

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**МИХАЙЛЕНКО ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 615.27:615.322:582.579.2:581.192:581.5

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис:  
перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О.О. Михайленко

Науковий консультант Георгіяниц Вікторія Акопівна,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Львів – 2024

## АНОТАЦІЯ

*Михайленко О.О.* Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис: перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах 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 біологічно активних компонентів у лікарській рослинній сировині шляхом визначення умов та етапів належного вирощування.

Планування експерименту зроблено з урахуванням підходу «Якість шляхом розробки» для забезпечення оптимізації цілеспрямованого пошуку протипухлинних/противірусних рослинних екстрактів з сировини крокусу посівного та рослин роду Ірис. Визначено критичні етапи забезпечення якості рослинних екстрактів, а саме: контроль якості сировини, допоміжних матеріалів і процесу екстракції. За допомогою діаграми Ісікава (якісна оцінка ризиків) та за допомогою Аналізу режиму відмови та наслідків (кількісна оцінка) були визначені потенційно критичні точки виробництва, що впливають на якість рослинних екстрактів: умови вирощування, переробка рослинної сировини, технологія екстракції.

Проведено порівняльне дослідження хімічного складу 57 зразків шафрану з 13 країн світу (в тому числі 35 зразків з 12 регіонів України). Досліджено побічні продукти виробництва шафрану – листя, оцвітину та бульбоцибулини. Проведено хімічний аналіз рослин роду Ірис, що включав 38 видів та 34 сортів з України, Азербайджану, Литви та Латвії.

Відповідно до вимог ISO 363235 встановлено, що 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. Обґрунтовано доцільність використання методу подрібнення сировини у рідкому азоті, що збільшує вихід кроцинів у 3,5 рази порівняно зі звичайним подрібненням. Вперше розроблена методика ВЕРХ дозволила точно визначити апокаротиноїди, шафраналь, пікрокроцин та фенольні сполуки у зразках шафрану. За вмістом кроцин *t*-4GG українські зразки шафрану були більш подібні до шафрану зі Швейцарії (446-475 мг/г). Кореляційний аналіз вмісту речовин-маркерів шафрану з факторами навколишнього середовища показав, що вміст фенольних сполук та апокаротиноїдів корелюється тривалістю сонячного випромінювання, сонячним УФ-індексом та типом ґрунту. Для українських зразків відмічене збільшення вмісту кроцину та пікрокроцину у шафрані з північно-східних регіонів України та зменшення ближче до південно-західних районів вирощування, але врожайність сировини протилежна. Вперше розроблено метод ГХ-МС для одночасного визначення у рослинній сировині амінокислот, карбонових кислот, а для шафрану – маркерної сполуки – шафраналю (вміст від 50,87 до 77,59%). Серед компонентів шафрану, домінуючими були  $\alpha$ -ліноленова, ліноелаїдинова кислота, L-тирозин.

Запропоновано методики ВЕРХ та ВЕТШХ для виявлення можливих фальсифікацій шафрану та подальшої стандартизації сировини. Кроцин, пікрокроцин, у протестованих фальсифікатів (куркума, сафлор, нагідки, чорнобривці, жовті тичинки тюльпану) не виявлено. Дані ВЕТШХ корелювали з даними аналізу ВЕРХ, де характерні піки кроцину (UV  $\lambda_{\max}$  261, 440, 466 нм) були відсутні у фальсифікатів. Розроблена методика ВЕРХ для визначення колхіцину в сировині к. посівного дозволила підтвердити відсутність алкалоїду у сировині та вирішити питання про можливу фальсифікацію та токсичність шафрану.

Вперше було розроблено стандартну операційну процедуру одержання робочих стандартів пікрокроцину та кроцинів (*t*-4GG, *t*-2G, *t*-3Gg) методом препаративної хроматографії за допомогою колонки Symmetry Prep C18 (300×19 мм×7 мкм) для рутинного контролю якості шафрану. За результатами

експериментальних досліджень розроблено та впроваджено монографію «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» (ДФУ 2.4). Серед досліджених видів фармакологічних активностей, цитотоксична дія на лінії гліобластоми була найбільш вираженою для сухого водного екстракту шафрану, а спиртовий – значно знижував життєздатність меланому та потрійно негативного раку молочної залози.

Дослідженнями хімічного складу побічних продуктів виробництва шафрану встановлено вміст фенольних сполук, амінокислот, карбонових кислот, макро- і мікроелементів. Окремо вивчено хімічний склад листя восьми видів і сортів крокусів, серед яких найбільш перспективним виявився крокус гарний (*Crocus speciosus*), та п'ять зразків квітів різних сортів крокусів. Вперше проведено виділення 16 індивідуальних речовин з оцвітини к. посівного методом колонкової хроматографії, серед них софорофлавонолозид, космосіїн, текторидин, нігрицин, ірисктекторигенін В, мангіферин, рутин, ферулова кислоти виділено вперше, крім того виділено раніше описані для к. посівного кверцетин, хлорогенову, неохлорогенову кислоти, астрагалін, кемпферол, ізоорієнтин, ізорамнетин, ізокверцитрин. Структури речовин встановлювали методами ЯМР-спектроскопії.

Сухі екстракти бульбоцибулин крокусу проявили значну протиалергійну, противірусну (H1N1, 30-40% захист), цитотоксичну дію по відношенню до клітин раку нейробластоми (EC<sub>50</sub> 0,018 мг/мл) та гліобластоми U-87 (EC<sub>50</sub> 0,02 мг/мл), особливо полісахаридний комплекс (IGR39, EC<sub>50</sub> 0,2 мг/мл). Екстракти листя та оцвітини крокусу проявили виражений антиоксидантний ефект. Всі одержані екстракти належать до V класу токсичності за класифікацією К. К. Сидорова. Дослідження *in vivo* підтвердили виражену протизапальну дію екстрактів бульбоцибулин. Розроблено параметри стандартизації для сировини та екстрактів.

Модифіковано ВЕРХ-ДМД методику аналізу фенольних сполук ірисів, яку було апробовано на кореневищах і. білого, і. угорського, і. сибірського, і. строкатого, що дозволила ідентифікувати та встановити вміст 25 фенольних сполук у всіх дослідних зразках ірисів. Домінуючими речовинами були мангіферин, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон, текторидин, германаїзм В,



іристоригенін В, іригенін. Дослідження впливу факторів навколишнього середовища на вміст фенольних сполук у кореневищі та листі і. германського, і. болотного, і. сибірського, і. солелюбивого з 16 популяцій України, Литви та Латвії. Встановлено, що на накопичення фенольних сполук у ірисів позитивний вплив мають тривалість сонячного випромінювання та вміст фосфору у ґрунті.

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*. Вміст насичених жирних кислот у кореневищах видів ірисів переважає (від 15% до 53%), а в листі переважає вміст ненасичених (зокрема полієнових) кислот. Серед органічних кислот 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%. Домінуючою сполукою є  $\alpha$ -ірон (до 2,85 %). Вперше виявлені нортерпеноїди та їх похідні:  $\beta$ -дамаскенон,  $\beta$ -іонон-5,6-епоксид,  $\beta$ -іонон у видах ірисів. 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 ( $\beta$ -іонон,  $\alpha$ -ірон, *транс*-2,6- $\gamma$ -ірон).

Проведено дослідження фармакологічної активності для сухих водних та спиртових (70%) екстрактів з кореневищ та листя видів ірисів. Найбільш виражену антибактеріальну дію виявив спиртовий екстракт листя і. сибірського, протиалергійну та протиентеровірусну дію – водний екстракт кореневищ і. строкатого, а цитотоксичну, протигрипозну та протиентеровірусну дію проявили екстракти кореневищ ірису угорського. Оцінено противірусний потенціал індивідуальних сполук ірису, для цього було вдосконалено методику виділення сполук з кореневищ і. угорського методом колонкової хроматографії, що дозволило додатково виділити 12 сполук, серед них вперше: кікалідон, ірисолідон, іристорин В, іристоригенін В, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон, германазм В, ірилон, апігенін-7-глюкозид,

ізокверцитрин, кемпферол, корична та кумарова кислоти. Крім того виділено: нігрицин, іригенін, ононін, геністеїн, дайдзеїн, формонетин, мангіферин, ізомангіферин, текторигенін, текторидин, гіперозид, апігенін, кверцетин, ембінін, хлорогенову, неохлорогенову, кофейну, ферулову кислоти. Структуру сполук встановлювали за допомогою 1D та 2D ЯМР-спектроскопії.

Методом ChemGPS-NP встановлено, що найбільш прогностичними протиентеровірусними (D68) фенольними сполуками можуть бути ірисолідон, кікалідон, кемпферол, а протигрипозними (H1N1) – апігенін, кверцетин, кемпферол, що підтвержено дослідженнями *in vitro* (ірисолідон 1,95% інгібування при 50 мкМ, IC<sub>50</sub> 9,2 мкМ), кікалідон 5,93%, кемпферол 14,83%, апігенін 100% при 50 мкМ, кемпферол 92%, кверцетин 48%) та аналізом інгібування нейрамінідази.

За допомогою системи ранжування хімічних маркерів рослин, даних фармакогностичного аналізу та фармакологічного скринінгу речовин та екстрактів було обґрунтовано вибір Q-маркерів для сировини та екстрактів к. посівного та рослин роду Ірис, а саме для шафрану: кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин, апігенін, для його побічних продуктів виробництва – кроцин, рутин, ізокверцитрин, ізоорієнтин, кемпферол, кверцетин, ферулову кислоту, мангіферин, L-пролін, L-піроглютамінова кислота на основі їх використання для лікування різних ліній ракових клітин; для видів ірисів: ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин, хлорогенова кислота та  $\alpha$ -ірон з урахуванням їх протиракового та противірусного потенціалу.

Для к. посівного, і. угорського та двох сортів ірисів («Indian Pow Wow» та «Galleon Gold») розроблені стандартні операційні процедури щодо належного культивування лікарських рослин відповідно до керівних принципів Належної практики культивування та збирання вихідної ЛРС, обробки рослинної сировини, контроль якості сировини для фармацевтичної галузі. Застосування екологічних стрес-методів (холодна плазма, вакуум, електромагнітне поле) передпосівної обробки посівного матеріалу к. посівного, дозволила ідентифікувати та кількісно визначити вміст 23 естерів кроцетину, рутин,

пікрокроцин та шафраналь, при цьому електромагнітне поле мало найбільший вплив біосинтез речовин-маркерів: збільшення вмісту кроцину *t*-4GG у 4 рази, а шафраналю та пікрокроцину – у 2 рази. Крім того, обрані стрес-методи мали позитивний вплив на загальний кількісний вміст фенольних сполук та вільну радикальну активність у оцвітині та листі крокусу.

Застосування монокомпонентного живлення хелатом заліза ( $\text{Fe}^{2+}$ ), хелатом калію ( $\text{K}^+$ ) та сульфатом магнію ( $\text{Mg}^{2+}$ ) сортових ірисів («Цікавинка», «Талібо», «Widcombe Fire») показало динаміку стабільного вмісту фенольних речовин, крім того відмічене значне вмісту речовин-маркерів геністину (до 9,67 мг/г), іригеніну (до 3,52 мг/г) та ірисолідону у кореневищах, а хлорогенової кислоти та мангіферину – у листі ірисів. Визначення оптимальних термінів заготівлі сировини ірисів з 16 популяцій України, Литви, Латвії, показало, що вміст фенольних сполук залежності від вегетаційного періоду і має максимальне накопичення влітку.

За результатами досліджень отримано патенти на винахід «Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю з оцвітини крокусу посівного» № 124210 від 04.08.2021 та на корисну модель «Спосіб культивування, збирання та зберігання шафрану» № 135685 від 10.07.2019, «Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю з листя крокусу посівного» № 146567 від 03.03.2021; подано заявку на патент Європейського Союзу LT2021 527, 106245, від 03.06.2021 на спосіб одержання полісахаридного комплексу з бульбоцибулин к. посівного з цитотоксичною дією, а у роботу фермерських господарств впроваджено «Стратегії вирощування шафрану в Україні. Методичні рекомендації з оптимізації технології вирощування та збору шафрану (*Crocus sativus*) в різних ґрунтово-кліматичних зонах України» (2019).

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

Список публікацій здобувача

1. 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). P. 574 – 578. (Особистий внесок: формування основної ідеї роботи, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті) [Q2].
2. Kovalev V. N., Mikhailenko O. A., Vinogradov B. A. Aromatic compounds and terpenoids of *Iris hungarica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2014. № 50 (1). P. 161 – 162. (Особистий внесок: постановка задачі дослідження, участь в обговоренні та узагальненні експериментальних даних, написанні та оформленні статті) [Q3].
3. 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*. *Фармація Казахстану*. 2015. № 3 (166). С. 38 – 41. (Особистий внесок: формування основної ідеї роботи, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті).
4. Quantitative determination of mangiferin in rhizomes of *Iris hungarica* and *Iris subirica* by HPLC / V. N. Kovalyov, O. A. Mykchailenko, D. I. Isaev, G. M. Gurbanov. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*. 2016. № 1. P. 13 – 17. (Особистий внесок: формування основної ідеї роботи, розробка методик, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті) [Q4].
5. Mykchailenko O. O., Kovalyov V. M. Phenolic compounds of the genus *Iris* plants (*Iridaceae*). *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2016. № 65 (2). P. 70 – 77. (Особистий внесок: планування хімічного експерименту, участь в експериментальній роботі, інтерпретації результатів та написанні статті) [Q3].
6. Constituents of essential oils from Azerbaijan *Iris medwedewii* and *I. carthaliniae* rhizomes / D. I. Isaev, O. A. Mikhailenko, G. M. Gurbanov, V. N. Kovalev *Chemistry of Natural Compounds*. 2016. № 52 (3). P. 748 – 750. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі дослідження, участь в обговоренні та узагальненні експериментальних даних, написанні та оформленні статті) [Q3].

7. Antimicrobial activity of extracts of *Iris hungarica* and *Iris sibirica* / V. M. Kovalev, O. O. Mykhailenko, A. V. Krechun, T. P. Osolodchenko. *Annals of Mechnikov Institute*. 2017. № 2. P. 57 – 64. (Особистий внесок: планування хімічного експерименту, участь в експериментальній роботі аналізу ірису сибірського, обговорення всіх результатів та написанні статті).
8. Gas chromatography-mass spectrometry studies of the component composition of carboxylic acids of the rhizomes of *Iris medwedewii* and *Iris carthaliniae* (*Iridaceae*) / J. I. Isaev, O. O. Mykhailenko, V. N. Kovalyov, G. M. Gurbanov, M.Y. Suleymanov. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017. № 66 (1). P. 9–14. (Особистий внесок: постановка задачі дослідження, участь в обговоренні та узагальненні експериментальних даних, написанні та оформленні статті) [Q3].
9. Fatty acid composition of lipids of *Iris sibirica* O. Mykhailenko, V. Kovalyov, S. Kovalyov, E. Toryanik, T. Osolodchenko, Y. Buidin. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017. № 66 (5). P. 220 – 227. (Особистий внесок: планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту, написання статті) [Q3].
10. Mykhailenko O. Composition of volatile oil of *Iris pallida* Lam. from Ukraine. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018. № 15. P. 85 – 90. [Q3].
11. Mikhailenko O. A., Krechun A. V., Kovalev V. N. Carboxylic acids from *Iris graminea* and *I. halophila*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2018. № 54 (5). P. 956 – 958. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі дослідження, аналіз та узагальненні експериментальних даних, написанні статті) [Q3].
12. Шаталова О. М., Михайленко О. О. Експериментальне дослідження протизапальної активності екстрактів з рослин родини *Iridaceae*. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 1 (58). С. 39 – 43. (Особистий внесок: постановка задачі дослідження, участь у проведенні фармакологічної, технологічної та хімічної роботи, аналізі результатів, написанні статті).
13. Михайленко О. О. Дослідження біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного (шафран) з України. *Фармацевтичний журнал*. 2019. №74 (6). С. 70 – 77.

14. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* species from Latvia, Lithuania and Ukraine / O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov, V. Desenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Georgiyants. *Phytochemical Analysis*. 2020. № 31 (1). P. 1–19. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, аналіз та узагальненні даних, написання статті) [Q1].
15. 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 / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, R. Lesyk, V. Georgiyants. *Scientia Pharmaceutica*. 2020. № 88 (1). P. 8–21. (Особистий внесок: формування основної ідеї, участь у проведенні експерименту, аналізі та узагальненні даних, написанні статті) [Q2].
16. Mykhailenko O., Kovalyov V., Orlova T. Chemical composition of the essential oil of several *Iris* species. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. № 44 (3). P. 178 – 185. (Особистий внесок здобувача: постановка задачі дослідження, участь у плануванні експерименту, аналізі результатів, написанні статті) [Q3].
17. Standard operating procedure of Ukrainian saffron cultivation according with Good Agricultural and Collection Practices to assure quality and traceability / O. Mykhailenko, V. Desenko, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Industrial Crops and Products*. 2020. № 151. P. 112376–112387. (Особистий внесок здобувача: розробка стратегії щодо належного вирощування рослин, проведення хімічного та агрохімічного дослідження, обговорення результатів та написання статті) [Q1].
18. Investigation of organic acids in saffron stigmas (*Crocus sativus* L.) extract by derivatization method and determination by GC/MS / L. Jarukas, O. Mykhailenko, J. Baranauskaite, M. Marksa, L. Ivanauskas. *Molecules*. 2020. № 25. P. 3427 – 3437. (Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та проведенні аналітичної роботи, аналізі результатів, написанні статті) [Q1].
19. Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian *Iris* species: A fresh look on their content and biological activities / O. Mykhailenko, M. Korinek, L. Ivanauskas, I. Bezruk, A. Myhal, V. Petrikaitė, M. El-Shazly, C.-H. Yen, B.-H. Chen, V. Georgiyants,

T.-L. Hwang. *Molecules*. 2020. № 25. P. 4588 – 4612. (Особистий внесок: формування ідеї, участь у проведенні хімічного експерименту, обговоренні та інтерпретації результатів, формуванні висновків, написання статті) [Q1].

20. Влияние удобрений на биоаккумуляционных свойства корневищ *Iris pumila* «Violet carpets» и их химический состав / О. А. Михайленко, В. Г. Десенко, Т. Е. Дмитренко, В. А. Георгиянц. *Наука и инновация*. 2020. № 4. С. 92 – 97. (Особистий внесок: розробка стратегії монокомпонентного живлення рослин, участь у проведенні експерименту, обговорення результатів та написання статті).

21. Comparative analysis of the major metabolites of Ukrainian saffron samples by HPLC / О. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021. № 76. P. 394–396. (Особистий внесок: планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту) [Q1].

22. The comparative analysis of carboxylic acid composition in four *Iris* species from Ukraine / О. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, S. Romanova, T. Orlova, S. Kozura, S. Harna, V. Volochai. *Chemistry and Biodiversity*. 2021. № 18. P. e2000969 – e2000978. (Особистий внесок: формування основної ідеї, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q2].

23. Розробка методик стандартизації приймочок крокуса посівного (шафран) для включення у проект монографії Державної Фармакопеї України / О. О. Михайленко, А. Г. Котов, Е. Е. Котова, Л. М. Сіра, В. М. Ковальов, В. А. Георгиянц. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. № 19. 1 (73). С. 32 – 41. (Особистий внесок: планування експерименту, проведення стандартизації, узагальнення результатів експерименту, написання статті).

24. Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (*Crocus sativus* stigma): moving from correlation toward causation / О. Mykhailenko, V. Petrikaitė, M. Korinek, M. El-Shazly, B.-H. Chen, C.-H. Yen, C.-F. Hsieh, I. Bezruk, A. Dabrišiūtė, L. Ivanauskas, V. Georgiyants, T.-L. Hwang. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021. № 21. P. 203 – 218. (Особистий внесок: планування експерименту, участь у хімічному експерименті, обговоренні

- та інтерпретації результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q1].
25. Characterization of phytochemical components of *Crocus sativus* leaves using HPLC-MS/MS and GC-MS: a new potential by-product / O. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, R. Lesyk, V. Georgiyants. *Scientia Pharmaceutica*. 2021. № 89 (2). P. 28 – 45. (Особистий внесок: планування та проведення хімічного експерименту, аналіз та інтерпретація результатів, формуванні висновків, написання статті) [Q2].
26. Effective and simple approach for colchicine determination in saffron parts / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, M. Marksa, O. Borodina, V. Georgiyants. *Food Chemistry*. 2022. № 368. P. 130862 – 130867. (Особистий внесок: розробка стратегії хімічного дослідження щодо підтвердження відсутності токсичної речовини у харчовій сировині шафрану, участь у проведенні експерименту, обговорення результатів та написання статті) [Q1].
27. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Crocus speciosus* leaves / O. Mykhailenko, V. Volochai, I. Bezruk, V. Mishchenko, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 2022. № 91 (1). P. 207 – 221. (Особистий внесок: планування та проведення хімічного експерименту, аналіз та інтерпретації результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q3].
28. Pharmacological potential and chemical composition of *Crocus sativus* leaf extracts / O. Mykhailenko, V. Petrikaite, M. Korinek, F.-R. Chang, M. El-Shazly, C.-H. Yen, I. Bezruk, B.-H. Chen, C.-F. Hsieh, D. Lytkin, L. Ivanauskas, V. Georgiyants, T.-L. Hwang. *Molecules*. 2022. № 27. P. 10 – 27. (Особистий внесок: формування основної ідеї, участь проведенні хімічного експерименту, обговоренні та інтерпретації результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q1].
29. Comparative analysis of apocarotenoids and phenolic constituents of *Crocus sativus* stigmas from eleven countries: ecological impact / O. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Archiv der Pharmazie*. 2022. № 355 (4). P. e2100468 – e2100484. (Особистий внесок: планування та проведення експерименту, аналіз та інтерпретація результатів, формуванні висновків та написання статті) [Q2].
30. Application of Quality-by-Design approach to the pharmaceutical development



of anticancer crude extracts of *Crocus sativus* perianth / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Petrikaitė, V. Georgiyants. *Scientia Pharmaceutica*. 2022. № 90 (1). P. 19 – 42. (Особистий внесок: планування та обґрунтування використання підходу QbD у експерименті, проведення експерименту, аналіз та інтерпретація результатів, формуванні висновків та написання статті) [Q2].

31. Innovative GACP approaches for obtaining the quality *Iris hybrida* leaves for the pharmaceutical industry / O. Mykhailenko, Y. Buydin, L. Ivanauskas, A. Krechun, V. Georgiyants. *Chemistry and Biodiversity*. 2022. № 19. P. e202200149 – e202200160. (Особистий внесок: розробка стратегії належного вирощування рослин, проведення хімічного та агрохімічного дослідження, аналіз результатів, написання статті) [Q2].

32. Bioactive Constituents of *Iris hybrida* (Iridaceae): processing effect / O. Mykhailenko, S. Chetvernyia, I. Bezruk, Y. Buydin, N. Dhurenk, O. Palamarchuk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Biomedical Chromatography*. 2022. № 36 (7). P. 5369 – 5381. (Особистий внесок: розробка стратегії належного вирощування рослин, проведення дослідження, аналіз результатів, написання статті) [Q3].

33. Effective isolation of picrocrocin and crocins from saffron: from HPTLC to working standard obtaining / L. Jarukas, K. Vitkevicius, O. Mykhailenko, I. Bezruk, V. Georgiyants, L. Ivanauskas. *Molecules*. 2022. № 27 (13). P. 4286 – 4300. (Особистий внесок: формування ідеї одержання робочих стандартів для контролю якості шафрану, проведення хімічного експерименту, обговоренні та інтерпретації результатів, формуванні висновків та написанні статті) [Q1].

34. Model implementation of the legal regulation on medicinal plant cultivation for pharmaceutical purposes. Case study of *Crocus sativus* cultivation in Ukraine / O. Mykhailenko, N. B. Saidov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Botanica*. 2022. № 28 (1). P. 27–38. (Особистий внесок: розробка стратегії належного вирощування рослин, проведення аналізу законодавчої бази, агрохімічного дослідження, аналіз результатів, написання статті) [Q4].

35. Anti-viral and anti-inflammatory isoflavonoids from Ukrainian *Iris aphylla* rhizomes: structure-activity relationship coupled with ChemGPS-NP analysis / O.

Mykhailenko, C.-F. Hsieh, M. El-Shazly, A. Nikishin, V. Kovalyov, P. Shynkarenko, L. Ivanauskas, B.-H. Chen, F.-R. Chang, J.-T. Horng, T.-L. Hwang, V. Georgiyants, M. Korinek. *Planta Medica*. 2023. № 89 (11). P. 1063 – 1073. (Особистий внесок: планування хімічного експерименту, участь в експериментальній роботі, інтерпретації результатів та написанні статті) [Q1].

36. 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): А01В 79/00, А01С 14/00, А01D 91/00, А01F 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, написанні патенту).

37. 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: А61К 36/88 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01), А61Р 39/06 (2006.01). № а 2019 10648 ; заявл. 28.10.2019 ; опубл. 04.08.2021, Бюл. № 31. (Особистий внесок: розробка стратегії одержання рослинної субстанції, участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів, написанні патенту).

38. 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: А61К 36/88 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01), А61Р 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, написанні патенту).

39. 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): А61К 36/00, А61Р 31/04 (2006.01), А61Р 39/06

(2006.01). № и 2020 05762 ; заявл. 07.09.2020 ; опубл. 03.03.2021, Бюл. № 9. (Особистий внесок: розробка стратегії одержання рослинної субстанції, участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів, написанні патенту).

40. Mykhailenko O. A., Kovalev V. N. Chemical composition of essential oil from leaves of *Iris versicolor*. X<sup>th</sup> Intern. Symposium on the chemistry of natural compounds, 21–23 November 2013, Tashkent-Bukhara, Republic of Uzbekistan, 2013. P. 280.

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

42. Phenolic compounds of the rhizomes of *Iris variegata* / O. Mykhailenko, A. Myhal, S. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. The 8<sup>th</sup> Intern. Conf. on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice dedicated to the 80<sup>th</sup> anniversary of the Museum of History of Lithuanian Medicine and Pharmacy, 15 December 2017, Kaunas, Lithuania, 2017. P. 74–77.

43. 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.

44. Comparative study on the composition of phenolic compounds in *Iris* species from Ukraine, Lithuania and Latvia / O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. Sciences and Practice: abstract of 9<sup>th</sup> Intern. Pharmaceutical Conf. dedicated to the 100<sup>th</sup> years anniversary of independent Lithuanian's Pharmacy, 9 November 2018, Kaunas, Lithuania, 2018. P. 27.

45. Development and validation of HPLC method for determination of biological active substances of *Crocus sativus* L / V. Karpinskaite, I. Bezruk, R. Marksiene, O. Mykhailenko, V. Georgiyants, L. Ivanauskas. Topical issues of new medicines development: мат. XXVI Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, 10-12 квітня 2019 р. Харків, НФаУ, 2019. С. 83-84.

46. Anti-allergic inflammatory potential of herbs and herbal natural products / O. O. Mykhailenko, M. Korinek, M. El-Shazly, Y.-C. Tsai, I. M. Ayoub, A. A. Thabet, F. S.

Youssef, Y.-C. Wu, F.-R. Chang, B.-H. Chen, T.-L. Hwang, V. M. Kovalyov, V. A. Georgiyants. *Topical issues of new medicines development*: мат. XXVI Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, 10 – 12 квітня 2019 р. Харків, НФаУ, 2019. С. 52 – 53.

47. Antiviral effects of herbs from Ukraine against influenza and enterovirus / M. Korinek, O. Mykhailenko, C.-F. Hsieh, V. Georgiyants, M. El-Shazly, H. Handoussa, J.-T. Horng, T.-L. Hwang. *The 34<sup>th</sup> symposium of Natural products*, 17-19<sup>th</sup> October 2019, Chang Gung University of Science and Technology, Taoyuan, Taiwan, 2019. P. 97.

48. Anti-allergic activities of saffron extracts / O. Mykhailenko, M. Korinek, B.-H. Chen, T.-L. Hwang, V. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Sciences and Practice*: abstract of 10<sup>th</sup> Intern. Pharm. Conf., 15 November 2019, Kaunas, Lithuania, 2019. P. 80 p.

49. The HPLC post-column antioxidant assay and effect on respiratory burst in human neutrophils of *Crocus sativus* extracts / O. Mykhailenko, M. Korinek, T.-L. Hwang, C.-H. Yen, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *35<sup>th</sup> Symposium on the Natural Products*, 11 – 13 September 2020, Taipei Medical University of Graduate Institute of Pharmacognosy, Taiwan.

50. Mykhailenko O., Georgiyants V. The quality of Ukrainian saffron and its antibacterial activity. *4<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food*, November 30 – December 5, 2020, Xi'an, China.

51. Activity of *Crocus sativus* L. extracts on human brain cancer cell lines / A. Dabrišiūtė, O. Mykhailenko, V. Georgiyants, L. Ivanauskas, V. Petrikaitė. *Achievements of Pharmaceutical Science and Practice*: book of abstracts of Intern. Conf. of the Lithuanian Pharmaceutical Association, 16 October 2020, Lithuanian Pharmaceutical Association, Vilnius, Lithuania, 2020. P. 19.

52. Михайленко О. О., Козира С. А., Георгіянц В. А. Порівняльне дослідження фенольних сполук різних видів та сортів крокусів. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: мат. VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23 – 24 вересня 2020 р., Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського, МОЗ України, 2020. С. 40 – 42.

53. Anti-allergic activity of various natural product samples from Ukraine / O. Mykhailenko, M. Korinek, B.-H. Chen, M. El-Shazly, Y.-C. Wu, F.-R. Chang, C.-F. Hsieh, J.-T. Horng, T.-L. Hwang, V. Georgiyants. *EFMC-ISMIC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session*. Powered by the EFMC Young Scientists Network, 9 September, 2020, Belgium, 2020. P. 201.
54. Mykhailenko O., Ivanauskas L., Georgiyants V. Identification of saffron adulteration by thin-layer chromatography coupled with high performance liquid chromatography. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations: abstract of Intern. E-conf.*, 23<sup>rd</sup> October, 2020. Kaunas, Lithuania, 2020. P. 51.
55. Михайленко О. О., Георгіянц В. А. Історичне та сучасне фармакологічне використання шафрану. *Planta+. Наук., практ. та освіта: мат. Міжнар. наук-практ. конф.*, 19 лютого 2021, м. Київ, Україна, 2021. С. 144 – 148.
56. Phenolic compounds from *Iris hungarica* as potential anti-inflammatory agent / O. Mykhailenko, M. Korinek, B. H. Chen, T. L. Hwang, V. Georgiyants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021, № 165, P. 44–45. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting of SFRR International. 15 – 18<sup>th</sup> March 2021, Spain, 2021.
57. Mykhailenko O. O., Ivanauskas L., Georgiyants V. A. Analytical method of picrocrocin isolation from saffron. *Сучасні проблеми хімії: Мат. XXII Міжнар. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених*, 19 – 21 травня 2021, Хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна, 2021. С. 26.
58. Isolation of naturally compounds crocins from *Crocus sativus* L. stigma as anticancer agents / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Georgiyants. *Vanguards of Natural Product Research*, 16<sup>th</sup>, 23<sup>rd</sup>, 30<sup>th</sup> July 2021, American Society of Pharmacognosy, USA, 2021. P-065.
59. Mykhailenko O., Georgiyants V. Quality control of *Crocus sativus* leaves. *5<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (5-ISPMF)*, 25 – 30 August, 2021, Nanchang University, Nanchang, China, 2021. P. 404.
60. Михайленко О. О., Осолодченко Т. П., Георгіянц В. А. Антибактеріальна

активність екстрактів Крокусу посівного. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*: мат. Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячену 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021, Харків, НФаУ, 2021. С. 222 – 223.

61. The used of Herb MaRS approach for selection of chemical markers for the quality control of *Crocus sativus* leaves / О. Mykhailenko, М. Korinek, М. El-Shazly, Т.-L. Hwang, V. Georgiyants. *100 років успіху та якості*: мат. міжнар. наук.-практ. симпозиуму, присвяченого 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021, м. Харків, НФаУ, 2021. С. 66.

62. Antiviral activities of *Juno* and *Crocus* corms extract / О. Mykhailenko, М. Korinek, В.-Н. Chen, Т.-L. Hwang, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *The Joint International Pharmacy Symposium “Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2021” and “11<sup>th</sup> Conference: Pharmacy Science and Practice”*, 22 October 2021, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, 2021. P. 29.

63. Sophoraflavonoloside and cosmosiin from *Crocus sativus* perianth / О. Mykhailenko, М. Korinek, Т.-L. Hwang, С.-Н. Yen, F.-R. Chang, В.-Н. Chen, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *36<sup>th</sup> Symposium on the Natural Products & Symposium on Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 15 – 16 October, 2021, Taipei Medical University. Taiwan, 2021. P. 62.

64. Bioactive compounds from saffron flowers / О. Mykhailenko, L. Ivanauskas, М. Korinek, Т.-L. Hwang, С.-Н. Yen, F.-R. Chang, В.-Н. Chen, V. Georgiyants. *Planta+. наука, практика та освіта*: мат. III Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 180-річчю Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ, 18 лютого 2022 р. Київ, 2022. Т.1. С. 82 – 84.

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

66. 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.

67. Mykhailenko O., Georgiyants V. Potential Benefits of Ukrainian *Crocus sativus* as Anti-inflammatory agent. *MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering*, 8<sup>th</sup> congress MODECO-07: Molec. Sci., Develop., Environ. Sustainability and Economy Congress, Paris, France-Ohio, USA, 2022.

68. Михайленко О.О., Георгіянец В.А. Імплементация принципів GACP та QbD у процес вирощування шафрану в Україні для харчової промисловості та фармацевтики. *Хімія природних сполук: мат. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 27-28 жовтня, 2022 року, Тернопіль*. С. 157 – 159.

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

70. Mykhailenko O. Saffron: the “golden flower» of Ukraine. *71<sup>st</sup> 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.

#### Додаткові публікації

71. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review / O. Mykhailenko, V. Kovalyov, O. Goryacha, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Phytochemistry*. 2019. № 162. P. 56 – 89. (Особистий внесок: постановка задачі дослідження, пошук та аналіз даних, узагальнення та висновки; систематизація інформації, написанні та оформленні статті) [Q1].

72. Класифікації роду *Iris* L. на біологічному та молекулярному рівні як основа для сучасних філогенетичних досліджень / М. О. Троїцький, Т. Б. Троїцька, Ю. В. Буйдін, Н. О. Мірошніченко, О. О. Михайленко. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. № 19 (4). С. 12 – 19. (Особистий внесок: участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написанні статті).

73. 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, дослідження умов вирощування рослин, інтерпретації результатів, написання статті).

74. Затильнікова О. О. Елементний склад *Iris sibirica* L. *Український медичний альманах*. 2013. № 16(2). С. 30 – 31.

75. Михайленко О. О. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку протівірусних лікарських засобів. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика*. 2015. № 24. С. 336 – 343.

76. 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.

77. 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.

78. 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.



## ANNOTATION

*Mykhailenko O.O.* Pharmacognostic study of *Crocus sativus* and *Iris* genus plants: prospects for the complex use and optimization of growth 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 plant raw materials by determining the conditions and stages of proper cultivation.

The planning of the experiment was done taking into account the “Quality by development” approach to ensure the optimization of the targeted search for antitumor/antiviral plant extracts from the *Crocus sativus* and *Iris* genus plants raw materials. The critical stages of ensuring the quality of plant extracts are determined, namely: quality control of raw materials, auxiliary materials and the extraction process. With the help of the Ishikawa diagram (qualitative risk assessment) and with the help of Failure Mode and Effect Analysis (quantitative assessment), potentially critical points of production affecting the quality of plant extracts were determined: growing conditions, processing of plant raw materials, extraction technology.

A comparative study of the chemical composition of 57 saffron samples from 13 countries of the world (including 35 samples from 12 regions of Ukraine) was conducted. By-products of saffron production – leaves, perianth and corms – were studied. A chemical analysis of *Iris* genus plants was carried out, which included 38 species and 34 varieties from Ukraine, Azerbaijan, Lithuania and Latvia.

In accordance with the requirements of ISO 3632, it was established that saffron samples from Ukraine have indicators at the same level as samples from Spain, Italy,

Morocco, Australia, Switzerland and correspond to quality category 1 according to the content of crocins, picrocrocin and safranal. The expediency of using the method of grinding raw materials in liquid nitrogen, which increases the yield of crocins by 3,5 times compared to conventional grinding, is substantiated. For the first time, the developed HPLC technique made it possible to accurately determine apocarotenoids, safranal, picrocrocin and phenolic compounds in saffron samples. According to the crocin *t*-4GG content, Ukrainian saffron samples were more similar to saffron from Switzerland (446 – 475 mg/g). Correlation analysis of the content of saffron marker compounds with environmental factors showed that the content of phenolic compounds and apocarotenoids is correlated with the duration of solar radiation, solar UV index and soil type. For Ukrainian samples, an increase in the content of crocin and picrocrocin in saffron from the north-eastern regions of Ukraine and a decrease closer to the south-western regions of cultivation was noted, but the yield of raw materials is opposite. For the first time, a GC-MS method was developed for the simultaneous determination of amino acids and carboxylic acids in plant raw materials, and for saffron – the marker compound – safranal (content from 50.87 to 77.59%). Among the components of saffron,  $\alpha$ -linolenic, linoelaidic acid, and L-tyrosine were dominant.

HPLC and HPLC methods are proposed for detection of possible falsification of saffron and further standardization of herbal raw materials. Crocin, picrocrocin, were not detected in the tested fakes (turmeric, safflower, marigolds, marigolds, yellow tulip stamens). The HPLC data were correlated with the HPLC analysis data, where the characteristic peaks of crocin (UV  $\lambda_{\max}$  261, 440, 466 nm) were absent in counterfeits. The developed HPLC method for the determination of colchicine in raw materials for sowing allowed to confirm the absence of alkaloid in *Crocus* raw materials and to resolve the issue of possible falsification and toxicity of saffron.

For the first time, a standard operating procedure was developed for the preparation of working standards of picrocrocin and crocins (*t*-4GG, *t*-2G, *t*-3Gg) by preparative chromatography using a Symmetry Prep C18 column (300×19 mm×7  $\mu$ m) for routine saffron quality control. According to the results of experimental studies, the monograph

“Saffron *Crocus sativus*<sup>N</sup>” (SPU 2.4) was developed and implemented. Among the investigated types of pharmacological activities, the cytotoxic effect on the glioblastoma line was the most pronounced for the dry aqueous extract of saffron, and the ethanolic extract significantly reduced the viability of melanoma and triple-negative breast cancer.

Studies of the chemical composition of saffron by-products determined the content of phenolic compounds, amino acids, carboxylic acids, macro- and microelements. The chemical composition of the leaves of eight *Crocus* species and varieties, among which *Crocus speciosus* turned out to be the most promising, and five flower samples *Crocus* species and varieties were separately studied. For the first time, 16 individual compounds were isolated from *Crocus sativus* perianth by the column chromatography method, among them sophoroflavonolose, cosmosiin, tectoridin, nigricin, iristectorigenin B, mangiferin, rutin, ferulic acid was isolated for the first time, in addition the previously described for *Crocus* perianth quercetin, chlorogenic, neochlorogenic acid, astragalin, kaempferol, isorientin, isorhamnetin, isoquercitrin have been isolated. The structures were determined by NMR spectroscopy.

Dry extracts of *Crocus sativus* corms showed significant anti-allergic, antiviral (H1N1, 30-40% protection), cytotoxic effects against neuroblastoma cancer cells ( $EC_{50}$  0.018 mg/mL) and against glioblastoma U-87 cells ( $EC_{50}$  0.02 mg/mL), especially the polysaccharide complex (IGR39,  $EC_{50}$  0.2 mg/mL). Extracts of *Crocus* leaves and perianth showed a pronounced antioxidant effect. All obtained extracts belong to the V class of toxicity according to the classification of K.K. Sydorov. *In vivo* studies have confirmed the pronounced anti-inflammatory effect of *Crocus* corms extracts. Standardization parameters for *Crocus sativus* herbal raw materials and extracts were developed.

The HPLC-DAD technique 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, 5,6-dihydroxy-7,8,3',5'-tetramethoxyisoflavone, tectoridin, germanaism B, iristectorigenin B, irigenin. The influence of environmental factors on the content of phenolic compounds in rhizomes and

leaves of *I. germanica*, *I. pseudacorus*, *I. sibirica*, *I. halophila* from 16 populations of Ukraine, Lithuania and Latvia have been established. It was found that the duration of solar radiation and the phosphorus content in the soil have a positive effect on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* samples.

The composition of carboxylic acids for rhizomes and leaves of *I. graminea*, *I. sibirica*, *I. halophila*, *I. pallida*, *I. variegata*, *I. pumila*, *I. musulmanica*, *I. carthalinae*, *I. medwedewii* was studied. The content of saturated fatty acids in *Iris* species rhizomes prevails (from 15% to 53%), and the content of unsaturated (in particular, polyenoic) acids prevails in the leaves. Citric, malic, and oxalic acids are dominant among organic acids. A study of terpenoids of rhizomes and leaves of 27 *Iris* species and varieties was carried out. The total yield of *Iris* rhizomes essential oil is from 0.02% to 0.58%. The dominant compound is  $\alpha$ -iron (up to 2.85%). Norterpenoids and their derivatives:  $\beta$ -damaskenone,  $\beta$ -ionone-5,6-epoxide,  $\beta$ -ionone were discovered for the first time in samples. The prospects of the rhizomes of little-studied *Iris* species (*I. musulmanica*, *I. virginica*, *I. notha*, *I. halophila*, *I. hybrida Stockholm*, others) as essential oil raw materials due to the high content of essential oil marker compounds ( $\beta$ -ionone,  $\alpha$ -iron, trans-2,6- $\gamma$ -iron).

A study of the pharmacological activity of dry water and ethanolic (70%) extracts from *Iris* species rhizomes and leaves was conducted. The most pronounced antibacterial effect was shown by the ethanolic extract of *I. sibirica* leaves; the anti-allergic and anti-enteroviral effect were observed for water extract of *I. varietaga* rhizomes; and *I. hungarica* rhizomes extracts showed higher cytotoxic, anti-influenza and anti-enteroviral effects. The antiviral potential of individual compounds of *Iris* was evaluated. For this the method of column chromatography compounds isolation from *I. hungarica* rhizomes and was improved. This made it possible to additionally isolate 12 compounds, among them for the first time: kikkalidon, irisolidon, iristectorin B, iristectorigenin B, 5,6-dihydroxy-7,8,3',5'-tetramethoxyisoflavon, germanaism B, irilon, apigenin-7 glucoside, isoquercitrin, kaempferol, cinnamic and coumaric acids. In addition, ononin, genistein, daidzein, formononetin, mangiferin, isomangiferin, tectorigenin, tectoridin, hyperoside, apigenin, quercetin, embinin, cosmosiin,

chlorogenic, neochlorogenic, caffeic, ferulic acids were isolated. The structure of the compounds was inserted using 1D and 2D NMR spectroscopy. Using the ChemGPS-NP method, it was established that the most prognostic anti-enteroviral (D68) phenolic compounds can be irisolidon, kikkalidon, kaempferol, and anti-influenza (H1N1) – apigenin, quercetin, kaempferol, which was confirmed by *in vitro* studies (irisolidon 1.95% inhibition at 50  $\mu$ M, IC<sub>50</sub> 9.2  $\mu$ M, kikalidone 5.93%, kaempferol 14.83%, apigenin 100% at 50  $\mu$ M, kaempferol 92%, quercetin 48%) and neuraminidase inhibition assay.

Using the Herbal Chemical Marker Ranking System, pharmacognostic analysis data and the results of compounds and extracts pharmacological screening, the choice of Q-markers for herbal raw materials and extracts of *C. sativus* and *Iris* genus plants was substantiated, namely for saffron: crocin, picrocrocin, safranal, rutin, apigenin, for its production by-products – crocin, rutin, isoquercitrin, isoorientin, kaempferol, quercetin, ferulic acid, mangiferin, L-proline, L-pyroglutamic acid based on their use for the treatment of various cancer cell lines; for *Iris* species: irisolidon, irigenin, tectorigenin, kaempferol, quercetin, apigenin, mangiferin, chlorogenic acid and  $\alpha$ -iron, taking into account their anticancer and antiviral potential.

For *C. sativus*, *I. hungarica* and two *Iris* varieties (“Indian Pow Wow”, “Galleon Gold”) developed standard operating procedures for the proper cultivation of medicinal plants in accordance with the guidelines of the WHO guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for medicinal plants. The application of environmental stress methods (cold plasma, vacuum, electromagnetic field) of pre-sowing treatment of *C. sativus* corms allowed to identify and quantify the content of 23 esters of crocetin, rutin, picrocrocin and safranal, while the electromagnetic field had the greatest effect on the biosynthesis of marker compounds: an increase the content of crocin *t*-4GG by 4 times, and safranal and picrocrocin – by 2 times. In addition, the selected stress methods had a positive effect on the total quantitative content of phenolic compounds and free radical activity in perianth and *Crocus* leaves.

The use of monocomponent nutrition with iron chelate (Fe<sup>2+</sup>), potassium chelate (K<sup>+</sup>)

and magnesium sulfate ( $Mg^{2+}$ ) of *Iris* varietal (“Tsikavynka”, “Talibo”, “Widcombe Fire”) showed the dynamics of a stable content of phenolic compounds, in addition, a significant content of genistin marker compounds was noted (up to 9.67 mg/g), irigenin (up to 3.52 mg/g) and irisolidon in the rhizomes, and chlorogenic acid and mangiferin in *Iris* leaves. Determination of the optimal terms for harvesting *Iris* raw material from 16 populations of Ukraine, Lithuania, and Latvia showed that the content of phenolic compounds depends on the growing season and has a maximum accumulation in summer.

According to the results of the research, the following patents were obtained: for the invention “Method of obtaining a substance with anticancer, antioxidant and antibacterial activity from *C. sativus* perianth” No. 124210 from 04.08.2021; for the utility model “Method of cultivation, harvesting and storage of saffron” No. 135685 from 10.07.2019; “The method of obtaining a substance with anticancer, antioxidant, and antibacterial activity from *Crocus* leaves” No. 146567 from 03.03.2021; an application for a European Union patent LT2021 527, 106245, dated 03.06.2021, was submitted for a method of obtaining a polysaccharide complex from *C. sativus* corms with a cytotoxic effect, and “Saffron cultivation strategies in Ukraine. Methodological recommendations for optimizing the technology of growing and harvesting saffron (*Crocus sativus*) in different soil and climatic zones of Ukraine” (2019) were implemented in the work of farms.

*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.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....</b>	<b>33</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>37</b>
<b>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).....</b>	<b>51</b>
1.1 Рослини роду Крокус.....	52
1.2 Рослини роду Ірис.....	56
1.3 Хімічний профіль та фармакологічна активність рослин роду Крокус .....	61
1.3.1 Компонентний склад рослин роду Крокус .....	61
1.3.2 Сучасні аспекти використання крокусу посівного.....	72
1.4 Біологічно активні сполуки та фармакологічні властивості рослин роду Ірис .....	76
1.4.1 Основні представники БАР рослин роду Ірис .....	76
1.4.2 Узагальнення даних щодо використання рослин роду Ірис .....	84
1.5 Закономірності біосинтезу вторинних метаболітів у рослин роду Крокус та Ірис.....	88
1.5.1 Рослини роду Крокус.....	88
1.5.2 Рослини роду Ірис.....	90
1.6 Сучасне забезпечення якості рослинних препаратів. Належне вирощування.....	92
1.6.1 Вплив факторів навколишнього середовища на хімічний склад рослин .....	93
1.6.2 Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження як частина родини стандартів .....	96
<b>РОЗДІЛ 2 ДИЗАЙН ТА МЕТОДОЛОГІЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ .....</b>	<b>102</b>
2.1 Об'єкти дослідження .....	102
2.2 Умови культивування рослин роду Крокус та Ірис, агрохімічний аналіз ґрунту, географічні та кліматичних даних .....	110
2.3 Методологія та дизайн досліджень.....	112
2.3.1 Формування дизайну досліджень з позицій QbD.....	112

2.3.2 Вибір маркерів якості з використанням підходу HerbMars .....	119
2.4 Методи досліджень.....	121
2.4.1 Проведення прескринінгу БАР.....	121
2.4.2 Спектрофотометричні методики визначення кількісного вмісту БАР та антиоксидантної активності .....	122
2.4.3 Хроматографічні методи аналізу БАР у сировині та сухих екстрактах .....	124
2.4.4 Одержання рослинних сухих екстрактів для досліджень активності <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> .....	132
2.4.5 Загальна процедура експерименту виділення речовин та встановлення їх будови .....	133
2.4.6 Методи передпосівного впливу: холодна плазма та монокомпонентне живлення.....	136
2.4.7 Фармакологічні методики визначення активності зразків та індивідуальних речовин .....	138
2.4.8 Розробка параметрів стандартизації сировини к. посівного .....	143
2.4.9 Статистичні та кореляційні методи .....	145
<b>РОЗДІЛ 3 ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ВПЛИВ ЕКОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ НА КОМПОЗИЦІЙНИЙ СКЛАД ШАФРАНУ. ОБГОВОРЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ШАФРАНУ .....</b>	<b>146</b>
3.1 Порівняльна характеристика зразків шафрану з різних країн світу відповідно до вимог ISO 3632.....	146
3.2 Порівняльне дослідження вмісту фенольних сполук та речовин-маркерів (апокаротиноїдів) методом ВЕРХ.....	152
3.2.1 Розробка методики хроматографічного визначення фенольних сполук та апокаротиноїдів у шафрані .....	153
3.2.2 Ідентифікація БАР у зразках шафрану .....	155
3.2.3 Порівняльне дослідження вмісту апокаротиноїдів у зразках шафрану .....	158
3.2.4 Порівняння вмісту фенольних речовин в зразках шафрану .....	161
3.3 Розробка методики та результати дослідження складу карбонових кислот та амінокислот у шафрані методом ГХ-МС164	



3.4 Оцінка впливу факторів навколишнього середовища на компонентний склад зразків шафрану з різних країн .....	172
3.5 Дослідження речовин-маркерів шафрану методом ВЕТШХ	177
3.6 Розробка методик для виявлення фальсифікацій шафрану..	180
3.6.1 Хроматографічне дослідження можливих фальсифікацій шафрану .....	180
3.6.2 Розробка методики визначення колхіцину у рослинній сировині .....	182
3.7 Розробка монографії ДФУ «Шафрану посівного приймочки <sup>N</sup> » для введення до національної частини ДФУ .....	186
3.7.1 Обґрунтування вибору речовин-маркерів сировини та екстрактів шафрану .....	186
3.7.2 Розробка методики одержання робочих стандартних зразків пікрокроцину та кроцинів .....	187
3.7.3 Результати експериментальних досліджень з розробки монографії ДФУ «Шафрану посівного приймочки <sup>N</sup> ».....	192
3.8 Обговорення фармакологічної активності екстрактів шафрану .....	199
3.8.1 Одержання екстрактів з шафрану та дослідження їх хімічного складу .....	199
3.8.2 Дослідження антиоксидантної дії методом <i>in vitro</i> .....	202
3.8.3 Дослідження цитотоксичної дії екстрактів та індивідуальних речовин з шафрану методом <i>in vitro</i> .....	203
3.8.4 Дослідження антибактеріальної дії методом <i>in vitro</i> .....	206
3.8.5 Результати дослідження антинейрамінідазної, протизапальної та противірусної активності <i>in vitro</i> .....	207
3.8.6 Результати дослідження протизапальної активності та токсичності екстрактів <i>in vivo</i> .....	208
Висновки до розділу 3 .....	209
<b>РОЗДІЛ 4 ПОБІЧНІ ПРОДУКТИ ВИРОБНИЦТВА ШАФРАНУ: ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ .....</b>	<b>212</b>
4.1 Дослідження БАР листя к. посівного .....	212
4.2 Дослідження БАР оцвітини к. посівного.....	218

4.2.1 Дослідження компонентного складу оцвітини к. посівного .....	218
4.2.2 Виділення БАР з оцвітини к. посівного та встановлення їх структури .....	222
4.3 Порівняльний скринінг БАР у листі та оцвітині різних видів та сортів рослин роду Крокус .....	228
4.4 Дослідження складу та вмісту БАР у бульбоцибулинах к. посівного .....	231
4.5 Хімічний профіль сухих екстрактів з побічних продуктів виробництва шафрану та обговорення результатів їх фармакологічного дослідження .....	234
4.5.1 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з листя к. посівного .....	234
4.5.2 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з оцвітини к. посівного .....	237
4.5.3 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з БЦ к. посівного .....	239
4.6 Обговорення результатів вивчення фармакологічної активності екстрактів листя, оцвітини та бульбоцибулин к. посівного .....	241
4.6.1 Дослідження антиоксидантної дії екстрактів методом <i>in vitro</i> .....	241
4.6.2 Дослідження цитотоксичної дії екстрактів к. посівного та індивідуальних речовин методом <i>in vitro</i> .....	244
4.6.3 Результати дослідження антибактеріальної дії екстрактів методом <i>in vitro</i> .....	249
4.6.4 Результати дослідження антиалергічної дії екстрактів <i>in vitro</i> .....	250
4.6.5 Результати дослідження протівірусної дії <i>in vitro</i> .....	251
4.6.7 Результати дослідження протизапальної дії <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> .....	251
4.7 Обґрунтування вибору речовин-маркерів сировини та екстрактів .....	254
4.8 Розробка параметрів стандартизації побічних продуктів виробництва шафрану та їх сухих екстрактів .....	259
Висновки до розділу 4 .....	272

## **РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ РОСЛИН РОДУ ІРИС ТА ЙОГО ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІД ФАКТОРІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА. ОБГОВОРЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ІРИСІВ ..... 276**

5.1 Дослідження фенольних сполук у видів ірисів методом ВЕРХ .....	276
5.2 Кореляційний аналіз між екологічними факторами та вмістом фенольних сполук у кореневищах та листі ірисів з природних популяцій .....	284
5.3 Дослідження складу карбонових кислот видів ірисів методом ГХ-МС.....	295
5.4 Дослідження складу терпеноїдів у видів ірисів методом ГХ-МС .....	300
5.5 Одержання екстрактів з видів ірисів та дослідження їх хімічного профілю .....	302
5.6. Обговорення результатів фармакологічного скринінгу екстрактів ірисів.....	305
5.6.1 Антиоксидантна дія .....	305
5.6.2 Активність утворення ліпідів .....	308
5.6.3 Протиалергійна дія .....	309
5.6.4 Антибактеріальна дія.....	311
5.6.5 Цитотоксична дія .....	312
5.6.6 Противірусна дія.....	313
5.6.7 Протизапальна активність екстрактів ірисів.....	313
5.7 Індивідуальні речовини ірисів та їх фармакологічна дія.....	315
5.7.1 Виділення та встановлення структури речовин з кореневищ і. угорського.....	315
5.7.2 Прогнозування противірусної та нейрамінідазної дії фенольних речовин з використанням Chem-GPS аналізу .....	325
5.7.3 Фармакологічний скринінг індивідуальних речовин методом <i>in vitro</i> .....	328
5.8 Обґрунтування вибору речовин-маркерів у сировині та екстрактах і. угорського .....	334
Висновки до розділу 5 .....	337

<b>РОЗДІЛ 6 СТАНДАРТИЗАЦІЯ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ КРОКУСУ ПОСІВНОГО ТА РОСЛИН РОДУ ІРИС ЯК ЛРС .....</b>	<b>340</b>
6.1 Імплементация принципів Належного культивування к. посівного в Україні .....	340
6.1.1 Дослідження умов культивування рослин роду Крокус в Україні.....	341
6.1.2 Розробка СОП культивування к. посівного в Україні .....	344
6.1.3 Дослідження впливу методів передпосівної обробки к. посівного для впливу на біосинтез вторинних метаболітів .....	350
6.2 Імплементация принципів Належного культивування рослин роду Ірис в Україні та заготівля сировини у дикій природі .....	357
6.2.1 Дослідження умов культивування рослин роду Ірис в Україні.....	358
6.2.2 Вплив монокомпонентного живлення на біосинтез фенольних сполук у сировині ірисів.....	361
6.2.3 Розробка СОП культивування ірисів в Україні .....	373
6.2.4 Оцінка оптимальних термінів заготівлі сировини ірисів ..	377
Висновки до розділу 6 .....	382
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>384</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>389</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Абревіатура	Повна назва
АФІ	Активний фармацевтичний інгредієнт
БАР	Біологічно активні речовини
БУВ	Бутанол – оцтова кислота – вода
ВЕРХ-ДМД (HPLC-DAD)	Високоєфективна рідинна хроматографія в поєднанні з діодно-матричним детектором
ВЕТШХ (HPTLC) / ТШХ	Високоєфективна тонкошарова хроматографія / Тонкошарова хроматографія
БЦ	Бульбоцибулини
ГА	Генетичний алгоритм
ГХ-МС (GC-MS)	Газова хромато-мас-спектрометрія
ДФУ	Державна Фармакопея України
ЄС	Європейський союз
ЄФ (Ph. Eur.)	Європейська Фармакопея
і.	ірис
к.	крокус
ЛРС / ЛРЗ	Лікарська рослина сировина / Лікарські рослинні засоби
КБП	Коефіцієнт біологічного поглинання
НБС / БС	Національний ботанічний сад / ботанічний сад
НФаУ	Національний фармацевтичний університет
ПХ	Паперова хроматографія
сmt	Селище міського типу
СОП (SOP)	Стандартна операційна процедура
УФ/Вид (UV-Vis)	Ультрафіолетово-видима спектрофотометрія

уш	Уширений сигнал
ФГ	Фермерське господарство
ХНУ	Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
ЯМР	Ядерний магнітний резонанс
ABTS	2,2'-Азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота)
ADT /ADH	Арогенатдегідратаза / Арогенатдегідрогеназа
BPS	Бензофенонсинтаза
CM / CS	Хоризматна мутаза / Хоризматсинтаза
CP	Холодна плазма
CPP	Критичні параметри процесу
C4H	Циннамат 4-монооксигеназа
C3'H	<i>p</i> -кумароїловий ефір 3'-гідроксилаза
4CL	4-кумарат: КоА-лігаза
CHS / CHI	халконсинтази / халконізомераза
CsZCD	Зеаксантин 7,8(7',8')-розщеплення діоксигеназою
CQAs	Критичні атрибути якості
DAC	Лікарський кодекс Німеччини
DBI	Індекс подвійних зав'язків
DMSO	Диметилсульфоксид
DNP-BSA	Динітрофеніл-кон'югований бичачий сироватковий альбумін
DPPH	2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу
DoE	Дизайн експерименту
ED <sub>50</sub>	Половина максимально ефективною концентрації

EMEA / EMA	Європейське агентство з лікарських засобів
EMF	Електромагнітне поле
EPSPS	5-енолпірувілшікімат 3-фосфатсинтаза
EUROPAM	Європейська асоціація виробників трав
FAO	Продовольча сільськогосподарська організація
FDA	Управління з харчових продуктів і медикаментів
FMEA	Аналіз режимів та наслідків відмови
FMNH2	Відновлений мононуклеотид флавіну
fMLF	Формил-метіоніл-лейцил-фенілаланін
GACP	Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження
GACP-MAP	Належна практика культивування та збору лікарських та ароматичних рослин
GAP	Належна сільськогосподарська практика
GWP	Належна практика дикорослого виробництва
HTCC	4-Гідрокси-2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-карбоксальдегід
HACCP	Система аналізу ризиків і критичних контрольних точок
HCT	Квінатгідроксициннамоїлтрансфераза
2HIS	2-Гідроксіізофлаванон
HI4'OMT	Ізофлаван 4'-О-метилтрансфераза
HID	2-гідроксіізофлаванондегідратаза
Herb MaRS	Система ранжирування хімічних маркерів рослин
HMBC	Кореляція гетероядерних множинних зв'язків
HMPC	Комітет з лікарських засобів рослинного походження
HSQC	Гетероядерна одноквантова когерентність

IC <sub>50</sub>	Половина максимальної інгібуючої концентрації
ISO	Міжнародна організація стандартизації
LC-ESI-MS/MS	Рідинна хроматографія-електророзпилювальна іонізаційна-тандемна мас-спектрометрія
MTT assay	Оцінка метаболічної активності клітини
MTBSTFA	N-( <i>t</i> -бутилдиметилсиліл)-N109 метилтрифторацетамід
MC (MS)	Мас-спектрометрія
NRF2	Ядерний фактор еритроїдний 2-пов'язаний фактор 2
NOESY	Ядерна спектроскопія з ефектом Оверхаузера
QbD	Якість шляхом розробки
Q-маркер	Маркер якості
QTPP	Якість цільового профілю продукту
PAL	Фенілаланін амоніак ліаза
PDG / PDT	Префенатдегідрогеназа / префенатдегідратаза
PPY-AT / PPA-AT	Фенілпіруватамінотрансфераза / префенатамінотрансфераза
RBL	Базофільний лейкоцит щурів
RPN	Остаточний пріоритет ризику
Rt	Час утримання
SAR	Зв'язок структура-активність
SD	Шикіатдегідрогеназа
SK	Фермент шикіаткіназа
TAL / TAT	Тирозиноаміацна ліаза / Тирозинамінотрансфераза
UPLC-ESI-MS/MS (UPLC)	Ультрофективна рідинна хроматографія-електророзпилювальна тандемна МС
V	Вакуум



## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

У сучасних дослідження ключовим інструментом є дотримання вимог доказової фармації. З цієї точки зору проблема одержання рослинних лікарських препаратів із стабільним складом діючих компонентів стає дедалі актуальнішою у системі охорони здоров'я. Для досягнення якості і 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 (Bionogica©, 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. Рослин мають давню історію застосування у якості протизапальних, протиракових, гепатопротекторних, тощо засобів, а також визнані багатими джерелами ізофлавоноїдів, флавоноїдів, тритерпеноїдів, ксантонів, апокаротиноїдів, амінокислот тощо (Anaigoudari, 2023; Iwashina, 2020; Singab, 2016). Крім того, для рослин властиве широке вирощування в Україні. 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 у відповідності 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 із 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 з 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, запропонувати шляхи їх попередження та усунення; сформулювати стратегію досліджень із виявлення Q-маркерів сировини та екстрактів з використанням HerbMars підходу;

– Провести первинний скринінг сировини видів рослин роду Крокус та Ірис для вибору 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; запропонувати методи аналізу для запобігання фальсифікації сировини; одержати екстракти з приймочок, стандартизувати їх та дослідити їх фармакологічну активність; розробити структуру монографії для контролю якості шафрану для впровадження до ДФУ;

– Дослідити побічні продуктів виробництва шафрану – листя, оцвітину, 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 та 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 вітчизняної сировини. Дизайн експерименту, виявлення, визначення вмісту БАР сировини рослин роду Крокус та Ірис, вибір речовин-маркерів із різних груп (апокаротиноїдів, флавоноїдів, ізофлавоноїдів, фенольних кислот, терпеноїдів) з крокусу посівного та ірису угорського; 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 лікарських рослинних засобів, 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 використане 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 деметилування, метилування, лужного, кислотного, ферментативного гідролізу), фізико-хімічні ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-, NOESY, HSQC і НМВС-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 здійснювалася за вимогами ДФУ. Для обробки даних використовували стандартний пакет програм Microsoft Office.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше 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.

Вперше 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.

Вперше 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.

Вперше 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 вплив передпосівної обробки (холодна плазма, вакуум, електромагнітне поле) бульбоцибулин крокусу посівного на вміст кроцинів у шафрані, та фенольних сполук у листі та оцвітині рослини.

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

Вперше 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 шафраналу, 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 порівняння 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 крокусу посівного (заявка на патент Європейського Союзу LT2021 527, 106245, від 03.06.2021); вперше запропоновано технології одержання рослинних екстрактів з листя, оцвітини крокусу посівного (патент № 124210 на винахід України від 04.08.2021, Бюл. № 31; патент № 146567 на корисну модель України від 03.03.2021, Бюл. № 9); 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).

### **Теоретичне та 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, від 11.08.2023); ТОВ «АГРО-ФОКУС» (Херсонська обл.; Акт впровадження від 15.01.2021); ФГ «Шафран Любимівський» (Херсонська обл., від 28.11.2020); «Крокус.про» (Волинська обл., від 19.05.2023); «Агроленд» (Волинська обл., від 19.05.2023) та в Нідерландах («Mts Schipper & Elberse», 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 №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 <sup>N</sup>» 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 вищих навчальних закладів 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 напрямку, 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, ДАС, 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 сировини та екстрактів та умов вирощування рослин, вдосконалено технологію одержання рослинних 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. Петрікайте 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. (України).

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 наукового ступеня доктор 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 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*. Однак, 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. проведене комплексне фармакогностичне дослідження листя та кореневища *Iris pseudacorus*. Результати дослідження, обговорення чи висновки, що виносились на захист 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:

- 71<sup>st</sup> 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” (Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, 2015, 2017-2023 pp.); 34<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, 36<sup>th</sup>, 37<sup>th</sup> 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, 8<sup>th</sup> Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering (Basel, Switzerland, 2022); 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, організовано Phytochemical Society of Europe and the Phytochemical Society of Asia (Xi'an, China, 2020, 2021); 20<sup>th</sup> Biennial Meeting of SFRR International, організовано Society for Free Radical Research International (Spain, 2021); Vanguard 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 усього 78 наукових робіт (статті, патенти, тези), 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 входять до наукометричних баз даних Scopus та Web of Science – 29 (Q1 – 10, Q2 – 7, Q3 – 10, Q4 – 2 статей).

До додаткових публікацій віднесено: 2 оглядові 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 методичні рекомендації щодо оптимізації вирощування та збору крокусу посівного, 31 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури за темою дисертаційного дослідження, розділу, в якому наведено дизайн та методологія дослідження, інформацію про об'єкти та методики дослідження, чотирьох розділів експериментальних досліджень, висновків, списку використаних джерел та Додатки. Дисертація викладена на 332 сторінках основного тексту, проілюстрована 70 таблицями та 120 рисунками, 1 схема. Бібліографія включає 520 найменувань, з них 467 латиницею.

**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)**

Лікарські рослини відіграють важливу роль у глобальних системах охорони здоров'я, оскільки понад 80% населення використовують природні продукти в первинному медичному обслуговуванні. Родина Ірисові (Iridaceae Juss.) складається з 92 родів і 1800 видів, включених до порядку однодольних Asparagales [1,2]. Крокуси та іриси представляють значні компоненти квіткового розмаїття в Євразії та Північній Америці. Рослини з родини Ірисові, викликають інтерес як декоративні рослини, особливо іриси, крокуси, гладіолуси, беламканда та фрезії. З іншого боку, з економічної точки зору, приймочки к. посівного (шафран) та кореневища і. флорентійського, і. германського, і. білого (під загальною назвою *Orris root*) вважаються найважливішими видами сировини родини [3]. Олія ірису є одним із найцінніших інгредієнтів у парфумерії [4]. Фітохімічні дослідження різних видів роду Ірис та Крокус показали наявність ізофлавонів, флавонів, флаванонів, тритерпенів, іридалів, ксантонів, хінонів, пельтогіноїдів і стильбенів [5, 6, 7, 8]. Рослини роду Крокус окрім фенольних сполук, містять апокаротиноїди, антоціани, терпеноїди, фітостероли, тощо [9]. Екстракти та активні компоненти рослин родини Ірисові продемонстрували протизапальну, антиоксидантну, антидіабетичну, гепатопротекторну, гіполіпідемічну [5, 7, 10], протимікробну, протипухлинну, антидепресантну та антихолінестеразну дії [5, 11, 12].

## 1.1 Рослини роду Крокус

Рід Крокус (*Crocus* L.) налічує близько 80 видів багатолітніх трав'янистих бульбоцибулинних рослин, які поширені в країнах Середземномор'я, Малої і Середньої Азії. Зона розповсюдження рослин роду Крокус знаходиться між 10°W та 90°E та між 30°N та 52°N (оптимальний температурний діапазон становить від 4 до 23°C), з річною кількістю опадів від 0,1 до 1,1 метра та добре дренованим ґрунтом із рН 5,8 до 7,8. Для видів крокусів характерне тонке листя з білими, жовтими або фіолетовими квітками; рослини поширені в основному в середземноморському регіоні (рис. 1.1), але широко культивуються.

У флорі України зростає 7 видів крокусів, з них *C. banaticus* J.Gay і *C. heuffelianus* Herb. поширені в західній частині, *C. reticulatus* M.Bieb. в Центральній та Східній частинах України, а в Криму – *C. angustifolius* Weston, *C. tauricus* Trautv., *C. pallasii* Goldb., *C. speciosus* M.Bieb. Ці види є рідкісними та зникаючими та занесені до «Червоної книги України». Однак, зараз існує велика кількість сортів крокусів, але тільки один представник – к. посівний – використовується при лікуванні та у харчуванні під назвою «шафран». К. посівний (*C. sativus* L.) – бульбоцибулинна багаторічна рослина, від 10 до 25 см заввишки, з яскраво-фіолетовими квітками (рис. 1.2а), тривалість цвітіння яких 1 – 2 дні, є однією з найцінніших харчових та лікарських рослин у світі. Квітка складається з шести листочок оцвітини, трьох тичинок і вершини, яка завершується трьома червоними гіллястими приймочками, які використовуються для отримання прянощі. Це однодольна триплоїдна рослина, з вегетативним розмножується, оскільки є генетично стерильною. Найбільш імовірним предками є види *C. cartwrightianus* Herb. і *C. pallasii* Goldb. [13].

Вирощуванню к. посівного більше 3500 років. Він походить з Греції (Санторіні). Результати недавніх досліджень вказують на те, що, рослина вперше була культивована на Криті протягом пізнього бронзового століття. Звідти він поширився на Індію, Китай та країни Близького Сходу. А звідти пізніше араби принесли шафран до Середземноморської Європи.



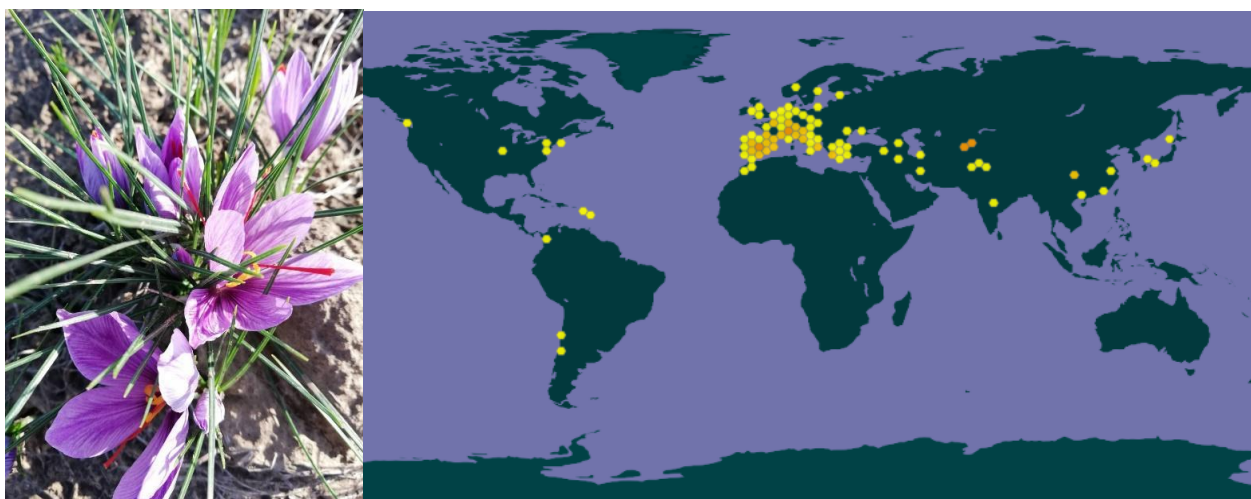


Рис.1.1 Розповсюдженість крокусу посівного у світі (GBIF database 2024)



Рис. 1.2 (а) Зовнішній вигляд бульбоцибулини, квітка та приймочки к. посівного; (б) зовнішній вигляд спеції «шафран»

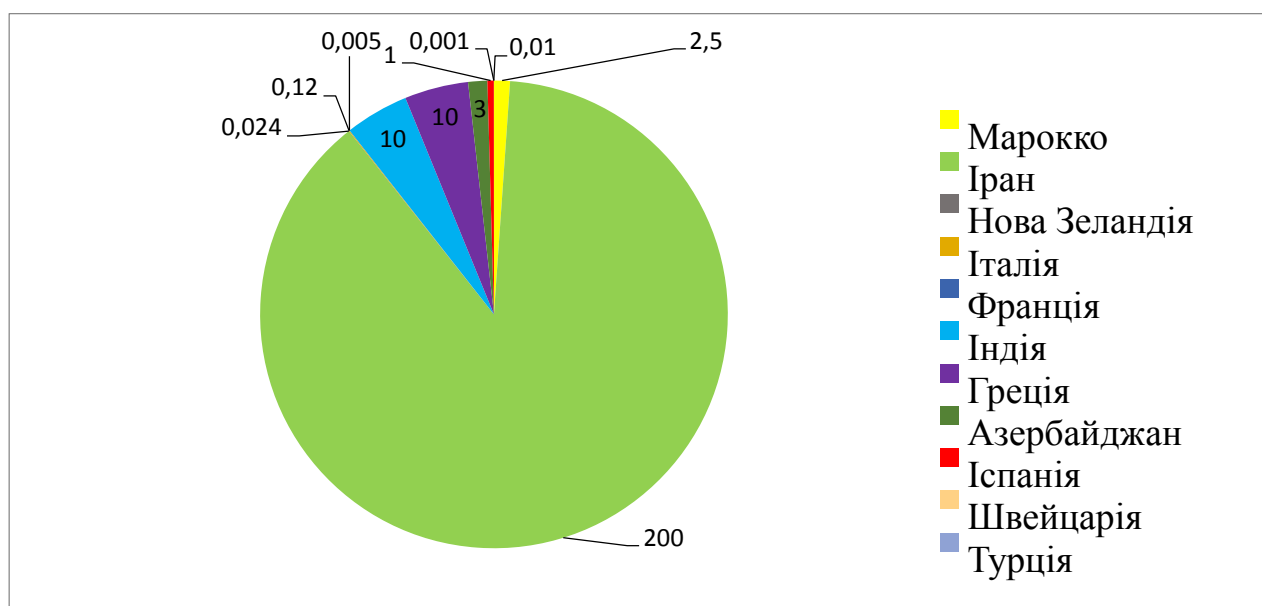


Рис.1.3 Об'єми виробництва шафрану у світі (тон/рік) на 2016 рік

Згідно з археологічними дослідженнями древніх монет і написів, шафран вже культивувався в греко-римський період на Сицилії [14]. Зараз рослина культивується в різних регіонах світу, включаючи Іспанію, Індію, Іран, Туреччину, Грецію, Італію, Швейцарію (рис. 1.1., 1.3.), а з 2015 року в Україні. К. посівний культивується в різних кліматичних умовах, що обумовлює відмінний склад компонентів та активність (кліматичні умови для різних країн-виробників шафрану наведено у таблиці А.1 (Додатки).

Шафраном є спеція, а саме висушені червоні приймочки маточки (червоні нитки або стиль, які утворюють жіночі репродуктивні частини квітки) к. посівного (рис. 1.2б). Під час збору врожаю цілу квітку видаляють з рослини, а пізніше приймочки відокремлюють від квітки і сушать. Якісний шафран продають у вигляді неподрібнених ниток. Шафран як спеція має найвищу вартість у світі – в середньому 1500 – 2200 €/кг. Є шафран, 1 кг якого коштує більше 30 000 €. Сьогодні площа вирощування досягає 55 000 га у всьому світі, з врожайністю понад 418 тон/рік [15, 16]. З 75–100 квіток шафрану збирають 225–300 ниток приймочок, з яких виходить лише 0,5 г сухих приймочок [17]. Шафран є прибутковою та конкурентоспроможною культурою [18].

Найкрупнішим світовим виробником шафрану є Іран – 140 тон на 2023 рік. Основними країнами-виробниками є крім Ірану є Марокко, Індія, Греція, Італія, а обсяг виробництва досягає 370 тон на рік [19, 20]. Іран має найширшу територію культивування рослини, більша частина якої знаходиться в провінції Хорасан. У Індії в Кашмірі крокус широко культивується, в той час як в Греції (Казані, Західна Македонія), Азербайджані (півострів Апшерон) та Марокко (район Толуїдин) значно менші території, навіть з урахуванням типології врожаю. У Італії також є невеликі площі для культивування приблизно 35 га, здебільшого зосереджені в Сардинії (близько 25 га у с. Сан-Гавіно, провінція Кальяні) та Абруцо (близько 6 га у Альтопіано ді Новелі, в Авіалі). Різними є масштаби виробництва шафрану у Франції, Туреччині, Швейцарії, Ізраїлі, Пакистані, Китаї, Єгипті, Об'єднаних Арабських Еміратах, Японії та Австралії.

З 2015 року культивування к. посівного започатковано в Україні із загальним обсяг біля 0,07 тон/рік з площі 20 га. Виробництво шафрану в Україні – невелика, але зростаюча промисловість. Започаткувало даний напрямок в Україні фермерське господарство «Шафран Любимівський» у смт. Любимівка, Каховського району, Херсонської області у 2015 році, маючи плантацію у 0,05 га. Перший врожай склав 250 г сухого шафрану. З 2015 року до 2018 року кількість фермерів, які придбали посадковий матеріал шафрану у «Шафран Любимівський» досягнула 150 господарств (власний збір даних). І тепер в Україні шафран для продажу почали вирощувати у Закарпатській, Одеській, Вінницькій, Чернігівській, Волинській та інших областях. Динаміка врожайності шафрану на прикладі ФГ Шафран Любимівський (Україна), як фермерства з найдовшою історією вирощування даної культури в Україні, наведено на рисунку 1.4. Вирощування к. посівного є реальною можливістю диверсифікувати прибуток у багатофункціональних господарствах у степних районах України. Крім того, це потенційно цінна фармакологічна сировинна база.

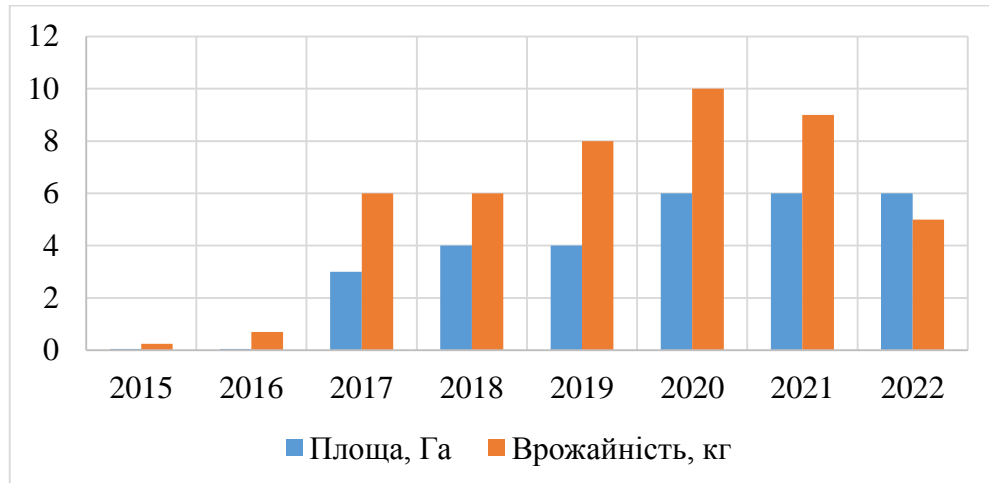


Рис. 1.4 Врожайність шафрану з 2015 до 2022 рр. з плантації у смт. Любимівка, Херсонська обл., Україна (дані надані Головним фахівцем з ФГ Шафран Любимівський)

Основними країнами, що імпортують шафран є Німеччина, Італія, США, Швейцарія, Великобританія та Франція [21]. Іспанія також імпортує велику

кількість шафрану, особливо з Ірану, Греції та Марокко для реекспорту та для потреб її внутрішнього ринку [17, 22].

Сушу спецію шафран можуть фальсифікувати іншими рослинними продуктами, зокрема куркумою, паприкою, квітками нагідків, арніки або чорнобривців (під назвою «імеретинський шафран»), які мають більш низьку якість, а також жовтими тичинками (чоловічі репродуктивні частини) тієї ж квітки. Звичайне неправильне маркування куркуми (*Curcuma longa*), як «індійський шафран», «американський шафран» або «мексиканський шафран», також межує з шахрайством, жоден з перелічених продуктів не є к. посівним [23]. Враховуючи розповсюджену фальсифікацію шафрану, є важливим проводити контроль якості сировини та виявляти фальсифікацію. Збереження якості шафрану необхідно сертифікувати на міжнародному ринку торгівлі відповідно до міжнародних стандартів якості Міжнародної організації по стандартизації (ISO) або Управління продовольства і медикаментів (FDA). У наш час вирощування к. посівного набуває все більшого інтересу через його основне використання в промисловості, а саме: текстильна, фарбувальна, лікарська та кулінарна промисловість, харчові добавки, барвники та ароматизатори; крім того, він також цікавий своїми фармакологічними властивостями [24].

## 1.2 Рослини роду Ірис

Рід Ірис (*Iris* L.), який зараз налічує приблизно 310 видів, є найбільшим родом родини [25, 26, 27, 28]. Охоплення та таксономія рослин роду Ірис довгий час були та все ще є предметом дискусій. Деякі автори прийняли широку концепцію роду Ірис [27, 28, 29, 30], тоді як інші прагнули поділити його на 25 вузько визначених родів [26, 31].

Найбільш вичерпну та широко прийняту систему широко окресленого роду Ірис розробив *Mathew B. F.* (1989) [29]. Рід був поділений на шість підродів: *Iris*, *Limniris* (Tausch) Spach, *Nepalensis* (Dykes) G.H.M. Lawr., *Xiphium* (Mill.) Spach, *Scorpiris* Spach і *Hermodactyloides* Spach. Система була оновлена та модифікована

деякими авторами [32], але результати молекулярних досліджень не підтвердили цей поділ [30, 33, 34, 35, 36, 37]. За думкою вчених для вирішення таксономічних проблем роду Ірис необхідні подальші комплексні молекулярні дослідження [27, 38]. Крім того, природна гібридизація вносить значний внесок у таксономічні проблеми дуже різноманітного роду Ірис [34, 35; 39].

