратів для порівнянням з природними фенольними сполуками з метою прогнозування активності із використання *in silico* метода ChemGPS-NP;

Вперше виявлено закономірності накопичення речовин-маркерів для досліджуваної сировини в залежності від вегетаційного періоду збору, умов культивування (інформ. листи № 376-2018) чи зростання у дикому вигляді.

Вперше проведено стандартизацію українських приймочок крокусу посівного, показана відповідність їх якості вимогам ISO 3632, DAC та ЄФ, що дозволило визначити найбільш сприятливі регіони для вирощування рослини.

На основі проведених досліджень сформовано рекомендації щодо порядку формування монографії на сировину приймочки крокусу посівного (шафран) для введення до національної частини ДФУ.

Вперше проведено комплексну оцінку хімічного складу досліджуваної сировини, а саме визначено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, поліфенолів; ізофлавоноїдів, ксантонів), амінокислот, карбонових кислот, сполук терпенової природи, фенольних речовин, макро- і мікроелементів, додатково для к. посівного – склад апокаротиноїдів.

Запропоновано оригінальну технологію одержання полісахаридного комплексу з бульбоцибулин к. посівного (заявка на патент Європейського Союзу LT2021 527, 106245, від 03.06.2021); вперше запропоновано технології одержання рослинних екстрактів з листя, оцвітини к. посівного (патент № 124210 на винахід України від 04.08.2021, Бюл. № 31; патент № 146567 на корисну модель України від 03.03.2021, Бюл. № 9; № 142213 від 25.05.2020, Бюл. № 10); вдосконалено методики одержання екстрактів із сировини видів ірисів.

Вперше проведено дослідження *in vitro* біологічної активності рослинних екстрактів крокусу посівного, ірису угорського, і. строкатого, і. сибірського, включаючи антивірусну (ентеровірус D68, вірус грипу (H1N1), коронавірус 229E), протизапальну, антиоксидантну, протиалергійну, експресію NRF2, крапельну активність ліпідів, цитотоксичну та антибактеріальну активність. Вперше досліджено хімічний склад отриманих екстрактів методом ВЕРХ.

Вперше використано підхід Herb MaRS для обґрунтування вибору Q-маркерів для всієї досліджуваної сировини та екстрактів заданої дії.

На прикладі контрольованого вирощування сортових карликових бородатих ірисів у НБС ім. М.М. Гришка НАН України, а крокусу посівного – у ФГ Шафран Любимівський, вперше науково обґрунтовано доцільність застосування принципів GACP для просування якісної вітчизняної продукції на міжнародний ринок сировини та фітопрепаратів (патент України на корисну модель № 135685 від 10.07.2019, Бюл. № 13).

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано підхід «Якість шляхом розробки» для забезпечення оптимізації цілеспрямованого пошуку протипухлинних та противірусних рослинних компонентів з сировини к. посівного та видів ірисів. Імплементація підходу може бути використана при плануванні дослідження різних рослин.

Для забезпечення якості, безпеки та ефективності кінцевого ЛРЗ, проведено визначення критичних атрибутів якості стабільності рослинних екстрактів віднесено: контроль якості первинної сировини, допоміжних матеріалів і процесу екстракції.

Використання підходу Herb MaRS для обґрунтування вибору Q-маркерів для сировини та екстрактів, на прикладі крокусу посівного та ірису угорського є корисним інструментом при плануванні фармакологічних досліджень.

Рекомендації щодо практичного дотримання GACP при вирощуванні крокусу посівного введено у промислове виробництво в Україні: Фармацевтична фабрика Vishpha (Житомир, Україна, акт впровадження від

11.08.2023); ТОВ «АГРО-ФОКУС» (Херсонська обл.; акт впровадження від 15.01.2021); ФГ «Шафран Любимівський» (Херсонська обл., акт впровадження від 28.11.2020); «Крокус.про» (Волинська обл., акт впровадження від 19.05.2023); «Агроленд» (Волинська обл., акт впровадження від 19.05.2023) та в Нідерландах («Mts Schipper & Elberse», акт впровадження від 18.01.2021), а для рослин роду Ірис – у роботу науково-дослідного відділу квітково-декоративних рослин НБС імені М.М. Гришка НАН України (акт впровадження №112/9-5 від 10.01.2022). Рекомендації можуть бути адаптовані під кожний регіон України, враховуючи кліматичні та біологічні особливості вирощування.

Використання сучасних стресових методів для попередньої обробки посівного рослинного матеріалу, таких як електромагнітне поле для к. посівного та мінеральне живлення ґрунту для рослин роду Ірис, дає можливість одержання сталого та якісного врожаю ЛРС та не мати небажаних токсичних та мутаційних ефектів на подальших стадіях розвитку.

Результати досліджень щодо оптимальних умов культивування к. посівного підтверджено інформаційним листом про нововведення у галузі охорони здоров'я (№ 376 – 2018), патентом України на корисну модель № 135685 та свідоцтвом про реєстрацію авторського права на твір № 88048: АПС/2816-19.

Результати досліджень впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез БАР рослин, культивування лікарських рослин та контролю якості сировини впроваджено у практичну роботу ДУ "Миколаївська ДСДС" ІКОСГ НААН (Миколаївська обл., Україна, акт впровадження від 02.05.2023).

Співпраця з українськими фермерством щодо культивування к. посівного та стандартизації шафрану відповідно до стандарту ISO 3632, з урахуванням рекомендацій дотримання GACP, дозволила покращити якість вихідної сировини. Визначено найкращі регіони для вирощування культури.

Розроблено проект національної монографії «Шафрану посівного приймочки ^{N}» ДФУ 2.4 (2020), що підтверджено актами впровадження про участь в розробці проекту монографії № 111806-5 від 02.12.2019, № 111807-5 від 02.12.2019, № 111809-5 від 02.12.2019, № 111808-5 від 02.12.2019.

Розроблено ВЕРХ-методики аналізу фенольних сполук, апокаротиноїдів; експрес-метод для аналізу колхіцину; ГХ-МС-метод аналізу амінокислот та органічних кислот; ВЕТШХ метод визначення фальсифікації шафрану;

Розроблені методики одержання стандартних зразків пікрокроцину, транс-4GG, транс-2G, транс-3Gg для впровадження у роботу аналітичних лабораторій для контролю якості шафрану.

У роботу фонду Гербарію (CWU) ХНУ ім. В.Н. Каразіна передано для користування гербарні матеріали сировини к. посівного (приймочки, листя, бульбоцибулини, оцвітина заготовки 2018 року) та рослин роду Ірис (14 видів з України) (акти про передачу від 08.05.2019).

Результати проведених досліджень впроваджено в науково-дослідну роботу споріднених закладів вищої освіти України та світу, що підтверджено актами впровадження: Миколаївського національного аграрного університету (від 20.06.2023); Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (від 24.05.2023); Національного медичного університету імені

О.О. Богомольця (від 24.05.2023); Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (від 20.06.2023); Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (від 31.05.2023); Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (від 28.05.2023); Chang Gung University, Тайвань (від 22.05.2023); Kaohsiung Medical University, Тайвань (від 22.05.2023); University of Vienna, Австрія (від 25.05.2023); два акти з UCL School of Pharmacy, Велика Британія (від 29.05.2023, від 22.05.2023); 3 акти з Lithuanian University of Health Sciences, Литва (від 29.05.2023); University of Life Sciences in Lublin, Польща (від 22.05.2023); Medical University of Lublin, Польща (від 31.05.2023); Kiel University, Німеччина (від 10.07.2023).

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок автора в одержанні наукових результатів є визначальним на всіх етапах дослідження і полягає у формуванні наукового напряму, цілей дослідження, виборі об'єктів дослідження, стратегії експерименту, а також аналізі, інтерпретації, узагальненні експериментальних даних, одержаних як особисто, так і у співавторстві з колегами.

Здобувачем особисто проведено аналіз сучасної наукової літератури, дослідження хімічного складу рослин відповідно до вимог та методик ДФУ, DAC, аналітичні дослідження зразків, встановлено параметри якості усіх зразків шафрану відповідно до ISO3632, аналіз впливу факторів навколишнього середовища, розроблено етапи належного культивування лікарських рослин, модифіковано методику виділення речовин, інтерпретовано спектральні характеристики ідентифікованих та виділених речовин, розробка стандартних операційних процедур щодо одержання стандартів кроцинів та пікрокроцину, проведено аналіз ризиків якості рослинних екстрактів, обґрунтовано вибір маркерів-якості сировини, проведено стандартизацію, удосконалено технологію одержання екстрактів, аналіз та узагальнення експериментальних даних, обґрунтовано структуру монографії на приймочки крокусу, проведено аналіз фармакологічних, хімічних, екологічних даних, одержаних як самостійно, так і у співпраці зі співавторами публікацій. Автор висловлює вдячність за консультативну допомогу у проведенні фітохімічних та аналітичних досліджень: проф., д.біомед.н. Іванаускас Л. (Литва), у тому числі під час проходження стажування «Chromatographic analysis for chemical substances and plant raw material», 2018, 2019, 2020, 2021), проф., д.фарм.н. Ковальову В.М. (Україна), к.фарм.н. Шинкаренко П.Є. (Україна), доц., к.хім.н. Нікішину А.А. (Україна), проф., д.фарм.н. Лесик Р.Б. (Україна); стандартизації доц., к.фарм.н. Сіра Л.М. (Україна), с.н.с., д.фарм.н. Котову А.Г., с.н.с., к.фарм.н. Котовій Е.Е. (Україна); проведення фармакологічних досліджень: проф. д.біомед.н. Хванг Т.-Л. (Тайвань), доц., д.біомед.н. Корінек М. (Тайвань), проф., д.біомед.н. Чанг Ф.-Р. (Тайвань), проф., д.біомед.н. Хорнг Ж.-Т. (Тайвань), проф., д.фарм.н. Ел-Шазлі М. (Египет), проф., д.біомед.н. Петрікаїте В. (Литва), доц., к.фарм.н. Литкіну Д.В. (Україна), с.н.с., к.б.н. Осолодченко Т.П. (Україна); проведення біологічних досліджень: с.н.с., д.біомед.н. Гудзінскас З. (Литва), проф.,

д.біомед.н. Мілдазієне В. (Литва), с.н.с., к.б.н. Орлова Т.Г. (Україна), с.н.с., к.б.н. Буйдін Ю.В., с.н.с., к.б.н. Четверня С.О. (Україна). Агрохімічні дослідження проведені під контролем ґрунтознавця Десенко В.Г. (Україна).

Співавторами наукових праць є науковий консультант та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Особистий внесок дисертанта зазначено у списку публікацій за темою дисертаційної роботи.

Під керівництвом автора, було захищено дисертацію Кречун А.В. на здобуття ступеня доктора філософії на тему: «Вивчення біологічно активних сполук півників угорських та розробка субстанцій на їх основі» (226 Фармація) (затверджено Вченою радою НФаУ від 30.10.2019 р., протокол № 9, наукові керівники – Михайленко О.О., Ковальов В.М.), яка є співавтором ряду робіт. Разом з Анастасією Кречун під час виконання її дисертаційного дослідження були проведені деякі дослідження ірису угорського та його сортів. Було проведено визначення загального вмісту БАР у сировині ірисів, досліджено параметри стандартизації сировини та екстрактів, було виділено 18 фенольних сполук, визначені терміни заготівлі сировини для ірису угорського, розроблено технологічні параметри одержання екстрактів з ірисів, та проведені деякі фармакологічні дослідження *in vivo*. Проте, залишились відкритими питання впливу факторів навколишнього середовища на накопичення фенольних сполук та питання досягнення стабільного вмісту БАР у сировині рослин роду Ірис за рахунок належного культивування, порівняльна оцінка вмісту фенольних сполук ірису угорського з іншим видами ірисів. Хроматографічний аналіз показав наявність більше фенольних сполук у кореневищах ірису, ніж було виділено, що потребувало більш ефективної методики визначення та виділення речовин. Крім того, не було проведено дослідження фармакологічного скринінгу екстрактів *in vitro*, щоб обрати екстракти-лідери для більш глибоких досліджень. Невизначеними залишились механізми фармакологічної дії екстракту ірису угорського, що потребувало досліджень *in vitro*. Результати досліджень ірису угорського, що виносились на захист в дисертаційній роботі Кречун А.В., в дисертації Михайленко О.О. використовуються тільки для порівняльного аналізу з одержаними, особисто дисертантом, даними досліджень 37 інших видів та 34 сортів ірисів, мають належні посилання і на захист не виносяться.

У кандидатській дисертації Михайленко О.О. «Фармакогностичне дослідження Iris pseudacorus L.» (захист: 8.06.2011 р. Спеціалізована вчена ради Д 64.605.01 Національного фармацевтичного університету, м. Харків) проведене комплексне фармакогностичне дослідження листя та кореневища *Iris pseudacorus*. Результати дослідження, обговорення чи висновки, що виносились при захисті кандидатської дисертації, на захист представленої дисертаційної роботи не виносяться.

Усі наукові узагальнення, результати, висновки та рекомендації, наведені в дисертації, опрацьовано та виконано автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень представлені у вигляді доповідей та постерів на наукових заходах:

- 71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Dublin, Ireland, 2023; Synthesis and Analysis of Drugs (Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Brno, Czech Republic, 2022); Natural Products in Drug Discovery and Development–Advances and Perspectives, організовано Phytochemical Society of Europe (University of Medicine and Pharmacy "Grigore T. Popa", Iasi, Romania, 2022); "Sciences and Practice» та «Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations" (Lithuanial University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, 2015, 2017-2023 pp.); 34th, 35th, 36th, 37th Symposium on the Natural Products, організовано the Society of Chinese Natural Medicine, Taiwan (Medical University of Graduate Institute of Pharmacognosy, Тайбей, Тайвань, 2019–2023); Proceedings of the MOL2NET'22, 8th Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering (Basel, Switzerland, 2022); 4th and 5th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, організовано Phytochemical Society of Europe and the Phytochemical Society of Asia (Xi'an, China, 2020, 2021); 20th Biennial Meeting of SFRR International, організовано Society for Free Radical Research International (Spain, 2021); Vanguards of Natural Product Research, організовано American Society of Pharmacognosy (USA, 2021); "EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session" (Бельгія, 2020); "Achievements of Pharmaceutical Science and Practice", Kaunas, Lithuania, 2020;
- також викладено та обговорено на науково-практичних конференціях України: XXVIII Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (Харків, 2021); IV Всеукраїнській наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2022); VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю "Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів" (Тернопіль, 2020); Міжнародна науково-практична конференція «PLANTA+. наука, практика та освіта» (Київ, 2021, 2022); XXII Міжнародної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 2021); Міжнар. наук.-практ. Симпозіум, присвячений 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету «100 років успіху та якості» (Харків, 2021) та ще на 15 конференціях різного рівня.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 78 наукових робіт (8 одноосібні), серед них 36 статей та 1 патент на винахід, з них 5 статей – у наукових фахових виданнях України, 32 – у наукових виданнях інших держав за профілем дисертаційної роботи, у тому числі у журналах, що індексуються БД Scopus та Web of Science – 29 (Q1 – 10, Q2 – 7, Q3 – 10, Q4 – 2 статей). До додаткових публікацій віднесено 2 оглядових статті (в т.ч. 1 в журналі Phytochemistry – Q1, 1 – у фаховому виданні України), 1 стаття у фаховому виданні суміжних знань (рослинництво), 3 патенти України на корисну модель, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я, 1 авторське свідоцтво на науковий твір, 1 методична рекомендація щодо оптимізації вирощування та збору крокусу посівного, 31 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу дизайн та методологія дослідження, чотирьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту становить 332 сторінок. Робота проілюстрована 70 таблицями, 120 рисунками, 1 схемою.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Розповсюдженість, хімічний склад, фармакологічна активність та біосинтез вторинних метаболітів рослин родів Крокус та Ірис. Вплив факторів навколишнього середовища на біологічні метаболіти рослин (огляд літератури). Систематизовано дані щодо розповсюдження, хімічного складу та фармакологічної активності сировини рослин роду Крокус та Ірис; викладено сучасні гіпотези шляхів біосинтезу основних БАР шафрану (кроцин, пікрокроцин, шафраналь) та фенольних сполук для рослин роду Ірис; висвітлено вплив факторів навколишнього середовища (географічні, кліматичні, едафічні) на біосинтез БАР. Проведено аналіз законодавчої бази країн ЄС та України щодо виробництва лікарських рослинних засобів (ЛРЗ) та запровадження принципів Належної практики культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження (GACP) у виробничу практику, що стало підґрунтям для напряму дослідження.

Розділ 2. Дизайн та методологія експерименту. Для ефективного планування етапів дослідження було використано підхід «Якість шляхом розробки» (*QbD*) для забезпечення якості та ефективності експерименту, який включав: контроль якості рослинних екстрактів з урахуванням аналізу та управління ризиками, відбір та ідентифікацію Q-маркерів з використанням Системи ранжування хімічних маркерів рослин (*Herbal Chemical Marker Ranking System*, HerbMars), технологічні методи, хроматографічні, біологічні аналізи. Потенційно критичні точки виробництва рослинних екстрактів були визначені за допомогою діаграми *Ishikawa* (якісна) (Рис. 1) та *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA, кількісна) та включали: вирощування та переробку рослинної сировини, процес екстракції, вибір розчинників.

Рис. 1. Оцінка ризиків при отриманні рослинних екстрактів за методом Ісікави.

Для кількісної оцінки конкретних ризиків при виробництві рослинних екстрактів використовувався FMEA, шляхом оцінки діапазону критичних

параметрів процесу (CPPs), визначеного на діаграмі Ісікави, до потенційного впливу, який може призвести до ризику, що вплине на показники якості, та ймовірності ризику під час вилучення рослинних матеріали з розчинниками. Результати розрахунку остаточного пріоритету ризику (ОПР) дозволили віднести можливі невідповідності технологічного процесу на етапі видобутку як неприйнятні ризики. Значний вплив мають ризики, що виникають на стадії підготовки сировини, очищення та екстракції екстрактів. У процесі управління ризиками було оцінено рівень ризику, запропоновано методи контролю та попередження ризиків.

Метод Herb MaRS враховує біодоступність речовини-маркера, наявність шуканої фармакологічну активність відповідно до даних літератури, наявність обраного стандарту та концентрація маркеру у сировині, відповідно до власних експериментальних даних. На рис. 2 наведено критерії для вибору Q-маркерів на прикладі шафрану.

Рис. 2. Підхід Herb MaRS для обґрунтування вибору Q-маркерів для рослин та потенційні Q-маркери на прикладі шафрану.

Для фармакогностичного скринінгу було використано 10 видів та сортів крокусів, з яких к. посівний – обрано основним об’єктом. Дослідження включено 35 зразків приймочок к. посівного (далі – шафран), що заготовлені у 12 регіонах України за 7 років (з 2015 до 2021). А також 22 зарубіжні зразки шафрану з 12 країн світу (Марокко, Індія, Італія, Іспанія, Німеччина, Швейцарія, Іран, Литва, Австралія, Азербайджан, Афганістан, США). Крім того, досліджено побічні продукти виробництва шафрану – листя, оцвітина, бульбоцибулини з різних регіонів України, а також з Марокко, Азербайджану та Нідерландів. Дослідження рослин роду Ірис включало кореневища та листя 38 видів та 34 сортів ірисів з колекцій БС та дикої природи України, Литви, Латвії, Азербайджану. Одержано 30 оригінальних субстанцій для фармакологічних досліджень; виділено 16 індивідуальних речовин з оцвітини к. посівного; 4 – з шафрану; 30 – з кореневищ і. угорського. У *in silico* та *in vitro* аналіз включено 24 сполуки.