Найважливішими центрами роду є Середземномор'я, Центральна Азія, Східна Азія та Північна Америка [25, 27, 28, 30] (рис. 1.5). У Середземноморському регіоні види ірисів є найрізноманітнішими – приблизно 140 видів [40]. Загалом 57 видів цього роду було зареєстровано в горах Центрально-Азійського центру різноманітності [27], 58 видів у Східно-Азійському центрі різноманітності [41] і 34 види в Північній Америці [42].

Більшість видів рослин роду Ірис зустрічаються в посушливих регіонах, де вони ростуть у напівпустелях і на скелястих гірських схилах, але багато видів, що зустрічаються в помірних зонах, ростуть у середовищі існування (луги, ліси та узлісся) або навіть у заболочених місцях [27, 39, 40, 42].

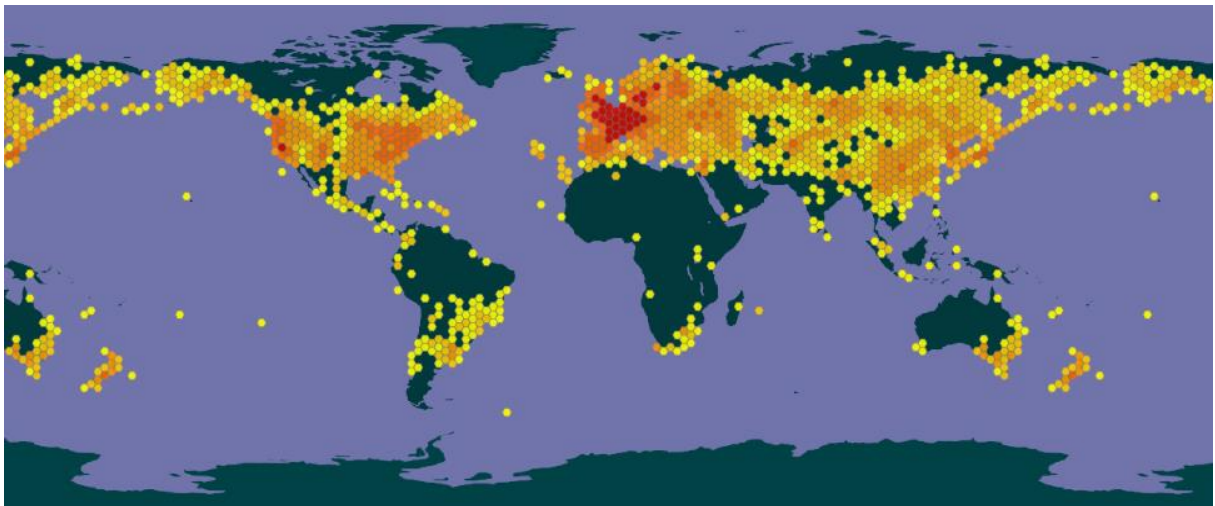


Рис.1.5 Глобальне розповсюдження рослин роду Ірис (GBIF, 2024)

Для території України в літературних джерелах наводиться різна кількість видів: «Флора УРСР» – 15 видів (1938–1965 рр.), «Визначник рослин України» – 13 видів (1965 р.). На даний час до флори України входять 16 видів ірисів (рис. 1.6) [43]. До “Червоної книги України” [44] були включені три види – *I. pineticola* Клок., *I. pseudacuperus* Schur й *I. pontica* Zapal., пізніше до третього видання книги



[45] окрім вищезгаданих ірисів, додані *I. furcata* M. Vieb. та *I. sibirica* L. Більшість видів флори України описані з Середньої Європи і Кавказу, один вид – *I. pineticola* Клоков., описаний М. Клоковим з території України (Харківська обл.) [46]. Проф. Мосякін С. Л. (Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН, Україна) включає до роду Ірис 16 видів, серед них *I. musulmanica* Fomin, *I. branzae* Prodan та *I. aphylla* L., кількість яких поступово зменшувалась та останнім часом дані види культивувались лише у Криму у ботанічних садах. За останніми публікаціями с.н.с. Буйдіна Ю. В. (НБС ім. М. М. Гришка НАН України) до роду включено 15 видів [47]. На основі літературних даних автор виключає з роду вищенаведені три види ірисів (які зустрічаються лише в культивованій флорі, однак додатково включає *I. furcata* M.Vieb., *I. scariosa* Willd., *I. aequiloba* Labed., дані про поширення яких по території степу України зустрічаються у літературних джерелах. Неоднозначним також є віднесення видів до тієї чи іншої секції. На сьогодні на території України зростають у дикому вигляді або є ендеміками види трьох підродів ірисів – *Iris*, *Limniris* та *Xyridion*.

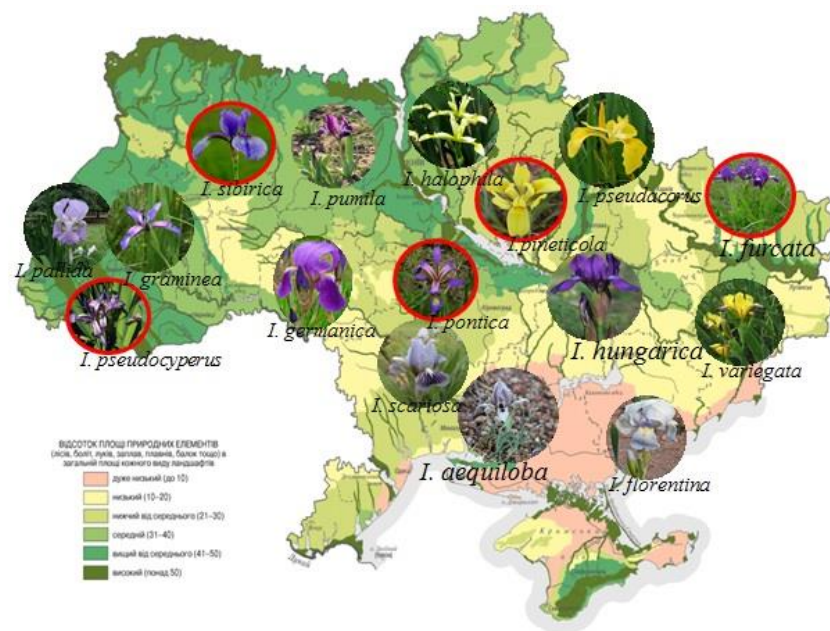


Рис. 1.6 Розповсюдження ірисів флори України

Слід зазначити, що і. угорський (*Iris hungarica* Waldst. & Kit., синоніми: *Iris aphylla* L., *Iris biflora* L., *Iris furcata* var. *diantha* (K.Koch) Grossh. природоохоронний статус виду: зникаючий [28]), поширений в більшості країн

Європи (Албанія, Болгарія, Чехія, Словаччина, Німеччина, Угорщина, Польща, Румунія, Україна, Словенія, Хорватія, Сербія) (рис. 1.7). І. угорський – це короткочерешковий ірис, з широким мечоподібним листям, з гладкою виступаючою віссю, яка несе поодинокі фіолетові квітки. Оцвітина правильна, віночкоподібна, з більш-менш вираженою трубкою та шести роздільним відгином. Природним середовищем існування є узбережжя річок.



Рис. 1.7 Природне розповсюдження ірису угорського у світі (GBIF, 2024)

*The American Iris Society* [48], засвідчує, що і. угорський має дуже потужні адаптаційні можливості: взимку він впадає в повний стан спокою не маючи видимого листя, тому він дуже толерантний до холодних зон. Рослина процвітає на сонячних і добре дренованих місцях. Як і більшість бородатих ірисів, вона є досить стійкою до посухи та відсутності осадів. Рослина з успіхом широко культивується [49], в тому числі в Україні.

Наявність серед видових ірисів представників різних екоморф дає можливість відбирати рослини для фармакогностичних досліджень з метою впровадження сировини у фармацевтичне виробництво. Іриси мають різний екологічний діапазон місцезростання. Найбільш водолубним ірисом є *I. pseudacorus* L. Рослинами, що зростають уздовж рік, є *I. sibirica* L., *I. halophila* Pall, *I. hungarica* – відноситься до лісових видів; до степових та напівстепових видів належать *I. versicolor* L., *I. humilis* Georgi., *I. pumila* L., *I. scariosa* Willd. ex

Link – це представник кам'янистих сухих пустель *I. versicolor*, *I. pallida*, *I. germanica*, *I. florentina* занесені на територію України шляхом інтродукції, що, як відомо, може траплятися у природних умовах, отже до нашої флори внесені дані види як здичавилі форми інтродукованих рослин. Враховуючи цей факт, ці види скоріше не є ендемічними для нашого регіону.

Одна з недавніх робіт с.н.с. Троїцького М. О. (Миколаївський обласний еколого-натуралістичний центр учнівської молоді, Україна) разом зі співавторами [38], наводить дані, щодо класифікації рослин роду Ірис, узагальнюючи вже існуючі традиційні класифікації за Г.І. Родіоненком (1961) та *Mathew B. F.* (1989), крім того, в ній надано дані щодо сучасних досягнень у філогенетичних дослідження даного роду з використанням функціональних геномних досліджень, із залученням молекулярних маркерів в ірисах. Усі сучасні дослідження направлені на те, щоб завершити інтенсивні екологічно-еволюційні дослідження цієї групи рослин. Отримані дані можуть допомогти при розв'язанні питань систематики, філогенії, генетики і практичних завдань селекції рослин роду Ірис та, крім того, сприятимуть більш належному використанню сировини ірисів у практичній фармації.

Рослини роду Ірис сьогодні належать до найпоширеніших та найпопулярніших квітково-декоративних культур. На сьогодні кількість офіційно зареєстрованих сортів ірисів наближається до 100000 [25, 29, 40, 50]. Кореневища, бульбоцибулини або листя деяких видів ірису використовуються для фарбування тканин [51], у традиційній медицині [52] та парфумерії [53]. Як ефіроолійну рослину іриси культивують у Франції, Германії, Італії (Флоренція, Тоскана), Іспанії, США (табл. А.2, Додатки). Окрім приватних господарств, значні їх колекції перебувають у ботанічних установах різного підпорядкування (ботанічних садах, арборетумах, дослідних станціях тощо).

Іриси природньої флори нашої країни є переважно мезофітами, види досить екологічно пластичні, непримхливі до умов зростання, успішно розмножуються за допомогою насіння та вегетативно, є відносно стійкими до шкідників та хвороб, що робить ці рослини перспективними для введення у культуру з метою фармацевтичного чи медичного використання. За даними досліджень [54, 55], види



рослин роду Ірис успішно інтродуковані і в Україні. На основі аналізу особливостей онтоморфогенезу інтродукованих видів ірисів, дослідження морфологічних, біологічних, цитогенетичних характеристик, авторами підтверджено перспективність розширення видової та сортової бази ірисів. Іриси характеризуються високою зимостійкістю, адаптованістю до низьких температур. Рослини добре зберігають декоративні властивості при інтродукції. Садові борідкові іриси є культурами, що мають складне полігібридне походження, вони добре схрещуються та дають насіння [54].

Сировинна база ірисів в Україні є потужною, що обґрунтування їх дослідження як перспективної сировини для фармацевтичної галузі.

### 1.3 Хімічний профіль та фармакологічна активність рослин роду Крокус

#### 1.3.1 Компонентний склад рослин роду Крокус

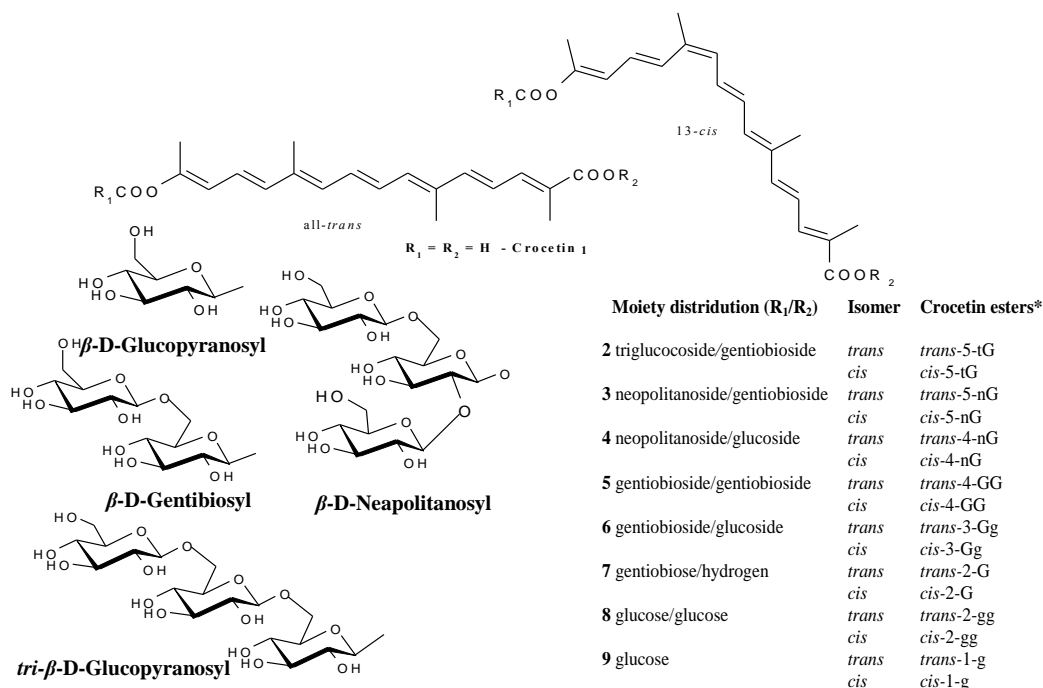
У оглядовій статті [9] нами систематизовано дані щодо хімічного складу та фармакологічної активності сировини рослин роду Крокус. У цьому огляді наведено сучасні дані про хімічні складові та фармакологічну активність приймочок к. посівного, а також інших частин рослин (оцвітину, тичинки, листя, бульбоцибулини) різних видів рослин роду Крокус.

Найбільш дослідженим є к. посівний. Хімічний склад шафрану детально досліджено рядом авторів [56, 57]. З приймочок виділено понад 100 БАР, переважно терпени, флавоноїди, антрахінони, антоціани та ін. Сучасні фармакологічні дослідження шафрану виявили широкий спектр біологічної активності: антиоксидантну, цитотоксичну, антимікробну, антидепресантну, гіполіпідемічну, протипаразитарну та ін. Показано, що приймочки ефективні в лікуванні психічних розладів, нейродегенеративних захворювань, дисфункцій навчання та пам'яті, серцево-судинних захворювань, атеросклерозу, гіперліпідемії, цукрового діабету, гіпертонії, епілепсії та судом.

Під час виробництва шафрану утворюється велика кількість пелюсток і чашолистків (92,6 г на 100 г квіток), які витрачаються як біозалишки та марний матеріал [58, 59]. Загалом близько 350 кг пелюсток або 160 000 квіток, 1500 кг листя і сотні БЦ (що є занадто малими та/або з фізичними чи біологічними пошкодженнями) відкидаються/утилізуються, щоб отримати лише 1 кг сухих приймочок [60]. Однак ця біомаса є потенційним джерелом БАР, використання яких може значно підвищити рентабельність і сталість виробництва шафрану [61]. Останні наукові дослідження свідчать про актуальність створення ЛРЗ на основі відходів виробництва шафрану – листях, оцвітині та дрібних БЦ, як джерел БАР [9,60]. Листя та квіти накопичують флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, антоціани, які виявляють різні фармакологічні ефекти та можуть використовуватися як функціональні компоненти харчових продуктів, лікарських засобів та харчових добавок [57].

В огляді *Chen N.* та *Yang B.* [62] було описано 19 флавоноїдів, 38 терпеноїдів (4 тетратерпени, 2 тритерпеноїди, 12 дитерпеноїдів) і 19 монотерпенів, ідентифікованих у к. посівному. Тетра- та дитерпеноїди були виявлені в шафрані, тритерпени були виявлені в БЦ, монотерпени були зареєстровані в приймочках, пелюстках і пилку. У шафрані виявлено понад 150 летких, нелетких і ароматичних сполук, що належать до ліпофільних і гідрофільних вуглеводів, білків, амінокислот, мінералів, вітамінів [63, 64]. Основними хімічними складовими шафрану є естери кроцетину, пікрокроцин і шафраналь [65].

*Апокаротиноїди.* Найбільш характерними та важливими фітохімічними речовинами, яких були виявлені в приймочках крокусу, є водорозчинні  $C_{20}$  апокаротиноїдні глікозиди – кроцетин **1** ( $C_{20}H_{24}O_4$ ) (синоніми:  $\beta$ -D-глюкозилметиловий естер кроцетину, диметилкроцетин, ін.) та його глікозидні естери кроцини ( $C_{44}H_{64}O_{24}$ ) (речовини **2-9** на рис. 1.8), кон'юговані з одним або декількома фрагментами цукру [66], а також жиророзчинні каротиноїди, такі як фітоєн, зеаксантин,  $\alpha$ - і  $\beta$ -каротин, лікопін фітофлуєн.



\* 5, 4, 3, 2 – кількість молекул глюкози, приєднаних до молекули кроцетину; t – триглюкоза; Г – гентіобіоза; г – глюкоза; п – неаполітаноза

Рис. 1.8 Структурні формули естерів транс- і цис-кроцетину та замісників при R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub>

Шість кроцинів були вперше виділені та ідентифіковані в 1982 році *H. Pfander* та *F. Wittwer* [66], а потім *G. Speranza* ідентифікував цис- і транс-ізомери кроцинів за допомогою ВЕРХ та спектрофотометрії УФ-Вид [67]. У 1995 році *P.A. Tarantilis* ідентифікував численні кроцини [68], а в 2006 році *M. Carmona* та його співавтори [69] винайшли ще чотири кроцини, і вони спростили назву глікозидних естерів. Номенклатура, запропонована *M. Carmona* [69], стала загальновизнаною і використовується для інтерпретації результатів. Основними естерами кроцетину в шафрані є *транс*-кроцетиновий ди-( $\beta$ -D-гентіобіозил) естер (названий *транс*-4-GG) **5** (38,6% від загального вмісту), *транс*-кроцетиновий ( $\beta$ -D-глюкозил) естер-( $\beta$ -D-гентіобіозилу) (під назвою *транс*-3-Gg) **6**, естер *транс*-кроцетину ( $\beta$ -D-гентіобіозилу) (під назвою *транс*-2-G) **7** [70]. З приймочок *S. neapolitanus* cv. «Blue Bird» були виділені два нових глікозилових естери кроцетину: кроцетин-( $\beta$ -D-гентіобіозил)-( $\beta$ -D-неаполітанозилу) естер (або *транс*-5-nG) **3** [71] і кроцетин-ди-( $\beta$ -неаполітанозилу) естер. Однак,

згідно з *C. Dufresne* [72] останній був пігментом, який переважно виробляється культурою к. посівного у суспензії, коли субстратом був кроцетин.

Вміст кроцинів у шафрані становить приблизно 6–16% від сухої маси і залежить від сорту, умов вирощування та методів обробки сировини [73, 74]. Але згідно з даними, наданими групою *Tsimidou M. Z.* [75, 76], рівень кроцинів може сягати до 30%, а згідно з *S. Llorens* [70] кроцини були виділені з шафрану з виходом 25,5%. *Moraga Á.R.* та співавтори [77] виявили, що основними сполуками, які накопичувалися під час розвитку приймочок к. посівного, були кроцетин, його глікозидні похідні та пікрокроцин, кількість яких збільшувалась, коли приймочки досягали повністю розвиненої стадії. Кроцини та кроцетин відповідають за колір шафрану та використовуються як природний харчовий барвник [78].

*Монотерпеноїди.* Пікрокроцин і шафраналь є двома іншими основними фітохімічними речовинами шафрану (рис. 1.9), які утворюються з продуктів окислення каротиноїдів і відповідають за його гіркий смак і аромат [79].

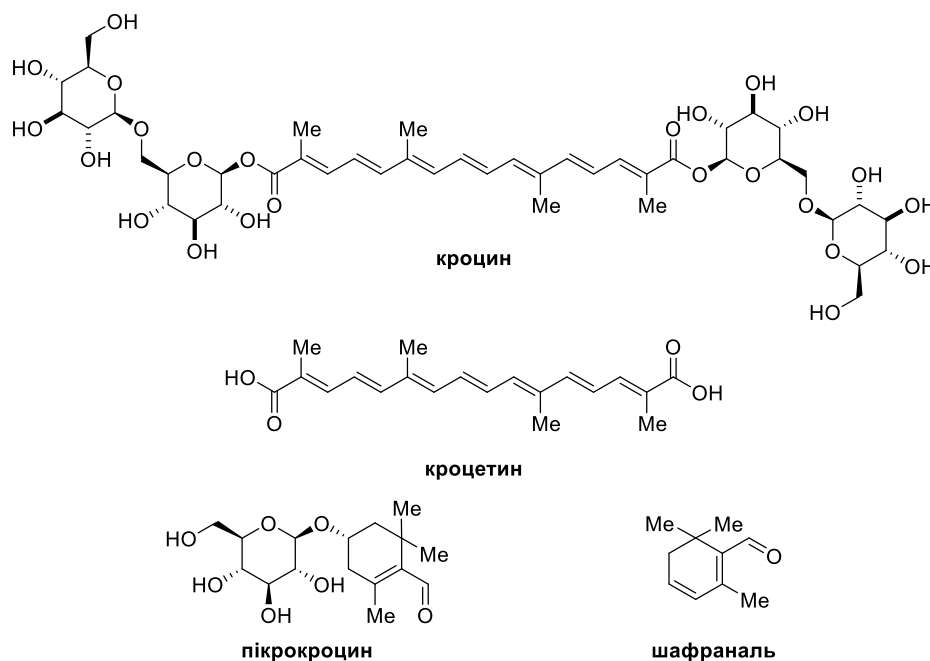


Рис. 1.9 Структурні формули основних маркерних сполук шафрану

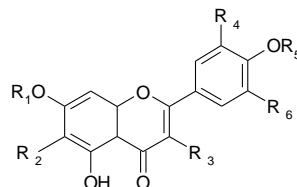
Пікрокроцин ( $C_{16}H_{26}O_7$ ) є попередником шафраналю ( $C_{10}H_{14}O$  (2,6,6-триметил-1,3-циклогексадієн-1-карбоксальдегід) тритерпенового альдегіду, який є основним компонентом ефірної олії, що відповідає за аромат шафрану.

Пікрокроцин вважається основним гірким компонентом шафрану, ця сполука вперше була охарактеризована *R. Buchecker* в 1973 р. [80]. Шафран містить від 2,7 до 12,9% пікрокроцину. Вміст шафраналю у приймочках становить до 1% [83, 84]. Наразі пікрокроцин був виявлений лише в приймочках к. посівного [81], і це найкращий біомаркер автентичності у шафрані [82]. За даними *Maggi L.* [85], вміст шафраналю становить понад 60% вмісту ефірної олії, вміст якої в свою чергу у шафрані становить 0,4–1,3% [79, 86, 87].

*Флавоноїди.* Похідні флавоноїдів є другим за поширеністю класом БАР у шафрані та побічних продуктах його виробництва. Флавоноїди переважно представлені глікозидними похідними кемпферолу [88] (табл. 1.1–1.3). Кемпферол 3-О-софорозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, софорофлавонолозид, кемпферол 7-О- $\beta$ -D-софорозид були ідентифіковані як найпоширені [77, 79]. LC-ESI-MS/MS та HPLC/DAD/MS скринінг виявив низькі рівні кемпферолу 3,7,4'-три-О- $\beta$ -глюкопіранозиду, кемпферолу тетрагексозиду і кемпферолу-3-дигексозиду [89]. Декілька похідних кемпферолу, а саме астрагалін [90], популін (включаючи *C. carwrightianus*) [77, 91], дигідрокемпферол [83], дигідрокемпферол 3-О-гексозид [92] були виділені з приймочок к. посівного. Також виявлено кемпферол 3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, кемпферол 3-О- $\alpha$ -L-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) рамнопіранозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, кемпферол 3-О- $\beta$ -D-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) глюकोпіранозид та їх метоксиловані та ацетильовані похідні. Серед усіх досліджених видів крокусів, кверцетин, мірицетин, таксифолін 7-О-гексозид, ізорамнетин-3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид були ідентифіковані лише у приймочках к. посівного [93]. Деякі флавоноїди були виявлені в оцвітині та листі різних видів крокусів крім к. посівного. У 1984 р. *J.B. Harborne* та *C.A. Williams* [132] виділили кемпферол, софорофлавонолозид, кемпферол 3-О-рутинозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, кверцетин з квіток видів і сортів крокусів, таких як *C. astricus*, *C. corsicus*, *C. etruscus*, *C. minimus*, *C. stellaris*.

Таблиця 1.1

## Структури основних похідних флавонів, ідентифікованих у видів роду Крокус



Назва речовини	OR <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	OR <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>
1	2	3	4	5	6	7
Кемпферол (3,5,7,4'-тетрагідроксифлавоон)	H	H	OH	H	OH	H
Кемпферол 3-О-софорозид-7-О-β-D-глюкопіранозид	β-Glc	H	O-β-Glc-1→2-O-β-Glc	H	OH	H
Софорофлавонолозид (кемпферол-3-О-β-D-глюкопіранозил - (1→2)-β-D- глюкопіранозид; кемпферол-3-О-β-D-софорозид)	OH	H	O-β-Glc-1→2-β-Glc	H	OH	H
Кемпферол 7-О-β-D-софорозид	β-Glc-1→2-β-Glc	H	OH	H	OH	H
Кемпферол 3,7,4'-три-О-β-глюкопіранозид	O-β-Glc	H	O-β-Glc	H	O-β-Glc	H
Кемпферол-3-дигексозид	H	H	O-hex-hex	H	OH	H
Астрагалін (кемпферол 3-О-β -D-глюкопіранозид)	H	H	O-β-Glc	H	OH	H
Популін (кемпферол 7-О-β-D-глюкопіранозид)	β-Glc	H	OH	H	OH	H
Кемпферол 3-О-β-D-глюкопіранозил-(1→2)-О-β-D-глюкопіранозид-7-О-β-D-глюкопіранозид	β-Glc	H	O-β-Glc-1→2-O-β-Glc	H	OH	H
Кемпферол 3-О-α-L-(2-О-β-D-глюкопіранозил) рамнопіранозид-7-О-β-D-глюкопіранозид	β-Glc	H	O-α-(2-О-β-Glc-Rha)	H	OH	H
Кемпферол 3-О-β-D-(2-О-β-D глюкопіранозил) глюкопіранозид	H	H	O-β-Glc-(2-О-β-Glc)	H	OH	H
Кемпферол 3-О-β-D-(2-О-β-D-6-О-ацетилглюкозил) глюкопіранозид	H	H	O-β-Glc-(2-О-β-acetyl)	H	OH	H
Кемпферол 3-О-α-L-(2-О-β-D-глюкопіранозил)рамноперанозид-7-О-β-D-(6-О-ацетил) глюкопіранозид	β-(6-О-acetyl-Glc)	H	O-α-(2-О-β-Glu-Rha)	H	OH	H
Кемпферол 3,4'-ди-О-β-D-глюкопіранозид	H	H	O-β-Glc	H	O-β-Glc	H
Кемпферол 3,7-ди-О-β-D-глюкопіранозид	β-Glc	H	O-β-Glc	H	OH	H
Кемпферол 3-О-рутинозид-7-О-β-D-глюкопіранозид	β-Glc	H	O-α-Rut	H	OH	H

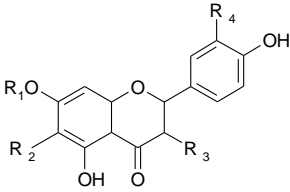
Продовження табл. 1.1

1	2	3	4	5	6	7
Кемпферол 3-О- $\alpha$ -L-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) рамнопіранозиди	H	H	O- $\alpha$ -(2-О- $\beta$ -Glu-Rha)	H	OH	H
Кемпферол 3-О- $\beta$ -D-(2-О- $\alpha$ -L-рамнопіранозил) глюкопіранозид	H	H	O- $\alpha$ -L-Rha-1 $\rightarrow$ 6-О- $\beta$ -Glc	H	OH	H
Кемпферол 3-О- $\alpha$ -L-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил)рамнопіранозиди-7-О- $\beta$ -D-(6'-О-малоніл) глюкопіранозид	$\beta$ -(6-О-malonyl-Glc)	H	O- $\alpha$ -(2-О- $\beta$ -Glc)-Rha	H	OH	H
Кемпферол 3-О- $\alpha$ -(2,3-di-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) рамнопіранозид	H	H	O- $\alpha$ -(2,3-О- $\beta$ -Glc)-Rha	H	OH	H
Кемпферол 3-О- $\beta$ -D-софорозид-7-О- $\alpha$ -L-рамнопіранозид	$\alpha$ -Rha	H	O- $\beta$ -Glc-1 $\rightarrow$ 2- $\beta$ -Glc	H	OH	H
Кверцетин	H	H	OH	OH	OH	H
Геліхризозид (кверцетин 3-О-(6"-О- <i>p</i> -кумароїл) глюкопіранозид)	H	H	O- <i>p</i> -coumaroyl-Glc	OH	OH	H
Тамариксетин 3-О-бігексозид (4'-метоксикверцетин)	H	H	O-hex-hex	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Кверцетин 3,4'-ді-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	H	H	O- $\beta$ -Glc	OH	O- $\beta$ -Glc	H
Кверцетин-3,7-ді-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	$\beta$ -Glc	H	O- $\beta$ -Glc	OH	OH	H
Кверцетин 3-О- $\beta$ -D-софорозид	H	H	O- $\beta$ -Glc-1 $\rightarrow$ 2-О- $\beta$ -Glc	OH	OH	H
Кверцетин 3-О- $\alpha$ -L-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) рамнопіранозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	$\beta$ -Glc	H	O- $\alpha$ -(2-О-Glc-Rha)	OH	OH	H
Кверцетин 3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	H	H	O- $\beta$ -Glc	OH	OH	H
Кверцетин 3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ L-рамнопіранозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	$\beta$ -Glc	H	O- $\beta$ -Glc-1 $\rightarrow$ 2-О- $\alpha$ -Rha	OH	OH	H
Рамнетин	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH	H
Ізорамнетин	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Кросатозид А (ізорамнетин 4'-неогесперидозид; ізорамнетин-4'-О- $\alpha$ -L-рамнопіранозил (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-глюкопіранозид)	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	O- $\alpha$ -Rha-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -Glu	H
Ізорамнетин 3-О- $\beta$ -(2-О- $\alpha$ -L-рамнопіранозил) глюкопіранозид	H	H	O- $\beta$ -(2-О- $\alpha$ -Rha-Glc)	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ізорамнетин 3,4'-ді-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	H	H	O- $\beta$ -Glc	OCH <sub>3</sub>	O- $\beta$ -Glc	H
Ізорамнетин 3,7-ди-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	Glc	H	O- $\beta$ -Glc	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ізорамнетин-3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид	H	H	O- $\beta$ -Glu	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ізорамнетин-3-О-робінобіозид	H	H	O- $\beta$ -Rob	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Мірицетин	H	H	OH	OH	OH	OH
Мірицетин 3-О- $\alpha$ -L-(2-О- $\beta$ -D-глюкопіранозил) рамнопіранозид-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозиди	$\beta$ -Glc	H	O- $\alpha$ -(2-О-Glc-Rha)	OH	OH	OH
Акацетин (4-метиловий ефір апігеніну)	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Лютеолін	H	H	H	OH	OH	H
6-Гідроксилютеолін-7-О- $\beta$ -D- глюкопіранозид	$\beta$ -Glc	OH	H	OH	OH	H

Пізніше було ідентифіковано глікозильованими та метоксильованими похідними кемпферолу, кверцетину, ізорамнетину, тамариксетину та глікозидами у вигляді моно-, ди- або триглікозидів [9]. Глікозиди кемпферолу були основними флавонолами (84,0 % від загального вмісту флавонолів) а кемпферол 3-О-софорозидом – основною сполукою. Крім того, у листі та оцвітини видів крокусів виявлені похідні флавононів, що наведені у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

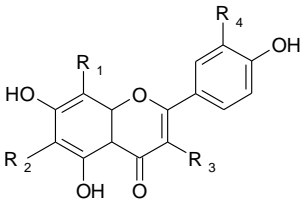
### Структури похідних флавононів, ідентифікованих у видів роду Крокус

	Назва речовини	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
	Дигідрокемпферол 7-О-β-D-глюкопіранозид	β-D-Glc	ОН	ОН	Н
	Дигідрокемпферол 3-О-гексозид	Н	ОН	О-hex	Н
	Таксифолін 7-О-гексозид	Н	ОН	О-hex	ОН
	Нарингенін-7-О-гексозид	hex	ОН	Н	Н
	Нарингенін	Н	ОН	Н	Н

Астрагалін та похідні кемпферолу (кемпферол 3-О-β-D-софорозид-7-О-α-L-рамнопіранозид, дигідрокемпферол 3-О-гексозид та інші), кверцетин 3-О-β-D-софорозид, геліхризозид, міріцетин, та похідні С-флавонів (ізоорієнтин, вітексин, орієнтин) (табл. 1.3) були виявлені в оцвітині різних видах крокусів [97, 99], але переважно у к. посівному.

Таблиця 1.3

### Структури похідних С-флавонів, ідентифікованих у видів роду Крокус

	Назва речовини	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
	Кемпферол-8-С-β-D-глюкопіранозил-6,3-ді-О-β-D-глюкопіранозид	С-β-Glc	О-β-Glc	О-β-Glc	Н
	Кемпферол-8-С-β-D-глюкопіранозил-6-О-β-D-глюкопіранозид	С-β-Glc	О-β-Glc	ОН	Н
	Ізоорієнтин (лютеолін 6-С-β-D-глюкопіранозид)	Н	С-β-Glc	Н	ОН
	Вітексин (апігенін-8-С-β-D-глюкопіранозид)	С-β-Glc	Н	Н	Н
	Орієнтин (лютеолін-8-С-β-D-глюкопіранозид)	С-β-Glc	Н	Н	ОН



*Похідні бензену та гідроксикоричні кислоти.* Серед усіх видів крокусів поглиблено досліджено лише ароматичні сполуки шафрану. Похідні бензену в приймочках к. посівного були представлені сполуками із замісниками -ОН, -СООН, -СООСН<sub>3</sub> та іншими замісниками, у деяких глікозидах гідрокси- та карбоксигрупи були додатково пов'язані з конденсованими фрагментами цукру [17–22]. З гідроксикоричних кислот в шафрані були виявлені лише хлорогенова та кавава кислоти [93]. Іншими ароматичними речовинами шафрану є пірогалол, галова кислота [93, 133] і метилпарабен. У пелюстках к. посівного ідентифіковано: *n*-кумарову кислоту, протокатехову кислоту, метиловий естер протокатехової кислоти, метилпарабен, ванілінову кислоту, *n*-гідроксибензойну кислоту, 3-гідрокси-4-метоксибензойну кислоту, структурні формули яких наведено на рисунку 1.10. Використовуючи методи LC-DAD-MS (ESI<sup>+</sup>) та LC-ESI-IT/MS, у пелюстках к. посівного було ідентифіковано синапову кислоту [62]. Гідрат катехіну, кавава кислота і ферулова кислота були ідентифіковані в приймочках *C. cancellatus subsp. damascenus* [115].

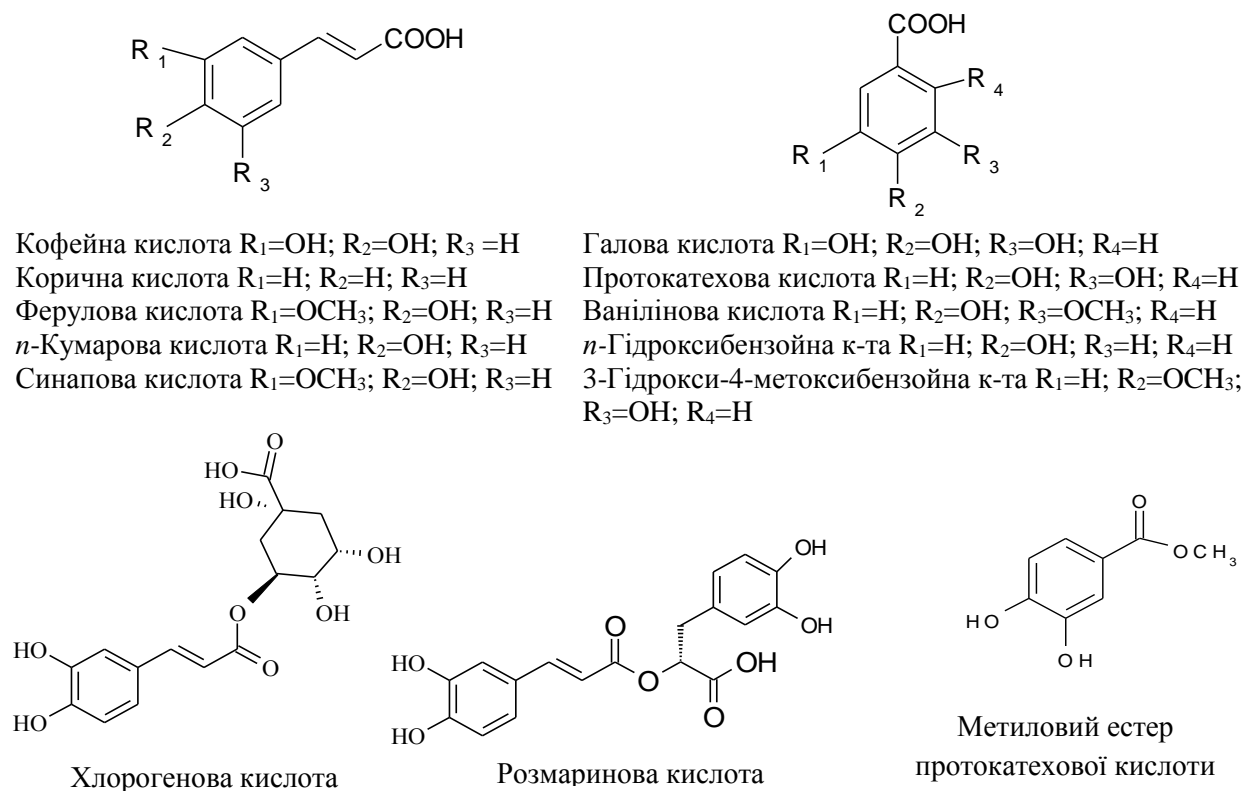


Рис. 1.10 Структурні формули похідних фенолкарбонових кислот, ідентифікованих у видах роду Крокус

Хімічні компоненти видів крокусів представлені як первинними метаболітами (вуглеводи, мінерали, жири та вітаміни), так і сполуками з різних класів вторинних метаболітів, а саме каротиноїдами, монотерпеноїдами, флавоноїдами та антоціанами. Фітохімічний профіль видів крокусів представлено наявністю 1 ксантону, 15 антоціанів, 4 антрахінонів, 2 ацетофенонів, 6 вітамінів, 5 фітостеролів, 2 тритерпенових сапонінів, 10 фуранів, 7 нуклеозидів і алкалоїдів, а також більше 20 каротиноїдів, 61 флавоноїдів та їх глікозидів, 18 похідних одно-, дво-, триатомних фенолів та фенолкарбонових кислот, 24 монотерпеноїди, 30 циклогексанів та їх похідних [9].

Таким чином, приймочки к. посівного багаті кроцинами, серед флавоноїдів головним чином похідними кемпферолу, тоді як у пилку накопичуються похідні ізорамнетину. Тичинки містять переважно кемпферол-3-О-софорозид, а в оцвітині виявлено глікозиди кверцетину і метилкверцетину; в листі видів крокусів ідентифіковано більшість С-глікозилфлавонів апігеніну та лютеоліну. Оцвітина, листя та бульбоцибулини видів крокусів потенційно можуть бути використані як активні компоненти харчових продуктів і дієтичних добавок.

*Визначення якості шафрану.* Вміст основних речовин у шафрані залежить від методів вирощування та географічного розташування. Для аналізу хімічних компонентів шафрану використовуються різні методи: УФ-Вид, ВЕРХ, ВЕТШХ, УЕРХ, NIR-FT-Raman, LC-ESI-MS/MS, HPLC-MS/MS, GC/MS, тощо [79, 94, 95].

На даний момент ISO рекомендує УФ/Вид спектрофотометрію як метод визначення якості шафрану (ISO 3632) [15, 16] за кольором, ароматом і смаком шляхом кількісного визначення основних компонентів – кроцину, пікрокроцину та шафраналю, а також визначають чотири ступені якості шафрану (категорії I або найвища – IV або найнижча). ISO 3632, створений спеціально для харчової промисловості з використанням шафрану, був випущений у 1980 році, регулярно коригується актуальна на сьогодні версія випущена в 2011 році [15, 16]. Максимум поглинання УФ-спектру пікрокроцину припадає на 257 нм [83], шафраналю – 330 нм, а кроцинів – 440 нм (табл. 1.4). Забарвлюючі речовини (назва суми кроцинів) складаються з водорозчинного глікозидного *цис*- і *транс*-

каротиноїдного кроцину, глікозилових естерів кроцетину. Кроцини легко розчиняються у воді з утворенням помаранчево-червоного розчину. Вміст основних компонентів шафрану має бути вищим за певну категорію, щоб бути віднесеними до найнижчої або найвищої категорії. Нижче наведена шкала класифікації абсорбції кроцинів: I ступеня: > 190, клас II: > 150, клас III: > 110 і клас IV: <110. Вимоги якості до цілих та подрібнених приймочок к. посівного відповідно до ISO 3632 наведено у Табл. А.3 (Додатки).

Таблиця 1.4

**Узагальнений вміст основних компонентів шафрану (УФ-метод)  
згідно ISO 3632 [9]**

Країна походження шафрану	Висота н.р.м., м	Пікрокроцин, 257 нм	Шафраналь, 330 нм	Кроцин, 440 нм
Італія (Civitaretenga)	799	75	27	94
Італія (Lombardia)	307	105	21,28	234
Італія (Sardinia)	58	75,96	37,05	192
Італія (Val Trompia)	1100	90	31	231
Марокко (Taliouin)	1630	-	38	276
Греція (Kozan)	710	71,40	39,59	167
Іран (Khorosan)	1096	53,57	29,04	129,07
Іспанія (Albacete)	610	69,89	27,04	165,21
Китай (Zhejiang)	10	85	34	223

Примітка. \* – межі ISO 3632 для I категорії якості шафрану: пікрокроцин >70, шафраналь 20-50, кроцин >200; для II категорії якості: пікрокроцин >55, шафраналь 20-50, кроцин >170; для III категорії якості: пікрокроцин >40, шафраналь 20-50, кроцин >120.

Однак спектрофотометрія не дозволяє точно визначити вміст окремих кроцинів, а дає їх загальний вміст у перерахунку на кроцин-4, що унеможливорює точне визначення категорії якості. Тому використовуються різні хроматографічні методи, частіше віддається перевага методу ВЕРХ як найбільш ефективному аналітичному методу для аналізу чутливих сполук у складних екстрактах природних продуктів [82]. У *H. Caballero-Ortega* [133] наведено порівняльні дані кількісного визначення кроцину, пікрокроцину і шафраналю в одинадцяти зразках шафрану з 11 країн (табл. 1.5), які були зібрані з районів з різним кліматом, складом ґрунту, умовами вирощування тощо і відповідно мають суттєві зміни у складі речовин.

Таблиця 1.5

**Вміст основних компонентів (мг/г) у шафрані (метод ВЕРХ) [301]**

Країна походження шафрану	Висота н.р.м., м	Пікрокроцин	Шафраналь	<i>t</i> -Кроцин 4
Греція (Krokos Kozanis)	710	5,95	1,29	40,77
Індія (Baby Brand)	1585	7,87	1,24	37,54
Нова Зеландія (Rangiora)	30	7,90	0,47	41,21
Іспанія (La Mancha)	610	8,14	0,88	38,41
Франція (Poitou)	144	5,97	0,81	38,43
Азербайджан (Apsheron)	293	3,34	0,98	39,08
Італія (Navelli)	1100	5,80	0,53	38,25
Турція (Kozören)	500	5,67	0,84	36,35
Іран (Abbaszadeh)	1051	3,69	0,65	38,41
Китай (Tibetan saffron)	10	0,53	0,22	6,29

На вміст основних компонентів у шафрані значною мірою впливають фактори навколишнього середовища, а саме середньорічна температура повітря, кількість опадів, зокрема кількість опадів під час посадки та цвітіння, а також умови сушіння та зберігання. Серед Європейських брендів, які відповідають за якість шафрану та мають відзнаку якості PDO, можна назвати лише 7 виробників [20, 83, 96, 97], серед них «Krokos Kozanis», Греція; «Azafrán de la Mancha», Іспанія; «Zafferano dell’Aquila», Італія; «Zafferano de San Gimignano» Італія; «Zafferano di Sardegna», Італія; «Zafferano delle Colline Fiorentine», Італія; «Munder Safran», Швейцарія. За даними FAO, Україна має значні перспективи розвитку лікарського рослинництва, що підтверджується попитом на внутрішніх ринках, позитивними тенденціями обсягів експорту, вдосконаленням технологій вирощування та бізнесу [98].

### 1.3.2 Сучасні аспекти використання крокусу посівного

*Використання шафрану у харчовій галузі.* Використання шафрану бере початок з середземноморських цивілізацій (Греція, Єгипет та Рим), а також багатьох районів Середнього та Далекого Сходу [22, 99]. Основним призначенням

є використання шафрану як харчової добавки для надання кольору, смаку та аромату їжі у багатьох культурах протягом тисяч років. Шафран є характерною спецією європейських, північно-африканських та азіатських страв. Ця спеція також є ключовим компонентом у хлібах і тортах у багатьох країнах. Завдяки своєму аромату (суміш меду і сіна) і його світло-жовто-оранжевому кольору, шафран також використовується в сирах, кондитерських виробках і лікерах.

*Використання к. посівного у традиційній медицині.* Користь шафрану для здоров'я була відома ще єгиптянам, грекам і римлянам. Сьогодні шафран використовується в традиційній медицині через його протиракові властивості [100].

У Аюрведичній практиці шафран використовується як потогінний, відхаркувальний засіб, афродизіак і транквілізатор, а також для лікування метеоризму, спазмів, блювоти, безсоння, депресії, когнітивних розладів, астми, кашлю, бронхіту, грипу, лихоманки, захворювань печінки, розладів серцево-судинної системи, раку. Шафран визнано адаптогеном в індійській аюрведичній медицині [101]. Лікувальна цінність шафрану була записана в традиційній китайській медичній книзі «*І-Лінь-Цзі-Яо*», написаній у 16 столітті [102], і він використовується як стимулятор, що впливає на психіку. Шафран підвищує активність ферментів і виведення білку, він стимулює діяльність матки і може проявляти абортивну дію. Завдяки високому вмісту рибофлавіну шафран використовується як гіполіпідемічний засіб. У китайській медицині шафран входить до складу харчових добавок (*Lifevita, Chyawanprash*). У гомеопатії його застосовують при судомному кашлі і спастичних явищах у дітей [102].

Шафран використовується переважно як спеція у харчуванні та у традиційній медицині ЄС, Аюрведичній медицині та у Традиційній Китайській Медицині як потужний протидіабетичний, протибольовий, протираковий засіб, афродизіак, для лікування меланхолії, депресії, при порушенні менструального циклу, захворювань очей, розладів нервової системи, нормалізації обміну речовин. Як гомеопатичний засіб шафран також представлений у різних фармакопєях світу [103].

*Сучасне фармакологічне застосування сполук к. посівного.* За останні роки було опубліковано кілька оглядів, що узагальнюють дані про хімічний склад і

фармакологічні властивості к. посівного. Усі дослідження в основному стосувалися екстрактів шафрану та його біоактивних сполук, а саме кроцину, кроцетину та шафраналю. Всі компоненти шафрану можуть бути цінними при лікуванні хвороби Альцгеймера легкого та помірного ступеня [104], помірної депресії [105] та пов'язаних з цим розладів пам'яті [106], ішемічної ретинопатія [107] та/або вікової дегенерації жовтої плями, гострих та/або хронічних запальних захворюваннях, депресія, судомах, паркінсонізмі [108]. Розслаблювальні ефекти БАР приймочок на кровеносні судини опосередковуються через активацію  $\beta$ 2-адренорецепторів, інгібування гістамінових  $H_1$  і мускаринових рецепторів кальцієвих каналів і модуляцію оксиду азоту [109]; екстракт приймочок знижує перекисне окислення ліпідів [92]. Крім того, були встановлені антиоксидантні, антимуtagenні та профілактичні властивості шафрану [102].

У міні-огляді *P. Bhandari* [110] були підсумовані протиракові властивості шафрану та його БАР щодо раку шлунку, передміхурової залози, шийки матки, яєчників і молочної залози, раку шкіри, лейкемії, що були продемонстровані на тваринних моделях і культивованих лініях людських злоякісних клітин.

Дослідження *in vitro* виявили антиоксидантну активність і здатність поглинати вільні радикали для шафрану і його основних компонентів. Екстракт шафрану модулював медіатори запалення, гуморальний і клітино-опосередкований імунітет як протизапальний та імуностимулювальний засіб [111]. Шафран розглядається як терапевтичний засіб при метаболічному синдром; він виявляє антидіабетичні, антигіпертензивні, гіполіпідемічні властивості [112].

Лютеолін, кемпферол, кверцетин і апігенін, що є компонентами к. посівного є потужними антипроліферативними та цитотоксичними агентами [113]. Таким чином, присутність цих активних компонентів у БЦ, листках оцвітини к. посівного є підґрунтям використання цих побічних продуктів у розробці продуктів, що зміцнюють здоров'я. Протизапальні, радіопротекторні та протипухлинні властивості, а також вплив на пов'язані з раком біологічні шляхи, такі як біоактивація канцерогену, регуляція клітинного циклу, ангиогенез, окислювальний стрес, були повідомлені для цих класів БАР [114].

Побічні продукти виробництва шафрану, а саме листя та оцвітину, можна розглядати як багаті джерела БАР, а комплексна переробка шафрану підвищить загальну прибутковість врожаю шафрану та може сприяти розробці нових протиракових, протизапальних та антиоксидантних препаратів.

Фенольні сполуки в оцвітині, листі або приймочках к. посівного виявляють активність поглинання радикалів [102, 115]. Висновки R. Sanchez-Vioque [114] узгоджуються з повідомленнями про антипроліферативну та токсичну дію поліфенолів або багатих поліфенолами екстрактів крокусу на ракові клітинні лінії.

У нашій оглядовій статті [9] ми зробили спробу узагальнити найбільш релевантні фармакологічні дослідження приймочок к. посівного та їх БАР, проведені за період (2014–2018 рр.), а також фармакологічні дослідження побічних продуктів виробництва к. посівного та інші види крокусів.

Експериментально встановлено антибактеріальну активність екстрактів листя к. посівного по відношенню до бактерій *Listeria* spp. при концентраціях 9000 мкг та 13500 мкг [116]; екстрактів листя та БЦ *C. alatavicus* до грампозитивних бактерії *S. aureus*, *B. subtilis* і *B. cereus* [117]. Етанольні екстракти листя та БЦ *C. alatavicus* (500 мкг/мл) мали добрий розподіл радикалів за даними DPPH-тесту – 65,5% та 54,08% відповідно з IC<sub>50</sub> 387 та 447 мкг/мл.

Екстракти БЦ [118] та листя к. посівного [116] проявили значну антиоксидантну дію на рівні препарату порівняння  $\alpha$ -токоферолу, дещо нижчі показники мав екстракт пелюсток. Відмічається, що при збільшенні концентрації (12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл) антиоксидантні властивості сировини збільшуються [119]. Для екстрактів з приймочок та БЦ к. посівного встановлено також антидепресантну дію *in vivo* [120]. А водно-спиртові (50%) екстракти з оцвітини та листя (ED<sub>50</sub>, 0,42 мг/мл) проявили значний проліферативний ефект на клітини аденокарциноми людини [116].

Таким чином, ці та багато інших результатів фармакологічного вивчення рослин роду Крокус надають експериментально обґрунтовані дані щодо перспективності подальших фармакологічних досліджень листя, оцвітини, бульбоцибулин к. посівного, як потенційної ЛРС.

*Препарати к. посівного на світовому ринку.* На світовому ринку наявні різні види додаткового харчування на основі шафрану, серед них: «Affron»® Saffron Extract (Pharmactive, Canada) [121]; «Dry saffron extract «Saffron'Extr»® (Eusano, France, Germany) [122]; «Saffr'Activ»® (Green Plants Extracts, Australia) [123] та ін.

*Токсичність.* Навіть високі дози шафрану (більше 1,5 г/добу) вважаються безпечними. Токсична дія проявляється після прийому «шафрану лугового, або шафрану осіннього» (*Colchicum autumnale*, пізньоцвіт осінній), отруйної рослини, дуже схожої на шафран. Жодних побічних ефектів при добовій дозі (у дозі 30 мг/день) шафрану не повідомлялося [124]. Шафран не проявив токсичності у тварин (LD<sub>50</sub> 20,7 г/кг) при введенні у вигляді відвару, а дослідження *in vitro* не показали цитотоксичних властивостей (LD<sub>50</sub> 200 мг/кг). Кроцин і диметилкроцетин також не були мутагенними та нетоксичними [125].

## 1.4 Біологічно активні сполуки та фармакологічні властивості рослин роду Ірис

### 1.4.1 Основні представники БАР рослин роду Ірис

Основними класами сполук рослин роду Ірис є флавоноїди, антоціани, фенолкарбонові кислоти, терпеноїди, а також речовини з класів ізофлавоноїдів та ксантонів, що рідко зустрічаються у природі [8]. Серед однодольних рослин, рослини роду *Iris* займають перше місце по кількості ізофлавоноїдів – більше 50 сполук [52, 126]. З часу дослідження рослин роду Ірис було опубліковано декілька оглядів, які стосуються розповсюдження вторинних метаболітів у рослинах. *Boland G.M.* та *Donnelly D.M.* [127] привели узагальнені відомості щодо ізофлавоноїди (понад 260 нових сполук), в тому числі з видів роду Ірис, виділених у період з 1991 по 1996 рр. [5]. *Iwashina T.* та *Ootani S.* [128] у 1998 р. описали структури, розподіл і функції 46 різних агліконів ізофлавоноїдів з 18 видів роду Ірис, переважно флори Китаю. Флавоноїди були найбільш вивченою групою вторинних метаболітів на 1997 р. було описано 17 глікозилфлавононів з 14 видів



ірисів [129]. У 2005 р. французькі вчені [130] також надрукували огляд по розповсюдженню ізофлавоноїдів у рослинах з небобових родин. Китайські вчені [131] узагальнили дані про флавоноїди і ізофлавоноїди видів рослин роду Ірис, опубліковані в літературі за 1999–2008 рр. У огляді описано 94 флавоноїди та ізофлавоноїди з 15 видів ірисів в тому числі 38 нових сполук. На 2010 р. було описано 56 ізофлавоноїдів, з них 20 нові сполуки (5 ізофлавонів, 15 глікозидів ізофлавонів). Польськими та чеськими вченими [6, 7] у період з 2012 по 2015 рр. проведено збір відомостей про розповсюдження БАР, фармакологічну активність різних видів ірисів. Поряд з флавоноїдами і ізофлавоноїдами [132], в цих рослинах описані С-глікозиди ксантону, хінони і тритерпеноїди типу іридаль. Таким чином, для видів роду Ірис описано 15 ксантонів, 6 антоціанідинів, 13 флавонів, 20 флавонолів, 20 С-глікозилфлавонів, 14 флаванонів, 11 дигідрофлавонолів, 6 флаванів і проантоціанідинів і 85 ізофлавоноїдів, що були зареєстровані як аглікони та глікозиди. Однак халкони, дигідрохалкони, аурони, біфлавоноїди та неофлавоноїди не зустрічаються в рослинах роду Ірис [8].

*Ізофлавоноїди.* Рослини роду Ірис містять значну кількість сполук різного класу та фармакологічної активності. У підземних частинах рослин накопичуються переважно ізофлавонони, ксантони, ефірні олії та тритерпеноїди. Надземні частини містять флавоноїди, поліфенольні кислоти, ксантони. Першими ізофлавоноїдами, виділеними з кореневищ *I. florentina* (Baker, 1928), були аглікон іригенін та його 7-глюкозид іридин (іригенін 7-О-β-D-глюкопіранозид). Іригенін (22 види) та іридин (16 видів) ідентифіковані у більшості видів ірисів (рис. 1.11).

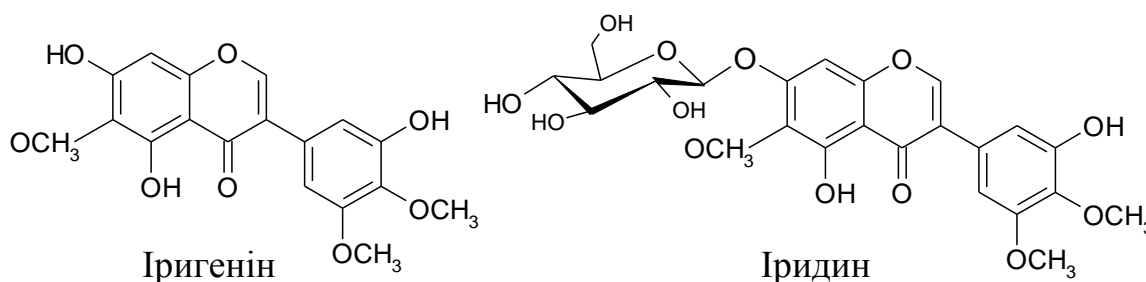


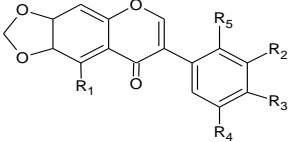
Рис. 1.11 Структурні іригеніну та іридину

Іригенін ідентифіковано у видах ірисів: *I. adriatica*, *I. albicans* (= *I. florentina*), *I. dichotoma*, *I. domestica*, *I. florentina*, *I. × germanica*, *I. hookeriana*, *I. aphylla*, *I. japonica*, *I. kemaonensis*, *I. marsica*, *I. milesii*, *I. nepalensis* (= *I. × germanica*), *I. halophila*, *I. pseudopumila*, *I. sibirica*, *I. sofarana* (= *I. susiana*), *I. tectorum*, *I. tingitana*, *I. variegata*, *I. unguicularis*. Він є найбільш поширеним.

Ізофлавоноїди та їх глікозиди найчастіше містяться в кореневищах ірису, рідше в листі і квітках. Аналіз розподілу фенольних сполук ірису показав, що найбільш вивченим є *I. × germanica*, дещо поступаються йому *I. tectorum*, *I. florentina* та *I. dichotoma*. Найпоширенішими ізофлавоноами для цього роду є текторигенін та його глікозиди (20 видів), з яких 6 видів належать до підроду *Iris*, 4 до підроду *Crossiris*, 6 до підроду *Limniris* 3, до підроду *Xyridion*, 1 до підроду *Parandanthopsis*, ірилон виявлено у 12 видів, нігрицин – у 14 видів ірисів. Текторигенін та іригенін містять гідроксильні групи в положеннях С-5 і С-7, а також метоксильну групу в положенні С-6. Нігрицин та ірилон мають метилендіоксильну групу в 6,7-положенні кільця А.

Ізофлавоноїди, що містять метилендіоксигрупу в кільці А, є досить рідкісними та нерівномірно розподілені в природі. Рослини роду Ірис є найбільшим джерелом ізофлавоноїдів: з них виділено та описано понад 50 різних сполук цієї групи. Найбільш поширені ізофлавоноїди з метилендіоксигрупою представлені у таблиці 1.6. Найбільшу кількість ізофлавоноїдів з 6,7-метилендіоксигрупою (32 сполуки з 94 ізофлавоноїдів) виділено з рослин роду Ірис. Підрід *Iris* містить більшість цих сполук. Ірилон виявлено у восьми видів ірис з підроду *Iris*, три види підроду *Limniris* і один вид з підроду *Parandanthopsis*. Найбільшу кількість ізофлавоноїдів з 6,7-метилендіоксигрупою та їх глікозидів виділено з кореневищ *I. potaninii* (9 сполук) та *I. × germanica* (14 сполук). Найбільш відомі з них ірифлогенін, нігрицин (ірисолон), ірисфлорентин, дихотомітін, нігриканін (ірискашмірианін), ірискумаонін метиловий естер. Розподіл, ідентифікованих фенольних сполук у видах ірисів з флори України наведено у таблиці 1.7.

**Структури похідних метилендиоксиізофлавону, ідентифіковані у видах ірисів**

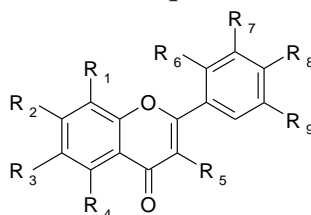
Назва сполуки 	Замісники				
	R1	R2	R3	R4	R5
Ірилон	ОН	Н	ОН	Н	Н
Ірифлогенін	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Н	Н
4'- <i>O</i> -метилірилон	ОН	Н	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
Ірисолон	ОСН <sub>3</sub>	Н	ОН	Н	Н
4'-метилірисолон	ОСН <sub>3</sub>	Н	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
Скварозин	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
Діхотомітин	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Н
Ізоірискашміріанін	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Н	ОСН <sub>3</sub>	Н
Ірискумаонін	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
Нігріканін	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	ОН	Н	Н
Кашмігенін	Н	ОСН <sub>3</sub>	ОН	ОСН <sub>3</sub>	Н
Софоранін А	ОН	ОН	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н
Норірисфлорентин	ОН	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Н
Ірисон А	ОН	Н	Н	Н	ОСН <sub>3</sub>
Ірисон В	ОН	Н	Н	Н	ОН
Ірисфлорентин	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	ОСН <sub>3</sub>	Н
Бетавульгарин	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н	Н	ОН
Тлатанциїн	ОСН <sub>3</sub>	Н	Н	Н	ОСН <sub>3</sub>



*Флавоноїди.* Як раніше описали *T. Iwashina* та *T. Mizuno* [8], основними компонентами ірисів є С-глікозилфлаволи (ізовітексин, вітексин, орієнтин, ізорієнтин, свертизин, свертцияпонін) і О-глікозилфлаволи, виявлені в більшості видів ірисів. Цукровий компонент зазвичай розташований у положеннях С-6 і С-7 аглікону, на відміну від 7-,4'-О-глікозилізофлаволи. На відміну від ізофлаволи, флаволи у видах ірису представлені переважно у формі 6-С-глікозидів. Так, ізоорієнтин та ізовітексин були виявлені в рослинах підроду *Limniris* (*I. rossii*, *I. ensata*) та підроду *Iris* (*I. pseudopumila*, *I. albicans*) [5]. Разом із флавоновими глікозидами ембініном та ембігеніном у листі *I. lactea* (підрид *Limniris*, розділ *Limniris*) виявлено два незвичайних ацетильованих С-глікозилфлавонових похідних ірислактин А та ірислактин В [8]. Вони відрізняються положенням замісників і глікозилюванням положень С-6 і С-7 в кільці А (табл. 1.8).

Таблиця 1.8

### Специфічні флаволи, ідентифіковані в рослинах роду *Iris*



Назва	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
Ірислактин А	H	2,4-diAc-O-β-D-Rha	6-Ac-O-α-L-Glc-1→2-β-D-Glc	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Ірислактин В	H	OCH <sub>3</sub>	2,3-di-Ac-O-α-L-Rha-1→2-β-D-Glc	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Ембінін	H	OCH <sub>3</sub>	O-α-L-Rha-1→2-β-D-Glc	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
Ембігенін	H	OCH <sub>3</sub>	C-β-D-Glc	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H

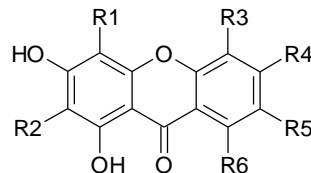
Серед видів ірисів часто зустрічаються моно- та ди-С-глікозиди апігеніну та лутеоліну, кверцетин, мірицетин та ін. Новий флавоновий глікозид, 6,4'-диметокси-5-гідроксифлаволи 7-глікозид, був вперше виділений з етилацетатної

фракції кореневищ *I. carthaliniae* [7].

**Ксантони.** Найпоширенішим і відомим С-глікозилксантоном, що міститься в рослинах роду Ірис, є мангіферин. Вперше мангіферин ідентифіковано в листі *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). Пізніше він був виявлений у видах деяких папоротей і дводольних рослин [8]. Серед однодольних рослин мангіферин був вперше виявлений у квітках *I. × germanica* в 1963 р., а пізніше також в інших видах сировини ірисів [134]. Мангіферин поширений в усьому роду Ірис, а також у підродах, секціях і рядах. До кінця 80х рр. ксантон був ідентифікований у 15 видах ірисів із підроду *Iris* [135]. Виявлено також у *I. humilis* з секції *Psammiris* і в *I. hoogiana* з секції *Regelia*. У підроду *Limniris* секції *Limniris*, мангіферин присутній в серії *Tripetalae*, серії *Laevigata*, серії *Ensatae*, і серії *Unguiculares*. У підрозділі *Hermodactyloides*, мангіферин виявлено в видах *I. histriodes* та *I. reticulata* [8, 128]. Окрім мангіферину у рослинах роду Ірис ідентифіковано додатково 5 ксантонів (табл. 1.9).

Таблиця 1.9

### Хімічні структури деяких ксантонів, що виділені з рослин роду ірис [8]



Назва	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Мангіферин	H	C- $\beta$ -D-Glc	H	OH	OH	H
Ізомангіферин	C- $\beta$ -D-Glc	H	H	OH	OH	H
Неомангіферин	H	C- $\beta$ -D-Glc	H	OH	O- $\beta$ -D-Glc	H
Нігриканзид	H	C- $\beta$ -D-Glc	OH	H	H	OH
Ірисксантон	H	C- $\beta$ -D-Glc	OCH <sub>3</sub>	OH	H	

**Ефірна олія.** Промислове виробництво ефірної олії ірису (близько 0,1 – 2,0%) для парфумерії почалося в 1912 р. на фабриці Санта Марія Новела у Франції. Обсяг виробництва становив 10 кг/рік. Вирощування ірисів для промислових цілей було розпочато в Італії в середині 19 ст. [136]. В даний час деякі види ірисів як ефіроолійну сировину для парфумерної промисловості

вирощують лише в кількох місцях у світі: і. блідий (*I. pallida*), і. німецький (*I. × germanica*) та і. флорентійський (*I. florentina*) вирощують у Лілії Тоскани та у Флоренції (Італія); *I. pallida* в Ландах, Ланди (Франція); *I. × germanica* в Марракеші, у передгір'ях Атлаських гір (Марокко).

З кореневищ ірисів (*I. florentina*, *I. × germanica*, *I. pallida*) отримують ефірну олію ірису із запахом фіалки, яка має вигляд напівтвердої маси жовтого кольору і називається «ірис-конкрет». Ефірну олію також було знайдено в кореневищах і листі *I. persica* [137], *I. variegata* [138], *I. bulleyana* [139], *I. haussknechtii*, *I. susiana* [140], *I. nigricans* [141], *I. taochia* [142], *I. planifolia* [143], тощо. Різні класи летючих органічних сполук із класів монотерпенів, сесквітерпенів, дитерпенів, тритерпенів, жирних кислот, аліфатичних вуглеводнів та альдегідів були знайдені в ефірних оліях ірисів. У всіх пробах виявлено монотерпенкетон  $\alpha$ -ірон та тритерпеноїд сквален. Ці речовини (рис. 1.12) можуть бути використані як маркери в хемотаксономії та хемосистематиці рослин роду Ірис для подальших досліджень. Монотерпен-кетон ірон (10–20% ЕО), який надає олії фіолетовий запах, представлений у вигляді трьох структурно-просторових ізомерів ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ірон).

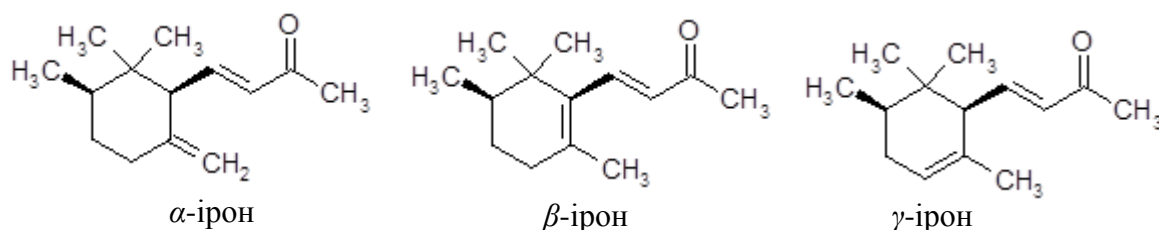


Рис. 1.12 Основні компоненти ефірної олії видів ірисів

Серед інших компонентів ефірної олії ірисів різні нортерпеноїди, такі як  $\beta$ -іонон-5,6-епоксид,  $\beta$ -іонон, транс-2,6- $\gamma$ -ірон,  $\beta$ -ізометиліонон,  $\beta$ -дамасценон були визначені практично у всіх видах ірисів. Серед інших речовин в олії ірисів присутні неофітадієн, евгенол,  $\alpha$ -терпінеол, гермакрен D, терпінен-4-ол, гексагідрофарнезилацетон, фарнезилацетон, фенілацетальдегід, геранілацетон, 2-метокси-4-вінілфенол. Також в олії ірисів міститься велика частка міристинової кислоти (близько 50–85%), інших жирних кислот (каприлової, капринової, лауринової, пальмітинової та ін.) та їх естерів.

Істотний вплив на склад БАР рослин мають фактори зовнішнього середовища. Різні види ірисів також були проаналізовані залежно від середовища зростання, кліматичних даних, інтенсивності освітлення, кількості опадів, складу ґрунту [144]. Для ірисів найбільші зміни відбуваються у складі ізофлавонів, гідроксикоричних кислот і ксантонів, як домінуючих класів БАР.

#### 1.4.2 Узагальнення даних щодо використання рослин роду Ірис

*Використання рослин роду Ірис у традиційній медицині.* Приблизно в 4 ст. до н.е. наукову назву роду Ірис дав грецький лікар Гіппократ. Про лікувальні властивості кореневищ ірису згадують Діоскорид, Теофраст, Аристотель та інші лікарі. Відвар кореневищ ірисів застосовували при лікуванні пневмонії, асцити, захворювань матки, стенокардії, головного і зубного болю, при лікуванні виразок, свищів, при розсмоктуванні пухлин, невралгії сідничного нерву, при плевриті, як жовчогінний засіб при захворюваннях печінки [5].

Відвар і настій кореневищ *I. sibirica* застосовують при асциті, сифілісі, цинзі, абсцесах горла; як ранозагоювальний, кровоспинний, пом'якшувальний, глистогінний засіб. У китайській медицині кореневища, квіти та насіння *I. ensata* використовують як жарознижуючий, в'язучий засіб, в індійській – тонізуючий, сечогінний, жовчогінний, гепатопротекторний [101]; Тибетська медицина рекомендувала застосування ірисів при лікуванні пневмонії, бронхіту, гепатиту, хронічного гастриту, жіночих захворювань [145].

В індійській медицині *I. kumaonensis* використовується як протиотрута при отруєнні опіумом [101]. Кореневища *I. japonica* прискорюють загоєння ран, при бронхітах, внутрішніх виразках, пухлинах. Листя *I. lactea* використовуються в монгольській медицині як глистогінний засіб, при інфекційних і вірусних захворюваннях, в тибетській медицині при захворюваннях нирок, квіти при захворюваннях шлунково-кишкового тракту [145].

Кореневища *I. florentina*, *I. halophila*, *I. × germanica* використовують як відхаркувальний, обволікаючий, болезаспокійливий і протизапальний засіб [101]



при катарах верхніх дихальних шляхів, запаленні легень, захворювання печінки, жовчного міхура, запаленні підшлункової і слинних залоз, а також вегетоневрозах і при шлунково-кишкових колітах; плоди використовують як антибіотики, а ефірну олію – в ароматерапії при запаленнях бронхів, кашлі.

Доктор Кітчен (Kitchen, 1851) вперше застосував *I. versicolor* як гомеопатичний засіб при лікуванні стоматиту, маститу, геморою, невралгії, мігрені, шлунково-кишкових захворювань (гастрит, гепатит), дисменореї, шкірних захворювань (екзема, псоріаз), панкреатиту.

Сучасне фармакологічне дослідження рослин роду *Iris*. Визначена *in vitro* антиоксидантна активність різних видів ірисів значною мірою корелює зі значною присутністю фенольних сполук, зокрема флавоноїдів та їх похідних [52]. Екстракти кореневищ, листя і квітів *I. pumila*, *I. variegata*, *I. humilis* [146], кореневищ *I. suaveolens* [147], кореня та листя *I. orientalis* [148], екстракти *I. × germanica*, отримані з кореневища, листя та квіток [149], листя *I. stenophylla* [150] та інших видів продемонстрували значну антиоксидантну активність.

Екстракти з ірисів (*I. × germanica*, *I. pseudacorus*, *I. orientalis*) також проявили протимікробну активність до штамів *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Serratia marcescens*. Хлороформний екстракт *I. × germanica* пригнічував ріст *S. aureus* і *P. aeruginosa*, а етілацетатний – *Streptococcus pyogenes* [151]. Ефірна олія з кореневищ *I. pseudacorus*, має великий потенціал для інгібування зростання *Candida albicans* [152].

Дослідження виявили значний вплив ізофлавоноїдів на зниження розвитку онкологічних захворювань [153, 154]. Екстракт квіток *I. pseudopumila* (100 мкг/мл) на 50,9% пригнічував проліферацію клітин амеланотиченої меланоми [155]. Антипроліферативна активність 3-О-β-D-глюкопіранозид кемпферолу і ірисолідону склала 100 і 96,6% по відношенню до клітин меланоми і 82,1 і 84,6% по відношенню до клітин карциноми легень CORL-23 відповідно.

Ізофлавоноїди з кореневищ *I. × germanica* [156] проявили значну протипухлинну активність, поряд з цим виявлена протигрибкова та протизапальна дія. При окисленні ксенобіотиків цитохром Р450-залежними

монооксигеназами можуть утворюватися канцерогенні сполуки. Ізофлавоноїди з *I. × germanica* здатні пригнічувати цитохром P450-залежну монооксигеназу 1A (Cyp1A) (IC<sub>50</sub> 0,25-4.90 мкМ) і запобігати розвитку онкологічних захворювань. Ці приклади засвідчують протираковий потенціал ізофлавононів із сировини ірисів.

Протизапальну активність екстракту з *I. × germanica* і виділених з нього індивідуальних ізофлавононів і їх глікозидів, вивчали на формаліновій моделі набряку лапи щура [157]. Найбільшу активність, співставну з такою для дексаметазону, проявив іригенін S. Кореневища *I. × germanica* пригнічують прогресування гіперглікемії та гіпертригліцеридемії та мають захисну дію проти спричиненого діабетом ураження печінки та підшлункової залози.

Експериментально підтверджена здатність іригеніну з *I. confusa* пригнічувати біосинтез простагландину E2 (ПГЕ2) на перитонеальних макрофагах щурів, а іригеніну – на мишачих макрофагах RAW 264.7 [158]. Крім того, іригенін ефективно інгібував ЛПС-індукований біосинтез NO і ПГЕ2. Це може бути пов'язано з його впливом на зниження експресії генів NO-синтази і циклооксигенази 2. Ці та інші активності рослин роду Ірис підтверджують перспективність дослідження цього роду, зважаючи на широку сировинну базу рослин в Україні.

*Препарати з видів ірисів на світовому ринку.* Численні дані щодо фармакологічного використання рослин роду Ірис у традиційній медицині свідчать про їх ще невикористаний потенціал і нові можливості застосування в доказовій медицині, оскільки на світовому ринку створено лише декілька препаратів та біологічно активних добавок на їх основі.

У Європі в XVII-XIX століттях *G. De Laire* і *F. Tiemann* [159] із кореня *I. versicolor* виділили глюкозид іридин (Merck, Німеччина), його давали в таблетках по 0,05–0,02 г (Hager) як стимулюючий і жовчогінний засіб (Duke, 2002). Кореневища *I. × germanica* та 26 інших компонентів входять до складу комплексного фітопрепарату – Оригінальний великий бальзам Біттнера (Richard Bittner AG, Австрія) для внутрішнього застосування, який має загальнозміцнювальну, імуностимулювальну дію та застосовується при захворюваннях шлунково-кишкового тракту та розладах обміну речовин.

Кореневища *I. florentina*, *I. pallida*, *I. × germanica* вирощують як ефіроолійну сировину для парфумерної промисловості, а кореневища *I. versicolor* включено до складу комплексного гомеопатичного препарату Мастодинон® (Біонорика, Німеччина) у гомеопатичному розведенні D2 для корекції передменструального синдрому (мастодинія, психічна лабільність); порушення менструального циклу, лікування фіброзно-кістозної мастопатія; безпліддя (G03X A10). Мастодинон зареєстрований на фармацевтичному ринку України.

До складу трав'яного збору М. М. Здренка (Україна) [160] для лікування папіломатозу сечового міхура, антацидних гастритів, виразкової хвороби шлунку входять кореневища *I. pseudacorus*. НВО «Міжнародний медичний центр» розроблено комплексну харчову добавку «Панкріофіл» («Фітолінія СмартМед», Україна), до складу якої входять кореневища *I. pseudacorus* (краплі, 30 мл), який застосовують при захворюваннях підшлункової залози, кишечника, ферментативної недостатності. На основі листя *I. lactea* створені лікувально-профілактичні препарати для онкологічних хворих: «Вітонк»© (полівітаміни) і «Лактир»© (засіб для зменшення побічних ефектів променевої та хіміотерапії).

**Токсичність.** Дослідження токсичної дії проводилось для кореневищ *I. versicolor*, що не входить до флори України. Встановлено, що він подразнює слизові оболонки, викликає рясну сльозо- та слинотечу, печію у роті, блювання, болі у шлунку. Під час розтину лабораторних тварин, отруєних порошком ірису, встановлено сильний притік крові до підшлункової залози [52].

Китайські вчені займались дослідженням токсичності кореневищ *I. pseudacorus* та вмістом у ньому свинцю. Було встановлено, що стінки кліток, що розташовані у верхній частині кореня містять 10 мкл свинцю, але його вміст є гранично допустимим. Крім того, відомо, що кореневища *I. pseudacorus* можуть викликати у дітей діатез, нудоту, блювання [161].

Проведено клінічні випробування ефірної олії з *I. florentina*, *I. × germanica*, *I. pallida*. По даним RIFM (1975), летальна доза олії-абсолют для щурів LD<sub>50</sub> 9,4 г/кг. У вигляді 3% розчину ефірна олія у петролятумі за 48 год не подразнює шкіру людини і не викликає реакції сенсibiliзації [162].

## 1.5 Закономірності біосинтезу вторинних метаболітів у рослин роду Крокус та Ірис

### 1.5.1 Рослини роду Крокус

Існують різні гіпотези щодо біогенезу кольорів, гіркомого смаку та аромату к. посівного. Перші дослідження біосинтезу шафрану були проведені *H. Pfander* та *H. Schurterbeger* (1982). Вони досліджували біоокислювальне розщеплення каротиноїду зеаксантину  $C_{40}$ , що приводить до виробництва апокаротиноїдних пігментів  $C_{20}$ , пікрокроцину та шафраналю. Під час сушіння сировини аглікон 4-гідрокси-2,6,6-триметил-1-циклогексен-1-карбоксальдегід (НТСС, продукт  $\beta$ -глюкозидазного гідролізу пікрокроцину) перетворюється на шафраналь [9].

Кроцетин та його похідні мають обмежене поширення в природі, повідомлялося лише про їх присутність в приймочках к. посівного та плодах *Gardenia jasminoides* [69]. У результаті була висунута гіпотеза, згідно з якою біосинтез цих апокаротиноїдів бере участь у механізмі специфічного ферментативного окислення, але не залучає ліпоксигенази [163] або ксантиноксидази [164]. Фермент CsZCD каталізує синтез діальдегіду кроцетину та гідрокси- $\beta$ -циклоцитралю (останній перетворюється на шафраналь) із зеаксантину (рис. 1.13), і на відміну від інших діоксигеназ цей діоксигеназ фермент був виявлений лише у хромопластах видів крокусів [22].

Однак пізніше виникли суперечки щодо можливих шляхів утворення кроцетинового діальдегіду. Італійські вчені *M. Carmona* та *L. Alonso* [69] провели дослідження щодо визначення кількісних співвідношень між пікрокроцином і шафраналем і запропонували альтернативний шлях біосинтезу летких сполук у шафрані. Встановлено, що шафраналь може утворюватися не тільки з пікрокроцину, але й з ланцюга кроцетину шляхом термічної деградації [22]. *Mir J.I.* та співавтори [165] продовжили дослідження щодо визначення шляхів біосинтезу апокаротиноїдів з урахуванням експресії гену діоксигенази. Максимальне накопичення апокаротиноїдів шафрану спостерігалось на стадії повністю

розвиненої приймочки перед збиранням. Ген діоксигенази розщеплення зеаксантину крокусу 7,8(7',8') розташований у хромопластах і ініціює біогенез кроцетинів шляхом розщеплення зеаксантину.

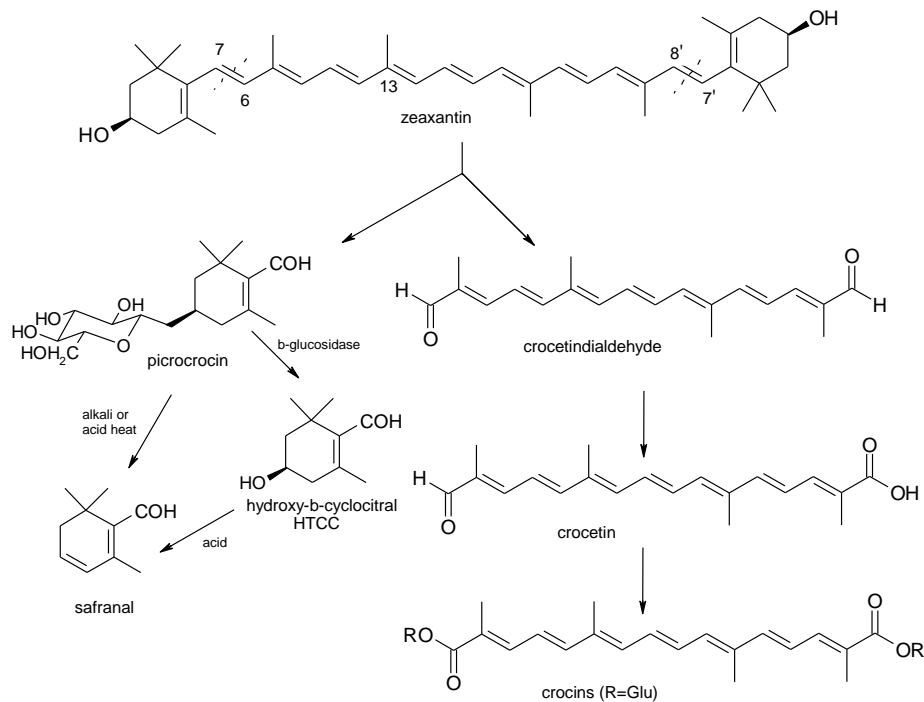


Рис. 1.13 Загальноприйнята гіпотеза хімічного та ферментативного перетворення пікрокроцину в шафраналь і НТСС із звичайного попередника зеаксантину в шафрані (Адаптовано до [28, 69, 92])

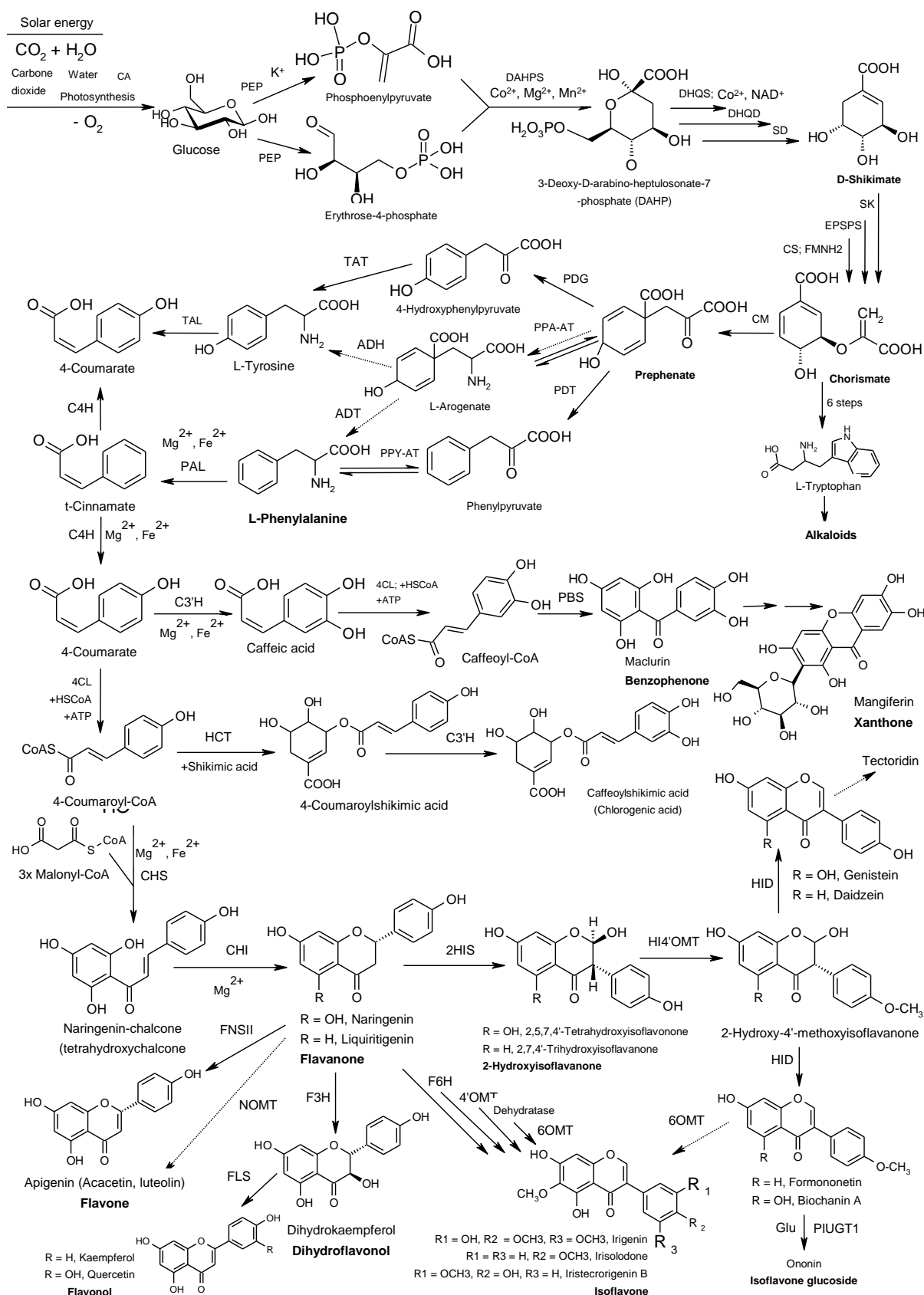
Зеаксантин є попередником у біосинтезі кроцинів та інших важливих сполук у приймочках к. посівного [166]. Було встановлено, що зеаксантин присутній лише в слідових кількостях в органах рослин у фізіологічних умовах *in vivo* або без стресу [167]. Однак зеаксантин утворюється шляхом деепоксидації через оборотну реакцію ксантофілового циклу через вплив радіації або в умовах високої освітленості. Рівень зеаксантину знижується зі зменшенням освітленості [168]. Це свідчить про те, що в країнах із більшим періодом та інтенсивністю сонячного випромінювання вміст апокаротиноїдів є вищим. Накопичення каротиноїдів визначається фізіологічними, генетичними та біохімічними характеристиками видів рослин, а також факторами навколишнього середовища – температура повітря, інтенсивність світла.

### 1.5.2 Рослини роду Ірис

Як основне джерело фенольних сполук, рослини роду Ірис мають шлях біосинтезу шикімату або хоризмату фенілпропаноїдів (рис. 1.14) для синтезу цих сполук. Біосинтез перебігає в основному шляхом синтезу хоризмату. Це важливий попередник префенату, з якого утворюються три основні ароматичні амінокислоти, такі як фенілаланін, тирозин і триптофан. Ці амінокислоти ініціюють біосинтез фенілпропаноїдів, катехоламінів, алкалоїдів (ізохінолінових, тропанових, протоалкалоїдів), лігнінів, меланінів тощо [169, 170].

Основний шлях утворення фенольних сполук починається з ароматичних амінокислот L-фенілаланіну та у меншій мірі – з L-тирозину. У загальному фенілпропаноїдному шляху вони трансформуються у 4-кумарову кислоту, що активується коензим А за допомогою P<sub>4</sub>L, 4-гідроксилази коричної кислоти та 4-кумарат-КоА-лігази. 4-Кумароїл-КоА є попередником у біосинтезі всіх фенольних сполук, в тому числі флавоноїдів, лігнанів, кумаринів, дубильних речовин, естерів та амідів, а також мономерів лігніну [171].

Однак, існує шлях до фенілаланіну та тирозину через L-арогенову кислоту [170, 308], яка утворюється в результаті амінування префенової кислоти з використанням L-глутамінової кислоти як донора аміногрупи. Далі L-арогенова кислота піддається або окислювальному декарбоксілюванню під дією арогенатдегідрогенази, або супроводжується декарбоксілюванням дегідратації за участю арогенатдегідратази. Дегідратація та декарбоксілювання арогенату призводять до утворення фенілаланіну, а окислення та декарбоксілювання – тирозину. Фенілаланін, тирозин та продукти їх обміну дають початок безлічі різних сполук, таких як: фенілпропаноїди, катехоламіни, алкалоїди (ізохінолінові, тропанові, протоалкалоїди), лігніни, меланіни.



\*для текторидину, иригеніну, ірисолідону, іристоригеніну В наведено гіпотетичні шляхи біосинтезу (підрозділ 6.2.2)

Рис. 1.14 Біосинтез вторинних метаболітів, отриманих з шикімату та фенілаланіну в рослинах роду Ірис

Утворення фенольних сполук через арогенан (рис. 1.15) характерно для шафрану.

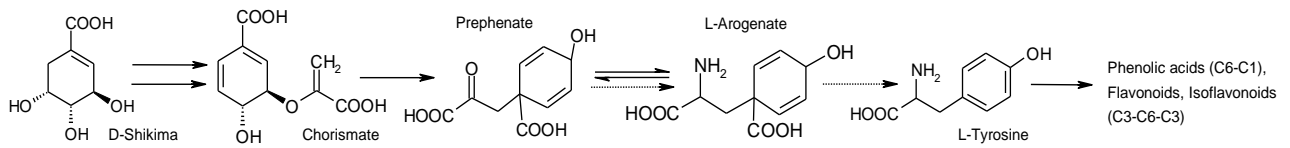


Рис. 1.15 Можливий арогенатний шлях у біосинтезі фенольних сполук через L-тирозин у приймочках крокусу [170]

Ферменти, що каталізують перші реакції біосинтезу фенілпропаноїдів, використовують іон двовалентного металу (наприклад,  $Mg^{2+}$  або  $Fe^{2+}$ ) як кофактор [172]. Відповідно до Seigler [173] та Marchiosi [174] фотосинтез має великий вплив на продукування фенольних сполук, оскільки поліфеноли біосинтезуються шляхом шикімової кислоти, що вимагає еритрози 4-фосфату та фосфоенол пірувату, що утворюються саме під час фотосинтезу. Активність ферментів у біосинтезі може бути відновлена або активована додаванням  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  або  $Ni^{2+}$  [175]. Рослини отримують названі іони переважно з ґрунту у процесі всмоктування з водою чи через надземні органи у процесі обприскування. Саме в умовах абіотичного стресу (збільшений вміст добрив, посуха, важкі метали, солоність, висока/низька температура, ультрафіолетове випромінювання), у рослин відбувається підвищений синтез поліфенолів, таких як фенольні кислоти та флавоноїди, які допомагають рослині справлятися з екологічними обмеженнями [176]. Таким чином, створення стресових умов шляхом внесення окремих елементів у ґрунт, стимулюватиме утворення фенольних сполук.

## 1.6 Сучасне забезпечення якості рослинних препаратів. Належне вирощування

Одним з критеріїв отримання якісної ЛРС є підбір належних умов вирощування рослин, які базуються на дослідження впливу екологічних факторів



навколишнього середовища на накопичення БАР [177]. Вміст речовин в рослинах схильний до змін в залежності від: виду, сорту і стадії вегетації рослин; фізичних властивостей і хімічного стану ґрунту; географічного розташування; кліматичних умов; технології обробки сировини; екологічних факторів антропогенної дії [178, 179] (рис. 1.16). Порівняння хімічного складу сировини, вирощеної у різних кліматичних умовах, сприяє коректній розробці етапів культивування ЛР. Керівні принципи ГАСР [180, 181] гарантують можливість одержання якісних ЛРС з однорідним та стабільним складом, забезпечують можливість простежуваності ЛРС у виробничому процесі [182, 183].



Рис. 1.16 Фактори впливу на якість ЛРС

### 1.6.1 Вплив факторів навколишнього середовища на хімічний склад рослин

Абіотичні стреси навколишнього середовища можуть змінити метаболізм рослин, що призводить до інгібування або стимулювання утворення вторинних метаболітів (рис. 1.17). Незважаючи на те, що вирішальна роль цих сполук у акліматизації та захисті рослин добре відома [185, 186], їх реакція на зміну клімату недостатньо вивчена. В останні десятиріччя спостерігається підвищення температури в середньому на 2–5°C, і ці коливання можуть впливати на різні види рослин та їхню врожайність [187]. На БАР і ріст рослин впливають стрибки температури через зміни в метаболічних шляхах, які регулюють передачу сигналів, фізіологію та захисні механізми. Зміна клімату також впливає на

первинні метаболіти, тобто амінокислоти, цукри та проміжні продукти циклу Кребса. Загалом встановлено, що збільшення утворення вторинних метаболітів забезпечує захист рослин від біотичного стресу, це можна описати як сполучну ланку між біотичним та абіотичним стресом [178]. В умовах змін навколишнього середовища, саме рослини можуть адаптуватися до мінливих умов середовища [188], змінювати свою морфологію та фізіологію, що сприятиме пристосуванню до нових умов [189].



Рис. 1.17 Фактори навколишнього середовища, що чинять вплив на склад БАР рослин

Флавоноїдний склад рослини – одна зі сторін метаболізму, особливості якого формуються в процесі онто- і філогенезу, різноманітність яких супроводжується різноманітністю їх функцій [190]. Встановлено, що зі збільшенням висоти над рівнем моря кількість флавоноїдів зростає [177], в той час як якісний склад в рослинах, які ростуть в різних екологічних умовах, як правило, не змінюється як у межах одного природно-кліматичних району.

Відомо, що на вміст флавоноїдів має вплив світло. Було визначено, що швидкість біосинтезу флавоноїдів збільшується при оптимальній освітленості, в темряві утворення флавоноїдів значно сповільнюється або припиняється. Вплив світла на біосинтез флавоноїдів відбувається через забезпечення прекурсорами ко-

факторів, енергією, а також завдяки світлозалежності деяких ферментів, причетних до біосинтезу флавоноїдів [191]. Іншим фактором впливу на синтез флавоноїдів є температура. За результатами різних досліджень для одних рослин підвищенням температури збільшує накопичення флавоноїдів [192, 193, 194], для деяких позитивний вплив на вміст флавоноїдів надає зниження температури [195]. Є відомості про різний характер температурної залежності біосинтезу флавоноїдів на різних етапах розвитку рослин [196]. Різним є вплив температурного фактору для різних класів флавоноїдів: накопичення антоціанів і флавонолів більш схильне до впливу температурних умов, ніж лейкоантоціанів [197].

Ґрунт як джерело поживних речовин і середовище з певним хімічним складом, вмістом води і мікрофлори, механічної структурою також певним чином впливає на метаболізм рослин. Найбільший вплив з складових едафічного фактору на накопичення флавоноїдів має забезпеченість рослин елементами мінерального живлення. Було відмічене несприятливий вплив надлишку азоту на накопичення катехінів, флоридзину, антоціанів, рутину. Фосфор та калій позитивно впливають на вміст флавоноїдів [198, 199]. Дефіцит фосфору, калію і азоту призводять до більш високого накопичення фенольних сполук [200]. Додаткове введення цих компонентів стимулює ріст рослин і пригнічує процеси утворення фенольних сполук. При нестачі бору спостерігається підвищення вмісту флавоноїдів, позитивний вплив завдають молібден, марганець, мідь, цинк.

Мінеральні мікроелементи, такі як цинк, мідь, селен, мають важливі метаболічні функції, діючи як кофактори для ряду антиоксидантних ферментів [172–175], Cu відомий як важливий мікроелемент для функції мідь-цинкових супероксиддисмутаза (SOD) та каталази (CAT), які є найбільш важливими ферментами, що поглинають кисневі види активних речовин. Характерною особливістю багатьох мікроелементів є їх необхідність для росту рослин в малих дозах і токсична дія на клітини при високих концентраціях. Деякі мікроелементи (Cu, Mn, Zn) виконують специфічні функції у захисних механізмах у морозостійких і посухостійких рослин [201]. При нестачі деяких мікроелементів ріст рослини відхиляється від норми або припиняється [202].

Хімічний склад рослин, а також кругообіг елементів в біогеоценозах залежать вмісту кожного елементу в ґрунтах. Важливе значення має надходження мікроелементів в рослини через листову пластинку [203, 204]. Мікроелементи, які були поглинуті листям, переносяться в інші тканини рослинного організму, включаючи тканини кореня, де надмірний вміст цих елементів накопичується. Швидкість руху мікроелементів в тканинах рослин залежить від органу рослини та його природи [205, 206]. Таким чином, поглинання і накопичення мікроелементів рослинами залежить від умов існування, видової специфічності рослини, фази розвитку і природи елемента. Надлишок елементів зазвичай накопичується в фізіологічно пасивних органах: плодах, бульбах, кореневищах.

Таким чином, якісний склад флавоноїдів є видовою ознакою і формується в процесі онтогенезу рослин під впливом кліматичних та едафічних факторів середовища і залежить від фази розвитку рослини. Подальші дослідження мають дати більше розуміння впливу багатьох факторів навколишнього середовища на вторинні метаболіти к. посівного та видів ірисів українського походження.

#### 1.6.2 Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження як частина родини стандартів

Безпека та якість ЛРЗ є першочерговим питанням як для органів охорони здоров'я, так і суспільства в цілому. Препарати, що постачаються на європейський ринок ЛРЗ (діюча речовина, проміжна або готова продукція), повинні вироблятися в умовах GMP [207]. Фармацевтична промисловість є однією з найвибагливіших з точки зору дотримання вимог, і виробництво ЛРЗ [180] є одним із специфічних напрямків, що пов'язане з такими стандартами. Для забезпечення безпеки пацієнтів на всіх етапах розробки ЛЗ є необхідним дотримання належних практик GxP, що включають у себе дотримання операційних процедур та критичних точок впродовж всього технологічного процесу, що гарантує одержання високоякісного, надійного, ефективного продукту. Якщо дотримання Належних практик (Належна виробнича практика, Належна лабораторна практика, Належна клінічна практика,

Належна практику дистрибуції) є загальнообов'язковими та контрольованим, то дотримання принципів GACP до якості ЛРС носить рекомендаційний характер [208]. Основною метою GACP в умовах забезпечення якості сировини є створення належних умов вирощування та первинної обробки ЛРС, які забезпечують послідовні та відтворювані «рослинні вихідні матеріали» відповідного стандарту. Рекомендації ВООЗ GACP у процесі виробництва ЛРС розроблені та впроваджені в країнах ЄС, Японії, Індії, Малайзії та Україні. В Україні Настанова «СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012 Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження» впроваджена тільки у 2013 році [184] (Наказ МОЗ України № 118 від 14.02.2013) (табл.1.10). Ці принципи є гарантією якості, яка виділяє вимоги стандартизації та показників якості ЛРС.

Комітет ЕМЕА [209, 210] розширив вимоги спеціально для вирощування та обробки культивованих та дикорослих лікарських і ароматичних рослин в ЄС [181, 182] для досягнення вищої якості ЛРС. Було розроблено «Посібник із практичного впровадження» у формі основних СОП щодо важливих етапів GACP. EUROPAH пропонує рекомендації щодо вибору умов вирощування, враховуючи контроль якості сировини. Однак умови вирощування слід коригувати залежно виду рослин та місцевості. Ці рекомендації поширюються на виробництво всіх рослинних матеріалів, які використовуються безпосередньо для людей та відповідають європейськими стандартам якості.

Національні вимоги та підходи до встановлення якості ЛРС визначені в ДФУ [211], нормативно-технічній документації та міжнародних стандартах якості для кожного виду сировини. Раніше дикорослу рослинну сировину збирали згідно з інструкціями «Правила збору і сушіння лікарських рослин: Збірник інструкцій» (рос. мовою) [212] та «Довідник із препаратів лікарських рослин» (рос. мовою) [213]. Принципи GACP рекомендовані як для вирощування ЛР та їх збору в природі. Вони складаються з п'яти розділів: загальний вступ, належна практика культивування лікарських рослин, належна практика організації збору лікарських рослин, етичні та правові аспекти.

Таблиця 1.10

## Становлення GACP у світі та в Україні

Рік	Настанови, рекомендації та стандарти
1998	Асоціація EUROПAM випустила перший проект «Належної сільськогосподарської практики» (GAP)
1999	Агенція EMEA опублікувала коментарі до EUROПAM (EMEA/HMPWG/17/99 і 18/99)
2000	EUROПAM випустила перший проект «Належна практика дикорослого виробництва» (GWP)
2002	GAP і GWC були інтегровані в GACP
2002	EMEA опублікував «Точки, які слід розглянути щодо GACP для вихідних матеріалів рослинного походження» ( <i>“Points to consider on GACP for Starting Materials of Herbal Origin”</i> )
2003	ВООЗ випустила «GACP-МАР»
2006	EMEA та Комітет HMPС випустили «Керівництво з належної сільськогосподарської практики та практики збирання (GACP) щодо вихідних матеріалів рослинного походження» (2005)
2009	МОЗ України видано настанови СТ-Н МОЗ 42-4,0; 2011 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика»
2010	EUROПAM оновило та опублікувало «GACP-МАР»
2013	МОЗ України видано настанову СТ-Н МОЗ 42-4,3; 2012 «Ліки. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження»
2016	EUROПAM опублікувала рекомендації «Практичний посібник із впровадження належної практики збирання сільськогосподарських культур та у дикій природі (GACP)»
2020	МОЗ України видало оновлені настанови СТ-Н МОЗ 42-4.0; 2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика»

Особливістю ЛРЗ є складність стандартизації вихідної ЛРС. У основу GMP покладено наявність критерію «відтворюваність (ідентичність)» складу препарату від серії до серії. Аналогічно для ЛРС слід забезпечити ідентичність від врожаю до врожаю. При розробці норм GACP для лікарських рослин в основу було покладено принципи, подібні GMP для синтетичних АФІ: обов'язковим є стандартизація насіння або посадкового матеріалу, умови вирощування з їх документуванням (із зазначенням даних про конкретне місце вирощування, кліматичних особливостей за період вирощування, склад ґрунту, зрошування, наявність добрив, тощо). Кожна плантація повинна мати свій паспорт, де фіксуються всі обставини та чинники в період вирощування; дата збору врожаю, метод висушування рослинного матеріалу та його упаковка. Це дає можливість простежити сировину «від поля до виробника фітопрепарату», що гарантує якість ЛРС. Рекомендації GACP слід розглядати в поєднанні з існуючими документами та публікаціями [214–219], щодо забезпечення якості ЛРЗ та збереження (захисту) рослин. Принципи GACP призначені для застосування в практиці вирощування та первинної переробки всіх рослин та їх частин, які продаються та використовуються в ЄС (рис. 1.18).

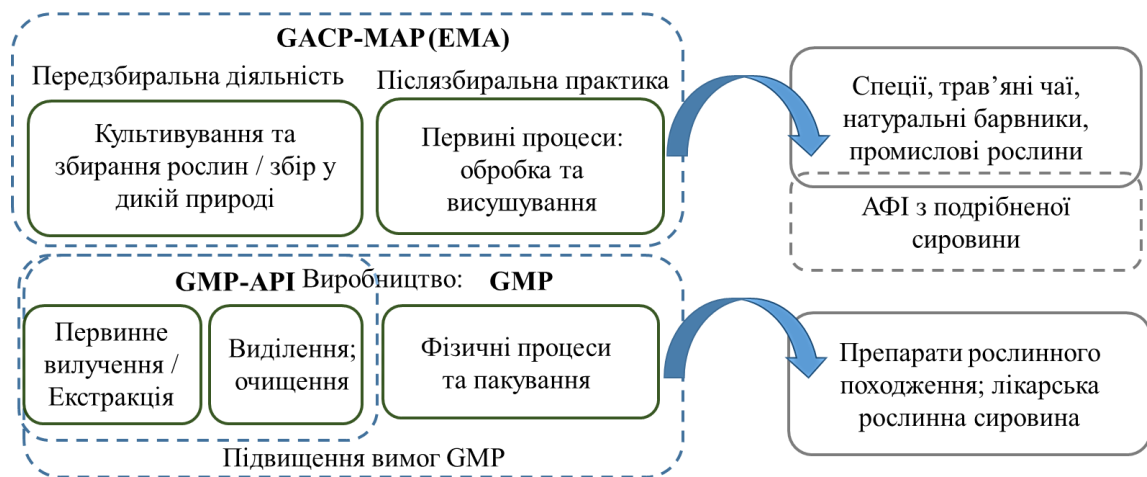


Рис. 1.18 Загальна презентація взаємозв'язку між принципами GACP (EMA), API-GMP та GMP при виробництві ЛРЗ для фармацевтичної галузі

Згідно з директивою ЄС 178/2002/ЕС виробники продуктів харчування, а також харчових добавок і фітопрепаратів, зобов'язані забезпечити

простежуваність походження ЛРС. Безумовно, Настанова ГАСР має рекомендаційний характер, однак дотримання її положень, розроблених для конкретної ЛРС, враховуючи кліматичні, географічні фактори, особливості самої культури, а також зважаючи на національні, регіональні та міжнародні нормативно-настановні документи, гарантуватиме одержання якісної та простежуваної ЛРС. За даними ВООЗ, країни Східної Європи, в тому числі і Україна, мають значні перспективи розвитку лікарського рослинництва, що підтверджується попитом на внутрішніх ринках, позитивними тенденціями обсягів експорту, вдосконаленням технологій вирощування та бізнесу [220, 221].

Україна має сприятливі екологічні умови для вирощування рослин і заготівлі високоякісної ЛРС, але її склад дуже мінливий під впливом факторів навколишнього середовища [222]. Слідування принципам ГАСР сприятиме розширенню бази ЛРС для виробництва натуральних, екологічно чистих та ефективних ЛРЗ як для внутрішнього ринку так і для експорту. Крім того, упорядковане виробництво надає раціональній експлуатації дикорослих запасів ЛР та сприятиме недопущенню до обігу в Україні неякісної ЛРС.

### Узагальнення

У розділі систематизовано дані щодо розповсюдження, хімічного складу та фармакологічної активності сировини різних видів рослин роду Крокус та роду Ірис. Основними класами сполук рослин є флавоноїди, антоціани, терпеноїди, фенолкарбонові кислоти тощо, а для видів роду Крокус додатково присутні апокаротиноїди, що є вираженими протираковими агентами. Рослини роду Ірис містять речовини з класів ізофлавоноїдів та ксантонів, що рідко зустрічаються у природі та є високо біологічно активними компонентами. Крім того у розділі, викладено сучасні гіпотези шляхів біосинтезу основних БАР шафрану (кроцину, пікрокроцину, шафраналу) роду Крокус та фенольних сполук рослин роду Ірис, та висвітлено вплив факторів навколишнього середовища (географічні, кліматичні та едафічні) на їх біосинтез. К. посівний та рослини роду Ірис широко культивуються



в Україні, що робить рослини перспективними для введення у фармацевтичне виробництво, але необхідні поглиблені дослідження їх хімічного складу враховуючи кліматичні та географічні особливості регіонів країни. Проведено аналіз законодавчої бази країн ЄС та України щодо виробництва лікарських рослинних засобів та запровадження принципів Належної практики культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження при вирощуванні ЛР. Принципи GACP мають рекомендаційний характер, але слідування їм надає можливість одержанню якісної ЛРС із стабільним складом біологічно активних компонентів. Враховуючи вплив факторів навколишнього середовища на метаболізм, накопичення та компонентний склад БАР у ЛРС, важливим є розробка СОП культивування рослин для одержання сировини із стабільним та заданим складом компонентів для подальших надійних фармацевтичних процесів, що було покращено в основу мети дисертаційного дослідження.

*Результати досліджень розділу наведено в таких публікаціях: [9, 23, 38]*

## РОЗДІЛ 2

### ДИЗАЙН ТА МЕТОДОЛОГІЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

#### 2.1 Об'єкти дослідження

Для дослідження було обрано декілька видів та сортів рослин з роду Крокус та Ірис, що зростають у дикому вигляді, або культивуються.

*Рослини роду Крокус.* Основним об'єктом досліджень обрано к. посівний (*C. sativus* L.). Крім того, у порівняльний прескринінг включено наступні види та сорти крокусів: к. Кочи (*C. kotschyanus* К.Кoch), к. жовто-білий (*C. ochroleucus* Boiss. & Gaill.), к. осіньоквітковий (*C. zonatus* К.Кoch), к. прекрасний (*C. speciosus* М.Вieb.), к. жовтий (*C. aureus* Sm.), к. весняний (*C. vernus* (L.) Hill), к. велухський (*C. veluchensis* Herb.), к. Гейфеля (*C. heuffelianus* Herb.), крім того заготовляли квітки крокусів *C. vernus* “Flower record”, *C. vernus* “Jeanna Dark”, *C. adamii* J. Gay, *C. sativus* L., *C. vernus* “Grand moidre”, *C. chrysianthus* “Gipsy girl”. Зразки були заготовлені з колекцій декоративних рослин БС ХНУ ім. В.Н. Каразіна (м. Харків, Україна; 2018-2021 рр.), НБС ім. М.М. Гришка НАН України (м. Київ, Україна; 2018-2021 рр.), БС Університету Вітовта Великого, м. Каунас, Литва (2019 р.)

У дослідження було включено 27 сертифікованих зразків приймочок к. посівного (далі – шафран) з 12 країн світу (табл. 2.1), а також 35 зразків шафрану з 12 регіонів України, врожаїв 2015 – 2021 рр. (табл. 2.2). Дозвіл на збір врожаю українських зразків шафрану отримано від фермерів згідно з договором про співпрацю. Квітки збирали вручну, вилучали приймочки, висушували при 35–38°C. Шафран зберігали в темних скляних банках при 4°C. Виконання всіх процесів було здійснено дисертантом, або під його контролем, для досягнення простежуваності сировини до лабораторії. Для комерційних зразків простежити умови дистриб'юсії не було можливості. Більшість досліджень проведена із шафраном, заготовленим у різні роки (2015–2021) у ФГ «Шафран Любимівський» на плантації в смт. Любимівка (Каховський район, Херсонська область, Україна, далі – Херсон).

Таблиця 2.1

## Дані комерційних зразків шафрану

Зразки, № ваучера	Назва країни (регіон, провінція, село)*	Інформація від фірми-виробника зразка	Рік виробництва
S2018-1	Індія (Уттар Прадеш)	Фірма «Кесар», Патанджалі ayurved Ltd., Уттар-Прадеш	2018
S2018-2	Іран (Хорасан)	Фірма «Есфеданський шафран» Західний Онсорі, Мешхед	2018
S2018-3	Індія (Махараштра)	Фірма «Шафран агмарк особливий сорт», GreenPharmacy	2018
S2018-4	Мароко (Таліуїдин)	Приватне господарство	2018
S2018-5	Азербайджан (Апшерон)	Селище Більгах, приватне господарство	2018
S2019-1	Іспанія (Кастілья Ла-Манча)	Фірма «World of Kesar. Іспанський шафран», Pure Mancha,	2019
S2019-3	Литва (Каунас)	БС Вітовта Магнус Університету, Литва, Каунас	2019
S2019-4	Італія (Ломбардія)	Фірма “Safranfäden”, MigrosBio	2019
S2019-5	Німеччина (Альтенбург)	Фірма “Остман”, Safran у Федені, Гевюрце GmbH	2019
S2019-6	Швейцарія (Мунд)	Фірма «Safran in Fäden», Фукс, Гевюрце GmbH	2019
S2019-7	Іран (Неішбор)	Фірма «Мігрос», Зафран	2019
S2019-8	Мароко (Марракеш)	Фірма «Naturaplan», Safranfäden, “IlidiZafferano”, Abgepackt in der Schweiz	2019
S2019-9	Австралія (Тасманія)	Фірма «Австралійський шафран», Тас-Сафф	2019
S2019-11	США, Пенсильванія, Літіц	Приватне підприємство	2021
S2019-12	Афганістан (Герат)	Приватне підприємство	2021

Таблиця 2.2

## Перелік українських зразків шафрану та ґрунтово-кліматичні дані з місць культивування к. посівного в Україні

Регіон / населений пункт	Висота н.р.м., м	Географічні координати	Середньо-місячна температура, °С	Середньомісячна кількість опадів, мм	Сонячна постійна кВт/м <sup>2</sup>	Гумус, %	pH водн	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	K <sub>2</sub> O, мг/кг	N, мг/кг	Тип ґрунту
Херсон, Любимівка	58	46,80501°N 33,57194°E	8,1	36,25	3,55	1,42	8,01	847	132,0	72,8	Чорноземи щербисті на елювії щільних карбонатних порід
Одеса, Андрусів	182	47,18010°N 29,52181°E	8,8	37,41	3,55	4,36	7,03	147	151,6	61,6	Чорноземи глибокі, лесові породи
Запоріжжя, Матвіївка	72	47,07222°N 35,14583°E	7,6	38,27	3,44	3,59	7,10	463	571,2	56,0	Чорноземи звичайні глибокі малогумусні
Вінниця, Красносілка	173	48,50611°N 29,62111°E	6,5	42,50	3,11	3,21	7,20	812	975,6	310,8	Підзолисті ґрунти переважно на лесових породах
Чернігів, Кладівка	110	51,33667°N 31,94752°E	4,9	44,32	3,03	2,98	7,42	756	195,6	92,4	Лучно-чорноземні ґрунти
Харків, Китчинківка	122	49,96194°N 35,21194°E	5,5	42,51	3,42	2,21	6,51	455	223,0	33,6	Чорноземи гумусні і солонцюваті на лесових породах
Миколаїв, Заїчівське	36	46,79361°N 29,98694°E	8,0	35,49	3,55	3,50	6,55	348	457,1	60,6	Чорноземи південні, лесові породи
Хмельницьки, Волочиськ	311	49,53639°N 26,19722°E	5,4	43,05	3,06	2,75	4,80	363	276,2	42,8	Чорноземи глибокі, лесові породи
Волинь, Борочиче	222	50°25'46"N 24°49'25"E	6,7	55,38	2,75	2,61	7,42	10	94,0	126,0	Дерново-слабopідзолисті піщані і глинисто-піщані
Чернівці, Горішні Шерівці	110	51,33667°N 31,94752°E	6,45	41,25	3,11	3,25	6,82	438	278,2	76,5	Буроземно-підзолисті, гірські на елювії-делювії щільних порід
Суми, Костянтинівка	152	51,17139°N 34,76444°E	3,91	48,13	2,92	2,17	6,77	451	137,9	42,6	Чорноземи середньогумусні і солонцюваті

Листя к. посівного також було заготовлено у фермерстві Херсону (сmt. Любимівка), Запоріжжя (сmt. Матвіївка), Чернігова (сmt. Кладівка), Одеси (сmt. Андрусів), Вінниці (сmt. Красносілка). Зразки оцвітини к. посівного заготовлені у Херсоні (сmt. Любимівка), Миколаєві (сmt. Заїчівське), Ужгороді (сmt. Медведівці), Волині (сmt. Борочиче). Зразки бульбоцибулин заготовлено в Україні (Херсон, Миколаїв), Азербайджану (Баку), Нідерландах (м. Н. Буйнен) та Марокко (м. Талуїдин). Зразки були зібрані та ідентифіковані здобувачем особисто, ідентифікацію підтвердив доц. Ю. Г. Гамуля (ХНУ ім. В.Н. Каразіна, Харків, Україна). Зразки передано на зберігання до відділу гербарію кафедри фармакогнозії НФаУ Харків, Україна (ваучерні зразки № S2018-1–S2019-10).

Рослини роду Ірис. У дослідження було включено 38 видів та 34 сортів ірисів (табл. 2.3), отримані з колекцій БС та дикої природи України, Литви, Латвії, Азербайджану, а саме: БС ХНУ ім. В.Н. Каразіна (м. Харків, Україна; 2012–2021 рр.), НБС ім. М.М. Гришка НАН України (м. Київ, Україна; 2012–2021 рр.), БС НФаУ (м. Харків, Україна; 2007–2009 рр.), Державного дендрологічного парку «Олександрія» НАН України (м. Біла Церква, 2017 р.), Національний дендрологічний парк «Софіївка» (м. Умань, Україна; 2017 р.), Азербайджанського медичного університету (м. Баку, Азербайджан; 2005 р.), Шяуляйського університету (м. Шяуляй, Литва, 2020 р.).

Українські зразки рослин роду Ірис були ідентифіковані с.н.с. Ю. В. Буйдіним (Відділ квітниково-декоративних рослин НБС ім. М. М. Гришка НАН України), с.н.с. Т. Г. Орловою (БС ХНУ ім. В.Н. Каразіна, Харків, Україна) та дисертантом. Ваучерні екземпляри (№ CWN0056534–CWN0056554) були перевірені доц. Ю. Г. Гамулею та депоновані в Гербарії ХНУ ім. В.Н. Каразіна (Харків, Україна). Ваучерні зразки з популяцій Латвії та Литви, зібрані та ідентифіковані доктором Z. Gudzinskas, були збережені в Гербарії Інституту ботаніки Центру природничих досліджень у Вільнюсі (BILAS, ваучерні зразки № 75995–76004). Для виділення фенольних речовин використовували кореневища і. угорського, що були заготовлені на території БС НФаУ у вересні 2018 р.

Таблиця 2.3

## Перелік об'єктів дослідження з роду Ірис

№	Латинська назва	Українська назва	Місце заготівлі**	Час заготівлі	Сировина
1	2	3	4	5	6
1	<i>I. hungarica</i> Waldst et Kit.	Ірис угорський*	1, 2, 5, 6	3 2012 – 2021 (n =11)	L <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>
2	<i>I. Medwedewii</i> Fomin ( <i>Iris paradoxa</i> f. <i>choschab</i> (Hoog) B. Mathew & Wendelbo)	І. Медведєва	7	05.2014	R
3	<i>I. Carthaliniae</i> Fomin ( <i>Iris spuria</i> subsp. <i>carthaliniae</i> (Fomin) B. Mathew)	І. карталінський	7	05.2014	R
4	<i>I. imbricata</i> Lindl.	І. черепитчатий	7	05.2014	R
5	<i>I. pallida</i> Lam.	І. блідий	8	10.2012	L/R
6	<i>I. variegata</i> L. *	І. рябий	2, 5	05.2012; 04.2015; 05.2015; 04.2016; 03.2017; 05.2017; 09.2017 (n =3)	L/R
7	<i>I. pumila</i> L.*	І. карликовий	3, 5	05.2015; 03.2017 (n =3)	R
8	<i>I. germanica</i> L. *	І. германський	2	05.2015 (n =3)	L/R
9	<i>I. florentina</i> L. *	І. флорентійський	3	05.2015	L/R
10	<i>I. humilis</i> Georgi	І. низький	2	05.2012	L
11	<i>I. musulmanica</i> Fomin*	І. мусульманський	5	04.2017	R
12	<i>I. mandshurica</i> Maxim.	І. манжурський	2	05.2012	L
13	<i>I. kumaonensis</i> Wall ex Don.	І. кумаоненсіс	2	05.2012	L
14	<i>I. pumila</i> “Violet carpets”	І. карликовий “Violet carpets”	3, 11	05.2018; 05.2019	R

Продовження табл. 2.3

1	2	3	4	5	6
15	<i>I. pumila</i> “Higgledy piggledy”	I. карликовий “Higgledy piggledy”	11	05.2019	L/R
16	<i>I. pumila</i> “Little superstation”	I. карликовий “Little superstation”	11	05.2019	L
17	<i>I. pumila</i> “Welders flame”	I. карликовий “Welders flame”	11	05.2019	L/R
18	<i>I. pumila</i> “Сонячні вітрила”	I. карликовий “Сонячні вітрила”	11	05.2019	L
19	<i>I. pumila</i> “Дівчинка-крижанка”	I. карликовий “Дівчинка-крижанка”	11	05.2019	L
20	<i>I. pumila</i> “Шати-курган”	I. карликовий “Шати-курган”	2	09.2016; 07.2017	F/L/R
21	<i>I. pumila</i> “Політ фантазії”	I. карликовий “Політ фантазії”	2	09.2016; 07.2017	F/L/R
22	<i>I. pumila</i> “Скіф”	I. карликовий “Скіф”	2	09.2016; 07.2017	F/L/R
23	<i>I. pumila</i> “Lenna’M”	I. карликовий “Lenna’M”	2	09.2016	L
24	<i>I. pumila</i> “Cherry Garden”	I. карликовий “Cherry Garden”	2	09.2016	L
25	<i>I. pumila</i> “Watercolor”	I. карликовий “Watercolor”	2	09.2016	L
26	<i>I. hybrid</i> “Stocholm”	I. гібридний “Stocholm”	1	10.2014	R
27	<i>I. hybrid</i> “Lime Smoth”	I. гібридний “Lime Smoth”	1	10.2014	R
28	<i>I. hybrid</i> “New Snow”	I. гібридний “New Snow”	2	04.2015	L/R
29	<i>I. hybrid</i> “Little Dream”	I. гібридний “Little Dream”	1	05.2015. 05.2017; 09.2017	L/R
30	<i>I. hybrid</i> “Mini Dynamo”	I. гібридний “Mini Dynamo”	1, 12	05.2015; 05.2017; 09.2017; 05.2018	L/R
31	<i>I. hybrid</i> “Galleon Gold”	I. гібридний “Galleon Gold”	1	05.2015. 05.2017; 09.2017	L/R
32	<i>I. hybrid</i> “Indian Pow Wow”	I. гібридний “Indian Pow Wow”	1	05.2015. 05.2017; 09.2017	L/R
33	<i>I. hybrid</i> “Bright White”	I. гібридний “Bright White”	1	05.2015. 05.2017; 09.2017	L/R
34	<i>I. hybrid cv.</i> “Cool Us”	I. гібридний “Cool Us”	2	05.2015	L/R
35	<i>I. hybrid cv.</i> “Talibo”	I. гібридний “Talibo”	1	05.2015	F/L/R

Продовження табл. 2.3

1	2	3	4	5	6
36	<i>I. hybrid</i> cv. "Tsikavinka"	I. гібридний "Tsikavinka"	1	05.2015	F/L/R
37	<i>I. hybrid</i> 'Widcombe Fire'	I. гібридний 'Widcombe Fire'	1	05.2015	F/L/R
38	<i>I. hybrid</i> "Margarita"	I. гібридний "Margarita"	2	04.2015	L/R
39	<i>I. hybrid</i> "Sungarian "	I. гібридний "Sungarian "	2	04.2015	L/R
40	<i>I. pseudacorus</i> f. <i>alba</i>	I. болотний форма біла	1	09.2012. 05.2017	R
41	<i>I. pseudacorus</i> L.* [series Laevigatae (Diels) Lawrence (Rod)]	I. болотний [series Laevigatae (Diels) Lawrence (Rod)]	1, 4, 5, 6, 9, 13	05.2012; 10.2015; 03.2017; 03.2017; 04.2017; 05.2017; 10.2017; 11.2017	L/R, n=15
42	<i>I. graminea</i> L. *	I. злаколистий	2, 6	05.2012; 05.2015; 05.2017; 04.2017	L/R, n = 2
43	<i>I. halophila</i> Pall. *	I. солелюбивий	2, 8, 13	05.2012; 10.2017; 05.2018; 09.2018	L/R, n = 2
44	<i>I. versicolor</i> L.	I. різнокольоровий	2, 5	05.2015. 03.2017; 05.2017	L/R
45	<i>I. lactea</i> Pam.	I. молочно-білий	2	05.2015	L/R
46	<i>I. lactea</i> f. <i>alba</i>	I. молочно-білий форма біла	1, 2, 5	05.2015; 10.2015; 03.2017	L
47	<i>I. sibirica</i> L. [series Sibiricae (Diels) Lawrence (Rod)]	I. сибірський [series Sibiricae (Diels) Lawrence (Rod)]	1,2, 4, 6, 9	09.2012; 10.2015; 05.2017; 05.2020	L/R, n=3
48	<i>I. sibirica</i> f. <i>alba</i>	I. сибірський форма біла	2	05.2015	L
49	<i>I. notha</i> M. Bieb.	I. нота	1, 2	05.2015	R
50	<i>I. spuria</i> L.	I. спурія	2	05.2015	R
51	<i>I. spuria</i> f. <i>alba</i>	I. спурія форма біла	2	05.2015	L
52	<i>I. spuria</i> subsp. ( <i>ssp.</i> ) <i>halophila</i> (Pall.) B. Mathew & Wendelbo	I. спурія підвид солелюбивий	2	05.2015	L
53	<i>I. virginica</i> L.	I. вірджинський	1	10.2015	R
54	<i>I. pseudocyperus</i> Schur.*	I. несправжньоосмикавцевий	2	05.2015	L
55	<i>I. tectorum</i> Maxim	I. текторум	1	05.2017	R/L



Закінчення табл. 2.3

1	2	3	4	5	6
56	<i>I. setosa</i> Pall. ex Link	І. щетинистий	2	05.2015	L
57	<i>I. prismatica</i> Pursh	І. призматичний	2	05.2015	L
58	<i>I. thunbergii</i> C.E.Lundstr.	І. Тунберга	2	05.2015	L
59	<i>I. bulleyana</i> Dykes	І. булеяна	2	05.2015	L
60	<i>I. chrysographes</i> Dykes	І. золотисто-розписний	2	05.2015	L
61	<i>I. milesii</i> Baker ex Foster	І. мілезії	2	05.2015	L
62	<i>I. pallasii</i> Fisch. ex Trevir.	І. Паласа	2	05.2015	L
63	<i>I. dichotoma</i> Pall.	І. вільчатий	2	05.2015	L
64	<i>I. sanguinea</i> Donn ex Hornem.	І. криваво-червоний	2	05.2015	L
65	<i>I. sibirica</i> "Gatinea"	І. сибірський "Gatinea"	1, 2	05.2012; 09.2012; 05.2014	R/L
66	<i>I. sibirica</i> "Cambridge Blue"	І. сибірський "Cambridge Blue"	1, 2	05.2012; 05.2014	R
67	<i>I. sibirica</i> "Snowcrest"	І. сибірський "Snowcrest"	1, 2	05.2012; 09.2012	R
68	<i>I. sibirica</i> "Violet Fantasy"	І. сибірський "Violet Fantasy"	1	05.2014	R
69	<i>I. sibirica</i> "Early Blue Bird"	І. сибірський "Early Blue Bird"	2	05.2012	R
70	<i>I. sibirica</i> "Grand Yunction"	І. сибірський "Grand Yunction"	2	05.2012	R
71	<i>I. sibirica</i> "Cool String Blue"	І. сибірський "Cool String Blue"	2	05.2012	R
72	<i>I. sibirica</i> "Montain Lake"	І. сибірський "Montain Lake"	2	05.2012	R

Примітка. 1 – L – листя, 2 – R – кореневища. \* – види, що відносяться до флори України. \*\* Місце заготівлі сировини: (1) Національний бот. сад ім. Н.Н. Гришка НАНУ, Київ; (2) Ботанічний сад загальнодержавного значення Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Харків; (3) Ботанічний сад Національного фармацевтичного університету, Харків, Україна; (4) Ботанічний сад Ужгородського національного університету, Ужгород, Україна; (5) Національний дендрологічний парк "Софіївка" НАН України, Умань, Україна; (6) Дендрологічний парк "Олександрія" НАН України, Біла Церква, Київська обл.; (7) с. Держмаліан, с. Пірасора Лерікського району, Азербайджан; (8) с. Кремінна, Луганська обл. Україна; (9) Карпатський біосферний заповідник, м. Рахів, Закарпатська обл., Україна; (10) Природний парк Долини нарцисів, урочищі Кіресі, за 4 км на схід від міста Хуст, Закарпатська обл.; (11) Миколаївський обласний еколого-натуралістичний центр учнівської молоді, Миколаїв, Україна» (12) Донецький ботанічний сад НАН України, Донецьк, Україна; (13) Природний парк Долина Ірисів, Вінницька область, Мурованокуріловецький район, Україна.

## 2.2 Умови культивування рослин роду Крокус та Ірис, агрохімічний аналіз ґрунту, географічні та кліматичних даних

Розробка етапів культивування для к. посівного із застосуванням Настанови GACP проводилося на плантації в смт. Любимівка, Херсонської області в Україні з 2016 по 2021 р., з подальшою імплементацією етапів культивування у різних регіонах України з 2018 року. Введення принципів GACP при культивуванні к. посівного було апробовано та введено у роботу наступних підприємств: ФГ «Шафран Любимівський» (Херсон, Україна), «Агро-фокус» (Херсон, Україна), ФГ «Crocus.pro» (Волинь, Україна), ФГ «Mts Schipper & Elberse» (Нідерланди). Для рослин роду Ірис дослідження умов вирощування проведено на базі НБС ім. М.М. Гришка НАН України (м. Київ, Україна) протягом 2018–2021 р. при консультуванні с.н.с Буйдіна Ю.В. та с.н.с. Четверні С.О.

Реалізація принципів GACP для к. посівного, і. угорського та сортових ірисів *Iris x hybrid hort* («Indian Pow Waw», «Galleon Gold», «Mini Dinamo», «Tsikavinka», «Talibo», «Widcombe Fire») включав: опис рослини, посівний матеріал, первинну обробку, умови посіву, транспортування та зберігання, пакування, контроль якості та документацію. Процес культивування включав дані про тип місця вирощування; умови посіву; склад ґрунту; збагачення ґрунту; іридацію; утримання поля; потенційні хвороби та шкідники; збір і врожайність; сівозміну; зібрану частину рослини. Представлені результати відображають весь виробничий процес і показують перспективи отримання високоякісної сировини. У дослідженні представлені результати впровадження рекомендацій ВООЗ GACP, щоб гарантувати простежуваність рослинної сировини та її якість.

Встановлення агрохімічних показників ґрунтів виконані на базі лабораторії Харківської філії Державної установи Інститут охорони ґрунтів України (м. Харків) під контролем головного інженера-ґрунтознавця Десенко В.Г Для дослідження агрохімічних показників брали зразки ґрунту з поверхневого шару 0-30 см, просушували повітрям, та аналізували за наступними показниками:

значення гумусу (%), рН, вміст  $P_2O_5$  (мг/кг), вміст  $K_2O$  (мг/кг), вміст N, легкогідролізуємий (мг/кг). Вміст гумусу та рухомого фосфору визначали фотометричним методом відповідно до ДСТУ 4289:2004 та ДСТУ 4115-20002 відповідно. Вміст обмінного калію визначали по Чирікову методом полуменевої фотометрії за ДСТУ 4115-2002; кислотність зразків – інструментальним методом ДСТУ ISO 10390-2001; вміст азоту легкогідролізуємого (мг/кг) по Корнфілду. При аналізі використано прилади: Specol 11, Конє-фотопериметр, Ендорф-полуменевий фотометр, Бекман. Зразки ґрунту заготовляли з усіх місць зростання досліджуваних рослин у природі та при культивуванні, в суху, сонячну погоду.

Концентрацію, перенесення та накопичення обраних елементів з ґрунту до сировини оцінювали за показником коефіцієнту біологічного поглинання (КБП), який розраховували за формулою 2.1 [223]:

$$C_{\text{частина рослини}}/C_{\text{ґрунт}}, \quad (2.1)$$

де  $C_{\text{частина рослини}}$  – концентрація елемента в обраній частині рослини (мг/кг);  
 $C_{\text{ґрунт}}$  – концентрація елемента у ґрунті (мг/кг).

Кліматичні дані по регіонах України фіксували з 2015 по 2022 роки з локальних станцій в рамках польових досліджень. Інформацію про погоду брали з відкритих даних Укргідрометцентру [224] та локальних метеостанцій. Географічні координати та висоту визначали за допомогою GPS-пристрою Prestigio GeoVision 5056 для українських зразків та Maps.ie [225] для іноземних зразків (табл. А.1, Додатки). Значення «Висота над рівнем моря, м» наведено як приблизне, а не точне місце проведення експерименту. Акроніми для типу клімату були взяті з кліматичної класифікації Кеппена-Гейгера [226]. Типи ґрунтів наведено відповідно даних «Карти ґрунтів України» [227] та з Атласу ґрунтів Європи [228]. Інформацію про тривалість сонячного сяйва брали з карти сонячного сяйва [229], згідно з якою всі регіони поділено на чотири групи. Інформацію про сонячний УФ-індекс, середню температуру та кількість опадів було взято з Global solar UV index, Brugger & Rubel і Weather Online [230, 231, 232].

## 2.3 Методологія та дизайн досліджень

При плануванні експерименту використано підхід QbD. Відповідно до Настанови ІСН Q8 «Фармацевтична розробка» [233], концепція QbD базується на чіткому визначенні мети експерименту, плануванні та контролі на кожному етапі всього процесу отримання рослинних екстрактів з обраної ЛРС. Основним цільовим призначенням досліджуваної сировини відповідно до даних літератури було визначено потенційну хіміотерпевтичну цінність.

План експерименту включав: визначення проблеми (актуальна проблема онкологічних та інфекційних захворювань у світі), вибір напрямку вирішення проблеми (пошук ЛРС з протипухлинною/протівірусною активністю), обґрунтування вибору об'єкта дослідження (сировина к. посівного та види ірисів – вибірка ЛРС з широкою сировинною базою та перспективним складом БАР за літературним пошуком). Оцінку ризиків одержання рослинних екстрактів належної якості визначали за допомогою діаграми Ісікави та Аналізу режимів та наслідків відмови [377]. Для вибору потенційних маркерів якості спеціально для екстрактів з досліджуваної ЛРС з протипухлинними та протівірусними властивостями застосовували підхід Herb MaRS [252]. DoE передбачає проведення хімічного аналізу сировини, отримання екстрактів із обраного виду сировини та їх хімічний аналіз [244]. Коректність використаних підходів оцінювали за результатами фармакологічних досліджень отриманих екстрактів.

### 2.3.1 Формування дизайну досліджень з позицій QbD

Фітопрепарати, як і будь-який лікарський засіб, повинні відповідати вимогам якості, безпеки та ефективності. Впровадження настанов ІСН Q8, Q9 та Q10 поєднало етапи розробки фармацевтичного продукту, де гарантія якості ЛРС закладена на кожному етапі виробництва згідно з вимогами GMP. У зв'язку з цим ВООЗ розробила кілька рекомендацій щодо етапів стандартизації ЛРС [234]. ЕМЕА [235, 236] адаптувало підхід QbD для покращення розуміння процесу

виробництва ЛРЗ. Однак, незважаючи на переваги цього моделювання, підхід ще не був повністю реалізований на етапі планування та виробництва ЛРЗ. Концепція QbD була застосована для забезпечення безпеки, ефективності та контролю якості всього виробничого процесу одержання рослинних екстрактів з к. посівного та рослин роду Ірис з бажаними характеристиками продукту (протипухлинні та протівірусні дії екстрактів), а також визначення критичних факторів [233, 235]. Відповідно до підходу QbD, фармацевтична розробка повинна включати принаймні такі елементи та фази:

- визначення бажаних характеристик / профілю якості цільового продукту (QTPP);
- визначення потенційно критичних ознак якості лікарського засобу (CQA);
- визначення можливих критичних параметрів процесу (CPP) і характеристик фармацевтичної субстанції та допоміжних речовин (CMA);
- розробка та впровадження плану експерименту (DoE), його оптимізація, визначення стратегій контролю та вдосконалення

Узагальнений робочий процес для розробки рослинного екстракту на основі застосування підходу QbD на прикладі оцвітини к. посівного, показано на рисунку 2.1. Цей підхід гарантує надійний процес від відбору ЛРС, екстракції для виробництва ЛРЗ, навіть якщо вихідний матеріал рослинного походження має широку різноманітність, що характерно для ЛРС.

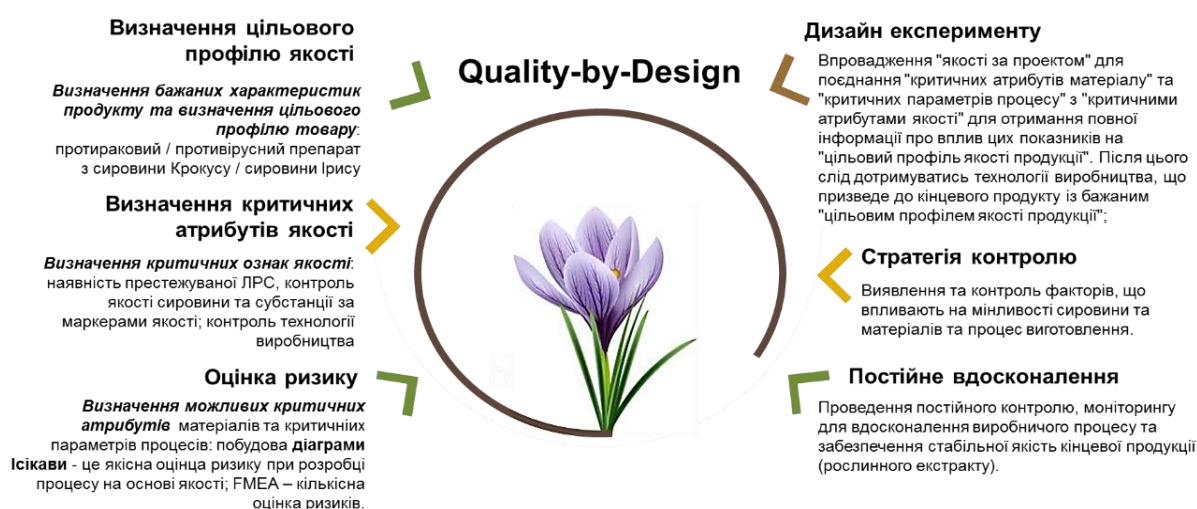


Рис. 2.1 Оцінка процесу з використанням підходу «якість шляхом розробки» (QbD) для одержання фітофармацевтичних препаратів

### 2.3.1.1 Профіль цільового продукту

В основу покладено актуальність пошуку та вимоги до протипухлинних та противірусних рослинних препаратів, а саме високу ефективність, низьку токсичність і можливість тривалого застосування в терапії [237, 238].

Рак є важливою проблемою охорони здоров'я в усіх країнах. Щорічно в середньому 182 з 100 000 людей у всьому світі хворіють на рак, а 102 з них – помирають. За даними ВООЗ, у всьому світі 14 млн. людей хворіють на рак і 8 млн. помирають від раку. Смертність, викликана раком, зростає в усьому світі, і прогнозується, що більше 13,1 млн. смертей станеться через рак. у всьому світі до 2030 р. В даний час для лікування раку використовуються різні методи, такі як хіміотерапія, але в цьому методі через не селективність ліків високий відсоток здорових клітин буде втрачено разом з раковими клітинами. Найважливішою проблемою лікування раку є знищення пухлинних клітин у присутності природних клітин, без пошкодження нормальних клітин людини.

Для потенційного виробництва протипухлинних фітопрепаратів необхідно дослідити сухі екстракти та/або окремі цитотоксичні компоненти.

Така ж небезпечна ситуація і з вірусними захворюваннями. Дослідження показали, що профілактика та лікування вірусних інфекцій на ранніх стадіях мають вирішальне значення для швидкого одужання та захисту населення [239]. Віруси грипу, такі як H1N1, H3N2, H5N1 і H7N9, становлять серйозну загрозу здоров'ю людини. Ці віруси грипу є дуже заразними та призводять до високого рівня захворюваності та смертності. Ентеровіруси (EV68, EV69, EV70, EV71) щорічно вражають мільйони людей у всьому світі і часто виявляються в респіраторних виділеннях, включаючи слину, мокротиння або носовий слиз. Поява резистентності цих вірусів до БАР спонукає до розробки нових терапевтичних стратегій для боротьби з їх інфекціями [240]. Іншу небезпеку становить віруси простого герпесу (ВПГ-1, 2). За даними ВООЗ цей вірус посідає друге місце серед вірусних інфекцій за поширеністю на планеті після вірусу грипу. Асортимент ефективних противірусних ліків з доведеною ефективністю

на сьогодні є недостатнім. У зв'язку з великою соціальною значимістю групи протівірусних препаратів, пошук ЛРС з заданою дією є актуальним [241].

Рослинна сировина є джерелом фенольних сполук, які позитивно впливають на виживаність, імуномодуляцію та якість життя онкологічних хворих у поєднанні з традиційними терапевтичними засобами. Тому кінцевою метою процесу є отримання високоякісних рослинних екстрактів з к. посівного та видів ірисів, які проявляють протівірусну та цитотоксичну дію. Для забезпечення властивостей, зазначених у QTPP, було обрано метод отримання екстрактів різними розчинниками для визначення найбільш підходящого екстрагента на основі результатів хроматографічного аналізу БАР.

#### 2.3.1.2 Якісна та кількісна оцінка ризиків при одержанні рослинних екстрактів

Оцінка ризиків складалась з ідентифікації та опису потенційних небезпек, оцінки впливу та характеристики ризику. Побудову та аналіз діаграми Ісікави було виконано згідно з настановою ІСН Q9 «Управління ризиками якості» [243], щоб визначити фактори, які можуть вплинути на вилучення сполук із сировини крокусу та ірису. Діаграма Ісікави [245] ідентифікує та групує різні види ефектів, такі як властивості матеріалу, дизайн обладнання та параметри процесу, які можуть становити ризик для певних СQA, таких як вихід, чистота або загальна технологічність. Основні гілки риб'ячої кістки поділяються на підгілки, які розкривають більш детальний причинно-наслідковий зв'язок між потенційною причиною та ризиком. Діаграма наводить критичні параметри процесу (CPP), які повинні підтримуватися в певному діапазоні під час процесу і, отже, повинні бути частиною стратегії управління процесом і можуть вимагати подальшого вивчення. Орієнтовна рання оцінка ризику для процедури отримання рослинних екстрактів зі стабільним складом компонентів із ЛРС наведена на рисунку 2.2.



Рис. 2.2 Оцінка ризиків при отриманні рослинних екстрактів за методом Ісікави

Відомо, що основними ризиками ЛРС, отриманої зі стабільним хімічним складом, є біологічні та фізіологічні аспекти вирощування рослин [246]. При ідентифікації ризиків нами було визначено шість основних потенційних причин відмов, вихідну ЛРС, первинну обробку сировини, умови виробничого процесу та оптимального екстрагенту, використане обладнання та наявність навченого персоналу, а також ідентифіковано пов'язані з ними підпричини. Першим кроком є культивування рослини відповідно до принципів GACP та первинна обробка сировини, потім підготовка сировини до екстракції та проведення аналізу для встановлення її хімічного складу методом ВЕРХ. Вплив людської помилки, обладнання та навколишнього середовища на якість можна зменшити за допомогою ефективного управління та дотримання стандартних операційних процедур або графіків технічного обслуговування. Ризики, пов'язані з процесом і матеріалами, в даному випадку отриманням якісної сировини та процесом вибору екстрагенту, є найбільш важливими для характеристики процесу [247].

Для кількісної оцінки конкретних ризиків при виробництві екстрактів з сировини крокусу/ірису використовувався метод FMEA, шляхом оцінки діапазону СРР, визначеного на діаграмі Ісікава, до потенційного впливу, який може призвести до ризику, що вплине на показники якості, та ймовірності ризику під час вилучення рослинних матеріалів з розчинниками [248]. Метод FMEA



пропонується як незамінний інструмент для класифікації ризиків на основі серйозності (S), ймовірності виникнення (O) та ймовірності виявлення (D) сировини, що піддається ризику. У FMEA ризик у кінцевому продукті виражається через RPN (остаточний пріоритет ризику), яке визначається таким чином:  $RPN = S \times O \times D$ . Якщо  $RPN > 130$ , слід вжити коригувальні дії. FMEA розглядає будь-який елемент, який є частиною всієї системи [244]. Аналіз усіх можливих причин того, чому кожен компонент або підсистема не може виконувати свою призначену функцію, здійснюється на основі як найкращої думки експертів, так і історичної інформації про подібні елементи. Аналіз FMEA побудований на основі оцінки небезпечних обробок і розрахунку RPN, як показано в таблиці А.4 (Додатки).

Результати розрахунку RPN 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. Приготування екстракту складається з декількох етапів первинної обробки, сушіння, подрібнення, екстрагування і власне отримання рослинних екстрактів. У процесі управління ризиками було оцінено рівень ризику, запропоновано методи контролю та попередження ризиків.



Рис. 2.3 Загальна кількісна оцінка конкретних ризиків (у балах) при виробництві рослинних екстрактів з використанням підходу FMEA

Система аналізу ризиків і критичних контрольних точок (НАССР) допомагає визначити ключові етапи обробки ЛРС, щоб мінімізувати ризик

мікробного забруднення, і має виконуватися за замовчуванням. Аналіз ризиків впровадження НАССР, інтегрований з FMEA, допоміг у поточному дослідженні передбачити наявність ймовірних небезпек, включно з біологічними (мікроорганізми, ферментативна активність), хімічними (залишки пестицидів, мікотоксини) і фізичними (важкі метали, сторонні речовини, критична вологість, потемніння, надмірна активність води, пил), які можуть виникнути на різних етапах процесу. У виробництві екстрактів к. посівного та видів ірисів первинна стадія обробки ЛРС, включаючи збирання, сортування та сушіння, незалежно від того, який тип сушіння використовується, вважається ССР. Крім того, процес екстракції також є визначальним етапом виробництва. Таким чином, виробництво ЛРЗ має здійснюватися відповідно до вимог GMP, GACP та НАССР із суворим контролем усіх видів ризиків.

### 2.3.1.3 Критичні атрибути якості

За результатами аналізу ризиків визначено критичні атрибути якості (CQA) вибраного продукту [242], які забезпечують його бажану якість при належному контролі в процесі виробництва (табл. А.4, Додатки). CQA включає фізичні, хімічні, біологічні або мікробіологічні властивості або характеристики вихідного рослинного матеріалу, а також отриманого екстракту. Відповідно до підходу QbD, CQA є динамічними характеристиками розвитку процесу, які необхідно оновлювати та покращувати протягом життєвого циклу продукту [232]. Аналіз ризиків використовується для визначення точок контролю процесу для визначення CQA. Ці CQA призначені для отримання стандартної рослинної сировини з дотриманням рекомендацій GACP щодо вирощування рослин, що забезпечить відстежуваність ЛРС та гарантує стабільний результат фармакологічної активності. Крім того, критичними моментами процесу є контроль якості сировини, допоміжних матеріалів і процесу екстракції, щоб переконатися, що рослинний екстракт має постійну якість і склад БАР.

Вибір маркерів якості здійснювався за допомогою підходу HerbMars.

### 2.3.2 Вибір маркерів якості з використанням підходу HerbMars

Фармацевтична промисловість повинна застосовувати суворий контроль якості, щоб забезпечити стійкість, безпеку та ефективність своїх ЛРЗ [249]. ЛРС та фітозасоби на її основі зазвичай містять комплексні суміші БАР, тому вибір характерних хімічних компонентів для аналітичного тестування є необхідним для гарантування та демонстрації належної та стабільної якості [250]. Загальноприйнято, що оцінка контролю якості ЛРС, екстрактів і препаратів на основі активних маркерів є обов'язковою. Маркери якості – це «хімічно визначені складові або групи компонентів ЛРС, рослинного препарату або ЛРЗ, які служать для цілей контролю якості, незалежно від того, чи мають вони будь-яку терапевтичну дію» [250]. ЕМЕА описує дві різні категорії хімічних маркерів/маркерів якості: компоненти фітопрепарату, відповідальні за його терапевтичну дію, або активні маркери, а також компоненти, характерні для таксонів або аналітичні маркери. Активними терапевтичними компонентами ЛРС є як первинні, так і вторинні метаболіти, що виробляються рослинами залежно від впливу навколишнього середовища. Дизайн дослідження та обрання Q-маркера є складною системою для оцінки якості та управління виробничими процесами одержання фітопрепаратів, а також забезпечення простежуваності якості [251]. Маркери якості (*Q-markers*) – концепція оцінки якості, що відкриває новий шлях для вдосконалення системи стандартів якості фітофармації.

Внаслідок складної природи хімічного складу ЛРЗ до контролю їх якості мають бути застосовані два підходи, а саме: кількісне визначення обраних речовин-маркерів і загальний профіль ЛРС. Тільки маркери, які відповідають визначеним критеріям, можуть бути маркерами якості і можуть бути використані як інструмент контролю якості. Щоб отримати надійні результати будь-якого аналізу, який був виконаний у будь-якій лабораторії контролю якості, метод аналізу повинен бути перевірений відповідно до новіших рекомендацій.

Для відбору Q-маркерів для ЛРС та рослинних субстанцій к. посівного та видів ірисів був запропонований підхід Системи ранжування хімічних маркерів

рослин (Herb MaRS, *Herbal Chemical Marker Ranking System*), розроблений науковцями Університету Західного Сіднея [252]. Метод Herb MaRS враховує різні фактори, пов'язані з компонентами ЛРС та ЛРЗ, такі як наявність досліджень біологічної активності та чисто хімічних стандартів; зв'язок традиційного або поточного використання трави з її терапевтичним застосуванням або фармакологічними ефектами, концентрацією хімічного маркера в ЛРС та токсичністю або максимальною рекомендованою дозою (рис. 2.4), а також комерційну доступність стандарту. Критерії Herb MaRS містять пріоритетний список хімічних маркерів, раціонально ранжованих за шкалою від 0 до 5, при цьому 5 вказує на найбільш відповідний хімічний маркер. Ранг 0 означає найменш придатний. Крім того, категорія «X» означає відсутність досліджень біологічної активності сполуки, доступних на момент відбору. Ці сполуки не можна було повністю виключити як потенційні хімічні маркери через невідому активність. Критерії HerbMaRS для ідентифікації/визначення якості в складних фітопрепаратах наведено у таблиці А.5 (Додатки).

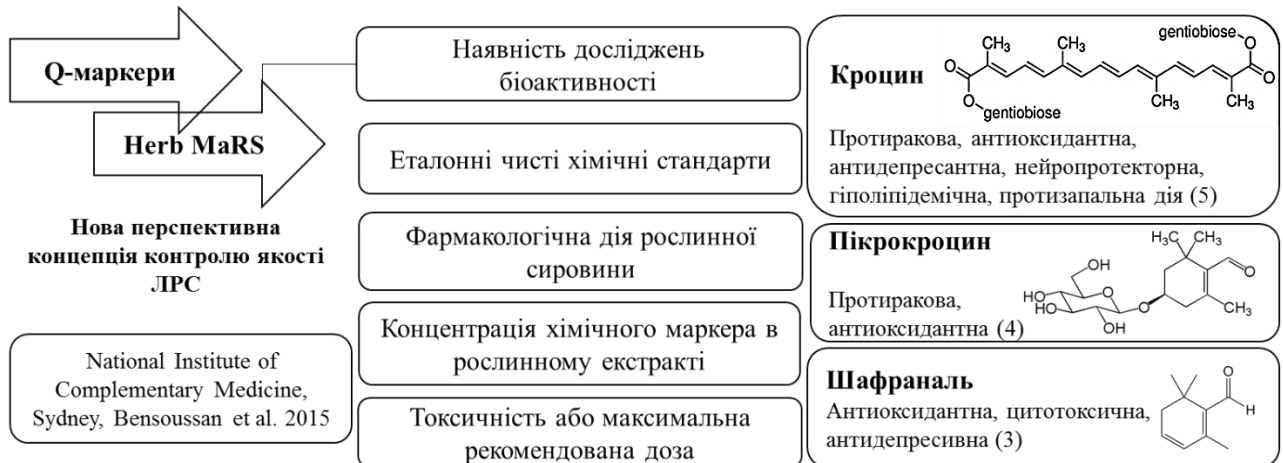


Рис. 2.4 Підхід Herb MaRS для обґрунтування вибору Q-маркерів для рослин та потенційні Q-маркери на прикладі шафрану

Оскільки сировина к. посівного та різних видів ірисів в Україні є новим джерелом для виробництва ЛРЗ, необхідно оцінити її хімічний склад, вибрати маркерні сполуки, підібрати або розробити сучасні методи аналізу та розробити параметри стандартизації для сировини та екстрактів, які досі відсутні в Україні.

## 2.4 Методи досліджень

### 2.4.1 Проведення прескринінгу БАР

Якісний склад БАР вивчали за допомогою методів ПХ, ТШХ, ВЕТШХ, ВЕРХ та ГХ. Хроматографічне дослідження БАР проводили методами висхідної та низхідної, одно- або двомірної, одно- і трикратної хроматографії на папері та у тонкому шарі сорбенту відповідно до вимог загальних статей ДФУ 2.0.1 «Хроматографія на папері» і «Тонкошарова хроматографія» [253].

Для хроматографічного аналізу використовували хроматографічний папір марки FN № 1, 2, 7 та пластинки TLC F<sub>254</sub> (Merck®, товщина 0,25 мм, 10×10 см).

Екстрагування сировини та попередній якісний аналіз фенольних сполук, амінокислот, полісахаридів проводили за загальновідомими реакціям забарвлення та осадження, та хроматографічним аналізом. На хроматограмах сполуки виявляли за характеристичною флуоресценцією в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм і 254 нм до і після обробки пластини парами амонію, 2 % спиртовим розчином алюміній хлориду; 10% розчин гідроксиду натрію/калію; 5% спиртовим розчином діазотованої сульфанілової кислоти.

Визначення числових показників сировини проводили відповідно до методик загальних статей ДФУ «Втрата в масі під час висушування», «Зола загальна», «Екстрактивні речовини» [253].

Використовували та готували реактиви класу аналітичної та хроматографічної чистоти згідно з вимогами ДФУ [211, 253, 297, 300] та ЄФ [299]. Очищена вода була отримана системою очищення води Millipore (Бедфорд, США). Суміш стандартних L-амінокислот (аланін, серин, валін, треонін, лейцин, ізолейцин, пролін, аспарагінова кислота, глютамінова кислота, лізин, метіонін, фенілаланін, тирозин) були придбані у Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Німеччина). Для ВЕРХ аналізів використовували: ацетонітрил, метанол, мурашину кислоту, концентровану оцтову кислоту хроматографії (Sigma-Aldrich GmbH, Karlsruhe, Німеччина); MTBSTFA (N-трет-бутилдиметилсиліл-N-

метилтрифторацетамід), 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозил (DPPH) (Fluka Chemie, Buchs, Швейцарія); 2,2'-Азино-біс (3-етилбензотіазолін-6-сульфо кислота) діамонієва сіль (ABTS, чистота  $\geq 98\%$ ), персульфат калію (чистота  $\geq 99\%$ ) були придбані у Sigma (Сент-Луїс, Міссурі, США), Trolox (чистота  $\geq 98\%$ ) від Fluka Chemika (Buchs, Швейцарія). В експериментах використовували стандарти речовин (чистота  $\geq 98,0\%$ ) (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Швейцарія) (табл. А.6, Додатки). Інші розчинники та хімікати мали аналітичну чистоту.

#### 2.4.2 Спектрофотометричні методики визначення кількісного вмісту БАР та антиоксидантної активності

Дослідження проводили згідно з вимогами статті ДФУ 2.0 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях» (2.2.25) [253]. Оптичну густину визначали за допомогою спектрофотометрів: Evolution 60S UV – Visible Spectrophotometer (США); Dynamica, HALO DB-20 (Dynamica Scientific Ltd., United Kingdom), Beckman Coulter DU-800 UV/Vis, із використанням кювет, товщина шару в яких становила 10 мм.

*Загальний вміст фенольних сполук.* Визначення проводили у метанольних екстрактах ЛРС методом Фоліна–Чокальтеу [254]. Вимірювали оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину та розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі ( $750 \pm 5$ ) нм у кюветі із товщиною шару 10 мм відносно компенсаційних розчинів. Як розчин порівняння використовували стандарт галової кислоти. Отримані дані оцінювали за рівнянням лінійної регресії кінцевого кислотного калібрувального графіка:  $y = 0,9068x + 0,0617$ ;  $R^2 = 0,9960$ ;  $y$  = інтенсивність поглинання;  $x$  = загальна кількість фенольних сполук, виражена як еквівалент галової кислоти [мг ГАЕ/г].

*Загальний вміст флавоноїдів* [255]. Рослинний екстракт (0,2 мл) змішували з 0,2 мл концентрованої оцтової кислоти 33%, 0,8 мл гексаметилентетраміну 5%, 0,6 мл 10% алюмінію хлориду і 2,2 мл води. Отриману суміш інкубували протягом 30 хв при 70°C. Абсорбцію вимірювали при 407 нм [256]. Як розчин

порівняння використовували стандарт рутину. Отримані дані оцінювали за рівнянням лінійної регресії кінцевого кислотного калібрувального графіка:  $y = 0,9465x - 0,0950$ ;  $R^2 = 0,9960$ ;  $y$  = інтенсивність поглинання;  $x$  = загальна кількість флавоноїдів, виражена як еквівалент рутину [мг RE/г].

*Загальний вміст гідроксикоричних кислот* у перерахунку на хлорогенову кислоту та абсолютно суху сировину визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 327 нм за модифікованою методикою монографії ДФУ «Кропиви листя» [253].

*Загальний вміст ізофлавоноїдів* у перерахунку на онозид та абсолютно суху сировину визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за модифікованою методикою з ДФУ ФС «Коріння стальника» [253]: як екстрагент застосовували 50% спирт, а оптичну густину екстракту встановлювали при 271 нм [257], оскільки максимум поглинання аналітичного розчину вилучення з кореневищ ірисів припадав на цю довжину хвилі.

*Загальний вміст суми  $\gamma$ -піронів* у перерахунку на мангіферин та абсолютно суху сировину визначали методом абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 369 нм за методикою [258].

*Визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю* здійснювали методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях відповідно до вимог стандарту ISO 3632 [15, 16]. Вимірювали оптичну густину водних витягів з ЛРС за довжині хвилі від 200 до 700 нм відносно компенсаційного розчину (вода). Визначали інтенсивність забарвлення за визначенням питомого показника поглинання  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  для кроцину при довжині хвилі 440 нм: аромат – для шафраналю при 330 нм; гіркоту – для пікрокроцину за довжини хвилі 257 нм, у перерахунку на суху сировину та розраховують за формулою 2.2:

$$A_{1\text{см}}^{1\%}(\lambda) = \frac{(A \times 10000)}{(m \times (100 - W))} \quad (2.2),$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 257 нм для пікрокроцину, 330 нм для шафраналю, 440 нм для кроцину;

10000 – повне розведення витягу,

$m$  – маса наважки випробовуваної сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні випробовуваної сировини, у %.

*Аналіз антиоксидантної дії in vitro з реагентом ABTS•+*. 10 мкл етанольного екстракту ЛРС змішували з 3 мл робочого основного розчину ABTS•+ (концентрація 2 ммоль/л). Суміш витримували в темному місці протягом 30 хв, потім абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 734 нм. Калібрувальний графік був створений з використанням стандартних розчинів тролоксу від 8000 до 24000 мкмоль/л [259].

*Аналіз антиоксидантної активності in vitro з реактивом DPPH*. Реакційні суміші готують у пробірках у 2 повторах: 50 мкл досліджуваного екстракту змішують з 1950 мкл розчину DPPH. Екстракти з реагентом витримують 15 хв в темному місці. Кількість непрореагованого радикала DPPH оцінювали вимірюванням оптичної густини за довжині хвилі 515 нм. Розчин порівняння – 85% метанол. Калібрувальну криву склали з використанням розчину рутину (0,05-0,25 мг/мл), а активність поглинання радикалів в екстрактах розраховували в RE мг/100 г сухої маси.

*Умови атомно-абсорбційної спектроскопії графітової печі (ГФ-ААС) з фотографічною реєстрацією на приладі ДФС-8 для якісної та кількісної оцінки складу макро- та мікроелементів у сировині*. Метод заснований на випаровуванні зразків з кратерів графітових електродів і збудженні спектрів в дузі та реєстрації отриманих спектрів на фотопластинках ІБС-28. Умови вимірювання: сила струму дуги – 16 А, фаза запалювання – 60 °С, частота імпульсів запалювання – 100 біт/с, аналітичний зазор – 2 мм, ширина зазору – 0,015 мм, експозиція – 60 с. Спектри фотографували в області 240–350 нм. Для визначення використовувався набір стандартних зразків СПГ-24 (GSO 2820-83).

#### 2.4.3 Хроматографічні методи аналізу БАР у сировині та сухих екстрактах

Хроматографічні дослідження проведені на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я



(Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки завідувача кафедри аналітичної та токсикологічної хімії проф. Людаса Іванаускаса згідно з вимогами статті ДФУ 2.0 «Рідинна хроматографія» (2.2.29), «Мас-спектрометрія» (2.2.43), «Газова хроматографія» (2.2.28). Дослідження проводили для рослинної сировини та сухих екстрактів із сировини.

#### 2.4.3.1 Пробопідготовка

*Одержання рослинних екстрактів для хроматографічних досліджень.* Для обґрунтування оптимального методу подрібнення ЛРС проводили порівняльний аналіз виходу БАР зі зразків шафрану з трьома способами пробопідготовки: без подрібнення, з подрібненням відповідно ДФУ 2.0 та подрібненням із застосуванням рідкого азоту. Вміст речовин визначали УФ/Вид та ВЕРХ. У подальших дослідження використовували спосіб подрібнення із рідким азотом.

Одержання екстрактів для аналізу *фенольних сполук та апокаротиноїдів.* Наважку ЛРС/сухого екстракту (0,2/0,1 г відповідно) екстрагували у мірній колбі на 25 мл з додаванням 10 мл метанолу на УЗ-бані (Wise Clean WUC-A06H, Witeg Labortechnik GmbH, Вертхайм, Німеччина) при кімнатній температурі ( $20 \pm 2$  °C) протягом 30 хв. Отримані розчини фільтрували у віалу через мембранний фільтр (0,45 мкм), відкидаючи перші краплі. Аліквоту 10 мкл вводили в систему ВЕРХ для аналізу. Стандарти використовували для приготування еталонних розчинів у концентрації 1,0 мг/мл у метанолі та використовували для калібрування.

Пробопідготовка для аналізу *тритерпенових сапонінів:* 1,0 г подрібненого зразка БЦ к. посівного екстрагували 1 мл 100% ацетону на УЗ-бані 30 хв при 22 °C, розчин центрифугували 30 хв при  $3000 \times g$  у центрифугі Biofuge Stratos та фільтрували через фільтр 0,45 мкм (Карлсруе, Німеччина).

*Ефірну олії отримували* методом перегонки з водяною парою відповідно до статті ДФУ 2.6 «Ефірні олії в лікарській рослинній сировині» [211]. Отриманий дистилат змішували з 1 мл *n*-гексану. Гексановий шар відокремлювали від води та аналізували компоненти ефірних олій.