Розділ 3. Хімічний склад та вплив екологічних факторів на композиційний склад шафрану. Обговорення фармакологічної активності екстрактів шафрану. Першим етапом дослідження була порівняльна оцінка якості шафрану з різних країн світу за допомогою УФ/Вид спектроскопії відповідно до стандарту ISO 3632 для порівняння з

українськими зразками. За результатами встановлено, що зразки України мають показники на рівні зразків з Іспанії, Італії, Марокко та відповідають 1 категорії якості відповідно до вмісту кроцинів, пікрокроцину та шафраналю. Українські зразки мали значно вищій вміст кроцинів у порівнянні з Австралією, Афганістаном, Марокко, Швейцарією. На рис. За наведено результати розподілу маркерних сполук у іноземних зразках шафрану у порівнянні з українськими зразками (Рис. 3б). Метод ISO3632 визначає основні показники якості шафрану, які впливають на колір, смак, аромат, а саме вміст кроцинів, шафраналю та пікрокроцину відповідно.

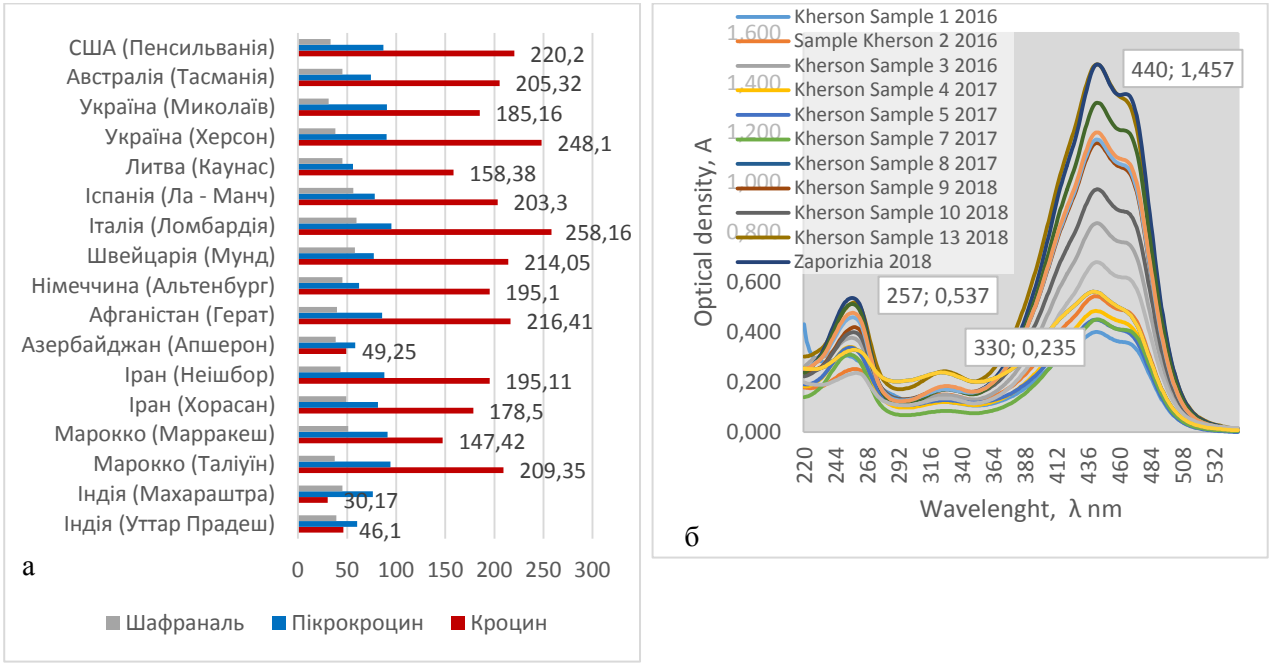


Рис. 3. Результати кількісного вмісту речовин маркерів у шафрані, що визначені методом УФ-Вид. ISO 3632 (а); типові УФ-видимі спектри водних екстрактів зразків українського шафрану (б).

Враховуючи, що шафран широко використовують з лікувальною метою, визначення харчової промисловості повністю не задовольняють вимоги, що висуваються до контролю якості ЛРЗ. Нами було розроблено методику ВЕРХ для точного визначення всього профілю апокаротиноїдів шафрану. Використаний метод було перевірено за вибраними параметрами відповідно до Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) Q2 (R1): специфічність, лінійність, межа виявлення (LoD; S/N =3), межа кількісної оцінки (LoQ; S/N=10), правильність, точність. Усі калібрувальні криві показали прийнятну лінійну регресію ($r2 \geq 0{,}9995$). Розроблений метод показав гарну точність із загальним відновленням у діапазоні від 99 % до 101 % (RSD≤2.0%) для речовин. Межі виявлення речовин становили від 3,82 до 120 нг/мл; межі кількісного визначення – від 10 до 360 нг/мл; значення повторюваності – в діапазоні 98,20–101,53 %; проміжна точність – 98,02–102,45 %. За лінійністю, селективністю, чутливістю та точністю метод був достатнім для оцінки хімічного складу метаболітів шафрану (Рис. 4). Було встановлено якісний та кількісний вміст апокаротиноїдів (кроцин *t*-4GG; кроцин *t*-2G; кроцин *c*-4GG; кроцин *c*-3Gg), пікрокроцину, шафраналю та фенольних сполук (хлорогенова

кислота, кавова кислота, *n*-кумарова кислота, ферулова кислота, рутин, апігенін-7-глюкозид, лютеолін, апігенін, 6,7-дигідроксиізофлавон, кемпферол, 7-гідроксиізофлавон, формононетин, біоханін А) в українських зразках шафрану у порівнянні з 15 сертифікованими іноземними зразками. У всіх зразках був виявлений рутин (0,83 – 8,74 мг/г). Найбільша кількість кроцинів (в середньому 382,45 мг/г) знайдено в зразках шафрану з Італії та України. Встановлено, що загальний вміст кроцину в зразках Запорізького та Чернігівського українського шафрану був вищим порівняно з іншими зразками України і становив 205,04 та 225,99 мг/г відповідно. За даними кількісного вмісту кроцин *t*-4GG методом ВЕРХ українські зразки більш подібні до зразка зі Швейцарії (446 мг/г). Їх вміст і склад сильно варіювали в залежності від району вирощування шафрану. Обґрунтовано доцільність використання методу подрібнення шафрану у рідкому азоті, що збільшує вихід кроцинів у 3,5 рази порівняно зі звичайним подрібненням.

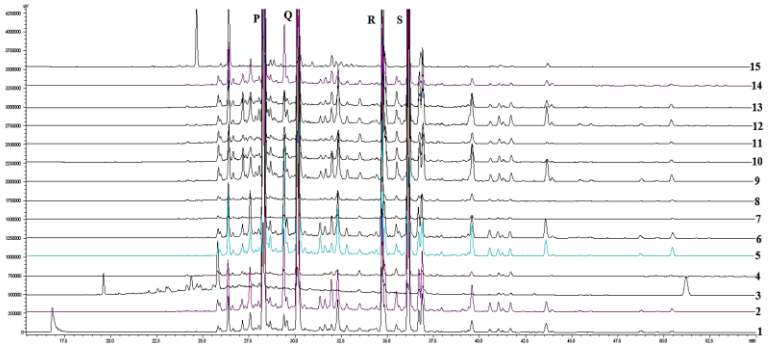


Рис. 4. Апокаротиноїдний профіль шафрану, λ = 440 нм. Виявлені сполуки: кроцин t-4GG (P) 28,38 хв; кроцин t-2G (Q) 30,14 хв; кроцин c-4GG (R) 34,72 хв; кроцин c-3Gg (S) 36,13 хв.

Вперше представлено ефективний ГХ-МС метод визначення органічних (молочної, гліколевої та яблучної) кислот та амінокислот у шафрані й інших видах ЛРС на хроматографі Shimadzu GC-MS-QP2010 з капілярною колонкою Rxi-5ms (30 m ×0.25 mm, 0.25 μm) з дериватизаційним реагентом MTBSTFA. Межі виявлення (LoDs) та межі кількісного визначення (LoQs) для органічних кислот коливались від 0,317 до 0,410 мкг/мл та від 0,085 до 1,53 мкг/мл відповідно. Результати показали, що найвищий вихід органічних кислот був отриманий з 0,1 мл MTBSTFA та методом дериватизації за допомогою звичайного процесу нагрівання при 130°C протягом 90 хв. Межа LoD і LoQ усіх стандартів амінокислот змінювалися в діапазоні 0,14–0,72 нг/мл і 0,2–2,4 нг/мл відповідно. Точність часу утримування та площ піків суміші стандартів амінокислот для повторної ін’єкції була в діапазоні 0,70–1,92 % від RSD (n=6).

ГХ-МС методом одночасного визначення амінокислот, карбонових кислот та шафраналю у шафрані, було ідентифіковано до 42 речовини, при цьому встановлено, що маркер-якості шафраналь (50,87–77,59 %), *α*-ліноленова кислота (1,43–2,10 %), ліноелаїдинова кислота (4,87–7,36%), *трис*-фосфорна кислота (4,67–10,41 %) та L-тирозин (0,39–1,49 %) є домінуючими сполуками у зразках.

Проаналізовано вплив екологічних факторів (висота над рівнем моря, широта, довгота, річна кількість опадів, мм); тривалість сонячного сяйва, год/рік; середньорічна температура, °C; сонячний УФ-індекс; тип ґрунту (вміст гумусу, pH, вміст P_2O_5, K_2O, N, тип клімату) на вміст основних метаболітів у

зразках шафрану з України та світу. Аналіз шафрану з різних країн та екологічних факторів показав (рис. 5), що найбільший вплив та кореляцію з усіма кроцинами, рутином, феруловою кислотою та хлорогеновою кислотою мали такі параметри, як тривалість сонячного сяйва, сонячний УФ-індекс, тип ґрунту та тип клімату. Додатково для українських зразків встановлено, що концентрація кроцину та пікрокроцину вища для шафрану з північно-східних (Запорізька та Чернігівська, вміст кроцину 205 мг/г та 226 мг/г відповідно) регіонів України та зменшується ближче до південно-західних районів вирощування (Вінницька обл., 136 мг/г), що обумовлено кліматичними особливостями регіонів.

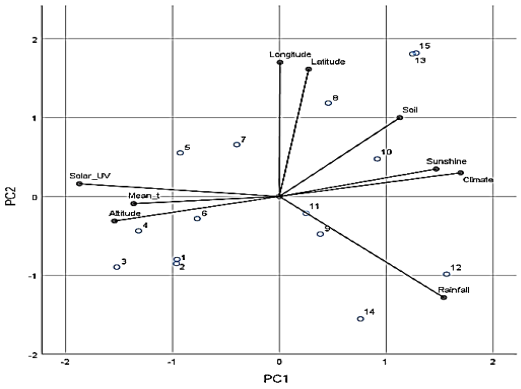


Рис. 5. Групування метеорологічних умов (річна кількість опадів, мм; тривалість сонячного сяйва, годин; середньорічна температура, °C) та вміст апокаротиноїдів та рутину в зразках шафрану

Вперше запропоновано модифіковану методику ВЕТШХ (ЄФ 9.0) для кількісного визначення шафраналю, кроцину, пікрокроцину на прикладі 11 зразків шафрану для подальшої стандартизації сировини. Методика показала гарне розділення компонентів (Рис. 6), а саме: зона стандарту кроцину (R_{St}) мала характерну жовту флуоресценцію при R_f 0,48; жовті зони похідних кроцетину (R_f 0,139–0,152) зразків $S_1 – S_9$ у видимому світлі характерні для всіх зразків, і всі мали пригнічення флуоресценції при УФ-254 нм. Забарвлена в жовтий колір зона (R_f 0,413–0,430), що присутня в зразках, стає темно-фіолетово-блакитною після дериватизації анісовим альдегідом, що підтверджує наявність пікрокроцину у зразках. Бліді зони шафраналю з'являються (R_f 0,661–0,683) після дериватизації і нагріван при 100–105 °C протягом 5 хв. На основі результатів, отриманих для зразків з України ($S_1 – S_6$), Іспанії (S_7), Марроко (S_8) та Ірану (S_9) встановлено схожий хімічний склад, гарну розділювальну здатність, але різну інтенсивність зон, що свідчить про різний кількісний вміст компонентів. Визначення кількісного вмісту показало, що вміст кроцинів становив від 17,80 % до 33,25 %.

Визначення фальсифікації ЛРС є одним з критичних факторів виробничого процесу, особливо для шафрану, як найдорожчої пряності у світі. Для аналізу фальсифікації, вперше було імплементовано методику якісного контролю шафрану у метод ВЕТШХ, що дозволило визначити не лише кроцин, а й наявність шафраналю та пікрокроцину у зразках шафрану. Комбінація двох методів ВЕТШХ та ВЕРХ показала відсутність маркерних сполук шафрану у досліджуваних фальсифікатів (куркума, сафлор, календула, чорнобривці,

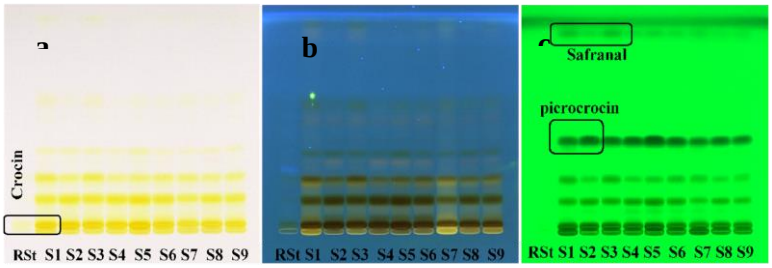


Рис. 6. ВЕТШХ-хроматограми зразків шафрану: при денному світлі (а); при 366 нм (б); при 254 нм після дериватизації анісовим альдегідом (с)

жовті тичинки тюльпану). Кроцин, який є маркером якості шафрану, а також пікрокроцин у досліджуваних фальсифікатах не виявлено (Рис. 7). Дані ВЕТШХ корелювали з даними аналізу ВЕРХ, де характерні піки кроцину (R_t 28,37 хв, UV λ_{max} 261, 440, 466 нм) були відсутні в екстрактах фальсифікатів.

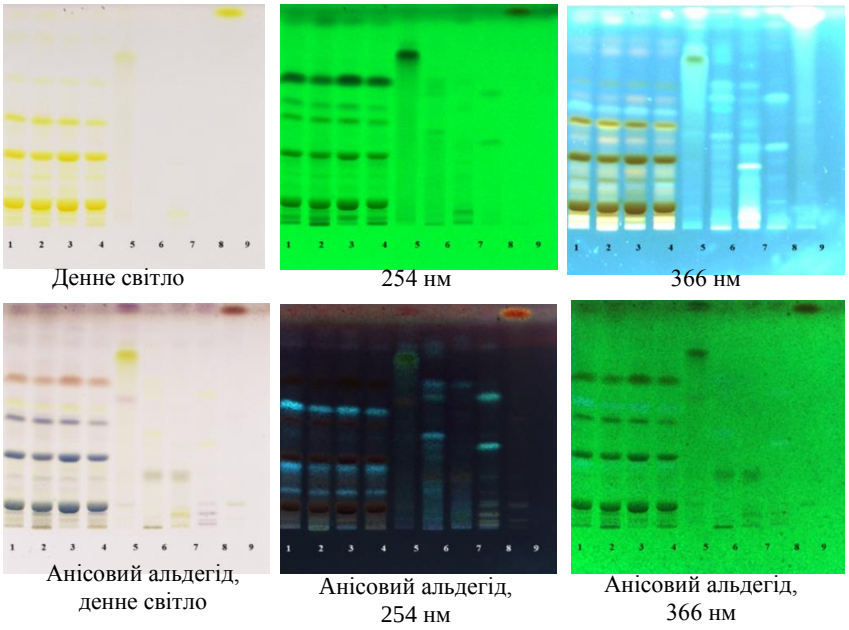


Рис. 7. ВЕТШХ аналіз шафрану та його фальсифікатів: 1 – шафран з Херсону; 2 – шафран з Одеси; 3 – шафран з Миколаєва; 4 – шафран з Марокко; 5 – чорнобривці; 6 – тюльпан; 7 – сафлор; 8 – нагідки; 9 – куркума.
Умови визначення:
А: денне світло. В: УФ-світло, 254 нм С: пластину обприскують розчином анісового альдегіду Р, нагрівають до 100-105°С протягом 5-10 хв і визначають при денному світлі. Рухома фаза: вода, 2-пропанол, етилацетат (10:25:65).

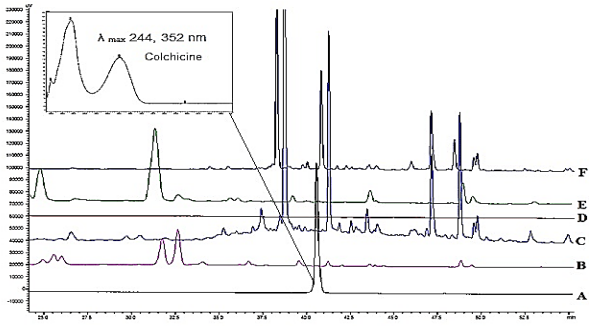


Рис. 8. ВЕРХ хроматограми, записані при 330 нм: А – колхіцин (53,4 мкг/мл; λ_{max} 244, 352 нм); Б – квіти крокусу, Миколаїв, В – шафран, Херсон, D – бульбоцибулини крокусу, Херсон, Е – квітки крокусу, Херсон, F – шафран, Миколаїв.

Іншою проблемою є те, що отруйний пізньоцвіт осінній (*Colchicum autumnale*) часто плутають з к. посівним, тому що рослини мають ряд схожих ознак: термін цвітіння, зовнішня схожість, забарвлення. Описано випадки споживання у їжу пізньоцвіту, який приймали за к. посівний, в результаті чого відбувалося швидке смертельне отруєння. Наразі не існує описаних надійних методик, які б використовували як для позитивної, так і негативної оцінки наявності колхіцину в ЛРС. Тому нами було вперше запропоновано експрес-методику ВЕРХ для підтвердження відсутності колхіцину у сировині к. посівного. Методику було також апробовано на сировині пізньоцвіту (Рис. 8), щоб підтвердити придатність і надійність для якісної оцінки колхіцину. Алкалоїд був відсутній в усіх зразках к. посівного, що свідчить про не токсичність шафрану та його побічних продуктах.

Використання підходу Herb MaRS дало можливість обґрунтувати вибір маркерів якості для сировини та екстрактів шафрану. Враховуючи високий вміст кроцину, пікрокроцину, шафраналю, рутину та апігеніну, дані речовини можуть бути запропоновані як речовини для контролю якості шафрану. З урахуванням того, що не всі похідні кроцину є на ринку для стандартизації, та є деякі складнощі з придбанням пікрокроцину, наступним етапом дослідження була розробка методу одержання цих речовин контролю якості шафрану.

Вперше запропоновано нову стандартну операційну процедуру (СОП) одержання робочих стандартів пікрокроцину та кроцинів (транс-4GG, транс-2G, транс-3Gg) з шафрану методом препаративної хроматографії (Рис. 9). Одержаний метанольний екстракт шафрану ліофілізували при зниженій температурі і під зниженим тиском протягом 24 год., а потім використовували для препаративного виділення за допомогою ВЕРХ колонки Symmetry Prep C18 (300 × 19 мм × 7 мкм). Приблизний вихід кожної сполуки становив 2 мг, чистота речовин була більше 95%. Для підтвердження структури використовували спектроскопічні методи (ВЕРХ-ДМД, УЕРХ-МС/МС), які показали гарне розділення компонентів (Рис. 9). Запропонований спосіб є простим і відтворюваним для рутинного аналізу контролю якості шафрану.

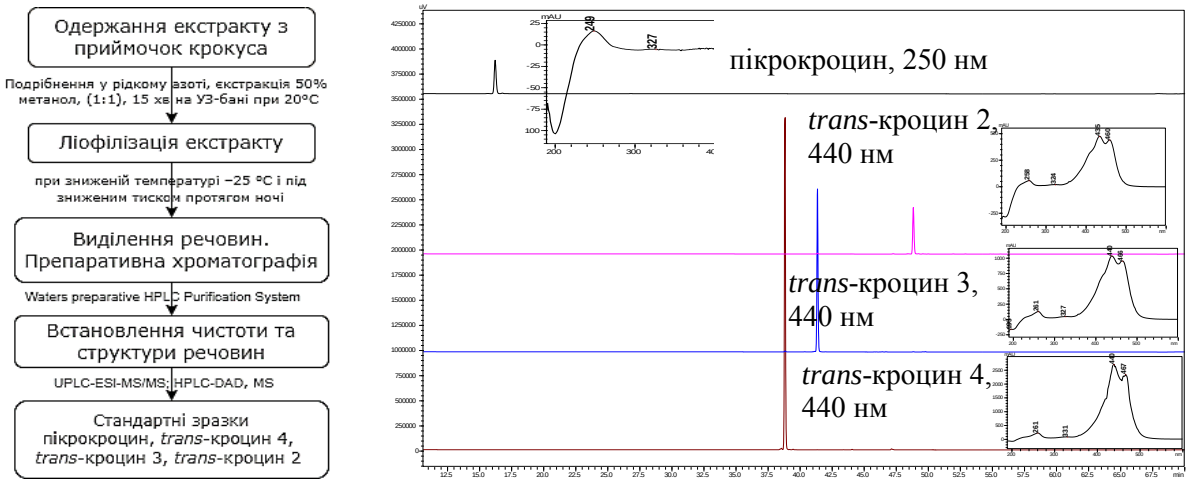


Рис. 9. Дизайн експерименту та ВЕРХ-DAD хроматограми чистих виділених сполук шафрану.

Для наступної розробки монографії на приймочки к. посівного, було проведено порівняльний аналіз монографії «*Saffron for homoeopatic preparations*» з Європейської Фармакопеї (ЄФ) 9.0, «*Safran. Croci stigma*» з Deutscher arzneimittel codex (DAC) та ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)», які регламентують використовувати шафран як гомеопатичний лікарський засіб, як ЛРС чи як харчовий засіб. В результаті, було проведено визначення основних критеріїв стандартизації шафрану: опис зовнішнього вигляду цілих приймочок, ідентифікація (макроскопія, мікроскопія, ТШХ), сторонні домішки, втрата в масі при висушуванні та масова частка летких сполук (105°С, 16 год), зола загальна та кількісне визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю при 257 нм, 330 нм та 440 нм відповідно, за допомогою методу УФ-Вид-спектроскопії. Запропоновано ввести наступні показники за визначенням питомого показника поглинання: для кроцину ($C_{44}H_{64}O_{24}$; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафраналю ($C_{10}H_{14}O$; М.м. 150,22) – не менше 30, для пікрокроцину ($C_{16}H_{26}O_7$; М.м. 330,37) – не менше 60, у перерахунку на суху сировину. За результатами дослідження розроблено монографію «*Шафрану посівного приймочки* ^{N}» (ДФУ 2020).

Наступним етапом дослідження було одержання сухих екстрактів з шафрану для фармакологічних досліджень. До оптимальних технологічних параметрів віднесено: подрібнення сировини у рідкому азоті, використання

води очищеної та етанолу (70 % об/об) у якості розчинників; спосіб екстракції – мацерація впродовж 24 год у темному місці; співвідношення між сировиною і екстрагентом – 1:10; трикратна екстракція. Для одержаних екстрактів було визначено склад біоактивних компонентів та параметри їх стандартизації.

Методом ВЕРХ у водному та етанольному екстрактах шафрану було ідентифіковано кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин, апігенін, кавову та ферулову кислоти. Кроцин (38 мг/г у водному та 163 мг/г у етанольному екстракті), пікрокроцин (62 мг/г – водному та 197 мг/г у етанольному екстракті), шафраналь (146,6 мг/г у етанольному та 81,0 мг/г у водному екстракті), рутин та апігенін були домінуючими компонентами. Рутин, ферулова кислота та апігенін було виявлено у шафрані вперше. Методом ГХ-МС було також встановлено профіль амінокислот у водному екстракті шафрану. Найбільший вміст мав тирозин (326,6 мг/г), також ідентифіковано метіонін, серин та аланін.

Фармакологічний скринінг екстрактів *in vitro* включав оцінку антиоксидантної та експресію NRF2, протигрипозної (H1N1), протиентеровірусної (D68), протикоронавірусної (229E), протизапальної, протиалергійної, крапельно-ліпідної, цитотоксичної (SK-N-BE(2), U-87, MDA-MB-231, IGR39) та антибактеріальної активності. Встановлено, що водний та етанольний екстракти шафрану мають найбільш виражену цитотоксичну дію по відношенню до клітинних ліній раку мозку (Рис 10).

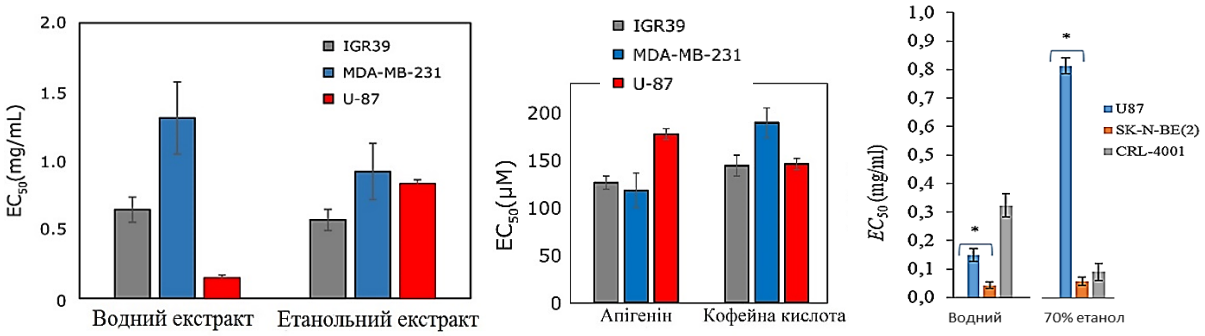


Рис. 10. Цитотоксична активність водного та етанольного екстрактів шафрану та їх активних сполук проти різних ліній ракових клітин.

Водний екстракт був майже в 7,7 разів більш активним до нейробластоми SK-N-BE(2) (EC_{50} 0,04 ± 0,01 мг/мл) та у 5,6 разів більш активним щодо лінії клітин гліобластоми U-87 (EC_{50} 0,15 ± 0,02 мг/мл), ніж фібропласти та етанольний екстракт. Аналіз цитотоксичної дії індивідуальних речовин шафрану, показав, що найбільший вклад мають апігенін та кофейна кислота по відношенню до U-87 клітин. Екстракти також були активні по відношенню до клітин меланоми людини (IGR39) та потрійно негативного раку молочної залози (MDA-MB-231), але поступались дії до нейробластоми та гліобластоми.

Етанольний екстракт шафрану мав виражену антибактеріальну дію та був більш активним проти *Ps. aeruginosa* (19,5 ± 1,5 мм), *Pr. vulgaris* (20,0 ± 1,2 мм), *S. aureus* (20,5 ± 1,3 мм), при цьому МПК становило до

S. aureus та *B. subtilis* – 62,5 мкг/мл, до усіх інших штамів мікроорганізмів МПК – 125 мкг/мл. Інші протестовані активності не були сильно виражені. Введення тваринам водного екстракту шафрану (у дозі 25 мг/кг) також показало виразну протизапальну активність на рівні препарату порівняння Альтан (5 мг/кг) (73,24 %) на моделі карегенінового набряку у щурів. Усі дослідні екстракти віднесено до VI класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К.К. Сидорова. Проведені фармакологічні дослідження підтвердили вибір маркерів якості для шафрану (кроцин, шафраналь, пікрокроцин, рутин, апігенін) відповідно до їх протиракового потенціалу та параметрів підходу HerbMars і будуть враховані для подальшої стандартизації вирощування к. посівного.

Розділ 4. Побічні продукти виробництва шафрану: хімічний склад та фармакологічна активність. Враховуючи важливості комплексної переробки сировини, були проведені дослідження для листя, оцвітини та бульбоцибулин (БЦ) к. посівного. Порівняльний скринінг БАР видів та сортів крокусів (*C. speciosus, C. kotschyanus, C. ochroleucus, C. zonatus, C. sativus, C. aureus, C. vernus, C. veluchensis, C. heuffelianus, C. vernus* "Flower record", *C. vernus* "Jeanna Dark", *C. adamii, C. vernus* "Grand moidre", *C. chrysianthus* "Gipsy girl") з України показав перспективність дослідження листя к. посівного та к. га́рного (*C. speciosus*), але з урахуванням сировинної бази, подальші дослідження були зосереджені на сировині к. посівного. У дослідження було включено зразки листя к. посівного з Херсона, Запоріжжя, Чернігова, Одеси, Вінниці, у яких методом ВЕРХ було виявлено 11 фенольних сполук, при цьому мангіферин (0,90–1,26 мг/г), ізоорієнтин (3,55–6,45 мг/г) та робінин (0,35–5,22 мг/г) є домінуючими. Зразки оцвітини к. посівного було заготовлено у Херсоні, Миколаєві, Запоріжжі, Волині. Методом ВЕРХ ідентифіковано до 20 фенольних сполук. Найбільший вміст компонентів мав зразок з Херсону: рутин (16,05 мг/г), апігенін 7-глюкозид (4,57 мг/г), ізоорієнтин (7,39 мг/г), кемферол-3-О-*β*-софорозид (2,33 мг/г), ізокверцитрин (2,70 мг/г), текторидин (2,23 мг/г). Мангіферин, ізокверцитрин, рутин, ферулова кислота, а також ізофлавони (текторидин, нігрицин, іристекторигенін В) вперше виявлені в оцвітині к. посівного з України. Додатково для зразка оцвітини з Херсону було ідентифіковано апокаротиноїди: транс-кроцин 4 (2,66 мг/г), транс-кроцин 2, цис-кроцин 4, цис-кроцин 3, які також присутні у шафрані.

Для листя та оцвітини к. посівного з Херсонської обл. додатково визначили профіль амінокислот, карбонових кислот, макро- та мікроелементів. Домінуючими амінокислотами листя були: ізолейцин (107,31 мкг/г); пролін (177,68 мкг/г), валін (138,12 мкг/г) та лейцин (99,61 мкг/г); для оцвітини: L-пролін (14,48 мкг/г), L-піроглутамінова кислота (30,46 мкг/г), L-аланін (16,18 мкг/г) та L-валін (9,81 мкг/г). Серед вищих карбонових кислот у листі та оцвітині к. посівного домінантними були: *α*-ліноленова, лінолева та пальмітинова кислоти, серед органічних – лимонна та яблучна кислоти. Серед 24 визначених макро- та мікроелементів, домінантними були: калій (більше 10 000 мг/л), кальцій (6745– 1234 мг/л), магній (3377–2318 мг/л). Важкі метали

(Co, Cd, As, Hg) мали вміст менше 0,0001 мк/г, що відповідає вимогам ДФУ до їх вмісту у ЛРС. Для оцвітини к. посівного також визначено 34 летючий компонент. Домінантними були 1,3-циклогексадієн-1-карбоксальдегід (4,35 %), пальмітальдегід (7,58 %).

Уперше з аутоферментованої сировини оцвітини к. посівного з Херсонської обл. було проведено екстракцію фенольних сполук методом мацерації 70% етанолом с наступним фракціонування компонентів. Контроль речовин проводили методами ТШХ та ВЕРХ. В результаті з хлороформної та етил-ацетатної фракції оцвітини методом колонкової хроматографії було вперше виділено 16 фенольних сполук, серед них софорофлавонолозид, космосіїн, текторидин, нігрицин, іристекторигенін В, мангіферин, рутин, ферулова кислоти виділено вперше; крім того виділено раніше описані для к. посівного: кверцетин, астрагалін, кемпферол, ізоорієнтин, ізорамнетин, ізокверцитрин, хлорогенову та неохлорогенову кислоти.

У порівняльний морфолого-анатомічний та хроматографічний аналіз були включені БЦ крокусів з України, а саме *C. veluchensis, C. vernus, C. aureus, C. sativus*, а також БЦ к. посівного з Азербайджану, Нідерландів та Марокко. Незважаючи на те, що профіль амінокислот, суми фенольних сполук були приблизно однакові у подальше дослідження включили БЦ к. посівного з Херсонської обл. (Україна) за рахунок наявної сировинної бази. Дослідження показало наявність 35 карбонових кислот та 13 амінокислот, серед них домінантими є: L-пролін (12,42 %), L-глутамінова кислота, L-аланін (8,43 %), L-валін (4,96 %), олеїнова кислота (5,89 %), пальмітинова кислота (6,87 %).

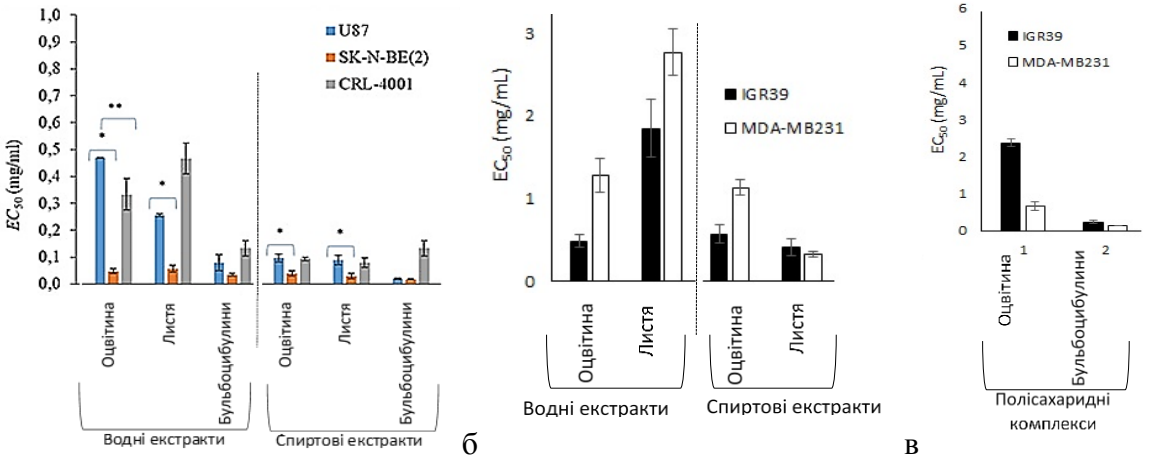
Наступний етап включав дослідження фармакологічної активності та хімічного профілю водних та етанольних екстрактів побічних продуктів виробництва шафрану. У екстрактах знайдено від 16 (для оцвітини) до 7 (для бульбоцибулин) речовин (фенольні сполуки, кроцин, пікрокроцин). Мангіферин було знайдено у всіх зразках, при цьому у екстрактах листя речовина домінує (1,82–2,03 мг/г), рутин, ізоорієнтин, астрагалін, апігенін-7-глюкозид також домінантні речовини у всіх екстрактах. Маркерну сполуку транс-кроцин 4 було ідентифіковано у обох екстрактах оцвітини, але у водному екстракті його вміст значно більше (3,79 мг/г), ніж у етанольному (0,2 мг/г).

Домінантними амінокислотами у водних екстрактах були: L-аланін (0,16–2,71 мг/г), L-піроглутамінова кислота (1,16–12,35 мг/г), L-треонін (0,06–1,65 мг/г), L-пролін (2,25–4,67 мг/г). Серед органічних кислот у сухих екстрактах гліколева кислота та яблучна кислоти домінували. Лимона кислота (0,35%) знайдена лише у водному екстракті БЦ к. посівного.

Методом ВЕРХ-ABTS в екстрактах листя, оцвітини та БЦ к. посівного було виявлено 12 сполук з антиоксидантними властивостями, а саме для екстрактів листя – мангіферин та рутин, для оцвітини – ізокверцитрин та рутин, для БЦ – геністин. Для етанольного екстракту оцвітини та водного екстракту листя к. посівного встановлено виражений ефект поглинання вільних радикалів (400,86 ммоль/г та 495,83 ммоль/г відповідно) та інгібуючу

активність нейрамінідази (у дозі 10 мкг/мл), помірний посилюючий ефект на активність NRF2 та антибактеріальну дію.

Дослідження цитотоксичної дії екстрактів показало, що найбільш активним був етанольний екстракт БЦ крокусу по відношенню до лінії клітин раку нейробластоми (SK-N-BE(2)) (EC_{50} 0,018 мг/мл) та гліобластоми U-87 (EC_{50} 0,02 мг/мл) (Рис. 11). Етанольний екстракт листя значно знижував життєздатність ракових клітин IGR39 і MDA-MB-231 (EC_{50} 0,41 і 0,33 мг/мл відповідно). Цитотоксична активність етанольного екстракту оцвітини була наступна: до нейробластоми > гліобластоми > меланоми, а водний екстракт був більш активним до клітин MDA-MB-231. Для вибору найбільш перспективних сполук для подальших досліджень на лініях ракових клітин, були проведені експерименти з молекулярного докінгу для оцінки аффінітету окремих компонентів екстрактів *in silico*. Серед фенольних речовин – хлорогенова кислота, ізоорієнтин, ферулова кислота, текторидин, кверцетин, корична кислота, геністеїн-7-глюкозид, апігенін, кемпферол та іригенін показали кращий афінітет порівняно з нативними лігандами білків раку молочної залози 4RJ3, 2IOK і 4XYFB. Додатка оцінка цих сполук *in vitro* показала, що найактивнішими є кемпферол і кверцетин. Проте, загальна дія екстрактів була більшою за рахунок синергічного ефекту компонентів.



а б в

* статистично значущі відмінності між ефектами сполук на лінії ракових клітин; ** статистично значущі відмінності між дією сполук на ракові клітини та фібробласти, p<0,05, n =3.

Рис. 11. Значення EC_{50} екстрактів к. посівного між різними клітинними лініями через 72 год.

Екстракти БЦ к. посівного мали найбільш виражену протиалергійну дію, майже на рівні з препаратом порівняння дексаметазон. Окрім того, етанольний екстракт БЦ (50 мкг/мл) проявив виражений захисний ефект проти вірусу грипу на рівні 30–40 %. Водні екстракти оцвітини та БЦ крокусу інгібували утворення супероксид-аніонів і вивільнення еластази в нейтрофілах людини, проявляючи протизапальну дію, що було підтверджено у дослідах на *in vivo*. Обидва екстракти з БЦ крокусу (200 мг/кг) проявили найбільші протизапальні властивості, у механізмі яких лежить інгібуючий вплив на синтез ЛТ (23 і 20 %), активність біогенних амінів – гістаміну та серотоніну (14 і 20 %) і незначний вплив на активність простагландинів (12 і 14 %). Крім того, полісахаридний комплекс з БЦ показав дуже високу активність щодо потрійного негативного раку молочної залози та клітин меланоми

(EC_{50} 0,2 мг/мл). На технологію одержання полісахаридного комплексу з БЦ к. посівного з вираженим цитотоксичним ефектом подано заявку на патент ЄС LT2021 527, 106245, від 03.06.2021. Антибактеріальна дія екстрактів з оцвітини, листя та БЦ крокусу по відношенню до *S. aureus, E. coli, P. vulgaris, Ps. aeruginosa, C. albicans* була помірна (діаметр затримки росту 16–18 мм), при цьому до клінічних штамів мікроорганізмів етанольні екстракти мали рівну активність (15,5–17 мм діаметр затримки зросту). МПК для екстрактів до *S. aureus, C. ablicans* та *B. subtilis* становила 125 мкг/мл, для інших мікроорганізмів – 250 мкг/мл.