Приготування розчинів для аналізу *амінокислот і карбонових кислот* у сировині та сухих екстрактах: 0,2/0,1 г, відповідно, відважували в мірну колбу та екстрагували метанолом (10 мл) в УЗ-бані при кімнатній температурі ( $20 \pm 2$  °С) протягом 15 хв. Отриманий розчин центрифугували 10 хв при 5000 об/хв при 25 °С. Кількість 500 мкл супернатанту випарювали під газоподібним азотом до сухого залишку. Отриманий осад розчиняли в 100 мкл ацетонітрилу та 100 мкл MTBSTFA. Цей розчин нагрівали при 100°C протягом 2,5 год на гліцериновій бані. Потім 1 мкл досліджуваного розчину вводили в газовий хроматограф.

Приготування *стандартних розчинів амінокислот*. 100 мкл стандартної суміші L-амінокислот (Sigma-Aldrich, Литва) відбирали та сушили під газоподібний азот до сухого залишку, потім додавали 100 мкл ацетонітрилу та 100 мкл MTBSTFA. Отриманий розчин нагрівали при 100 °С протягом 2,5 год на гліцериновій бані.

Приготування *стандартних розчинів органічних кислот*. Базовий розчин включав стандарти: молочну (концентрація 242 мкг/мл), гліколеву (379 мкг/мл) і яблучну кислоти (758 мкг/мл). Стандартні розчини (n=3) готували при концентраціях молочної: 242, 121, 60,5, 30,25, 15,13 мкг/мл; гліколевої: 379, 189,5, 94,75, 47,38, 23,69, 11,84 мкг/мл і яблучної кислот: 758, 379, 189,5, 94,75, 47,38, 23,69, 11,84 мкг/мл. Концентрації молочної, гліколевої та яблучної кислот у кожному розчині підтримувалися наступним чином: 15,13, 11,84, 11,84 мкг/мл відповідно.

Приготування розчинів з сировини ірисів для аналізу *метилових естерів жирних кислот*: 50,0 мг сировини поміщали у флакон на 2.0 мл додавали внутрішній стандарт (розчин 50,0 мкг тридекану в гексані) і 1,0 мл метилюючого агента (14%  $\text{BCl}_3$  в метанолі, Supelco 3-3033). Суміш витримували в герметично закритому флаконі 8 год при 65°C. У цей час жирну олію було повністю екстраговано та гідролізовано до її складових жирних кислот, а також проведено їх метилювання. Реакційну суміш зливали з осаду рослинної сировини і розбавляли 1,0 мл дистильованої води. Метиліві естери екстрагували 0,2 мл метиленхлориду, ретельно перемішували кілька разів протягом години, потім отриманий екстракт хроматографували.

#### 2.4.3.2 Умови хроматографування, валідація

Умови ВЕРХ-УФ-ДМД для визначення апокаротиноїдів, фенольних сполук та колхіцину. Аналіз проводили за допомогою системи Shimadzu Nexera X2 LC-30AD (Shimadzu, Японія), яка складається з дегазатора в режимі онлайн, четвертинного насоса, автосамплера SIL-30AC (Shimadzu), термостата СТО-20AC (Shimadzu), контролера температури колонки та діодно-матричного детектора SPD-M20A (DAD). Хроматографічне розділення сполук проводили за допомогою колонки ACE C18 (250 мм × 4,6 мм, 5,0 мкм; Пенсильванія, США). Елюювання проводили зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Бінарна система розчинників рухомої фази складалася з розчинника А (0,1% оцтової кислоти у воді) і розчинника Б (ацетонітрилу). Температура колонки була постійною і становила 25°C. Аліквоту 10 мкл екстрактів двічі автоматично вводили в ВЕРХ.

Для аналізу фенольних сполук застосована система лінійного градієнту: 0-8 хв, 5-15% В; 8-30 хв, 15-20% В; 30-48 хв, 20-40% В; 48-58 хв, 40-50% В; 58-65 хв, 50% В; 65-66 хв, 50-95% В. Хроматограми записували при 269 нм.

Для аналізу апокаротиноїдів використовували систему лінійного градієнта: 0 хв – 95% А і 5% Б, 7 хв – 95% А і 5% Б, 67 хв – 0% А і 100% Б, 69 хв – 95% А і 5% Б, 75 хв – 95% А і 5% В. Хроматограми записували при 260, 310 та 440 нм для пікрокроцину, шафраналю та кроцинів. Вміст пікрокроцину розраховували за вмістом шафраналю за формулою:  $\text{площа піку пікрокроцину} / \text{площа піку шафраналю} \times \text{концентрація шафраналю (мкг/г)} \times 330,37 \text{ г/моль (молекулярна маса пікрокроцину)} / 150,21 \text{ г/моль (молекулярна маса шафраналю)}$ .

Для ідентифікації колхіцину використовували градієнтне елюювання: 0-8 хв, 5-15% В; 8-30 хв, 15-20% В; 30-48 хв, 20-40% В; 48-58 хв, 40-50% В; 58-65 хв, 50%; 65-66 хв, 50-95% В. Хроматограми записували при 350 нм. Базовий розчин колхіцину готували шляхом розчинення стандарту колхіцину (номер CAS 64-86-8; чистота  $\geq 95\%$ ) у 50% метанолі (Sigma-Aldrich GmbH, Швейцарія) з концентрацією розчину в діапазоні 0,83-106,8 мкг/мл.

Хроматографічні умови для *методу УЕРХ-МС*. Розділення компонентів зразків проводили за допомогою системи ACQUITY H-class UPLC (Waters, Milford, MA, USA), оснащеної ACQUITY UPLC BEH C18 (50 × 2,1 мм, розмір частинок 1,7 мкм) (Merck Millipore, Німеччина). Градієнтне елюювання проводили 0,1% водним розчином мурашиної кислоти (розчинник А) і ацетонітрилом (розчинник В), швидкість потоку 0,5 мл/хв. Пропорції системи розчинників були застосовані з використанням профілю лінійного градієнта В: початкові 5%, 3 хв. 30%, 7 хв. 50%, 7-8 хв. 95%, 15-16 хв. 5%. Потрійний квадрупольний мас-спектрометричний детектор Xevo TQD (Waters) використовувався для отримання даних MS/MS. Позитивна іонізація електророзпиленням застосовувалася з наступними налаштуваннями: капілярна напруга становила 1,5 кВ, температура колонки – 150 °С, температура десольватації – 350 °С, з потоком газу десольватації 650 л/год, конусний потік газу – 25 л/год. Енергія зіткнення та напруга конуса були оптимізовані для кожної сполуки окремо. Енергія зіткнення змінювалася в діапазоні від 6 еВ до 20 еВ, а напруга на конусі вибиралася від 8 В до 38 В.

Умови ВЕРХ-аналізу *тритерпенових сапонінів*. Розділення сполук проводили за допомогою системи Waters e2695 Alliance HPLC у поєднанні з детектором 2998 PDA (Waters, Milford, MA, USA) на колонці ACE Super C18 (250 мм × 4,6 мм, 3 мкм) (Великобританія), рухома фаза складалася з ацетонітрилу і води (89:11), швидкістю потоку 0,7 мл/хв в ізократичному режимі. Температуру колонки – 15 °С з об'ємом ін'єкції 10 мкл. Хроматограми записували при довжині хвилі 205 нм. Кількісну оцінку проводили методом зовнішнього стандарту.

*Ідентифікація піків і пік чистоти*. БАР ідентифікували шляхом порівняння часів утримування ( $R_t$ ) контрольних сполук. Чистоту піку перевіряли за допомогою детектора з діодною матрицею шляхом порівняння УФ-спектрів кожного піку зразку зі спектрами стандартних сполук (табл. А.7, рис. А.1, А.2, Додатки). УФ-спектри піки маркерних-сполук порівнювали зі спектрами еталонних сполук та/або шляхом оцінки спектрів MS/MS (табл. А.8, Додатки).

Кількісне визначення вмісту речовин проводили за стандартними калібрувальними кривими, для цього готували стандартні розчини різної концентрації (табл. А.9, Додатки). Концентрацію сполуки в ЛРС/екстракті розраховували (мг/г) за формулою 2.3:

$$X \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{S \times m_{st} \times V}{S_{st} \times m \times V_{st}} \quad (2.3)$$

де  $S$  – середня площа піків сполуки, розрахована за паралельними хроматограмами розчину зразка;

$S_{st}$  – середня площа піків стандарту, розрахована за паралельними хроматограмами стандартного розчину;

$m$  – маса наважки сировини, г;

$m_{st}$  – маса стандарту, мг;

$V$  – об'єм мірної колби досліджуваного екстракту, мл;

$V_{st}$  – об'єм мірної колби дослідних сполук, мл.

*Процедури валідації.* Методики ВЕРХ були валідовані згідно з рекомендаціями ІСН [25]. Визначали параметри: межу кількісного визначення (LoQ), межу виявлення (LoD), лінійність, точність, повторюваність, специфічність, прецизійність [260]. Діапазон лінійності відповідей стандартів був отриманий з використанням десяти рівнів концентрації з двома ін'єкціями для кожного рівня (табл. А.8, Додатки). Для побудови калібрувальних кривих вихідні розчини розбавляли до серії відповідних концентрацій. Усі калібрувальні криві записували з використанням розчинів еталонних сполук з об'ємом ін'єкції 2,2 мкл. Робочий розчин з найменшою концентрацією розбавляли метанолом до різних концентрацій. Потім ці розчини використовувалися для визначення LoD і LoQ при співвідношенні сигнал/шум (S/N) 3 і 10 для кожної сполуки.

Параметри LoD та LoQ розраховували за формулами (2.4):

$$\text{LoD} = 3,3 * (\sigma)/S \text{ і } \text{LOQ} = 10 * (\sigma)/S; \quad (2.4)$$

де  $\sigma$  – стандартне відхилення відгуку, кут нахилу S-калібрувальної кривої.

Повторюваність оцінювали шляхом аналізу шести повторів кожного препарату. Основні площі піків двох повторних хроматограм використовували для розрахунку відносного стандартного відхилення (RSD) (табл. А.10, Додатки).

Умови *ВЕРХ-АВТС* аналізу з післяколонковою дериватизацією. Використана модульна система розділення Waters Alliance 2695 (Waters, Мілфорд, США), оснащена Waters 2487 UV/VIS і Waters 996 PDA діодно-матричний детектор (DAD). Розділення сполук проводили за допомогою колонки ACE C18 (250 мм × 4,6 мм, 5,0 мкм) із захисним картриджем YMC ODS-A (3,0 мкм, 10 мм × 4,0 мм). Система розчинників рухомої фази включала: розчинник А (0,1% оцтової кислоти у воді) і розчинник В (ацетонітрил). Застосовували наступну програму лінійного градієнту: 0–8 хв, 5–15% В; 8–30 хв, 15–20% В; 30–48 хв, 20–40% В; 48–58 хв, 40–50% В; 58–65 хв, 50%; 65–66 хв, 50–95% В. Об'єм введеного розчину зразка становив 20 мкл. Після виявлення PDA розчин АВТС змішували з рухомою фазою, що містить аналіти в реакційній спіралі. Для аналізу даних використовували Empower Software Chromatographic Manager System (Waters Corporation, Мілфорд, США). Післяколонкові хроматограми АВТС виявляли на довжині хвилі 650 нм за допомогою детектора Waters 2487 UV/VIS (Waters Corporation). Для складання калібрувальних кривих використовували стандартний антиоксидант тролокс (0,3995 мкмоль/г) [261]. Для вираження антиоксидантної активності використовували еквівалентну антиоксидантну здатність тролоксу (ТЕАС). Значення було розраховано як мкмоль тролокс-еквіваленту (ТЕ) на 1 г сухої маси (DM) ЛРС за такою формулою 2.5:

$$\text{ТЕАС} = c \times V/m \text{ (мкмоль/г)}, \quad (2.5)$$

де  $c$  – концентрація тролоксу в мкмоль, встановлена за калібрувальною кривою,  $V$  – об'єм екстракту рослинного матеріалу, л,  $m$  – наважка, г.

Хроматографічне розділення *терпеноїдів, карбонових кислот та амінокислот* проводили з використанням системи SHIMADZU GC-MS-QP2010 і капілярною колонкою Rxi-5 ms (Restek Corporation, Bellefonte, США) (30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм) з рідкою нерухомою фазою (5% дифенілу і 95% полісилоксану) і газом-носієм гелієм. Температура інжектора – 260°C. Умови мас-

спектрометричного детектора (енергія електронів 70 eV): температура потоку іонів 200°C, температура інтерференції 280°C, швидкість сканування, діапазон сканування мас-спектрів від  $m/z$  29 до 500 а.е.м. з часом сканування маси 0,2 сек.

Умови ГХ-МС *аналізу терпеноїдів* в оцвітині к. посівного: початкова температура колонки 50°C, температура межі розділу 280°C. Об'єм ін'єкції становив 5 мкл, а коефіцієнт розподілу – 10. Температуру поступово підвищували від 50°C (підтримували протягом 5 хв, потім підвищували) до 200°C при 2°C/хв, а потім від 200°C до 315°C при 15°C/хв і підтримувати протягом 1 хв. Загальний час аналізу однієї проби становить 98 хв.

Умови ГХ-МС аналізу *амінокислот і карбонових кислот*. Температуру колонки становила 75°C і її підтримували протягом 5 хв, а потім підвищували на 10°C/хв до 290 °C, потім на 20°C/хв до 320°C і, витримували при цій температурі 5 хв. Ін'єкцію проводили в режимі спліттер 1:20 при 260 °C з об'ємом ін'єкції 1 мкл. Швидкість потоку колонки становила 1,5 мл/хв, тиск 100 кПа, загальна швидкість потоку: 34,4 мл/хв. Загальна тривалість аналізу – 41 хв. Валідаційні характеристики методики визначення амінокислот наведено у таблицях А.11-А.14 (Додатки). ГХ-МС хроматограма розподілу стандартної суміші амінокислот, що використано у аналізі, наведено на рисунку А.3 (Додатки).

Аналіз *метилових естерів жирних кислот* (для видів ірисів) проводили методом ГХ-МС на хроматографі 5973N/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США) [262, 263] з використанням капілярної колонки HP-INNOWAX (30 м×250 мкм×0,50 мкм), рухлива фаза – гелій, швидкість потоку газу – 1,2 мл/хв. Аліквоту 2,0 мкл проводили в режимі без поділу потоку протягом 0,2 хв. Температура нагрівача уведення проби – 250°C. Температура термостата програмується від 50 до 250 °C зі швидкістю 4 град/хв.

Компоненти ефірної олії, амінокислоти та карбонові кислоти ідентифікували шляхом порівняння з базою даних (NIST14, NIST14s, WR10, WR10R) мас-спектрів сполук, аналізуючи іони, характерні для мас-спектрів та часу утримання стандартів. 4-аміномасляну кислоту кількісно визначали в еквівалентах глютамінової кислоти. Вміст карбонових кислот розраховували та виражали в еквіваленті молочної

кислоти; вміст 2-аміномасляної кислоти,  $\gamma$ -аміномасляної кислоти та L-аспарагінової кислоти перераховували на глютамінову кислоту; вміст  $\beta$ -аланіну розраховували через L-аланін; і L-триптофан розраховували через L-пролін. Вміст речовин розраховували щодо внутрішнього стандарту.

Для оцінки ненасиченості жирних кислот розраховували індекс подвійних зв'язків (DBI) за формулою 2.6 [264]:

$$DBI = \frac{\sum P_j \times n_j}{100}, \quad (2.6)$$

де  $P_j$  – вміст кожної ненасиченої РК (%);  $n_j$  – число подвійних зв'язків у молекулі.

Коефіцієнт ненасиченості (K) розраховували як відношення сумарного вмісту ненасичених (UFA) кислот до насичених (SFA) за формулою 2.7:

$$K = \frac{\sum UFA}{\sum SFA}, \quad (2.7)$$

Активність ацил-ліпідних  $\omega 9$ ,  $\omega 6$  і  $\omega 3$  мембранних десатураз, що каталізують введення подвійних зв'язків у вуглецеві ланцюги олеїнової (C18:1), лінолевої (C18:2) та ліноленої (C18:3) кислот, визначали як стероїл- (SDR), - (ODR) та лінолеїл- (LDR) десатуразні відносини, які розраховували як вміст (% від суми ЖК) компонентів C18, відповідно до формул 2.8:

$$\begin{aligned} SDR & & ODR & & LDR & & (2.8) \\ = \frac{(C_{18:1})}{(C_{18:0} + C_{18:1})}; & = \frac{(C_{18:2} + C_{18:3})}{(C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3})}; & = \frac{(C_{18:3})}{(C_{18:3} + C_{18:2})}; \end{aligned}$$

де C18:0, C18:1, C18:2 та C18:3 – відсотковий від суми кислот вміст стеаринової, олеїнової, лінолевої та ліноленої кислот, відповідно.

#### 2.4.4 Одержання рослинних сухих екстрактів для досліджень активності *in vitro* та *in vivo*

Попередньо всі зразки ЛРС подрібнювали із застосуванням рідкого азоту при зниженому тиску. Отриману подрібнену ЛРС використовували для приготування сухих екстрактів для фармакологічних дослідів.



*Сухі екстракти з приймочок та БЦ к. посівного* готували методом мацерації дистильованою водою та 70% етанолом. Подрібнений порошок шафрану (5 г) мацерували гарячою водою або 70% етанолом (500 мл, 80°C, 24 год × 2) в темному місці, екстракт фільтрували. Подрібнені БЦ крокусу заливали водою або 70% етанолом кімнатної температури (18–20°C) (100 г, 1 л, 24 год × 3).

*Сухі екстракти з листя, оцвітини к. посівного* готували методом екстракції на водяній бані при 100 °C (100 г, 1 л, 60 хв × 3) або 70% етанолом при кімнатній температурі (100 г, 1 л), 60 хв × 3).

*Сухі екстракти з кореневищ та листя і. угорського, і. сибірського, і. строкатого.* готували методом екстракції дистильованою водою або 70% етанолом на УЗ бані при 45 °C (100 г, 1 л, 60 хв × 3).

Всі процеси екстракції для сировини повторювали тричі. Отримані витяги об'єднували, концентрували на роторному випарнику («Heidolph 2 WB есо, Laborata400effective», Німеччина). Після цього екстракти заморожували в морозильній камері при температурі –20 °C і поміщали в ліофілізатор (Christ Gamma 1-16 LSC) до повного висихання екстрактів.

*Одержання полісахаридних комплексів з ЛРС.* Водні екстракти з сировини готували як зазначено вище, фільтрували, упарювали до 1/5 вихідного об'єму. Полісахариди осаджували потрійним об'ємом 96% етанолу. Утворений осад відділяли, промивали 70% етанолом, ліофільно висушували. Вихід полісахаридів для приймочок та листя крокусу були дуже низькими, тому їх не було включено у дослідження. Всі отримані сухі екстракти зберігали при 4°C для хімічних та фармакологічних досліджень.

#### 2.4.5 Загальна процедура експерименту виділення речовин та встановлення їх будови

Для виділення речовин кореневища і. угорського (2,5 кг) подрібнювали, мацерували в 15,0 л 95% (об./об.) нагрітого до кипіння водного етанолу (EtOH) у перколяторі протягом 24 год, потім екстракт зливали, а сировину заливали

повторно 10 л 70% етанолом та проводили екстракцію УЗ-обробкою при температурі 40°C впродовж 8 год. Екстракцію повторювали двічі, отримані витяги об'єднували та концентрували за допомогою роторного-випаровувача до густого екстракту. Концентрований екстракт (850,0 г) суспендували хлороформом, а потім етилацетатом та бутанолом. Кожен витяг випарювали при зниженому тиску насухо, отримані залишки (25,6 г для хлороформного; 54,0 г для етилацетатного; 50,2 для бутанольного екстракту), адсорбували на силікагелі (40–63 мкм) і потім хроматографували (силікагель, Si 60, 40–63 мкм), елюювали градієнтом суміші хлороформ – метанол, у різних співвідношеннях. Розмір фракції становив 50 мл. Було отримано двадцять одну об'єднану фракцію (Fr. p1–Fr. p21). Фракції концентрували та аналізували методом ТШХ та ВЕРХ на склад фенольних сполук. Етапи виділення речовин із кореневищ і. угорського наведена на схемі 2.1.

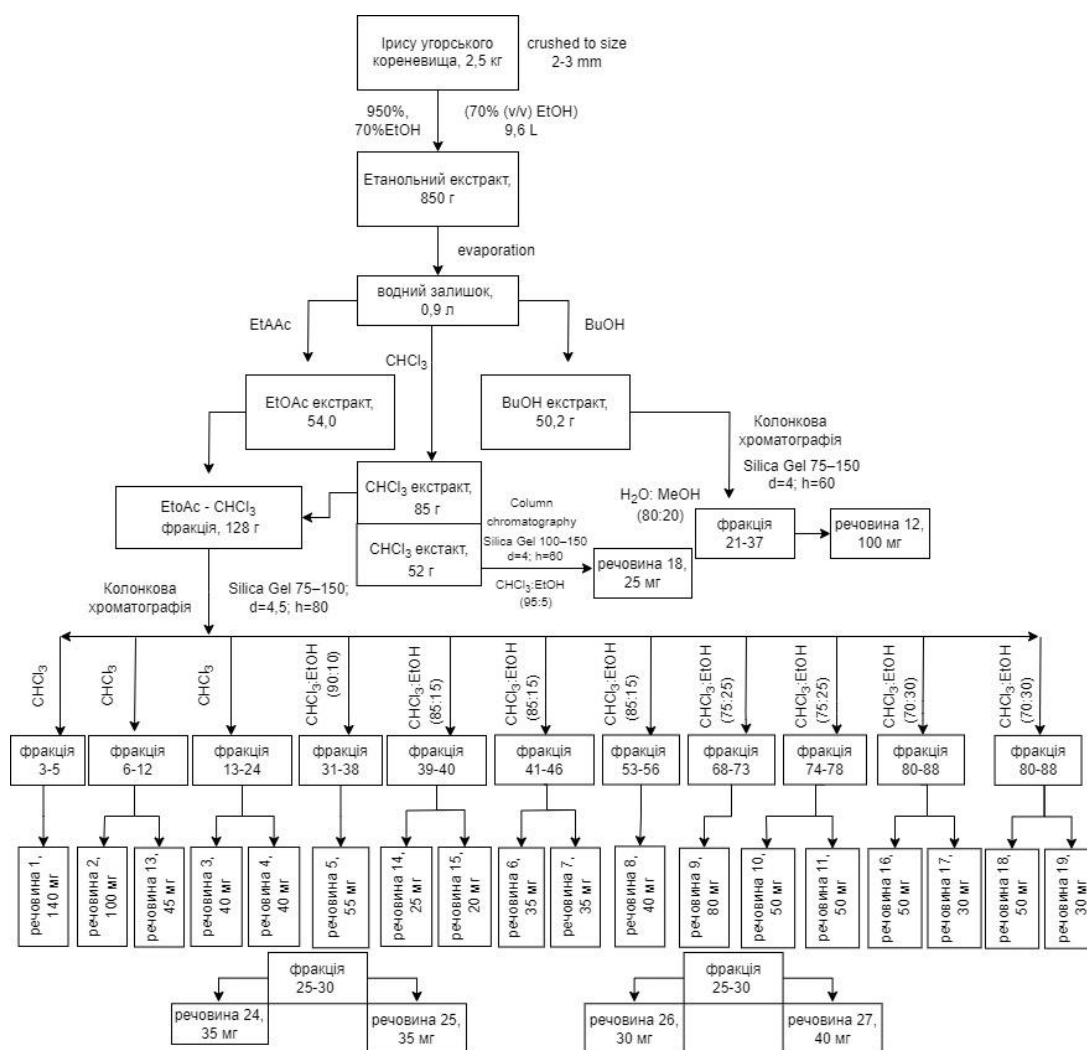


Схема 2.1 Екстракція та хроматографічне фракціонування екстракту кореневищ і. угорського

Для виділення індивідуальних сполук з оцвітини к. посівної (2 кг сировини) застосовували аналогічний підхід поділу їх суми на колонці з силікагелем та препаративну хроматографію в декількох системах розчинників з подальшою дробовою кристалізацією виділених сполук. Отриману суму поліфенольних сполук (730,0 г) поступово екстрагували хлороформом, етилацетатом та бутанолом. Отримані витяги, упарювали на окремо наносили на колонку з сорбентом силікагелем. Екстрагували послідовно хлороформом та етанолом з підвищенням концентрації останнього. Колонку переглядали в УФ-світлі, спостерігали чіткі зони поділу сполук на сорбенті, збирали окремі фракції. Процес елюювання контролювали хроматографією на папері в системах БУВ (4: 1: 5) та 15% оцтова кислота. Однакові фракції об'єднували, розчинник відганяли, речовини перекристалізовували з метанолу та етанолу.

Для встановлення структури виділених речовин використовували фізико-хімічні методи аналізу. Спектри ЯМР  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  записували на спектрометрах Bruker Avance (400 МГц) та Varian Mercury-VX-200 (200 МГц) відповідно мас-спектри реєстрували на мас-спектрометрі FTIRMS Orbitrap (500 МГц). TMS використовувався як внутрішній стандарт. ГХ-МС аналіз сполук проводили на приладі Agilent 1100 HPLC з діодною матрицею та мас-селективними детекторами (Agilent LC-MSD SL), колонці Zorbax SB-C18 (4,6 × 15 мм) і на Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 × 150 мм, 3,5 мкм) з хімічною іонізацією при атмосферному тиску. Препаративну обернено-фазову ВЕРХ проводили протягом 10 хв на апараті Agilent 1260 з УФ-детектором при 254 нм, використовуючи колонку Waters SunFire C18, 5 мкм, 19 мм × 100 мм; швидкість потоку: 30 мл/хв.; 8-80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  у  $\text{H}_2\text{O}$ .

УФ-спектри записували на спектрофотометрі 60S UV-Visible, Thermo Scientific (США) в етанолі. ІЧ-спектри записували на спектрофотометрі Tensor 27 UR-20. Колонкову хроматографію (CC) проводили на силікагелі 60А (об'єм пор: 0,5-0,7 мл/г; питома поверхня: 450-600 м<sup>2</sup>/г, 80-100 меш, Китай). ТШХ проводили на пластинах силікагель 60F<sub>254</sub> Merck, Silufol UV254. Сполуки виявляли за характерною флуоресценцією в УФ-світлі при довжині хвилі 365 і 254 нм до і після парів амонію, 2% спиртового розчину  $\text{AlCl}_3$ . Температуру плавлення (°C)

визначали на блоці Кофлера. Перекристалізацію виділених речовин проводили в 96% етанолі з додаванням 2 – 3 крапель води. Субстанції сушили у вакуумі (10-2 мм рт. ст.) над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> при 110 – 115°C протягом 5 год. Додаткові відомості, загальні експериментальні процедури та спектроскопічні дані ізольованих сполук наведено на рисунках А.4–А.38 та у таблицях А.15–А.19 (Додатки). Чистота сполук становила 95-98,0% за даними ВЕРХ, ЯМР, ТШХ і аналізу точки плавлення.

*СОП одержання пікрокроцину та кроцинів (trans-4GG, trans-2G, trans-3Gg) з шафрану.* 100 мг сировини екстрагували 50% метанолом (10 мл) на УЗ-бані при кімнатній температурі протягом 15 хв. Після екстракції екстракти центрифугували, а супернатант ліофілізували при зниженій температурі –25 °С і під зниженим тиском протягом ночі (Liofilizator, Telstar lyoquest, НТ 40, Portugal). Отриманий ліофілізат використовували для препаративного виділення пікрокроцину та похідних кроцину методами ВЕРХ та УЕРХ (рис. А.39–А.46, Додатки).

#### 2.4.6 Методи передпосівного впливу: холодна плазма та монокомпонентне живлення

*К. посівний.* Дослідження проведені на базі кафедри біохімії, факультет природничих наук, Університет Вітаутаса Великого (Литва) при консультуванні проф. Віди Мілдажене. Польовий дослід проводили на ділянках БС Університету Вітаутаса Великого (координати 54.868567, 23.911813). За чотири дні до посадки БЦ к. посівного обробляли фізичними стресорами: холодною плазмою під низьким тиском протягом 3 і 5 хв (CP3 і CP5); з вакуумом – 3 хв (Vacuum3), і електромагнітним полем – 5 хв (EMF5). БЦ крокусу опромінювали холодною плазмою за допомогою нетермічного плазмового приладу низького тиску конструкції проф. К. Кога та проф. М. Шіратані (Університет Кюсю, Японія) за методикою [265, 266]. Контрольні та оброблені БЦ (по 24 БЦ на кожну групу) висаджували в добре окультурений суглинний ґрунт у 3 ряди на початку осені 2020 р., на глибину 10 см, зберігаючи відстань 20 см між БЦ, 20 см між рядами однієї групи обробки та 45 см відстані між різними групами обробки. Дослідні

ділянки зрошували вручну двічі в перші два тижні після посіву з метою зменшення впливу літньої посухи. Підживлення не вносилося.

Динаміку сходів БЦ крокусів спостерігали та реєстрували через добу протягом 32 днів після появи першого паростка та фіксували у вигляді графіків Річардса [267]. Морфометричні показники вимірювали через два тижні після появи перших паростків. Вимірювали висоту надземної частини рослини, підраховували середню кількість пророслих бруньок на БЦ та середню кількість листків на одну бруньку, починаючи з 34-го до 56-го дня після садіння. Трихоми рахували на абаксильній стороні листа з метою оцінити можливу реакцію зростаючої рослини на стрес, викликаний обробкою БЦ відповідно до [266]. Квітки відбирали вручну, після морфометричних вимірювань, приймочки відокремлювали та сушили 2–3 год при 50 °С у сушарці. Висушену сировину зберігали в темних скляних банках при 4 °С. Сировину використовували для ВЕРХ аналізу на фенольні сполуки та апокаротиноїди, СФ аналізу на загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів.

*Сорти Ірисів.* Дослідження монокомпонентного живлення ірисів проведені на території НБС ім. Н.Н. Гришка НАН України у 2019–2020 рр. під час вегетації *Iris hybrida* cv. «Цікавинка» (Правдивий Б.Р., 2011) Рег. № 411-00027, *I. hybrida* cv. «Тамбо» (Чорногуз А.Р. 2009) № 411-00343, *I. hybrida* cv. «Widcombe Fire» (Тейлор Дж. Д. Р., 1965) Рег. № 411-00030. Площа ділянок під дослідом і контролем становила 3 м<sup>2</sup> кожна. Кількість зразків ірисів у групі становила 141 і 138 сортів з підживленням і контролем відповідно. Для додаткового кореневого живлення (I декада квітня) використовували розчин сірководневого магнію сульфату (Mg 16%, S 32%, з розрахунку 12 г/м<sup>2</sup> на об'єм 5 л). У період бутонізації рослин проводили позакореневе мінеральне підживлення хелатом заліза (склад, г/л: Fe 32; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 32; K<sub>2</sub>O – 32, 30 мл препарату на 10 л води), хелатом калію (вміст розчиненої речовини K<sub>2</sub>O в розчині 77%, рН – 14,1, 50 мл на 10 л води). Через 10 – 12 днів проводили позакореневе мінеральне підживлення на початку фази цвітіння (I декада травня). Рослини на контрольних ділянках не мали додаткового живлення. Аналіз проб ґрунту проводили на усереднені дослідні та контрольні проби. Зразки ґрунту,

надземної частини та кореневища *I. hybrida* відбирали в період масового цвітіння (I декада червня). Для СФ та ВЕРХ аналізів використовували суху сировину.

#### 2.4.7 Фармакологічні методики визначення активності зразків та індивідуальних речовин

##### 2.4.7.1 Прогнозування біологічної активності *in silico*

*Віртуальний скринінг* БАР з листя к. посівного проводили методом молекулярного стикування (Molecular Docking) з використанням програмного пакету SCIGRESS (Fujitsu, Фукуока, Японія (ліцензія 742F6852C191)). Усі структурні формули речовин були розроблені за допомогою програмного забезпечення ISIS DRAW 4.0 і збережені у вигляді файлів .mol. Структури були імпортовані в програмне забезпечення SCIGRESS і збережені у форматі .csf. Додалися атоми водню. Оптимізацію структури проводили методом ММ3. Рентгенівські кристалічні структури білків були отримані з Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Були додані атоми водню та проведена оптимізація структури. Із структури видаляли воду та гетероатоми. Нативний ліганд видаляли з активного центру після його ідентифікації. Дослідження стикування проводили за допомогою швидкого квантового молекулярного стикування (жорсткий рецептор і гнучкий ліганд). Розраховані бальні функції досліджуваних речовин порівнювали з отриманими для нативного ліганду. Молекули води були видалені, а атоми водню були додані до кристалічної структури білків перед стикуванням. Остаточне уточнення (мінімізація енергії) присвоєння заряду та стану протонування було проведено за допомогою прогонів силового поля ММ3 [420].

*Аналіз ChemGPS-NP* – це інструмент, заснований на аналізі головних компонентів (PCA), який описує комплексний і біологічно відповідний хімічний простір [268]. Оцінки цих основних компонентів (осі PC1, PC2 і PC3) були отримані шляхом введення SMILES (ChemBioDraw 17.0 або PubChem) 18 виділених і контрольних фенольних сполук у систему ChemGPS-NP [269, 270].

Створено оригінальну базу даних протигрипозних та ентеровірусних препаратів (табл. А.20–А.22, Додатки). Препарати, класифіковані на кілька груп, включають протигрипозний H1N1 на різних стадіях клінічної розробки (жовті точки, джерела включають базу даних ChemBL [271, 272], інгібітори нейрамінідази (помаранчеві крапки) або протиентеровірусні препарати на різних стадіях клінічної розробки (зелені крапки [273]. Усі препарати у відповідних групах перераховані у допоміжній таблиці Excel за збільшенням балу PC1.

#### 2.4.7.2 Фармакологічні дослідження *in vitro*

*Ліпідно-краплинний аналіз, нейрамінідазна активність, NRF-2 активність* проведені на базі Інституту натуральних продуктів, Фармацевтичний коледж, Медичний університет Гаосюн, Гаосюн 80708, Тайвань при консультуванні доктора Чіа-Хунг Єн. Аналіз ліпідних крапель проводили шляхом обробки клітин Huh7 олеїною кислотою, кон'югованою з BSA, відповідно до методики [274]. Оцінювали активність репортерних клітин NRF2 *in vitro* [275]. Лінія клітин HaCaT/ARE (елемент антиоксидантної відповіді) була розроблена з використанням стабільної клітинної лінії HaCaT, що несе фрагмент, отриманий з плазмиди pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] та репортерного гена люциферази luc2P. Результати наведено у таблиці А.23 (Додатки).

*Оцінку цитотоксичної активності in vitro* проводили на базі Литовського університету наук про здоров'я (м. Каунас, Литва) під керівництвом проф. Вільми Петрікайте. Лінія клітин раку меланоми людини (IGR39), лінія клітин потрійного негативного раку молочної залози людини (MDA-MB-231) і лінії клітин гліобластоми людини (U-87) були отримані з Американської колекції типових культур (ATCC, Манассас, Вірджинія, США). Клітини вирощували в середовищі DMEM Glutamax (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Для оцінки життєздатності клітин, їх обробляли рослинними екстрактами, і їхню життєздатність визначали методом МТТ (Sigma-Aldrich Co.), як описано в роботі [276]. Клітини піддавалися впливу різних концентрацій досліджуваних екстрактів (від 1 мг/мл до 31,25 мкг/мл для

сухих водних та спиртових екстрактів, та від 1 мг/мл до 15,56 мкг/мл для полісахаридних комплексів), а після вимірювання поглинання розчину формозану EC<sub>50</sub>, при якій 50% його максимальна відповідь) були розраховані значення.

Визначення антибактеріальної активності проводили на базі Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України (м. Харків, Україна) під керівництвом с.н.с., к.б.н. Осолодченко Т. П. Визначення антимікробної активності сухих рослинних екстрактів проводили методом дифузії в агар та методом серійних розведень. У відповідності до рекомендацій ВООЗ використовували наступні тест – штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885-653. Детальні умови дослідження описані у роботах [277, 278]. Для дослідження антибактеріальних властивостей відібраних екстрактів використовували метод серійних розведень з визначенням мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) екстрактів, що характеризує бактеріостатичні властивості об'єктів дослідження. Концентрація речовин складала 1000 мкг/мл; 500 мкг/мл; 250 мкг/мл; 125 мкг/мл; 62,5 мкг/мл. Результати наведено у таблицях А.24 – 27 (Додатки).

Оцінка протівірусної активності *in vitro* проведена на кафедрі біохімії та молекулярної біології, Медичний коледж, Університет Чанг Гун, Тайвань, під консультуванням проф. Джим-Тонг Хорнг. Інформація щодо клінічного штаму ентеровірусу та вірусів грипу наведена у роботі [279]. Клітини MDCK використовували для інфікування вірусом грипу А, а клітини RD використовували для інфікування ентеровірусу D68. І клітинні лінії, і віруси були отримані з Американської колекції типових культур (ATCC EC<sub>50</sub> розраховували за методом Ріда–Мюнха як концентрацію сполуки, яка здатна інгібувати цитопатичний ефект вірусу на 50 % [280]. Середню цитотоксичну концентрацію (CC<sub>50</sub>) розраховували за методом Ріда–Мюнха на основі концентрації сполуки, відповідальної за 50% загибелі клітин, з використанням МТТ-аналізу. Дані наведено у таблиці А.28 (Додатки).



*Аналіз активності нейрамінідази in vitro.* Було використано бакуловірус, що демонструє нейрамінідазу NA9 на поверхні (NA9-Вас) як псевдотипований вірус грипу. *Аналіз на коронавірус 229Е in vitro:* захисну дію зразків на клітини Huh7, інфіковані коронавірусом людини 229Е (HCoV-229), визначали, як описано раніше [281]. *Оцінка протизапальної активності in vitro* проведена на базі Науково-технологічного університету Чанг Гун, Таоюань 33302, Тайвань при консультуванні проф. Цонг-Лонг Хван. Нейтрофіли, отримані від здорових людей-донорів (схвалені інституційною комісією з огляду в Меморіальній лікарні Чанг Гун), були виділені за допомогою стандартного методу, як описано [282]. Інгібування супероксиддисмутази (СОД) вимірювали за зниженням вмісту ферицитохрому *c*, як описано раніше [283, 284]. Вивільнення еластази вимірювали за дегрануляцією азурофільних гранул [285]. Геністеїн служив позитивним контролем для обох аналізів. Клітини активували 100 нМ fMLF і 0,5 мкг/мл СВ, і зміни поглинання при 405 нм постійно відстежували для моніторингу вивільнення еластази. Результати виражали як % початкової швидкості вивільнення еластази в fMLF/СВ-активованій системі контролю без дослідного розчину (табл. А.29, Додатки).

*Оцінка протиалергійної активності методом in vitro* проведена на кафедрі біотехнології, Коледж наук про життя, Медичний університет Гаосюн, Тайвань сумісно з доктором Міхал Корінек при консультуванні проф. Б.-Х. Чен. Для вимірювання можливих токсичних ефектів зразків на клітини RBL-2H3 використовували аналіз метилтіазолтетразолію [286], експеримент проводили, як описано раніше [287]. Аналіз активності  $\beta$ -гексозамінідази використовувався для визначення ступеня дегрануляції, індукованої А23187 [288, 289] та антигеном [287], у клітинах RBL-2H3. Результати наведено у таблиці А.30 (Додатки).

#### 2.4.7.3 Фармакологічні дослідження *in vivo*

*Дослідження протизапальної активності in vivo* екстрактів оцвітини та БЦ к. посівного проведені на базі ННТЦ МБД НФаУ під керівництвом директора

ННПФ, к.фарм.н., доц. Д. В. Литкіна. Первинний скринінг ексудативної дії водних екстрактів (у дозі 25 мг/г) на моделі карегенінового набряку у щурів, були проведені на кафедрі нормальної та патологічної фізіології НФаУ під керівництвом к.фарм.н., доц. Шаталова О. М. (табл. А.31 Додатки).

Екстракти-лідери за результатами фітохімічних досліджень, що включені у дослідження протизапальної дії: об'єкт №1 – водний екстракт з БЦ к. посівного; об'єкт №2 – етанольний екстракт з БЦ к. посівного (70%); об'єкт №4 – етанольний екстракт з оцвітини к. посівного; об'єкт №5 – водний екстракт з оцвітини к. посівного. Дослідження протизапальних властивостей проводили на моделях гострого ексудативного запалення стопи у щурів, викликаного зимозаном, гістаміном та карагеніном [290]. Гостре ексудативне зимозанове, гістамінове та карагенінове запалення стопи у щурів викликали шляхом субплантарного введення у стопу правої задньої лапи 0,1 мл 2% суспензії зимозану (НВО «Біолар», Латвія), 0,1% розчину гістаміну («Fluka», Швейцарія), 1% роз-ну карагеніну («Sigma-Aldrich», США). Результати наведено у таблицях А.32-33 (Додатки).

У дослідження були включені безпородні білі щури [291], які були вирощені у віварії ННПФ НФаУ і перед початком експерименту проходили акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань протягом 7-и днів. Усі дослідження були проведені на 108 статевозрілих щурах-самцях з масою тіла 160–180 г. Утримання тварин відповідало діючим правилам по пристроях, обладнанню та утриманню віваріїв. Тварини отримували стандартне харчування відповідно до діючих норм [292]. З тваринами поводитись згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986 р) [293].

Досліджувані зразки вводили внутрішньошлунково у дозі 200 мг/кг одноразово в день експерименту за 1 год до введення флогогену. За розвитком набряку спостерігали у динаміці після ініціювання зимозаном та гістаміном протягом 3 год (початковий стан, 0,5 1, 2, 3), після введення карагеніну – 5 год (початковий стан, 1, 2, 3, 4, 5). Ефективність зразків оцінювали за пригніченням

розвитку набряку кінцівки у порівнянні з тваринами групи КП і між групами, які отримували різні екстракти.

Результати представляли як різницю об'ємів стопи в момент вимірювання і його вихідним значенням, які визначали за допомогою плетизмометра (PanLab LE7500, Spain), у мл. Для інтегральної оцінки ефективності застосування досліджуваних об'єктів при даній патології розраховували показник їх антиексудативної активності (АЕА,%) за формулою 2.8:

$$АЕА = ((\Delta V_k - \Delta V_d) / \Delta V_k) * 100\%, \quad (2.8),$$

де АЕА – антиексудативна активність, показник пригнічення розвитку запалення у дослідних тварин порівняно з тваринами групи КП, %.

$\Delta V_d$  і  $\Delta V_{kp}$  – різниця між об'ємом лікованої і не лікованої стопи в дослідній і в контрольній групах, відповідно, мл.

Проект плану з доклінічного вивчення фармакологічних властивостей указаних об'єктів був схвалений комітетом з біоетики НФаУ (протокол №5 від 25.03.2021 р.). Дослідження проведені відповідно до методичних рекомендацій [294] і Наказів МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. та № 95 від 16.02.2009 р., з дотриманням вимог Належної лабораторної практики [295, 296].

Також проведено визначення гострої токсичності екстрактів-лідерів при внутрішньошлунковому введенні мишам (в дозах – 150 мг/кг, 200 мг/кг, 500 мг/кг, 5000 мг/кг, 10000 мг/кг і 15000 мг/кг) та внутрішньоочеревинному введенні щурам (в дозах – 10 мг/кг, 100 мг/кг, 1000 мг/кг, 3000 мг/кг і 5000 мг/кг).

#### 2.4.8 Розробка параметрів стандартизації сировини к. посівного

Методики визначення числових показників якості ЛРС (вміст суми екстрактивних речовин, вміст золи загальної, втрату в масі при висушуванні, визначення мікробіологічної чистоти, випробування на вміст важких металів) проведені відповідно до вимог ДФУ [243]. Для проведення дослідження було взято 8 серій шафрану, які на 2018 рік були доступні в Україні, а саме: зразки серії № 1 – 5 було заготовлено з смт. Любимівка, Херсонська обл., Україна (2016-

2018), зразки серії № 6–8: Марокко (м. Талуїдин, 2017); Азербайджан (м. Апшерон, 2017); Іспанія (м. Ла-Манш, 2017). Окремо проведено визначення параметрів стандартизації листя, оцвітини, БЦ к. посівного з Херсону, Україна.

Стандартизація включала морфолого-анатомічні дослідження ЛРС, що вивчали й описували за загальноприйнятими методами і вимогами ДФУ [297, 298], використовували мікроскопи МБІ-6, РВ-2610 (збільшення 15X10, 15X40) і фотокамери Samsung PL50, Nikon XP.

Ідентифікація (ТШХ). Для аналізу шафрану використовували методику ідентифікації кроцинів, що наведена у ЄФ 9.0 за статтею «Ідентифікація С» [299]: наважку сировини (0,01 г) розтирали у ступці та додавали 0,05 мл води *P*. Через 3 хв додавали 1 мл метанолу *P*, та витримували 20 хв у захищеному від світла місці та фільтрували. Хроматографування проводили на пластинках Merck 60 F<sub>254</sub>, в системі розчинників вода *P* – 2-пропанол *P* – етилацетат *P* (10:25:65). Як розчин порівняння використовували 5,0 мг нафтол-жовтого *S R* та 5 мг Суданового червоного *G R*, що розчиняли у 5 мл метанолу *P*. Отримані хроматограми висушували на повітрі, після чого переглядали за денного світла (Виявлення А), потім переглядали пластинки в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм (Виявлення В). Виявлення С: пластинку обприскували анісового альдегіду розчином *P*, нагрівали за температури 100 – 105°C протягом 5 – 10 хв і переглядали за денного світла.

Для кількісного визначення БАР дослідження використано методику вимірювання оптичного поглинання випробовуваного водного розчину шафрану при 440 нм з ЄФ 9.0 за статтею «Випробовування. Інтенсивність забарвлення» [299] та методику ISO 3632 [15, 16] оцінки вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцину зі статті «Визначення основних характеристик методом УФ-Вид-спектроскопія» у водному розчині приймочок крокусу. Умови описано у підрозділі «2.4.1.2. Спектрофотометричні методики визначення кількісного вмісту БАР». Результати наведено у таблицях А.34-А.40 (Додатки).

#### 2.4.9 Статистичні та кореляційні методи

Статистичні розрахунки отриманих результатів були виконані відповідно до монографії ДФУ 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту<sup>N</sup>», використовуючи програмне забезпечення Microsoft Office Excel 7.0. 2007, 2010 та базового пакету програм «Statistica 6». Обробку даних ВЕРХ проводили за допомогою LabSolutions Analysis Data System (Shimadzu). Статистичний аналіз проводили за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим множинним порівнянням Тьюкі з використанням Prism v.5.04 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA, хімічна частина), за допомогою тесту Даннета (GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США, протиалергічний аналіз) або t-тест Стьюдента (SigmaPlot, Systat Software Inc., Сан-Хосе, Каліфорнія, США, протизапальний тест). Значення з  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$  вважалися статистично значущими. Результати виражали як середнє значення  $\pm$  SD ( $n=3$ ) (хімічний аналіз) або S.E.M (фармакологічні аналізи). Отримані дані *in vivo* представляли як середнє значення і його помилку ( $M \pm m$ ). Порівняння між експериментальними групами проводили за допомогою непараметричного методу Крускала-Уолліса і критерію Манна-Уїтні. Відмінності між дослідницькими групами вважали статистично значущими при  $p<0,05$ .

Відмінності між зразками визначали за допомогою тесту багаторазового порівняння Тьюкі. Кореляція Спірмена була використана для розрахунку зв'язку між компонентами накопичення в зразках шафрану та параметрами середовища. Значення факторів «Середня температура», «Кількість опадів», «Сонячна постійна» та «Тип ґрунту» були перетворені у відповідні категоріальні змінні. Проведено ієрархічний кластерний аналіз. Отримані дендрограми базувалися на міжгрупових співвідношеннях з квадратом евклідових відстаней. Аналіз основних компонентів (РСА) проводили з використанням відносних кількостей конкретних фітохімічних речовин у відсотках від загального вмісту.

### РОЗДІЛ 3

## ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ВПЛИВ ЕКОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ НА КОМПОЗИЦІЙНИЙ СКЛАД ШАФРАНУ. ОБГОВОРЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ШАФРАНУ

### 3.1 Порівняльна характеристика зразків шафрану з різних країн світу відповідно до вимог ISO 3632

На першому етапі було проведено дослідження зразків шафрану з різних країн світу за допомогою УФ/Вид спектроскопії відповідно до стандарту ISO 3632 для порівняння з українськими зразками. Для оцінки впливу різних факторів на показники якості шафрану сформовано дві групи зразків:

- 1) зразки з різних країн світу у порівнянні з українськими. В цю групу було включено зразки з (Херсон, Миколаїв), що першими сертифікувались на відповідність стандарту ISO 3632 (табл. 3.1);
- 2) зразки з різних регіонів України у порівнянні з зарубіжними зразками належної якості. У другу групу для проведення порівняльного аналізу включено 35 зразків шафрану з 12 регіонів України, врожаїв 2015 – 2021 рр. (табл. А.41, Додатки).

Стандарт ISO 3632 встановлює чотири колірні градації в залежності від інтенсивності забарвлення: I, II, III (вища якість) і IV (низька якість).

Проаналізовані зразки українського шафрану мають темно-червоний колір, терпкий смак та специфічний аромат, приймочки довжиною 1,5 – 2,0 см, трубчасті, переплутані, поодинокі або сидячі на коротких стовпчиках, на дистальному кінці мають зубчастий край.

Одним з важливих показників, що відносять шафран до різних категорій якості, є вміст вологи та летких речовин (показник – Втрата в масі при висушуванні). Як показали результати досліджень, вміст вологи та летких речовин у всіх зразках зарубіжного шафрану становив менше 12% (табл. 3.1), що відповідає вимогам ISO 3632. За цим параметром всі зразки були віднесені до I

категорії. Для українських зразків шафрану показник втрати маси при висушуванні та золи загальної становив від 6,7 – 9,2% до 4,3 – 6,4%, відповідно. Ці значення, як і у зарубіжних зразків нижче встановлених допустимих норм 12% та 7% (табл. А.3, Додатки), відповідно, та дозволяють віднести їх до категорії I незалежно від місця та року заготівлі.

Основним показником якості є вміст апокаротиноїдів, що забезпечує колір та смак шафрану. Результати вмісту пікрокроцину, шафраналю і кроцинів у зарубіжного шафрану наведено в таблиці 3.1 відповідно до вимог ISO3632. Згідно з отриманими результатами, зразки шафрану з Італії та України (Херсон) показали високий вміст кроцину ( $A_{1\text{ см}}^{1\%} 440\text{ нм}$  у діапазоні від 248 до 258). Було відмічене широкий діапазон значень вмісту кроцину, і ця кількість сильно відрізняється залежно від походження зразків. Два зразки шафрану з Індії мали однакові значення кількості кроцину ( $A_{1\text{ см}}^{1\%} 440\text{ нм}$  46 і 30 для Утар-Прадеш і Махараштра, відповідно).

І це був найменший вміст кроцинів серед усіх зразків. Дещо вищий вміст кроцинів був у зразку з Апшерону, Азербайджан ( $A_{1\text{ см}}^{1\%} 440\text{ нм}$  49), однак і цей вміст не відповідав категорія якості. Зразки з Італії, України (Херсон), Швейцарії, Австралії та Марокко показали найвищий вміст кроцину в шафрані. Слід зазначити, що всі ці регіони відрізняються родючими ґрунтами і сприятливим кліматом.

Значущий вплив на склад компонентів шафрану мають фактори навколишнього середовища, а також спосіб вирощування, сушіння та зберігання. Як правило, шафран з Ірану та Іспанії має дуже високу якість спецій [301]. У нашому випадку ми тестували зразки, куплені в магазині або на ринках. Пакети були добре марковані, вказано виробника та рік випуску. Однак умови транспортування та зберігання не відомі. Ймовірно, саме ці фактори вплинули на те, що вміст кроцинів у досліджуваних нами зразках з Ірану та Іспанії був не найвищим. Розподіл зразків відповідно до категорії ISO 3632 наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.1

Якісні характеристики зразків шафрану з різних країн світу за ISO 3632, n=3, ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

№	Країна (місто, регіон)	Втрата в масі при висушуванні, W, %	$A_{1cm}^{1\%}$ Пікрокроцин	$A_{1cm}^{1\%}$ Шафраналь	$A_{1cm}^{1\%}$ Кроцин	Категорія
1	Марокко (Таліудин)	$2,33 \pm 0,01$	$94,15 \pm 1,17$	$37,20 \pm 0,54$	$209,35 \pm 3,52$	I
2	Іспанія Кастилія (Ла-Манш)	$8,01 \pm 0,18$	$78,22 \pm 1,32$	$56,25 \pm 1,03$	$133,30 \pm 2,17$	II
3	Іран (Хоросан)	$6,38 \pm 0,25$	$81,34 \pm 1,05$	$49,16 \pm 0,05$	$178,50 \pm 2,48$	II
4	Індія (Уттар-Прадеш)	$4,02 \pm 0,01$	$60,05 \pm 1,10$	$39,05 \pm 0,55$	$46,10 \pm 0,61$	-
5	Україна (Херсон)	$7,52 \pm 0,18$	$90,05 \pm 1,45$	$38,12 \pm 0,54$	$248,10 \pm 4,31$	I
6	Україна (Миколаїв)	$11,67 \pm 0,26$	$90,60 \pm 1,60$	$31,24 \pm 0,21$	$185,16 \pm 3,25$	II
7	Індія (Махараштра)	$3,51 \pm 0,02$	$76,11 \pm 1,28$	$45,15 \pm 0,62$	$30,17 \pm 0,50$	-
8	Азербайджан (Апшерон)	$7,02 \pm 0,15$	$58,17 \pm 1,05$	$38,22 \pm 0,55$	$49,25 \pm 0,05$	-
9	Іран (Неішбор)	$3,70 \pm 0,02$	$88,04 \pm 1,25$	$43,25 \pm 0,61$	$195,11 \pm 2,95$	I-II
10	Німеччина (Альтенбург)	$7,43 \pm 0,25$	$62,10 \pm 1,10$	$45,31 \pm 0,61$	$195,10 \pm 2,94$	I-II
11	Швейцарія (Мунд)	$6,52 \pm 0,28$	$77,16 \pm 1,30$	$58,02 \pm 1,05$	$214,05 \pm 3,84$	I
12	Італія (Ломбардія)	$5,05 \pm 0,02$	$95,03 \pm 1,12$	$59,41 \pm 1,06$	$258,16 \pm 4,43$	I
13	Марокко (Маррокеш)	$2,75 \pm 0,05$	$91,21 \pm 1,13$	$51,04 \pm 0,80$	$147,42 \pm 2,47$	II
14	Австралія (Тасманія)	$4,54 \pm 0,01$	$74,10 \pm 1,31$	$45,06 \pm 0,61$	$205,32 \pm 3,50$	I
15	Литва (Каунас)	$6,52 \pm 0,02$	$56,10 \pm 1,05$	$45,11 \pm 0,63$	$158,38 \pm 2,85$	III



## Класифікація зарубіжних зразків шафрану відповідно до ISO 3632

Параметр якості	Зразки відповідно до категорії		
	I	II	III
	13 зразків	5 зразків	1 зразок
$A_{1cm}^{1\%}$ 257 нм, пікрокроцин	74,1 – 95,03 (min 70): Марокко, Іспанія, Італія, Іран, Індія, Афганістан, США, Австралія	56,10 – 62,10 (min 55): Індія, Азербайджан, Німеччина, Литва	0 (min 40)
$A_{1cm}^{1\%}$ 330 нм, шафраналь	39,05 – 59,41 (20–50): Іспанія, Іран, Індія, Німеччина, Італія, Швейцарія, Литва, Австралія, Афганістан, Марокко	32,98 – 33,05 (20–50): Марокко, Індія, Азербайджан, Афганістан, США	0 (20–50)
$A_{1cm}^{1\%}$ 440 нм, кроцини	195,1 – 258,16 (min 190): Іспанія, Іран, Німеччина, Італія, Швейцарія, Австралія, Афганістан, Марокко, США	178,5 (min 150): Іран	147,42 – 158,38 (min 110): Марокко, Литва

Примітка. Значення кроцинів менше 110: 30,17 – 49,25 (Індія, Афганістан) не підпадає під жодну категорію.

Результати кореляційного аналізу вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцину за результатами визначення методом УФ/Вид показали певну різницю між значеннями (рис. 3.1). Склад компонентів змінювався в 15 зразках, де кожне число з тривимірної згрупованої діаграми розсіювання відповідає порядковому номеру відповідного зразка в таблиці А.42 (Додатки). Що стосується зразків українського шафрану ми проводили порівняння накопичення компонентів по роках та по регіонах. Крім того, для порівняння результатів дослідження було використано дані літератури різних країн [73-75, 78, 81-82], а також отримані дані для зарубіжних зразків шафрану. На рисунку 3.2 наведені спектри отриманих водних розчинів українського шафрану різних років заготівлі для оцінки динаміки накопичення кроцинів по роках.

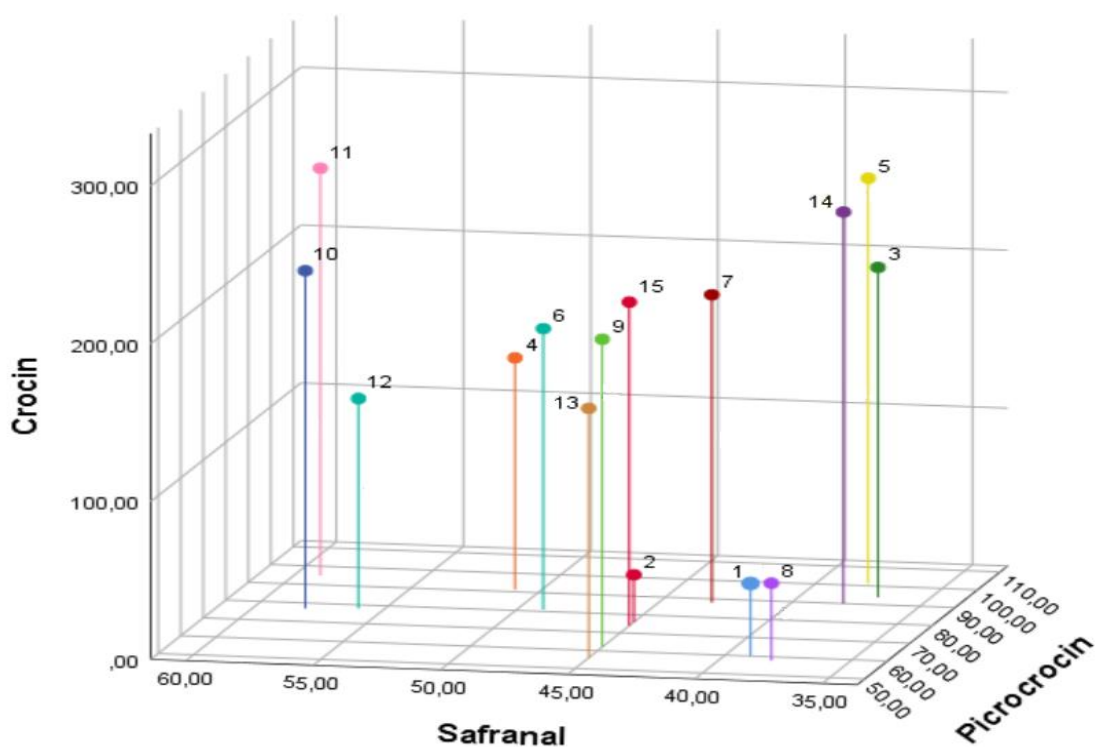


Рис 3.1 Згрупована тривимірна діаграма розділення вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцинів у зразках шафрану методом УФ/Вид спектрофотометрії.

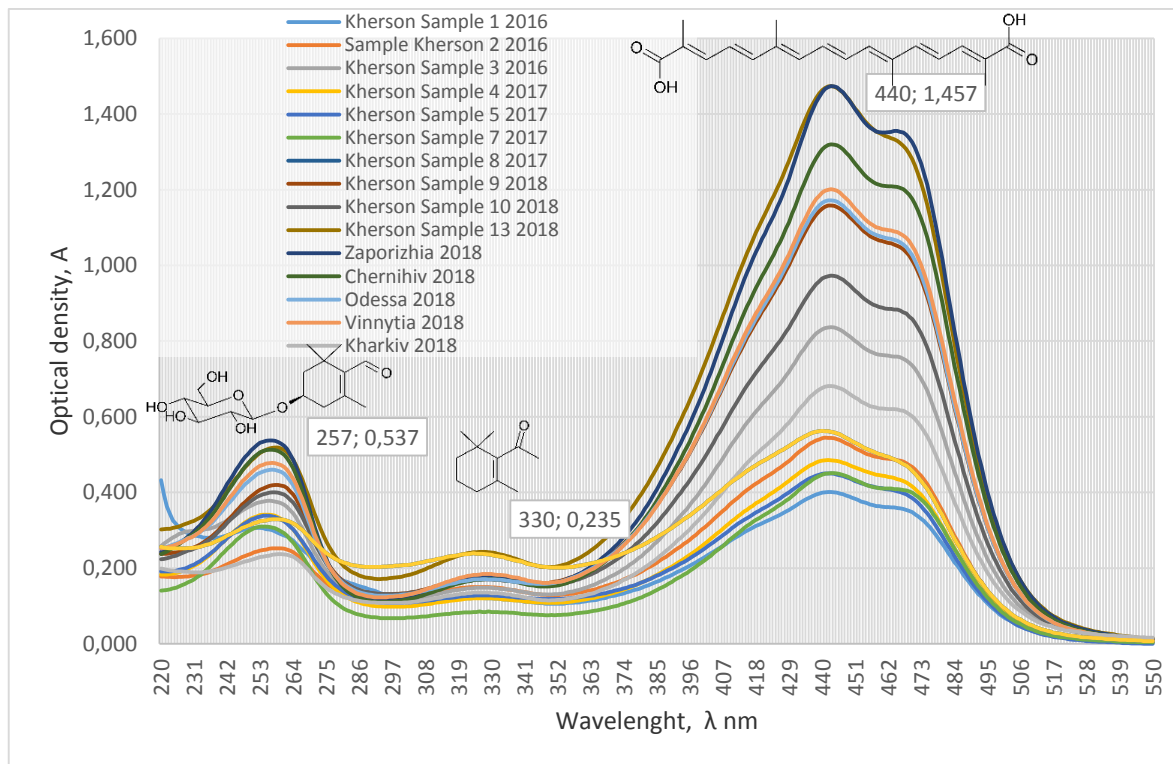


Рис. 3.2 Типові спектри поглинання водних екстрактів українського шафрану за стандартом ISO 3632

Як видно з рисунку, вміст кроцинів у зразках з Херсону поступово збільшується з кожним наступним роком врожаю незалежно від регіону. Це узгоджується з загальноприйнятими відомостями про те, що якість шафрану збільшується з кожним наступним роком та досягає найвищої точки між 3 – 4 роками збору при сприятливих кліматичних умовах. У таблиці 3.3 наведено порівняльні дані щодо вмісту кроцину, пікрокроцину та шафраналю у зразках шафрану 2018 року з різних регіонів України.

Таблиця 3.3

**Якісні характеристики зразків шафрану (врожай 2018 року) з України відповідно до ISO 3632,  $n=3$ , ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ) методом UV-Vis (повні дані для всіх регіонів та років наведено у табл. А.41, Додатки)**

Регіон України / точне місце зростання	$A_{1cm}^{1\%}$ 257 нм Пікрокроцин	$A_{1cm}^{1\%}$ 330нм Шафраналь	$A_{1cm}^{1\%}$ 440нм Кроцин
Херсон, Любимівка	90,01 ± 1,06	42,20 ± 0,16	254,05 ± 4,46
Харків, Харків	88,05 ± 1,12	50,04 ± 0,05	254,17 ± 4,05
Запоріжжя, Матвіївка	96,14 ± 1,10	32,16 ± 0,02	262,26 ± 4,05
Чернігів, Кладьківка	101,05 ± 1,15	34,10 ± 0,15	258,03 ± 4,15
Миколаїв, Заїчівське	90,60 ± 1,60	21,24 ± 0,21	185,16 ± 3,25
Одеса, Андрусів	96,02 ± 1,12	35,15 ± 0,03	243,22 ± 1,02
Вінниця, Красносілка	92,05 ± 1,15	35,03 ± 0,04	228,03 ± 0,07
Хмельницький, Волочиськ	68,42 ± 1,12	21,12 ± 0,22	181,65 ± 3,16
Волинська, Борочиче	30,45 ± 0,54	95,10 ± 1,10	253,10 ± 4,36
Закарпаття, Медведівці	102,30 ± 1,15	36,12 ± 0,64	218,35 ± 3,84
Суми, Костянтинівка	89,47 ± 1,32	28,46 ± 0,35	272,51 ± 4,70
Чернівці, Горішні Шерівці	84,25 ± 1,20	30,84 ± 0,22	225,44 ± 4,05
Італія [310]*	95,10 ± 0,02	59,32 ± 0,08	259,13 ± 0,05

Примітка. \* - зразок наведено для порівняння даних

Вміст пікрокроцину ( $A_{1cm}^{1\%}$  257 нм) у більшості зразків шафрану варіював від 90 у Херсоні до 101 у зразку з Чернігова, вибивався з загальної картини зразок з Волині; вміст шафраналю ( $A_{1cm}^{1\%}$  330 нм) становив від 34 для Чернігова до 42 у Херсонському зразку; вміст кроцинів ( $A_{1cm}^{1\%}$  440 нм) 228 у Вінниці до 262 у Запоріжжі. Зразки з Херсону та Чернігова за вмістом кроцинів  $A_{1cm}^{1\%}$  440 нм становить 254 – 258 є більш за інші та знаходяться на рівні із зразком з Італії (вміст

кроцінів  $A_{1cm}^{1\%}$  440 нм становить 259). За вмістом шафраналю українські зразки дещо поступаються комерційному зразку, а за вмістом пікрокроцину знаходяться на рівні або перевищують. Різні значення між регіонами України та комерційним зразком зазвичай обумовлені різними умовами навколишнього середовища та практиками вирощування. Результати вмісту кроцину, шафраналю та пікрокроцину методом УФ/Вид для у зразках шафрану з 18 регіонів України з 2016 по 2021 роки збору сировини наведені у таблиці А.41 (Додатки). Відповідність українських зразків шафрану категоріям якості ISO 3632 наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

### Класифікація українських зразків шафрану за категоріями якості ISO 3632

Параметр якості	Зразки відповідно до категорії		
	I	II	III
	29 зразків	5 зразків	1 зразок
$A_{1cm}^{1\%}$ 257 нм, пікрокроцин	75–96 (min 70)	54–72 (min 55)	83 (min 40)
$A_{1cm}^{1\%}$ 330 нм, шафраналь	28–90 (20–50)	21–41 (20–50)	24 (20–50)
$A_{1cm}^{1\%}$ 440 нм, кроцини	196–285 (min 190)	172–190 (min 150)	139 (min 110)

Як видно, переважну кількість зразків, заготовлених в Україні віднесено до I категорії, що свідчить про належну якість і гарні перспективи вирощування цієї культури в нашій країні. Аналіз основних компонентів (кроцин, пікрокроцин, шафраналь) водних екстрактів шафрану виявив чітку диференціацію зразків, що належать до різних категорій якості (I – III), але показав поганий розподіл відповідно до географічного походження. Подальший ВЕРХ аналіз допомог виявити точний вміст компонентів та визначити вплив географічного положення на їх накопичення.

### 3.2 Порівняльне дослідження вмісту фенольних сполук та речовин-маркерів (апокаротиноїдів) методом ВЕРХ

Для порівняльного аналізу вмісту БАР нами було відібрано зразки шафрану з країн з різним кліматом для подальшого встановлення можливих закономірностей щодо впливу екологічних факторів на накопичення вторинних

метаболітів. За походженням, зразки шафрану можна розподілити між Азією, Європою, Австралією та Північною Америкою. З українських зразків як і у попередньому порівняльному дослідженні було використано зразки з Херсону та Миколаєва, якість яких була в середньому співставною з такою для іноземних зразків. Також ми вирішили для об'єктивності взяти зразки з різних категорій: I – Херсон, II – Миколаїв (табл. 3.1).

### 3.2.1 Розробка методики хроматографічного визначення фенольних сполук та апокаротиноїдів у шафрані

Оскільки завданням запланованого дослідження була не стандартизація, а порівняльне дослідження вмісту речовин, для зменшення похибки визначення та об'єктивізації результатів слід було досягти максимального вилучення речовин в процесі пробопідготовки.

Для підбору оптимального методу вилучення БАР зі шафрану застосовували три різні методи подрібнення сировини в процесі (табл. 3.5) – без пробопідготовки, з подрібненням відповідно до рекомендацій ДФУ та з подрібненням з застосуванням рідкого азоту. До різних методів подрібнення ми вдалися, оскільки при стандартному подрібненні в умовах методик ДФУ за рахунок присутності ліпофільних речовин утворювались маслянисті аналіти, незручні для подальших маніпуляцій. Використання методу подрібнення рослинної сировини у рідкому азоті здалось нам найбільш придатним для вирішення цієї проблеми. Для цього рослинну тканину заморожували у рідкому азоті і потім подрібнювали, використовуючи ступку та товкач. При цьому утворювалась крихка порошкоподібна маса, зручна для приготування аналітичних розчинів. Для оцінки вилучення речовин-маркерів (кроцини, пікрокроцин і шафраналь) використовували метод ВЕРХ. Для коректності оцінки застосовували різну пробопідготовку для зразків шафрану з 5 різних регіонів України. Згідно з отриманими результатами (табл. 3.5) при застосуванні методу подрібнення у рідкому азоті вилучення кроцинів значно збільшується (у

3,5 рази порівняно зі звичайним подрібненням, а пікрокроцину та шафраналю істотно не змінюється.

Таблиця 3.5

**Результати вмісту сполук (мг/г) для трьох різних методів пробопідготовки**

Зразок шафрану з регіону	Пікрокроцин	Кроцин	Шафраналь
Сировина без подрібнення			
Херсон	12,53 ± 0,35	120,36 ± 0,72	2,00 ± 0,04
Одеса	11,79 ± 0,35	114,72 ± 0,37	2,84 ± 0,10
Чернігів	14,36 ± 0,19	124,17 ± 0,21	1,63 ± 0,02
Вінниця	11,63 ± 0,30	106,45 ± 0,23	1,26 ± 0,03
Запоріжжя	14,52 ± 0,22	148,83 ± 0,17	1,19 ± 0,04
Звичайна техніка подрібнення відповідно до ДФУ			
Херсон	12,90 ± 0,41	145,03 ± 0,15	2,12 ± 0,10
Одеса	11,99 ± 0,25	160,38 ± 0,49	2,47 ± 0,07
Чернігів	15,25 ± 0,27	180,55 ± 0,92	1,66 ± 0,06
Запоріжжя	16,31 ± 0,52	116,20 ± 0,53	1,27 ± 0,08
Вінниця	11,96 ± 0,28	109,20 ± 0,83	1,36 ± 0,03
Подрібнення в рідкому азоті			
Херсон	19,74 ± 0,19	177,90 ± 1,03	2,52 ± 0,07
Одеса	18,01 ± 0,51	154,50 ± 1,02	2,03 ± 0,05
Чернігів	16,79 ± 0,30	225,99 ± 0,95	1,75 ± 0,03
Вінниця	16,86 ± 0,28	136,15 ± 0,52	1,27 ± 0,03
Запоріжжя	20,71 ± 0,47	205,04 ± 0,96	1,31 ± 0,02

Встановлено, що метод подрібнення також впливає на вилучення кроцинів з ЛРС. Так, вихід кроцину в зразку шафрану з Херсона зріс від 145,03 мг/г за використання звичайного способу подрібнення сировини до 177,90 мг/г зразка шафрану за технології подрібнення у присутності рідкого азоту (табл. 3.5) вірогідно завдяки низькому вмісту вологи. Таким чином, волога може каталізувати процес деградації (гідролізу) кроцину в кроцетині, також спричиняючи знебарвлення шафранового порошку, колір обернено пропорційний вмісту вологи.

Через міцність на розтягування целюлози та інших полісахаридів, що становлять клітинну стінку, цей метод виявився найшвидшим і найефективнішим способом доступу до рослинних білків та ДНК.

Оскільки методика, запропонована для визначення вмісту речовин у зразках шафрану також була змінена у порівнянні з використовуваною раніше, було проведено її валідацію. Для оцінки валідності оригінальної ВЕРХ-методики використовували вісім стандартних концентрацій стандартних речовин. Усі отримані калібрувальні криві показали хороші результати в межах перевірених концентрацій. Сильна лінійна залежність підтверджується коефіцієнтами кореляції калібрувальної кривої, які є близькими до 1 ( $>0,999$ ) (табл. А.9, Додатки).

Межі виявлення фенольних речовин та апокаротиноїдів за цією методикою становили від 3,82 до 120 нг/мл, а межі кількісного визначення – від 10 до 360 нг/мл. Точність відповідала вимогам прийнятності, отримані значення повторюваності були в діапазоні 98,20 – 101,53%, а проміжна точність становила 98,02 – 102,45%. Значення точності середніх значень концентрацій стандартних сполук виражені у відсотках і наведені в таблиці А.10 (Додатки).

Повторюваність, проміжну точність і відтворюваність точності перевіряли з використанням стандартних розчинів трьох концентрацій (низької, середньої та високої), з трьома повторами в кожному випадку. Отримані результати підтвердили точність методу. Значення коефіцієнта варіації повторюваності методу ВЕРХ для площі піку не перевищують 1,29%, проміжної точності не перевищують 1,16%, а відтворюваності не перевищують 1,07%. Ідентифікація основних сполук у досліджуваних розчинах базувалася на порівнянні часів утримування піків та УФ-спектрів компонентів на хроматограмах досліджуваних екстрактів з відповідними даними стандартних розчинів (табл. А.7 Додатки).

### 3.2.2 Ідентифікація БАР у зразках шафрану

В результаті проведеного аналізу в зразках шафрану були ідентифіковані 4 фенольні кислоти, 9 флавоноїдів (рис. 3.3, табл. 3.6), 4 апокаротиноїди та 2 альдегіди (рис. 3.4, табл. 3.6). Усі глікозильовані апокаротиноїди елюються між 25 та 37 хв та мають гарне розділення (рис. 3.4).

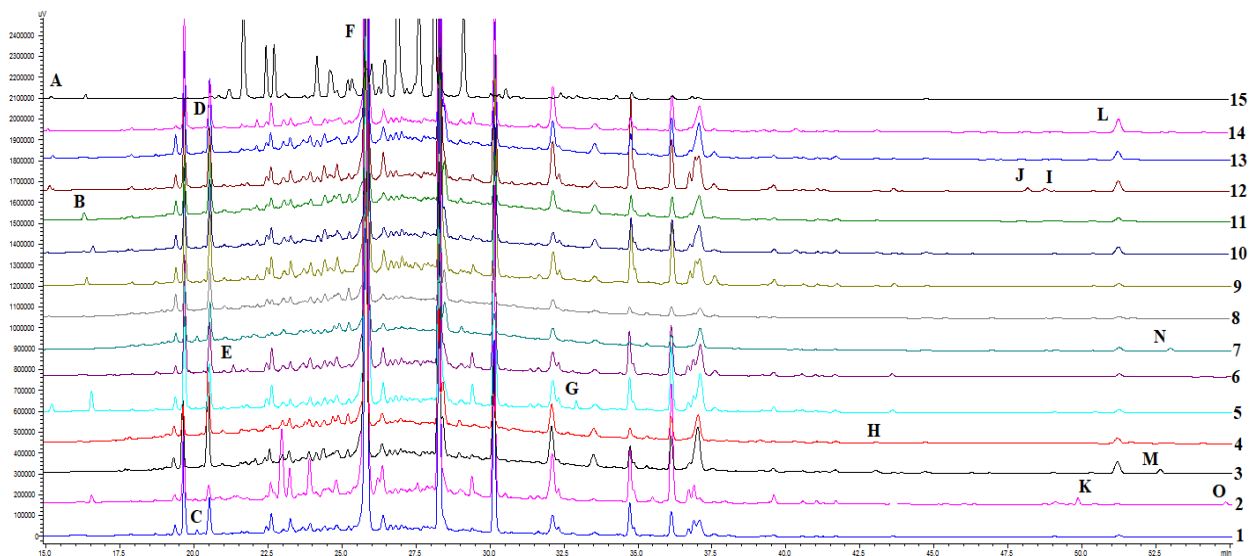
Таблиця 3.6

## Якісний скринінг сполук у зразках шафрану (власні та літературні дані)

Н	Походження шафрану	Хлорогенова кислота	Кофейна кислота	<i>p</i> -Кумарова кислота	Ферулова кислота	Рутин	Апігенин-7-О-глюкозид	Лютеолін	Апігенин	6,7-Дигідроксифлаванон	Кемферол	7-Гідроксифлаванон	Формононети	Біоханін А	Кроцини ( <i>t</i> - 4GG; <i>t</i> - 2G; <i>c</i> - 4GG; <i>c</i> - 3Gg)	Шафраналь	Пікроцин
1	Марокко (Толуїдин)			+		+				+	■				+	+	+
2	Іспанія (Кастілья Ла - Манча)		+			+		+			+	+		+	+	+	+
3	Іран (Хоросан)				+	+		+		+	■	+			+	+	+
4	Індія (Утгар-Прадеш)				+	+	+	+		+	■				+	+	+
5	Україна (Херсон)	+	+			+	+								+	+	+
6	Україна (Миколаїв)				+	+		+	+						+	+	+
7	Індія (Махараштра)			+		+	+	+	+	+	■		+		+	+	+
8	Азербайджан (Апшерон )				+	+				+	+				+	+	+
9	Іран (Найшбор)		+		+	+		+		+	■				+	+	+
10	Німеччина (Альтенбург)		+		+	+				+	■				+	+	+
11	Швейцарія (Мунд)		+		+	+				+					+	+	+
12	Італія (Ломбардія)	+	■	■	+	+		+	+	+	■				+	+	+
-	Італія (Чивітаретенга) [93]	■	■												■		
-	Італія (Morgex) [303, 304]			■													
13	Марокко (Марракеш)	+			+	+			+		■				+	+	+
14	Австралія (Тасманія)	+				+		+	+				+		+	+	+
15	Литва (Каунас)	+	+			+	+								+	+	+

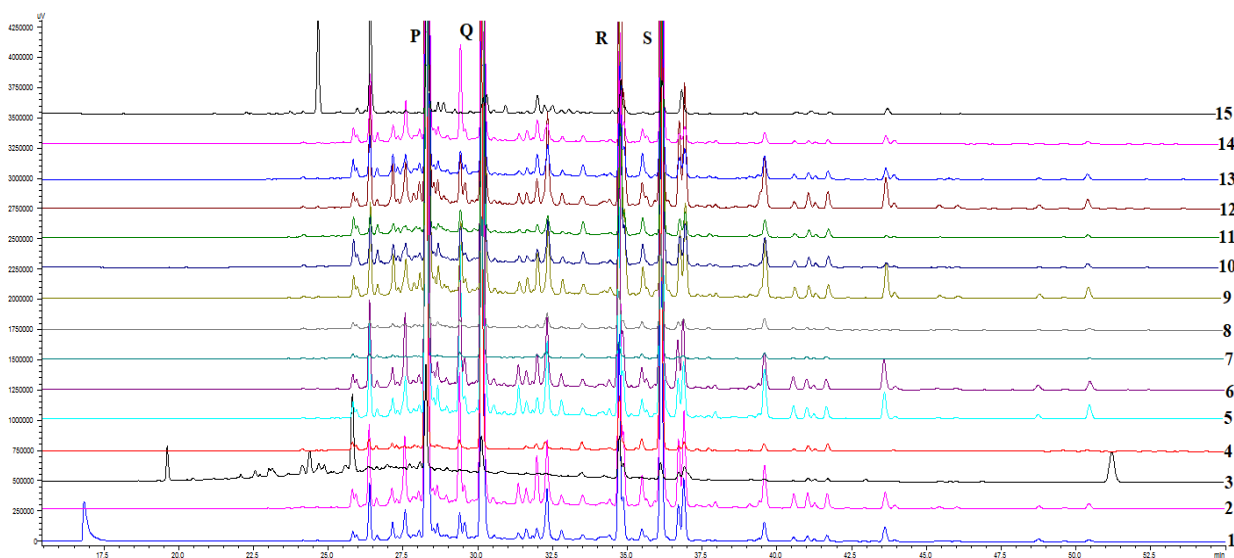
Примітка. ■ Літературні дані [89, 88, 93, 133, 301, 302, 304]





Нумерація зразків відповідає нумерації у таблиці 3.6

Рис. 3.3 Профілі фенольних сполук, що ідентифіковані у зразках шафрану при  $\lambda = 270$  нм. Виявлені сполуки: хлорогенова кислота (A); кофейна кислота (B); *n*-кумарова кислота (C); рутин (D); ферулова кислота (E); пікрокроцин (F); апігенін 7-О-глюкозид (G); лютеолін (H); апігенін (J); 6,7-дигідроізофлавонол (I); кемпферол (K); шафраналь (L); 7-гідроксиізофлавонол (M); формонетин (N); біоханін А (O)



Нумерація зразків відповідає нумерації у таблиці 3.6

Рис. 3.4 Апокаротиноїдний профіль зразків шафрану при  $\lambda = 440$  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

У всіх зразках шафрану виявлено основні метаболіти шафрану кроцини (*t*-4GG; *t*-2G; *c*-4GG; *c*-3Gg), шафраналь, пікрокроцин, а також флавоноїд рутин. Крім того, в зразках з Литви, України, Італії, Марокко та Австралії виявили хлорогенову кислоту. Кофейна кислота ідентифікована в шафрані з Литви, України, Німеччини, Швейцарії, Іспанії та Ірану. Ферулова кислота була найпоширенішою серед гідроксикоричних кислот і виявлена в 9 з 15 зразків шафрану. Натомість, кумарова кислота є найменш поширеною та виявлена лише в деяких зразках (з Марокко та Індії), що корелює з даними літератури [302, 303]. За частотою виявлення у зразках флавоноїдів та ізофлавоноїдів у зразках шафрану сполуки можна розташувати в такій послідовності: рутин (у всіх зразках) > 6,7-дигідроксіізофлавонон (9 зразків) > лютеолін (7 зразків) > апігенін = апігенін- 7-О-глюкозид (4 зразки) > кемпферол = 7-гідроксіізофлавонон = формонетин (2 зразки) > біоханін А (1 зразок).