За результатами фармакологічного скринінгу, а також із застосуванням підходу HerbMars, мангіферин, кемпферол, кверцетин, ізоорієнтин було запропоновано як Q-маркери для контроля якості листя к. посівного; мангіферин, кроцин, рутин, ізокверцитрин, ферулову кислоту – для оцвітини; мангіферин, L-пролін, піроглютамінову кислоту – для БЦ на основі їх протиракового потенціалу. Обрані речовини також було включено у параметри стандартизації сировини, сухих екстрактів відповідно до вимог ДФУ, а також для подальшої стандартизації вирощування к. посівного. Проведені дослідження свідчать про перспективність комплексного використання сировини к. посівного.

Розділ 5. Дослідження хімічного складу рослин роду Ірис та його залежність від факторів навколишнього середовища. Обговорення фармакологічної активності екстрактів ірисів. Для якісного аналізу та кількісного визначення видо-специфічних ізофлавоноїдів (текторидин, германаїзм В, ірисолідон-D-глюкозид, іристекторигенін В, нігрицин, іригенін, 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавон, ірисолідон та додатково – галова кислота, мангіферин, кофейна кислота) у рослинах роду Ірис, було модифіковано ВЕРХ-ДМД методику. Використання обернено фазної колонки ACE C18 (250×4,6 мм, 5,0 мкм) зі змінами у пропорціях градієнту (0,1 % розчином оцтової кислоти у воді (А) та ацетонітрил (В)) та зі збільшенням полярності від 5 до 95%, призвело до кращого розділення сполук з гарною симетрією піків. Методику було апробовано на кореневищах і. блідого, і. угорського, і. строкатого, і. сибірського (Рис. 12), а ідентифікація речовин підтверджена даними УЕРХ-МС. Методика була валідована за наступними показниками: лінійність, правильність, специфічність та межі визначення, та є придатною для кількісного визначення.

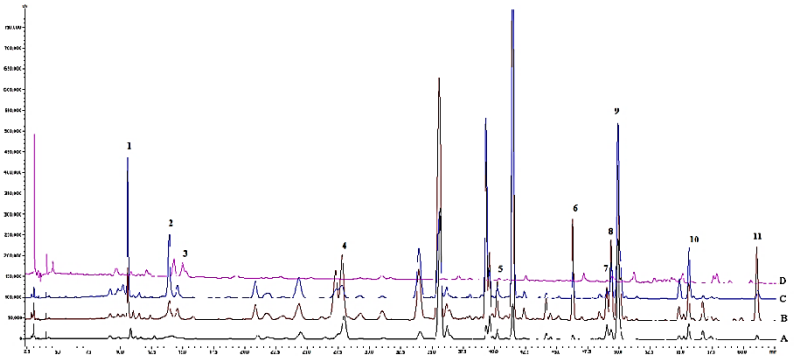


Рис. 12. ВЕРХ-хроматограми метанольних екстрактів і. блідого (A), і. угорського (B), і. строкатого (C), і. сибірського (D). Позначення: галова кислота (1), мангіферин (2), кофейна кислота (3), текторидин (4), германаїзм В (5), ірисолідон-D-глюкозид (6); іристекторигенін В (7), нігрицин (8), іригенін (9), 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавон (10) та ірисолідон (11).

Найбільший кількісний вміст текторидину (3,921 мг/г), нігрицину (2,267), іристекторигеніну В (0,750 мг/г) встановлено для кореневищ і. угорського. Кількісний вміст германаїзм В (7,09 мг/г), ірисолідон-D-глюкозиду (7,51 мг/г), іригеніну (5,518 мг/г) та ксантону мангіферину (5,747 мг/г) була найвищою в кореневищі і. строкатого та і. угорського (від 6,285 мг/г та від 7,507 до 7,353 мг/г відповідно) порівняно з іншими дослідженими видами ірисів.

Для оцінки впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез БАР у кореневищах та листі видів ірисів було використано описану вище методику ВЕРХ, але для ірисів з різних природних середовищ України, Литви та Латвії. Для цього було заготовлено види ірисів, що належать до двох підсекцій – *Iris* subg. *Iris* (*I. germanica* L.) та *Iris* subg. *Limniris* (Tausch) Spach (*I. halophila* Pall., *I. pseudacorus* L., *I. sibirica* L.), сировину заготовляли влітку та восени. Методика дозволила ідентифікувати та встановити вміст 25 сполук (6 фенолкарбонових кислот, 1 ксантон, 5 флавоноїдів, 13 ізофлавоноїдів). Домінантними речовинами були: мангіферин, 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавон, текторидин, германаїзм В, іристекторигенін В, нігрицин, іригенін (Рис. 13).

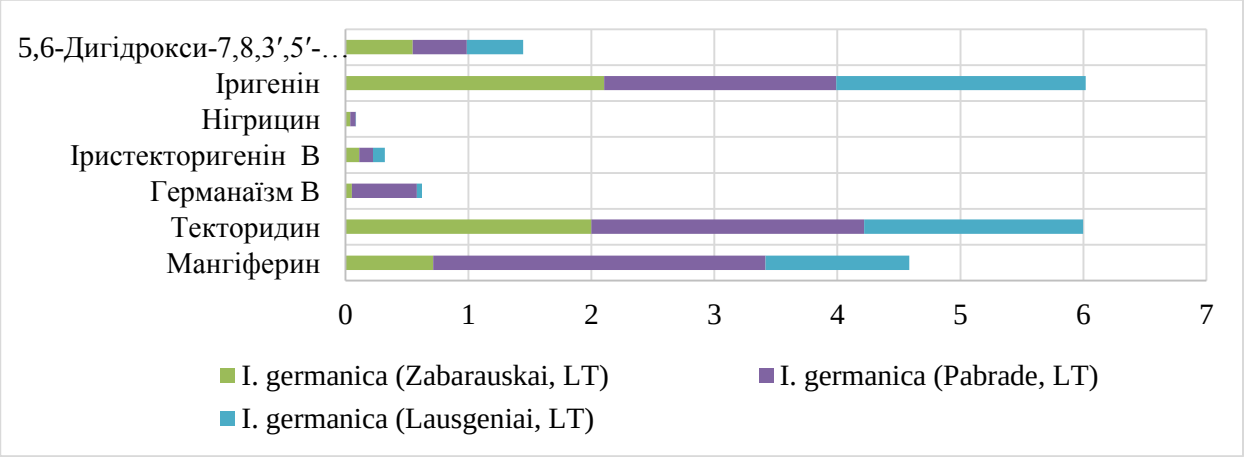


Рис. 13. Розподіл ідентифікованих речовин (мг/г) у кореневищах ірисів з секції *Iris* subg. *Iris.*

ВЕРХ аналіз листя дозволив ідентифікувати від 2 до 17 сполук фенольної структури у зразках листя ірисів. Мангіферин, текторидин, 6,7-дигідроксиізофлавон, іригенін, хлорогенова, кофейна кислоти ідентифіковані в більшості зразків листя незалежно від місця та часу заготівлі, але відмічені суттєві відмінності в їх кількісному вмісті. Загальний аналіз даних показав, що накопичення фенольних речовин більше відбувається у літній період, що обумовлено фактором освітленості, оскільки одна з фізіологічних функцій поліфенольних сполук є захистом рослин від УФ-випромінювання.

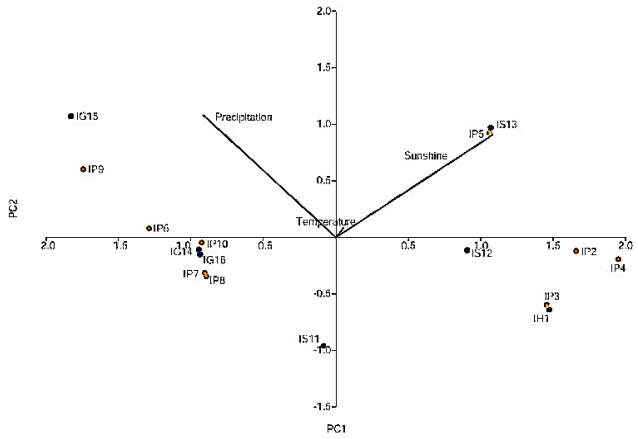


Рис. 14. Аналіз основних компонентів зразків ірисів на вміст фенольних сполук, згрупованих за класами, та метеорологічними умовами (річна кількість опадів, мм; тривалість сонячного сяйва, години; середньорічна температура, °C).

Кореляційний аналіз факторів навколишнього середовища на вміст фенольних сполук у ірисів показав, що метеорологічні фактори виявили позитивний вплив тривалості сонячного випромінення та негативний вплив кількості річних опадів на накопичення сполук у кореневищах видів ірисів та пояснюють 80,07 % варіації (Рис. 14). Вміст фосфору та калію позитивно впливає на кількість фенольних сполук та аргументують 52,35 % та 43,07 % варіацій відповідно, тоді як вміст азоту в ґрунті не має значного впливу на накопичення аналізованих речовин. Серед географічних факторів (довгота, широта, висота) найбільш значущим позитивним впливом на вміст фенольних сполук було встановлено висоту місцевості та пояснювали 80,57 % та 8,94 % варіацій.

Досліджено профіль карбонових кислот у кореневищ ірисів (*I. graminea, I. sibirica, I. halophila, I. hungarica, I. pallida, I. variegata, I. pumila, I. musulmanica* (види з України та з Азербайджану), *I. carthaliniae, I. medwedewii*) та 15 зразків листя ірисів. Методом ГХ-МС було ідентифіковано та визначено кількісний вміст не менше 42 карбонових кислот (низькомолекулярних аліфатичних моно-, ди-, трикарбонових кислот; кислот ароматичного ряду та високомолекулярних монокарбонових кислот). Вміст насичених жирних кислот у кореневищах видів ірисів переважає (від 15 % до 53 %), а в листі переважає вміст ненасичених (зокрема полієнових) кислот (Рис. 15). Серед карбонових кислот домінантними є: лимонна, яблучна, щавлева, *α*-лінолева кислоти.

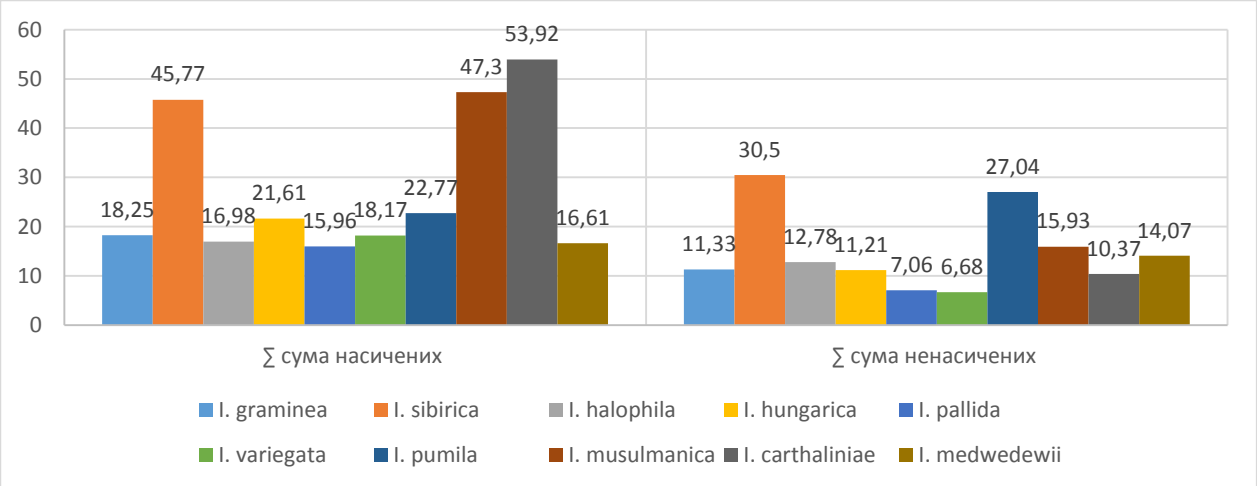


Рис. 15. Розподіл жирних кислот (% від загального вмісту карбонових кислот) між дослідженими кореневищами видів ірисів.

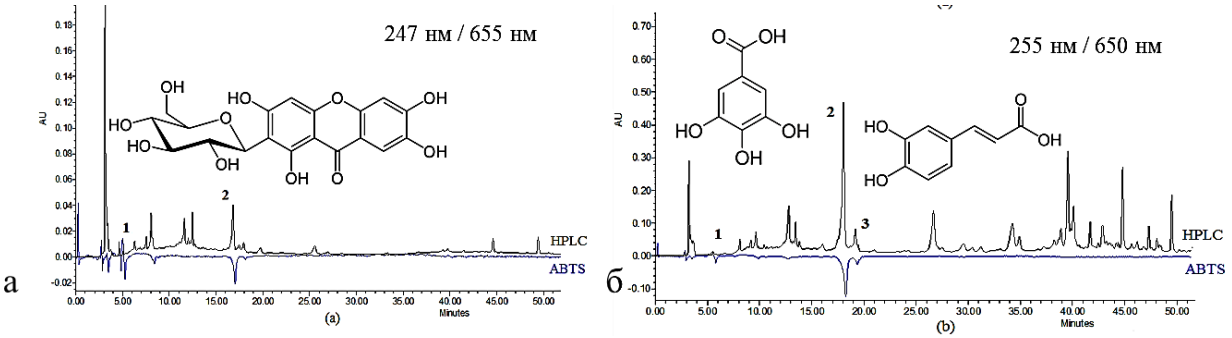
Для листя видів ірисів більш значущим виявився аналіз нижчих карбонових кислот. Для листя і. угорського, і. німецького, і. блідого, і. строкатого вміст таких кислот як лимонна (1337,5–12364,4 мг/кг), яблучна (50,8–4558,0 мг/кг) та щавлева (1199,0–3435,2 мг/кг) був високим у всіх зразках.

Дослідженням терпеноїдів кореневищ та листя 27 видів та сортів рослин роду Ірис показало, що загальний вихід ефірної олії кореневищ становить 0,02–0,58 %. Домінуючою маркерною сполукою ефірної олії є *α*-ірон (до 2,85 %). Вперше у видах ірисів виявлені нортерпеноїди та їх похідні: *β*-дамаскенон, *β*-іонон-5,6-епоксид, *β*-іонон. Тритерпеноїди у всіх видах ірисів були представлені лише скваленом (0,6–29,29 %). Встановлено перспективність кореневищ у малодосліджених ірисів (*I. musulmanica, I. virginica, I. notha, I. halophila, I. hybrida Stocholm* інші) у якості ефіроолійної сировини за рахунок високого вмісту маркерних речовин ефірної олії (*β*-іонон, *α*-ірон, транс-2,6-*γ*-ірон).

За результатами попередніх досліджень і. угорський, і. строкатий та і. сибірський було обрано для одержання сухих екстрактів за рахунок їх хімічного складу. Було модифіковано методику одержання екстрактів для досягнення кращої екстракції БАР, а саме: подрібнення сировини у рідкому азоті, УЗ-екстракція при нагрівання (40 °С) з наступною ліофілізацією для м’якого висушування екстрактів. Використана технологія дозволила виділити більше компонентів із сировини ірисів, що підтверджено даними ВЕРХ.

Порівняльне дослідження хімічного профілю сухих екстрактів ірисів, показало, що основними компонентами є ізофлавоноїди, ксантон мангіферин, галова кислота. Всього було ідентифіковано до 23 фенольних сполук, крім того вміст мангіферину (0,63–7,34 мг/г), германаїзму B (0,12–94,76 мг/г), іристекторигеніну B (4,34–9,25 мг/г), іригеніну (2,03–35,04 мг/г) та 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавону (1,06–5,04 мг/г) є домінантним. Етанольний екстракт кореневищ і. угорського мав вищий вміст компонентів, проте водний екстракт мав більш різноманітний склад. Екстракти листя і. угорського серед 13 ідентифікованих сполук, містили хлорогенову кислоту (0,38–1,24 мг/г), мангіферин (0,80–5,75 мг/г) як домінантні. У водному екстракті кореневищ і. угорського та і. строкатого методом ГХ-МС було ідентифіковано піроглутамінову кислоту (1,34 мг/г та 0,78 мг/г відповідно), а також у і. строкатого виявлено аланін, валін, ізолейцин, пролін, серин, аспарагінову кислоту.

Кількісний вміст речовин у екстрактах і. строкатого та і. угорського був значно вищим за і. сибірський. Крім того, екстракти і. угорського вперше продемонстрували найвищу антиоксидантну активність методом ВЕРХ-ABTS завдяки наявності фенольних сполук (для етанольного TEAC 50,32 мкмоль/г та водного 23,11 мкмоль/г) (Рис. 16). Додатковим методом оцінки антиоксидантного потенціалу екстрактів є оцінка ядерного фактору еритроїдного походження 2, що бере участь у клітинному окиснювально-відновному гомеостазі. Кореневища і. строкатого показали легкий ефект посилення активності NRF2 на 72,7 % у нормальних клітинах шкіри, що вказує на його цитопротекторні ефекти.



а б

Рис. 16. Хроматограми ВЕРХ-ABTS водних екстрактів кореневищ: і. строкатого при 247 нм (HPLC, чорний) і 650 нм (ABTS, синій) (a); і. угорського при 255 нм/650 нм (b). Галова кислота (1), мангіферин (2) і кофейна кислота (3).

Водні екстракти кореневищ і. строкатого та і. угорського знижували життєздатність лінії клітин меланоми (IGR39) (IC_{50} 0,53 та 1,15 мг/мл відповідно) та потрійно негативного раку молочної залози (MDA-MB-231) (IC_{50} 0,33 та 0,57 мг/мл відповідно). Етанольний екстракт кореневищ і. угорського мав порівняльну ефективність з водним екстрактом і. строкатим.

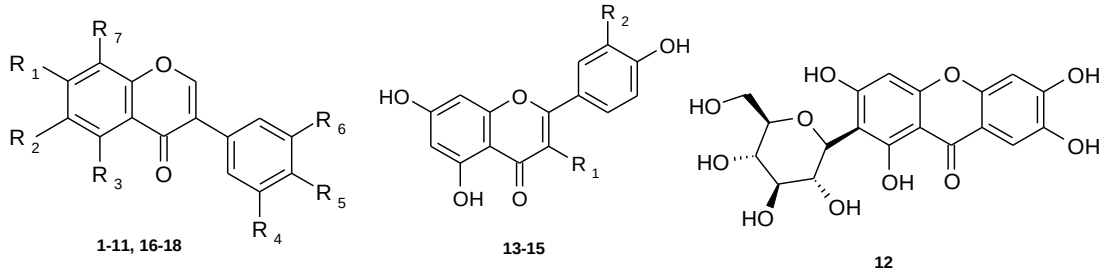
Водний екстракт кореневищ і. угорського (500 мкг/мл) показав 80 % захисний ефект (токсичність 20 %) проти грипу H1N1 (EC_{50} 125 мкг/мл), що свідчить про протигрипозний ефект. В той же час етанольний екстракт кореневищ і. угорського показав захисну дію щодо ентеровірусу D68 від 40 % до 55 % (токсичність 50 %), вірогідно за рахунок глікозидів – кікалідону, германаїзму B, ононіну. Водний екстракт кореневищ і. строкатого (500 мкг/мл) показав значно нижчий захисний ефект – 30 % (близько 20 % токсичності).