Таким чином, на цьому етапі можна зробити висновок про вплив екологічних факторів на компонентний склад здебільшого фенольних речовин. Відповідно до апокаротиноїдів, то відмінність між зразками скоріш за все полягає не у наявності цих речовин, а у їхній кількості. На наступному етапі ми вдалися до порівняльного аналізу кількісного вмісту БАР різної природи у досліджуваних зразках.

### 3.2.3 Порівняльне дослідження вмісту апокаротиноїдів у зразках шафрану

Хроматографічний аналіз показав, що кроцини, шафраналь і пікрокроцин накопичуються в зразках шафрану всіх досліджуваних країн у різній кількості (табл. 3.7). Основними за вмістом естерами кроцетину були *t*-4GG, *t*-2G, *c*- 4GG і *c*-3Gg. Кроцини мають 92–94% загального вмісту апокаротиноїдів в приймочках (табл. 3.7), що відіграє ключову роль у визначенні якості шафрану. Значна різниця між зразками пов'язана зі значно нижчим вмістом *c*-4GG і *c*-3Gg кроцинів у зразках шафрану, які мають азійське походження (Індія (Махараштра), Марокко (Марракеш) і Азербайджан (Апшерон)).

Найбільші концентрації в усіх пробах спостерігаються для кроцинів із середнім вмістом 382,45 мг/г. Результати показують, що зразки шафрану відрізнялися за вмістом естерів кроцину. Такі сполуки виявлені у більшій кількості у всіх зразках шафрану. Зокрема, у зразку з Італії (Ломбардія) виявлено найвищий вміст кроцинів. Відмінності у кількісному вмісті кроцинів, ймовірно, пов'язані з певними агроекологічними факторами, які впливають на місцеве виробництво шафрану. Вміст кроцину *t*-4GG у приймочках різних країн коливається від  $253,48 \pm 2,60$  мг/г (Литва) до  $612,85 \pm 11,29$  мг/г (Італія).

Розподіл вмісту шафраналу в зразках знаходиться в діапазоні від  $0,03 \pm 0,00$  мг/г (Литва) до  $5,4 \pm 0,02$  мг/г (Австралія). Найбільший вміст шафраналу був у зразках Марокко, Індії та Ірану (більше 2 мг/г). Найнижчим був вміст шафраналу у зразку литовського шафрану (до 0,03 мг/г). Кількісний вміст сполук у шафрані з Литви є найнижчою порівняно зі значеннями в інших країнах, за винятком пікрокроцину, його вміст є другим найнижчим серед усіх інші.

Ймовірно, на цей розподіл сильно впливають різні кліматичні умови в Литві та інших країнах Середземномор'я та Азії. Тим не менш, вміст основних сполук, знайдених у зразках з України та Німеччини, значно (принаймні на 50%) перевищує показники Литви. З іншого боку, така різниця в кількості може бути спричинена неоднаковими умовами вирощування та сушіння. Це також підтверджується тим фактом, що відмінності в кількості вихідних сполук між двома різними зразками, зібраними в одній країні, були значними ( $p < 0,05$ ), за винятком індійської сировини для пікрокроцину. Також ми оцінили результати вмісту апокаротиноїдів, одержані при розробці пробопідготовки (табл. 3.5) для зразків українського шафрану. Виявлено широкий діапазон значень для цих компонентів шафрану, і їх кількість сильно відрізняється від регіону до регіону України. Згідно з отриманими результатами (табл. 3.5), зразок шафрану з Чернігова показав високий вміст апокаротиноїдів. Зокрема, цей зразок містив найбільшу кількість кроцину ( $225,99$  мг/г). Вміст кроцину в зразку запорізького шафрану становив  $205,04$  мг/г і поступався тільки чернігівському.

Таблиця 3.7

## Вміст (мг/г) пікрокроцину, шафраналю та кроцинів у зразках шафрану за даними ВЕРХ

N	Країна походження	Пікрокроцин	Шафраналь	Кроцин <i>t</i> -4GG	Кроцин <i>t</i> -2G	Кроцин <i>c</i> -4GG	Кроцин <i>c</i> -3Gg
1	Марокко (Толуїдин)	91,64 ± 0,87 <sup>h1</sup>	0,77 ± 0,02 <sup>b</sup>	561,74 ± 5,92 <sup>e</sup>	108,92 ± 4,71 <sup>a</sup>	69,31 ± 2,89 <sup>c</sup>	20,94 ± 0,98 <sup>h</sup>
2	Іспанія (Кастілья Ла-Манча )	242,45 ± 7,51 <sup>f</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>f</sup>	587,33 ± 4,97 <sup>ad</sup>	142,34 ± 6,09 <sup>k</sup>	137,38 ± 3,08 <sup>a</sup>	52,27 ± 2,49 <sup>a</sup>
3	Іран (Хоросан)	163,97 ± 3,94 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,01 <sup>g</sup>	515,65 ± 4,00 <sup>b</sup>	56,03 ± 2,52 <sup>c</sup>	46,61 ± 1,82 <sup>c</sup>	28,67 ± 0,82 <sup>c</sup>
4	Індія (Утар-Прадеш)	108,77 ± 0,94 <sup>d</sup>	2,24 ± 0,00 <sup>i</sup>	409,26 ± 3,49 <sup>j</sup>	21,30 ± 0,97 <sup>h</sup>	21,25 ± 0,39 <sup>h</sup>	19,85 ± 0,22 <sup>h</sup>
5	Україна (Херсон )	103,21 ± 4,72 <sup>d</sup>	1,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	417,09 ± 14,87 <sup>e</sup>	28,59 ± 1,21 <sup>c</sup>	11,38 ± 0,32 <sup>j</sup>	8,30 ± 0,41 <sup>b</sup>
6	Україна (Миколаїв)	223,51 ± 4,62 <sup>e</sup>	1,27 ± 0,00 <sup>a</sup>	496,10 ± 12,82 <sup>a</sup>	153,80 ± 6,28 <sup>a</sup>	96,58 ± 4,71 <sup>c</sup>	43,02 ± 2,02 <sup>a</sup>
7	Індія (Махараштра)	104,02 ± 1,78 <sup>d</sup>	1,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	311,62 ± 2,64 <sup>k</sup>	1,84 ± 0,82 <sup>j</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>j</sup>	1,45 ± 0,01 <sup>j</sup>
8	Азербайджан (Апшерон)	54,91 ± 1,41 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>b</sup>	344,52 ± 3,61 <sup>h</sup>	3,57 ± 0,09 <sup>j</sup>	2,41 ± 0,10 <sup>i</sup>	1,17 ± 0,02 <sup>j</sup>
9	Іран (Неїшбор)	197,13 ± 2,12 <sup>g</sup>	1,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	602,93 ± 5,09 <sup>ac</sup>	22,44 ± 1,02 <sup>h</sup>	22,02 ± 0,89 <sup>h</sup>	7,94 ± 0,40 <sup>b</sup>
10	Німеччина (Альтенбург)	170,41 ± 4,09 <sup>b</sup>	2,95 ± 0,01 <sup>d</sup>	521,76 ± 4,78 <sup>b</sup>	67,27 ± 1,30 <sup>k</sup>	67,85 ± 1,27 <sup>a</sup>	26,44 ± 1,05 <sup>c</sup>
11	Швейцарія (Мунд)	141,75 ± 5,96 <sup>c</sup>	1,43 ± 0,00 <sup>a</sup>	446,50 ± 6,46 <sup>g</sup>	5,01 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,88 ± 0,13 <sup>h</sup>	2,59 ± 0,10 <sup>j</sup>
12	Італія (Ломбардія)	144,67 ± 4,74 <sup>c</sup>	4,35 ± 0,02 <sup>e</sup>	612,85 ± 11,30 <sup>c</sup>	23,30 ± 0,42 <sup>h</sup>	32,97 ± 1,21 <sup>h</sup>	6,32 ± 0,21 <sup>b</sup>
13	Марокко (Маррокеш)	145,96 ± 2,60 <sup>c</sup>	3,38 ± 0,25 <sup>h</sup>	542,72 ± 4,78 <sup>i</sup>	12,19 ± 0,26 <sup>b</sup>	7,10 ± 0,22 <sup>j</sup>	4,93 ± 0,21 <sup>b</sup>
14	Австралія (Тасманія)	180,72 ± 1,43 <sup>i</sup>	5,41 ± 0,02 <sup>j</sup>	574,62 ± 3,05 <sup>de</sup>	72,56 ± 2,18 <sup>k</sup>	25,88 ± 0,94 <sup>h</sup>	2,08 ± 0,09 <sup>j</sup>
15	Литва (Каунас)	62,17 ± 3,44 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>c</sup>	253,48 ± 2,60 <sup>f</sup>	12,45 ± 0,21 <sup>i</sup>	12,67 ± 0,37	3,21 ± 0,13 <sup>b</sup>

Примітка. <sup>1</sup> Значення (середнє значення ± SE), позначені різними літерами вздовж рядків, значно відрізняються ( $p \leq 0,05$ ) відповідно до тесту множинного порівняння Posthoc Tukey HSD. Різні літери вказують на значні відмінності між значеннями.

Два зразки шафрану з півдня України мали подібні значення концентрації кроцину 177 та 180 мг/г для Херсона та Миколаєва відповідно. Наступним за вмістом кроцину в кількості 154,50 мг/г є одеський зразок. Концентрація кроцинів у зразку з Хмельницького (154,98 мг/г) така ж, як і в зразку з Одеси. Для зразка з Вінниці виявлено зниження концентрації кроцинів (136,15 мг/г). А найменший вміст кроцинів має проба із Закарпатської області (52,19 мг/г).

Аналізуючи дані про концентрацію пікрокроцину як прекурсора компонентів смаку в українських зразках шафрану, встановлено подібну залежність щодо вмісту речовини від місця зростання рослини. Виняток становлять Одеса та Вінниця, де вміст пікрокроцину знаходиться в межах 16 – 18 мг/г, тоді як для зразків Запоріжжя, Чернігова, Херсона вміст знаходиться в межах 16 – 20 мг/г (табл. 3.5, 3.7).

Шафраналь – монотерпеновий альдегід, який утворюється в приймочках з пікрокроцину шляхом гідролізу під час сушіння та зберігання. Вміст вологи в сушеному продукті безпосередньо впливає на кількість цих сполук, що містяться у сировині. Херсонська та Одеська як найпівденніші області України мають схожий сухий клімат влітку та восени. Вміст шафраналю саме в цих регіонах виявився найвищим і становив понад 2 мг/г (табл. 3.5, 3.7). Для зразків з Чернігова, Вінниці та Запоріжжя вміст був приблизно однаковий 1,27–1,75 мг/г. Найменший вміст шафраналю (0,21–0,85 мг/г) у зразках шафрану з Хмельницького, Закарпаття та Миколаєва. Слід зазначити, що зразки шафрану з найнижчим вмістом шафраналю були зібрані у 2019 р. на а інші зразки – у 2018 р. Останні мали довший термін зберігання, що вплинуло на збільшення концентрації шафраналю в сировині за рахунок гідролізу.

#### 3.2.4 Порівняння вмісту фенольних речовин в зразках шафрану

При ідентифікації БАР в зразках шафрану ми відзначили, що саме за складом фенольних речовин зразки відрізняються найбільшим чином. Наступним

етапом стала порівняльна оцінка їх вмісту. Сумарний вміст фенольних кислот у досліджуваних зразках шафрану коливався від 0,05 мг/г в іранському зразку з провінції Нейшбор до 0,28 мг/г у приймочках з Індії (штат Утар-Прадеш). Їх вміст і компонентний склад сильно варіював залежно від району вирощування (табл. 3.8). У досліджених зразках виявлено гідроксильовані похідні коричної кислоти, такі як кумарова, кофейна, ферулова та хлорогенова кислоти.

Найбільша кількість кофейної кислоти ( $4,88 \pm 0,03$  мг/г) була представлена у шафрані з України (Херсон); вона була найбільшою серед усіх зразків ( $p < 0,05$ ) (табл. 3.8). Найбільший вміст хлорогенової кислоти ( $0,203 \pm 0,005$  мг/г) виявлено також у зразку з Херсону (Україна). На відміну від кофейної кислоти, хлорогенова кислота не виявлена у зразках шафрану з Німеччини, Іспанії, Марокко, Індії, Швейцарії та Ірану, але знайдена у шафрані, що вирощено у кліматичних умовах України (Херсон), Італії (Ломбардія), Марокко (Марракеш), Литви (Каунас) та Австралії (Тасманія). *n*-Кумарова кислота була знайдена лише у шафрані з Марокко (Толуїдин) та Індії (Махараштра), і її кількість становила 0,17 мг/г і 1,15 мг/г відповідно ( $p < 0,05$ ). Ферулова кислота виявлена у 9 зразках шафрану.

Найбільший вміст ферулової кислоти виявлено у зразках з Індії (штат Утар-Прадеш) та Швейцарії (Мунд) (0,28 і 0,23 мг/г відповідно). Дещо поступались за її вмістом зразки з Ірану (Хорасан) та Азербайджану (Апшерон) (0,15–0,16 мг/г). Загальний вміст гідроксикоричних кислот був найбільшим (5,08 мг/г) у зразку з України (Херсон). Аналізуючи вміст флавоноїдів (табл.3.9), відзначено деякі закономірності. У всіх досліджених зразках виявлено рутин, який є однією з домінуючих сполук. Кількість рутину в зразках коливалась в інтервалі від  $0,83 \pm 0,01$  мг/г (Литва) до  $8,74 \pm 0,15$  мг/г (Іспанія). Згідно з результатами статистичного аналізу не виявлено статистично значущої різниці ( $p > 0,05$ ) у кількості рутину між зразками з наступних країн: Німеччина (Альтенбург) та Іран/Австралія; Німеччина та Італія; Італія і Марокко (Марракеш); Іран, і Іран (Нейшбор); і Марокко (Марракеш) і Індія (Утар-Прадеш)/Індія (Махараштра).

Таблиця 3.8

## Вміст гідроксикоричних кислот (мг/г) у зразках шафрану за даними ВЕРХ

Н	Країна походження шафрану	Хлорогенова кислота	Кофейна кислота	<i>p</i> - Кумарова кислота	Ферулова кислота	Всього
1	Марокко (Толуїдин)	- <sup>1</sup>	-	0,165 ± 0,003 <sup>a</sup>	-	0,17 ± 0,003 <sup>a</sup>
2	Іспанія (Кастілья Ла -Манча)	-	0,05 ± 0,003 <sup>b</sup>	-	-	0,05 ± 0,003 <sup>b</sup>
3	Іран (Хоросан)	-	-	-	0,15 ± 0,002 <sup>g</sup>	0,15 ± 0,002 <sup>g</sup>
4	Індія (Утар-Прадеш)	-	-	-	0,28 ± 0,004 <sup>i</sup>	0,28 ± 0,004 <sup>i</sup>
5	Україна (Херсон)	0,20 ± 0,01 <sup>d2</sup>	4,88 ± 0,03 <sup>f</sup>	-	-	5,08 ± 0,003 <sup>b</sup>
6	Україна (Миколаїв)	-	-	-	0,09 ± 0,002 <sup>j</sup>	0,09 ± 0,002 <sup>j</sup>
7	Індія (Махараштра)	-	-	1,149 ± 0,003 <sup>b</sup>	-	1,15 ± 0,003 <sup>b</sup>
8	Азербайджан (Апшерон)	-	-	-	0,16 ± 0,002 <sup>f</sup>	0,16 ± 0,002 <sup>f</sup>
9	Іран (Неішбор)	-	0,08 ± 0,002 <sup>c</sup>	-	0,05 ± 0,003 <sup>h</sup>	0,12 ± 0,002 <sup>f</sup>
10	Німеччина (Альтенбург)	-	0,07 ± 0,003 <sup>ac</sup>	-	0,13 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,002 <sup>a</sup>
11	Швейцарія (Мунд)	-	0,10 ± 0,003 <sup>g</sup>	-	0,23 ± 0,003 <sup>d</sup>	0,29 ± 0,003 <sup>d</sup>
12	Італія (Ломбардія)	0,06 ± 0,004 <sup>e</sup>	-	-	0,11 ± 0,003 <sup>e</sup>	0,17 ± 0,003 <sup>e</sup>
13	Марокко (Маррокеш)	0,08 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	0,14 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,002 <sup>a</sup>
14	Австралія (Тасманія)	0,09 ± 0,004 <sup>c</sup>	-	-	-	0,09 ± 0,004 <sup>c</sup>
15	Литва (Каунас)	0,03 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,003 <sup>d</sup>	-	-	0,21 ± 0,003 <sup>d</sup>

Примітка. <sup>1</sup> не виявлено. <sup>2</sup> Значення (середнє значення ± SE), позначені різними літерами вздовж рядків, значно відрізняються ( $p \leq 0,05$ ) відповідно до тесту множинного порівняння Тьюкі HSD. Різні літери вказують на значні відмінності між значеннями.

Середнє значення рутину (4,09 мг/г) у шафрані є найвищим у порівнянні з іншими фенольними компонентами. Іншим переважаючим ізофлавоноїдом у зразках шафрану був 6,7-дигідроксиізофлавоон. Різниця в кількості цього флавоноїду в зразках шафрану різних країн була достовірною ( $p < 0,05$ ).

Найбільшу кількість 6,7-дигідроксиізофлавоону ( $1,00 \pm 0,01$  мг/г) виявлено у шафрані з Італії, а найменшу ( $0,02 \pm 0,004$  мг/г) – у зразку з Індії (Махараштра) (табл. 3.9). Апігенін-7-О-глюкозид виявлено в обох зразках з Індії, Литви та в українському (Херсон). Найбільший його вміст був у зразку з України (2,74 мг/г). Вміст лютеоліну в зразках коливався від  $0,10 \pm 0,01$  мг/г (шафран з Індії, Махараштра) до  $0,67 \pm 0,01$  мг/г (шафран з Індії, Утар-Прадеш) ( $p < 0,05$ ). З європейських країн апігенін виявлений лише у зразку з Італії з вищим вмістом ( $3,18 \pm 0,08$  мг/г). Найменшу кількість апігеніну виявлено у шафрані ( $0,08 \pm 0,003$  мг/г) з географічній зоні Індії (Махараштра). Формононетин ( $0,07 \pm 0,004$  мг/г) і кемпферол ( $0,52 \pm 0,01$  мг/г), 7-гідроксиізофлавоон ( $0,01 \pm 0,002$  мг/г) виявлено в невеликих кількостях лише у двох зразках шафрану. Найменш рідкісним флавоноїдом, знайденим лише в одному зразку шафрану, був біоханін А в іспанському зразку ( $0,09 \pm 0,004$  мг/г).

### 3.3 Розробка методики та результати дослідження складу карбонових кислот та амінокислот у шафрані методом ГХ-МС

Нами розроблена оригінальна ГХ-МС методика для одночасного визначення профілю карбонових кислот і амінокислот, а також шафраналю. Порядок елюювання стандартів амінокислот представлений на рисунку А.4 (Додатки). Методика валідована (табл. А.11-А.14, Додатки): точність дала нижче значення, ніж  $RSD = 2\%$ , за винятком Arg, Cys і Tyr; значення чутливості нижче 10 нг усіх введених амінокислот. Межа LoD і LoQ усіх амінокислот стандартів змінювалися в діапазоні 0,14–0,72 нг/мл і 0,2–2,4 нг/мл відповідно.



Таблиця 3.9

## Вміст флавоноїдів (мг/г) у зразках шафрану (метод ВЕРХ)

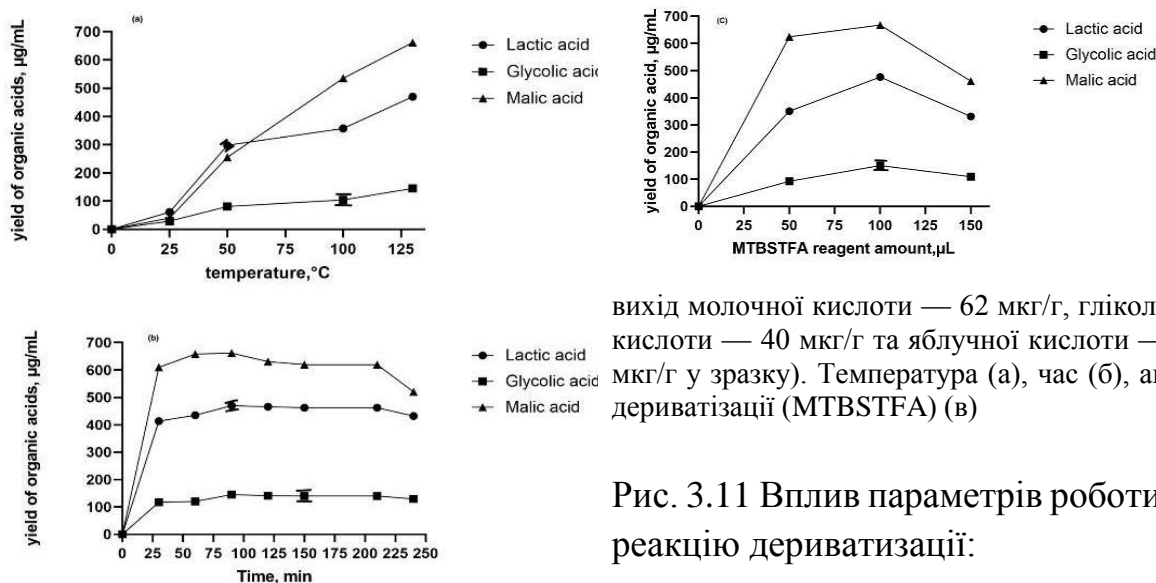
N	Країна походження шафрану	Апігенін-7-О-глюкозид	Рутин	Лютеолін	Апігенін	6,7-Дигідроксизофлаво	Кемпферол	7-Гідроксиизофлаво	Формононетин	Біоханін А	Всього
1	Марокко (Толуїдин)	- <sup>1</sup>	2,84 ± 0,13 <sup>k</sup>	-	-	0,32 ± 0,004 <sup>g</sup>	-	-	-	-	3,16 ± 0,01 <sup>j</sup>
2	Іспанія (Кастілья Ла-манш)	-	8,74 ± 0,15 <sup>i</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,002 <sup>a</sup>	-	0,09 ± 0,004 <sup>a</sup>	9,63 ± 0,16 <sup>i</sup>
3	Іран (Хоросан)	-	6,40 ± 0,21 <sup>ad</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	0,20 ± 0,003 <sup>e</sup>	-	0,05 ± 0,003 <sup>b</sup>	-	-	7,20 ± 0,16 <sup>h</sup>
4	Індія (Утар-Прадеш)	0,226 ± 0,007 <sup>ab2</sup>	4,65 ± 0,21 <sup>e</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>e</sup>	-	0,09 ± 0,002 <sup>h</sup>	-	-	-	-	5,63 ± 0,21 <sup>e</sup>
5	Україна (Херсон)	2,738 ± 0,068 <sup>f</sup>	1,44 ± 0,00 <sup>f</sup>	-	-	-	-	-	-	-	4,18 ± 0,10 <sup>e</sup>
6	Україна (Миколаїв)	-	6,05 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,003 <sup>g</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	6,57 ± 0,07 <sup>d</sup>
7	Індія (Махараштра)	0,172 ± 0,010 <sup>b</sup>	4,56 ± 0,10 <sup>e</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,08 ± 0,003 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,004 <sup>i</sup>	-	-	0,02 ± 0,002 <sup>b</sup>	-	4,95 ± 0,11 <sup>e</sup>
8	Азербайджан (Апшерон)	-	2,22 ± 0,01 <sup>j</sup>	-	-	0,05 ± 0,003 <sup>d</sup>	0,02 ± 0,002 <sup>b</sup>	-	-	-	2,29 ± 0,01 <sup>j</sup>
9	Іран (Неішбор)	-	6,59 ± 0,38 <sup>d</sup>	0,13 ± 0,003 <sup>d</sup>	-	0,51 ± 0,01 <sup>f</sup>	-	-	-	-	7,23 ± 0,16 <sup>h</sup>
10	Німеччина (Альтенбург)	-	6,09 ± 0,09 <sup>a</sup>	-	-	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	-	-	-	6,47 ± 0,12 <sup>a</sup>
11	Швейцарія (Мунд)	-	5,52 ± 0,02 <sup>b</sup>	-	-	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-	-	5,70 ± 0,02 <sup>b</sup>
12	Італія (Ломбардія)	-	5,11 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	-	-	9,59 ± 0,17 <sup>i</sup>
13	Марокко (Маррокеш)	-	4,95 ± 0,16 <sup>ce</sup>	-	0,56 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	5,51 ± 0,05 <sup>c</sup>
14	Австралія (Тасманія)	-	7,70 ± 0,16 <sup>h</sup>	-	-	-	-	-	0,07 ± 0,004 <sup>a</sup>	-	7,78 ± 0,16 <sup>h</sup>
15	Литва (Каунас)	0,979 ± 0,022 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	1,80 ± 0,003 <sup>e</sup>

Примітка. <sup>1</sup> - не виявлено. <sup>2</sup> Значення (середнє значення ± SE), позначені різними літерами вздовж рядків, значно відрізняються (p ≤ 0,05) відповідно до тесту множинного порівняння Тьюкі HSD. Різні літери вказують на значні відмінності між значеннями.

Точність часів утримування та площ піків суміші стандартів амінокислот для повторної ін'єкції була в діапазоні 0,70–1,92% від RSD ( $n=6$ ). Відтворюваність і повторюваність методу оцінювали, аналізуючи шість ін'єкцій розчину зразка і дві повторності екстракції зразка, відповідно. Середні відсотки відновлюваності стандартів змішаних амінокислот коливалися від 81,92% до 113,00%. Результати продемонстрували, що умови для аналізу амінокислот були повторюваними та точними, а методика – коректною.

Газова хроматографія завдяки своїй «зеленості» та можливості використання «універсальних» умов спрощує процес верифікації сполук. Тому цей метод є перспективним не тільки для визначення летких сполук, а завдяки дериватизації дозволяє визначати досить цікаве коло речовин. Нами було досліджено можливість використання застосування методики визначення амінокислот для інших речовин, зокрема, органічних кислот в шафрані. Експериментальні дослідження показали, що обрані умови методики дають належну лінійність для всіх органічних кислот з коефіцієнтами визначення  $R^2 > 0,9955$ . Межа виявлення (LoD) та межа кількісного визначення (LoQ) коливались для різних органічних кислот від 0,317 до 0,410 мкг/мл та від 0,085 до 1,53 мкг/мл відповідно. Найвищий вихід органічних кислот був отриманий з використанням 0,1 мл MTBSTFA та методом дериватизації за допомогою звичайного процесу нагрівання при 130 °C протягом 90 хв (рис. 3.11). В результаті розробки методу встановлено, що підвищення температури значно збільшило вихід органічних кислот (рис. 3.11a;  $p < 0,05$ ). При температурі дериватизації 130°C виходи похідних молочної, гліколевої та яблучної кислот суттєво зросли в 7,7, 16,1 і 5 разів відповідно в порівнянні зі зразками, приготовленими при температурі 25°C (рис. 3.11a). Це обумовлено тим, що більш висока температура підвищує ефективність дериватизації за рахунок підвищення розчинності реагентів та метаболітів органічних кислот [309]. Крім того, досліджено вплив часу екстракції (30, 60, 90, 120, 150, 210 і 240 хв) на вихід органічних кислот. Встановлено, що подовжений час екстрагування (90 хв) не мав значного впливу на вихід продуктів дериватизації кислот у шафрані ( $p > 0,05$ ; рис. 3.11b), сигнальна відповідь похідних органічних кислот залишалася постійною.

Хроматограми стандартів (молочної, гліколевої та яблучної кислот) та шафрану, отриманого в оптимальних умовах, наведено на рисунку 3.12.



вихід молочної кислоти — 62 мкг/г, гліколевої кислоти — 40 мкг/г та яблучної кислоти — 30 мкг/г у зразку). Температура (а), час (б), агент дериватизації (MTBSTFA) (в)

Рис. 3.11 Вплив параметрів роботи на реакцію дериватизації:

Також було досліджено вплив різних об'ємів (50, 100, 150 мкл) реагенту MTBSTFA на вихід органічних кислот. Як показано на Рис. 3.11с, найвищий вихід продуктів дериватизації органічних кислот був отриманий, коли кількість реагенту становила 100 мкл ( $p < 0,05$ ). Однак спостерігалось зниження ефективності дериватизації, коли кількість реагенту MTBSTFA в екстракті зросла до 150 мкл. Таким чином, найвищий вихід органічних кислот у шафрані досягається за таких умов: температура дериватизації 130°C, час сілілування 90 хв, кількість реагенту MTBSTFA – 100 мкл. Швидка процедура дериватизації покращила параметри розділення, такі як летючість, термічна стабільність, роздільна здатність, а також параметри виявлення. Результати експериментальних досліджень підтвердили можливість застосування запропонованого методу ГХ з дериватизацією для кількісного аналізу органічних кислот у шафрані.

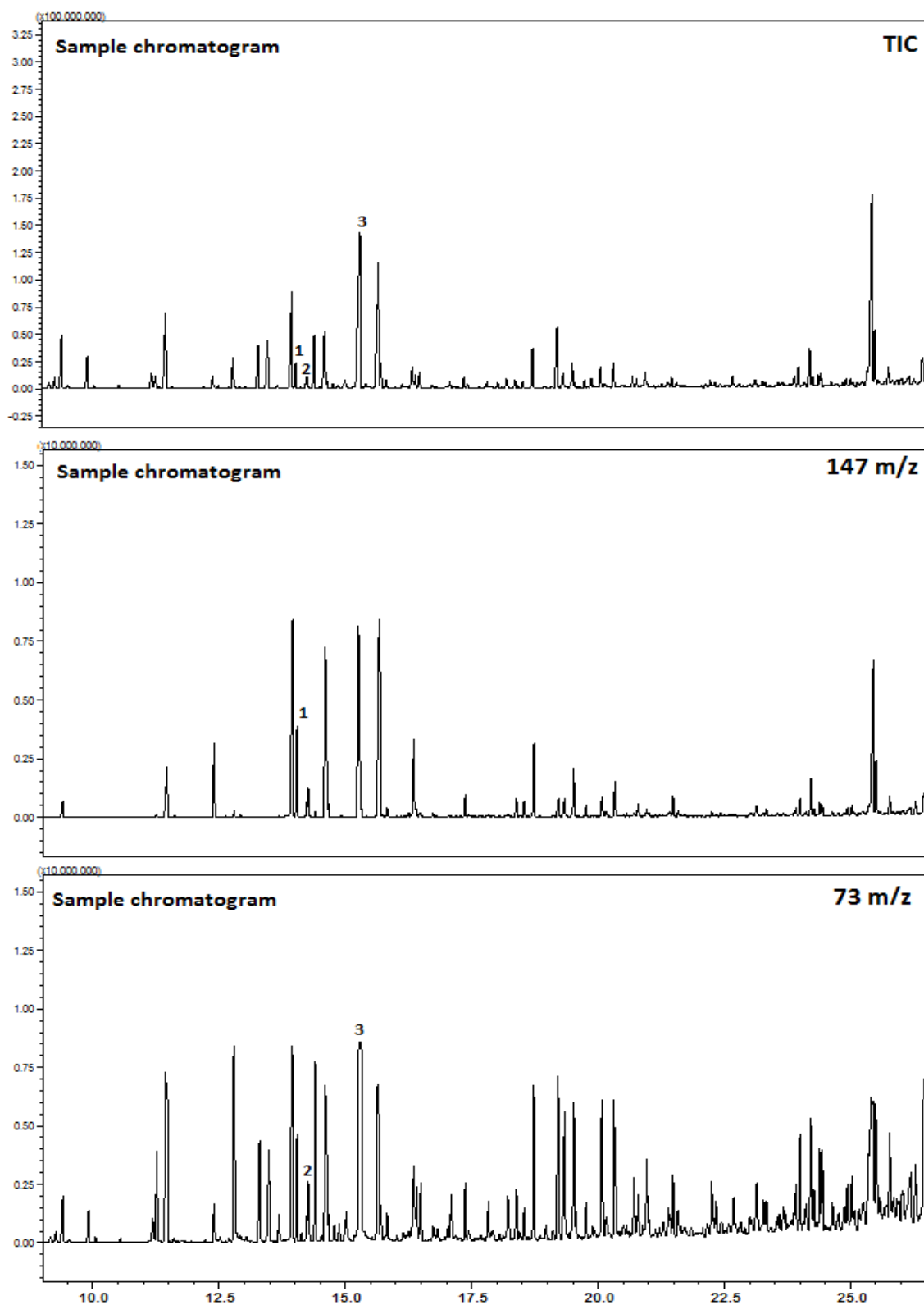


Рис. 3.12 ГХ/МС хроматограми стандартів (1-молочної, 2-гліколевої та 3-яблучної кислот) і похідних органічних кислот, екстрагованих з шафрану

Додатково слід відзначити, що запропонованим методом у всіх зразках знайдено речовину-маркер шафраналь (вміст від 50,87 до 77,59%). Таким чином, даний метод можна використовувати не тільки для визначення органічних та амінокислот, а й для швидкого та точного аналізу шафраналю у приймочках або одночасного визначення цих речовин. Для дослідження вмісту карбонових кислот та амінокислот використовували сертифіковані зразки шафрану з органічних виробництв України, Марокко, Іспанії, Німеччини, Ірану та Італії (табл. 3.10).

Переважно профіль амінокислот та карбонових кислот у досліджених зразках шафрану був однаковим, хоча були значні відмінності у присутності або відсутності тих чи інших компонентів. Карбонові кислоти в зразках є досить різноманітними і представлені по різному. Молочна кислота знайдена у всіх зразках, від 0,13% у зразку з Ірану до 8,86% у зразку з України, Херсон.

Гліколева кислота мала приблизно однаковий вміст у всіх зразках шафрану (1,23-1,46%), виключенням був зразок з України, він мав найбільший вміст – 2,59%. Спільними також були речовини: 4-гідроксибензойна кислота (0,49-0,72%) та пальмітинова кислота (0,87 – 1,90%). Крім того, вперше було виявлено незамінні жирні кислоти  $\alpha$ -ліноленову кислоту ( $\omega$ 3) (1,43-2,10%) і ліноелаїдинову кислоту ( $\omega$ 6) (4,87 – 7,36%) як основні компоненти серед кислот. Це характеризує нутрицевтичну користь сировини.

Високий вміст у всіх зразків мала *трис*-фосфорна кислота (4,67 – 10,41%). Згідно з Hu et al. [306], наявність цієї речовини у сировині сигналізує про реакцію рослини на температурний стрес, що виражається у змінах профілю метаболіту. При цьому підвищується вміст карбонових кислот (яблучної кислоти, лимонної кислоти, *трис*-фосфорної кислоти), амінокислот (ізолейцину, піроглутамінової кислоти, фенілаланіну, аланіну, глутаміну), а також ненасичених жирних кислот (ліноелаїнової кислоти, лінолевої), що обумовлює антиоксидантний потенціал ЛРС.

Таблиця 3.10

**Профіль карбонових кислот та амінокислот у зразках шафрану з різних країн, визначений методом ГХ-МС, відносний вміст речовин у %**

N	Назва речовини	Rt	Німеччина	Італія	Іспанія	Україна	Іран	Марокко
1	Етил-3-(триметилсиліл)пропіонат	7.08	0,73	-	-	-	-	-
2	3-Гідрокси-4-метил-пентанова кислота	7.23	-	-	-	-	-	0,29
3	L-(+)-Молочна кислота	8.19	4,76	-	-	-	-	4,76
4	5-Гідрокси-3-метил-δ-лактон гексанової кислоти	9.15	2,28	-	-	-	-	-
5	Шафраналь	9.85	54,09	77,59	69,65	68,25	72,75	50,87
6	Оцтова кислота	10.91	-	-	-	-	-	6,63
7	Щавлева кислота	10.99	-	-	-	1,68	-	0,67
8	Гліколева кислота	11.35	0,64	0,52	-	-	0,59	0,51
9	3-Фууроїнова кислота	12.41	-	-	-	0,10	-	-
12	Тридециловий ефір 3-метил-2-бутенової кислоти	13.08	-	-	-	-	-	2,35
13	Циклогексанкарбонова кислота	13.09	-	-	-	-	1,64	-
14	Молочна кислота	14.34	2,19	0,90	0,69	8,86	0,13	2,35
15	Гліколева кислота	14.57	1,42	1,23	1,37	2,59	1,31	1,36
16	L-Аланін	14.84	-	0,74	0,45	0,17	-	0,48
17	Гліцин	15.21	0,80	-	-	-	-	-
18	2-Метилбутанова кислота	15.21	-	-	3,17	-	-	0,64
19	Гідракрилова кислота	15.52	1,26	0,71	1,77	-	-	1,18
20	Метилмалонова кислота	15.99	-	-	1,34	-	-	-
21	L-валін	16.54	3,44	-	3,25	-	1,07	2,15
22	L-лейцин	16.88	-	-	0,78	-	-	0,48
23	L- пролін	17.33	0,30	-	-	-	-	-
24	Урацил	17.72	-	-	-	1,55	-	-
25	Еритроно-1,4-лактон	18.61	-	0,34	1,15	-	-	-
26	трис -Фосфорна кислота	19.55	10,32	6,83	-	4,67	8,46	10,41
27	Яблучна кислота	19.85	0,75	-	-	3,63	-	0,86
28	L-Метіонін	19.98	0,81	-	-	0,16	0,31	-
29	L-Піроглутамінова кислота	19.98	-	0,56	-	-	-	-
30	L-Серин	20.23	0,31	0,20	-	0,19	0,58	-
31	L-Треонін	20.55	-	-	-	0,06	-	-
32	Міристинова кислота	21.15	-	0,54	-	-	0,76	-
33	11,14-Ейкозадієнова кислота	21.28	-	1,11	3,25	-	-	1,17
34	Лінолева кислота	21.28	1,17	-	-	-	-	-
35	Метилловий ефір ліноленової кислоти	21.35	0,43	0,44	1,07	-	0,26	0,42

Продовження табл. 3.10

1	2	3	4	5	6	7	8	9
36	4-Гідроксибензойна кислота	21.48	0,72	0,58	0,82	0,49	0,61	0,66
37	L-Аспарагінова кислота	21.76	-	-	-	1,16	0,21	-
38	Меглютол	22.63	-	-	-	1,88	-	-
39	L-Глутамінова кислота	22.88	-	-	-	0,37	0,26	-
40	Пальмітинова кислота	23.02	1,65	1,33	1,73	0,87	1,90	1,80
41	L-Лізин	23.89	2,06	-	-	2,34	-	1,08
42	Ліноелайнова кислота	24.54	7,36	4,87	6,09	-	6,28	6,20
43	$\alpha$ -Ліноленова кислота	24.62	1,61	1,53	1,49	-	2,10	1,43
44	Стеаринова кислота	24.76	-	-	-	-	-	0,88
45	L-тирозин	26.03	0,89	-	1,40	0,99	0,78	0,39

У зразку українського шафрану ідентифіковано 3-фууроїнову кислота (0,10%) та меглютол (1,88%), які проявляють гіполіпідемічну активність у гризунів, знижують рівень холестерину в сироватці крові та рівні тригліцеридів у сироватці крові у мишей і щурів [307]. Ці речовини були виявлені тільки у цьому зразку, що свідчить про потенційну перспективу подальших досліджень крокусу у якості гіполіпідемічного агента.

Крім того, тільки у зразку з Херсону встановлено наявність урацилу, який є звичайною та природною піримідиною нуклеотидною основою, в якій піримідинове кільце заміщено двома гідроксогрупами в положеннях 2 і 4. Головним є те, що урацил є протипухлинним засобом, який використовується в комбінації з тегафуром для лікування різних видів раку, включаючи рак молочної залози, простати та печінки. Вірогідно, наявність урацилу обумовлює наявність цитотоксичної дії екстракту приймочок, що буде наведено у наступному розділі. Аналіз амінокислотного складу шафрану показав наявність L-тироzinу (0,39 – 1,49%) і відсутність L-фенілаланіну. Подібні дані були отримані Прісцилою дель Кампо [166].

### 3.4 Оцінка впливу факторів навколишнього середовища на компонентний склад зразків шафрану з різних країн

Для встановлення оптимальних умов для накопичення ключових БАР нами проведено кореляційний аналіз впливу екологічних факторів (висота над рівнем моря, широта, довгота, річна кількість опадів, мм; тривалість сонячного сяйва, год/рік; середньорічна температура, °С; сонячний УФ-індекс; тип клімату; тип ґрунту (для українських зразків додатково – вміст гумусу, рН, вміст P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, N, Zn, Ca, Mg) на вміст основних метаболітів у шафрані з України та світу.

Комерційні зразки шафрану були закуплені з різних країн (табл. 2.1), однак їх можна умовно розділити на три групи залежно від кліматичних умов, а саме: зразки з європейської частини, Азії та Австралії. Зразки європейського походження, досліджені в цій роботі, розташовані на відносно невеликій території таких країн, як Іспанія, Італія, Німеччина, Литва, Україна та Швейцарія. Це означає, що вони мають майже однаковий ґрунт і отримують майже однакову кількість опадів і сонячної радіації на рік (табл. А.1, Додатки). Для зразків з Індії, Ірану, Азербайджану та Марокко, подібними у кліматі є інтенсивність та тривалість сонячної радіації, ці регіони мають дуже низьку кількість опадів. Клімат Австралії кардинально відрізняється від усіх країн і період цвітіння крокусів припадає на квітень-травень, що також відбивається на складі його компонентів. Таким чином, відмінності, які спостерігаються між зразками більше пов'язані з фізіологією рослин під час збирання сировини, а також з можливими генетичними відмінностями між зразками, ідентифікованими спеціально для к. посівного в екологічних умовах.

Взаємозв'язок між вмістом метаболітів і факторами навколишнього середовища для зарубіжних зразків та двох зразків з України (Херсон та Миколаїв) аналізували за допомогою лінійної регресії (табл. А.42, Додатки). Значні відмінності спостерігались для апокаротиноїдів: кроцинів, шафраналю, пікрокроцину. За виключенням рутину, хлорогенової кислоти та ферулової кислоти, склад фенольних сполук у зразках шафрану в цілому не відрізнявся.



Результати кореляційного аналізу показали різноманітність значень. Кількість опадів, висота, широта і довгота не мали істотного впливу на накопичення компонентів у досліджуваних зразках шафрану. Помірні негативні кореляції з довготою були виявлені для вмісту кроцину ( $r_s = -0,543$ ;  $p = 0,045$ ). Найбільший вплив та кореляцію з вмістом усіх кроцинів, рутину, ферулової кислоти та хлорогенової кислоти мали такі параметри, як тривалість сонячного сьйва, сонячний УФ-індекс, тип ґрунту та тип клімату. Встановлено, що накопичення кроцинів у шафрані сильно залежить від тривалості сонячного сьйва (в діапазоні  $r_s = 0,745$ ;  $p = 0,007$  і  $r_s = 0,657$ ;  $p = 0,008$ ) та індексу сонячного ультрафіолетового випромінювання ( $r_s = 0,795$ ;  $p = 0,006$  і  $r_s = 0,657$ ;  $p = 0,008$ ).

Збільшення вмісту фенольних сполук і каротиноїдів зі збільшенням висоти було чітко ідентифіковано як відповідь на посилене УФ-випромінювання. Було виявлено, що вміст пікрокроцину і кроцину мають помірну позитивну і статистично значущу кореляцію з тривалістю сонячного світла ( $r_s = 0,559$ ;  $p = 0,038$  і  $r_s = 0,555^*$ ;  $p = 0,040$ , відповідно). Помірну негативну кореляцію виявлено для вмісту кофейної кислоти з тривалістю сонячного освітлення ( $r_s = -0,653$ ;  $p = 0,034$ ). Вміст ферулової кислоти показав помірну позитивну кореляцію з сонячним УФ-індексом ( $r_s = 0,565$ ;  $p = 0,028$ ) і висотою над рівнем моря ( $r_s = 0,526$ ;  $p = 0,044$ ).

Більшість частин квітки ефективно захищені від УФ-випромінювання завдяки накопиченню сполук, що поглинають УФ-В. Однак найменш захищені частини, такі як пилок або приймочки, є чутливими до високих доз УФ-В. Серед сполук, що поглинають УФ-В, флавоноїди відіграють складну роль у розмноженні рослин, оскільки вони є необхідними для захисту від УФ-В і нормальної функції приймочки. У зразках шафрану виявлено позитивну статистично значущу кореляцію між накопиченням кроцину та сонячним УФ-індексом ( $r_s = 0,795$ ;  $p = 0,006$  і  $r_s = 0,657$ ;  $p = 0,008$ ). Крім того, вміст хлорогенової кислоти також мав сильну позитивну та статистично значущу кореляцію з сонячним УФ-індексом ( $r_s = 0,735$ ;  $p = 0,009$ ). Тип ґрунту також має помірний зв'язок і статистично значущий зв'язок для шафраналю ( $r_s = -0,597$ ;  $p = 0,024$ ). Вміст рутину сильно залежав від типу ґрунту ( $r_s = -0,811$ ;  $p = 0,007$ ). Аналіз основних компонентів досліджуваних

зразків шафрану за вмістом апокаротиноїдів і флавоноїдів рутина за класами та метеорологічними умовами наведено на рисунку 3.13.

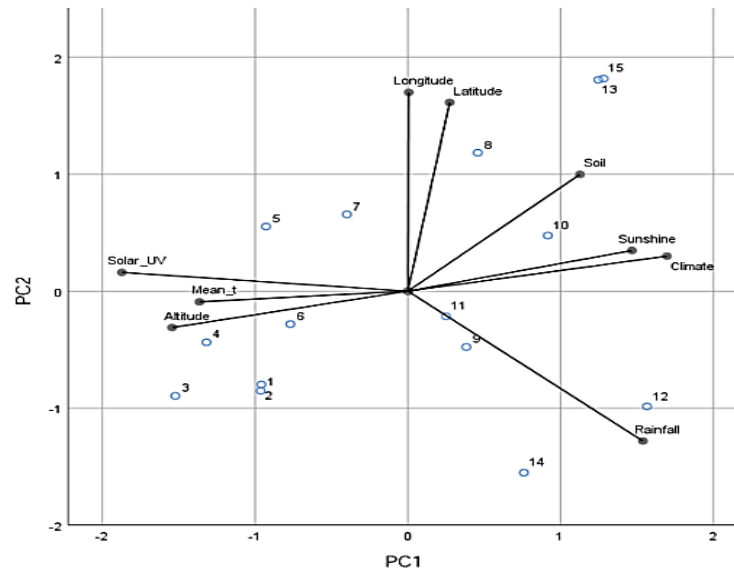


Рис. 3.13 Групування метеорологічних умов (річна кількість опадів, мм; тривалість сонячного сяйва, годин; середньорічна температура, °C) та вміст апокаротиноїдів та рутина в шафрані за допомогою аналізу основних компонентів

Для українських зразків вибірка факторів навколишнього середовища була зменшена враховуючи більш подібні умови існування, що обмежені однією країною (табл. 3.11). Достатньо високий вміст кроцинів, пікрокроцину та шафраналю обумовлений сприятливими відповідними кліматичними умовами, а саме: супіщане-суглинистим ґрунтом, середньою температурою, меншою відносною вологістю та загальною кількістю опадів, що свідчить про можливість вирощування шафрану в Україні, навіть у північних областях [312]. При визначенні методом ВЕРХ (табл. 3.5) більша кількість кроцину (205,04 та 225,99 мг/г відповідно) виявлена у зразках із північно-східних регіонів вирощування, таких як Запорізький та Чернігівський, тоді як у зразках південно-західного регіону спостерігалось зменшення кількості кроцину (180 мг/г і менше), що вірогідно зумовлено кліматичними особливостями.

Таблиця 3.11

**Дані кореляційного аналізу Спірмена між речовинами-маркерами, ідентифікованими у зразках шафрану з різних регіонів України та факторами навколишнього середовища**

<b>Сполука</b>	<b>Пікрокроцин</b>	<b>Кроцин</b>	<b>Шафраналь</b>
Висота	$r_s = -0,536$ ; $p = 0,215$	$r_s = -0,500$ ; $p = 0,253$	$r_s = -0,464$ ; $p = 0,294$
Довгота	$r_s = 0,857^*$ ; $p = 0,014$	$r_s = 0,750$ ; $p = 0,052$	$r_s = 0,643$ ; $p = 0,119$
Широта	$r_s = -0,821^*$ ; $p = 0,023$	$r_s = -0,436$ ; $p = 0,295$	$r_s = -0,536$ ; $p = 0,215$
Опади	$r_s = -0,857^*$ ; $p = 0,014$	$r_s = -0,214$ ; $p = 0,645$	$r_s = -0,786^*$ ; $p = 0,036$
Сонячна постійна	$r_s = -0,794^*$ ; $p = 0,033$	$r_s = 0,033$ ; $p = 0,880$	$r_s = -0,548$ ; $p = 0,203$
Температура	$r_s = -0,510$ ; $p = 0,242$	$r_s = 0,094$ ; $p = 0,840$	$r_s = -0,567$ ; $p = 0,184$

Отримані результати кореляційного аналізу показали різноманітність значень. Висота над рівнем моря та середня температура не впливали на накопичення компонентів у досліджуваних зразках Шафрану. Тим не менш, пікрокроцин мав помірну позитивну та статистично надійну кореляцію з довготою ( $r_s = 0,857$ ;  $p = 0,014$ ), а також помірні негативні кореляції були виявлені для інших параметрів, таких як широта ( $r_s = -0,821$ ;  $p = 0,023$ ), кількість опадів ( $r_s = -0,857$ ;  $p = 0,014$ ) і сонячна стала ( $r_s = -0,794^*$ ;  $p = 0,033$ ). Таким чином, найбільшу кількість пікрокроцину мали місця з річною кількістю опадів у межах 36-38 мм. Крім того, найбільш підходящим діапазоном сонячної постійної був 3,44-3,55, хоча зразок шафрану з Миколаїва з 3,55 показав дещо менший вміст пікрокроцину ( $10,37 \pm 0,06$  мкг/г). З іншого боку, вміст шафраналю сильно залежав від кількості опадів ( $r_s = -0,786$ ;  $p = 0,036$ ), Відповідно, місця, де кількість опадів була в межах 36-37 мм, мали найбільший вміст шафраналу.

Позитивні кореляції відмінено для врожайності шафрану зі збільшенням тривалості світла та меншою кількістю опадів. На вміст пікрокроцину та шафраналю українських зразків мали вплив довгота, широта, кількість опадів та

тривалість сонячного саява. Північні регіони мають нижчі температури та більша кількість опадів в осінній період (близько 35–45 мм/місяць), що є сприятливим для вирощування к. посівного та отриманню шафрану високої якості. Таким чином, встановлено, що на накопичення кроцинів в першу чергу впливають температура повітря та кількість опадів з вересня по грудень.

Порівняння результатів СФ-досліджень (табл. А.42, Додатки) із даними літератури, свідчать, що українські зразки шафрану за вмістом пікрокроцину та шафраналу є близькими до зразків шафрану із Італії (Val Trompia) [313] та Марокко (Taliouin) [78]: вміст кроцинів  $E_{1cm}^{1\%}$  440 нм становить 234 та 276, відповідно. Приблизно однаковий вміст основних компонентів можна пояснити близькими кліматичними умовами країн: Італія (Сардинія) має висоту над рівнем моря 58 м що подібно до розташування смт. Любимівка, де вирощують шафран, середньорічна температура (16 – 20°C) є трохи вищою, ніж в Україні (10 – 12°C), а кількість опадів (Сардинія 300 – 600 мм/рік, Україна 350–450 мм/рік) приблизно однакові [314].

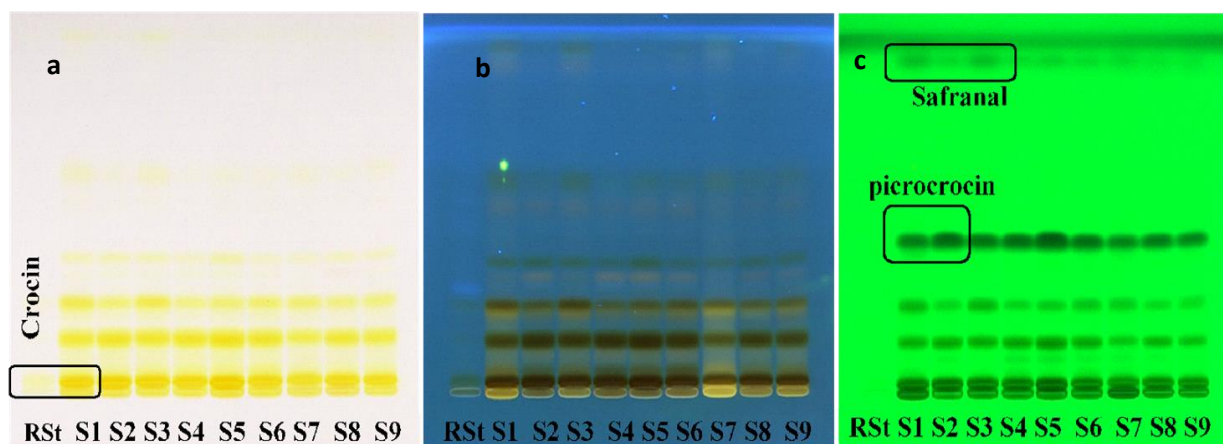
Слід зазначити, що такі параметри, як тривалість сонячного саява, сонячний УФ-індекс, тип ґрунту та тип клімату, мали найбільший вплив на вміст кроцинів, рутину, ферулової кислоти та хлорогенової кислоти у порівняльному аналізі зразків шафрану з 11 країн світу (табл. 3.8 – 3.9) [315]. Загальний вміст фенольних сполук і апокаротиноїдів був значно вищим у зразків з місць, розташованих на більшій висоті над рівнем моря, завдяки суттєвому збільшенню УФ-випромінювання та збільшенню адаптаційних захисних сил рослини на інтенсивне випромінювання. А вміст апокаротиноїдів збільшується за рахунок збільшення синтезу зеаксантину, попереднику у біосинтезі кроцинів (рис. 1.13).

Згідно з одержаними даними, шафран можна успішно вирощувати в деяких нетрадиційних місцях північних та центральних регіонів України [316 – 317].

### 3.5 Дослідження речовин-маркерів шафрану методом ВЕТШХ

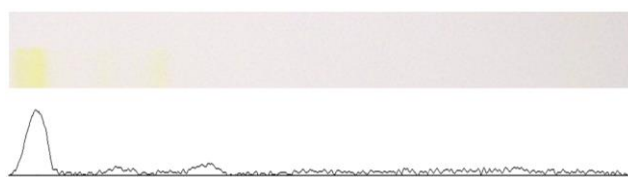
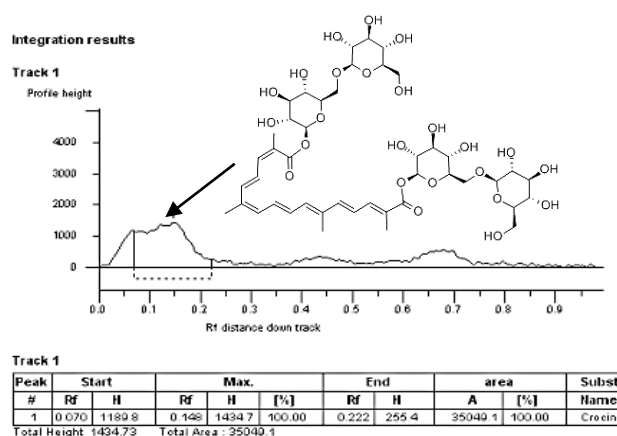
З метою розробки методик стандартизації, запропоновано та валідовано оригінальну методику ВЕТШХ для кількісного визначення шафраналу, кроцину, пікрокроцину на прикладі 11 зразків шафрану [311].

Основним завданням дослідження була оцінка роздільної здатності методики та визначення компонентного складу зразків шафрану методом ВЕТШХ. За основу було обрано вимоги «Ідентифікація D. ТШХ» з ЄФ 9.0 [299]. За цих умов метанольні екстракти зразків шафрану мали хорошу роздільність БАР. Зона стандарту кроцину ( $R_{Sr}$ ) мала характерну жовту флуоресценцію з  $R_f$  0,48 (рис. 3.14). Жовті зони кроцину та кроцетину ( $R_f$  0,14–0,15) зразків S1-S9 у видимому світлі характерні для метанольних екстрактів шафрану і показали пригнічення флуоресценції при УФ-254 нм. Забарвлена в жовтий колір зона ( $R_f$  0,41–0,43) при денному світловому режимі, присутня в зразках шафрану, стає темно-фіолетово-блакитною після дериватизації анісовим альдегідом, що підтвердило наявність у зразках пікрокроцину. Бліді ділянки шафраналу можуть з'являтися в діапазоні  $R_f$  0,66–0,68 після обробки хроматограм анісовим альдегідом і нагрівання при 100–105 °C протягом 5 хв. Віднесення плям пікрокроцину та кроцетину без стандартів проводили на основі значень  $R_f$ , часу виходу, порядку та порівняння літературних даних. На основі результатів, отриманих для українських зразків (S1 – S6), іспанського зразка (S7), марокканського зразка (S8) та іранського зразка (S9) шафрану було доведено, що вони мають подібний хімічний склад, гарне розділення речовин, різну інтенсивність або вміст основних компонентів. Порівняння еталонного стандарту кроцину на хроматограмі ВЕТШХ (рис. 3.15) і профілю ВЕТШХ типового розчину дослідного зразка (рис. 3.16) показує, що вибрані піки мають подібну хімічну природу, що підтверджує присутність кроцину в усіх зразках шафрану.



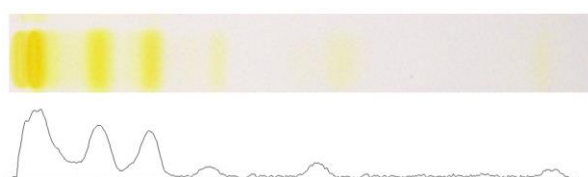
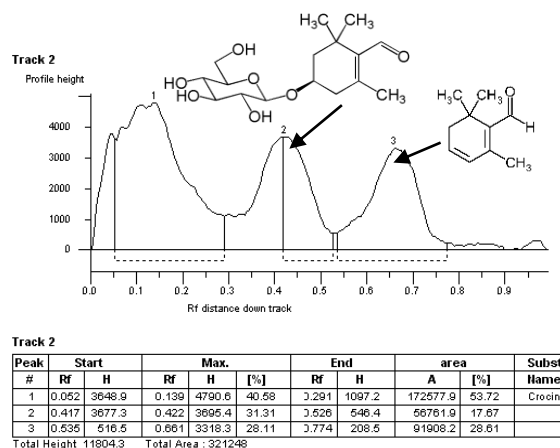
Шифри відповідають порядку треків у таблиці 3.12

Рис. 3.14 Хроматограми метанольних екстрактів шафрану в аналізі ВЕТШХ: (а) при денному світлі та (б) при 366 нм перед дериватизацією; (с) після дериватизації анісовим альдегідом при 254 нм



Пік 1 – стандарт кроцину

Рис. 3.15 Хроматограма ВЕТШХ стандарту кроцину (5 мг/мл) і хімічна структура сполуки



Пік 1 – кроцин, пік 2 – пікрокроцин, пік 3 – шафраналь

Рис. 3.16 Типова ВЕТШХ хроматограма зразка шафрану (з Херсонської області) при 366 нм до дериватизації

Однією з переваг методу ВЕТШХ є можливість кількісної оцінки вмісту компонентів та можливість проводити скринінг більшої кількості зразків за один і той же час. Дані розрахунку вмісту основних метаболітів шафрану в аналізованих зразках представлені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12

**Кількісний вміст основних сполук (%) у шафрані методом ВТШХ**

Трек *	Зразок	Кроцин		Пікрокроцин		Шафранль	
		R <sub>f</sub>	Вміст, %	R <sub>f</sub>	Вміст, %	R <sub>f</sub>	Вміст, %
RSt	Стандарт кроцину	0,148	-	-	-	-	-
S1	Херсон, Україна	0,139	29,12 ± 3,90	0,422	9,92 ± 2,50	0,661	15,51 ± 4,69
S2	Запоріжжя, Україна	0,139	33,25 ± 4,39	0,413	24,20 ± 4,63	0,665	12,89 ± 2,39
S3	Одеса, Україна	0,143	30,00 ± 3,99	0,426	21,67 ± 3,21	0,674	17,14 ± 2,17
S4	Чернігів, Україна	0,143	17,80 ± 2,42	0,426	21,02 ± 3,08	0,678	4,10 ± 0,97
S5	Миколаїв, Україна	0,139	27,37 ± 2,86	0,413	20,49 ± 2,56	0,674	4,13 ± 1,30
S6	Вінниця, Україна	0,148	26,08 ± 2,65	0,422	19,58 ± 2,83	0,678	4,81 ± 1,49
S7	Кастілія, Іспанія	0,126	17,26 ± 3,37	0,430	13,49 ± 2,77	0,674	10,17 ± 2,08
S8	Толуїдин, Марокко	0,152	24,47 ± 3,54	0,430	19,92 ± 2,75	0,678	5,08 ± 1,53
S9	Хорошан, Іран	0,152	32,34 ± 4,61	0,430	26,55 ± 3,59	0,683	7,16 ± 1,69

Примітка. \* Нумерація треків відповідає нумерації на рисунку 3.14.

Результати дослідження показали, що вміст кроцину в зразках українського шафрану становив 18–33%. Для зразків шафрану з Іспанії, Марокко та Ірану вміст кроцину становив 17%, 24% і 32% відповідно. Найбільший вміст пікрокроцину серед українських був у зразках із Запорізької області України (24%) що майже співставно з іранським (26%). Вміст шафраналу в українських зразках дуже різнився – від 4 до 17%. За результатами аналізу зразок шафрану із Запоріжжя визначено як оптимальний для розробки СОП для отримання робочих стандартів, оскільки має найвищий серед зразків вміст кроцинів (33%),

пікрокроцину (24%) та шафраналю (13%). Результати валідації методики ВЕТШХ представлені в таблиці А.9 (Додатки). Рівняння лінійної регресії для кроцину становило  $13,662x + 3425,2$  з коефіцієнтом кореляції  $r^2 0,9986$  у діапазоні концентрацій 5000 – 39,06 мкг/мл. Таким чином, запропонований метод може бути успішно застосований у фармакопейному аналізі як заміна методу ТШХ для швидкого скринінгу активних компонентів у шафрані та його контролю якості.

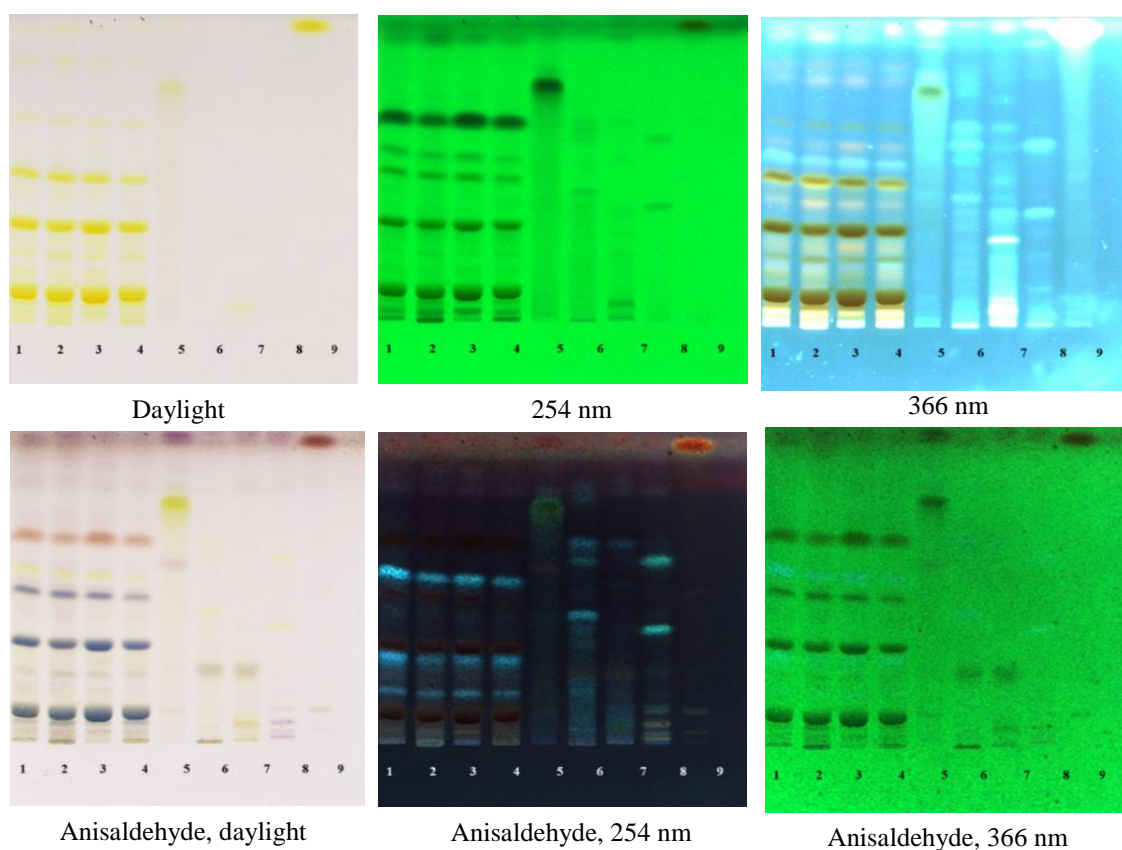
### 3.6 Розробка методик для виявлення фальсифікацій шафрану

Визначення фальсифікації ЛРС є одним з критичних факторів виробничого процесу. Шафран, як найдорожча пряність у світі, посідає четверте місце серед харчових продуктів за кількістю контрафактної продукції [318]. Деякі з продуктів можуть вплинути на здоров'я споживачів. Тому важливим є своєчасне виявлення таких фальсифікацій.

#### 3.6.1 Хроматографічне дослідження можливих фальсифікацій шафрану

Для визначення фальсифікацій метод спектрофотометрії, наведений в стандарті ISO, є непридатним, оскільки максимумами поглинання основних компонентів з великою долею вірогідності можуть бути хибно виявленими за рахунок груп БАР інших рослинних субстанцій. Для підтвердження автентичності шафрану та швидкого визначення типу фальсифікату нами було запропоновано використання методів хроматографії. Ми застосували умови, розроблені нами раніше для визначення апокаротиноїдів у зразках шафрану. Метою дослідження було визначення, чи добре розділяються та достовірно визначаються основні маркери шафрану – кроцин та пікрокроцин – з БАР потенційних фальсифікатів. В той же час в інших зразках вони не мають маскуватися іншими БАР ані до, ані після дериватизації. Методами ВЕТШХ (рис. 3.17) та ВЕРХ (рис. 3.18) та було проаналізовано шафран, а також його відомі фальсифікати.





Позначення треків: 1 – шафран з Херсону (2018); 2 – шафран з Херсон (2019); 3 – шафран з Миколаїв; 4 – шафран з Марокко; 5 – чорнобривці; 6 – тюльпан; 7 – сафлор; 8 – нагідки; 9 – куркума

Рис. 3.17 ВЕТШХ аналіз шафрану та його фальсифікатів

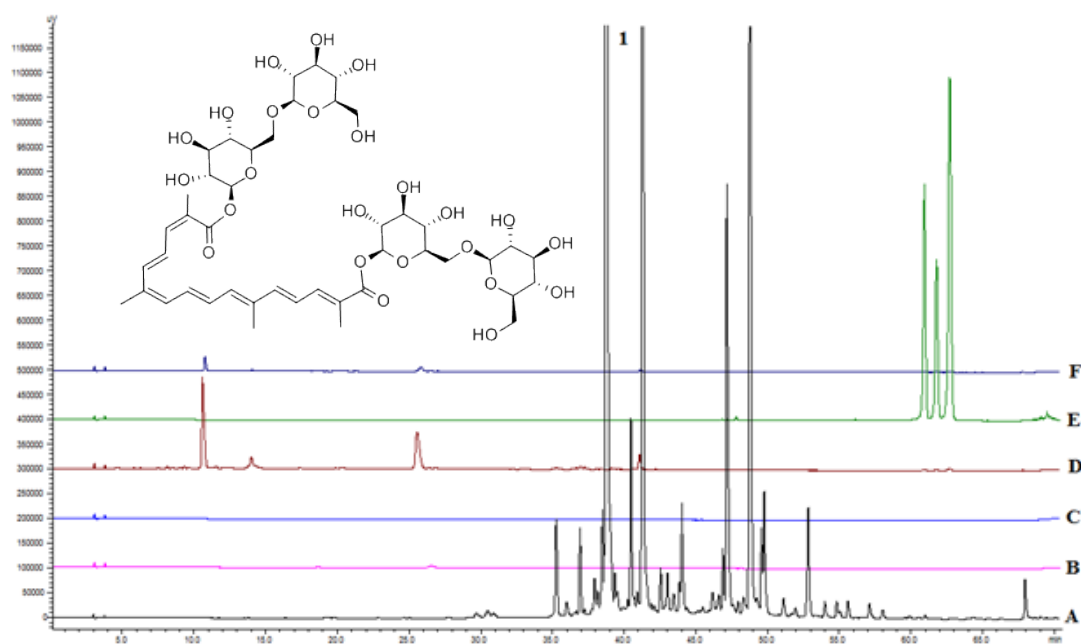


Рис. 3.18 ВЕРХ хроматограма метанольних екстрактів при 440 нм: 1 – кроцин стандарт; А – шафран; В – чорнобривці; С – нагідки; D – сафлор; Е – куркума; F – тюльпан

До відомих фальсифікатів, що включені в аналіз, відносяться: порошок кореневищ куркуми (*Curcuma longa*), крайові квітки сафлору (*Carthamus tinctorius*), крайові квітки календули (*Calendula officinalis*), крайові квітки чорнобривців (*Tagetes minuta*) та жовті тичинки тюльпану «Purple Palette» (*Tulip*).

Екстракт шафрану показав гарне розділення кроцину ( $R_f$  0,20) та пікрокроцину ( $R_f$  0,55) на пластинах у рухомій фазі: вода, 2-пропанол, етилацетат (10:25:65), зони мають характерну жовту флуоресценцію. Після обробки хроматограм анісовим альдегідом плями забарвлюються від інтенсивне-синього до синювато-зеленого кольору (кроцин). Кроцин, який є маркером якості шафрану, а також пікрокроцин за таких умов у досліджуваних фальсифікатах не виявлено (рис. 3.17). Дані ВЕТШХ корелювали з даними аналізу ВЕРХ, де характерні піки кроцину ( $R_t$  28,37 хв, UV  $\lambda_{max}$  261, 440, 466 нм) були відсутні в екстрактах фальсифікатів (рис. 3.18). Умови визначення, що наведені на рисунку 3.18: А: денне світло; В: в УФ-світлі, 254 нм; С: пластину обприскують розчином анісового альдегіду Р, нагрівають до 100 – 105°C протягом 5 – 10 хв і визначають при денному світлі. Таким чином, запропоновані нами умови хроматографування (ВЕТШХ та ВЕРХ) дозволяють надійно розрізнити справжні зразки шафрану та його найбільш поширені фальсифікації.

### 3.6.2 Розробка методики визначення колхіцину у рослинній сировині

Шафран важливий завдяки своїм смаковим властивостям у харчовій промисловості та своїм лікувальним властивостям у фармацевтичній промисловості. Справжній шафран має відповідати вимогам якості, встановленим специфікаціями FDA або ISO, а також повинен бути безпечним і нетоксичним. *Colchicum autumnale* (пізньоцвіт осінній, Colchicaceae), що містить високотоксичний алкалоїд колхіцин, часто помилково приймають за к. посівний. Ці рослини мають кілька схожих ознак: однакові підземні органи (бульбоцибулини), зовнішня схожість надземних частин, забарвлення оцвітини, період цвітіння (жовтень-листопад) [319]. Проблема полягає в тому, що у всіх

частинах різних видів пізньоцвіту міститься токсичний алкалоїд колхіцин [320]. Колхіцин є нервово-паралітичною отрутою, яка зазвичай використовується в медицині для лікування та профілактики подагри, склеродермії та сімейної середземноморської лихоманки [321]. Описано кілька випадків, коли звичайна людина приймала дикий «крокус осінній» за к. посівний. Рослину збирали, готували та споживали з нею їжу, в результаті чого відбувалося швидке смертельне отруєння [322]. З іншого боку, є експериментальні дані, коли колхіцин використовується для підвищення врожайності шафрану або для його клонової селекції [323], і він може накопичуватися в рослинній сировині. Проте визначення колхіцину в кінцевому продукті не проводилося.

Незважаючи на велику кількість методик аналізу колхіцину у ЛРС, їх не використовували для визначення колхіцину в інших видах крокусів, хоча проблема фальсифікації різноманітної сировини крокусів існувала. Для наших задач необхідним є те, щоб методика надійно гарантувала як позитивний, так і негативний результат, а таких відомостей на сьогодні в літературі не наводиться. Тому наше дослідження було спрямоване на розробку методики ВЕРХ для визначення присутності або підтвердження відсутності колхіцину в БЦ, квітках і приймочках к. посівного. Така методика може вирішити питання про можливу фальсифікацію шафрану або оцінити його потенційну токсичність за рахунок обробки виробничих ділянок колхіцином для збільшення врожайності.

Для визначення колхіцину ми взяли за основу запропоновано методику ВЕРХ, що використовували раніше для аналізу речовин-маркерів у шафрані, але в нього було внесені деякі зміни з урахуванням хімічних властивостей алкалоїду колхіцину. Зокрема, як рухома фаза були обрані 0,1% розчин оцтової кислоти у воді та ацетонітрил, для кращих результатів розділення застосовувалося градієнтне елюювання. Метод показав хорошу роздільну здатність і коректність визначення колхіцину та основних компонентів сировини. Відповідно до максимумів поглинання колхіцину на УФ-спектрах детекції ВЕРХ довжина хвилі була встановлена на 350 нм (рис. 3.19).

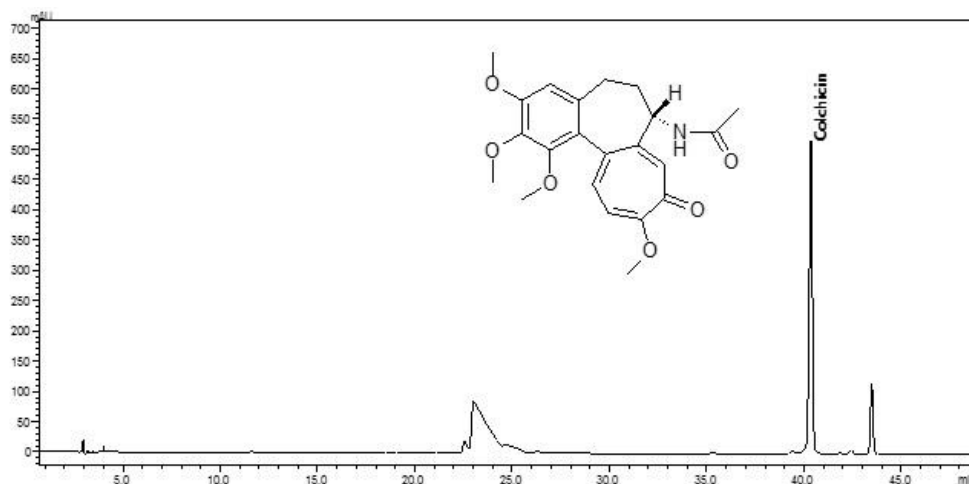
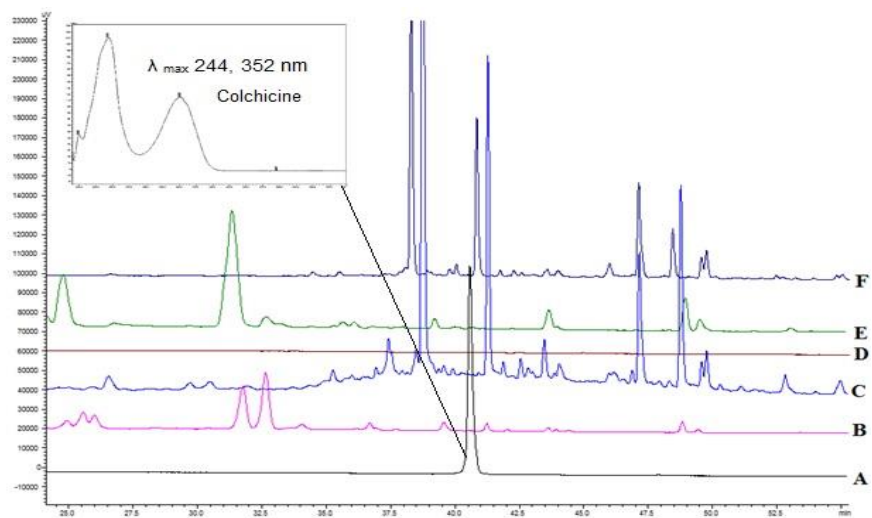


Рис. 3.19 ВЕРХ хроматограма метанольного екстракту БЦ пізньоцвіту осіннього

Коректність запропонованої методики підтверджено в ході її валідації відповідності до рекомендацій ICH Q2 (R<sup>1</sup>) [250]. Для визначення лінійного діапазону готували і використовували розчин стандарту колхіцину готували в 50% метанолі і використовували для визначення лінійного діапазону. Результати стандартних калібрувальних кривих і лінійність наведені в таблиці А.9 (Додатки). Були досягнуті хороші лінійні залежності та коефіцієнти кореляції ( $R^2$  0,99998). Значення межі виявлення (LoD) (сигнал/шум = 3) і межі кількісного визначення (LoQ) (сигнал/шум = 10) колхіцину вказують на те, що аналітичний метод був прийнятним із відмінною чутливістю. Точність часу утримування та площ піків колхіцину для повторної ін'єкції становила 0,89% від RSD ( $n = 6$ ). Відтворюваність та повторюваність методу оцінювали шляхом аналізу шести ін'єкцій розчину зразка та двох повторів екстракції сировини к. посівного відповідно. Щоб підтвердити точність методу, був проведений експеримент із відтворенням. Внутрішньоденна мінливість прецизійності була проаналізована трьома повторами при низькій, середній та високій концентраціях. Міжденну мінливість прецизійності аналізували трьома повторами кожного дня протягом трьох днів поспіль. RSD внутрішньоденної варіабельності знаходився в діапазоні 0,83 – 1,02%, тоді як міжденна варіабельність була в діапазоні 0,87–1,05%. Середній відсоток вилучення колхіцину становив від 99,92% до 100,47%. Результати точності відображені в таблиці А.10 (Додатки). Результати

продемонстрували, що умови для аналізу колхіцину були повторюваними та точними. Специфічність оцінювали шляхом порівняння хроматограм, отриманих при аналізі холостого зразку, стандартного розчину та розчину досліджуваного зразку. Ідентифікація процесу ґрунтувалася на порівнянні часу утримування стандартного піку колхіцину (40,6 хв) та УФ-спектрів відповідних піків. Запропонований метод ВЕРХ також був випробуваний на БЦ *S. autumnale*, щоб підтвердити його придатність і надійність для виявлення колхіцину. Основні піки на хроматограмі рослинного екстракту (рис. 3.20) були визначені шляхом порівняння зі стандартом колхіцину на основі його УФ-спектрів і відносного часу утримування аналіту. Метод мав гарне розділення, і колхіцин можна було точно ідентифікувати на хроматограмі екстракту БЦ *Colchicum* з часом утримування 40,54 хв і УФ  $\lambda_{\max}$  244, 352 нм, що повністю збігається з літературними даними [320, 321].



А – стандарт колхіцину (53,4 мкг/мл;  $\lambda_{\max}$  244, 352 нм); В – квітки, Миколаїв, С – приймочки, Херсон, D – бульбоцибулини, Херсон, E – квітки, Херсон, F – приймочки, Миколаїв

Рис. 3.20 ВЕРХ-хроматограма стандарту колхіцину та метанольних сировини к. посівного, записані при 350 нм

Піки інтеграції на хроматограмі досліджуваних розчинів ЛРС к. посівного за часом утримування не відповідають піку на хроматограмі стандартного розчину колхіцину (рис. 3.20), що свідчить про відсутність токсичної речовини у сировині к. посівного. Максимуми на спектрах поглинання стандарту колхіцину також

відрізнялися порівняно з УФ-спектрами піків на хроматограмах досліджуваних екстрактів (табл. А.43, Додатки). Аналіз даних найближчих піків на хроматограмах досліджуваних розчинів показав наявність кількох кроцинів у зразках шафрану, а також флавоноїдів у квітках к. посівного. В екстракті БЦ не було піків. Піки *транс*-кроцинів на хроматограмах були ідентифіковані на основі часу утримування, УФ-спектрів і послідовності вихідних піків відповідно до COST Action FA 1101 [324]. У метанольному екстракті шафрану орієнтовно виявлені такі компоненти: *транс*-кроцин-4, *транс*-кроцин-3 і *транс*-кроцин-2. Флавоноїди кверцетин і похідні кемпферолу були ідентифіковані у зразках квіток к. посівного на основі УФ-даних референт-зразків та літературних даних [69].

### 3.7 Розробка монографії ДФУ «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» для введення до національної частини ДФУ

Якість приймочок к. посівного регламентується різними нормативними документами, проте у ДФУ така монографія була відсутня.