Водні екстракти кореневищ і. строкатого та і. угорського виявляли протизапальний потенціал та інгібували утворення супероксид-аніонів при концентрації 10 мкг/мл на 41,0 % та 45,7 % відповідно. Обидва екстракти показали посилюючий вплив на вивільнення еластази нейтрофілів людини і, отже, можуть проявляти імуностимулюючі ефекти, пов’язані з дегрануляцією. Полісахаридний екстракт листя і. угорського (10 мкг/мл) інгібував утворення супероксид-аніонів на 7,84 % і вивільнення еластази на 39,02%, що свідчить про присутність помірної протизапальної дії.

Найбільш виражену антибактеріальну активність екстракти кореневищ і. угорського, і. строкатого, і. сибірського мали по відношенню до *B. subtilis*, *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *C. albicans* (діаметри затримки росту складали більше 19 мм). Бактеріостатична дія екстрактів ірисів становила: МПК для *B. subtilis* 125–250 мкг/мл, *S. aureus* 250 мкг/мл, *E. coli* – 500 мкг/мл.

Потужні імуномоделюючі ефекти екстракту і. угорського спонукали нас до вдосконалення методики виділення індивідуальних речовин з кореневищ ірису угорського та вивчення їх біоактивності. Для поліпшення розділення речовин в методику було внесені наступні зміни: збільшена маса досліджуваної сировини (до 2,5 кг), екстракцію сировини проводили 70 % етанолом при нагріванні, об’єднували етилацетатну та бутанольну фракції. Методом фракціонування з етилацетатної, хлороформної, бутанольної фракції та водного

залишку за модифікованою методикою було виділено 12 нових фенольних речовин (ірисолідон **1**, ірилон **4**, кікалідон **5**, германаїзм B **11**, кемпферол **14**, іристекторигенін B **17**, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавон **18**, іристекторин B **19**, ізокверцитрин **20**, апігенін-7-глюкозид **24**, коричну **29**, кумарову **30** кислоти), крім того 18 раніш описаних речовин (іригенін **2**, ірисолон **3**, текторигенін **6**, ононін **7**, геністеїн **8**, дайдзеїн **9**, формононетин **10**, мангіферин **12**, апігенін **13**, кверцетин **15**, текторидин **16**, ембінин **21**, гіперозид **22**, ізомангіферин **23**, хлорогенову **25**, неохлорогенову **26**, кофейну **27**, ферулову **28** кислоти) (Рис. 17). Структуру сполук встановлювали за допомогою 1D та 2D ЯМР-спектроскопії для визначення спірних моментів по замісникам.



Ірисолідон (**1**) R_1=R_3= OH; R_4=R_6=R_7=H; R_2=R_5=OCH_3; Іригенін(**2**) R_2=R_4=R_5=OCH_3; R_1=R_3=R_6=OH; R_7=H; Ірисолон (**3**) R_1 (R_2) = -O-CH_2-O-; R_3=OCH_3; R_5=OH; R_4=R_6=R_7=H; Ірилон (**4**) R_1 (R_2) = -O-CH_2-O-; R_3 = R_5 = OH; R_4 =R_6 = R_7 = H; Кікалідон (**5**) R_1 = O-Glu; R_2=R_5=OCH_3; R_3= OH; R_4=R_6=R_7=H; Текторигенін (**6**) R_1 = R_3=R_5=OH; R_2 =H; R_4=R_6==H; R_7=OCH_3; Ононін (**7**) R_1= O-Glu; R_2=R_3=R_4=R_6= R_7=H; R_5=OCH_3; Геністеїн (**8**): R_1=R_3=R_5=OH; R_2=R_4=R_6=R_7=H; Даїдзеїн (**9**) R_1=R_5=OH; R_2=R_3=R_4=R_6=R_7=H; Формононетин (**10**) R_1=OH; R_2=R_3=R_4=R_6=R_7=H; R_5=OCH_3; Германаїзм B (**11**) R_1 (R_2) = -O-CH_2-O-; R_3=OCH_3 R_5=O-Glu; R_4=R_6=R_7=H; Текторидин (**16**) R_1 = O-Glu; R_2 =OCH_3; R_3=R_5=OH; R_4=R_6=R_7=H; Іристекторигенін B (**17**) R_1=R_3=R_5=OH; R_2=R_6=OCH_3; R_4=R_7=H; 5,6-Дигідрокси-7,8,3′,5′-тетраметоксиізофлавон (**18**) R_1=R_4=R_6=R_7=OCH_3; R_2=R_3=OH; R_5=H; Апігенін (**13**) R_1=R_2=H; Кемпферол (**14**) R_1=OH; R_2=H; Кверцетин (**15**) R_1=R_2=OH; Мангіферин (**12**)

Рис. 17. Фенольні сполуки, виділені з кореневищ і. угорського та оцінені в аналізах біоактивності.

Природні сполуки **1, 2** та **5** є рідкісними речовинами та були знайдені лише у видах ірисів, проте це перший точний опис структури індивідуальних сполук. Молекулярна формула сполуки **1** була визначена як $C_{17}H_{14}O_6$ за квазімолекулярним іонним піком $[M+H]^+$ при m/z 315 у LC-MC спектрі в поєднанні з даними ^{13}C ЯМР. У спектрі ^1H ЯМР речовини **1** пара сигналів 2H при δH 7,49 (d, J = 8,5 Гц) і 7,00 (d, J = 8,5 Гц) вказує на те, що B-кільце є заміщення при C-4′. Характерний ізофлавоновий сигнал H-2 спостерігався при δH 8,37(*s*), разом із лише одним ароматичним протоном при δH 6,50(*s*), призначеним H-8, що вказує на те, що три замісники були пов'язані з A-кільцем. Схема заміщення була встановлена на основі хімічних зсувів ^{13}C ЯМР і 2D ЯМР спектрів (NOESY, HSQC і HMBC, Рис. 18). OH-група в C-5 (δH 13,02, *s*) була виведена з діагностичного резонансу C-4 (δC 180,95). Спостережувані ефекти NOE між групою OH у C-5 та метоксигрупою у C-6 (δH 3,74, *s*), а також між ароматичним протоном у H-8 та групою OH у C-7 (δH 10,79, *brs*) дозволило встановити повне заміщення кільця A. Що стосується кільця B, розташування метоксигрупи в C-4' (δH 3,78, *s*) було виведено з ключових кореляцій HMBC від метоксигрупи до C-4', і від ефекту NOE між метоксигрупою та H-3',5' (Рис. 18). Інший ефект NOE був

виявлений між H-2 і H-2’,6’. Отже, сполука **1** була ідентифікована як 5,7-дигідрокси-6,4′-диметоксиізофлавон (ірисолідон). Це рідкісний ізофлавон, який був виділений вперше з кореневищ і. угорського.

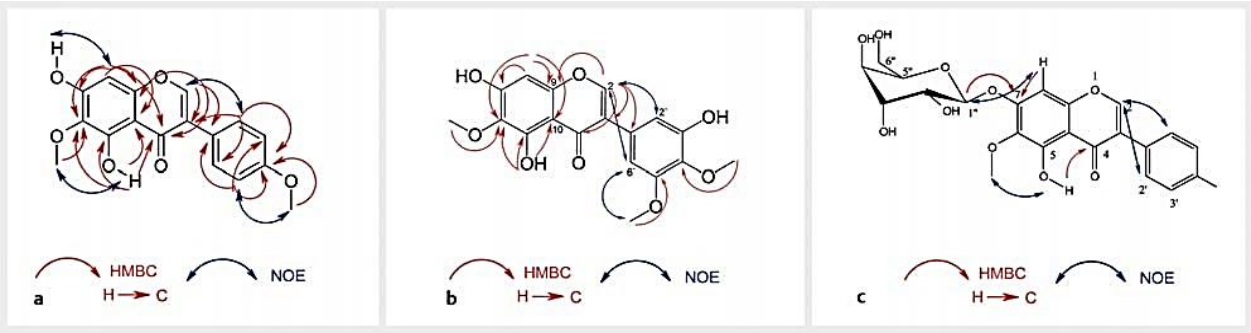


Рис. 18. Ключові кореляції HMBC та ефекти NOE у сполуках **1** (a), **2** (b), **5** (c).

LC-MC-спектр сполуки **2** показав пік квазімолекулярного іону $[M+H]^+$ при m/z 361. У поєднанні з даними ^{13}C ЯМР молекулярну формулу сполуки **2** було визначено як $C_{18}H_{16}O_8$. Спектр ^1H ЯМР сполуки **2** показав характерний сигнал H-2 ізофлавону при *δ*H 8,36 (*s*), сигнали трьох метоксигруп (*δ*H 3,79, *s*; 3,75, *s*; 3,70, *s*), трьох OH-груп (*δ*H 13,03, *s*; 10,22, *brs*; 9,28, *brs*), ароматичний протон при *δ*H 6,49 (*s)*, віднесений до H-8, і два ізольовані ароматичні протони (*δ*H 6,72, *s* і *δ*H 6,66, *s*) кільця B. Характер заміщення кільця A був подібним до сполуки **1** і був визначений шляхом інтерпретації спектрів NOESY, HSQC і HMBC (Рис. 18). Розташування ароматичних протонів кільця B було виведено з ключових кореляцій HMBC від H-2’ і H-6’ до C-3, а також з ефекту NOE між H-2’/H-6’ і H-2. Метоксигрупи при δH 3,70(*s*) і 3,79(*s*) можуть бути розташовані в C-4’ і C-5’, відповідно, завдяки тому факту, що ефект NOE було виявлено між H-6’ і метоксигрупою в C -5’. Кореляція HMBC спостерігалася від метоксигрупи до C-4’. Отже, сполука **2** була ідентифікована як 5,7,3’-тригідрокси-6,4’,5’-триметоксиізофлавон, або іригенін.

Молекулярну формулу сполуки **5** було визначено як $C_{23}H_{24}O_{11}$ за піком квазімолекулярного іона $[M+H]^+$ при m/z 477 у LC-MC спектрі разом із даними ^{13}C ЯМР. Протонний резонанс для ізофлавону C-2 був локалізований при *δ*H 8,45 (1H, s) ppm, що також підтвердило ізофлавонову природу кільця. Кислотний гідроліз 5 з 10% H_2SO_4 дав аглікон сполуки **1** (ірисолідон) і D-глюкозу, які були ідентифіковані спільною ПХ і ТШХ. У спектрі ^1H ЯМР **5** характерний сигнал H-2 ізофлавону було виявлено при *δ*H 8,48 (*s*), а 4-метоксифенільну природу B-кільця було виведено з сигналів при *δ*H 7,52 (2H, *d, J* = 8,4 Гц, H-2’,6’) і 7,01 (2H, *d, J* = 8,4 Гц, H-3’,5’). Значення *J* (7,7 Гц) аномерного протона при *δ*H 5,09 (*d*) (CD_3OD) вказувало на те, що цукор був у *β*-конфігурації. У спектрі NOESY **5** було встановлено, що цукор знаходиться в C-7 з кореляції між аномерним протоном D-glc (*δ*H 5,09) і характерним одиночним протоном H-8 (*δ*H 6,90, 1H, *s*). Метоксигрупа при *δ*H 3,77 була розташована в C-6, оскільки група OH при C-5 (*δ*H 12,90) корелювала з метоксипротонами (Рис. 18). У спектрі також виявлено сигнали для двох метоксигруп при *δ*H 3,78 (3H, *s*, 4’-OCH_3) та *δ*H 3,74 (3H, *s*, 6-OCH_3) ppm та

синглет для гідроксигрупи при *δ*H 12,9 (1H, *s*, 5-OH) ppm. В результаті, структура сполуки **5** була охарактеризована, як ірисолідон-7-O-*β*-D-глюкопіранозид або кікалідон, який вперше виділено з i. угорського. Для подальшого співвіднесення спостережуваних противірусних ефектів виділених фенольних сполук з клінічними противірусними препаратами (71 препарат) було проведено моделювання *in silico* за допомогою хімічної глобальної системи позиціонування для природних продуктів (ChemGPS-NP) (Рис 19).

Фенольні сполуки утворювали кластер, який частково перекривався з протигрипозними препаратами (жовті крапки) та інгібіторами нейрамінідази (помаранчеві крапки). Флавоноїди з вищою ароматичністю (до позитивного синього PC2, вісь y) і гідрофільністю (до негативного зеленого PC3, вісь z) виявили захисну дію проти інфекції грипу H1N1, тоді як інші флавоноїди були менш активними. Не було явної кореляції між апігеніном (**13**), кемпферолом (**14**), кверцетином (**15**) (червоні крапки) і групою інгібіторів нейрамінідази (помаранчеві крапки), що вказує на те, що вплив на нейрамінідазу лише частково сприяв антивірусним властивостям активних протигрипозних флавоноїдів ірису (червоні крапки; **13, 14, 15**), що також спостерігалося *in vitro*. При оцінці протиентеровірусних властивостей фенольних сполук, ірисолідон (**1**), кікалідон (**5**) і кемпферол (**14**) (рожеві крапки) утворювали кластер з референтними препаратами (зелені крапки) та мали подібність в ароматичності (синя вісь, PC2, вісь *y*) і рівнях ліпофільності (зелений PC3, вісь *z*), тоді як розмір активних молекул відрізнявся через присутність глюкози в кікалідон (**5**). Загалом результати продемонстрували подібність фізико-хімічних властивостей активних фенольних сполук ірису з відомими препаратами.

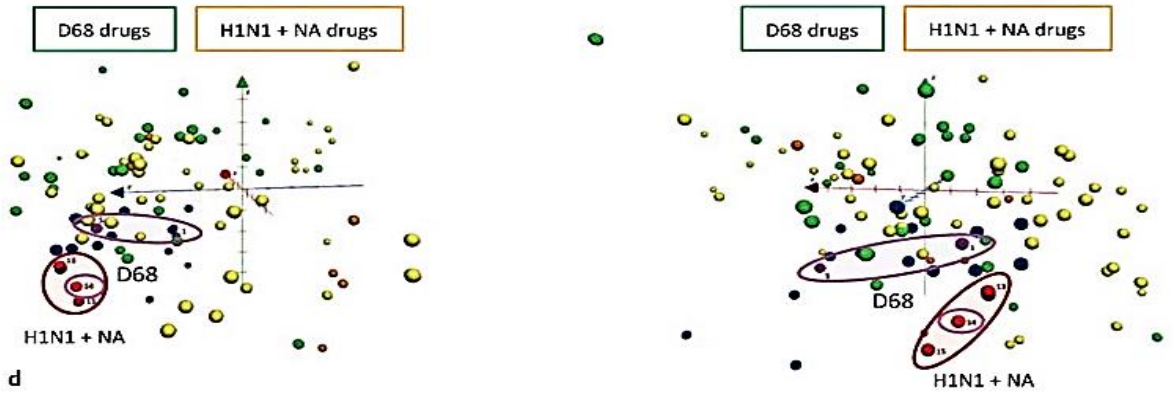


Рис. 19. ChemGPS‑NP аналіз: фенольні речовини ірису (сині крапки неактивні; червоні - активні проти вірусу грипу; рожеві – активні проти ентеровірусу) були нанесені разом із протигрипозними (жовті крпки) та інгібіторами нейрамінідази (помаранчеві крапки) та антиентеровірусними препаратами (зелені крапки). Кожен тривимірний графік представлений розрахованими головними компонентами різних фізико-хімічних властивостей, тобто PC1 (червона вісь; *x*; розмір), PC2 (синя вісь; *y*; ароматність) і PC3 (зелена вісь; *z*; ліпофільність).

Усі сполуки були оцінені *in vitro* на предмет їх захисної дії проти ентеровірусу D68, вірусу грипу H1N1 та коронавірусу 229E. Рідкісний ізофлавон ірисолідон проявив найсильнійший захисний ефект проти ентеровірусу D68 з майже повним інгібуванням у діапазоні концентрацій від

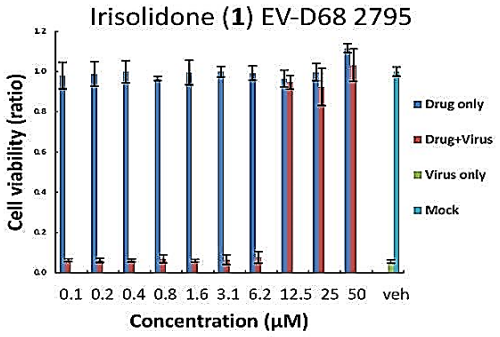


Рис. 20. Захисна активність ірисолідону щодо ентеровірусної інфекції D68.

12,5 мкМ до 50 мкМ (Рис. 20) без токсичного впливу на RD клітини. Кікалідон (93 %) і кемпферол (83 %) також показали інгібуючу активність при 50 мкМ. Перспективний протигрипозний ефект (препарат порівняння Занамівір (97,5 %)) кемпферолу (92 %), кверцетину (47,5 %) та апігеніну (100%) був додатково підтверджений інгібуючу активністю нейрамінідази. Апігенін (IC_{50} 2,19 і 2,59 мкМ) і кверцетин (IC_{50} 6,81 і 6,82 мкМ) при 200 мкг/мл виявили глибокий інгібуючий вплив на утворення супероксид-аніонів, а також на вивільнення еластази. Мангіферин значно пригнічував утворення супероксиду (IC_{50} 5,24 мкМ) завдяки антиоксидантним властивостям. Геністеїн, відомий інгібітор протеїн-тирозинкінази, може служити позитивним контролем та інгібувати супероксид (IC_{50} 1,84 мкМ), тоді як вплив на вивільнення еластази був слабкішим (29,44 %). Екстракти кореневищ і. угорського (10 мкг/мл) та виділені сполуки не виявили захисних ефектів проти інфекції коронавірус людини 229E (HCoV-229E) *in vitro*.

Після проведеного аналізу закономірності зв'язку «структура – активність» та в результаті оцінки критеріїв Herb MaRS було обрано вісім основних сполук, включаючи ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин та *α*-ірон для кореневищ ірисів, а також мангіферин, іригенін, хлорогенову кислоту для листя ірисів на основі їх противірусного та протизапального потенціалу. Обрані речовини та параметри впливу факторів навколишнього середовища на БАР ірисів, враховані при розробці умов стандартизації вирощування видів та сортів ірисів.

Розділ 6 Стандартизація умов вирощування крокусу посівного та рослин роду Ірис як ЛРС. Для впровадження ЛРС у фармацевтичну практику, обов'язковим є доведення умов вирощування до стандартизованих. Враховуючи великий вплив факторів на композиційний склад рослин факторів навколишнього середовища, нами було розроблено СОП культивування та післязбиральної практики з урахуванням принципів GACP для к. посівного та рослин роду Ірис в Україні з метою простежуваності сировини та складу маркерних сполук.

Рис 21. Регіони, задіяні у дослідженнях умов вирощування к. посівного.