#### 3.7.1 Обґрунтування вибору речовин-маркерів сировини та екстрактів шафрану

Вибір хімічних маркерів має вирішальне значення для контролю якості ЛРС та ЛРЗ, а також для ідентифікації та автентифікації. Найбільш правильними вважаються фармакологічні маркери, тобто ті компоненти, які визначають її фармакологічну активність. Для ЛРС існує кілька маркерів якості, оскільки речовини діють синергічно. Оцінка придатності сполук як маркерів ґрунтувалася на підході Herb MaRS за результатами хімічного скринінгу та визначеної цитотоксичної активності проти меланоми, потрійно негативного раку молочної залози та гліобластоми, а також даними літератури із передбачуваним використанням речовини (у даному випадку – протипухлинного). Крім того, було

враховано наявність еталонної сполуки для аналізу, її біодоступність та кількісний вміст у зразках українського шафрану (рис. 2.4)

Основними компонентами шафрану відповідно до даних літератури та власних експериментальних даних є кроцини (кількісний вміст > 40 мг/г у сухих екстрактах), шафраналь (> 11 мг/г), пікрокроцин (> 63 мг/г), рутин (> 3 мг/г) та апігенін (1 – 8 мг/г в залежності від екстрагента). Відповідно до критеріїв підходу Herb MaRS, обрані сполуки мали значення рейтингу >5, що свідчить про найбільшу відповідність бути маркером. Сполуки, представлені в таблиці А.44 (Додатки), можна розглядати як потенційні Q-маркери шафрану з точки зору відносної важливості в лікуванні раку, якщо вони виявлені в досліджуваних зразках. Крім того, усі розглянуті сполуки мають доступні стандарти.

### 3.7.2 Розробка методики одержання робочих стандартних зразків пікрокроцину та кроцинів

Еталонний стандарт пікрокроцину можна придбати у багатьох дистриб'юторів, але його вартість є дуже високою. Крім того, існує проблема відсутності стандартів деяких кроцинів (кроцин 2, кроцин 3), які є фармакологічними компонентами шафрану. Ми вдалися до розробки методики отримання робочих стандартних зразків пікрокроцину та кроцинів (транс-4GG, транс-2G, транс-3Gg) методом препаративної хроматографії на прикладі зразка шафрану із Запоріжжя. Для проведення досліджень попередньо одержаний екстракт шафрану ліофілізували, оскільки саме спосіб ліофілизованого сушіння рослинних екстрактів забезпечує мінімальний час висихання і при цьому зберігає чутливість до сполук теплових речовин [325].

Висушений екстракт використовували для препаративного виділення за допомогою хроматографічної колонки Symmetry Prep C<sub>18</sub> (300 × 19 мм × 7 мкм). В результаті було отримано чотири сполуки, з приблизним виходом кожної – 2 мг. Пікрокроцин і кроцини (*транс-4GG*, *транс-2G*, *транс-3Gg*) виділено з чистотою

97,75% і 94,12–98,41% відповідно. На рисунку 3.21 наведено УФ-спектри та ВЕРХ хроматограми виявлених сполук, інші дані наведені у таблицях А.8-А.15 (Додатки).

ВЕРХ хроматограми (рис. 3.21, 3.22) метанольного екстракту шафрану (50%), записані при 310 нм, 440 нм, 250 нм, показали наявність від 9 до 10 піків. Піки сполук були ідентифіковані та попередньо визначені відповідно до *Tarantilis* [68] на основі часу та послідовності вихідних піків, на УФ-спектрах *цис*-/*транс*-ізомерної форми кроцетину та *транс*-кроцинів (рис.1.8).

Більшість сполук із часом утримування в діапазоні 50–80 хв демонструють типові УФ-вид спектри кроцинів з інтенсивною смугою поглинання при 440 нм, характерною для естерів кроцетину. У метанольному екстракті шафрану попередньо було визначено такі компоненти: *транс*-кроцини (t-5tG, t-4GG, t-3Gg, t-2G) та *цис*-кроцини (c-5tG, c-4GG, c-3Gg, c-2G). УФ-спектр пікрокроцину має характерну широку смугу поглинання при 250 нм через наявність у його структурі  $\alpha,\beta$ -ненасиченого циклоальдегіду [68]. Кемпферол диглікозид був ідентифікований у досліджуваному екстракті шафрану на основі співставлення даних часу утримування та спектру поглинання. У результаті порівняння УФ/Вид спектрів кроцинів виявлено їх *транс*- та 13-*цис*-ізомери. Спектри 13-*цис*-ізомерів кроцинів мають додаткову смугу поглинання приблизно при 350 нм, яка є специфічною для цих речовин. У цьому випадку кроцин-3 і кроцин-2 є *транс*-ізомерами, оскільки немає додаткової смуги. У шафрані з України не виявлено *цис*-кроцин-1 (c-1g) та *транс*-кроцин 2' (t-2gg), що можна додатково використовувати для географічної простежуваності ЛРС.

Для з'ясування структури сполук, виділених з метанольних екстрактів шафрану використовували метод UPLC-ESI-MS/MS. Використання електророзпилювальної мас-спектрометрії (ESI-MS) детекції в режимі негативних іонів дало можливість отримати масову фрагментацію кожної сполуки як додатковий метод для підтвердження їх структури. Їх час утримування (tR), молекулярні маси та дані MS/MS наведені в таблиці 3.13.



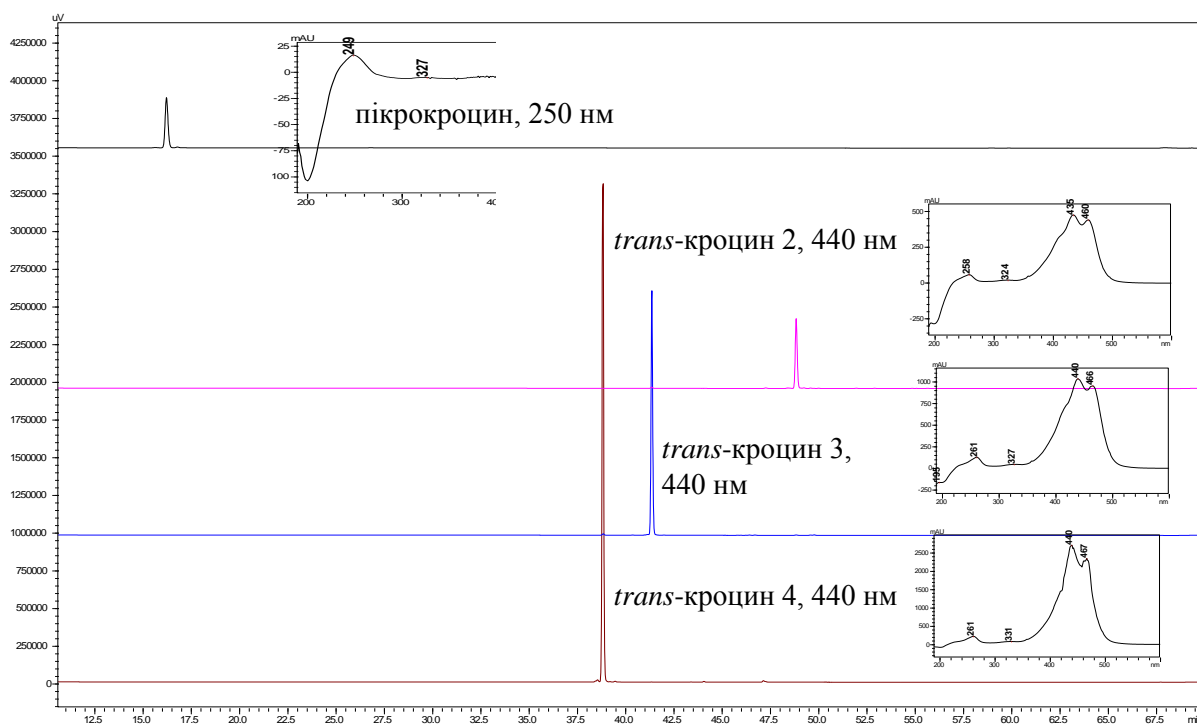
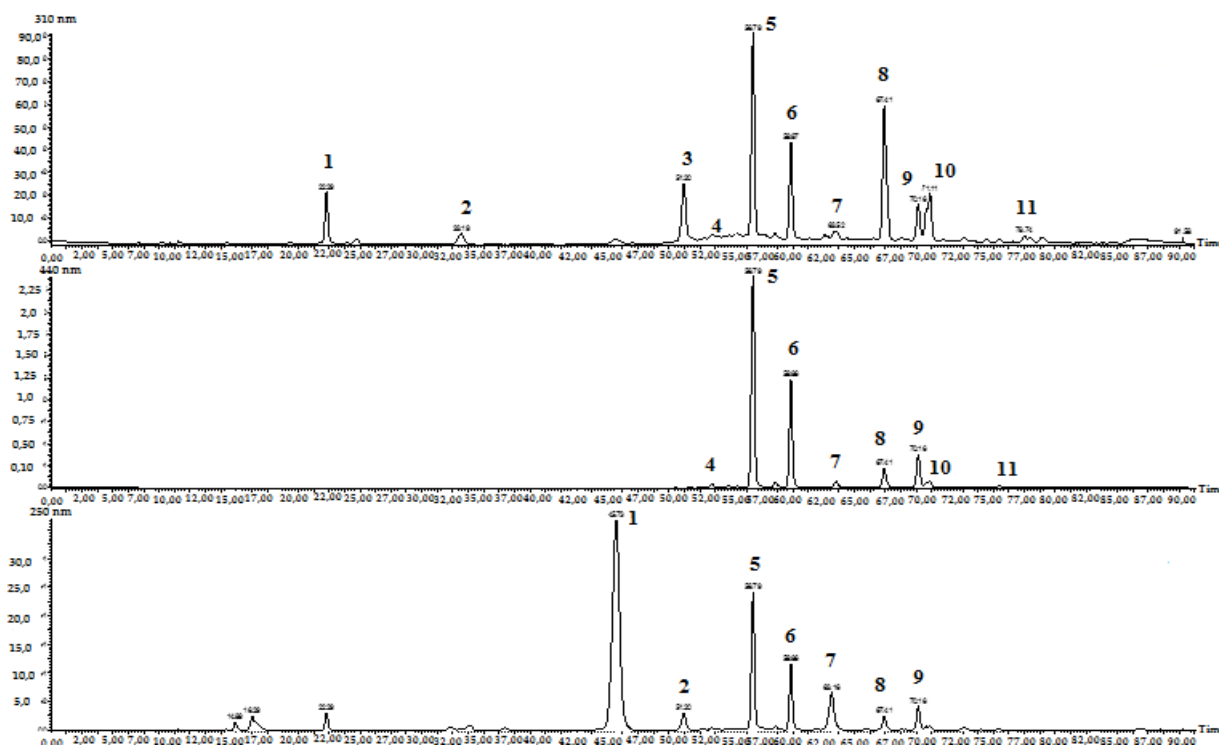


Рис. 3.21 ВЕРХ-DAD хроматограми чистих сполук шафрану



1 – пікрокроцин; 2 – форма пікрокроцинової кислоти; 3 – кемпферол диглікозид; 4 – *транс*-кроцин-5; 5 – *транс*-кроцин-4; 6 – *транс*-кроцин-3; 7 – *цис*-кроцин-5; 8 – *цис*-кроцин-4; 9 – *транс*-кроцин-2; 10 – *цис*-кроцин-3; 11 – *цис*-кроцин-2 (за Tarantilis [68])

Рис. 3.22 Типові ВЕРХ-хроматограми метанольного екстракту (50%) шафрану, записані при 310 нм, 440 нм, 250 нм

Таблиця 3.13

## Хроматографічні та спектральні дані виділених компонентів шафрану

Речовина	Abbreviation *	HPLC, R <sub>time</sub> , min	UV Max, nm	UPLC-MS, R <sub>time</sub> , min	[M – H] <sup>–</sup> , m/z	Fragment Ions, m/z	Adduct Ions (Formic Acid) [M – H + HAA] <sup>–</sup>	Молек.вага, г/мол	Чистота, % **
Пікрокроцин	-	45.70	249	4.42	N/O	N/O	375.1 [M – H + HA] <sup>–</sup> 365.2 [M – H + HCl] <sup>–</sup>	330	97.75
Кроцин 4 ( <i>trans</i> -crocetin di( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester)	t-4GG	57.00	261, 331, 440, 467	5.64	975.2	651.1 [M – H – Gnt] <sup>–</sup>	1021.0 [M – H + HA] <sup>–</sup> 978.3 [M – H + HCl] <sup>–</sup> 697.9 [M – H – Gnt + HA] <sup>–</sup>	976	98.41
Кроцин 3 ( <i>trans</i> -crocetin ( $\beta$ -D-glucosyl)-( $\beta$ -D-gentiobiosyl) ester)	t-3Gg	60.42	261, 327, 440, 466	6.35	813.1	651.3 [M – H – Glc] <sup>–</sup> 489.3 [M – H – Gnt] <sup>–</sup>	927.7 [M – H + HA + NaA] <sup>–</sup> 859.2 [M – H + HA] <sup>–</sup> 849.5 [M – H + HCl] <sup>–</sup>	814	97.85
Кроцин 2 ( <i>trans</i> -crocetin( $\beta$ -D-gentibiosyl) ester)	t-2G	70.56	258, 324, 435, 460	7.29	651.4	N/O	697.0 [M – H + NaA] <sup>–</sup> 812.1 [M – H + HA] <sup>–</sup>	652	94.12

Примітка. \* Аббревіатура відомих кроцинів представлена відповідно до [69]; \*\* Чистота, відсоток від загальної площі піку на хроматограмі. N/O – не спостерігається

У спектрі ESI–MS пікрокроцину ( $C_{16}H_{26}O_7$ ,  $m/z$  330) виявлено два іони приєднання (з мурашиною кислотою) при  $m/z$  375  $[M-H+HFA]^-$  та 365,2  $[M-H+HCl]^-$ . Максимум поглинання пікрокроцину спостерігався при 249 нм.

Основним компонентом шафрану був кроцин-4, кроцетин, естерифікований однією гентіобіозою на кожному кінці. Сполука (розрахована для  $C_{44}H_{64}O_{24}$ ,  $m/z$  976) утворювала молекулярний іон  $[M-H]^-$  з  $m/z$  975 (час утримування на хроматограмі 5,64 хв) та демонструвала поглинання в максимумах 261, 331, 440 і 467 нм. Під час утворення аддуктів з мурашиною кислотою в мас-спектрі кроцину 4 утворені піки з  $m/z$  1021,0 були ідентифіковані як  $[M-H+HA]^-$ , 978,3  $[M-H+HCl]^-$  та 697,9  $[M-H-Gnt+HA]^-$ . Представлена ідентифікація маси іонів також характерна для сполук, що містять один атом хлору, і узгоджується з раніше опублікованими спостереженнями *Lech* [326].

Мас-спектр кроцину-3 ( $C_{38}H_{54}O_{19}$ ,  $m/z$  814), кроцетин, естерифікований однією гентіобіозою на одному кінці та однією глюкозою на іншому, *транс*- та *цис*-ізомери має відповідний молекулярний іон  $[M-H]^-$  з  $m/z$  813. Спектр поглинання, зареєстрований для кроцину-3, має максимумами поглинання при 261, 327, 440 і 466 нм. Використання мурашиної кислоти як модифікатора рухомої фази дало інтенсивний сигнал з  $m/z$  859,2, що свідчить про утворення аддукту  $[M-H+HA]^-$ , а також показало наявність іонів адукції  $[M-H+HA+NFaA]^-$  з  $m/z$  927,7 та  $[M-H+HCl]^-$  з  $m/z$  849,5. Інші іони  $[M-H-Glc]^-$  з  $m/z$  651,2 були віднесені до залишку глюкозиду, а  $[M-H-Gnt]^-$  з  $m/z$  489,2 до гентіобіозилу, відповідно.

На мас-спектрі кроцину-2 ( $C_{33}H_{44}O_{14}$ ,  $m/z$  652) – кроцетину, естерифікованого однією гентіобіозою на одному кінці та вільною карбоксильною групою на іншому, міститься молекулярний іон  $[M-H]^-$  з  $m/z$  651 (час утримування на хроматограмі – 7,29 хв). Сполука має подібну до кроцин-4 і кроцин-3 фрагментацію іонів, а також має чотири максимума поглинання при 258, 324, 435 і 460 нм, характерні для родини кроцинів. Отримані дані добре узгоджувалися з раніше опублікованими дослідженнями [326, 327], що свідчить про надійне підтвердження структури отриманих кроцинів і пікрокроцину на основі аналізу мас-спектрів.

Таким чином, в результаті розділення з українського шафрану вперше отримано пікрокроцин і кроцини (*транс-4GG*, *транс-2G*, *транс-3Gg*). Ці сполуки мають високу чистоту і можуть використовуватися як робочі стандартні зразки для аналітичної роботи. Запропонований спосіб є простим і відтворюваним для рутинного аналізу контролю якості шафрану в умовах лабораторії.

### 3.7.3 Результати експериментальних досліджень з розробки монографії ДФУ «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>»

Аналіз сучасного стану науково-технічної документації (НТД) на цей вид ЛРС показав, що монографії на приймочки к. посівного є у всіх провідних фармакопеях світу: ЄФ 9.0 “*Saffron for homeopathic preparations. Croci stigma ad praeparationes homeopathicas*”, 2014 [299]; British Pharmacopoeia “*Saffron for Homeopathic Preparations*”, 2009 [328]; German Homeopathic Pharmacopoeia “*Crocus. Safran*”, 2003 [329]; Deutscher arzneimittel codex (DAC) “*Safran. Croci stigma*”, 1999 [330]; Ayurvedic Pharmacopoeia of India, “*Kumkuma (Style and stigma)*”, 2015 [331]; Taiwan Herbal Pharmacopoeia 2<sup>nd</sup> Ed. «*Croci stigma*», 2016 [332]; Japanese Pharmacopoeia 17<sup>nd</sup> Ed. «*Crude Drugs Saffron*», 2016 [333]; Chinese Pharmacopoeia “*Stigma Croci. Xihonghua*», 2005 [334], міжнародний стандарт ISO 3632 Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.), 2010/2011 [15, 16.]; FDA PART 73 – Listing of color additives exempt from certification Subpart A – Foods. Sec. 73.500 *Saffron* [335]; Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.), 2010/2011 [336, 337]; National Iranian Standards 259-1: Saffron – specifications and 259-2: Saffron-test methods, 1996 [338]. Проте слід зазначити, що усі НТД регламентують використовувати шафран по різному – як гомеопатичний лікарський засіб, як ЛРС чи як харчовий засіб.

Таким чином, на цей час існує широкий спектр підходів до стандартизації шафрану, зумовлений вмістом основних БАР, а тому розробка єдиних методик стандартизації як сировини, так і препаратів на її основі є актуальною. Для верифікації методик показників якості шафрану було обрано монографії ЄФ 9.0,

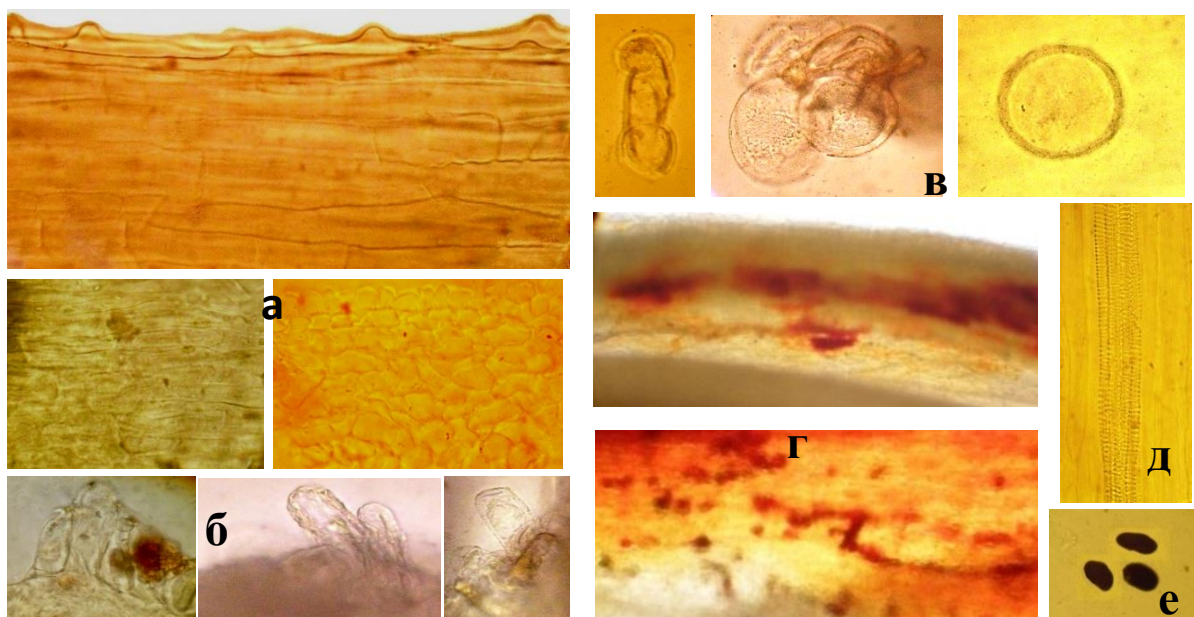
DAC та ISO 3632 для розробки проектів монографій на ЛРС приймочок к. посівного (табл. А.45, Додатки). Враховуючи те, що досліджувана сировина описана в ЄФ 9.0, DAC та інших НТД, але не описана в ДФУ, метою роботи було обґрунтування методики якісного та кількісного визначення БАР шафрану з урахуванням вимог ДФУ для розробки монографії на ЛРС (національної частини).

Досліджуючи критерії стандартизації та регламентації показників якості, наведені у зазначених вище документах, виявлено, що у них містяться розбіжності, які при цьому суттєво доповнюють один одного. У таблиці А.45 (Додатки) наведено результати аналізу досліджуваних зразків шафрану українського та порівняння вимог з нормативних документів, що висуваються для шафрану походження: ідентифікація А та В (макро- та мікроскопія сировини); ідентифікація С (ТШХ), а також випробовування (сторонні домішки; сторонні барвники, ТШХ, втрата в масі при висушуванні; загальна зола та кількісне визначення). На основі цих даних було сформовано фармакопейні вимоги.

*Ідентифікація А. Макроскопія.* При проведенні макроскопічних досліджень серій приймочок к. посівного було встановлено, що досліджувана сировина відповідає вимогам монографій ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632.

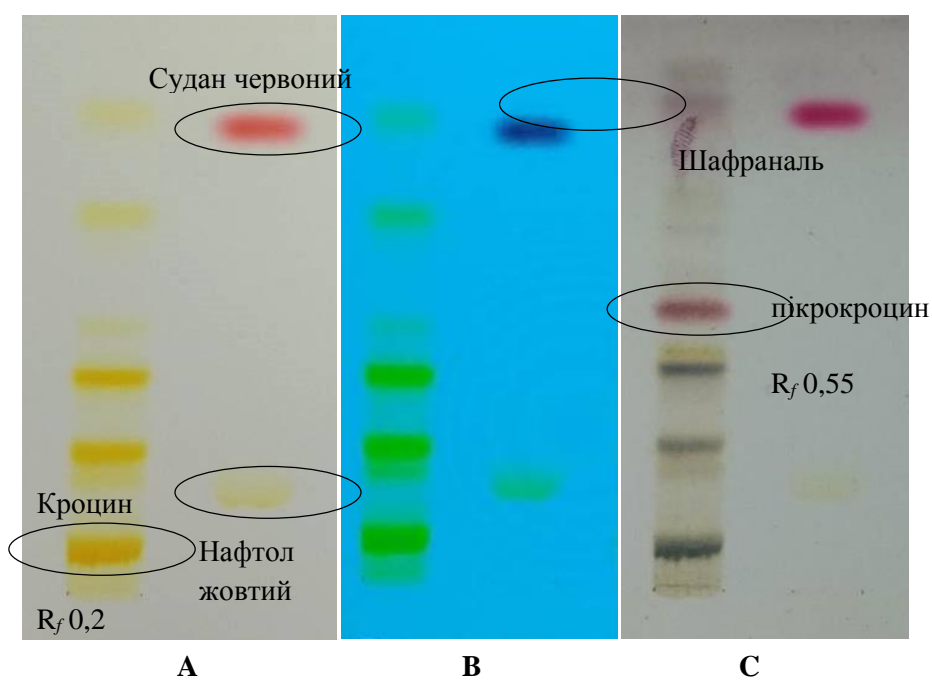
*Ідентифікація В. Мікроскопія.* Дослідження проводять для подрібненої сировини. У ході мікроскопічних досліджень у всіх зразках виявлено діагностичні анатомічні структури, характерні для приймочок к. посівного (рис. 3.23, табл. А.45 Додатки).

*Ідентифікація С. Тонкошарова хроматографія.* Ідентифікацію кроцінів у сировині проводили методом ТШХ відповідно до вимог DAC та ЄФ. На рис. 3.24 - представлена послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину шафрану та розчину порівняння. За денного світла (*виявлення А*) на хроматограмі розчину порівняння зверху виявляється червона зона Суданового червоного G, у нижній третині виявляється жовна зона нафтол-жовтого S. На хроматограмі випробовуваного розчину у нижній третині нижче стандарту проявляється одна жовта зона та вище неї – дві жовті зони.



а – епідерма поверхні приймачок з сосочками; б – край приймочки з сосочкоподібними й пальчастими виростами; в – пилкові зерна; г – пігментовані клітини епідерми і паренхіми приймочок; д – спіральні судини ксилеми стовпчика і приймочки; е – крохмальні зерна (після дії розчину Люголя)

Рис. 3.23 Анатомо-діагностичні ознаки цілих приймочок к. посівного

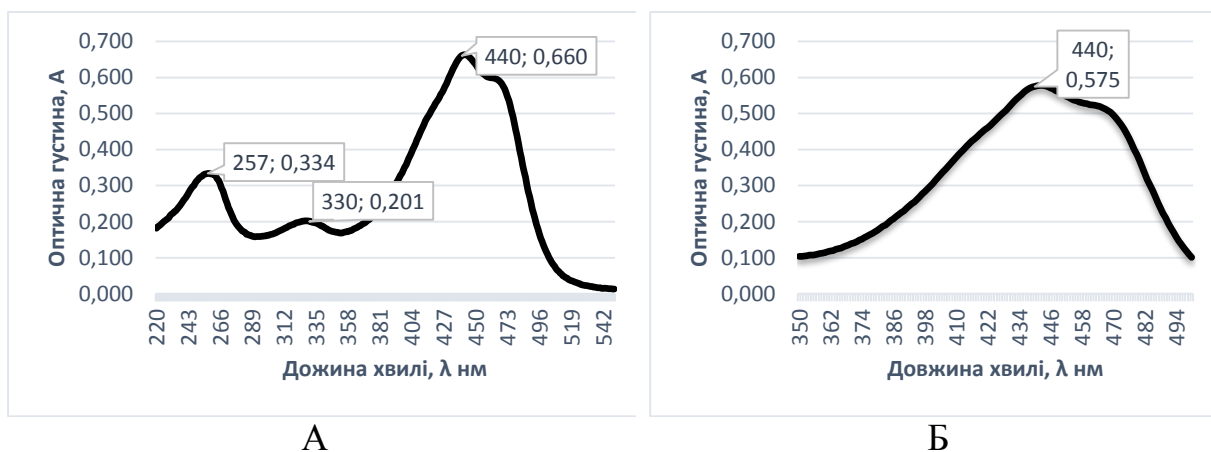


А. переглядають за денного світла; В. в УФ-світлі за 254 нм; С. після обприскування розчином анісового альдегіду і перегляду за денного світла після нагрівання за 100 – 105°C протягом 5 – 10 хв

Рис. 3.24 Хроматограми випробовуваних розчинів шафрану

У середній третині хроматограми може бути видно до двох блідо-жовтих зон. Зона з найменшим значенням  $R_f$  (кроцин) має найбільшу інтенсивність, що перевищує інтенсивність зони нафтол-жовтого S. На хроматограмі випробуваного розчину (*виявлення B*) видна темна зона при переході від нижньої до середньої третини та у верхній треті. При *виявленні C* видно, що на хроматограмі випробуваного розчину в нижній половині виявляється синьо-зелена зона (кроцин), над нею – дві синьо-зелені зони, над ними – зона від червоного до червоно-фіолетового кольору і у верхній половині – одна або дві блідо-червоно-фіолетові зони. На хроматограмі розчину порівняння у верхній частині виявляється малиново-червона зона Суданового червоного G, а під нею – виявляється жовта зона нафтолового-жовтого S. Слід відмітити, що екстракти шафрану дуже добре розділяються, зони мають характерну жовту флуоресценцію, з чітким визначенням  $R_f$ . Зони стандартів порівняння знаходяться дуже високо (рис. 3.24), навіть не на рівні з речовиною, що визначалась – кроцином ( $R_f$  0,15-0,25) та пікрокроцином ( $R_f$  0,55).

**Кількісне визначення.** У ЄФ 9.0 проводять визначення оптичної густини (інтенсивності забарвлення) водного витягу шафрану методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій області при 440 нм у перерахунку на кроцини. Відповідно до методики ISO 3632, кількісне визначення пікрокроцину, кроцинів та шафраналю, виражених як поглинання 1% водного розчину приймочок при 257 нм, 330 нм та 440 нм відповідно, проводять тим самим методом. Порівняння запропонованих методик показало, що тільки у ISO 3632 наведено визначення питомого показника поглинання для кроцинів за довжини хвилі 440 нм (інтенсивність забарвлення), для шафраналю при довжині хвилі 330 нм (аромат), для пікрокроцину за довжини хвилі 257 нм (гіркота), за якими визначають кількісний вміст компонентів; у ЄФ визначають лише показник поглинання кроцинів при 440 нм, що має становити не менше 0,44, при цьому не обчислюють кількісний вміст речовини. У DAC відповідна стаття відсутня зовсім. На рисунку 3.25 наведено типові спектри поглинання випробуваного розчину шафрану відповідно до методик ISO 3632 та ЄФ 9.0.



А. УФ спекти, отримані в умовах методики ISO 3632; Б. отримані в умовах методики ЄФ 9.0

Рис. 3.25 Типові спектри поглинання випробовуваних розчинів з приймочок крокусу посівного

Оптимальним ми вважаємо використання методики кількісного визначення основних сполук за допомогою спектрофотометричного аналізу відповідно до ISO 3632, де визначаються всі характеристичні компоненти – пікрокроцин, шафраналь та кроцини (табл. 3.14). Ці значення визначаються як пряме зчитування поглинання 1% водного розчину висушених приймочок при 257, 330 та 440 нм у кварцевій кюветі з товщиною шару 1 см.

Таблиця 3.14

**Результати визначення кількісного вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцинів у розчинах шафрану відповідно до методики ISO 3632, ( $\bar{x} \pm \Delta x$ ),  $P = 0,95$ ;  $\mu = 5$**

Номер серії	$A_{1cm}^{1\%}$ 257 нм Пікрокроцин (смак)	$A_{1cm}^{1\%}$ 330 нм Шафраналь (аромат)	$A_{1cm}^{1\%}$ 440 нм Кроцини (колір)
№1	73,63±1,30	43,54±0,77	158,66±2,79
№2	69,04±1,21	35,38±0,62	153,29±2,70
№3	81,23±1,43	31,72±0,56	221,04±3,89
№4	87,81±1,54	35,38±0,62	245,52±4,31
№5	90,40±1,59	37,76±0,66	248,11±4,36
№6	94,15±1,66	36,96±0,65	208,52±3,67
№7	57,62±1,01	38,48±0,66	49,30±0,87
№8	77,74±1,37	55,52±0,98	133,03±2,34



Таким чином, порівняльний аналіз вимог монографій аналізу шафрану з ЄФ 9.0, ДАС та ISO 3632 щодо показників якості шафрану та проведені дослідження дозволили запропонувати ввести наступні показники: визначення питомого показника поглинання: для кроцину ( $C_{44}H_{64}O_{24}$ ; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафраналу ( $C_{10}H_{14}O$ ; 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. Обрані речовини впливають як на якість сировини, так і на фармакологічну дію ЛРС. За результатами дослідження до національної частини ДФУ 2, доп. 2.4 включено монографію «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» [339].

*Методики контролю якості приймочок та екстрактів з приймочок к. посівного.* При пошуку маркерів стандартизації ми спирались на дані фармакологічного випробування індивідуальних сполук шафрану, а також на дані фармакологічного скринінгу та кореляційних досліджень. Для здійснення досліджень зі стандартизації сировини та сухих екстрактів шафрану здійснювали визначення показників якості для 5 серій кожного.

Крокусу посівного приймочки. *Croci sativus stigma*. Параметри якості наведено у монографії ДФУ «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» [339].

Крокусу посівного приймочок екстракт водний сухий. *Croci sativus stigma extractum siccum aqueum*. Крокусу посівного приймочок екстракт етанольний сухий. *Croci sativus stigma siccum hydroethanolum extractum*.

*Опис.* Однорідний порошок червоне-помаранчевого кольору, із слабким специфічним запахом, одержаний мацерацією водою очищеною / 70% етанолом з приймочок крокуса посівного (*Crocus sativus* L.).

*Ідентифікація.* ТШХ (2.2.27). Аналогічно дослідженню шафрану приймочок.

*Випробовування. Втрата в масі при висушуванні:* не більше 4% (водний екстракт), не більше 5% (70% етанол);

*Вміст важких металів:* не більше 0,001% (табл. А.46, Додатки);

*Мікробіологічна чистота:* Не більше  $10^4$  життєздатних бактерій. Не більше  $10^2$  життєздатних грибів. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*,

*S. aureus, S. aeruginosa.*

*Кількісне визначення.* 0,01 г сухого екстракту розчиняють у 20 мл води очищеної під дією ультразвуку, фільтрують крізь мембранні фільтри у віали для ВЕРХ. Субстанцію ідентифікують за вмістом кроцину – не менше 30 мг/г (для водного екстракту), не менше 150 мг/г (для етанольного екстракту).

*Інтенсивність забарвлення, гіркоти, аромату.* 0,1 г екстракту розчиняють у 100 мл води, проводять екстракцію впродовж 1 год на магнітній мішалці при кімнатній температурі, фільтрують. Потім відбирають 20 мл витягу та доводять до 100 мл, знімають УФ спектр (рис. 3.26) аналогічно дослідженню шафрану.

Для водного/етанольного екстракту шафрану, значення питомого показника поглинання ( $E_{1\text{см}}^{1\%}$ ) для кроцину при довжині хвилі 440 нм становить не менше 170 / 230, для шафраналу при довжині хвилі 330 нм значення становить не менше 40 / 70, для пікрокроцину за довжини хвилі 257 нм значення становить не менше 100 / 170.

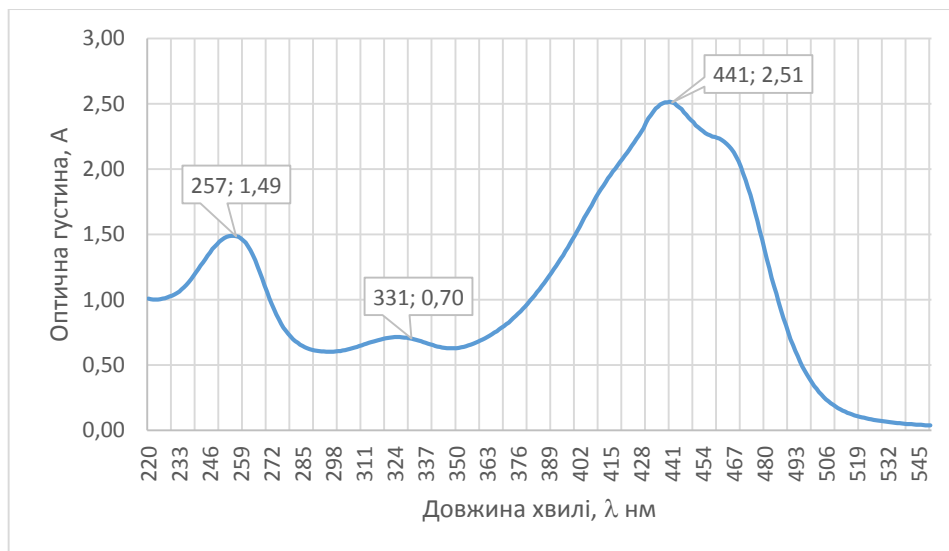


Рис. 3.26 УФ-спектр аналітичного розчину, одержаного з сухого водного екстракту шафрану відповідно описаному методу

За заявленими параметрами стандартизації в умовах виробництва було здійснено контроль якості для 5 серій сухих екстрактів шафрану (Табл. А.34-А.40, Додатки).

### 3.8 Обговорення фармакологічної активності екстрактів шафрану

Перед дослідженням рослинних екстрактів *in vitro*, та доклінічного *in vivo*, екстракти було піддано поглибленому дослідженню з елементами стандартизації, а також визначено вміст та ідентичність ключових БАР-маркерів. Для всіх одержаних екстрактів було встановлено профіль та вміст активних компонентів та проведено аналіз їх впливу на фармакологічну активність.

#### 3.8.1 Одержання екстрактів з шафрану та дослідження їх хімічного складу

За результатами хімічного скринінгу, а також враховуючи наявну сировинну базу к. посівного у Херсонській області, саме сировина з цього регіону була обрана для фармакологічних досліджень. Враховуючи, що компонентний склад БАР у рослинних екстрактах в залежності від розчинника є різним, ми проводили попереднє визначення основних компонентів різних розчинників, щоб вибрати найкращий розчинник. За результатами СФ-досліджень загального вмісту фенольних сполук, флавоноїдів та загальної антиоксидантної дії екстрактів, а також екстрактивних речовин, найбільш привабливими екстрагентами для екстрагування були 70% етанол і вода (рис. 3.27). Використання 96% етанолу давало вихід 35%, що майже на 5% менше порівняно з 70% етанольним екстрактом. Крім того, економічніше використовувати 70% етанол. З іншого боку, вода є універсальним розчинником, екологічно чистим, виділяє значну кількість сполук із рослинної сировини. Дані щодо вибору методу екстракції та екстрагента наведені в магістерській роботі С. Ромашко (Литовський університет наук про здоров'я, керівник проф. Л. Іванаускас). Одержання екстрактів БАР з шафрану проводили за шляхом мацерації при кімнатній температурі, щоб мінімізувати розкладання фенольних сполук і каротиноїдів.

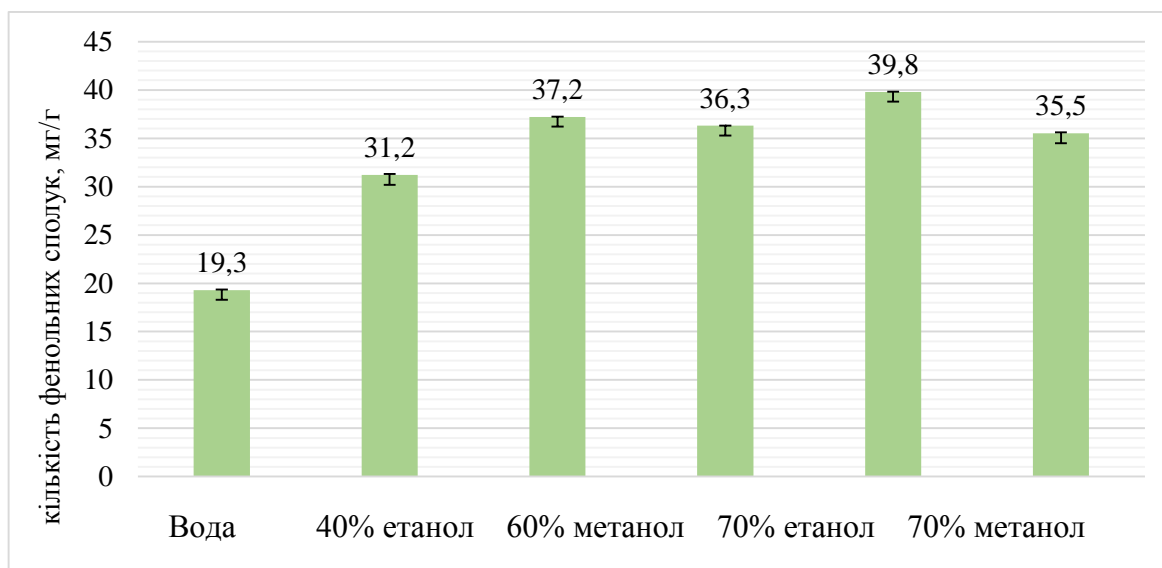


Рис.3.27 Загальна кількість фенольних сполук (мг/г) з використанням води та різних концентрацій суміші вода-етанол і вода-метанол (n=3)

Для визначення складу активних інгредієнтів у досліджуваних екстрактах використовували метод ВЕРХ. Хроматограми водного та етанольного екстрактів шафрану наведені на рисунках А.47–А.49 (Додатки). Результати хімічного складу сухих екстрактів шафрану представлені в таблиці 3.15.

Таблиця 3.15

**Вміст БАР (мг/г сухої маси) у водному та етанольному (70%) сухих екстрактах шафрану**

Сполуки	RT, хв	$\lambda$ , нм	УФ, $\lambda_{\max}$ , нм	Екстракт шафрану	
				Водний	Етанольний
Маркерні сполуки					
Кроцин	28.37	440	261, 440, 466	38,27 ± 0,03	163,02 ± 1,16
Пікрокроцин	25,88	250	249, 327	62,25 ± 0,10	197,19 ± 5,60
Шафраналь	55,85	310	231, 312	10,81 ± 0,03	146,66 ± 3,07
Флавоноїди					
Рутин	22.48	310	256, 352	3,07 ± 0,02	14,81 ± 0,41
Апігенін	47,90	250	237, 267, 337	0,96 ± 0,01	8,39 ± 0,15
Гідроксикоричні кислоти					
Кофейна кислота	14.18	310	217, 236, 342	0,11 ± 0,00	0,38 ± 0,01
Ферулова кислота	21.64	310	218, 236, 323	0,13 ± 0,03	0,26 ± 0,00

Як видно з одержаних результатів, вміст кроцину в екстрактах шафрану становив 38 мг/г (3,8 %) у водному та 163 мг/г (16,3 %) – у етанольному. Вміст пікрокроцину було перераховано як еквівалент шафраналю та виявлено в етанольному сухому екстракті шафрану – 197 мг/г (19,7%). У водному екстракті виявлено пікрокроцин у меншій концентрації (62 мг/г). У досліджуваних сухих екстрактах шафрану вміст шафраналю становив 146,6 мг/г у етанольному та 10,81 мг/г – у водному екстракті.

Окрім естерів кроцетину, пікрокроцину та шафраналю виявлено інші БАР. Зокрема, нами вперше одержано дані щодо ідентифікації флавоноїдів апігеніну та рутину в шафрані. Вміст рутину та апігеніну в етанольному екстракті шафрану був значно вищим (14,8 мг/г і 8,38 мг/г відповідно), ніж у водному екстракті (3,07 мг/г і 0,96 мг/г). У етанольному екстракті також виявлено ферулову та кофейну кислоти у кількості відповідно 0,26 та 0,38 мг/г. Таким чином, вміст усіх речовин-маркерів у етанольному екстракті був значно вищим, ніж у водному.

Амінокислоти, будучи навіть мінорними компонентами у загальній сумі БАР, відіграють важливу роль у прояві багатьох фармакологічних ефектів. Методом ГХ-МС проведено визначення амінокислот у водному сухому екстракті шафрану. Всього було ідентифіковано 4 вільні амінокислоти. Найбільший вміст мав тирозин ( $326,6 \pm 6,9$  мкг/г). Дещо в менших кількостях виявлено метіонін ( $84,1 \pm 2,4$  мкг/г), також ідентифіковано серин ( $14,2 \pm 0,2$  мкг/г) та аланін ( $60,0 \pm 2,1$  мкг/г). Дані наведено у таблиці А.47 (Додатки). Для водного екстракту шафрану також відмічено високий вміст заліза (100,02 мг/л) (табл. А.46, Додатки).

Кількісний аналіз БАР у сухих екстрактах показав, що кроцин, пікрокроцин і шафраналь були основними компонентами екстрактів шафрану. Наявність флавоноїдів з їх потенцією антипроліферативною та цитотоксичною активністю [113, 114], спонукала провести дослідження цитотоксичної активності екстрактів українського шафрану.

### 3.8.2 Дослідження антиоксидантної дії методом *in vitro*

Дослідження загальної антирадикальної активності шафрану проведено з використанням реактиву АВТС ( $n=3$ ). Отримані результати виражали в тролоксеквівалентах (ТЕ/1 г) (рис. 3.28). Для оцінки активності досліджено ЛРС, зібрану в різні роки у Херсоні, порівнюючи їх зі зразками з Азербайджану (Апшерон). Шафран з Херсону (врожай 2017 р.) мав найвищу активність зв'язування радикалів АВТС-катионів (215,1 мкмоль/г). Шафран з Азербайджану показав меншу, але також чітко помітну активність (178,44 мкмоль/г). Найнижча активність виявлена у шафрані з Херсону (врожай 2018 р.) (146,03 мкмоль/г), шафран 2019 р. характеризувався дещо вищою антирадикальною активністю (162,93 мкмоль/г). Це додатковим чином свідчить про коливання хімічного складу та відповідно антиоксидантної активності в залежності від кліматичних коливань навіть при вирощуванні в одній місцевості. Крім того, з 2016 р. проводили вирощування з к. посівного з дотриманням розроблених вимог, що також сприяло збільшенню компонентів. Одержані результати показали, що сумарна активність зразків шафрану (702,5 мкмоль/г) з України є достатньо високою.

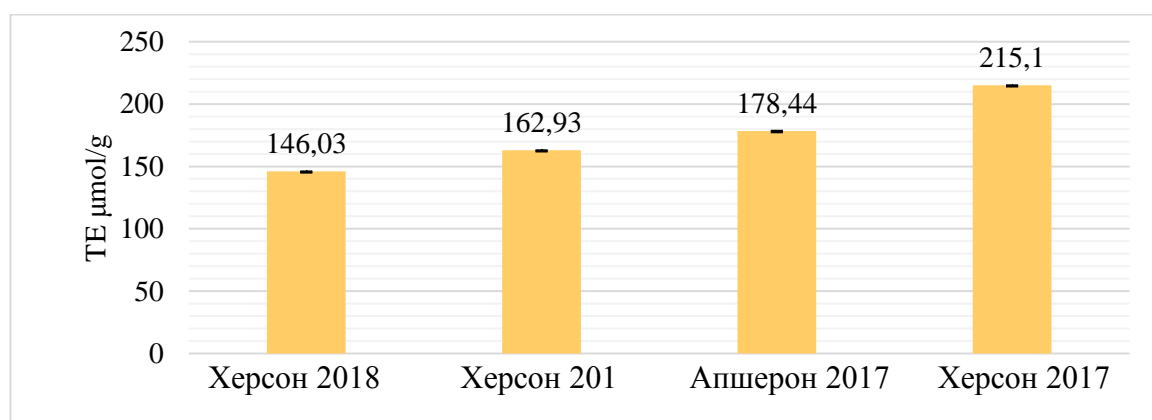
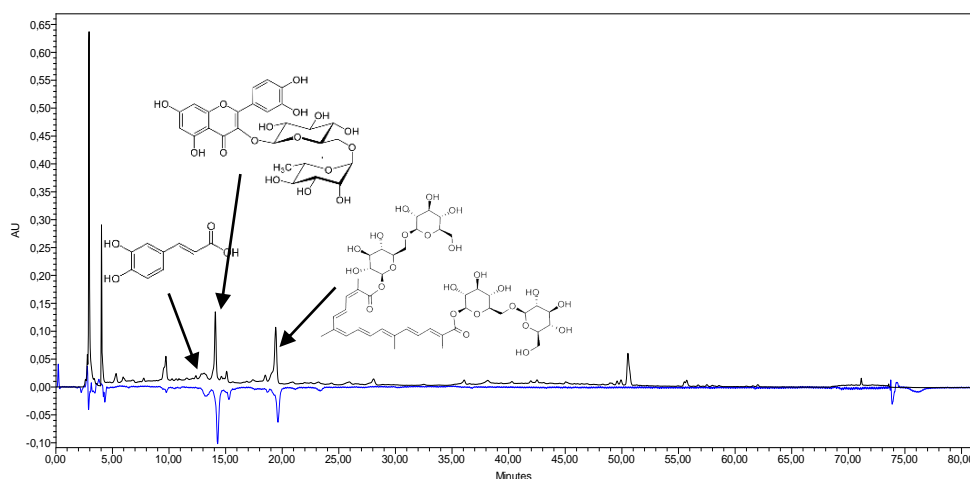


Рис. 3.28 Визначення антиоксидантної активності шафрану методом АВТС

Для визначення вкладу окремих БАР у антиоксидантну активність шафрану було використано *in vitro* метод ВЕРХ з постколонковою дериватизацією АВТС у перерахунку на Тролокс (ммоль/л). Вивчені компоненти характеризували від 80 до 95 % загальної активності у зразках (рис. 3.29).



кофейна кислота (14.29 хв), рутин (15.29 хв) і кроцин (19.62 хв)

Рис. 3.29 Хроматограми ВЕРХ-АВТС шафрану при 267 нм (HPLC, чорний) і 650 нм (АВТС, синій)

Найбільший вклад в антиоксидантну активність за експериментальними даними очікувано мали кофейна кислота (3266,54 ммоль/л), рутин (3192,91 ммоль/л) та кроцин (3240,27 ммоль/л) (рис. 3.29). Активність препарату порівняння тролоксу становила 399,54 ммоль/л, що значно поступається як сумарній активності, так і активності окремих компонентів.

### 3.8.3 Дослідження цитотоксичної дії екстрактів та індивідуальних речовин з шафрану методом *in vitro*

Дослідження цитотоксичної дії екстрактів шафрану та його сполук (кроцин, шафраналь, рутин, апігенін, кофейна кислота, ферулова кислота) проводили проти ліній клітин меланоми IGR39, потрійно негативного раку молочної залози MDA-MB-231, гліобластоми U-87 *in vitro* за допомогою МТТ аналізу.

#### 3.8.3.1 Цитотоксична активність екстрактів шафрану

За результатами експериментальних досліджень виявлено, що етанольний екстракт шафрану значно знижував життєздатність клітин раку молочної залози

та меланоми, а ефект був більш потужним у порівнянні з водним екстрактом. Проте водний екстракт був майже в 5,6 рази активнішим проти клітинної лінії гліобластоми ( $EC_{50}$  водного екстракту проти U-87 становив  $0,15 \pm 0,02$  мг/мл, а  $EC_{50}$  етанольного екстракту –  $0,83 \pm 0,03$  мг/мл) (рис. 3.29).

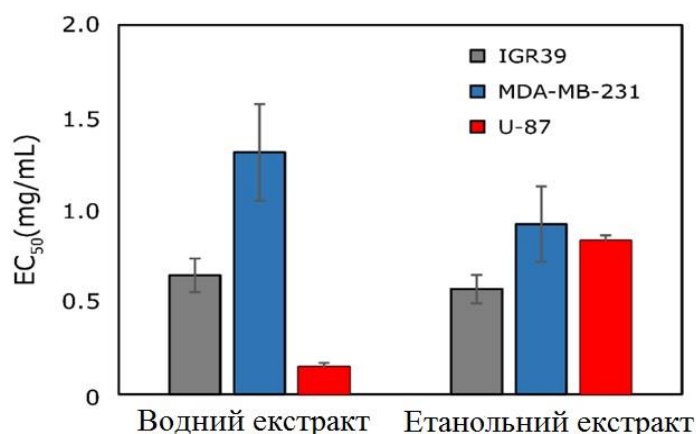


Рис. 3.29 Цитотоксична активність екстрактів шафрану проти ліній ракових клітин гліобластоми, меланоми та потрійно-негативного раку молочних залоз

Більш висока активність водного екстракту шафрану проти клітинної лінії гліобластоми може бути зумовлена наявністю гідрофільних БАР, таких як амінокислоти, полісахариди, карбонові кислоти. Наприклад, опубліковані дані [9, 27, 58, 70] свідчать про те, що кроцетин, метаболіт кроцину, демонструє виражені протипухлинні властивості проти клітинних ліній гліоми U251, U87MG, U373 та U138. Однак про активність екстракту шафрану проти лінії клітин раку головного мозку (лінія клітин U-87) раніше не повідомлялося.

### 3.8.3.2. Цитотоксична активність окремих сполук шафрану

За даними літератури, екстракти шафрану виявляють свою цитотоксичну дію завдяки присутності не лише кроцину, пікрокроцину, шафраналю, а й завдяки фенольним сполукам [17]. Для виявлення внеску окремих БАР у цитотоксичний потенціал шафрану, було проведено оцінку значення  $EC_{50}$  для кількох основних інгредієнтів екстрактів шафрану у МТТ тесті (рис. 3.30).



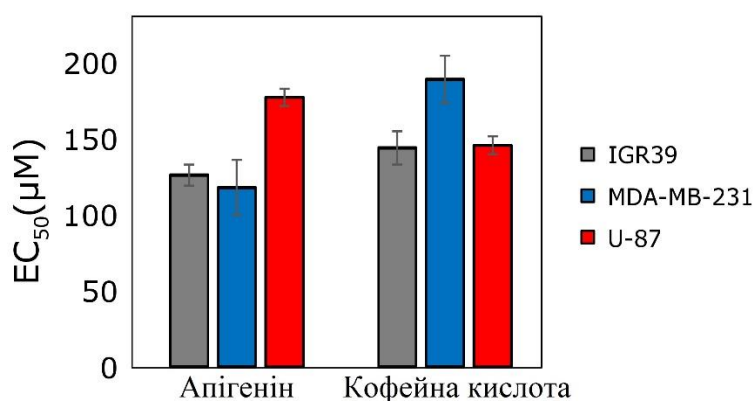


Рис. 3.30 Протиракова активність апігеніну та кофейну кислоти проти різних ліній ракових клітин

Згідно з результатами дослідження, найбільш активними речовинами проти досліджуваних клітинних ліній раку молочної залози, меланоми та гліобластоми виявились апігенін і кофейна кислота.

Апігенін продемонстрував у експерименті найвищу активність проти клітинних ліній меланоми і раку молочної залози (значення  $EC_{50}$   $131,8 \pm 7,2$  мкМ і  $123,4 \pm 19,0$  мкМ відповідно) (рис. 3.30). Активність проти лінії клітин гліобластоми була нижчою порівняно з кофейною кислотою. Активність апігеніну була вищою порівняно з активністю проти клітин IGR39 у наших експериментах, що можна пояснити специфічністю сполуки проти різних клітинних ліній.

Кофейна кислота показала подібний рівень активності проти клітинних ліній IGR39 та U-87 (значення  $EC_{50}$  становили  $150,5 \pm 11,4$  мкМ та  $152,3 \pm 6,2$  мкМ відповідно) і трохи нижчу щодо MDA-MB-231 клітинна лінія ( $EC_{50}$  становила  $197,6 \pm 16,3$  мкМ). Згідно з різними дослідженнями, рутин може викликати значне зменшення розміру пухлини, що підтверджує його антилейкемічний потенціал [340]. Однак у нашому дослідженні рутин (як і маркер шафрану кроцин) не продемонстрував суттєвого пригнічення росту клітин IGR39, MDA-MB-231 або U-87 у концентрації до 1 мМ.

Молекулярні механізми екстракту шафрану та його активних компонентів ще повністю не вивчені, і необхідні подальші дослідження, щоб обґрунтувати використання екстрактів шафрану в лікуванні раку.

### 3.8.4 Дослідження антибактеріальної дії методом *in vitro*

Результати досліджень антибактеріальної активності показали, що етанольний і водний екстракти шафрану ефективно пригнічують зріст досліджуваних штамів мікроорганізмів зі змінною дією. Як показано в таблиці 3.16 та у таблицях А.24, А.25 (Додатки), етанольний і водний екстракти шафрану мали максимальну зону інгібування до *B. subtilis* зі значенням  $21,50 \pm 0,32$  мм і  $17,60 \pm 0,40$  мм відповідно. Обидва екстракти показали майже однакову пригнічувальну дію проти чотирьох патогенних штамів (*E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*). Етанольний екстракт показав найвищу активність (приблизно 20 мм зони інгібування) проти *S. aureus*, дещо поступався йому водний екстракт, який продемонстрував менш виражену активність (зона інгібування складала  $15,30 \pm 0,30$  мм). Найбільш виражену антимікробну активність етанольного екстракту шафрану встановлено по відношенню до *Ps. aeruginosa* ( $19,5 \pm 1,5$  мм), *Pr. vulgaris* ( $20,0 \pm 1,2$  мм) та *St. aureus* ( $20,5 \pm 1,3$  мм).

Таблиця 3.16

#### Антимікробна активність (діаметр зон інгібування) та мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) екстрактів шафрану

Тестові штами	Водний		Етанольний		Препарат порівняння Хлорофіліпт
	Зона інгібування (мм)	Значення МІК (мкг/мл)	Зона інгібування (мм)	Значення МІК (мкг/мл)	
<i>S. aureus</i> 25923 ATCC	$15,30 \pm 0,30$	250	$21,15 \pm 0,25$	62,5	$22,50 \pm 0,42$
<i>E. coli</i> 25,922 ATCC	$16,00 \pm 0,20$	250	$19,20 \pm 0,30$	125	$12,00 \pm 0,20$
<i>P. vulgaris</i> 4636 NCTC	$16,50 \pm 0,25$	500	$20,00 \pm 0,30$	125	ріст
<i>P. aeruginosa</i> 27,853 ATCC	$18,70 \pm 0,27$	500	$19,60 \pm 0,20$	500	ріст
<i>B. subtilis</i> 6633 ATCC	$17,80 \pm 0,40$	125	$21,50 \pm 0,32$	62,5	ріст
<i>C. albicans</i> 885/653 ATCC	$17,00 \pm 0,28$	250	$18,00 \pm 0,25$	125	ріст

Враховуючи серйозну проблему резистентності мікроорганізмів було проведено також експериментальні дослідження з використанням клінічних штамів. Найбільш виражену антибактеріальну дію щодо клінічного штаму *St. aureus* та *E. coli* мав етанольний екстракт шафрану на рівні 17,5 мм та 16,00 см відповідно, діаметр затримки зросту. Проте водний екстракт проявив виражену дію проти клінічного *Enterobacter cloacea* та *C. albicans*, діаметр затримки зросту 18,5 мм та 17,00 мм. Отримані дані у подальшому можна розвивати для розробки ЛРЗ для боротьби з антибіотикорезистентністю. Результати підтвердили, що екстракти шафрану володіють значною ( $p < 0,05$ ) антибактеріальною активністю щодо грампозитивних бактерій. Подальше визначення протимікробної та антикандидозної дії екстрактів проводили стандартним методом двократних серійних розведень у поживному бульйоні. Найбільш виражена мінімально-пригнічуюча концентрація (МПК) була встановлена для етанольного екстракту шафрану проти *S. aureus* та *B. subtilis* – 62,5 мкг/мл для кожного. Крім того, було виявлено помірно високе значення МІК (125 мкг/мл) етанольного екстракту для *P. vulgaris*, *E. coli* і *C. albicans*. Загалом етанольний екстракт мав в середньому нижчі значення МІК (62,5 – 125,0 мкг/мл), ніж водний екстракт (125 – 500 мкг/мл).

### 3.8.5 Результати дослідження антинеірамінідазної, протизапальної та противірусної активності *in vitro*

Крім специфічних маркерів в зразках шафрану українського походження нами було виявлено фенольні сполуки, зокрема апігенін, рутин, кофейну кислоту. Попередні дослідження показали, що рослинні екстракти, багаті фенольними речовинами, пригнічують ферментативну активність вірусної нейрамінідази [341]. Крім того, відомо, що активність нейрамінідази проти вірусу грипу А визначає амінокислотний склад рослинних екстрактів [342]. Відповідно до наших експериментальних даних шафран характеризується високим вмістом амінокислот, зокрема тирозину (326,6 мкг/г), метіоніну (84 мкг/г) і аланіну (60 мкг/г) [343].

Для аналізу біоактивності (антинейрамінідазної, протизапальної та противірусної) нами був обраний водний екстракт шафрану з урахуванням більш різноманітного хімічного складу та екологічності розчинника. Згідно з результатами (табл. А.23, Додатки), водний екстракт (100 мкг/мл) пригнічував ферментативну активність нейрамінідази на 41,0% порівняно з позитивним контролем занамівіром (97,4 % при 1  $\mu$ M) [344].

Екстракт виявився неактивним в інших тестах на біологічну активність (табл. А.28-А.30, Додатки), включаючи протиалергічну (тест на дегрануляцію, 100 мкг/г) [345, 346], противірусну (грип H1N1 та ентеровірус D68, 50 мкг/г), протизапальну дію (респіраторний спалах і дегрануляція, 10 мкг/г) [347], дослідження експресії NRF2 у нормальних і ракових клітинних лініях (100 мкг/г) і аналіз ліпідних крапель (100 мкг/г). Високий вміст амінокислот, а також наявність фенольних сполук може корелювати з інгібуючими ефектами нейрамінідази водного екстракту шафрану, але для встановлення інших біоактивностей, вірогідно, необхідна більш висока концентрація екстракту.

### 3.8.6 Результати дослідження протизапальної активності та токсичності екстрактів *in vivo*

Введення тваринам сухого водного екстракту шафрану (25 мг/кг) показало виражену протизапальну активність (73,24%) на моделі карагенінового набряку у щурів [348]. Приріст об'єму кінцівки із запаленням у порівнянні з вихідною величиною через 3 год становив для контрольної патології –  $24,167 \pm 1,493$  ум.од., для екстракту приймочок –  $6,467 \pm 0,085$  ум.од., для препарату порівняння Альтану (в дозі 1 мг/кг) –  $6,170 \pm 0,494$  ум.од. ( $p < 0,05$ ) (табл. А.31, Додатки). За результатами досліджень екстракт віднесено до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К.К. Сидорова ( $LD_{50} > 5000$  мг/кг).

### Висновки до розділу 3

1. За результатами аналізу якості шафрану відповідно до ISO 3632 встановлено широкий діапазон значень вмісту пікрокроцину, шафраналу та кроцину, кількісний вміст сполук відрізняється залежно від географічного походження зразків. Комерційні зразки мали значення маркерного компоненту кроцину  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 нм в діапазоні у від 30 до 258. Найнижчі значення кроцину встановлені для зразків шафрану з Індії: Махараштра та Уттар-Прадеш 30,17 та 46,10 відповідно. Переважна кількість українських зразків шафрану віднесена до I категорії якості. Зразки з Херсону та Чернігова мали найбільший вміст кроцинів  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 нм 254–258, найменший вміст вставлене для шафрану з Вінниці  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 нм 139. Українські зразки шафрану не поступалися за характеристиками якості зразкам з Італії, Австралії, Марокко, Швейцарією.

2. Розроблено оригінальну ВЕРХ методику одночасного визначення апокаротиноїдів та фенольних сполук, а також ГХ-МС метод визначення амінокислот, карбонових кислот та шафраналу у шафрані. Обґрунтовано доцільність використання методу подрібнення шафрану у рідкому азоті, що збільшує вихід кроцинів у 3,5 рази порівняно зі звичайним подрібненням. В зразках шафрану були ідентифіковані 4 фенольні кислоти, 9 флавоноїдів, 4 апокаротиноїди (*t*-4GG, *t*-2G, *c*-4GG і *c*-3Gg) та 2 альдегіди (шафраналь, пікрокроцин). У всіх зразках був виявлений рутин та кроцини. Українські зразки шафрану мали вміст кроцин-4 від 136 до 496 мг/г та були близькі до зразка зі Швейцарії (446 мг/г). Серед фенольних сполук домінантними були: кофейна кислота (0,05 – 4,88 мг/г) та апігенін-7-глюкозид (0,23 – 2,74) у зразку з України (Херсон), апігенін (0,08 – 3,18 мг/г) у зразку з Італії (Ломбардія) та рутин (0,83 – 8,74 мг/г) у зразку з Іспанії (Кастілія Ла Манча). Метод ГХ-МС дозволив ідентифікувати 42 речовини, при цьому встановлено, що маркер-якості шафраналь (50,87 – 77,59%),  $\alpha$ -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 в усіх зразках.

3. Кореляційне дослідження впливу екологічних факторів та склад фенольних

сполук та апокаротиноїдів у досліджених зразків шафрану, дозволив встановити, що вміст гідроксикоричних кислот контролюється тривалістю сонячного випромінювання під час розвитку рослин. На вміст кроцинів найбільший вплив мали показники тривалості сонячного випромінювання, сонячного УФ-індексу та тип ґрунту. Додатково для українських зразків встановлено, що вміст кроцину та пікрокроцину вищий для шафрану з північно-східних регіонів України та зменшується ближче до південно-західних районів вирощування.

4. З метою стандартизації шафрану, модифіковано методику ВЕТШХ для оцінки якісного профілю та кількісного вмісту речовин-маркерів у шафрані на прикладі 11 зразків шафрану. Вміст кроцинів в українських зразках шафрану становив від 17,80% до 33,25%.

5. Оцінено придатність ВЕТШХ методики визначення маркерів для аналізу потенційної фальсифікації шафрану. Кроцин та пікрокроцин у досліджуваних фальсифікаторів (куркума, сафлор, календула, чорнобривці, жовті тичинки тюльпану) не виявлено. Дані ВТШХ корелювали з даними ВЕРХ-методу. Запропонований експрес-метод ВЕРХ для визначення колхіцину в сировині к. посівного, для вирішення питання про можливу фальсифікацію та токсичність шафрану, дозволив підтвердити відсутність токсичного алкалоїду у шафрані та його побічних продуктах виробництва. Метод було апробовано для БЦ пізньозриву осіннього, для підтвердження гарного розділення та ідентифікації колхіцину.

6. За результатами проведених досліджень було розроблено монографію «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» (ДФУ, 2020). Із застосуванням підходу HerbMars було обґрунтовано вибір маркерів якості для шафрану: кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин та апігенін, враховуючи їх протиракову дію. Вперше було розроблено методику одержання робочих зразків пікрокроцину та кроцинів (*транс*-4GG, *транс*-2G, *транс*-3Gg) із чистотою сполук понад 97% для контролю якості шафрану. Сполуки виділяли з ліофілізованого екстракту шафрану за допомогою колонки Symmetry Prep C18 (300×19 мм×7 мкм) та ідентифікували за допомогою спектроскопічних методів.

7. Одержано сухі водні та спиртові (70% етанол) екстракти шафрану методом

мацерації з наступним упарюванням та м'яким ліофілізованим висушуванням при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  для збереження всіх БАР. Методом ВЕРХ встановлено вміст БАР. Визначено, що кроцин (38,27 – 163,02 мг/г), пікрокроцин (62,25 – 197,19 мг/г), шафраналь (10,81 – 146,66 мг/г) є домінуючими. Рутин, апігенін, ферулова кислота були знайдені у шафрані вперше.

8. Встановлено антиоксидантну активність шафрану, найбільший внесок мали кофейна кислота, рутин та кроцин. Етанольний екстракт проявив виражену антибактеріальну активність проти *Ps. aeruginosa* (19,5 мм), *Pr. vulgaris* (20,0 мм), *S. aureus* (20,5 мм). Скринінг активності водного екстракту шафрану (100 мкг/мл), виявив його інгібуючу активність щодо ферменту нейрамінідази на 41%. Водний екстракт шафрану (25 мг/кг) проявив виразну протизапальну активність (73,24%) *in vivo* на моделі карегенінового набряку. Екстракти віднесено до VI класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К.К. Сидорова.

9. Найбільшу фармакологічну дію проявили сухі екстракти шафрану до ліній клітин гліобластоми U-87, меланоми IGR39, потрійно негативного раку молочної залози MDA-MB-231 *in vitro*. Аналіз цитотоксичної дії показав, що водний екстракт шафрану був майже в 5,6 рази більш активним щодо лінії клітин U-87 ( $EC_{50}$  0,15 мг/мл). Етанольний екстракт значно знижував життєздатність клітин MDA-MB-231 (0,9 мг/мл) і IGR39 (0,6 мг/мл). Апігенін і кофейна кислота виявили високу цитотоксичну активність щодо клітин раку молочної залози, меланоми та гліобластоми ( $EC_{50}$  від 123,4 до 197,6 мкМ).

10. Розроблено параметри стандартизації для сировини шафрану та його сухих екстрактів для фармакологічних досліджень відповідно до вимог до ДФУ. Проведені фармакологічні дослідження підтвердили вибір маркерів якості для шафрану (кроцин, шафраналь, пікрокроцин, рутин, апігенін) відповідно до їх протиракового потенціалу та параметрів підходу HerbMars та будуть враховані для подальшої стандартизації вирощування к. посівного.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [23, 103, 305, 311, 312, 314 – 317, 339, 343 – 356].*

## РОЗДІЛ 4

### ПОБІЧНІ ПРОДУКТИ ВИРОБНИЦТВА ШАФРАНУ: ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

При вилученні приймочок з к. посівного утворюється велика маса відходів виробництва (листя, оцвітина та дрібні БЦ). Після збору 1 кг приймочок, близько 350 кг оцвітини, 1500 кг листя і БЦ не використовуються і викидаються [114]. Однак ця біомаса може бути використана як потенційно значне джерело БАР для розробки ЛРЗ на їх основі, використання яких значно підвищує прибутковість і сталість виробництва шафрану [61, 357, 358], що є дуже перспективним.

#### 4.1 Дослідження БАР листя к. посівного

Листя як побічний продукт виробництва шафрану є найбільш значним за об'ємом, тому дослідження цієї ЛРС є перспективним з огляду наявної сировинної бази. У порівняльне дослідження були включені зразки листя к. посівного з України (Херсона, Запоріжжя, Чернігова, Одеси, Вінниці, Миколаїв, Харків) та один зразок листя з Азербайджану (Баку). Дослідження проводилось серед іншого з метою вибору найбільш перспективного об'єкту для фармакологічних досліджень.

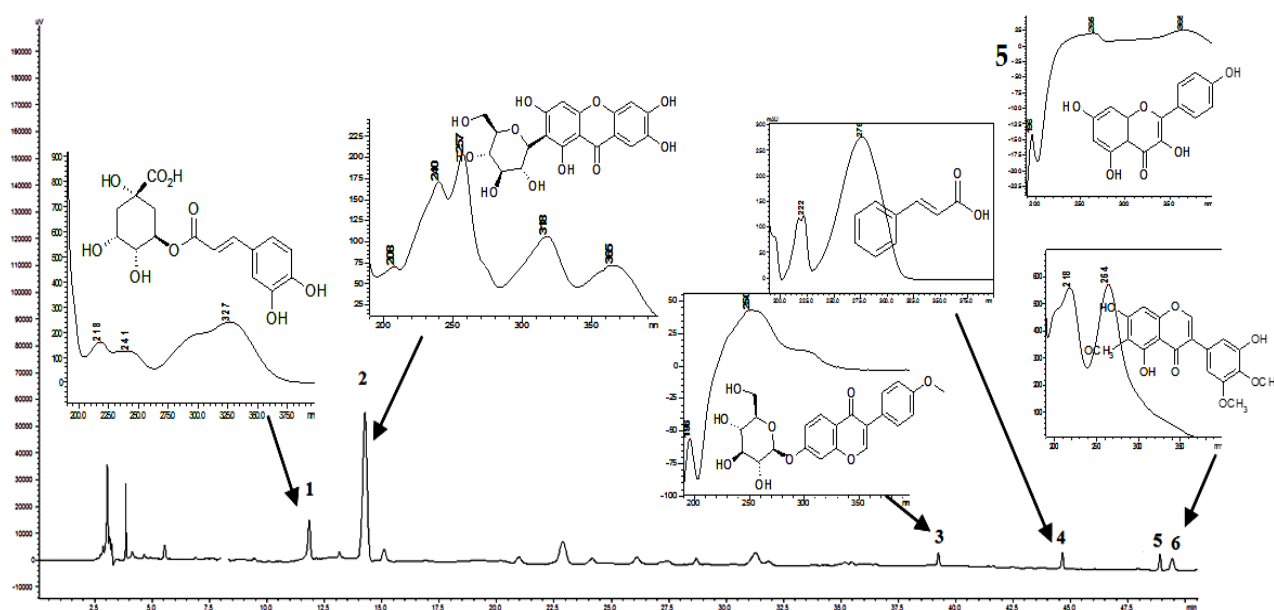
*Фенольні сполуки.* Найбільшу кількість фенольних сполук виявлено у сировині, зібраній у смт. Любимівка, Херсонська область (далі Херсон) –  $14,17 \pm 0,33$  мкмоль/г (табл. 4.1). Найменшу кількість фенольних сполук у листках визначено у сировині, зібраній у м. Харків –  $4,12 \pm 0,21$  мкмоль/г та у листі крокусу з Баку ( $3,85 \pm 0,06$  мкмоль/г).

Вміст окремих компонентів визначено методом ВЕРХ. У дослідження були включені зразки листя з України (Херсону, Запоріжжя, Чернігова, Одеса та Вінниці), які мали перспективні попередні дані. Ідентифіковано 11 фенольних сполук (табл.4.2).



**Порівняльний аналіз загального вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у  
листі к. посівного (СФ-метод, мкмоль/г)**

Регіон	Загальний вміст фенольних сполук	Загальний вміст флавоноїдів
Херсон, Україна	14,17 ± 0,33	34,01 ± 0,71
Запоріжжя, Україна	10,16 ± 0,17	21,40 ± 0,20
Чернігів, Україна	8,54 ± 0,34	9,74 ± 0,15
Одеса, Україна	9,65 ± 0,20	24,11 ± 0,24
Вінниця, Україна	8,77 ± 0,15	18,52 ± 0,17
Миколаїв, Україна	10,51 ± 1,67	26,9 ± 0,98
Харків, Україна	4,12 ± 0,26	10,62 ± 0,42
Баку, Азербайджан	3,85 ± 0,06	6,18 ± 0,87



хлорогенова кислота (1), мангіферин (2), ононін (3), *транс*-корична кислота (4), кемпферол (5), іригенін (6)

Рис. 4.1 Типова ВЕРХ-DAD хроматограма метанольного екстракту листя к. посівного з Херсону при 310 нм

Таблиця 4.2

Порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у листі к. посівного з різних регіонів України методом ВЕРХ, мг/г

Регіон України	Мангіферін	<i>t</i> -Корична кислота	Хлорогенова кислота	Неохлорогенова кислота	Ононін	Кемпферол	Ізоорієнтин	Робінін	Гіперозид	Ізокверцитрин	Іригенін
Херсон	1,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,01	-	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,02	3,52 ± 0,07	2,35 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,002 ± 0,00
Запоріжжя	1,13 ± 0,02	-	0,48 ± 0,02	0,04 ± 0,01	-	0,20 ± 0,01	4,88 ± 0,11	4,05 ± 0,12	0,24 ± 0,05	0,17 ± 0,02	-
Чернігів	0,90 ± 0,01	-	0,24 ± 0,02	-	-	0,15 ± 0,01	3,68 ± 0,10	0,35 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	-
Одеса	1,84 ± 0,03	-	0,29 ± 0,01	-	-	0,21 ± 0,02	2,72 ± 0,08	5,22 ± 0,18	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,003 ± 0,00
Вінниця	1,05 ± 0,02	-	0,59 ±	-	0,88 ± 0,50	0,16 ± 0,02	4,45 ± 0,15	4,45 ± 0,14	0,26 ± 0,03	0,17 ± 0,02	-

Найбільш різноманітним був склад фенольних сполук у зразку з Херсону – в ньому були виявлені всі речовини, крім неохлорогенової кислоти. Мангіферин, хлорогенова кислота, кемпферол, ізоорієнтин, робінін були знайдені у всіх зразках у різній кількості, що обумовлено географічними особливостями регіонів. Домінуючими речовинами були ізоорієнтин (від 3,52 до 6,45 мг/г), робінін (від 0,35 до 10,22 мг/г) та мангіферин (від 0,90 до 1,84 мг/г). Найвищу кількість мангіферину виявлено у зразку з Одеси, ізоорієнтину – з Запоріжжя та Вінниці, робініну – з Одеси та Вінниці. Неохлорогенова кислота була ідентифікована лише у зразку з Запоріжжя, *транс*-корична кислота – з Херсону, ононін – у зразках з Херсону та Вінниці, іригенін – з Херсону та Одеси.

За результатами досліджень, у подальші визначення хімічного складу було включено тільки зразок листя з Херсону за рахунок наявної сировинної бази.

*Макро- та мікроелементи.* У результаті дослідження елементного профілю листя крокусу з України (Херсон) встановлено наявність 15 мінералів (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

#### Мінеральний профіль листя к. посівного

Мінерал	Вміст, мг/100 г	Мінерал	Вміст, мг/100 г
Fe	60,02 ± 1,05	Mg	6,73 ± 0,12
Si	395,11 ± 9,95	Pb	0,03 ± 0,01
Al	73,21 ± 1,28	Mo	0,06 ± 0,01
Mn	8,04 ± 1,14	P	130,04 ± 2,29
K	1525,10 ± 26,81	Ni	0,06 ± 0,01
Ca	550,12 ± 9,67	Cu	0,30 ± 0,01
Zn	7,30 ± 0,13	Na	75,02 ± 1,32
Sr	2,41 ± 0,04		

Примітка. Co < 0,03; Cd < 0,01; As < 0,01; Hg < 0,01.

Серед ідентифікованих елементів було три макроелементи, п'ять мезоелементів і сім ультрамікроелементів. Цікаво відзначити наявність значної кількості незамінних і умовно незамінних елементів, таких як кальцій (Ca), ферум (Fe), манган (Mn), цинк (Zn), силіцій (Si), фосфор (P), і нікель (Ni).

Виявлено, що в листі калій і кальцій мають найбільший вміст зі значенням 1525 мг/100 г і 550 мг/100 г відповідно. Високий вміст калію в листі к. посівного пояснюється фізіологічною функцією калію в процесі транспорту в рослинах: участю високоосмотичної активної речовини в індукції тиску на БЦ і транспорті асимілятів у флоемі листа [359]. Кальцій накопичується у вигляді оксалату або інших важкорозчинних солей в місцях депонування в клітині (вакуолі, ендоплазматичному ретикулумі) [360]. Кальцій повільно проходить через ксилему, тому його вміст нижчий, ніж калію. Значне зниження вмісту магнію (6,73 мг/100 г) у листі крокусу прямо пов'язане з вмістом калію в сировині та з механізмами поглинання цих поживних речовин із ґрунту [361]. Дослідження показало, що листя к. посівного має різноманітний мінеральний склад, враховуючи, що рослина вирощується без додаткових добрив.

*Карбонові кислоти та амінокислоти.* Для дослідження вмісту аліфатичних карбонових (жирних та коротколанцюгових) та амінокислот ми використовували методику ГХ/МС (рис. 4.2). L-глутамін, ізолейцин, L-аланін, L-лейцин, L-піроглутамінова кислота та L-фенілаланін були виявлені в листі к. посівного у великих кількостях (табл. А.43, Додатки), що вказує на адаптацію рослини до холодного стресу [362].

Великий вміст L-глутаміну, вірогідно, пов'язаний з циклом глутамат-синтази, який обумовлює синтез аргініну, триптофану, гістидину, або аспарагіну [363]. До семи незамінних амінокислот у листі, які були присутні у високій концентрації, входили ізолейцин (7965 мкг/г), L-лейцин (6955 мкг/г), L-лізін (866 мкг/г), L-метіонін (398 мкг/г), L-фенілаланін (6032 мкг/г), L-треонін (2701 мкг/г), L-триптофан (1186 мкг/г) і L-валін (6151 мкг/г) (табл. А.48, А.49, Додатки). Загальний вміст амінокислот у листі к. посівного перевищує 43,174 мкг/г, таким чином дана сировина може бути корисним джерелом протеїногенних амінокислот, особливо глутаміну, фенілаланіну, ізолейцину, аланіну і лейцину.

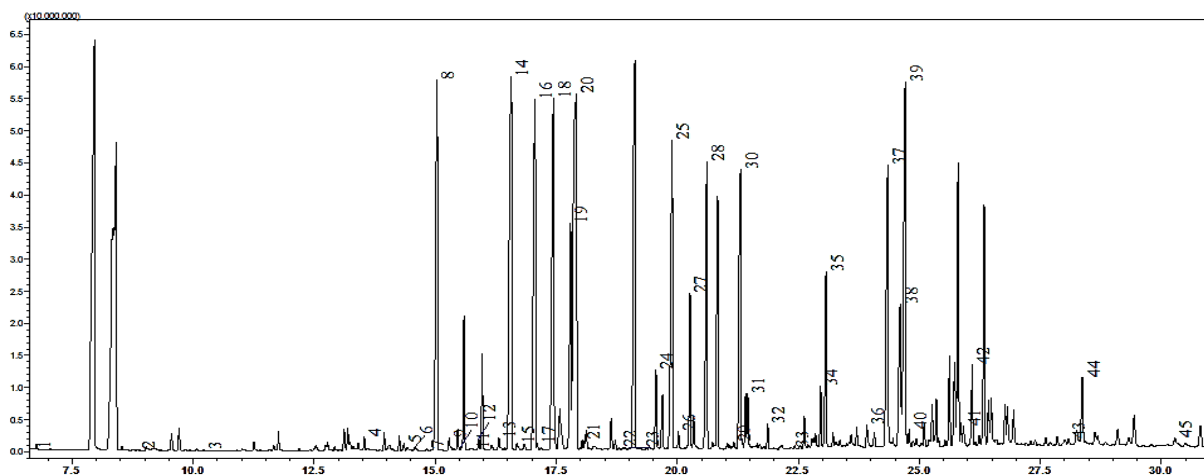


Рис. 4.2 ГХ-МС хроматограма одночасного дослідження жирних кислот, коротколанцюгових карбонових кислот та амінокислот у листі к. посівного

Серед органічних кислот циклу трикарбонових кислот (ТСА) у листі к. посівного виявлено лимонну (834 мкг/г), фумарову (195 мкг/г) і яблучну (925 мкг/г), які мали найвищий вміст серед усіх коротколанцюгових карбонових кислот, що характерно для більшості рослин [364]; водночас листя к. посівного має підвищений вміст яблучної кислоти під час акліматизації до низьких температур [365] України в післязбиральний період. 3,3-Диметилакрилова кислота, 4-гідроксибутанова та молочна кислоти були виявлені в кількості 187 мкг/г, 162 мкг/г та 98 мкг/г відповідно. Вміст інших органічних кислот не перевищував 50 мкг/г.

Аналіз жирних кислот (ЖК) листя к. посівного показав, що виявив сім кислот: міристинова, пальмітинова, ліноелаїдова,  $\alpha$ -ліноленова, стеаринова, бегенова та лігноцерінова. Загальний вміст ЖК становив 63 544 мкг/г від загального виходу кислот і є найбільшою частиною серед усіх ідентифікованих кислот у листі крокусу. Домінуючою насиченою кислотою була пальмітинова кислота (6997 мкг/г), потім лігноцерінова кислота (1611 мкг/г). Вміст ненасичених ЖК був у два рази вищий, ніж насичених кислот. Аналіз виявив незамінні ЖК  $\alpha$ -ліноленову (22490 мкг/г) і ліноелаїдинову кислоти (9880 мкг/г) як основні компоненти серед кислот, які були знайдені в листі к. посівного вперше.

Визначальну роль в адаптації рослин до переохолодження відіграє біосинтез дієнної та триєнної кислот 18:2 $\omega$ 6 і 18:3 $\omega$ 3. Ці поліненасичені ЖК регулюють

«текучість» клітинних мембран у широкому діапазоні температур і впливають на стійкість рослин до складних середовищ. При низьких температурах, або замерзанні, кількість ненасичених жирних кислот значно перевищує вміст насичених кислот в органах рослини [365]. Високий вміст ліноленової кислоти в листі к. посівного (22 490 мкг/г) зумовлений саме адаптацією рослини до низьких температур в Україні (грудень  $+3/-5$  °C) у період збирання.

Наявність *трис*-фосфорної кислоти (1305 мкг/г) у листі крокусу, згідно з [366], також сигналізує про реакцію рослини на температурний стрес, що виражається у змінах профілю метаболіту. *Трис*-фосфорна кислота сприяє підвищенню вмісту органічних кислот (яблучної кислоти, лимонної кислоти), амінокислот (ізолейцину, піроглутамінової кислоти, фенілаланіну, аланіну, глутаміну), а також ненасичених жирних кислот (ліноелаїдинової та лінолевої).

## 4.2 Дослідження БАР оцвітини к. посівного

### 4.2.1 Дослідження компонентного складу оцвітини к. посівного

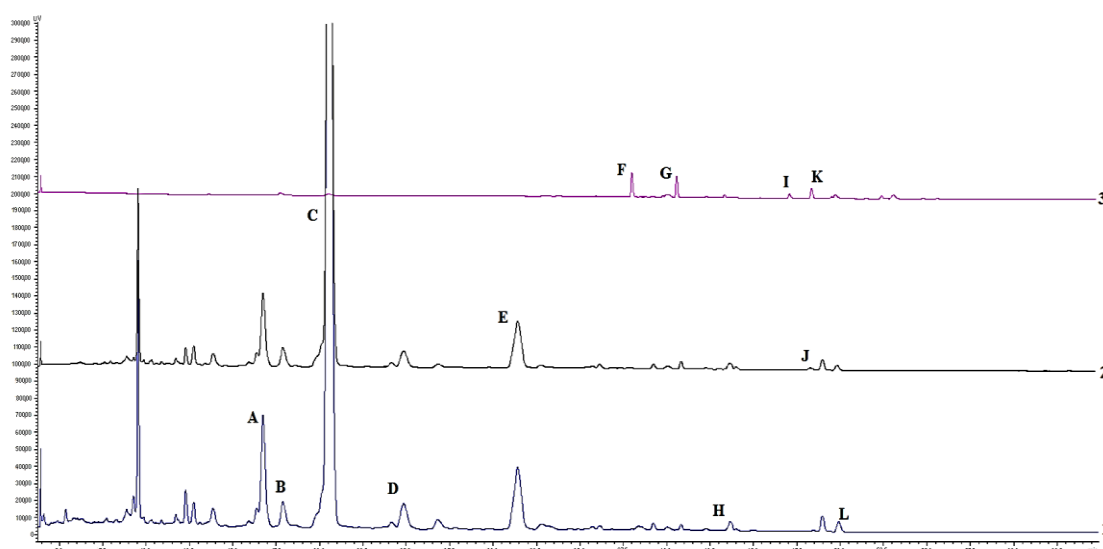
У порівняльне дослідження були включені зразки оцвітини к. посівного з Херсона, Миколаєва, Ужгорода, Волині.

*Фенольні сполуки.* Згідно з отриманими результатами СФ-досліджень (табл. 4.4), оцвітина к. посівного, зібрана у Херсоні та Волині (у с. Борочиче), накопичувала найбільшу кількість флавоноїдів (11,088 та 10,232 мкмоль/г, відповідно), зібрані зразки в Миколаєві (9,854 мкмоль/г) характеризуються дещо меншою кількістю флавоноїдів ( $p < 0,05$ ). Найменшою кількістю флавоноїдів ( $p < 0,05$ ) характеризується сировина з Ужгорода (7,204 мкмоль/г).

Дослідження хімічного складу зразків оцвітини крокусу з Херсона, Миколаєва, Ужгорода, Волині методом ВЕРХ показало наявність 20 фенольних сполук (рис. 4.3, табл. 4.5, 4.6). Мангіферин, ізокверцитрин, рутин, ферулова кислота, а також ізофлавоноїди (текторидин, нігрицин, іристоригнін В) вперше виявлені в оцвітині к. посівного з України.

**Порівняльний аналіз загального вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у оцвітині к. посівного з різних регіонів України СФ-методом, мкмоль/г**

Регіон	Загальний вміст фенольних сполук	Загальний вміст флавоноїдів
Херсон, Україна	10,549 ± 0,25	11,088 ± 2,04
Миколаїв, Україна	9,402 ± 1,50	9,854 ± 1,76
Ужгород, Україна	8,111 ± 1,34	7,204 ± 1,25
Волинь, Україна	9,928 ± 1,28	10,232 ± 2,13



мангіферин (а), ізоорієнтин (в), рутин (с), ферулова кислота (d), ізокверцитрин (е), текторидин (f), кроцин 4 (g), апігенін-7-глюкозид (h), кверцетин (i), нігрицин (j), іристекторигнін b (k), кемпферол (l)  
Рис. 4.3 ВЕРХ хроматограма з сировини оцвітини к. посівного при 270 нм (лінія 1), 310 нм (лінія 2) та 440 нм (лінія 3)

**Вміст апокаротиноїдів (мг/г) в оцвітині к. посівного з Херсону**

Сполука	Час утримання, хв/λ, нм	Рослинна сировина
<i>транс</i> – кроцин 2	38,00/440	2,662 ± 0,113
<i>транс</i> – кроцин 2	40,59/440	2,299 ± 0,109
<i>цис</i> – кроцин 4	47,07/440	0,591 ± 0,028
<i>цис</i> – кроцин 3	48,36/440	1,356 ± 0,057

Таблиця 4.6

**Результати вмісту фенольних сполук у оцвітині к. посівного з різних регіонів України методом ВЕРХ, мг/г**

Речовина	Херсон	Миколаїв	Ужгород	Волинь
6,7-Дигідроксиізофлавон	0,02 ± 0,01	- <sup>1</sup>	0,01 ± 0,00	-
Апігенін 7-глюкозид	8,11 ± 0,39	-	1,21 ± 0,05	0,86 ± 0,04
Ізокверцитрин	2,70 ± 0,05	0,52 ± 0,07	0,77 ± 0,02	0,34 ± 0,01
Рутин	16,04 ± 0,28	2,25 ± 0,08	3,75 ± 0,08	1,80 ± 0,08
Кверцетин	0,48 ± 0,04	-	0,84 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Кемпферол	0,92 ± 0,03	0,23 ± 0,03	-	-
Ферулова кислота	0,03 ± 0,01	-	0,15 ± 0,01	-
Мангіферін	1,06 ± 0,04	-	0,03 ± 0,01	0,57 ± 0,03
Текторидин	2,23 ± 0,52	-	1,04 ± 0,04	-
Германаїзм В	0,02 ± 0,12	-	-	0,03 ± 0,01
Нігрицин	0,12 ± 0,02	-	0,52 ± 0,02	-
Іригенін	0,05 ± 0,02	-	-	-
Галова кислота	-	0,03 ± 0,01	-	-
Гіперозид	-	0,53 ± 0,03	-	-
Астрагалін	2,04 ± 0,10	2,77 ± 0,06	0,83 ± 0,02	-
Робінін	-	0,64 ± 0,04	-	0,33 ± 0,02
Іристекторигенін В	0,14 ± 0,05	-	-	-
Ізоорієнтин	7,39 ± 0,25	-	-	-
Кемферол-3-О-β-софорозид	2,33 ± 0,17	1,04 ± 0,04	0,88 ± 0,04	1,77 ± 0,04

Примітка. 1 – речовину не виявлено.



Найбільший вміст компонентів мав зразок з Херсону. Він містив рутин (16,05 мг/г), апігенін 7-глюкозид (4,57 мг/г), ізоорієнтин (7,39 мг/г), кемферол-3-О- $\beta$ -софорозид (2,33 мг/г), ізокверцитрин (2,70 мг/г), текторидин (2,23 мг/г). Додатково було ідентифіковано апокаротиноїди: *транс*-кроцин 4 (2,66 мг/г), *транс*-кроцин 2, *цис*-кроцин 4, *цис*-кроцин 3 (табл. 4.2).

Зразок оцвітини з Ужгороду також мав різноманітний склад фенольних сполук, але їх вміст значно поступався зразку з Херсону. Рутин був доміантною сполукою у всіх зразках. Його вміст коливався від 1,80 мг/г у зразку з Волині до 16,04 мг/г у зразку з Херсону. Зразок з Миколаїва найбільше містив астрагаліну.

*Терпеноїди.* Методом ГХ-МС було встановлено наявність 34 летких компонентів у оцвітині к. посівного з Херсону (рис. 4.4). Домінуючим був 1,3-циклогексадієн-1-карбоксальдегід (4,35%), пальмітальдегід (7,58%). Дані по всім компонентам наведено у таблиці А.50 (Додатки).

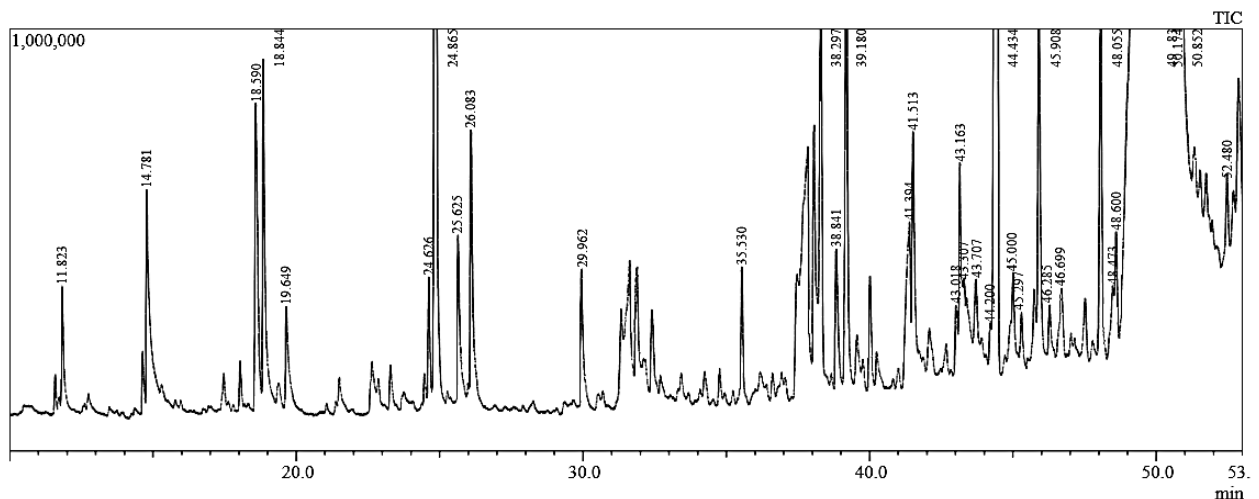


Рис. 4.4 ГХ-МС хроматограма аналізу терпеноїдів в оцвітині к. посівного

*Амінокислоти.* Ідентифіковано 9 амінокислот у зразку оцвітини к. посівного з Херсону, домінуючими є: L-пролін (14,48 мкг/г), L-піроглутамінова кислота (3,48 мкг/г), L-аланін (16,18 мкг/г) та L-валін (9,81 мкг/г). Повна таблиця і ідентифікованими амінокислотами наведена у таблиці А.49 (Додатки).

*Карбонові кислоти.* Дослідження профілю карбонових кислот оцвітини к. посівного методом ГХ-МС (Рис. 4.5) дозволило ідентифікувати 51 речовину. Результати (%) вмісту компонентів наведено у таблиці А.51 (Додатки).

Найбільший вміст мали пальмітинова кислота (26,36%), похідна ліноелаїдової кислоти (14,30%) та  $\alpha$ -ліноленова кислота (8,26%).

*Макро- та мікроелементи.* Аналогічно зразкам листя, було досліджено елементний склад оцвітини к. посівного. Серед 15 елементів, домінуючими є калій (3200 мг/100 г) і силіцій (1280 мг/100 г). Вміст важких, токсичних елементів знаходиться у допустимих межах. Дані наведено у таблицях А.46 (Додатки).

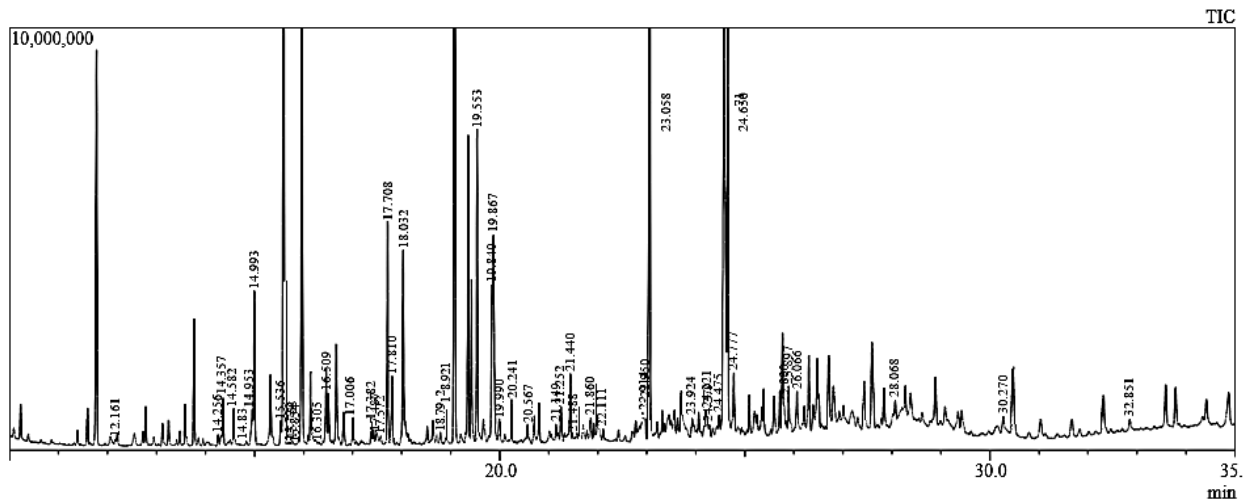


Рис. 4.5 ГХ-МС хроматограма одночасного дослідження жирних кислот, коротколанцюгових карбонових кислот та амінокислот в оцвітині к. посівного.

Таким чином, за результатами проведених досліджень, оцвітина к. посівного з Херсону характеризується у середньому вищим вмістом БАР та, крім того, стабільною сировинною базою.

#### 4.2.2 Виділення БАР з оцвітини к. посівного та встановлення їх структури

В результаті попереднього дослідження було встановлено наявність у сировині оцвітини к. посівного гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, ксантонів, ізофлавоноїдів. Подальшим етапом було виділення суми поліфенолів з рослинної сировини з наступним рідинним фракціонуванням, використовуючи розчинники з поступовою зміною полярності: від малополярних до високополярних і води. З аутоферментованої сировини оцвітини к. посівного з

Херсону було проведено екстракцію фенольних сполук методом мацерації 70% етанолом, екстракцію проводили двічі при кімнатній температурі. В результаті було отримано екстракт, який послідовно обробляли хлороформом, етилацетатом та бутанолом для фракціонування компонентів. Контроль речовин проводили методами ПХ, ТШХ та ВЕРХ. Результати ідентифікованих речовин у фракціях наведено у таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

**Вміст речовин, ідентифікованих у фракціях оцвітини к. посівного ВЕРХ  
методом, мкг/мл**

Речовина	Хлороф. фракція	Бутанол. фракція	Етилацет. фракція	Водний залишок
Ізоорієнтин	- <sup>1</sup>	-	-	11,46 ± 0,20
Рутин	46,59 ± 0,82	-	-	141,81 ± 2,49
Ізокверцитрин	15,327 ± 0,27	80,18 ± 1,41	-	-
Астрагалін	241,22 ± 4,24	550,99 ± 9,69	-	5,73 ± 0,10
Кверцетин	82,892 ± 1,46	16,28 ± 0,29	0,79 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Кемпферол	832,46 ± 14,64	207,98 ± 3,66	124,30 ± 2,19	3,68 ± 0,06

Примітка. 1 – речовину не виявлено.

При ТШХ-дослідженні в УФ-світлі деякі зони мали жовте і світло-жовте забарвлення, характерне для флавонів та їх 7-глікозидів, агліконів. Плями з жовто-коричневим або темно-коричневим забарвленням віднесені до флавонів, флавоно-3-глікозидів, флаванонів. Зони з яскраво-жовтогарячою флуоресценцією характерні для похідних дибензо- $\gamma$ -піронів. Зони абсорбції з блакитною, фіолетовою, синьо-фіолетовою флуоресценцією характерні для кумаринів, фенолкарбонових кислот, ізофлавоноїдів, флавоно-5-глікозидів, стильбенів, Зони з червоною флуоресценцією – вірогідно, халкони, аурони.

Хроматограми відрізнялися за кількістю плям, їхньою хроматографічною поведінкою, забарвленням плям до і після прояву в УФ-світлі, значенням  $R_f$ . Після обробки хроматограм парами амоніаку і 2% спиртовим розчином алюмінію хлориду плями агліконів набули яскраво-жовту флуоресценцію,

темно-коричневі плями набули жовто-зеленого забарвлення, що характерно для флавонових глікозидів.

З хлороформної та етил-ацетатної фракції етанольного екстракту оцвітини к. посівного методом колонкової хроматографії на силікагелі та препаративному хроматографічному поділі на силікагелі з подальшою дробною кристалізацією було вперше виділено 16 фенольних сполук (ферулова кислота, хлорогенова кислота, неохлорогенова кислота, астрагалін, рутин, кверцетин, кемпферол, ізоорієнтин, ізорамнетин, ізокверцитрин, текторидин, нігрицин, іристекторигенін В, мангіферин), крім того вперше з сировини крокусу виділено кемпферол 3-О- $\beta$ -D-софорозид (софорафлавонолозид) та апігенін 7-О-глюкозид (космосіїн) (рис. 4.6, табл. А.19, Додатки).

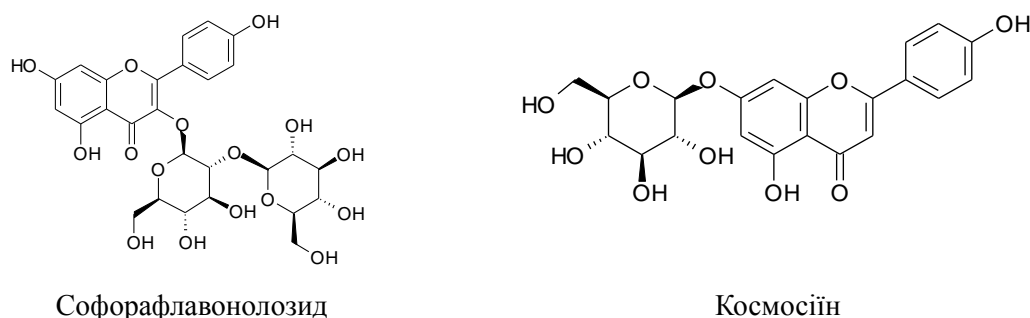


Рис. 4.6 Формули речовин, що вперше виділено з оцвітини к. посівного

Виділені речовини ідентифіковано на підставі вивчення їх фізико-хімічних властивостей за допомогою хімічних, фізичних і фізико-хімічних методів аналізу.

*Гідроксикоричні кислоти.* Речовини дають позитивну реакцію з хлоридом заліза (III), сульфаніловою діазотованою кислотою, що виявляє їхню фенольну природу. На підставі хроматографії на папері, якісних реакцій, УФ-спектрів, порівнянням з вірогідними зразками визначили, що речовини є: 3-метокси-4-оксикоричною (феруловою); 5-О-кофеїл-D-хінною кислотою (хлорогеновою) і 3-О-кофеїл-D-хінною (неохлорогеновою) кислотами.

*Флавоноїди.* Порівнянням даних хроматографічного аналізу: величин  $R_f$  у різних системах розчинників, флуоресценції, максимумів поглинання в спектрах поглинання, характеристичних смуг в ІЧ-спектрах речовин з даними достовірних зразків речовини ідентифіковано як: кемпферол-3-О-глюкозид (астрагалін);

кверцетин-3-О-рутинозид (рутин); 3,3',4',5,7 – пентагідроксифлавоон (кверцетин); 3,4',5,7-тетрагідроксифлавоон або кемферол; лютеолін-6-С-глюкозид (ізоорієнтин); 3,4',5,7-тетрагідрокси-3'-метоксифлавоон (ізорамнетин); кверцетин-3-О-глюкозид (ізокверцитрин); апігенін 7-О-глюкозид (космосіїн); кемпферол 3-О-β-D-софорозид (софорофлавонолозид). Структуру речовин встановлювали на підставі вивчення фізико-хімічних даних (УФ-, ІЧ-, ПМР) (табл. А.19, Додатки).

*Аглікони флавонолів:* кемпферол, кверцетин, ізорамнетин. За даними хроматографії на папері та позитивної проби поза Бріантом встановили, що сполуки є флавоноїдними агліконами. Результати аналізу спектрів поглинання показують, що дані сполуки відносяться до флавонолів; сполука кемпферол має вільні гідроксигрупи в положеннях С-3,5,7,4'; сполука кверцетин – у С- 3,5,7,3',4'; сполука ізорамнетин – у С-3, С-5, С-7,4'. У ІЧ-спектрах речовин виявлено смуги поглинання карбонільної групи γ-пірону, ароматичного кільця, гідроксильних груп. У спектрі ізорамнетину виявлено характеристичну смугу при 2895 см<sup>-1</sup> (-ОН<sub>3</sub> група). У продуктах лужної деструкції сполук сплавленням з кристалічним КОН було виявлено для сполуки – кемпферол флороглюцин та *n*-гідроксибензойну кислоту, для кверцетину – флороглюцин і 3,4-діоксибензойну кислоту, для ізорамнетину – флороглюцин та ванілінову кислоту. Змішані проби кемпферолу, кверцетину, ізорамнетину з відповідними вірогідними зразками не давали депресії температури плавлення. Сполуку кемпферол охарактеризовано як 3,5,7,4'-тетрагідроксифлавоон; кверцетин – як 3,5,7,3',4'-пентагідроксифлавоон; ізорамнетин – як 3,5,7,4'-тетрагідрокси-3'-метоксифлавоон.

*С-глікозид флавонів:* ізоорієнтин. Речовина виявляється на хроматограмі у вигляді темної плями, стійка до ферментів виноградного равлика і кислотного гідролізу 10% сірчаною кислотою. За молекулярною масою і результатами ціанідинової реакції за Бріантом речовину віднесено до глюкозидів. В ІЧ-спектрі виявляються ОН-групи, ароматичні зв'язки. В УФ-спектрі речовини встановлено гідроксильні групи при С-5,7,3',4'-флавонового кільця. Для підтвердження С-глікозидної природи речовини проведено розщеплення досліджуваного глікозиду йодистоводневою кислотою у середовищі оцтового ангідриду і рідкого фенолу. В

продуктах реакції встановлено наявність лютеоліну і D-глюкози. На підставі даних ПМР-спектру виявлено, що у агліконі С-глікозиду відсутній протон при С-6, що вказує на його заміщення. За фізико-хімічними властивостями, продуктами перетворення, даними УФ-, ІЧ- і ПМР-спектрів речовина ідентифікована як ізоорієнтин – 5,7,3',4'-тетрагідрокси-6-С-D-глюкопіранозидофлавонон.

*Глікозид кемпферолу:* астрагалін. Дані ПХ, УФ-спектрів – свідчать, що сполука є флавонолом. Речовина є 3-глікозидом, що підтверджується стійкістю до лужного гідролізу протягом 3 год. На підставі поведінки речовин в УФ-спектрі в присутності комплексоутворюючих та іонізуючих добавок доведено наявність вільних ОН- у положенні С-5 і С-7. Кількісний гідроліз 5% сірчаною кислотою з виходом аглікону 63,2% свідчить про монозидну природу речовини. Ці дані підтверджуються ІЧ-спектром і продуктами ферментного гідролізу. Аглікон сполуки було ідентифіковано як 3,5,7,4'-тетрагідроксифлавонон (кемпферол). Дані хроматографії на папері нейтралізованих гідролізатів, температура плавлення отриманих озазонів і відсутність депресії температури плавлення змішаної проби з вірогідними зразками вказують на те, що цукровою частиною глікозиду є D-глюкоза. Таким чином, сполуку ідентифіковано як 5,7,4'-тригідрокси-3-О-β-D-глюкопіранозид флавонону (астрагалін).

*Кемпферол-3-О-софорозид.* В результаті кислотного гідролізу 2% сірчаною кислотою речовини утворюється D-глюкоза. Ферментний гідроліз речовини рамнодіастазою приводить до утворення софорози.

Речовина – жовтий кристалічний порошок,  $C_{27}H_{30}O_{16}$ , т.пл. 199–201°C,  $R_f$  0,36 (система хлороформ-метанол-оцтова кислота-вода 7:3:0,5:0,5), УФ-спектр (MeOH,  $\lambda_{max}$ , нм): 258, 362, ІЧ-спектр (KBr,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3367 (ОН-група), 1655 (C=O,  $\gamma$ -пірон), 1607, 1560 (коливання ароматичного ядра),  $^1H$  ЯМР спектр: (400 МГц,  $CD_3OD$ , 5, м.ч. J/Гц,) 8,26 (1H, д,  $J = 2,2$ , H-2'), 7,98 (1H, дд,  $J=8,4, 2,2$ , H-6'), 7,22 (1H, д,  $J=8,4$ , H-5'), 6,62 (1H, д,  $J=2,0$ , H-8), 6,59 (1H, д,  $J=2,0$ , H-6), 5,34 (1H, д,  $J=7,6$ , H-1''), 4,72 (1H, д,  $J=6,6$ , H-1'''), 3,71 (1H, дд,  $J=8,9; 7,6$ , H-2''), 3,64 (1H, м, H-6a'''), 3,75 (1H, дд,  $J=12,0, 2,4$ , H-6e'''), 3,57 (1H, м, H-3''), 3,44 (1H, дд,  $J=12,0, 5,4$ , H-6a''), 3,64 (1H, м, H-6e''), 3,36 (1H, м, H-3'''), 3,33 (2H, м, H-3''', H-4'''), 3,30 (1H,

м, Н-4"), 3,26 (1Н, м, Н -5"), 3,17 (1Н, м, Н -5"),  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр: (100 МГц, CD3OD, 5, м,д.): 179,55 (С-4), 162,93 (С-5), 166,02 (С-7), 161,43 (С-4'), 158,89 (С-2), 158,38 (С-9), 134,86 (С-3), 132,30 (С-2' и С-6'), 122,77 (С-1'), 116,19 (С-3' и С-5'), 105,65 (С10), 101,04 (С-1"), 104,52(С-1""), 99,90 (С-6), 94,77 (С-8), 82,20 (С-2"), 78,12 (С-5""), 78,07 (С-5"), 77,80 (С-3""), 77,76 (С-3"), 75,40 (С-2""), 71,21 (С-4""), 71,00 (С-4"), 62,52 (С-6""), 62,38 (С-6"). На підставі порівняльного аналізу вище представлених спектральних даних та їх порівняння з такими, описаними в літературі, сполука ідентифікована як софорафлавонолозид (кемпферол-3-О- $\beta$ -D-софорозид).

*Глікозид кверцетину*: ізокверцитрин. В УФ-спектрах сполуки є два максимуми (362, 255 нм) та “плече” (265 нм), що характерно для флавонолів, у боковому фенільному радикалі яких є вільне орто-гідроксиугруповання. УФ-спектри з діагностичними добавками вказують на наявність вільних гідроксигруп в положеннях 5,7,3,4'. При кислотному гідролізі речовин виявлено аглікон (т.пл. 312-314°C) з виходом 63–65%, що характерно для моноглікозидів. Будову аглікону встановлено аналогічно кверцетину. Суміш аглікону та кверцетину не дає депресії температури плавлення, отже агліконом є кверцетин. Гідролізати досліджено на вуглеводний компонент методом хроматографії на папері з вірогідними зразками L-рамнози, D-глюкози та D-галактози. У сполуці ідентифіковано D-глюкозу. Сполуку охарактеризовано як 5,7,3,4'-тетрагідрокси-3-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид флавон (ізокверцитрин).

Рутин. При кислотному гідролізі речовини утворюється аглікон – кверцетин та цукри D-глюкоза, L-рамноза. У фільтрованому УФ-світлі речовина виявляється у вигляді темних плям, що свідчить про заміщеність гідроксилів при С-3. Дані ступінчастого гідролізу речовини виявили L-рамнозу і ізокверцитрин. У результаті проведеного ферментного гідролізу речовини отримано кверцетин і рутинозу. Речовина ідентична кверцетин-3-О- $\beta$ -D-рутинозиду (рутин).

*Ізофлавоноїди*. У зв'язку з тим, що забарвлення плям ізофлавоноїдів в УФ-світлі збігається з деякими фенолокіслотами, далі хроматографічний аналіз проводили з достовірними зразками речовин, порівнювали їх забарвлення і  $R_f$  плям, а також підтверджували структуру речовин інструментальними методами.

В результаті ідентифікації речовин за допомогою ІЧ-, УФ-,  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії, достовірно було визначено структуру наступних речовин: 7-глюкозид текторигеніну або текторидин, нігрицин, ірисктекторигенін В. Спектральні дані наведено у таблиці А.18 (Додатки).

*Ксантони:* мангіферин. В УФ-світлі на хроматограмах речовину ідентифікували за характерним темно-жовтим світінням, що характерно для дибензо- $\gamma$ -піронів. При прояві парами аміаку ці зони набували яскраво-жовтогарячого забарвлення, а після обробки хромогенним реактивом – зелене забарвлення, що підтверджує його ксантонову природу.

Мас-спектр речовини показав псевдомолекулярний іон при  $m/z$  423 ( $M^+$ ), що відповідає молекулярній формулі  $C_{19}H_{18}O_{11}$ , що підтверджено даними  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Була виявлена втрата маси 120 атомів у події  $MS^2$  ( $m/z$  303), поведінка фрагментації, типова для С-глікозидів. Інші іони були виявлені при  $m/z$  405, 369, 357, 327 і 273. На відміну від флавоноїдних О-глікозидів, С-глюкозиди не генерують великої кількості агліконових іонів, УФ-спектр речовини показав поглинання  $\lambda_{\text{max}}$  при 369, 318, 259 і 241 нм, що свідчить про ксантоновий скелет. Константа спінової взаємодії аномерного протону ( $J = 9,5$  Гц) в спектрі ПМР і стійкість речовини до кислотного гідролізу підтвердили ксантоновий 3-С-глюкозид. Хімічні, спектроскопічні та літературні дані про мангіферин вказують на структуру як 1,3,6,7-тетрагідроксиксантону С-2- $\beta$ -D-глюкозид. Це добре відомий природний ксантон, який, однак, був виділений з оцвітини к. посівного вперше.

#### 4.3 Порівняльний скринінг БАР у листі та оцвітині різних видів та сортів рослин роду Крокус

*Листя видів та сортів крокусів.* У порівняльний скринінг було включено *C. speciosus*, *C. kotschyanus*, *C. ochroleucus*, *C. zonatus*, *C. sativus*, *C. aureus*, *C. vernus*, *C. veluchensis*, *C. heuffelianus*. Результати фітохімічного скринінгу (табл. А.40, Додатки) показали, що амінокислоти присутні у всіх видах, а особливо у екстрактах *C. speciosus*, *C. kotschyanus* та *C. sativus*. Алкалоїди і кумарини в

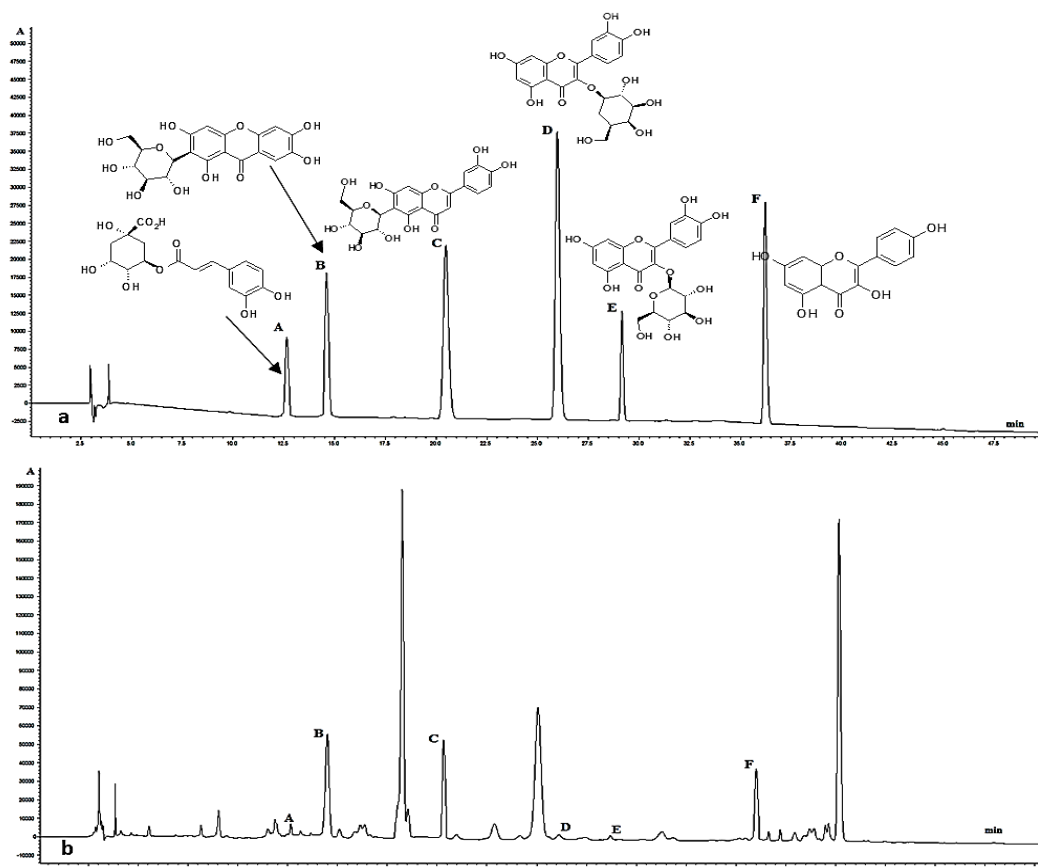


сировині не виявлені. Білки, сапоніни та тритерпеноїди присутні у всіх досліджуваних листках. Водно-спиртові екстракти листя багаті дубильні речовини, що гідролізуються (табл. А.52, Додатки). За результатами дослідження серед зразків крім к. посівного найбільшу кількість БАР містив *C. speciosus*, тому його було досліджено ретельно.

Загальна кількість флавоноїдів у листках *C. speciosus* становила  $10,62 \pm 0,42$  мкмоль/г, загальна кількість фенольних сполук –  $4,12 \pm 0,21$  мкмоль/г. Для визначення загального вмісту фенолів і флавоноїдів використовували реактиви, які реагують з різними групами фенольних сполук. Листя рослин роду Крокус містить флавони і флавонони (нарингенін та апігенін та їх глікозиди), які взаємодіють з алюмінію хлоридом і не утворюють комплексів з реактивом Фоліна-Чокальтеу. Тому загальний вміст флавоноїдів у перерахунку на рутин у листі *C. speciosus* перевищує загальну кількість фенольних сполук. Листя містить приблизно однакові кількості флавонолів і фенольних кислот (включаючи ідентифіковану хлорогенову кислоту), які не окислюються реактивом Фоліна-Чокальте.

Подальший ВЕРХ-аналіз листя *C. speciosus* показав наявність фенольних сполук: мангіферину, хлорогенової кислоти, ізоорієнтину, кемпферолу, гіперозиду та ізокверцитрину (рис. 4.7). Ізоорієнтин і кемпферол мали вищий вміст 3,68 і 1,25 мг/г відповідно. Усі ідентифіковані сполуки в листі *C. speciosus* відіграють важливу роль як антиоксиданти. Таким чином, їх наявність у сировині свідчить про потенційну антирадикальну активність її екстрактів.

УЕРХ-МС/МС у режимі негативних іонів, і їх час утримування ( $t_R$ ), розраховані молекулярні маси та дані МС/МС наведені в таблиці А.53 (Додатки). Усі сполуки були однозначно ідентифіковані порівнянням стандартів. Пік 1 ( $[M-H]^-$  при  $m/z$  353) було віднесено до монокофеохінових кислот. MS-спектр піку 1 характеризувався втратою одного фрагмента кофейної кислоти через естерний зв'язок, який легко дисоціював і був ідентифікований як 3-О-кофеїлхінна кислота або хлорогенова кислота порівняно з еталонними стандартами. У спектрі MS пік 2 утворює  $[M-H]^-$  іон при  $m/z$  421. Спектр  $MS^2$  дав переважаючі фрагментарні іони при  $m/z$  331 і 301 внаслідок нейтральної втрати  $C_3H_6O_3$  та  $C_4H_8O_4$  відповідно.



хлорогенова кислота (а), мангіферин (б), ізоорієнтин (с), гіперозид (д), ізокверцитрин (е), кемпферол (ф); (б) ВЕРХ-DAD хроматограма метанольного екстракту листа *C. speciosus*

Рис. 4.7 (а) ВЕРХ-хроматограма, записана при 310 нм, змішаних еталонних сполук

Іонний продукт низької інтенсивності при  $m/z$  259 з'явився в спектрі  $MS^2$  через втрату залишку глюкози з  $[M-H]^-$  іон. Спектр  $MS^3$  іона-попередника при  $m/z$  301 дає іон-продукт при  $m/z$  273, 271 і 257 в результаті втрати  $CO$ ,  $CH_2O$  і  $CO_2$  відповідно. Для флавонів, піки 3 ( $[M-H]^-$  при  $m/z$  447), 4 ( $[M-H]^-$  при  $m/z$  463), 5 ( $[M-H]^-$  при  $m/z$  463) і 6 ( $[M-H]^-$  при  $m/z$  285) були ідентифіковані як ізоорієнтин (розрахований для  $C_{22}H_{20}O_{11}$ ,  $m/z$  248), гіперозид (розрахований для  $C_{21}H_{20}O_{12}$ ,  $m/z$  464), ізокверцитрин (розрахований для  $C_{21}H_{20}O_{12}$ ,  $m/z$  464) і кемпферол (розрахований для  $C_{15}H_{10}O_6$ ,  $m/z$  286) відповідно. Вони були додатково підтверджені порівнянням часів утримування та спектрів  $MS/MS$  з відповідними стандартами. Високий вміст фенольних сполук та подальші результати антирадикальної активності листа *C. speciosus* обумовлюють перспективні фармакогностичні дослідження цього виду крокусу. Але зараз вирощування даного виду обмежено тільки БС України.

*Оцвітина видів та сортів крокусів.* У прескринінг БАР були включені види та сорти крокусів: *C. vernus* “Flower record”, *C. vernus* “Jeanna Dark”, *C. adamii*, *C. sativus*, *C. vernus* “Grand moidre”, *C. chrysianthus* “Gipsy girl”. Якісний хроматографічний аналіз фенольних сполук показав наявність флавоноїдів, гідроксикоричних кислот та антоціанів; склад і кількість речовин варіює залежно від виду та сорту (табл. А.52, Додатки). Наявність широкої сировинної бази та високого вмісту фенольних сполук на користь к. посівного, дало можливість подальшого аналізу листя даного виду з різних регіонів України.

#### 4.4 Дослідження складу та вмісту БАР у бульбоцибулинах к. посівного

У порівняльній морфолого-анатомічний та попередній 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 (рис. 4.8). Незважаючи на те, що хроматографічний профіль амінокислот, суми фенольних сполук були приблизно однакові, у подальше дослідження включили БЦ к. посівного з України за рахунок наявної сировинної бази.



Азербайджан

Нідерланди

Україна

Марокко

Рис. 4.8 Зовнішній вигляд бульбоцибулин к. посівного з різних країн

*Фенольні сполуки.* СФ-дослідження загального вмісту фенольних сполук у БЦ крокусу показало, що у сировині, зібраній у Херсоні (Україна) встановлено найбільший загальний вміст фенольних сполук  $19,08 \pm 1,53$  мкмоль/г (табл. 4.8). Найменшу кількість фенольних сполук у БЦ визначено у сировині, зібраній у Баку (Азербайджан) –  $3,34 \pm 0,07$  мкмоль/г, і це найменша кількість фенольних сполук, визначених після перевірки всієї доступної сировини.

Таблиця 4.8

**Порівняльний аналіз загального вмісту фенольних сполук та флавоноїдів у БЦ к. посівного з різних регіонів України (СФ-метод, мкмоль/г)**

Регіон	Загальний вміст фенольних сполук	Загальний вміст флавоноїдів
Херсон, Україна	19,08 ± 1,53	11,61 ± 0,58
Миколаїв, Україна	9,12 ± 0,78	8,52 ± 1,25
Н. Буйнен, Нідерланди	8,54 ± 1,26	6,31 ± 0,48
Талуїдин, Марокко	7,31 ± 1,06	2,96 ± 0,21
Баку, Азербайджан	3,34 ± 0,07	5,76 ± 0,72

Найбільшу кількість флавоноїдів у БЦ визначено у сировині, зібраній у Херсоні – 11,61 ± 0,58 мкмоль/г (табл. 4.8). Найменшу кількість флавоноїдів виявлено у БЦ з Марокко – 2,96 ± 0,21 мкмоль/г, і це найменша кількість флавоноїдів, визначена після дослідження. Для БЦ крокусу з Нідерландів та Азербайджана значення становило 7,55 ± 0,25 та 5,35 ± 0,54 мкмоль/г.

Методом ВЕРХ у БЦ крокусу з різних країн проведено дослідження вмісту окремих фенольних сполук (табл. 4.9). У найбільшій кількості містяться хлорогенова кислота (0,03 мг/г) і ферулова кислота (0,01 мг/г) у зразку з Херсону.

Таблиця 4.9

**Вміст фенольних сполук у БЦ к. посівного, мг/г (метод ВЕРХ)**

Показник	Україна		Азербайджан	Нідерланди	Марокко
	Херсон	Миколаїв			
Хлорогенова кислота	0,032 ± 0,02	0,011 ± 0,02	- <sup>1</sup>	0,025 ± 0,03	0,014 ± 0,02
Ферулова кислота	0,005 ± 0,00	-	0,002 ± 0,01	0,004 ± 0,001	-

Примітка. 1 – речовину не виявлено.

*Карбонові кислоти та амінокислоти.* Дослідження БЦ к. посівного з Херсона показало наявність 35 карбонових кислот та 13 амінокислот, серед них домінуючими є: L-пролін (12,42%), L-глутамінова кислота, L-аланін (8,43%), L-валін (4,96%), L-треонін. Серед насичених жирних кислот домінувала пальмітинова кислота (6,87%). У БЦ вміст ліноленової кислоти значно нижчий

(0,99%), за рахунок перебування БЦ на глибині не менше 20 см (відповідно до розроблених ГАСР для крокусу), що зберігає підземні органи рослини від переохолодження та сприяє репродукції. Однак вміст Е-олеїнової кислоти складає 5,89%. Дані профілю БЦ к. посівного наведено у таблиці А.49-А.51 (Додатки).

Якісне визначення амінокислот у БЦ к. посівного з Херсону методом ТШХ показало наявність від 5 до 10 хроматографічних зон адсорбції за характером забарвлення та значеннями  $R_f$ , які збігаються зі стандартними зразками амінокислот. Інтенсивність фарбування плям була різною. У більшості проб були виявлені пролін, глютамінова кислота, аланін, валін, треонін, лейцин, ізолейцин і фенілаланін. Перелічені амінокислоти є незамінними (за винятком аланіну) для організму людини, тому досліджувана сировина певною мірою може служити природним джерелом амінокислот. Колір амінокислотних плям після обробки нінгідрином змінювався від рожевого до фіолетового.

*Тритерпенові сапоніни.* Методом ВЕРХ встановлено наявність у БУ к. посівного похідних тритерпенових сапонінів (рис. 4.9). Ідентифіковано два піки похідних речовин, але за відсутності стандартів та даних літератури точно ідентифікувати ці речовини не вдалося.

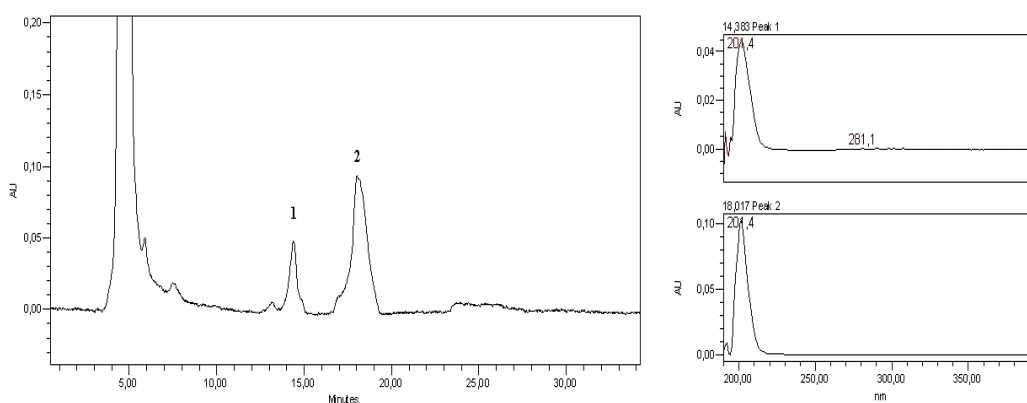
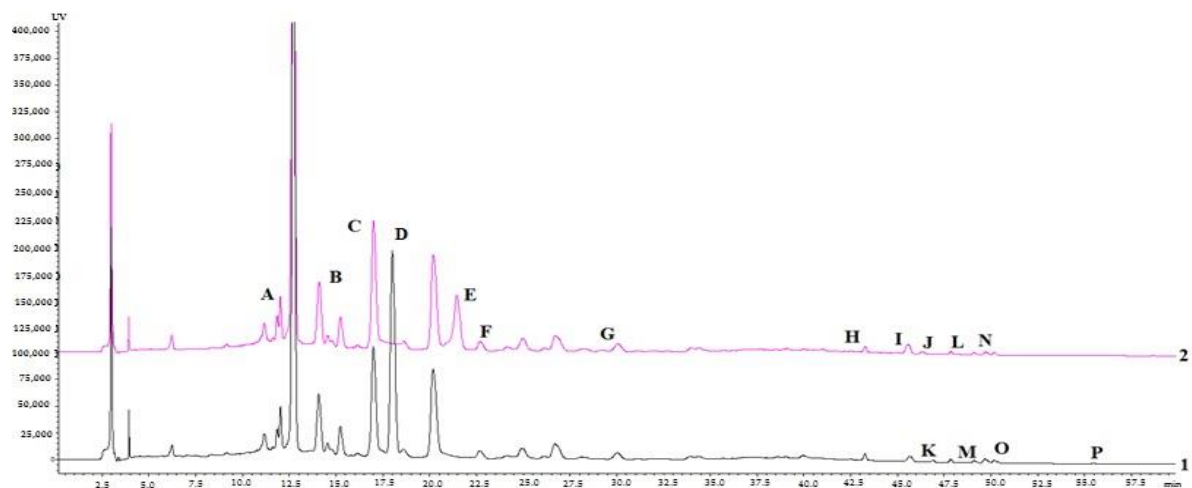


Рис. 4.9 Типова ВЕРХ хроматограма ацетонового екстракту БЦ к. посівного при довжині хвилі 205 нм

## 4.5 Хімічний профіль сухих екстрактів з побічних продуктів виробництва шафрану та обговорення результатів їх фармакологічного дослідження

### 4.5.1 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з листя к. посівного

*Похідні гідроксикоричних кислот.* В сухих екстрактах листя к. посівного встановлено наявність хлорогенової, кофейної, ферулової та коричної кислот (рис. 4.10, табл. 4.10). Вміст хлорогенової кислоти у водному та етанольному екстрактах листя крокусу був однаковим (0,68 мг/г). Корична кислота, попередник у біосинтезі флавоноїдів, була знайдена лише в етанольному екстракті листя крокусу (1,42 мг/г). Екстракти листя крокусу містять більше похідних гідроксикоричних кислот і менше флавоноїдів.



хлорогенова кислота (A); кофейна кислота (B); мангіферин (C); ізоорієнтин (D); ферулова кислота (E); рутин (F), текторидин (G); кверцетин (H); корична кислота (I); нігрицин (J); геністеїн-7-глюкозид (K); апігенін (L); кемпферол (M); іристекторигенін b (N); іригенін (O); біоханін A (P)

Рис. 4.10 ВЕРХ–ДМД хроматограми сухих екстрактів листя к. посівного водного (чорна лінія 1) та етанольного (рожева лінія 2) екстрактів

*Ксантони.* Рослини родини Ірисові накопичують різноманітні ксантони, переважно С-глікозилксантони. У рослин роду Крокус мангіферин був ідентифікований лише у листках *C. aureus* і *C. stellaris* [22]. Тому мангіферин можна вважати одним із маркерів цієї родини. На хроматограмах пік C на 17.18 хв ідентифікували як мангіферин на основі порівняння з УФ-спектром

стандарту. Це перший звіт про ідентифікацію мангіферину в екстрактах листя к. посівного, його вміст був майже рівним в обох екстрактах (1,8–2,0 мг/г).

*Флавоноїди, ізофлавоноїди та їх глікозиди.* Флавоноїдні глікозиди краще екстрагуються водою. Ізорієнтин і геністеїн-7-О-глюкозид були ідентифіковані лише у водному екстракті листя к. посівного. Вміст ізофлавонового глікозиду текторидину був вищим у етанольному екстракті (0,11 мг/г). Флавоноїдні аглікони є більш гідрофобними, ніж їхні відповідні глюкозиди, і тому їх розчинність низька. Розчинність кверцетину і кемпферолу у воді дуже обмежена. Таким чином, концентрація кемпферолу у водному екстракті (0,033 мг/г) була більш низькою порівняно з етанольним екстрактом (0,046 мг/г). Текторидин та іристоригенін В раніше були виділені або ідентифіковані лише у рослинах роду Ірис [8].

Таблиця 4.10

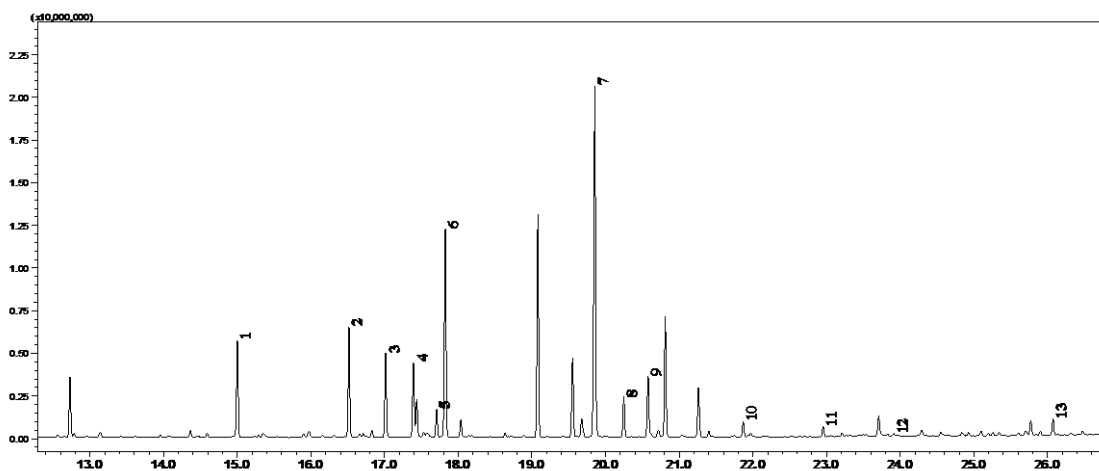
**Вміст вторинних метаболітів (мг/г сухої маси) у водному та етанольному сухих екстрактах листя к. посівного**

№	Речовина	Rt, min/λ, нм	Вміст, мг/г	
			Водний	Етанольний
A	Хлорогенова кислота	11.66/310	0,677 ± 0,037	0,678 ± 0,004
B	Кофейна кислота	14.18/310	- <sup>1</sup>	1,425 ± 0,012
C	Мангіферин	17.18/270	1,823 ± 0,124	2,031 ± 0,648
D	Ізоорієнтин	17.66/310	8,508 ± 0,001	-
E	Ферулова кислота	21.64/310	-	0,251 ± 0,005
F	Рутин	22.48/310	0,085 ± 0,027	0,100 ± 0,005
G	Текторидин	29.69/270	0,044 ± 0,032	0,107 ± 0,045
H	Кверцетин	43.71/310	-	0,255 ± 0,003
I	<i>транс</i> -корична кислота	45.22/270	0,106 ± 0,001	0,333 ± 0,006
J	Нігрицин	45.50/270	-	0,069 ± 0,003
K	Геністеїн-7-глюкозид	46.07/270	0,407 ± 0,015	-
L	Апігенін	47.90/340	-	0,088 ± 0,005
M	Кемпферол	48.96/310	0,033 ± 0,003	0,046 ± 0,002
N	Іристоригенін В	49.15/270	0,073 ± 0,025	0,058 ± 0,003
O	Іригенін	50.03/270	0,031 ± 0,016	0,028 ± 0,001
P	Біоханін А	55.85/270	0,108 ± 0,325	-

Примітка. 1 – речовину не виявлено. Значення представлені як середнє ± стандарт відхилення від потрійний примірник розслідування. Статистичний аналіз проведено за допомогою тесту ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Серед виявлених агліконів ізофлавоноїдів у екстрактах листя к. посівного ідентифіковано іристоригенін В, нігрицин, іригенін та біоханін А. Ці сполуки мають від 1 до 3 гідроксигруп і 0–3 метоксигрупи, що впливає на їх розчинність у екстрагенті. Концентрація іристоригенін В (три ОН групи) у водному екстракті листя була дещо вищою (0,073 мг/г), ніж в етанольному (0,058 мг/г). Нігрицин (має одну ОН-групу та дві ОСН<sub>3</sub>-групи) виявлено лише у водному екстракті листя (0,069 мг/г). Біоханін А був виявлений лише у водному екстракті (0,108 мг/г). Іригенін (три ОН-групи, три групи ОСН<sub>3</sub>), як і інші ізофлавоноїди, вперше виявлено в екстрактах листя; однак він показав найнижчу концентрацію серед усіх ідентифікованих речовин (0,028 мг/г і 0,031 мг/г для етанольного та водного екстрактів відповідно). Відзначено, що флавоноїдний глікозид ізоорієнтин показав вищій вміст (8,51 мг/г) порівняно з іншими компонентами. Враховуючи, що флавоноїди є потужними антипроліферативними та цитотоксичними агентами [170] їх наявність сприяє цитотоксичній активності в екстрактах к. посівного.

*Амінокислоти та карбонові кислоти.* Визначення вмісту амінокислот та карбонових кислот проводили для водного екстракту листя к. посівного. Загальний профіль амінокислот наведено на рисунку 4.11.



1) L-аланін; 2) L-валін; 3) L-лейцин; 4) ізолейцин; 5) L-пролін; 6) L-метіонін; 7) L-серин; 8) L-треонін; 9) L-фенілаланін; 10) L-аспарагінова кислота; 11) L-глутамінова кислота; 12) L-лізин; 13) L-тирозин

Рис. 4.11 ГХ-МС хроматограма амінокислот водного екстракту листя к. посівного

Експериментальні дані показали, що більший загальний вміст амінокислот очікувано має водний екстракт листя крокусу – 31,99 мг/г. Переважаючими



амінокислотами водного екстракту листя к. посівного були ліпофільні амінокислоти (аланін (2,71 мг/г), валін (3,02 мг/г), лейцин (2,40 мг/г), ізолейцин (2,32 мг/г), пролін (4,68 мг/г)), які зумовлюють інгібування вільних радикалів шляхом донорства протонів і виявляють високу антиоксидантну активність екстрактів. В обох зразках есенціальні амінокислоти (аланін, валін, пролін, валін, лейцин, фенілаланін, ізолейцин) мали високий вміст (табл. А.47, Додатки).

Серед карбонових кислот знайдена гліколева кислота, що є відомим кератолітиком у косметології, її вміст у водному екстракті листя крокусу становив 0,69%. Тільки у екстракті листя знайдена тиглієва кислота (0,32%). Також ідентифікована яблучна кислота (2,07%), яка домінувала серед органічних кислот. При застосуванні ГХ-МС для одночасного визначення карбонових кислот та амінокислот у водному екстракті листя к. посівного всього було ідентифіковано 20 речовин (табл. А.54, Додатки).

#### 4.5.2 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з оцвітини к. посівного

Враховуючи, що склад БАР к. посівного різний залежно від використовованого екстрагенту, отримано водний та етанольний екстракти оцвітини (табл. 4.11). Методом ВЕРХ було визначено профіль фенольних сполук та апокаротиноїдів у сухих екстрактах (рис. А. 50-А.53, Додатки). Кроцини, як гідрофільні каротиноїди, більше містяться у водному екстракті в кількості 3,79 мг/г, тоді як у етанольному лише 0,2 мг/г. Мангіферин виявлено в обох екстрактах оцвітини. Вміст мангіферину був вищим у водному екстракті (1,09 мг/г), ніж у етанольному (0,89 мг/г), що пояснюється наявністю залишку глюкозиду. Апігенін-7-О-глюкозид та ізоорієнтин (флавіон С-глюкозид лютеоліну) були ідентифіковані лише у водному екстракті оцвітини, 2,59 мг/мл, г, 4,76 мг/г і 0,67 мг/г відповідно. Крім того, подібна картина спостерігалася для інших ідентифікованих флавоноїдних глюкозидів. Для рутину виявлено значно вищий вміст у водному екстракті (81,16 мг/г), ніж у етанольному (65,79 мг/г).

Таблиця 4.11

**Вміст ідентифікованих сполук (мг/г) в сухих екстрактах оцвітини к.  
посівного методом ВЕРХ**

Сполука	Час утримування, хв/λ, нм	Екстракти оцвітини к. посівного	
		Водний	Етанольний
Мангіферин	13,83/270	1,091 ± 0,014	0,885 ± 0,010
Ізоорієнтин	16,74/310	0,668 ± 0,112	- <sup>1</sup>
Кемпферол-3- <i>O</i> -софорозид	17,94/310	-	-
Рутин	20,46/310	81,157 ± 0,580	65,785 ± 1,089
Ферулова кислота	22,74/310	0,045 ± 0,004	0,247 ± 0,003
Ізокверцитрин	24,76/350	1,785 ± 0,004	1,322 ± 0,026
Текторидин	31,34/270	1,423 ± 0,003	0,921 ± 0,070
Апігенін-7- <i>O</i> -глюкозид	31,41/340	2,587 ± 1,587	-
<i>транс</i> - Кроцин 4	38,00/440	3,788 ± 0,015	0,203 ± 0,003
<i>транс</i> - кроцин 2	40,59/440	-	-
Кверцетин	43,63/310	0,229 ± 0,540	0,253 ± 0,003
<i>цис</i> – кроцин 4	47,07/440	-	-
<i>цис</i> – кроцин 3	48,36/440	0,809 ± 0,361	-
Нігрицин	48,94/270	0,052 ± 1,137	0,099 ± 0,022
Іристекторигенін В	49,15/270	0,139 ± 0,012	0,142 ± 0,006
Кемпферол	49,43/310	0,820 ± 0,003	1,018 ± 0,021

Примітка. 1 – речовину не виявлено. Значення представлені як середнє ± стандарт відхилення від потрійний примірник розслідування. Статистичний аналіз здійснений за допомогою тесту ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Рутин був вперше ідентифікований в екстрактах оцвітини к. посівного. Ізокверцитрин і кверцетин були виявлені в обох екстрактах оцвітини. Вміст ізокверцитрину в етанольному екстракті був меншим (1,32 мг/г), ніж у водному (1,78 мг/г), а вміст кверцетину в екстрактах був приблизно однаковим (0,2 мг/г) (табл. 4.11). Ізофлавонони в оцвітині к. посівного були виявлені вперше. У водному екстракті вміст текторидину був вищим (1,42 мг/г) порівняно з етанольним (0,92 мг/г). Ірисктекторигенін В був знайдений у оцвітині приблизно в рівній кількості у обох екстрактах (0,14 мг/г). Вміст нігрицину в етанольному екстракті був вищим (0,10 мг/г), ніж у воді (0,05 мг/г), розчинність сполук зумовлені наявністю в молекулі групи 2-OCH<sub>3</sub>, що ускладнює розчинення у воді. Таким чином, вплив замісників на розчинність сполук ще раз підтверджується на прикладі залежності вмісту в екстрактах оцвітини від будови. Вихід компонентів у водному екстракті є вищим та здебільшого вони представлені похідними глікозидів.

*Амінокислоти та карбонові кислоти.* Результати дослідження вмісту амінокислот та карбонових кислот в екстрактах з оцвітини наведено у таблицях А.47–А.48 (Додатки). Зокрема, у водному екстракті оцвітини к. посівного з Херсону було ідентифіковано L-аланін, L-валін, L-лейцин, ізолейцин, L-серин, L-треонін та L-піроглютамінову кислоту (загальний вміст  $1158,4 \pm 29,7$  мкг/г).

Серед карбонових кислот встановлено високий вміст бутандіової кислоти (3,56%), гліколевої кислоти (1,66%), молочної кислоти (1,91%) у водному екстракті. Щавлева кислота ідентифікована тільки у водному екстракті – 1,93%. Всього ідентифіковано 17 речовин ГХ-МС методом при одночасному визначенні карбонових кислот та амінокислот у водному екстракті оцвітини к. посівного.

#### 4.5.3 Дослідження хімічного профілю сухих екстрактів з БЦ к. посівного

*Фенольні сполуки.* ВЕРХ аналіз виявив наявність мангіферину, ферулової кислоти, нігрицину, геністеїн 7-глюкозиду, текторидину, 5,7-дигідрокси-4'-метоксиізофлавонону та коричних кислот в екстрактах (табл. 4.12). У етанольному екстракті БЦ к. посівного найбільший вміст мав мангіферин ( $2,18 \pm 0,05$  мг/г).

Таблиця 4.12

**Вміст ідентифікованих сполук (мг/г) в сухих екстрактах бульбоцибулин к. посівного (метод ВЕРХ)**

Сполука	Час утримування, хв/λ, нм	Екстракти БЦ к. посівного	
		<i>Вода</i>	<i>Етанол</i>
Мангіферин	17,18 / 270	0,35 ± 0,08	2,18 ± 0,05
Ферулова кислота	21,64 / 310	0,41 ± 0,02	1,03 ± 0,04
Тексторидин	29,69 / 270	0,31 ± 0,03	-
<i>t</i> -Корична кислота	45,22 / 270	- <sup>1</sup>	0,10 ± 0,05
Геністеїн-7-глюкозид	46,07 / 270	-	0,24 ± 0,02
Апігенін	47,90 / 270	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
іристоригенін В	49,15 / 270	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,05
Нігрицин	49,50 / 270	0,03 ± 0,01	0,68 ± 0,03
Іригенин	50,03 / 270	0,09 ± 0,01	-
Біоханін А	55,85 / 270	-	0,01 ± 0,01
Германаїзм В	41,08 / 270	-	-

Примітка. 1 – речовину не виявлено. Значення представлені як середнє ± стандарт відхилення від потрійний примірник розслідування. Статистичний аналіз здійснений за допомогою тесту ANOVA ( $p < 0,05$ ).

*Амінокислоти та карбонові кислоти.* Встановлено вміст у водному екстракті з БЦ наступних амінокислот: L-аланін, L-валін, L-лейцин, ізолейцин, L-пролін, L-піроглютамінова кислота, L-серин, L-треонін, L-фенілаланін (табл. А.47, Додатки). Фенілаланін у невеликих кількостях виявлено лише в БЦ крокусу (0,06 мг/г). Сухий водний екстракт БЦ крокусу показав високий вміст піроглютамінової кислоти – 12,35 мг/г, яка є ключовим попередником у біосинтезі БАР первинних і вторинних метаболітів. ТШХ визначення амінокислот у екстрактах БЦ к. посівного показало наявність декількох хроматографічних зон адсорбції за характером забарвлення та значеннями  $R_f$ , які збігаються зі стандартними зразками амінокислот, а саме: пролін, аланін, валін, піроглютамінова кислота, треонін, фенілаланін.

Методом ГХ-МС при одночасному визначенні амінокислот та карбонових кислот і порівнянні з бібліотекою мас-спектрів Nist у водному екстракті БЦ к. посівного було ідентифіковано 20 речовин (табл. А.48, Додатки). Найбільший вміст мали: бутандіова кислота (3,24%), яблучна (14,50%), молочна кислота (1,73%). Лимона кислота (0,35%) знайдена лише у водному екстракті БЦ.

Полісахариди – це високомолекулярні вуглеводи, ланцюжки моносахаридних залишків, з'єднаних глікозидним зв'язком. Умови, за яких отримували полісахаридний комплекс з БЦ, є типовими та стійкими для одержання тільки полісахаридів. Інші речовини залишаються у водному екстракті і тільки полісахариди осідають при додаванні 96% етанолу. Автори [367] вивчали склад БЦ к. посівного від стадії спокою до стадії проростання, склад домінуючих амінокислот і цукрів був наступний: аспартат; глютамін; аланін; фруктоза; галактоза; глюкоза; гліцин; глюконова кислота; молочна кислота; лейцин; мальтозу; яблучна кислота; фенілаланін; пролін; рибоза; серин; треонін; валін; та ін.

В завдання дослідження входило отримати весь білково-полісахаридний комплекс без фракціонування та провести аналіз його цитотоксичної активності. Для дослідження брали БЦ крокусу, які вирощувалися відповідно до розроблених норм ГАСР у Херсоні, для забезпечення сталості складу БАР в органах рослини. Протягом трьох років БЦ стандартизували за складом амінокислот, домінуючими є: L-пролін, L-глутамінова кислота, L-аланін, L-валін, L-треонін. Стандартизований профіль амінокислот не змінювався.

#### 4.6 Обговорення результатів вивчення фармакологічної активності екстрактів листя, оцвітини та бульбоцибулин к.посівного

##### 4.6.1 Дослідження антиоксидантної дії екстрактів методом *in vitro*

Антиоксидантний потенціал рослинних екстрактів досліджується на першому етапі, як фактор, що лежить в основі всіх патологічних процесів. Окрім к. посівного у дослідження було включено листя *C. speciosus*, оскільки в попередніх

дослідженнях встановлено високий вміст БАР. Порівняльні дані антиоксидантного потенціалу для сировини крокусів наведено у табл. 4.13. Загалом антиоксидантний потенціал листя *C. speciosus* був на рівні зі зразками листя к. посівного з Харкова та Херсону, та становив 150 мкмоль/г. Але, потужність всієї сировини к. посівного були вищі, а ніж оцвітина та БЦ *C. speciosus*. Перспективність дослідження сировини к. посівного додатково обумовлена наявністю сировинної бази.

Таблиця 4.13

**Результати вивчення антирадикальної активності рослинної сировини методом спектрофотометрії за реакцією з ABTS•+ у перерахунку на Тролокс (Trolox мкмоль/г)**

Вид крокусу	Листя	Оцвітина	Бульбоцибулини
<i>C. speciosus</i>	150,08 ± 4,5	54,18 ± 0,95	77,53 ± 1,36
К. посівний			
Миколаїв, 2018	362,58 ± 3,13	78,95 ± 1,39	80,50 ± 3,22
Харків, 2019	150,08 ± 3,22	147,57 ± 2,59	284,65 ± 17,08
Херсон, 2019	150,40 ± 2,03	226,08 ± 3,98	116,88 ± 5,84
Херсон, 2018	150,03 ± 2,64	186,86 ± 3,28	105,74 ± 4,25

Подальший аналіз екстрактів проводили із застосуванням методу хроматографії ВЕРХ/ABTS. Всього в екстрактах (листя, оцвітина, БЦ) к. посівного виявлено 31 сполуку. Серед них 12 сполук проявили антиоксидантні властивості – мангіферин, ізоорієнтин, хлорогенова кумарова, саліцилова, кофейна і ферулова кислоти, рутин, текторидин, геністеїн-7-глюкозид, апігенін-7-глюкозид і 7-гідроксиізофлавіон – і 19 неідентифікованих антиоксидантів у листі та оцвітині. Розподіл речовин з антиоксидантним потенціалом, які визначені у сухих екстрактах наведено на рисунку А.54 (Додатки).

Результати продемонстрували різну антирадикальну активність між водним та етанольним екстрактами листя, БЦ і оцвітини для ідентифікованих і неідентифікованих сполук к. посівного (табл. 4.14). Показники антиоксидантної активності водного та етанольного екстрактів листя становили 495,83 та 669,63 ммоль/г відповідно і були порівняні з тролоксом (385,5 ммоль/г), що свідчить про виражену дію екстрактів листя. Найвищі антиоксидантні властивості виявили

мангіферин, ізоорієнтин, кофейна кислота, ферулова кислота, рутин і текторидин. Біоактивність листя корелювала з наявністю наступних двох антиоксидантних фенольних сполук: мангіферину та рутину.

Таблиця 4.14

**Антирадикальна активність індивідуальних сполук екстрактів  
оцвітини к. посівного (ВЕРХ/ABTS, еквівалент тролоксу ммоль/г)**

Сполука	Водний екстракт	Етанольний екстракт
Мангіферин	15,76 ± 0,28	128,13 ± 2,25
Ізоорієнтин	5,51 ± 0,10	- <sup>1</sup>
Рутин	7,78 ± 0,14	3,77 ± 0,07
Ферулова кислота	9,12 ± 0,16	110,15 ± 1,94
Текторидин	15,16 ± 0,27	11,60 ± 0,20
Кверцетин	10,05 ± 0,18	121,11 ± 2,13
Апігенін-7-О-глюкозид	6,13 ± 0,11	-
Ірисктекоригенін В	13,47 ± 0,24	23,06 ± 0,41
Нігрицин	5,66 ± 0,10	3,04 ± 0,05
Загальна активність	88,64 ± 1,56	400,86 ± 7,05

Примітка. 1 – речовину не виявлено. Значення представлені як середнє ± стандартне відхилення від трикратних досліджень. Статистичний аналіз проводили за допомогою тесту ANOVA ( $p < 0,05$ ).

В екстрактах оцвітини к. посівного найвиваженіше проявили активність мангіферин, ізоорієнтин, ферулова кислоти, рутин, апігенін-7-глюкозид, ірисктекоригенін В та нігрицин (табл. 4.14). Етанольний екстракт оцвітини показав вищу активність (400,86 ммоль/г), ніж Тролокс, але дещо нижче аніж екстракт листя. У випадку ABTS сильніша антиоксидантна активність спостерігалася в етанольних екстрактах оцвітини к. посівного для мангіферину (128,13 ммоль/г) і кверцетину (121,11 ммоль/г).

Екстракт листя *C. speciosus* також проявили потужний антиоксидантний ефект (1049,930 мкмоль/г) за рахунок фенольних сполук (хлорогенова кислота, мангіферин, ізоорієнтин, гіперозид, ізокверцитрин, кемпферол). Найбільшу антиоксидантну активність проявили мангіферин, ізоорієнтин та кемпферол (табл. 4.15). Інші піки сполук також присутні на хроматограмі, але вони не виявили антиоксидантної активності, тому дані не наводили.

Таблиця 4.15

**Антирадикальна активність індивідуальних сполук сухих екстрактів  
листя к. посівного та сировини *C. speciosus* (ВЕРХ/АВТС, еквівалент  
тролоксу ммоль/г)**

Компонент	<i>C. speciosus</i> , мкмоль/г, сировина	К. посівний, екстракти, ммоль/л	
		Водний	Етанольний
Хлорогенова кислота	10,882 ± 0,191	–	-
Кофейна кислота	-	15,42 ± 0,14	17,21 ± 0, 21
Мангіферин	150,923 ± 2,654	405,92 ± 0,26	384,13 ± 0,14
Ізоорієнтин	376,061 ± 6,612	21,31 ± 0,01	18,91 ± 0,20
Ферулова кислота	-	–	16,24 ± 0,07
Рутин	-	50,04 ± 0,15	209,10 ± 0,09
Гіперозид	46,934 ± 0,825	-	-
Ізокверцитрин	26,740 ± 0,470	-	-
Текторидин	-	3,01 ± 0,001	24,04 ± 0,02
Кемпферол	438,401 ± 7,708	-	-
Загальна активність	1049,941 ± 18,46	495,83 ± 12,31	669,63 ± 0,75

Екстракти БЦ к. посівного проявили дуже слабку антирадикальну дію. Для етанольного екстракту БЦ загальна активність для ідентифікованих та неідентифікованих сполук становила 115,20 ммоль/г у еквіваленті тролоксу. А найбільший вклад в антиоксидатний потенціал водного екстракту БЦ мав геністин, але все рівно дія була дуже помірною (30,24 ммоль/г).

Встановлена антиоксидантна активність рослинних екстрактів крокусів корелювала з вмістом ідентифікованих сполук у сировині к. посівного і продемонструвала потенційну біоактивність і антиоксидантну активність, пов'язану з її здатністю поглинати радикали.

#### 4.6.2 Дослідження цитотоксичної дії екстрактів к. посівного та індивідуальних речовин методом *in vitro*

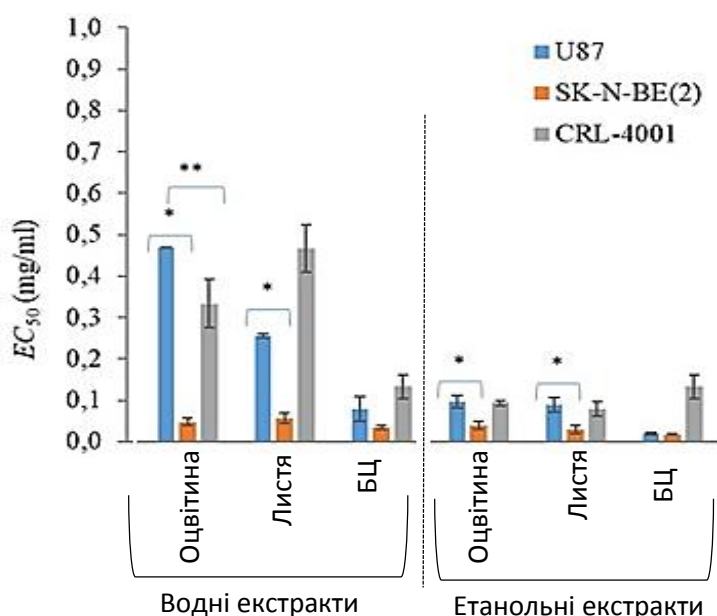
Сухі екстракти з к. посівного пригнічували життєздатність випробуваних ракових клітин та демонстрували більш високу активність проти лінії клітин раку нейробластоми (SK-N-BE(2)). Найбільш активним виявився етанольний



екстракт БЦ, його значення  $EC_{50}$  проти клітин SK-N-BE(2) становило 0,018 мг/мл та 0,02 мг/мл проти клітин гліобластоми U-87 (рис. 4.13). Майже всі екстракти показали більшу активність проти ракових клітин порівняно з фібробластами. Етанольний екстракт БЦ показав найсильніший вплив на утворення колоній та продемонстрував зменшення їх кількості та розміру. Водний екстракт оцвітини показав сильний вплив на ріст пухлинних сфероїдів в обох лініях ракових клітин.

Етанольний екстракт листя крокусу (рис. 4.14а) знижував життєздатність ракових клітин IGR39 і MDA-MB-231 з  $EC_{50} = 410$  і 330 мкг/мл відповідно, вірогідно за рахунок основних компонентів мангіферину (до 2 мг/г) та ізоорієнтину (8,5 мг/г). Водний та етанольний екстракти оцвітини к. посівного (Рис. 6.14б) знижували життєздатність меланоми (IGR39) ( $IC_{50}$  0,50 та 0,58 мг/мл, відповідно) та потрійно негативного раку молочної залози (MDA-MB-231) ( $IC_{50}$  1,25 та 1,20 мг/мл відповідно). Обидва екстракти були приблизно вдвічі більш активними проти меланоми, ніж клітинна лінія раку молочної залози (Рис. 4.14).

Активність водного екстракту оцвітини к. посівного була вищою проти клітин меланоми, ймовірно, через високий вміст глікозидів.



\* 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. 4.13 Порівняння значень  $EC_{50}$  екстрактів к. посівного між різними клітинними лініями через 72 год

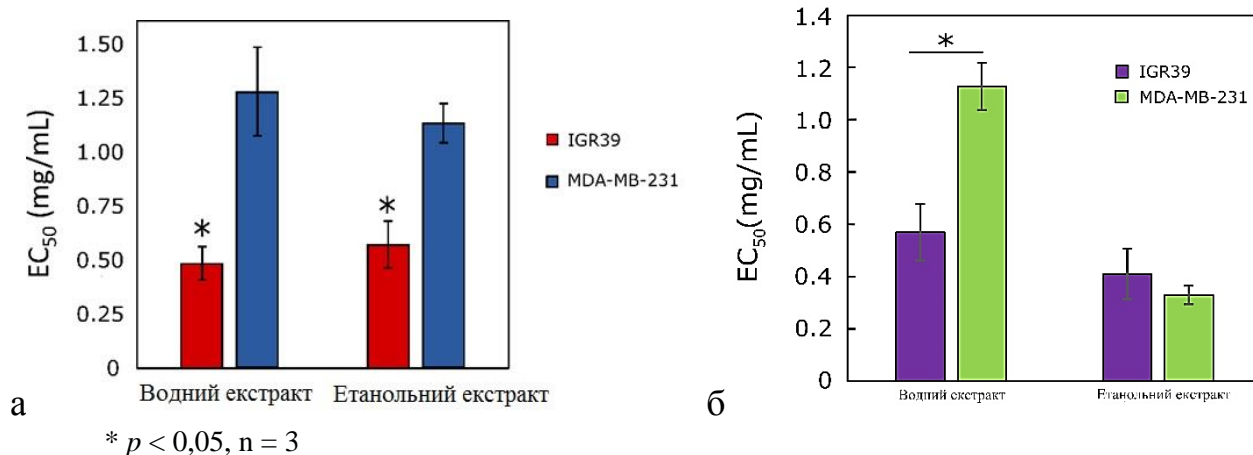


Рис. 4.14 Значення EC<sub>50</sub> екстрактів к. посівного оцвітини (а) та листя (б) проти клітинних ліній MDA-MB-231 та IGR39 через 72 год

Етанольний екстракт листя був більш активним (рис. 4.14а), ніж водний екстракт листя для обох клітинних ліній (EC<sub>50</sub> етанольного екстракту проти IGR39:  $0,41 \pm 0,10$  мг/мл, проти MDA-MB-231:  $0,33 \pm 0,04$  мг/мл; EC<sub>50</sub> для водного екстракту проти IGR39:  $0,57 \pm 0,11$  мг/мл, проти MDA-MB-231:  $1,13 \pm 0,09$  мг/мл). Встановлено, що водні екстракти значно знижували життєздатність клітин меланоми порівняно з клітинами потрійно-негативного раку молочної залози.

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*. Важливо було дослідити дескриптори з найвищою цитотоксичною активністю та вивчити можливий механізм дії вибраних сполук. Серед ідентифікованих сполук кемпферол, рутин, мангіферин і кверцетин були обрані для докінгових досліджень згідно з літературними даними щодо їх перспективності [114, 117, 303, 368]. Кілька досліджень показали, що екстракти крокусу виявляють цитотоксичну дію через присутність кроцину, пікрокроцину та шафраналю, а також фенольних сполук [94].

Згідно з результатами докінгу було виявлено, що майже всі природні сполуки з різних хімічних груп показали спорідненість до вибраних ферментів (виражену як скорингова функція) (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

**Енергія зв'язування вибраних сполук, ідентифікованих у екстрактах  
листя та оцвітині к. посівного, з амінокислотами активних центрів ферментів**

№	Сполуки	Енергія зв'язування в активному центрі, ккал/моль			
		Білки раку молочної залози			Меланома
		4RJ3	2IOK	4XYF	3ERT
1	Хлорогенова кислота	-70.448	-70.910	-95.773	-84.727
2	Кофейна кислота	-103.721	-73.071	-73.432	-79.224
3	Мангіферин	-36.321	-74.476	-93.985	-72.074
4	Ізоорієнтин	-72.180	-50.336	-103.029	-68.522
5	Ферулова кислота	-74.705	-90.033	-75.126	-90.066
6	Рутин	-59.391	-62.756	-53.408	-75.257
7	Текторидин	-88.706	-78.872	-96.284	-70.155
8	Кверцетин	-77.893	-56.916	-94.328	-66.201
9	<i>trans</i> -Корична кислота	-81.085	-72.741	-60.426	-84.200
10	Геністеїн-7-глюкозид	-76.241	-67.142	-96.593	-72.092
11	Апігенін	-87.532	-73.515	-82.298	-68.500
12	Кемпферол	-90.462	-71.603	-86.092	-79.633
13	Іристокторигенін В	-79.516	-75.179	-55.603	-86.510
14	Нігрицин	-83.299	-84.250	-74.943	-81.789
15	Іригенін	-86.146	-80.691	-80.050	-56.689
	Нативні ліганди				
	Ліганд 4RJ3	-86.564			
	Ліганд 2IOK		-69.486		
	Гідрокситамоксифен				-83.083
	Ліганд 4XYF			-75.090	

Окремі компоненти екстрактів к. посівного, зокрема 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 4XYF. Крім того, спорідненість багатьох сполук (хлорогенової кислоти, ферулової кислоти, коричної кислоти та іристекторигеніну В) до рецептора естрогену (3ERT) була порівнянна з гідрокситамоксифеном. Однак, роль кожної сполуки має бути доведена принаймні дослідженнями *in vitro*.