Для к. посівного дослідження проводили впродовж 2017–2021 рр. на базі ФГ «Шафран Любимівський» у Херсонській обл., де було додатково створено експериментальну ділянку, а з 2018–2021 рр. до проекту долучились ще 22 фермерств з інших регіонів України, що дало можливість порівнювати

умови вирощування к. посівного. Порівняльний аналіз включав кліматичні характеристики з 12 різних регіонів (Рис. 21) з дати висаджування до збору сировини, географічні параметри, агрохімічний аналіз ґрунту (гумус, pH води, P_2O_5, K_2O, N) з місць вирощування, післязбиральну практику, оцінку якості шафрану до вимог ISO 3632 та ДФУ.

У розділі 3 нами було встановлено, що на загальний вміст кроцинів та пікрокроцину у шафрані найбільший вплив чинять показники тривалості сонячної радіації, сонячного УФ-індексу та тип ґрунту. При вирощуванні к. посівного в умовах України з дотриманням розроблених етапів СОП, було відмічене, що сировина з північно-східних регіонів мала вищі показники вмісту маркерних сполук (кроцину, пікрокроцину, шафраналю), крім того методом ВЕРХ було відмічене наявність рутину та апігеніну у зразках. Відповідно до ґрунтово-кліматичних особливостей дані регіони є більш придатними для вирощування к. посівного та видобутку шафрану, як ЛРС для фармацевтичної галузі. У випадку виробництва побічних продуктів шафрану (листя, оцвітина, бульбоцибулини), увагу слід звернути на південно-західні регіони (Херсон, Вінниця, Одеса), так як на біосинтез їх маркерів-якості (фенольні сполуки) найбільший вплив чинили тривалість сонячного сяйва, сонячний УФ-індекс, тип ґрунту та тип клімату.

Етапи СОП для одержання якісної вихідної сировини включають: опис рослини, посівного матеріалу, первинної обробки, умов посіву (збагачення ґрунту, хвороби та шкідники, терміни іригації, сівозміна, умови збору та врожайність), первинна обробка (в тому числі висушування та зберігання), транспортування, пакування, контроль якості та документації. Вони були імплементовані у промислове виробництво шафрану в Україні (ТОВ «Агро-фокус»; ФГ «Шафран Любимівський», «Крокус.про»; «Агроленд») та у Нідерландах («Mts Schipper & Elberse»).

Вперше використано сучасний екологічний метод предпосівної обробки посівного (бульбоцибулин) матеріалу к. посівного холодною плазмою (CP, 3 та 5 хв), вакуумом (V, 3 хв) та електромагнітним полем (EMF, 5 хв) для оцінки змін вмісту вторинних метаболітів. Проведено оцінку впливу даних методів стресу на схожість рослин у польових умовах, морфологію сходів, фізіологію, токсичність, мутацію та біохімічні характеристики, такі як кількість кроцину, пікрокроцину, шафраналю та рутину у шафрані. Крім того оцінено зміни у загальному вмісті фенольних сполук та антиоксидантної активності у листі та оцвітині к. посівного, як побічних продуктів виробництва. В результаті, методом ВЕРХ визначено якісний профіль шафрану після впливу різних методів стресу та визначено кількісний вміст 23 похідні кроцинів, а також рутин, пікрокроцин та шафраналь. Основними ефірами кроцетину були транс-4GG (близько 40 % від загального вмісту), транс-3Gg, транс-2G, цис-4GG, транс-2-gg і цис-3Gg (до 114,3; 49,0; 25,4; і 23,9 мг/г сухої маси). Цис-ізомери показали додаткову смугу поглинання близько 324 нм у своїх УФ-спектрах. Що стосується частки складних ефірів цис/транс-кроцетину, то хроматографічна площа складних ефірів транс-кроцетину становила 85% загальної хроматографічної площі при 440 нм (Рис. 22).

Найбільший вплив на вміст метаболітів мала обробка EMF, яка суттєво збільшила вміст кроцинів (особливо кроцин-4 збільшення вмісту у 4 рази). Окремі сполуку були ідентифіковані тільки у оброблених зразках. Метод EMF може мати великий потенціал для збільшення виробництва цінних вторинних метаболітів рослин, з урахуванням екологічності методу.

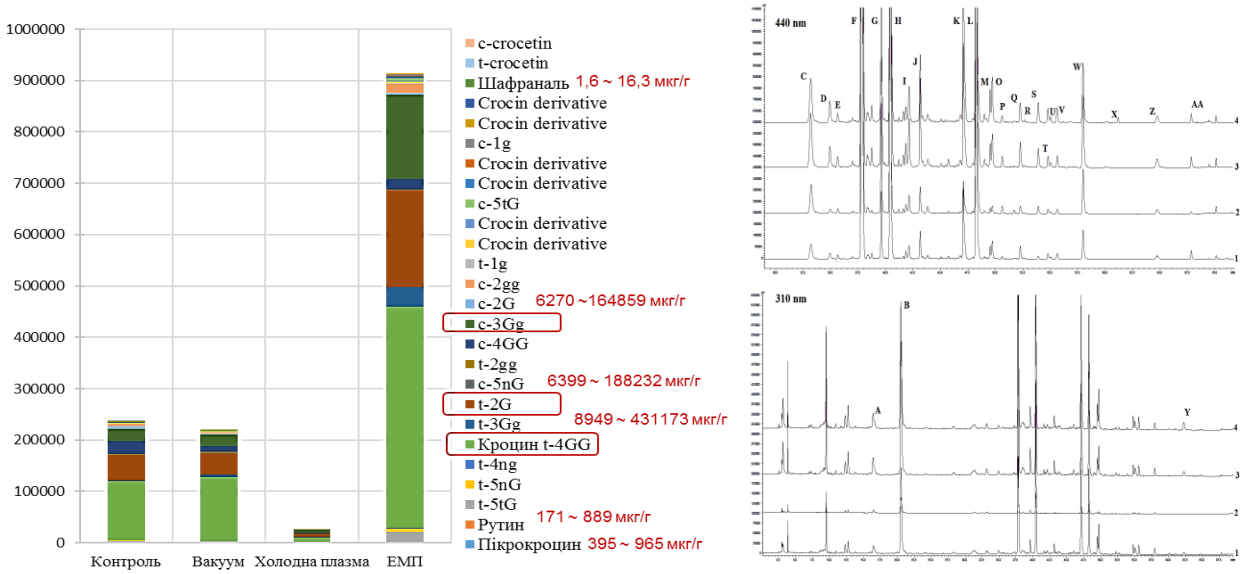
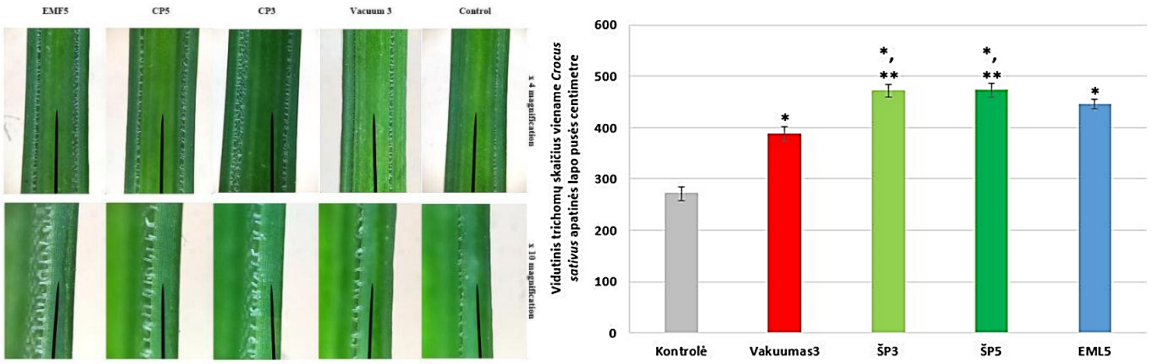


Рис. 22. Результати ВЕРХ (мкг/г) аналізу шафрану після передпосівної обробки.

Враховуючи, що після обробки БЦ та їх зростання, зміни відбуваються у всіх органах рослини, було оцінено зміни у загальному вмісті фенольних сполук та антиоксидатному потенціалі листя та оцвітини к. посівного, як побічних продуктів виробництва шафрану. Всі стресори значно (42–74%) збільшували кількість трихом листків (як показник вмісту вторинних метаболітів) (Рис. 23), загальний вміст фенольних сполук та вільну радикальну активність.



* - статистично значуща різниця порівняно з контролем того ж експерименту ($p \leq 0,05$); ** - статистично достовірна різниця порівняно з групою V3 ($p \leq 0,05$).

Рис. 23. Загальний вигляд трихом листа к. посівного на абаксіальній поверхні апертури крипти та їх кількість (б). Наведено середні результати ± стандартна помилка (n = 7).

Холодна плазма значно підвищувала антиоксидантну активність листя та загальний вміст фенольних сполук (групи CP5 становив 44%, в EMF – на 27% вищий порівняно з контролем). Незважаючи на значно вищий вміст фенольних сполук у оцвітині (у 2–2,5 рази), а ніж у листя, активність антиоксидантної дії екстрактів оцвітини на 13–20 % нижча порівняно з листям.

Застосований підхід є екологічним та перспективним для впровадження у виробництво. Отже, враховуючи ґрунтово-кліматичні особливості регіонів України, застосування нового методу передпосівної обробки посівного матеріалу к. посівного (EMF) може мати великий потенціал для забезпечення стабільного вмісту маркерів-якості (кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин), з порівняно більшим вмістом речовин, на відміну від традиційного вирощування.

Для розробки СОП вирощування рослин роду Ірис з урахуванням ґрунтово-кліматичних особливостей України, були проведені польові роботи на базі 4-х ботанічних садів України (НБС ім. М.М. Гришка НАН України (Київ), БС ХНУ ім. В. Н. Каразіна (Харків), БС НФаУ (Харків), «Навчально-дослідницька ділянка» (Миколаїв)) для визначення оптимальних регіонів вирощування. Незважаючи на різницю в температурі клімату, кількості опадів та складі ґрунту між регіонами, іриси мали добру пластичність та адаптацію. Враховуючи поточні дані, а також попередні експериментальні дані (розділ 5), тривалість сонячного випромінювання, вплив вмісту фосфору та калію, висота місцевості на біосинтез фенольних сполук, незважаючи на адаптацію ірисів до всіх регіонів України, з метою одержання ЛРС, перевагу слід надавати центральним та південним регіонам України відповідно до сонячних днів. З урахуванням того, що вирощування декоративно-квітучих рослин обов'язково потребує внесення добрив для стимулювання росту та біомаси рослини, нами було проведено експеримент з оцінки впливу монокомпонентних добрив (розчину сульфату магнію, хелатів заліза та калію) на вміст маркерних сполук рослин роду Ірис на прикладі ірисів сортів «Цікавинка», «Талібо», «Widcombe Fire». Гіпотеза дослідження полягала у тому, що застосування кореневого та позакореневого підживлення хелатом заліза (Fe^{2+}), хелатом калію (K^{+}) та сульфатом магнію (Mg^{2+}) у процесі вегетації ірисів через регуляцію біосинтезу фенілпропаноїдів має підвищити рівень основних фенольних сполук у сировині. За рахунок того, що названі іони діють як кофактори різних ферментів, які беруть участь у біосинтезі фенілпропаноїдів у рослинах (Рис. 24).

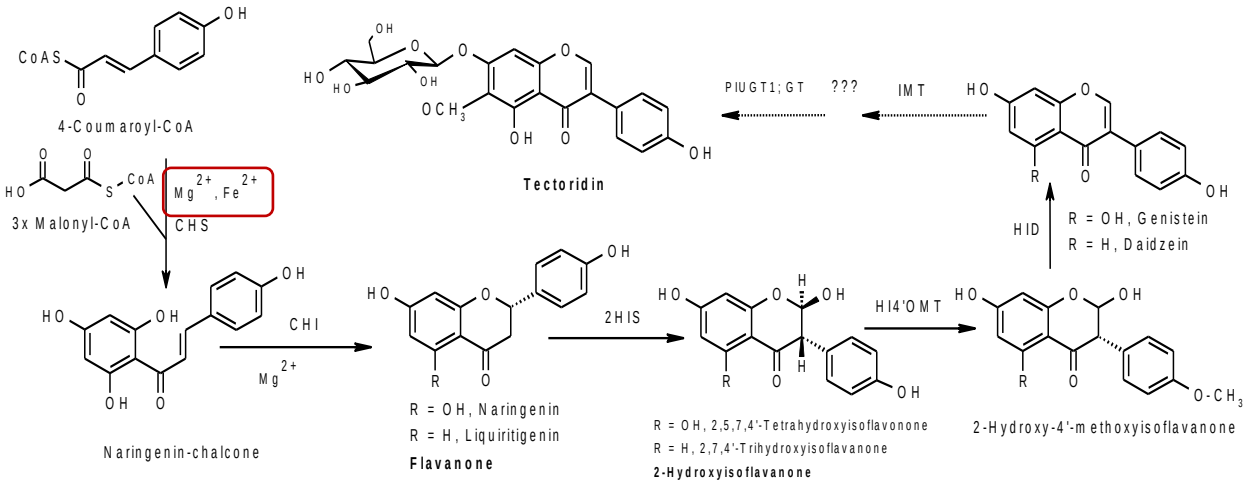


Рис. 24. Можливі шляхи біосинтезу текторидину у рослинах роду Ірис.

Вміст речовин різнився в залежності від виду сировини (квітки, листки, кореневища), сорту, а також наявності або відсутності підживлення. Для

кореневищ та листя ірисів відмічене підвищення загального вмісту фенольних сполук після підживлення (до 10% загального вмісту ізофлавоноїдів, до 8% фенольних кислот; до 5% γ-піронів; до 13% флавоноїдів), а у квітках відбувалось зменшення БАР за результатами СФ-метода. Це обґрунтовує застосування живлення для збільшення накопичення БАР у відповідних органах – кореневищах та листі. Дані загального вмісту фенольних сполук корелювали з даними кількісного вмісту маркерних речовин методом ВЕРХ. Вміст ізофлавоноїдів значно збільшувався у кореневищах (Рис. 25), що обумовлено вірогідним механізмом дії впливу ферментів та їх активаторів – мікроелементів, особливо магнієм, при цьому вміст хлорогенової кислоти у кореневищах зменшувався. Відмічена збільшення вмісту ізофлавонів геністину (у 2 рази для сорту Цікавинка, з 3,34 мг/г до 9,67 мг/г), іристекторигеніну В, ірисолідону у зразках кореневищ ірисів.

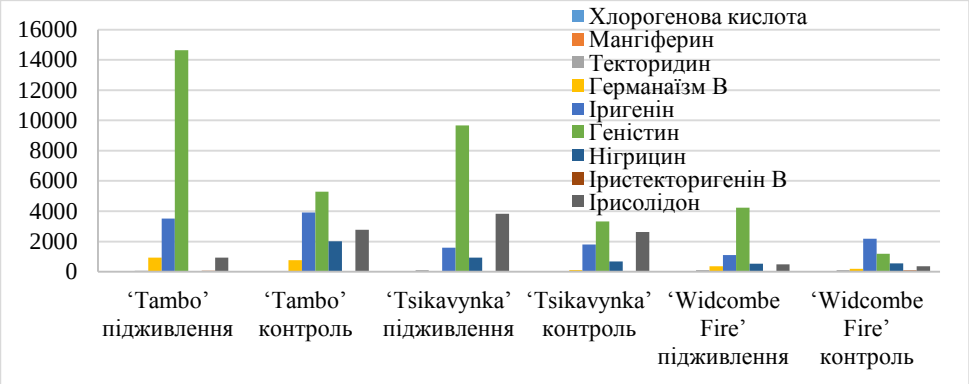


Рис. 25. Вміст маркерних сполук у кореневищах ірисів (ВЕРХ, мкг/г).

Для зразків листя ірисів відмічене збільшення загального вмісту гідроксикоричних кислот та ксантонів при підживленні, а саме вмісту речовин-маркерів – хлорогенової кислоти (з 0,03 мг/г до 0,21 мг/г у сорту Widcombe Fire) та мангіферину (до 0,29 мг/г), що узгоджується з даними фенілпропаноїдного шляху біосинтезу.

Досліди з додатковим монокомпонентним живленням виявили наступну залежність: додаткове живлення збільшувало вміст мангіферину в кореневищах ірисів, тоді як у листках вміст зменшувався, а хлорогенова кислота у кореневищах мала менший вміст або була відсутня, проте достовірно відмічене збільшення вмісту ізофлавонів у кореневищах.

З урахування ґрунтово-кліматичних особливостей регіонів України, а також обґрунтованим застосуванням монокомпонентного живлення при вирощуванні рослин роду Ірис, було запропоновано СОП культивування ірисів з надійним досягненням стабільного вмісту маркерних сполук (ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин, α-ірон, хлорогенова кислота) у ЛРС відповідно до принципів GACP. У досліді використовували два сорти ірисів: *I. x hybrida hort. ‘Indian Pow Wow’, I. x hybrida hort.‘Galleon Gold’* та і. угорський. Етапи належного вирощування включали відповідні параметри як СОП к. посівного (умови культивування, післязбиральна практика, контроль якості, документація).

Стандартизовані умови СОП вирощування ірисів у відповідності до вимог GACP, при внесенні мінеральних добрив, своєчасному поливі та догляді, сприяли одержанню ЛРС зі стабільним вмістом маркерних сполук. Домінанті компоненти мангіферин (7,57–28,75 мкг/г), геністин (3324,82–14642,10 мкг/г), ірисолідон (673,53–2015,81 мкг/г), іригенін (3904,37–14642, 10 мкг/г), які раніше були визначені як фармакологічні маркери, можна запропонувати як хімічні маркери для стандартизації сировини та умов вирощування. Враховуючи, що і. угорський є червонокнижним видом, а попередні дослідження показали перспективність цієї сировини, впровадження рослин у культуру сприяє не тільки збереженню виду, а й розширенню сировинної бази.

Визначення оптимального періоду заготівлі є ключовим фактором для одержання сировини із максимальним вмістом БАР. У вибірку було включено види ірисів з двох пісекцій *Iris* та *Limniris* з 16 популяцій з України, Литви та Латвії. Сировину (листя та кореневища) заготовляли восени та влітку, а кількісний вміст речовин-маркерів визначали ВЕРХ методом.

Було виявлено, що на накопичення ксантонів суттєво впливають сезон і вид, тоді як орган рослини не має істотного впливу. Восени концентрація ксантонів в органах усіх досліджених видів ірисів знижувалася порівняно з літом (Q = 7,64; p < 0,001). Мангіферин накопичувався у значній кількості (до 60 мг/г) у листі та кореневищах *I.* × *germanica* (секція *Iris*) значно більше у літній період, ніж у осінній. В той же час, у сировині *I. pseudacorus* з секції *Limniris* вміст мангіферину і у листі і у кореневищі був дуже низьким осінньої заготовки (не більше 0,4 мг/г) (Рис. 26), що обумовлено процесами онто- та філогенезу даних рослин.

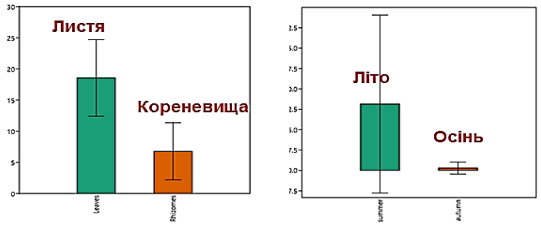


Рис. 26. Загальний розподіл ксантонів у листі та кореневищах ірисів різні сезони.

Аналогічна динаміка була для всіх фенольних сполук: ізофлавони значно більше накопичувались у кореневищах, ніж у листі (Q = 3,75, p = 0,012), а концентрація ізофлавонів у кореневищах була значно нижчою восени, ніж влітку (Q = 2,93, p = 0,046); накопичення гідроксикоричних кислот також значно вище влітку (Q = 3,45, p = 0,019), ніж восени. Загальна динаміка показала, що стадія вегетації ірисів після цвітіння влітку є максимальним періодом розвитку рослин та періодом максимального накопичення БАР у сировині ірисів, на що слід звертати увагу під час належної заготівлі сировини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати комплексного фармакогностичного дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис, а також результати впливу екологічних чинників на якість вихідної сировини рослинного походження з урахуванням дотримання принципів GACP для

теоретичного й експериментального обґрунтування сучасної методології та підходів до одержання культивованої й дикорослої ЛРС та субстанцій зі стабільним вмістом БАР. У роботі обґрунтовано вибір маркерів та наведено шляхи одержання стандартних речовин для контролю якості; встановлено перспективи комплексного використання сировини та індивідуальних речовин як інгібіторів нейрамінідази вірусу грипу, противірусних і протиракових агентів для лікування різних інфекційних захворювань.

1. Проведено аналіз законодавчої бази країн ЄС та України про виробництво ЛРЗ та запровадження рекомендації ВООЗ GACP, що дозволило окреслити актуальний напрям дослідження – доказовість ефективності фітопрепаратів за рахунок мінливості їх хімічного складу та впливу факторів навколишнього середовища на композиційний склад ЛРС і фітопрепаратів.
2. З використанням підходу «Якість шляхом розробки» сплановано дизайн дослідження, визначено критичні атрибути якості рослинних екстрактів, а саме: контроль якості сировини, допоміжних матеріалів і процесу екстракції; визначено потенційно критичні точки виробництва екстрактів за допомогою діаграми Ісікава та методів оцінки ризиків FMEA, включаючи належне вирощування, переробку рослинної сировини, процес екстракції, вибір розчинників.
3. Проведено порівняльне дослідження хімічного складу 57 зразків шафрану з 13 країн світу з факторами навколишнього середовища. Зразки шафрану з України мають показники на рівні зразків з Іспанії, Італії, Марокко, Австралії, Швейцарії та відповідають 1 категорії якості відповідно до вмісту кроцинів, пікрокроцину та шафраналю до вимог ISO 363235. Розробленим ВЕРХ-методом визначено вміст апокаротиноїдів, шафраналю, пікрокроцину та фенольних сполук у шафрані. Встановлено, що вміст сполук контролюється тривалістю сонячного випромінювання, сонячного УФ-індексу та типу ґрунту. Запропоновано методики ВЕРХ та ВЕТШХ для аналізу можливої фальсифікації шафрану, а також метод визначення колхіцину в сировині крокусу, для вирішення питання про можливу токсичність шафрану. Розроблено СОП отримання робочих стандартів пікрокроцину та кроцинів (*t*-4GG, *t*-2G, *t*-3Gg) з шафрану для контролю якості сировини. Проведено порівняльний аналіз монографії ЄФ 9.0 та ISO 3632 на приймочки к. посівного з метою розробки монографії для введення до ДФУ. За результати дослідження розроблено монографію «Шафрану посівного приймочки^{N}» (ДФУ 2.4). Розроблено метод ГХ-МС для одночасного визначення у ЛРС амінокислот, карбонових кислот, а для шафрану додатково шафраналю (50,87-77,59%). Серед компонентів домінантними були *α*-ліноленова, ліноелаїдинова кислота, L-тирозин.
4. Методом мацерації одержано водні та спиртові (70%) екстракти шафрану та проведено їх фармакологічний скринінг, а саме: дослідження *in vitro* екстрактів та індивідуальних речовин, включаючи інгібіторну активність

нейрамінідази, антивірусну (ентеровірус D68, вірус грипу H1N1, коронавірус 229E), протизапальну, антиоксидантну, протиалергійну, експресію NRF2, активність утворення ліпідів, цитотоксичну та антибактеріальну. Серед досліджених видів фармакологічних дій, цитотоксична дія на лінії нейробластоми (SK-N-BE(2)), гліобластоми (U-86) була найбільш вираженою для сухого водного екстракту шафрану, а етанольний – значно знижував життєздатність меланоми (IGR39) та потрійно негативного раку молочної залози (MDA-MB-231).

5. Досліджено хімічний склад побічних продуктів виробництва шафрану – листя, оцвітини та бульбоцибулин, відмічено суттєвий вміст фенольних сполук, амінокислот, карбонових кислот, макро- і мікроелементів у сировині. Окремо вивчено хімічний склад листя та оцвітини видів та сортів крокусів, серед яких *Crocus speciоus* є найбільш перспективним. Вперше виділено 16 індивідуальних речовин з оцвітини к. посівного методом колонкової хроматографії, серед них космосіїн, текторидин, софорофлавонолозид, нігрицин, іристекторигенін В, мангіферин, рутин, ферулова кислота виділено вперше, крім того виділено раніше описані кверцетин, астрагалін, кемпферол, ізоорієнтин, ізорамнетин, ізокверцитрин, хлорогенову та неохлорогенову кислоти.

6. Фармакологічний скринінг побічних продуктів виробництва показав, що водний та етанольний екстракти бульбоцибулин крокусу мали значну протиалергійну дію, та виражений захисний ефект проти вірусу грипу (30-40% захист); виражену цитотоксичну дію до SK-N-BE(2) (EC_{50} 0,018 мг/мл) та U-87 (EC_{50} 0,02 мг/мл). Полісахаридний комплекс з БЦ показав найвищу активність до MDA-MB-231 та IGR39 (EC_{50} 0,2 мг/мл). Обидва екстракти з БЦ крокусу (200 мг/кг) проявляли виражені протизапальні властивості *in vivo*. Екстракти оцвітини проявили перспективну антиоксидантну, протиалергійну та цитотоксичну дію до MDA-MB-231 та IGR39. Розроблено параметри стандартизації для сировини та екстрактів к. посівного.

7. Проведено скринінг видів та сортів листя і кореневищ 34 сортів та 38 видів рослин роду Ірис з України, Азербайджану, Литви та Латвії. Розроблено ВЕРХ-ДМД методику аналізу фенольних сполук ірисів, яку було апробовано на кореневищах і. блідого, і. угорського, і. сибірського, і. строкатого, яка дозволила ідентифікувати та встановити вміст 25 сполук фенольної природи у дослідних зразках ірисів. Домінантними речовинами були мангіферин, текторидин, германаїзм В, 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавон, іристекторигенін В, іригенін. Для визначення оптимальних умов збору у дикій природі сировини видів ірис, проведено кореляційне дослідження хімічного складу рослин та їх взаємозв’язок з факторами навколишнього середовища (географічні, кліматичні та едафічні). Вміст фенольних сполук у ірисів контролюється тривалістю сонячної радіації, сонячного УФ-індексу та типу ґрунту.

8. Досліджено склад карбонових кислот для кореневищ та листя *I. graminea, I. sibirica, I. halophila, I. pallida, I. variegata, I. pumila, I. musulmanica, I. carthaliniae, I. medwedewii*. У кореневищах переважає (1 5%-53 %) вміст насичених, а в листі – ненасичені кислоти. Серед органічних домінантними є лимонна, яблучна, щавлева кислоти. Проведено дослідження терпеноїдів кореневищ та листя 27 видів та сортів рослин роду Ірис. Загальний вихід ефірної олії кореневищ ірисів становить від 0,02 % до 0,58 %. Домінантною сполукою є *α*-ірон (до 2,85 %). Вперше у видах ірисів виявлені нортерпеноїди та їх похідні: *β*-дамаскенон, *β*-іонон-5,6-епоксид, *β*-іонон. Встановлено переспективність кореневищ малодосліджених ірисів (*I. musulmanica, I. virginica, I. notha, I. halophila, I. hybrida Stocholm* ін.) за рахунок високого вмісту маркерних речовин ефірної олії (*β*-іонон, *α*-ірон, транс-2,6-*γ*-ірон).

9. Одержано сухі екстракти (вода, 70% етанол, полісахаридні комплекси) з листя та кореневищ видів ірисів, визначено їх хімічний склад (фенольні сполуки, амінокислоти, апокаротиноїди). Найбільш виражену антибактеріальну дію проявив етанольний екстракт листя і. сибірського, протиалергійну та протиентеровірусну дію – водний екстракт кореневищ і. строкатого, а цитотоксичну, протигрипозну та протиентеровірусну дію проявили екстракти кореневищ і. угорського. Модифікованою методикою колонкової хроматографії з кореневищ і. угорського виділено 30 фенольних сполук, з них 12 сполук вперше: кікалідон, ірисолідон, іристекторин В, іристекторигенін В, 5,6-дигідрокси-7,8,3’,5’-тетраметоксиізофлавон, германаїзм В, ірилон, апігенін-7-глюкозид, ізокверцитрин, кемпферол, корична та кумарова кислоти. Крім того виділено: нігрицин, іригенін, ононін, геністеїн, дайдзеїн, формононетин, мангіферин, ізомангіферин, текторигенін, текторидин, гіперозид, апігенін, кверцетин, ембінин, хлорогенову, неохлорогенову, кофейну, ферулову кислоти. Методом ChemGPS-NP встановлено, що найбільш прогностичними протиентеровірусними (D68) сполуками є ірисолідон, кікалідон, кемпферол, а протигрипозними (H1N1) – апігенін, кверцетин, кемпферол, що підтвержено дослідженнями *in vitro*.

10. Після аналізу закономірності зв’язку «хімічний склад–активність» та в результаті оцінки критеріїв Herb MaRS було обрано п’ять основних маркерних сполук для шафрану: кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин та апігенін, для його побічних продуктів виробництва – кроцин, рутин, ізокверцитрин, ізоорієнтин, кемпферол, кверцетин, ферулову кислоту, мангіферин, L-пролін, L-піроглютамінова кислота на основі їх протиракового потенціалу. Для сировини ірисів сполуками-маркерами вставновлено: ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин, хлорогенова кислота, *α*-ірон з урахуванням їх протиракової та противірусної дії.

11. Для к. посівного та рослин роду Ірис розроблені СОП щодо належного культивування рослин відповідно до керівних принципів GACP в умовах України для одержання якісної сировини для фармацевтичної галузі. Застосування екологічно безпечного методу передпосівної обробки бульбоцибулин к. посівного електромагнітним полем, показало значне

збільшення вмісту кроцинів та антиоксидатної дії оцвітини і листя. Доведено позитивний вплив контрольованого вирощування ірисів із застосуванням мінерального живлення розчином сульфату магнію, хелатів заліза та калію на вміст ізофлавоноїдів (текторидин, нігрицин D-глюкозид, генистин, іристекторігенін В, нігрицин, іригенін, ірисолідон), мангіферину, а також хлорогенової кислоти в листках ірисів методом ВЕРХ.

12. Результати проведених фармакогностичних досліджень підтверджують перспективність впровадження в фармацевтичну та медичну практику нового виду ЛРС к. посівного та видів ірисів та розроблення ЛЗ на основі їх сировини. Відповідно до «Міжнародного статистичного класифікатору хвороб та споріднених проблем охорони здоров'я Десятого перегляду», отримані дані фармакологічної дії досліджуваних рослинних субстанцій мають перспективу у розробці лікарських засобів для лікування: вірусні інфекції (A85(B00.4); A88; B30.8(H13.1); B97.1); бактеріальні захворювання (A51; B37; B95.6; B96.2; B96.5; B99); захворювання органів дихання (грип та пневмонія): (J10.0; J10.1; J10.8; J11); злоякісні новоутворення (C43; C50; C71).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Затильнікова О. О**. Елементний склад *Iris sibirica* L. *Український медичний альманах*. 2013; 16*(2)*, 30–31.

2. Gontova T. N., **Zatylnikova O. A**. Comparative morphological and anatomical study of leaves and stems of *Iris pseudacorus* and *Iris sibirica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2013; 5*(3)*, 574–578. (*Особистий внесок*: формування основної ідеї роботи, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті) [Q2].

3. Kovalev V. N., **Mikhailenko O. A**., Vinogradov B. A. Aromatic compounds and terpenoids of *Iris hungarica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2014; 50*(1)*, 161–162. (*Особистий внесок*: дизайн роботи, участь в обговоренні та узагальненні експериментальних даних, написанні та оформленні статті) [Q3].

4. **Mykchailenko O. A**., Kovalyov V. N., Kovalyov S. V. Chromatography-mass spectrometric study of bioactive substances of rhizomes with roots of *Iris pseudacorus f. alba*. *Фармация Казахстана*. 2015; 3*(166)*, 38–41. (*Особистий внесок*: дизайн роботи, інтерпретація результатів, написання статті).

5. **Михайленко О. О**. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку противірусних лікарських засобів. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика.* 2015; 24, 336–343.

6. Kovalyov V. N., **Mykhailenko O. A.**, Isaev D. I., Gurbanov G. M. Quantitative determination of mangiferin in rhizomes of *Iris hungarica* and *Iris subirica* by HPLC. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal.* 2016; 1, 13–17. (*Особистий внесок*: дизайн роботи, розробка методик, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті) [Q4].

7. **Mykchailenko O. O**., Kovalyov V. M. Phenolic compounds of the genus *Iris* plants (*Iridaceae*). *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2016; 65*(2)*, 70–77. (*Особистий внесок*: планування та проведення експерименту, інтерпретація результатів, написанні статті) [Q3].
8. Isaev D. I., **Mikhailenko O. A.**, Gurbanov G. M., Kovalev V. N. Constituents of essential oils from Azerbaijan *Iris medwedewii* and *I. carthaliniae* rhizomes. *Chemistry of Natural Compounds.* 2016; 52*(3)*, 748–750. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, інтерпретація даних, оформленні статті) [Q3].
9. Kovalev V. M., **Mykhailenko O. O.**, Krechun A. V., Osolodchenko T. P. Antimicrobial activity of extracts of *Iris hungarica* and *Iris sibirica. Annals of Mechnikov Institute*. 2017; 2, 57–64. (*Особистий внесок*: дизайн роботи, інтерпретація результатів фармакологічних досліджень ірису сибірського, оформлення статті).
10. Isaev J. I., **Mykchailenko O. O.**, Kovalyov V. N., Gurbanov G. M., Suleymanov M.Y. Gas chromatography-mass spectrometry studies of the component composition of carboxylic acids of the rhizomes of *Iris medwedewii* and *Iris carthaliniae* (*Iridaceae*). *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017; 66*(1)*, 9–14. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, участь в обговоренні та узагальненні експериментальних даних, написанні та оформленні статті) [Q3].
11. **Mykhailenko O.**, Kovalyov V., Kovalyov S., Toryanik E., Osolodchenko T., Buidin Y. Fatty acid composition of lipids of *Iris sibirica*. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017; 66*(5)*, 220–227. (*Особистий внесок*: планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту, написання статті) [Q3].
12. **Mykhailenko O**. Composition of volatile oil of *Iris pallida* Lam. from Ukraine. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018; 15, 85–90 [Q3].
13. **Mikhailenko O. A**., Krechun A. V., Kovalev V. N. Carboxylic acids from *Iris graminea* and *I. halophila*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2018; 54*(5)*, 956–958. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, аналіз та узагальненні експериментальних даних, написанні статті) [Q3].
14. Шаталова О. М., **Михайленко О. О.** Експериментальне дослідження протизапальної активності екстрактів з рослин родини *Iridaceae*. *Український біофармацевтичний журнал.* 2019; 1*(58)*, 39–43. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, участь у проведенні фармакологічної, технологічної та хімічної частини, аналіз результатів, написанні статті).
15. **Михайленко О. О.** Дослідження біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного (шафран) з України. *Фармацевтичний журнал.* 2019; 74, 70–77.
16. **Mykhailenko O.**, Kovalyov V., Goryacha O., Ivanauskas L., Georgiyants V. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry.* 2019; 162, 56 – 89. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, пошук та аналіз даних, узагальнення

і висновки; систематизація інформації, написання та оформлення статті) [Q1].

17. **Mykhailenko O.**, Gudžinskas Z., Kovalyov V., Desenko V., Ivanauskas L., Bezruk I., Georgiyants V. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* species from Latvia, Lithuania and Ukraine. *Phytochemical Analysis*. 2020; 31*(1)*,1–19. (*Особистий внесок*: планування та проведення експерименту, інтерпретація даних, написання статті) [Q1/Q2].

18. **Mykhailenko O.**, Ivanauskas L., Bezruk I., Lesyk R., Georgiyants V. Comparative investigation of amino acids content in the dry extracts of *Juno bucharica, Gladiolus hybrid zefir, Iris hungarica, Iris variegata* and *Crocus sativus* raw materials of Ukrainian flora. *Scientia Pharmaceutica.* 2020; 88*(1)*, 8–21. (*Особистий внесок*: формування основної ідеї, участь у проведенні експерименту, аналіз та узагальнення даних, написання статті) [Q2].

19. **Mykhailenko O**., Kovalyov V., Orlova T. Chemical composition of the essential oil of several *Iris* species. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020; 44*(3)*, 178–185. (*Особистий внесок*: постановка задачі дослідження, участь у плануванні експерименту, аналізі результатів, написанні статті) [Q3].

20. **Mykhailenko O.**, Desenko V., Ivanauskas L., Georgiyants V. Standard operating procedure of Ukrainian saffron cultivation according with Good Agricultural and Collection Practices to assure quality and traceability. *Industrial Crops and Products.* 2020; 151, 112376–112387. (*Особистий внесок*: розробка стратегії належного вирощування, проведення хімічного та агрохімічного дослідження, обговорення результатів та написання статті) [Q1].

21. Jarukas L., **Mykhailenko O.**, Baranauskaite J., Marksa M., Ivanauskas L. Investigation of organic acids in saffron stigmas (*Crocus sativus* L.) extract by derivatization method and determination by GC/MS. *Molecules.* 2020; 25, 3427–3437. (*Особистий внесок*: участь у плануванні та проведенні аналітичної роботи, аналізі результатів, написанні статті) [Q1].

22. **Mykhailenko O.**, Korinek M., Ivanauskas L., Bezruk I., Myhal A., Petrikaitė V., El-Shazly M., Yen C.-H., Chen B.-H., Georgiyants V., Hwang T.-L. Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian *Iris* species: A fresh look on their content and biological activities. *Molecules.* 2020; 25, 4588–4612. *(Особистий внесок*: формування ідеї, проведення хімічного експерименту, інтерпретація даних хімічного та фармакологічних досліджень, написання статті) [Q1].

23. **Михайленко О. А.**, Десенко В. Г., Дмитренко Т. Е., Георгиянц В. А. Влияние удобрений на биоаккумуляционных свойства корневищ *Iris pumila* «Violet carpets» и их химический состав. *Наука и инновация.* 2020; 4, 92–97. (*Особистий внесок*: розробка стратегії монокомпонентного живлення рослин, проведення експерименту, обговорення результатів, написання статті).

24. **Mykhailenko O.**, Bezruk I., Ivanauskas L., Georgiyants V. Comparative analysis of the major metabolites of Ukrainian saffron samples by HPLC. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2021; 76, 394–396. (*Особистий внесок*: планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів) [Q1].

25. **Mykhailenko O.**, Gudžinskas Z., Romanova S., Orlova T., Kozura S., Harna S., Volochai V. The comparative analysis of carboxylic acid composition in four *Iris* species from Ukraine. *Chemistry and Biodiversity*. 2021; 18, e2000969–e2000978. (*Особистий внесок*: дизайн дослідження, інтерпретація результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q2].
26. **Михайленко О. О.**, Котов А. Г., Котова Е. Е., Сіра Л. М., Ковальов В. М., Георгіянц В. А. Розробка методик стандартизації приймочок крокуса посівного (шафран) для включення у проект монографії Державної Фармакопеї України. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021; 19, 1*(73)*, 32 – 41. (*Особистий внесок*: планування експерименту, проведення стандартизації, узагальнення результатів експерименту, написання статті).
27. **Mykhailenko O.,** Petrikaitė V., Korinek M., El-Shazly M., Chen B.-H., Yen C.-H., Hsieh C.-F., Bezruk I., Dabrišiūtė A., Ivanauskas L., Georgiyants V., Hwang T.-L. Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (*Crocus sativus* stigma): moving from correlation toward causation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021; 21, 203–218. (*Особистий внесок*: планування екперименту, проведення хімічного експерименту, узагальнення результатів, написання статті) [Q1].
28. **Mykhailenko O.**, Bezruk I., Ivanauskas L., Lesyk R., Georgiyants V. Characterization of phytochemical components of *Crocus sativus* leaves using HPLC-MS/MS and GC-MS: a new potential by-product. *Scientia Pharmaceutica*. 2021; 89*(2)*, 28–45. (*Особистий внесок*: планування та проведення хімічного експерименту, узагальнення результатів, написання статті) [Q2].
29. **Mykhailenko O.**, Ivanauskas L., Bezruk I., Marksa M., Borodina O., Georgiyants V. Effective and simple approach for colchicine determination in saffron parts. *Food Chemistry*. 2022; 368, 130862–130867. (*Особистий внесок*: дизайн та проведення експерименту, обговорення результатів, написання статті) [Q1].
30. **Mykhailenko O.**, Volochai V., Bezruk I., Mishchenko V., Ivanauskas L., Georgiyants V. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Crocus speciosus* leaves. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 2022; 91*(1)*, 207–221. (*Особистий внесок*: планування та проведення хімічного експерименту, обговорення результатів, висновків та написання статті) [Q3].
31. **Mykhailenko O.**, Petrikaite V., Korinek M., Chang F.-R., El-Shazly M., Yen C.-H., Bezruk I., Chen B.-H., Hsieh C.-F., Lytkin D., Ivanauskas L., Georgiyants V., Hwang T.-L. Pharmacological potential and chemical composition of *Crocus sativus* leaf extracts. *Molecules*. 2022; 27, 10–27. (*Особистий внесок*: формування ідеї, проведення хімічного експерименту, інтерпретація результатів, написання статті) [Q1].
32. **Mykhailenko O.**, Bezruk I., Ivanauskas L., Georgiyants V. Comparative analysis of apocarotenoids and phenolic constituents of *Crocus sativus* stigmas from eleven countries: ecological impact. *Archiv der Pharmazie*. 2022; 355*(4)*,

e2100468–e2100484. (*Особистий внесок*: дизайн експерименту, аналіз та інтерпретація результатів, формування висновків та написання статті) [Q2].

33. **Mykhailenko O.**, Ivanauskas L., Bezruk I., Petrikaitė V., Georgiyants V. Application of Quality-by-Design approach to the pharmaceutical development of anticancer crude extracts of *Crocus sativus* perianth. *Scientia Pharmaceutica*. 2022; 90*(1)*, 19–42. (*Особистий внесок*: дизайн дослідження з підходом QbD, проведення хімічного експерименту, обговорення результатів, написання статті) [Q2].

34. **Mykhailenko O.**, Buydin Y., Ivanauskas L., Krechun A., Georgiyants V. Innovative GACP approaches for obtaining the quality *Iris hybrida* leaves for the pharmaceutical industry. *Chemistry and Biodiversity.* 2022; 19, e202200149–e202200160. (*Особистий внесок*: розробка належного вирощування, проведення хімічного, агрохімічного дослідження, аналіз, написання статті) [Q2].

35. **Mykhailenko O.**, Chetvernya S., Bezruk I., Buydin Y., Dhurenk N., Palamarchuk O., Ivanauskas L., Georgiyants V. Bioactive Constituents of *Iris hybrida* (Iridaceae): processing effect. *Biomedical Chromatography*. 2022; 36(*7*), 5369–5381. (*Особистий внесок*: розробка стратегії належного вирощування рослин, проведення дослідження, аналіз результатів, написання статті) [Q3].

36. Jarukas L., Vitkevicius K., **Mykhailenko O.**, Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Effective isolation of picrocrocin and crocins from saffron: from HPTLC to working standard obtaining. *Molecules.* 2022; 27(*13*), 4286–4300. (*Особистий внесок*: формування ідеї СОП одержання робочих стандартів для шафрану, проведення експерименту, обговорення результатів, написання статті) [Q1].

37. **Mykhailenko O.**, Saidov N.B., Ivanauskas L., Georgiyants V. Model implementation of the legal regulation on medicinal plant cultivation for pharmaceutical purposes. Case study of *Crocus sativus* cultivation in Ukraine. *Botanica*. 2022; 28(*1*), 27–38. (*Особистий внесок*: розробка стратегії належного вирощування рослин, проведення аналізу законодавчої бази, агрохімічного дослідження, аналіз результатів, написання статті) [Q4].

38. **Mykhailenko O.**, Hsieh C.-F., El-Shazly M., Nikishin A., Kovalyov V., Shynkarenko P., Ivanauskas L., Chen B.-H., Chang F.-R., Horng J.-T., Hwang T.-L., Georgiyants V., Korinek M. Anti-viral and anti-inflammatory isoflavonoids from Ukrainian *Iris aphylla* rhizomes: structure-activity relationship coupled with ChemGPS-NP analysis. *Planta Medica.* 2023; 89(*11*), 1063–1073. (*Особистий внесок*: планування хімічного експерименту, участь в експериментальній роботі, інтерпретації результатів та написанні статті) [Q1].

39. Троїцький М. О., Троїцька Т. Б., Буйдін Ю. В., Мірошніченко Н. О., **Михайленко О. О.** Класифікації роду *Iris* L. на біологічному та молекулярному рівні як основа для сучасних філогенетичних досліджень. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021;19(*4*), 12–19. (*Особистий внесок*: участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті).

40. **Михайленко О. О**., Ковальов В. М., Георгіянц В. А., Демченко О. М., Шакало В.В. Спосіб культивування, збирання та зберігання шафрану: пат. 135685 на кор. мод. України МПК (2019.01): A01B 79/00, A01C 14/00, A01D 91/00, A01F 25/00. № u 201901401 ; заявл. 11.02.2019 ; опубл. 10.07.2019, Бюл. № 13. (*Особистий внесок*: розробка стратегії належного вирощування крокусу, участь у проведенні експерименту, обговорення результатів, оформлення патенту).
41. **Михайленко О. О**., Петрікайте В., Іванаускас Л., Ковальов В.М., Георгіянц В.А. Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю з оцвітини крокуса посівного: пат. 124210 на винахід України МПК: A61K 36/88 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 39/06 (2006.01). № a 2019 10648 ; заявл. 28.10.2019 ; опубл. 04.08.2021, Бюл. № 31. (*Особистий внесок*: розробка стратегії одержання екстракту, участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів, оформлення патенту).
42. **Михайленко О. О**., Петрікайте В., Іванаускас Л., Ковальов В.М., Георгіянц В.А. Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю з оцвітини крокуса посівного: пат. 142213 на кор. мод. України МПК: A61K 36/88 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 39/06 (2006.01). № u 201910657 ; заявл. 28.10.2019 ; опубл. 25.05.2020, Бюл. № 10. (*Особистий внесок*: розробка стратегії одержання рослинної субстанції, участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів, оформлення патенту).
43. **Михайленко О. О**., Петрікайте В., Іванаускас Л., Ковальов В.М., Георгіянц В.А. Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю з листя крокуса посівного: пат. 146567 на кор. мод. України МПК (2021.01): A61K 36/00, A61P 31/04 (2006.01), A61P 39/06 (2006.01). № u 2020 05762 ; заявл. 07.09.2020 ; опубл. 03.03.2021, Бюл. № 9. (*Особистий внесок*: розробка стратегії одержання екстрактів, участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів, оформлення патенту).
44. **Михайленко О. О.,** Десенко В. Г., Чабовська О. І. Дослідження умов культивування рослин родів *Crocus, Iris, Gladiolus*. *Збірник наукових праць Національного наукового центру «Інститут землеробства НААН» (Рослинництво)*. 2018. № 1. Р. 95 – 109. (*Особистий внесок*: планування експерименту, вирощування рослин, аналіз даних, написання статті).
45. **Михайленко О. О**., Ковальов В. М., Кречун А. В. Оптимальні умови вирощування харчової та лікарської рослинної сировини приймочок шафрану (*Crocus sativus* L.) в Україні: Інформаційний лист № 376-2018, вип. 49 з проблеми «Фармація», Київ, 2018. 8 с.
46. **Михайленко О. О**., Ковальов В. М., Георгіянц В. А. Спосіб культивування шафрану відповідно до норм Належної практики вирощування, збирання та зберігання лікарської рослинної сировини (Agricultural and Collection Practice, GACP): твір № 88048:АПС/2816-19 від 04.04.2019. Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, Київ, 2019.

47. **Михайленко О.О**., Шакало В.В., Демченко О.М., Георгіянц В.А. Стратегії вирощування шафрану в Україні. Методичні рекомендації з оптимізації технології вирощування та збору шафрану (*Crocus sativus*) в різних ґрунтово-кліматичних зонах України. Харків. 2019. – 48 с.

Деякі тези доповідей:

48. **Mykhailenko O. O**. Analysis of essential oil of leaves of *Iris germanica* L. Science and Practice 2015: abstracts of the *6th International Pharmaceutical Conference*, 5 – 6th November 2015, Kaunas, Lithuania, 2015. P. 30–31.

49. **Михайленко О. О**. Визначення якості шафрану відповідно до норм ISO 3632. *Управління якістю в фармації*: мат. XII Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 18 травня 2018 р. Харків, НФаУ, 2018. С. 135–136.

50. **Mykhailenko O**., Korinek M., Chen B. H., Hwang T. L., Georgiyants V. Phenolic compounds from *Iris hungarica* as potential anti-inflammatory agent / *Free Radical Biology and Medicine.* 2021, № 165, P. 44–45. 20th Biennial Meeting of SFRR International. 15 – 18th March 2021, Spain, 2021.

51. **Mykhailenko O**., M. Korinek, T.-L. Hwang, C.-H. Yen, F.-R. Chang, B.-H. Chen, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. Sophoraflavonoloside and cosmosiin from *Crocus sativus* perianth. *36th Symposium on the Natural Products & Symposium on Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 15–16 October, 2021, Taipei Medical University. Taiwan, 2021. P. 62.

52. Mildaziene V., **Mykhailenko O**., Malakauskiene A., Ivanauskas L., Georgiyants V. Changes in bioactive compounds content of *Crocus sativus* stigma during pre-sowing corms treatment. *Synthesis and Analysis of Drugs*, 7–9th September, 2022, Brno, Czech Republic, Faculty of Pharmacy, Masaryk University. P23. P.60.

53. **Mykhailenko O**., Lytkin D., Georgiyants V. *Crocus* and *Iris* extracts with regard anti-inflammatory properties. *Natural Products in Drug Discovery and Development – Advances and Perspectives,* Iasi, Romania, 19 – 22 September, 2022. P. 158.

54. **Mykhailenko O**. Cultivated medicinal plants in Ukraine: achievements and prospects. *Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity*, 21st of April 2023, dedicated to the 1st anniversary of the Pharmacognosy Club of LSMU. 24 p.

55. **Mykhailenko O**. Saffron: the “golden flower» of Ukraine. *71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research* (GA), Trinity College, Dublin, 2-5 July, 2023 P. 109.

АНОТАЦІЯ

Михайленко О.О. Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис: перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування. – Кваліфікаційна наукова праця у вигляді рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія,

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2024.

Дисертаційна робота присвячена теоретичному обґрунтуванню та експериментальному вирішенню наукової проблеми пошуку та забезпечення якості нових фітосубстанцій крокусу посівного та рослин роду Ірис з використанням сучасних наукових підходів для комплексного використання рослин та забезпечення стабільного складу БАР у лікарській рослинній сировині шляхом визначення умов та етапів належного вирощування.

Проведено порівняльне досліджено хімічний склад 57 зразків шафрану з 13 країн світу; побічних продуктів виробництва шафрану – листя, оцвітини та бульбоцибулин; 9 сортів листя та 5 сортів квітів крокусів; 38 видів та 34 сортів ірисів. Встановлено вплив факторів навколишнього середовища та закономірності накопичення та домінуючі речовини для сировини к. посівного та рослин роду Ірис. Розроблено методики аналізу апокаротиноїдів, фенольних сполук, карбонових кислот, амінокислот та колхіцину. Розроблено СОП одержання робочих стандартів кроцинів та пікрокроцину для контролю якості шафрану. Виділено та встановлено будову 46 індивідуальних речовин. У *in silico* та *in vitro* аналіз включено 24 індивідуальні сполуки та 30 оригінальних сухих рослинних екстрактів, для яких проведені фармакологічні дослідження. Розроблено параметри належного культивування рослин для забезпечення простежуваності сировини та її якості. Апробовано нові методи холодної плазми та монокомпонентного живлення при вирощуванні рослин для стимуляції біосинтезу та стабільного вмісту БАР. Проведені дослідження підтверджують перспективність впровадження в фармацевтичну практику нового виду ЛРС крокусу посівного та рослин роду Ірис у якості протиракових та противірусних рослинних засобів.

Ключові слова: крокус посівний, види ірисів, сорти ірисів, фармакогностичне дослідження, належна практика вирощування лікарських рослин, виділення БАР, стандартизація, віртуальний скринінг, фармакологічна активність.

ANNOTATION

Mykhailenko O.O. Pharmacognostic study of *Crocus sativus* and *Iris* genus plants: prospects for the complex use and optimization of growing conditions. – Qualified scientific work as the manuscript.

The thesis for the Doctor of Pharmaceutical Sciences Degree in Specialty 15.00.02 Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2024.

The dissertation is devoted to the theoretical justification and experimental solution of the scientific problem of finding and ensuring the quality of new phytosubstances of *Crocus sativus* and *Iris* genus plants using modern scientific approaches for the complex use of plants and ensuring a stable composition of bioactive components in herbal raw materials (HRM) by determining the conditions and stages of proper cultivation. The planning of the experiment was carried out

using the "Quality by development" approach; a quantitative assessment of risks (Ishikawa diagram), their analysis and interpretation of data, selection of critical manufacturing stages, which must be controlled in the process of determining the quality indicators of plant extracts, were carried out. The chemical composition of 57 samples of saffron from 13 countries; saffron by-products – leaves, perianth, corms; 9 leaves and 5 flowers of *Crocus* varieties; 38 *Iris* species and 34 varieties have been compared. Quality of saffron samples was investigated by ISO 3632. HPLC, HPTLC and GC-MS methods for the analysis of apocarotenoids, phenolic compounds, carboxylic acids, amino acids and colchicine have been developed. The phenolic compounds content and apocarotenoids is correlated with the duration of solar radiation, solar UV index and soil type. The SOP was developed for the preparation of picrocrocin and crocins (*t*-4GG, *t*-2G, *t*-3Gg) standards for routine saffron quality control. According to the results of experimental studies, the monograph "Saffron *Crocus sativus*^{N}" (SPU 2.4) was developed and implemented. The cytotoxic effect on the glioblastoma line was the most pronounced for the saffron dry water extract, and the ethanolic extract significantly reduced the viability of melanoma and triple-negative breast cancer. For the first time sophoroflavonoloside, cosmosiin, tectoridin, nigricin, iristorigenin B, mangiferin, rutin, ferulic acid were isolated from *C. sativus* perianth by column chromatography as well as previously described quercetin, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, astragalin, kaempferol, isoorientin, isorhamnetin, isoquercitrin. Dry extracts of *C. sativus* corms showed a pronounced antiallergic, antiviral, cytotoxic effect against cancer cells of neuroblastoma (EC_{50} 0.018 mg/mL), glioblastoma U-87 (EC_{50} 0.02 mg/mL); polysaccharide complex was active against IGR39 (EC_{50} 0.2 mg/mL). *C. sativus* leaves and perianth extracts showed a pronounced antioxidant effect. All extracts obtained belong to toxicity class V according to Sidorov's classification. *In vivo* studies have confirmed the pronounced anti-inflammatory effect of *Crocus* corm extracts. *C. sativus* HRM and extracts have been standardized.

The HPLC-DAD method for *Iris* phenolic compounds analysis was modified and tested on *I. hungarica, I. sibirica, I. variegata* and *I. pallida* rhizomes. The method makes it possible to identify and establish the content of 25 phenolic compounds in all test *Iris* species samples. The dominant compounds were mangiferin, tectoridin, germanaism B, irigenin, iristectorigenin B, 5,6-dihydroxy-7,8,3',5'-tetramethoxyisoflavone. Correlation analysis between environmental factors and phenolic compounds content in the rhizomes and leaves of *I. germanica, I. pseudacorus, I. sibirica, I. halophila* from 16 populations of Ukraine, Lithuania and Latvia showed that the duration of solar radiation and the phosphorus content in the soil have a positive effect on the accumulation of compounds in the samples. The composition of higher and lower carboxylic acids and terpenoids in the rhizomes and leaves of *Iris* species was also studied. From *I. hungarica* rhizomes 30 compounds were isolated, among them 12 for the first time (kikalidone, irisolidone, iristectorin B, iristectorigenin B, 5,6-dihydroxy-7,8,3',5'-tetramethoxyisoflavone, germanaism B, irilon, apigenin glucoside 7, isoquercitrin, kaempferol, cinnamic and coumaric acids). *I. sibirica* leaf ethanolic extract showed a pronounced antibacterial effect; antiallergic and antienteroviral effects were noted for *I. varietaga* rhizomes

water extract; *I. hungarica* rhizome extracts showed higher cytotoxic, anti-influenza and anti-enteroviral effects. Using the ChemGPS-NP method, it was found that the most prognostic anti-enteroviral compounds can be irisolidone, kikalidone, kaempferol, and anti-influenza compounds can be apigenin, quercetin, kaempferol, which is confirmed by *in vitro* studies. The quality markers for C. sativus and Iris genus plants HRM and extracts were selected using the HerbMars approach and the experimental data obtained taking into account their anticancer and antiviral potential.

For *C. sativus*, *I. hungarica*, *Iris* varieties "Indian Pow Wow" and "Galleon Gold" SOP for proper cultivation as per WHO GACP guidelines have been developed. A positive effect on the marker compounds content in HRM has been shown when using stress methods (cold plasma, vacuum, electromagnetic field) of *C. sativus* corms pre-sowing treatment and monocomponent nutrition (iron chelate, potassium chelate, magnesium sulfate) for *Iris* ("Tsikavynka", "Talibo", "Widcombe Fire") during cultivation. The optimal time for collecting *Iris* HRM is summer due to the maximum accumulation of phenolic compounds.

Key words: *Crocus sativus*, *Iris* species, *Iris* varieties, pharmacognostic research, good agricultural and collection practice for medicinal plants, isolation of natural compounds, standardization, virtual screening, pharmacological activity.

Підписано до друку 04.06.24
Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Друк на різографі. Зам. №04/06-1
Ум. друк. арк. 1,8
Наклад 100 прим.

Друк: ФОП Мацько Б.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924
Виписка з ЄДР №2010350000000170709 від 05.07.2022 р.