Для оцінки впливу окремих сполук на цитотоксичну активність цілісних екстрактів, кілька сполук, таких як кверцетин, кемпферол, мангіферин, рутин, апігенін, кофейна кислота, іригенін, нігрицин і текторидин, були протестовані *in vitro* проти меланоми та потрійно-негативної клітинні лінії раку молочної залози (рис. 4.15).

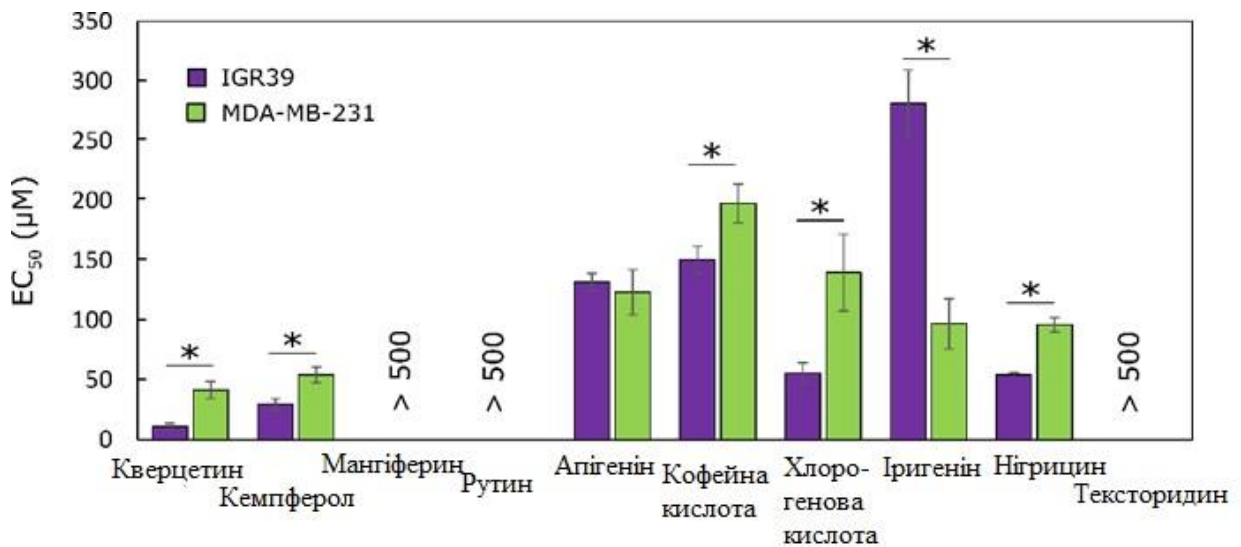


Рис 4.15 Цитотоксична активність індивідуальних речовин проти клітинних ліній IGR39 та MDA-MB-231, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 3$

Найактивнішими сполуками виявились кемпферол і кверцетин, але їх концентрація в екстрактах була не дуже високою. Отже, можна припустити, що активність екстрактів листя, оцвітини та БЦ к. посівного була зумовлена синергетичною активністю всіх цитотоксичних сполук.

Полісахаридний комплекс БЦ к. посівного показав дуже високу активність

щодо потрійного негативного раку молочної залози людини MDA-MB-231 та клітин меланоми людини IGR39 (рис. 4.16а) ( $EC_{50}$  0,2 мг/мл).

Клітини піддавали впливу різних досліджуваних екстрактів полісахаридних комплексів БЦ (від 1 мг/мл до 15,56 мкг/мл) (рис. 4.16б). Найактивнішим був екстракт № 2, що мав  $EC_{50}$  0,14 мкг/мл проти клітинної лінії MDA-MB-231 і 0,23 мкг/мл проти клітинної лінії IGR39. Він був у 17-34 рази активнішим, ніж екстракт №5, проти тих же двох клітинних ліній.

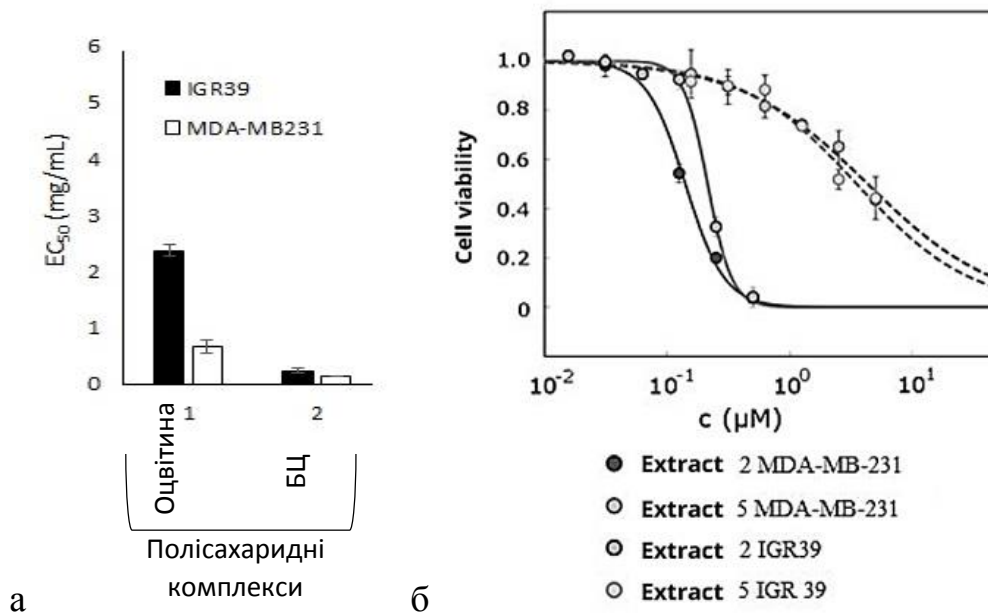


Рис. 4.16 (а) Значення  $EC_{50}$  полісахаридних комплексів оцвітину та БЦ к. посівного та проти клітинних ліній MDA-MB-231 та IGR39 через 72 год,  $*p < 0,05$ ,  $n=3$ ; (б) Порівняння активності екстракту БЦ к. посівного 2 і 5 у клітинних лініях IGR39 і MDA-MB231. Експериментальні дані показані точками, а теоретичні дані (згідно з рівнянням Хілла) – лініями

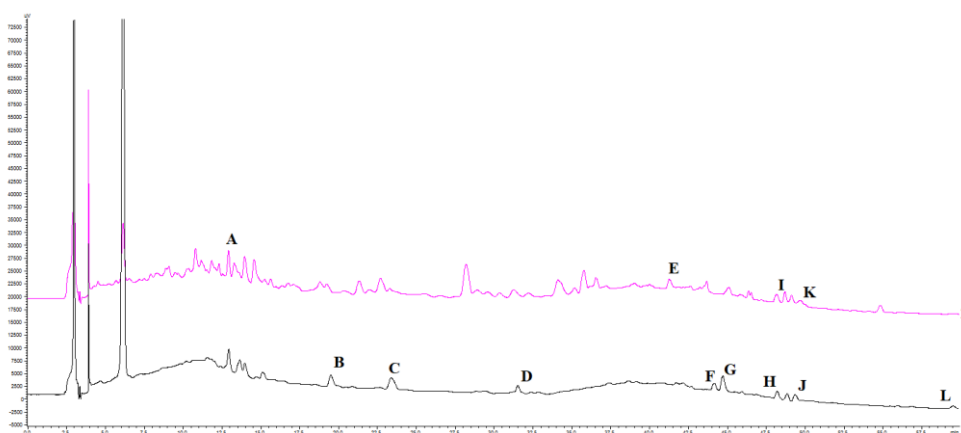
#### 4.6.3 Результати дослідження антибактеріальної дії екстрактів методом *in vitro*

Сухі спиртові екстракти з оцвітину, листя та БЦ к. посівного проявили помірну активність у відношенні до *St. aureus* ( $18,5 \pm 1,2$  мм), *E. coli* ( $17,2 \pm 1,3$  мм), *P. vulgaris* та *Ps. aeruginosa* ( $17,0 \pm 1,5$  мм), *C. albicans* ( $16,7 \pm 1,1$  мм). Найбільшу дію проявили спиртові екстракти по відношенню до *B. subtilis* (від

20,0 до 21,5 мм діаметр затримки зросту). Мікроорганізми були малочутливими до водних екстрактів, зона затримки росту складала не більше  $18,0 \pm 1,1$  мм. До клінічних штамів мікроорганізмів проявили помірну активність спиртові екстракти на рівні 15,5 – 17 мм діаметр затримки зросту. Найбільш виражену дію щодо клінічного штаму *St. aureus* мали спиртові екстракт побічних продуктів на рівні 16,0 – 17,5 мм діаметр затримки зросту. Досліджувані екстракти також проявляють бактеріостатичну дію по відношенню до широкого кола тест штамів мікроорганізмів, а також грибів рода *Candida*. МПК для *S. aureus*, *C. albicans* та *B. subtilis* по складала 125 мкг/мл, для інших мікроорганізмів – 250 мкг/мл. Результати дослідження антибактеріальної дії екстрактів по відношенню до тест-штамів та клінічних мікроорганізмів наведено у таблицях А.24 – А.25 (Додатки).

#### 4.6.4 Результати дослідження антиалергічної дії екстрактів *in vitro*

Дослідження антиалергічних властивостей екстрактів к. посівного, показали, що серед усіх екстрактів, найбільшу активність мали водний та етанольний екстракти БЦ: вони помітно інгібували дегрануляцію тучних клітин, стимульовану А23187 або антигеном, з діапазоном  $IC_{50}$  38-79 мкг/мл (табл. А.30, Додатки). Хімічний аналіз екстрактів БЦ показав наявність апігеніну та генистеїну як основних компонентів БЦ крокусу (рис. 4.17).



1 – водний; 2 – спиртовий екстракт. Ідентифіковані речовини: (а) – корична кислота, (b) мангіферин, (с) кумарова кислота, (d) ферулова кислота, (e) апігенін, (f) текторідин, (g) нігрицин глюкозид, (h) генистеїн глюкозид, (i) ірисктекторигенін В, (j) нігріцин, (k) іригенін, (l) біоханін А

Рис. 4.17 ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук у екстрактах БЦ к. посівного

#### 4.6.5 Результати дослідження протівірусної дії *in vitro*

Етанольний екстракт БЦ крокусу (50 мкг/мл) проявив виражений захисний ефект проти вірусу грипу від 30 – 40% захист. Водний та етанольний екстракти листя к. посівного були неактивними, включаючи антиалергійну (аналіз дегрануляції, 100 мкг/мл), протівірусну (грип H1N1 та ентеровірус D68, 50 мкг/мл; етанольний екстракт на коронавірус 229E, 10 мкг/мл) і аналіз ліпідних крапель (у дозі 100 мкг/мл). Дані наведено у таблиці А.28 (Додатки).

#### 4.6.7 Результати дослідження протизапальної дії *in vitro* та *in vivo*

Водний екстракт листя к. посівного у концентрації 10 мкг/мл інгібував утворення супероксид-аніонів на 35,67 % і вивільнення еластази на 19,62 % у нейтрофілах людини, індукованих fMLF/CB, демонструючи багатообіцяючу протизапальну дію. Більше того, обидва екстракти підвищували ефект експресії NRF2 виключно у нормальних клітинах (152,5% і 136,5% відповідно), тоді як експресія NRF2 була неушкодженою в лінії ракових клітин при 100 мкг/мл (106,2% і 104,5%, відповідно). Екстракти оцвітини продемонстрували помірний вплив на активність NRF2 у нормальних клітинах НасаТ, тоді як зниження активності NRF2 в ракових клітинах Нuh7 не спостерігалось. Дані наведено у таблиці А.23 (Додатки). Високий вміст фенольних сполук може корелювати з інгібуючим ефектом екстрактів к. посівного на утворення супероксид-аніонів у нейтрофілах та активацію NRF2 у нормальних клітинах.

Протестовані зразки полісахаридних комплексів оцвітини та БЦ крокусу у концентрації 10 мкг/мл інгібував утворення супероксид-аніонів на 17,91% та 3,56% і вивільнення еластази на 2,04% та 0,64%, відповідно, у нейтрофілах людини, індукованих fMLF/CB, що свідчить про протизапальний потенціал.

Підтвердження протизапальної дії екстрактів-лідерів к. посівного було здійснено в експериментах *in vivo*. Модель гострого ексудативного запалення стопи у щурів, викликаного карагеніном, є широко вживаною експериментальною

моделлю для вивчення протизапальних властивостей ЛРЗ. У механізмі розвитку набряку стопи беруть участь різноманітні медіатори запалення: гістамін, серотонін, кініни та простагландини (табл. 6.17, А.31 – А.33, Додатки).

Таблиця 4.17

### Результати досліджень з вивчення протизапальних властивостей

Досліджувані екстракти к. посівного, 200 мг/кг	Умови досліджу, АЕА (%)		
	Карагені новий набряк	Зимозановий набряк	Гістаміновий набряк
Водний екстракт БЦ	12	23	14
Етанольний екстракт БЦ	14	20	20
Етанольний екстракт оцвітини	2	6	10
Водний екстракт оцвітини	4	3	6

Динаміка розвитку набряку в групі позитивного контролю є характерною для даної експериментальної моделі [290, 369]. Вже через годину після введення флогену спостерігали розвиток запальної реакції, який наростав, сягаючи максимальних значень з 3-ої по 5-у год досліджу.

Тварини, які отримували водні та етанольні екстракти з БЦ к. посівного вже з 1-ої години досліджу знижували запальну реакцію на 9% і 11%, відповідно. Протягом наступного періоду (2-4 год) величина антиексудативної дії у першій групі була – 14% ( $p < 0,05$ ), 17% і 12%, а друга група виявляла статистично значущі значення – 21%, 18% і 15%. Середня АЕА об'єктів у період 2-4 годин дорівнювала 14% та 18%, відповідно. Їх активність в останню годину досліджу була низькою – 6% і 4%, відповідно. Водний та спиртовий екстракти з БЦ к. посівного у дозі 200 мг/кг виявляють помірну антиексудативну дію. Середня АЕА дорівнює 12% і 14%, відповідно.

Наступним етапом дослідження було вивчити протизапальні властивості досліджуваних об'єктів на моделі зимозанового набряку. З наведених даних (табл. А.32–А.33, Додатки) видно, що вже через півгодини після введення флогену в групі нелікованих тварин спостерігався максимальний набряк лапи, що надалі поступово знижувався і в інтервалі часу з 2-ої по 3-ю год знову мав високі значення. Після введення флоготропного агенту водний екстракт з БЦ у



дозі 200 мг/кг пригнічував набряк з 30-ї хв від його початку на 15%, у період з 1-ої по 3-ю год статистично значуще зменшував набряк на 37%, 23% та 16%, відповідно. Середня антиексудативна дія становила 23%.

Внутрішньошлункове введення етанольного та водного екстрактів з БЦ у дозах 200 мг/кг (табл. А.32, Додатки) демонструє пригнічування набряку з 30-ої хв від його початку на 11%. У період з 1-ої по 3-ю год екстракти зменшували набряк на 25%, 15% і 27% ( $p < 0,05$ ). Середня антиексудативна дія становила 20%.

Як показав аналіз результатів, етанольні та водні екстракти оцвітини к. посівного на моделі зимозанового набряку не виявили протизапальних властивостей. Їх активність на 30-ій хв після введення флогогену була однаковою (12%), проте в наступні періоди дослідження їх активність зменшилася. Середня АЕА дорівнювала 6% і 3%, відповідно. Таким чином, на моделі зимозанового набряку було встановлено виражену антиліпооксигеназну активність досліджуваних екстрактів з к. посівного: водний екстракт з БЦ – 23%, спиртовий екстракт з БЦ – 20%. Активність етанольного та водного екстрактів оцвітини була незначною – 6% і 3%, відповідно.

Класичним медіатором алергічних та запальних реакцій є гістамін [370]. На моделі гістамінового набряку лапи у щурів вивчали вплив досліджуваних об'єктів на активність гістаміну [371]. Встановлено, що водний екстракт БЦ при одноразовому внутрішньошлунковому введенні в дозі 200 мг/кг виявив таку антиексудативну активність через 0,5-у год – 9%, на 1-у – 26%, ( $p < 0,05$ ), на 2-у – 17% ( $0,05 < p < 0,100$ ) і на 3-ю год досліду – 2%. Максимальна антиексудативна активність екстракту встановлена на 1-у та 2-у год. від початку запалення – 26%, 17%, відповідно. Середня антиексудативна дія дорівнює 14% (табл. А.33, Додатки).

Етанольний екстракт БЦ при одноразовому внутрішньошлунковому введенні в дозі 200 мг/кг достовірно зменшував набряк протягом 0,5–1 год. спостереження, у період з 2-ї по 3-ю год. експерименту – не достовірно зменшував. Максимальна антиексудативна активність досліджуваного об'єкту встановлена на 0,5-у, 1-у та 2-у год. від початку запалення – 21%, 29%, 20%, відповідно. Середня антиексудативна дія дорівнює 20%. Вплив етанольного та

водного екстрактів з оцвітини на моделі гістамінового набряку також був незначним. Середня антиексудативна дія дорівнювала 10% і 6%, відповідно.

Таким чином, водний та етанольний екстракти з БЦ крокусу у дозі 200 мг/кг проявляли найбільші протизапальні властивості, у механізмі яких лежить інгібуючий вплив на синтез ЛТ (23 і 20%), активність біогенних амінів – гістаміну та серотоніну (14 і 20%) та незначний вплив на активність простагландинів (12 і 14%). За результатами досліджень рослинні екстракти к. посівного віднесені до V класу токсичності за класифікацією К.К. Сидорова.

#### 4.7 Обґрунтування вибору речовин-маркерів сировини та екстрактів

Основними компонентами шафрану є кроцини, шафраналь і пікрокроцин. Вони також були знайдені різними авторами [17, 19, 22, 56, 57] та нами [9] в оцвітині к. посівного. Крім того, похідні коричної кислоти і різні флавоноїди та їх похідні були знайдені у квітках та листі крокусів. Аналогічно шафрану було використано підхід Herb Mars для обґрунтування вибору потенційних маркерів якості з експериментальним підтвердженням їх присутності у сировині та сухих екстрактах к. посівного. Було проведено аналіз опублікованих експериментальних даних, як критерії пошуку застосовують наведені концентрації речовин у дослідях на клітинах чи тваринах із протираковою активністю. Сполуки, представлені в таблиці 4.18, можна розглядати як потенційні Q-маркери сировини к. посівного з точки зору їх вкладу у лікування раку меланоми та потрійно-негативного раку молочної залози. Для найвищого рейтингу (5), тобто найбільш підходящий маркер якості, критерії пошуку включали [426]:

- речовина має найвищу біологічну активність, пов'язану з основними симптомами захворювання;
- є достатня кількість доказів для підтвердження цієї активності (більше 2 експериментальних статей у високо рейтингових журналах);
- речовина присутня у відносно високій концентрації в ЛРС або екстракті;
- традиційне або сучасне використання ЛРС узгоджується з біологічною

активністю або фармакологічними ефектами сполуки;

- речовина та/або його метаболіти є біодоступними.

Для інших рейтингів (4,3,2,1) показники відбору поступово зменшуються, що свідчить про ненадійність вибору. Критерій (0) представляє найменш відповідний маркер якості, а останній критерій (X) свідчить, що вміст речовини або її фармакологічна дія не підходить, щоб бути маркером якості даної сировини. Повний опис критеріїв наведено у таблиці А.5 (Додатки).

Обґрунтування вибору тих чи інших речовин у якості Q-маркерів для контролю якості побічних продуктів виробництва шафрану здійснювали відповідно аналізу даних літератури та встановленого вмісту речовини. Кілька досліджень показали, що кроцини виявляють протипухлинну дію на різні лінії ракових клітин [372, 373, 374]. Кроцетин та *транс*-кроцин-4 (200 мкг/мл) значно пригнічують ефект проліферації проти раку молочної залози MDA-MB-231 [375], MCF-7 [376]. Пікрокроцин також є активним протипухлинним засобом проти клітин меланоми SKMEL-2 [372] та до HeLa cells [376]. Вміст кроцину-4 у водному екстракті оцвітини к. посівного становить 3,8 мг/г, тобто його вміст достатній для точного визначення та може бути обраний у якості стандарту.

ЛРС та екстракти к. посівного містять достатню кількість фенольних сполук. Рутин [381, 385], кемпферол [383], кверцетин [384], ізоорієнтин [378] проявили виражену протиракову дію по відношенню до клітин MDA-MB-231, а також проти меланоми, лейкемії та еритролейкемії. Рутин (20 мкМ) підвищував цитотоксичну активність циклофосфаміду та метотрексату в клітинах MDA-MB-231 та значно знижував ріст клітин TNBC MDA-MB-231/GFP [382]. Враховуючи встановлений вміст рутину в сировині оцвітини к. посівного (>16 мг/г) та екстрактах (> 60 мг/г), його можна обрати як Q-маркер (рейтингова оцінка 5).

Апігенін (від 25 до 100 мкМ) інгібував життєздатність клітини MDA-MB-231 на від 12% до 49% відповідно [387]. У нашому експерименті [344] апігенін виявив виражену цитотоксичну активність проти клітинних ліній меланоми і раку молочної залози ( $EC_{50}$   $131,8 \pm 7,2$  мкМ і  $123,4 \pm 19,0$  мкМ відповідно).

Таблиця 4.18

## Хімічний склад сировини к. посівного та відповідний бал Herb MaRS на основі потенційної протипухлинної дії

Сполука	Виявлена фармакологічна активність відповідно до даних літератури <sup>1</sup>	Herb MaRS Рейтинг <sup>2</sup>	Наявність стандарту (CAS Number)	Сировина	Посилання
1	2	3	4	5	6
Всі кроціни	Протираковий, цитотоксичний, антиоксидантний, нейропротекторний, протизапальний	5	Кроцин-4: 57710-64-2 Кроцин-3: 55750-85-1 Кроцин-2: 55750-84-0	Оцвітина	[114, 372, 373, 374, 375, 376]
Ізоорієнтин	Протираковий, протизапальний, інгібітор QS, антиноцицептивний	5	4261-42-1	Листя	[378, 379, 380]
Рутин	Протираковий, протизапальний, протівірусний, цитопротекторний, спазмолітичний	5	153-18-4	Оцвітина, листя	[340, 381, 385]
Кемпферол та його похідні	Антиоксидантна, протизапальна, протимікробна, протипухлинна, нейропротекторна	5	520-18-3	Листя	[383, 384, 385]
Кемпферол-3-О-софорозид	Протизапальна, протипухлинна, антиоксидантна	4	19895-95-5	Оцвітина	[386]
Кверцетин та його похідні	Протираковий, протівірусний, протипротозойний, протимікробний, протизапальний	5	849061-97-8	Листя	[382, 384]
Апігенін та його похідні	Цитотоксична дія, протигрибковий, протипухлинний, антипроліферативний	5	578-74-5	Оцвітина	[387, 388, 389]
Ізокверцитрин	Протираковий, антиоксидантний, антипроліферативний, протизапальний	5	482-35-9	Оцвітина	[390, 391]
Астрагалін	Протираковий, протизапальний, антиоксидантний	4	480-10-4	Оцвітина	[392, 393]
Ізорамнетин	Протираковий, протизапальний, антиоксидантний	4	480-19-3	Оцвітина	[394, 395]
Мангіферин	Протираковий, протівірусний, протизапальний, протипухлинний, антиоксидантний, безпечний, імуномодулюючий	5	4773-96-0	Оцвітина, листя, БЦ	[396, 397, 398]

Продовження табл. 6.18

1	2	3	4	5	6
Ферулова кислота	Протираковий, протизапальний, антиоксидантний, антибактеріальний	5	537-98-4	Оцвітина, Листя, БЦ	[388,399]
Кофейна кислота	Протираковий, антиоксидантний, протизапальний	5	331-39-5	Оцвітина, листя	[400, 401]
Нігрицин	Висока протизапальна активність	3	50901-38-7 (China)	Оцвітина, листя	[402]
Іристоригенін В	Модулятор Х-рецепторів печінки, протизапальний, антиоксидантний	4	86849-77-6 (China)	Листя, оцвітина	[403,404]
Текторидин	Протираковий, протизапальний, антиоксидантний, протиалергічний, пригнічує анафілаксію	4	611-40-5	Листя, оцвітина	[405,406]
Хлорогенова кислота	Протизапальний, інгібітор QS, антиоксидантний, антибактеріальну, протівірусну, протимікробну	4	327-97-9	Листя	[407,408]
Азафрин 1 та 2	Протипухлинний	2	-	БЦ	[409]
Олеанолова кислота	Протипухлинний, імуномодулюючий, антиоксидантний, протизапальний	3	508-02-1	БЦ	[410, 411]
Урсулова кислота	Протизапальний, протипухлинний, імуномодулюючий,	3	77-52-1	БЦ	[411,412]
L-Піроглутамінова кислота	Цитотоксичний, нейропротекторний	4	98-79-3	БЦ	[413]
L-Пролін	Імуномодулююча, цитотоксична	4	147-85-3	БЦ	[414,415]

Примітка: <sup>1</sup> Оцінка рейтингу коливається від 0 до 5, де 0 означає найменший показник, а 5 – найбільш відповідний.

Ферулова кислота (3, 10, 30 і 100 мкМ) мала виражену цитотоксичну активність проти ліній клітин раку молочної залози [313], знижуючи життєздатності, посилюючи апоптоз та пригнічуючи метастатичний потенціал. Протираковий ефект мангіферину був підтверджений *in vitro* та *in vivo* [396] дослідженнями на моделях мишей у дозах від 5 до 10 мг/кг проти асцитичної фібросаркоми [397], 50 і 100 мг/кг (перорально) проти канцерогенезу легень [398] та 100 мг/кг проти ER-негативного раку молочної залози.

Таким чином було проведено ретельний аналіз кожної обраної сполуки з таблиці 4.18. Незважаючи на те, що літературні дані свідчать про присутність тритерпенових сапонінів у БЦ к. посівного, ми не встановили їх наявності, отже олеолову та урсолову кислоти не можна розглядати як маркери якості, незважаючи на їх протираковий потенціал. Наші експерименти підтвердили наявність кроцинів та фенольних сполук у сировині та екстрактах к. посівного з України (табл. 4.2, 4.4-4.12, 4.15; рис. 4.16, 4.19). Враховуючи їх кількісний вміст, наявність стандартів та експериментальні дані фармакологічної активності щодо раку меланоми та молочної залози та оцінки критеріїв Herb MaRS було вибрано п'ять основних сполук для оцінки к. посівного: кроцини, рутин, ізокверцитрин, ферулову кислоту та мангіферин (рис. 4.18), для листя – мангіферин, кемпферол, хлорогенова кислота та ізоорієнтин, для БЦ – мангіферин, L-пролін та піроглютамінову кислоту.

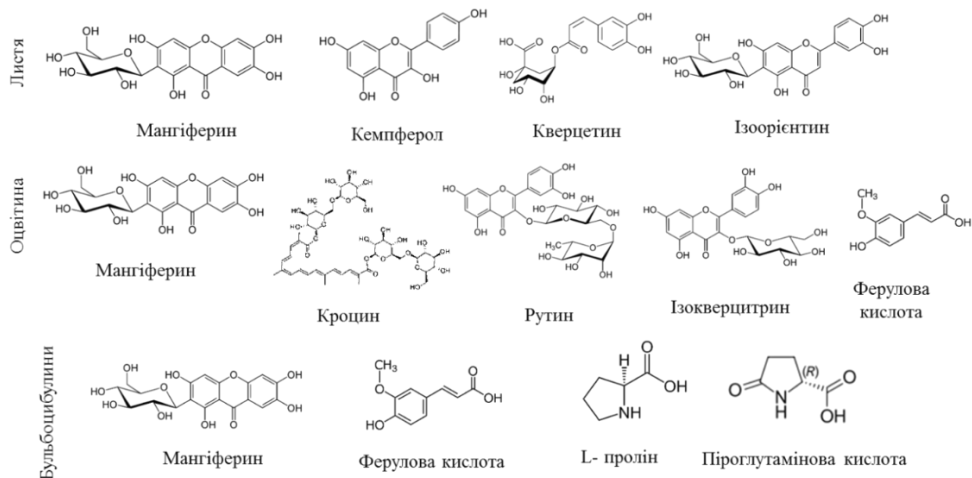


Рис. 4.18 Хімічна структура вибраних маркерів якості для сировини к. посівного на основі критеріїв Herb MaRS

#### 4.8 Розробка параметрів стандартизації побічних продуктів виробництва шафрану та їх сухих екстрактів

При пошуку маркерів стандартизації ми спирались на дані фармакологічного випробування індивідуальних сполук сировини к. посівного, а також на дані фармакологічного скринінгу та кореляційних досліджень. Для здійснення досліджень зі стандартизації побічних продуктів виробництва шафрану та сухих екстрактів листя, оцвітини та БЦ к. посівного здійснювали визначення показників якості для 5 серій кожного зразка.

Крокусу посівного листя. *Crocus sativus folia*.

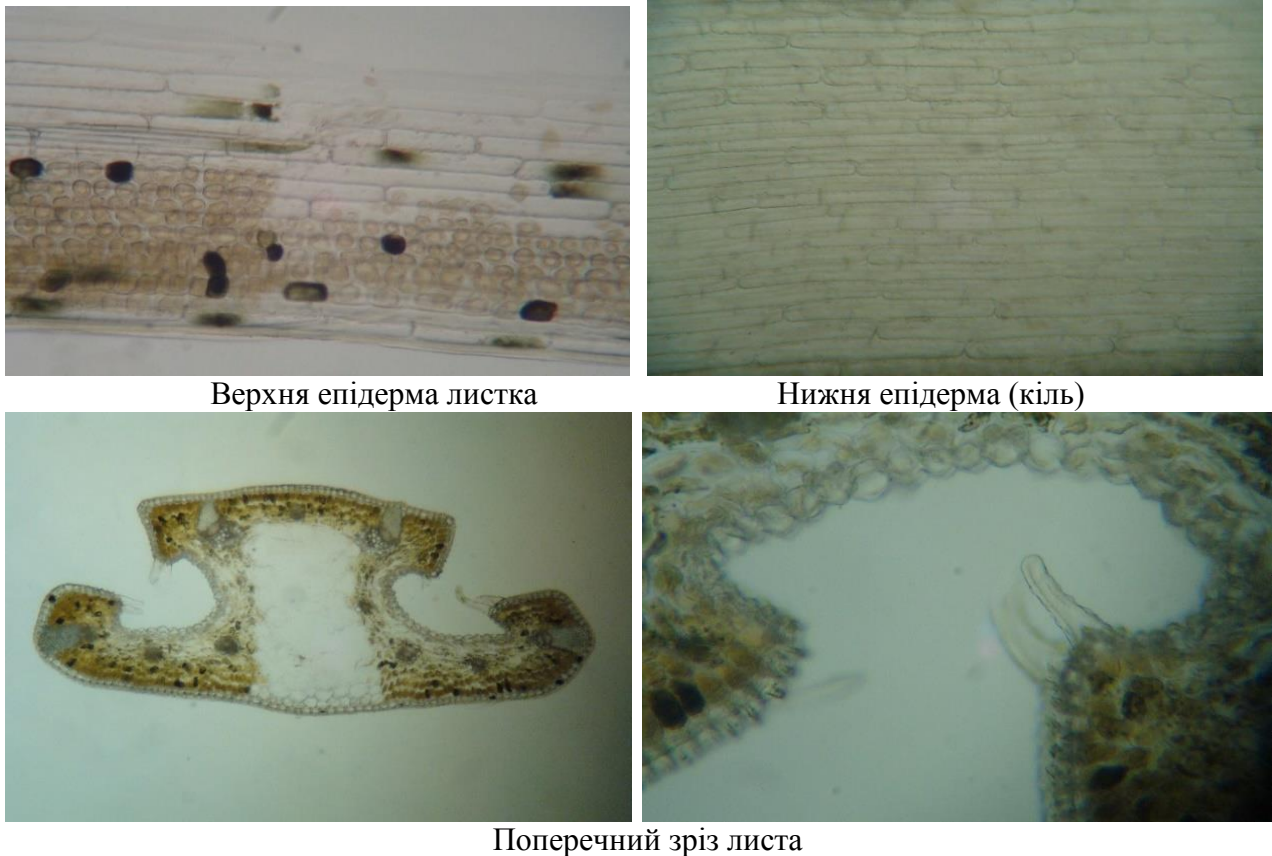
*Опис.* Ціле або фрагментоване листя к. посівного (*Crocus sativus* L.), зібране восени – початок зими (листопад – грудень).

*Ідентифікація.*

А. Листя прикореневе вузько лінійне, прямостояче, шириною кілька міліметрів, щільні, по 6 – 15 в пучку оточене півчастими піхвами.

В. *Мікроскопічне дослідження.* За анатомічною та морфологічною будовою листя відноситься до біфасіального типу. В центральній частині листка знаходиться кіль, по обидві боки від якого розташовані два плеча, які загинаються донизу, до кіля. Клітини епідерми абаксіального боку прозенхімні, прямокутні, мають рівномірно потовщені оболонки (деякі клітини мають намистоподібні потовщення). Продихи відсутні. Епідерма кіля з абаксіального боку листка представлена прозенхімними, прямостінними клітинами (аналогічна верхній епідермі) (рис. 4.19).

Клітини верхньої епідерми на кінці плеча мають добре виражені сосочки (сосочкоподібні вирости). Абаксіальна епідерма плечей складається з клітин куполоподібної форми з сосочками. Клітини абаксіального боку плеча і бічної сторони кіля прозенхімні, тонкостінні. Продихи занурені, розташовані нижче рівня епідермальних клітин. Продиховий апарат тетрацитного типу. Волоски розташовані на кінцях плеча та в кутах кіля. Волоски – прості, одноклітинні з розширеною основою, мають потовщену оболонку, зі слабкобородавчатою кутикулою.



Верхня епідерма листка

Нижня епідерма (кіль)

Поперечний зріз листа

Рис. 4.19 Деякі анатомо-мікроскопічні ознаки листя к. посівного

Центральна частина кіля листка складається з прозенхімних клітин, округлої форми, з тонкими стінками. Клітини іноді руйнуються, утворюючи повітряносу порожнину. Під епідермою над кілем клітини не містять хлоропласти – це біла смуга вздовж листка з адаксіального боку. Мезофіл плечей двох типів: під епідермою розташовані два шари полісадної паренхіми, губчастий мезофіл 4 – 5 шаровий, міжклітинники наявні. Біля основи з абаксіального боку кіля наявні два шари полісадної паренхіми. З боків кіля до 4 шарів губчастої паренхіми.

Колатеральні судинно-волокнисті пучки (СВП) розташовані вздовж всього листка. Можна виділити 4 найбільші пучки (2 на кінцях плечей листка, 2 – в основі кіля). Кількість менших пучків може бути різною, залежить від розміру листка – наприклад, по 3 пучки вздовжплеча та бокової частини кіля та один по центру кіля. СПВ має обкладку з кристалами (стилоїдами). Ділянки склеренхімних волокон (добре розвинених) розташовані над флоемою, ближче до епідерми, ксилема в напрямку до абаксіального боку, кіль – ксилема направлена до центру.

С. Переглядають хроматограми



Послідовність зон на хроматограмі випробуваного розчину і розчину порівняння мають відповідати зонам, наведеним нижче (Рис. 4.20).

Верхня частина пластинки (листя)		Приклад
Кемпферол жовтувата флуоресціююча зона	червона флуоресціююча зона  блакитна флуоресціююча зона  жовтувата флуоресціююча зона (кемпферол) жовта флуоресціююча зона синя флуоресціююча зона	
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин	1) кемпферол 2) листя, Херсон 3) листя, Запоріжжя 4) листя, Одеса 5) екстракт листя водний

Рис. 4.20 Схема типової ТШХ хроматограми листя к. посівного

Випробування.

*Випробовуваний розчин, сировина.* 1,0 г подрібненої на порошок сировини крокусу посівного екстрагують 10 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Випробовуваний розчин, екстракт.* 0,1 г екстракту сировини екстрагують 2 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Розчин порівняння.* 10 мг кемпферолу розчиняють в 10,0 мл метанолу *P*.

*Пластинка:* На ВЕТШХ пластинку із шаром силікагелю  $F_{254}$  *P* розміром 10×10 см. Пластину з нанесеними пробами поміщають у камеру зі сумішшю розчинників: оцтова кислота *P* – мурашина кислота безводна *P* – вода *P* – етилацетат *P* (11:11:27:100).

*Об'єм проб:* наносять у вигляді смуг 6 мм по 8 мкл випробовуваного розчину та по 2 мкл розчину порівняння.

*Виявлення:* обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти

аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P*, потім обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 *P* у метанолі *P*, висушують на повітрі протягом 30 хв, Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

*Втрата в масі при висушуванні.* Не більше 7 %, 1,0000 г здрібноної на порошок сировини сушать при температурі 105 °С впродовж 2 год.

*Загальна зола.* Не більше 4 %.

*Екстрактивні речовини:* не менш ніж 30% (вода), не менше ніж 65% (70% етанол)

*Важкі метали:* не більше ніж 0,01 % (табл. А.46, Додатки).

*Кількісне визначення* здійснювали методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії та методом ВЕРХ (розділ 2, розділ 4, підрозділи 4.2, 4.6.2).

*Вміст:* мангіферину – не менше 1 мг/г, кемпферолу – не менше 0,1 мг/г; вміст робініну не менше 3 мг/г (ВЕРХ) у перерахунку на суху речовину. Загальний вміст флавоноїдів: не менш ніж 2%; загальний вміст фенольних сполук: не менш ніж 6% (СФ) у перерахунку на суху речовину.

За заявленими параметрами стандартизації в умовах виробництва було здійснено контроль якості для 5 серій сировини листя (табл. А.35, Додатки) та сухих екстрактів листя к. посівного (табл. А.38, Додатки).

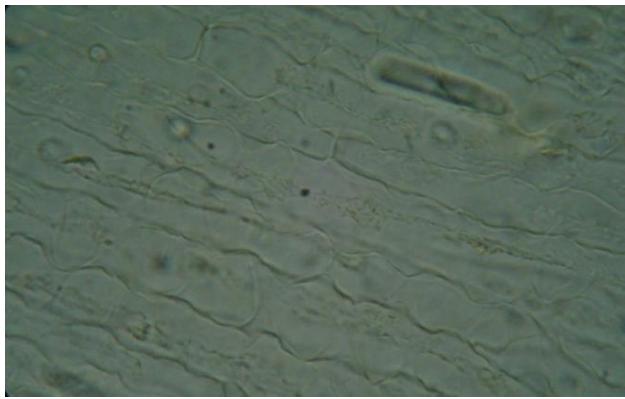
Крокусу посівного оцвітина. *Croci sativus perianthium*.

*Опис.* Ціла або фрагментована оцвітина к. посівного (*Crocus sativus* L.), зібрана восени (жовтень-листопад).

*Ідентифікація*

А. Квітки одиночні, іноді 2 – 3 з однієї БЦ, оточені плівчастими лусками, блідо-фіолетові. Оцвітина велика, довговоронковидна, відгін віночка складається з 6 часток, що переходять у довгу циліндричну трубочку. Тичинки прикріплені до зіва оцвітини, коротше за нього; нитки короткі; пильовики прямостоячі, лінійні, зазвичай довші за нитки. Стовпчик ниткоподібний з трьома приймочками.

В. *Мікроскопічне дослідження.* Внутрішня епідерма листочків оцвітини представлена видовженими прозенхімними клітинами зі звивистими оболонками. Клітини мають сосочкоподібні утворення всередині клітин. Продихи відсутні. В паренхімі наявні стилоїди. СПВ проходять в паренхімі, судини спіральні (рис. 4.21).



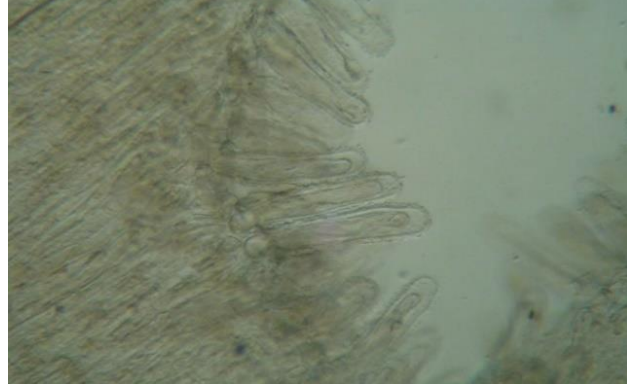
Внутрішня епідерма оцвітини



Зовнішня епідерма оцвітини



Зовнішня частина трубки оцвітини



Поперечний зріз приймочки

Рис. 4.21 Основні морфолого-анатомічні ознаки оцвітини к. посівного

Зовнішня епідерма представлена видовженими прозенхімними клітинами зі слабозвивистими оболонками. Деякі клітини мають загострені звужені кінці. Клітини ближче до основи пелюстки мають прямі стінки (звивистість зникає).

Трубка оцвітини: епідерма зовнішня – клітини прямиостінні, прозенхімні, видовжені вздовж трубки. Клітини внутрішньої епідерми паренхімно-прозенхімні, тонкостінні з прямими оболонками. СПВ проходять в паренхімі трубки, які потім переходять в пелюстки.

Приймочки: зовнішня і внутрішня епідерма складається з прозенхімних тонкостінних клітин, які сильно витягнуті вздовж поверхні. Клітини зовнішньої епідерми всередині мають сосочкоподібні утворення. Клітини внутрішньої епідерми сосочків не мають. Верхівка приймочки щільно вкрита одноклітинними волосками.

С. Переглядають хроматограми

Послідовність зон на хроматограмі випробуваного розчину і розчину порівняння мають відповідати зонам, наведеним нижче (рис. 4.22).

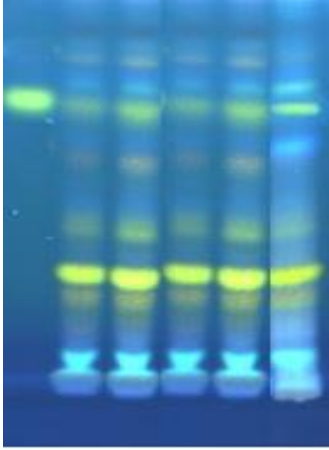
Верхня частина пластинки (оцвітина)		
Апігенін 7- глюкозид: зелена флуоресціююча зона	зелена флуоресціююча зона (апигенин 7- глюкозид)  зелена флуоресціююча зона  жовтувато-зелена флуоресціююча зона  синя флуоресціююча зона	
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин	1) Апигенин 7-глюкозид 2) оцвітина, Херсон 3) оцвітина, Миколаїв 4) оцвітина, Ужгород 5) оцвітина, Волинь 6) Екстракт оцвітини водний

Рис. 4.22 Схема типової ТШХ сировини та екстрактів оцвітини к. посівного

#### *Випробування.*

*Випробовуваний розчин, сировина.* 1,0 г здрібноної на порошок сировини крокуса посівного екстрагують 10 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Випробовуваний розчин, екстракт.* 0,1 г екстракту сировини екстрагують 2 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Розчин порівняння.* 10 мг апигенин-7-глюкозиду вміщують до мірної колби місткістю 10,0 мл та розчиняють у метанолі *P*.

*Пластинка:* На ВЕТШХ пластинку із шаром силікагелю  $F_{254}$  *P* розміром 10×10 см. Пластину з нанесеними пробами поміщають у камеру зі сумішшю розчинників: оцтова кислота *P* – мурашина кислота безводна *P* – вода *P* – етилацетат *P* (11:11:27:100).

*Об'єм проб:* наносять у вигляді смуг 6 мм по 8 мкл випробовуваного розчину та по 2 мкл розчину порівняння.

*Виявлення:* обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P*, потім обприскують розчином 50 г/л

макроголу 400 Р у метанолі Р, висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

*Втрата в масі при висушуванні.* Не більше 7 %, 1,0000 г здрібноної на порошок сировини сушать при температурі 105 °С впродовж 2 год.

*Загальна зола.* Не більше 4 %.

*Екстрактивні речовини:* не менш ніж 45% (вода), не менше ніж 70% (70% етанол).

*Важкі метали:* не більше ніж 0,01 % (табл. А.46, Додатки).

*Кількісне визначення* здійснювали методами УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ (розділ 2, розділ 4, підрозділ 4.2). Вміст: рутину – не менше 10 мг/г; ізокверцитрину не менше 1,5 мг/г; апігенін-7-глюкозиду – не менше 1,5 мг/г (ВЕРХ) у перерахунку на суху речовину. Загальний вміст флавоноїдів: не менш ніж 3% (у перерахунку на рутин, при 405 нм); загальний вміст фенольних сполук: не менш ніж 8% (у перерахунку на галову кислоту, при 270 нм); загальний вміст антоціанів: не менше 0,5% (у перерахунку на цианідин-3,5-диглікозид, при 510 нм) у перерахунку на суху речовину (СФ).

За заявленими параметрами стандартизації в умовах виробництва було здійснено контроль якості для 5 серій сировини оцвітини (табл. А.36, Додатки) та сухих екстрактів оцвітини к. посівного (табл. А.39, Додатки).

Крокусу посівного бульбоцибулини. *Crocus sativus corms.*

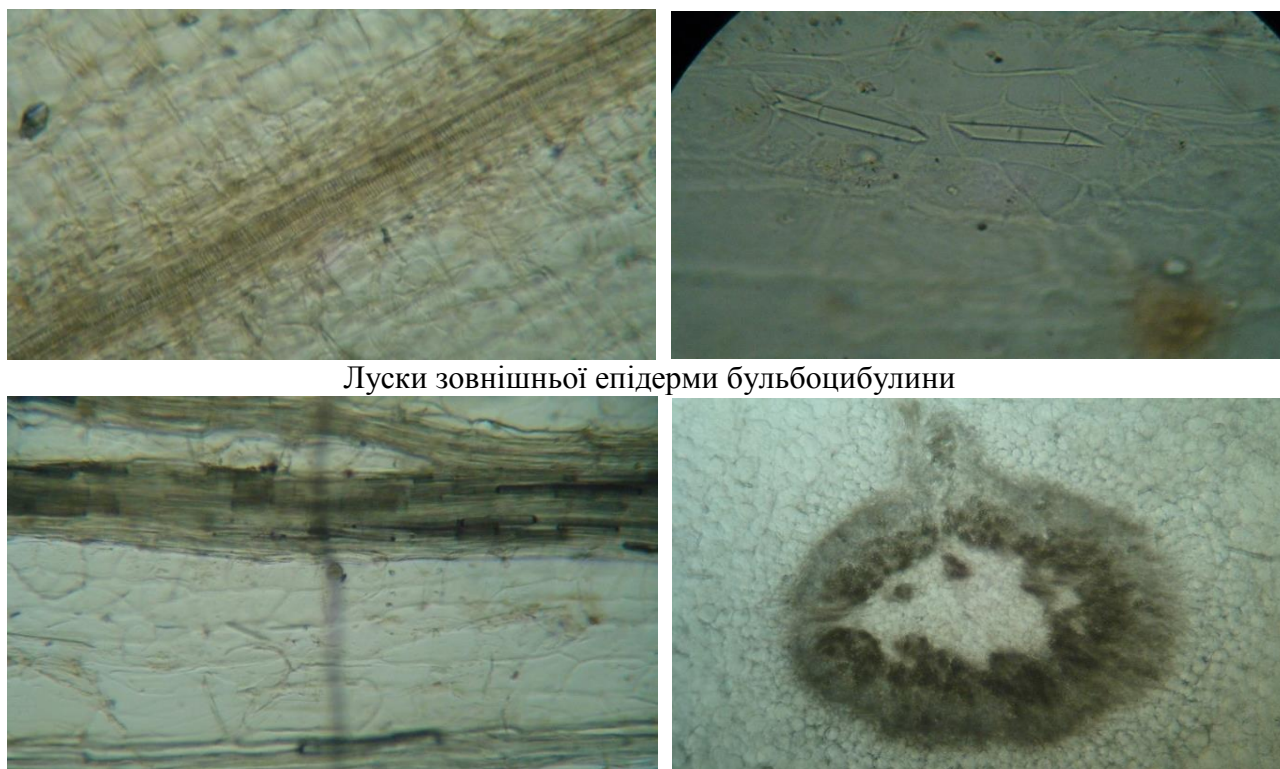
*Опис.* Цілі або фрагментовані бульбоцибулини к. посівного (*Crocus sativus* L.), зібрані влітку (червень-липень).

*Ідентифікація*

А. БЦ кулястої форми, з відхідним мочкуватим корінням, досягає в діаметрі 2,5 – 3 см, одягнені лусками, дають пучок корневих мочок.

В. *Мікроскопічне дослідження.* Зовнішня епідерма лусочок БЦ складається з прямостінних клітин з рівномірно потовщеними оболонками. Наявні поодинокі продихи, аномоцитного типу. Добре розвинена механічна тканина. Видовжені склереїди розташовані групами, які формують ребра. В паренхімі наявні стилоїди. На епідермі зустрічаються прості (червообразні) волоски (рис. 4.23).





Луски зовнішньої епідерми бульбоцибулини

Луска внутрішньої епідерми

БЦ поперечний зріз

Рис. 4.23 Основні морфолого-анатомічні ознаки БЦ к. посівного

Клітини внутрішньої епідерми тонкостінні, паренхімні, більші за розміром. Епідерма самої БЦ однорядна, клітини паренхимні, мають майже однакові розміри. Клітини кори БЦ паренхимні, багатокутні, заповнені крохмальними зернами. СПВ в зовнішній частині менші за розмірами. Клітини, які оточують СПВ, дрібніші. Ксилема: судини спіральні, добре розвинені. Наявні стилоїди.

С. Переглядають хроматограми.

*Випробовуваний розчин, сировина.* 1,0 г здрібненої на порошок сировини крокуса посівного екстрагують 10 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Випробовуваний розчин, екстракт.* 0,1 г екстракту сировини екстрагують 2 мл метанолу *P* на УЗ-бані протягом 20 хв.

*Розчин порівняння,* 10 мг ферулової кислоти вміщають до мірної колби місткістю 10,0 мл та розчиняють у метанолі *P*.

*Пластинка:* На ВЕТШХ пластинку із шаром силікагелю  $F_{254}$  *P* розміром 10×10 см, Пластину з нанесеними пробами поміщають у камеру зі сумішшю розчинників: оцтова кислота *P* – мурашина кислота безводна *P* – вода *P* –

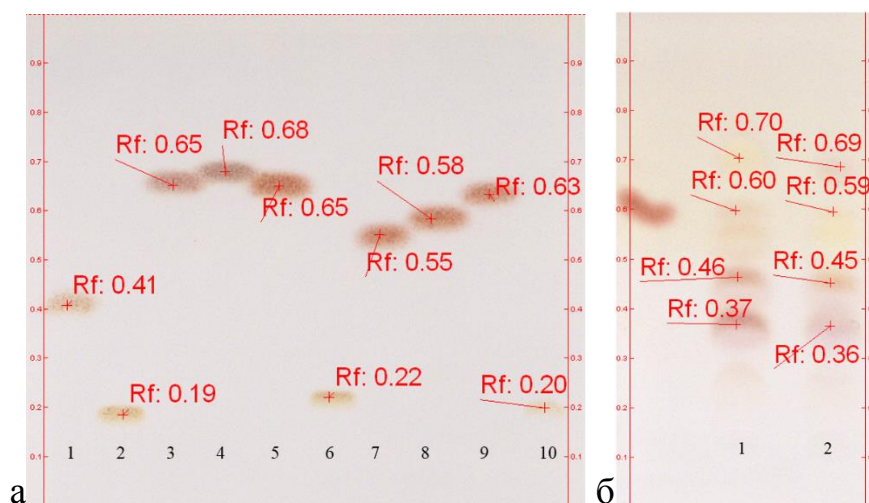
етилацетат Р (11:11:27:100).

*Об'єм проб:* наносять у вигляді смуг 6 мм по 8 мкл випробовуваного розчину та по 2 мкл розчину порівняння.

*Виявлення:* обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р, потім обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

С. Переглядають хроматограми (рис. 4.24).

*Випробовуваний розчин, сировина:* До 100 мг сировини додають 10 мл 70% етанолу та екстрагують на УЗ-бані протягом 15 хв, після чого встановлюють на центрифугу, зливають верхній шар рідини. До рослинного матеріалу знову додають 10 мл 70% етилового спирту та повторюють екстракцію ще два раз зливаючи верхній шар. Всі три витяги об'єднують та випаровують під зниженим тиском, сухого залишку розчиняють у 2 мл 0,01 М кислоти хлористоводневої.



1. треонін; 2. лізин; 3. фенілаланін; 4. триптофан; 5. лейцин; 6. аргінін; 7. валін; 8. метіонін; 9. ізолейцин; 10. гістидин

Рис. 4.24 (а) Типова ВЕТШХ стандартів амінокислот; (б) типова ВЕТШХ амінокислот двох серій БЦ к. посівного

*Розчин порівняння:* 1,0 мг стандарту амінокислоти розчиняють у 10 мл 0.01 М кислоти хлористоводневої.

*Пластинка:* На ВЕТШХ пластинку із шаром силікагелю F<sub>254</sub> Р розміром 10×10 см. Пластину з нанесеними пробами поміщають у камеру зі сумішшю

розчинників: *n*-бутанол: льодяна оцтова кислота: вода *P* (3/1/1 v/v/v).

*Об'єм проб*: наносять у вигляді смуг 6 мм по 10 мкл випробовуваного розчину та 2 мкл розчину порівняння.

*Відстань, що має пройти рухома фаза*: 8 см від лінії старту.

*Висушування*: на повітрі.

*Виявлення*: обприскують розчином нінгідрину *P* (*Розчин нінгідрину*. 0,1 г нінгідрину розчиняють у 0,5 мл льодяної оцтової кислоти та 100 мл ацетону *P*.), після чого підігривають пластинку при температурі 90°C протягом 10 хвилин. Пластинку переглядають при денному світлі.

ТШХ визначення амінокислот у екстрактах БЦ к. посівного показало наявність декількох хроматографічних зон адсорбції за характером забарвлення та значеннями  $R_f$ , які збігаються зі стандартними зразками амінокислот, а саме: проліну, аланіну, валіну, піроглутамінової кислоти, треоніну, фенілаланіну.

*Втрата в масі при висушуванні*. Не більше 3 %, 1,0000 г здрібноної на порошок сировини сушать при температурі 105 °С впродовж 2 год.

*Загальна зола*. Не більше 1,5 %.

*Екстрактивні речовини*: не менш ніж 30% (вода), не менше ніж 60% (70% етанол).

*Важкі метали*: не більше ніж 0,01 % (табл. А. 46, Додатки).

*Кількісне визначення* здійснювали методами УФ-спектрофотометрії, ВЕРХ, ГХ-МС (розділ 2, розділ 4, підрозділ 4.4, 4.5.3). Вміст: ферулової кислоти не менше 0,01мг/г (ВЕРХ) у перерахунку на суху речовину. Загальний вміст флавоноїдів: не менш ніж 2%; загальний вміст фенольних сполук: не менш ніж 4%, у перерахунку на суху речовину (методом СФ). Вміст проліну не менше 10 мкг/г, піроглутамінової кислоти не менше 6 мкг/г, аланіну не менше 10 мкг/г (ГХ-МС).

За заявленими параметрами стандартизації було здійснено контроль якості для 5 серій сировини БЦ (табл. А.58, Додатки) та сухих екстрактів БЦ к. посівного (табл. А.61, Додатки).

Крокусу посівного листя екстракт водний сухий. *Crocs sativus folium siccum extractum aqueum*.



Крокусу посівного листя екстракт етанольний сухий. *Crocus sativus folium siccum extractum hydroethanolum*.

*Опис.* Однорідний порошок темно-зеленого кольору, із слабким специфічним запахом, одержаний екстракцією водою очищеною / 70% етанолом з приймочок к. посівного (*Crocus sativus* L.).

*Ідентифікація.* ТШХ (2.2.27). Аналогічно дослідженню листя к. посівного (розділ 2, розділ 4, підрозділ 4.5.3).

*Випробовування. Втрата в масі при висушуванні:* не більше 10% (водний екстракт), не більше 7% (70% етанол).

*Вміст важких металів:* не більше 0,001%.

*Мікробіологічна чистота:* Не більше  $10^4$  життєздатних бактерій. Не більше  $10^2$  життєздатних грибів. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *S. aeruginosa*.

*Кількісне визначення.*

А. 0,01 г сухого екстракту (листя, оцвітини, бульбоцибулін) розчиняють у 20 мл води очищеної під дією ультразвуку, фільтрують крізь мембранні фільтри у віали для ВЕРХ. Субстанцію листя крокусу ідентифікують за вмістом мангіферину: не менше 2 мг/г (обидва екстракти), ізоорієнтин – не менше 6 мг/г (водний), кофейна кислота – не менше 1 мг/г (етанольний екстракт).

В. СФ, сума флавоноїдів у сировині к. посівного (листя, оцвітини, БЦ). *Випробовуваний розчин:* 0,5 г екстракту поміщають в колбу на 100 мл, розчиняють у 96% етанолі, відбирають 0,5 мл екстракту у мірну колбу та додають 1 мл  $AlCl_3$  доводять 96% етанолом до мітки 25 мл колби, через 40 хв проводять визначення при довжині хвилі 405 – 415 нм. *Компенсаційний розчин:* 0,5 мл екстракту + 1 крапля оцтової кислоти доводять 96% етанолом до 25 мл.

С. СФ, сума фенольних сполук у сировині к. посівного (листя, оцвітини, БЦ). *Випробовуваний розчин:* 0,5 г екстракту поміщають в колбу на 100 мл та розчиняють 96% етанолом, 1 мл екстракту поміщають у колбу на 25 мл та доводять 70% етанолом до 25 мл, знімають спектр від 220 до 500 нм, при довжині хвилі 270 нм, визначають суму фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту.

*Вміст для водного / етанольного екстракту:* загальний вміст флавоноїдів: не менше 7% / 2,5% флавоноїдів; суми фенольних сполук: не менше 5%/ 8% у перерахунку на суху речовину.

Крокусу посівного оцвітини екстракт водний сухий. *Croci sativus perianthium siccum extractum aqueum.*

Крокусу посівного оцвітини екстракт етанольний сухий. *Croci sativus perianthium siccum extractum hydroethanolum.*

*Опис.* Однорідний порошок темно-фіолетового кольору, із слабким специфічним запахом, одержаний екстракцією водою очищеною / 70% етанолом з оцвітини к. посівного (*Crocus sativus* L.).

*Ідентифікація.* ТШХ (2.2.27). Аналогічно дослідженню оцвітини к. посівного (розділ 2, розділ 4, підрозділ 4.2, 4.5.2).

*Випробовування. Втрата в масі при висушуванні:* не більше 10% (водний екстракт), не більше 7% (70% етанольний екстракт).

*Вміст важких металів:* не більше 0,001%.

*Мікробіологічна чистота:* Не більше  $10^4$  життєздатних бактерій. Не більше  $10^2$  життєздатних грибів. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *S. aeruginosa*.

*Кількісне визначення.* 0,01 г сухого екстракту розчиняють у 20 мл води очищеної під дією ультразвуку, фільтрують крізь мембранні фільтри у віали для ВЕРХ. Субстанцію оцвітини ідентифікують за вмістом рутин та апігенін-7-глікозиду: рутин не менше 60 мг/г (етанольний екстракт); апігенін 7-глюкозид не менше 2 мг/г (водний екстракт) у перерахунку на суху речовину (ВЕРХ).

*Вміст для водного/етанольного екстракту:* загальний вміст флавоноїдів: не менше 5,5% / 7,5% флавоноїдів; суми фенольних сполук: не менше 4,5%/ 8,5% у перерахунку на суху речовину (СФ).

Крокусу посівного бульбоцибулин екстракт водний сухий. *Croci sativus corms siccum extractum aqueum.*

Крокусу посівного бульбоцибулин екстракт етанольний сухий. *Croci sativus corms siccum extractum hydroethanolum.*

*Опис.* Однорідний порошок блідо-рожевого кольору, із слабким специфічним запахом, одержаний мацерацією водою очищеною / 70% етанолом з бульбоцибулин к. посівного (*Crocus sativus* L.).

*Ідентифікація.* ТШХ (2.2.27). Аналогічно дослідженню фенольних сполук (ферулова кислота) та амінокислот БЦ к. посівного (розділ 2, розділ 4, підрозділ 4.5, 4.5.3.). На хроматограмі виявлена синьо-зелена зона, що відповідає феруловій кислоті; виявлені рожеві, синьо-фіолетові зони амінокислот (валін  $R_f$  0,59; пролін  $R_f$  0,31; глютамінова кислота  $R_f$  0,40).

*Випробовування. Втрата в масі при висушуванні:* не більше 10% (водний екстракт), не більше 7% (70% етанольний екстракт).

*Вміст важких металів:* не більше 0,001%.

*Мікробіологічна чистота:* Не більше  $10^4$  життєздатних бактерій. Не більше  $10^2$  життєздатних грибів. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *S. aeruginosa*.

*Кількісне визначення.* 0,01 г сухого екстракту розчиняють у 20 мл води очищеної під дією ультразвуку, фільтрують крізь мембранні фільтри у віали. Субстанцію бульбоцибулин ідентифікують за вмістом ферулової кислоти не менше 0,3 мг/г, мангіферину – не менше 0,3 мг/г (ВЕРХ); пролін не менше 2000 мкг/г; валін не менше 4000 мкг/г перерахунку на суху речовину (ГХ-МС).

*Вміст для водного/етанольного екстракту:* загальний вміст флавоноїдів: не менше 5,5% / 7,5% флавоноїдів; суми фенольних сполук: не менше 4,5% / 8,5% у перерахунку на суху речовину.

Крокусу посівного листя / оцвітини / бульбоцибулин полісахаридний комплекс сухий. *Croci sativus folia / perianthi / corms polysaccharide complex arido*.

*Опис.* Однорідний порошок зеленого / синього / блідо-рожевого кольору, із слабким специфічним запахом, одержаний методом екстракцією водою з наступним осадження 96% етанолом з відповідної сировини к. посівного.

*Ідентифікація.* ТШХ (2.2.27) профілю амінокислот, як зазначено у розділі 2.

*Випробовування. Втрата в масі при висушуванні:* не більше 6%.

*Вміст важких металів:* не більше 0,001%.

*Мікробіологічна чистота:* Не більше  $10^4$  життєздатних бактерій. Не більше  $10^2$  життєздатних грибів. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *S. aeruginosa*.

*Кількісне визначення.* 0,01 г сухого полісахаридного комплексу розчиняють у 20 мл води очищеної під дією ультразвуку, фільтрують крізь мембранні фільтри у віали для ГХ-МС. Субстанцію ідентифікують за вмістом амінокислот: для бульбоцибулин – пролін не менше 2000 мкг/г; валін не менше 4000 мкг/г.

#### Висновки до розділу 4

1. Проведено дослідження хімічного складу листя та оцвітина к. посівного. Порівняльний аналіз листя к. посівного з Херсону, Запоріжжя, Чернігова, Одеси та Вінниці методом ВЕРХ, дозволив виявити присутність 11 фенольних сполук, при цьому мангіферин (0,90 – 1,26 мг/г), ізоорієнтин (3,55 – 6,45 мг/г) та робінін (0,35 – 5,22 мг/г) є домінуючими. У чотирьох зразках оцвітини к. посівного (Херсон, Миколаїв, Запоріжжя, Волинь) 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- $\beta$ -софорозид (2,33 мг/г), ізокверцитрин (2,70 мг/г), текторидин (2,23 мг/г). Мангіферин, ізокверцитрин, рутин, ферулова кислота, а також ізофлавоноїди (текторидин, нігрицин, іристекторигнін 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 Херсону додатково визначили профіль амінокислот, карбонових кислот та 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 домінуючими були:  $\alpha$ -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 мкг, що відповідає вимогам ДФУ до їх вмісту у ЛРС. Для оцвітини к. посівного з Херсону також визначено 34 летючий компонент. Домінуючим був 1,3-циклогексадієн-1-карбоксальдегід (4,35%), пальмітальдегід (7,58%). Вперше з оцвітини українського к. посівного методом колонкової хроматографії виділено 16 фенольних сполук, серед них софорофлавонозид та космосіїн виділено вперше.

2. Проведено порівняльний скринінг БАР у видах та сортах рослин роду Крокус з України, а саме у 9 зразках листя (*C. speciosus*, *C. kotschyanus*, *C. ochroleucus*, *C. zonatus*, *C. sativus*, *C. aureus*, *C. vernus*, *C. veluchensis*, *C. heuffelianus*) та 6 зразках оцвітини (*C. vernus* “Flower record”, *C. vernus* “Jeanna Dark”, *C. adamii*, *C. sativus*, *C. vernus* “Grand moidre”, *C. chrysianthus* “Gipsy girl”). Якісний склад і кількість визначених фенольних сполук речовин варіює залежно від виду та сорту. Листя *C. speciosus* мали найкращі показники на рівні з листям к. посівного. ВЕРХ-аналіз листя *C. speciosus* показав наявність мангіферину, хлорогенової кислоти, ізоорієнтину, кемпферолу, гіперозиду та ізокверцитрину. Ізоорієнтин і кемпферол мали вищий вміст 3,68 і 1,25 мг/г відповідно.

3. Методом СФ встановлено найбільший загальний вміст фенольних сполук у БЦ з Херсону (Україна) – 19,08 мкмоль/г; найменшу кількість фенольних сполук у БЦ визначено у сировині, зібраній у Баку (Азербайджан) – 3,34 мкмоль/г. Методом ВЕРХ у БЦ крокусу з України, Азербайджану, Нідерланди та Марокко встановлено вміст хлорогенової (0,03 мг/г) і ферулової (0,01 мг/г) кислот. Дослідження БЦ к. посівного (Херсон) показало наявність 35 карбонових кислот та 13 амінокислот, серед них домінуючими є: L-пролін (12,42%), L-глутамінова кислота, L-аланін (8,43%), L-валін (4,96%), олеїнова кислота (5,89%), пальмітинова кислота (6,87%).

4. Одержано водні, етанольні (70%) сухі екстракти, полісахаридні комплекси з листя, оцвітини, БЦ к. посівного. Методом ВЕРХ встановлено профіль фенольних сполук, амінокислот, апокаротиноїдів, запропоновано параметри їх стандартизації. 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 домінують речовини у всіх екстрактах. Домінують амінокислотами у 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 кислота домінували.

5. Методом ВЕРХ-АВТS в екстрактах листя, оцвітину та БЦ к. посівного було виявлено 12 сполук з антиоксидантними властивостями, а саме для екстракта листя – мангіферин та рутину, для оцвітину – ізокверцетрин та рутину, для БЦ – геністин. Для етанольного екстракту оцвітину та водного екстракту листя к. посівного (10 мкг/мл) визначено виражений ефект поглинання вільних радикалів та інгібіторну активність нейрамідіази, помірний посилюючий ефект на активність NRF2 та антибактеріальну дію.

6. Вперше досліджено цитотоксичну дію всіх екстрактів. Найбільш активним виявився етанольний екстракт БЦ крокусу ( $EC_{50}$  0,018 мг/мл) по відношенню до лінії клітин раку нейробластоми (SK-N-BE(2)) та проти клітин гліобластоми U-87 ( $EC_{50}$  0,02 мг/мл). Етанольний екстракт листя значно знижував життєздатність ракових клітин IGR39 і MDA-MB-231 ( $EC_{50}$  0,41 і 0,33 мг/мл відповідно). Етанольний екстракт оцвітину був більш активним проти клітинної лінії нейробластоми, потім гліобластоми ( $EC_{50}$  0,097 мг/мл), меланоми (0,50 мг/мл), а водний екстракт оцвітину, у свою чергу, був більш активним щодо потрійно негативних клітинних ліній раку молочної залози ( $EC_{50}$  1,20 мг/мл). 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 аффінітет 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. Однак, дія екстрактів була сильніше, за рахунок синергічного ефекту компонентів.

7. Екстракти БЦ к. посівного мали найбільш виражену протиалергійну дію, майже на рівні з препаратом порівняння дексаметазоном, крім того етанольний екстракт БЦ (50 мкг/мл) проявив виражений захисний ефект проти вірусу грипу від 30-40% захист. Водні екстракти оцвітини та БЦ крокусу інгібували утворення супероксид-аніонів і вивільнення еластази в нейтрофілах людини, проявляючи протизапальну дію, що було підтверджено у досліджах на *in vivo*. Екстракти з БЦ крокусу водний та етанольний (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%) та незначний вплив на активність простагландинів (12 і 14%). Крім того, екстракт полісахаридного комплексу з БЦ показав дуже високу активність щодо потрійного негативного раку молочної залози та клітин меланоми (EC<sub>50</sub> 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. Всі екстракти віднесені до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К.К. Сидорова.

8. За результатами фармакологічного скринінгу, а також з застосуванням підходу HerbMars, мангіферин, кемпферол, кверцетин, ізоорієнтин було запропоновано у якості Q-маркерів для контролю якості листя к. посівного; мангіферин, кроцин, рутин, ізокверцитрин, ферулову кислоту – для оцвітини; мангіферин, пролін, піроглутамінову 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, що сприятиме економічному розвитку виробництва цієї культури в Україні.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:* [341, 416 – 430], а також подана заявка на патент ЄС «Dry polysaccharide extract from *Crocus sativus* corms with anticancer properties (LT2021/05), 2021», заявка на патент LT2021 527, 106245.

## РОЗДІЛ 5

### ДОСЛІДЖЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ РОСЛИН РОДУ ІРИС ТА ЙОГО ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІД ФАКТОРІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА. ОБГОВОРЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ІРИСІВ

За результатами досліджень у галузі вивчення накопичення рослинами БАР, залежно від умов зростання, накопичено досить великий науковий матеріал, результати яких показують, що зміст певних груп БАР у рослинних організмах значною мірою залежить від абіотичних факторів – насамперед від кліматичних умов (температура, вологість, світло) та едафічних показників (кислотність ґрунту, хімічний склад ґрунту, тощо) місця зростання. У зв'язку з цим, актуальним є вивчення динаміки накопичення речовин різних видів ірисів у природних популяціях з різних місць проживання, що дозволяє виявити райони, найбільш перспективні для збирання рослини.

#### 5.1 Дослідження фенольних сполук у видів ірисів методом ВЕРХ

Рослини роду Ірис містять різноманітні фенольні сполуки, але характерної їх особливістю рослин є накопичення видо-специфічних ізофлавоноїдів. Для ідентифікації цієї групи речовин нами було модифіковано ВЕРХ метод, який відрізнявся гарним розподілом речовин, що дозволило точно ідентифікувати компоненти та визначити їх кількісний вміст.

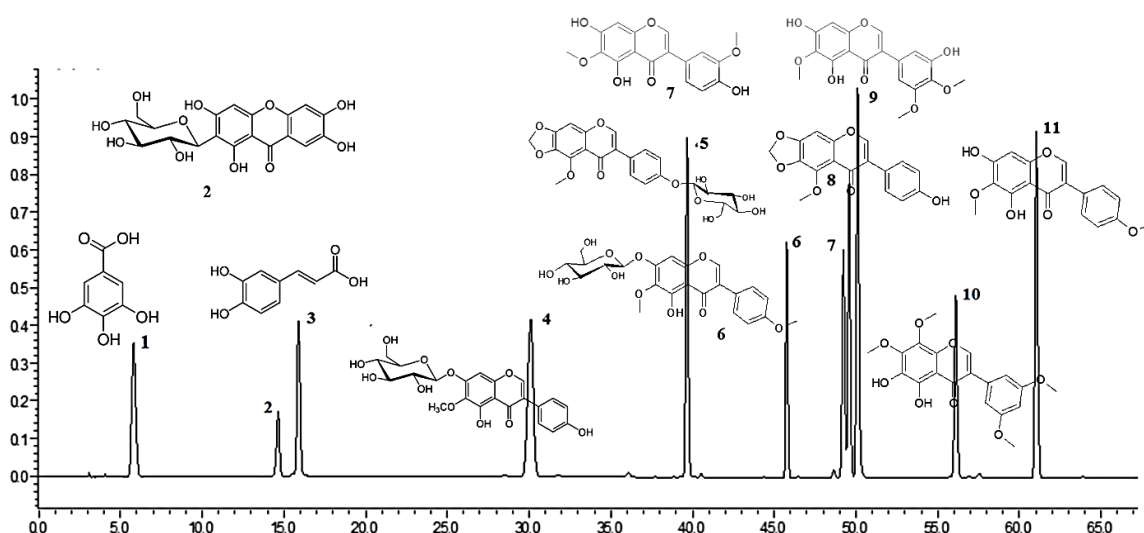
Розробка методики та результати визначення фенольних сполук. У поточному дослідженні ми застосували певні модифікації методу ВЕРХ, розробленого для одночасного визначення фенольних сполук у кореневищах *I. dichotoma* [431]. Застосовані модифікації призвели до кращого розділення сполук з хорошою симетрією піку. Було застосовано метанол як розчинник для екстракції та УЗ-баню для підвищення ефективності екстракції. Хроматографічне розділення екстрактів проводили за допомогою системи ВЕРХ



Shimadzu та оберненофазної колонки ACE C18 з градієнтним елююванням 0,1% розчином оцтової кислоти у воді та ацетонітрилу зі збільшенням полярності від 5 до 95%. Раніше автори [431] застосовували колонку Heder ODS-2 (250 мм) високого тиску, яка має подібні характеристики, але власне зміна пропорцій градієнту розчинника, дозволила точно розділити та ідентифікувати більше видо-специфічних ізофлавонів ірисів.

Апробацію методу проведено на чотирьох видах ірисів, по два з різних підсекцій (*Iris* та *Limniris*), щоб простежити варіації у фенольних компонентах та апробувати умови методики [432]. Подібні поліфенольні сполуки були виявлені в екстрактах кореневищ і. білого, і. угорського, і. сибірського та і. строкатого, як продемонстрували результати ВЕРХ-ДАД та УЕРХ–МС/МС. Ідентифікація сполук ґрунтувалася на їх спільному виведенні зі стандартами, попередньо виділеними з кореневищ і. болотного [433] та і. угорського [434, 435], а також на основі УФ/МС спектроскопічних даних. Для якісного аналізу фенольних сполук був обраний більш селективний і чутливий метод режиму негативної іонізації для сировини та екстрактів [359].

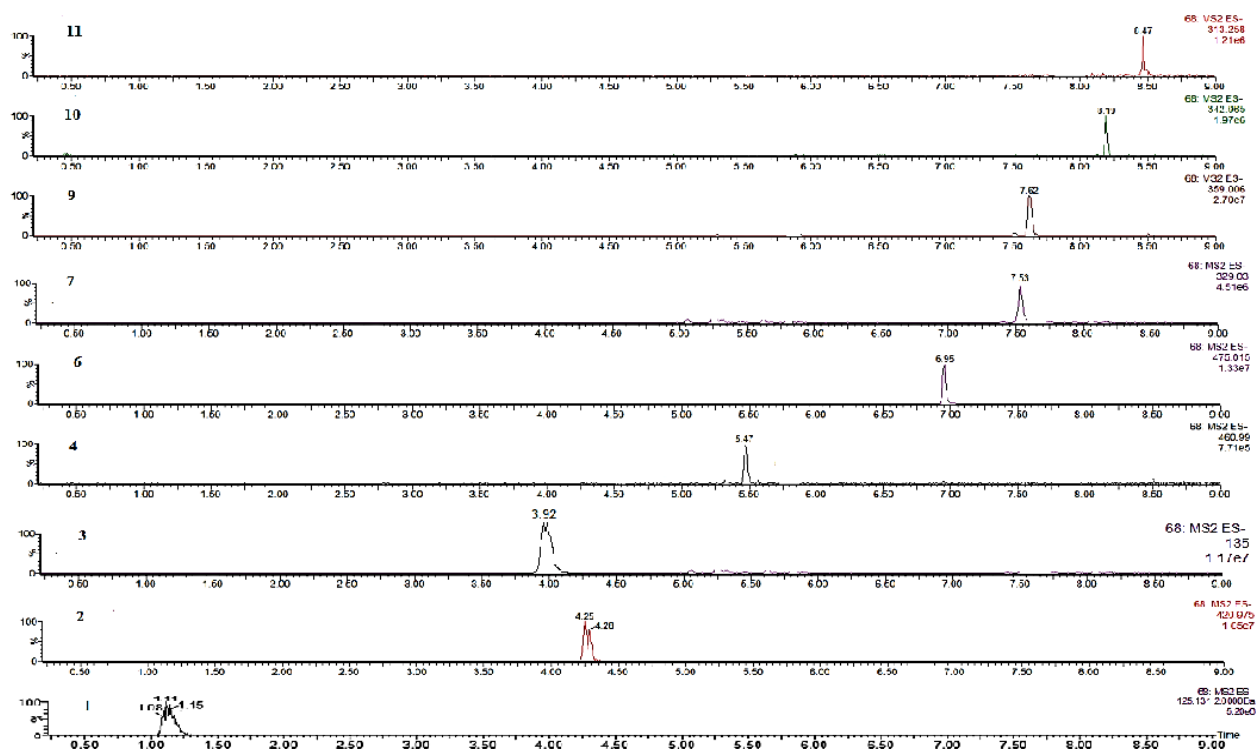
Розроблений метод пройшов повну валідацію. Калібрувальні криві, межі виявлення (LoD), межі кількісного визначення (LoQ) і лінійний діапазон для кожного аналіту наведені в таблиці А.9, А.10 (Додатки). Усі сполуки мали гарну лінійність ( $r^2 \geq 0,9993$ ) у межах перевірених діапазонів. Повторюваність була виражена як відносне стандартне відхилення (%RSD) вмісту основних компонентів, а RSD коливався від 0,3 до 1,3%, що було задовільним. Визначення основних сполук у досліджуваних розчинах проводили шляхом порівняння часів утримування піків та УФ-спектру, отриманого з хроматограми стандартного розчину (рис. 5.1, табл. А.7, А.8, рис. А.2, Додатки). Усі результати показали повторюваність, точність, гарну роздільну здатність компонентів, високу чутливість і хорошу лінійність методу. Хроматограми записували при 269 нм.



галова кислота (1), мангіферин (2), кофейна кислота (3), текторидин (4), германізм В (5), ірисолідон-D-глюкозид (6), іристекторигенін В (7), нігрицин (8), іригенін (9), 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавіон (10), ірисолідон (11)

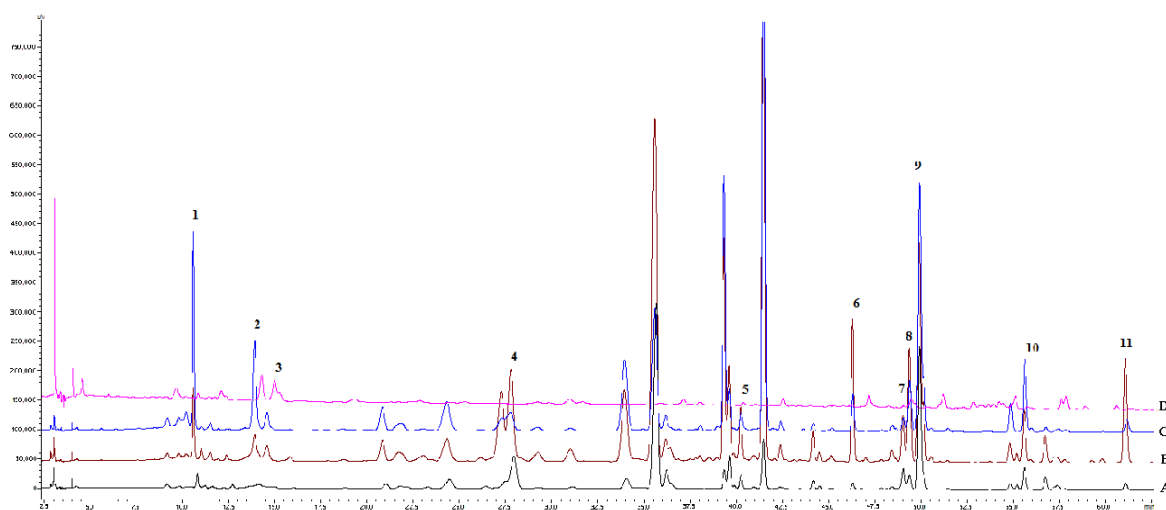
Рис. 5.1 ВЕРХ-хроматограма, записана при 269 нм змішаних стандартів

*Якісний аналіз зразків.* Часи утримання та характер фрагментації досліджуваних сполук  $[M - H]^-$  у негативних іонах (спектри  $MS^n$ ) порівнювали зі спектрами стандартів (рис. 5.2, табл. А.8, Додатки). Таким чином було ідентифіковано одинадцять піків, включаючи галову кислоту (1), мангіферин (2), кофейну кислоту (3), текторидин (4), германізм В (або нігрицин 4'-O- $\beta$ -D-глюкопіранозид) (5), ірисолідон-7-O- $\beta$ -D-глюкопіранозид (6), іристекторигенін В (7), нігрицин (або ірисолон) (8), іригенін (9), 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавіон (10) та ірисолідон (11). Усі поліфенольні сполуки якісно та кількісно визначено в кореневищах і. білого, і. угорського та і. строкатого. Для і. сибірського було ідентифіковано лише шість компонентів, включаючи п'ять ізофлавоноїдів (4, 5, 7, 8 і 9), мангіферин (2) і кофейну кислоту (3). У досліджуваних видах ірисів ці сполуки виявлені вперше. Сума площ усіх основних піків становить понад 90% загальної площі піків на всіх хроматограмах. Найбільший вміст фенольних сполук виявлено в кореневищах і. строкатого та і. угорського порівняно з іншими видами ірисів (рис. 5.3).



галова кислота (1) (1,14 хв), мангіферин (2) (4,21 хв), кофейна кислота (3) (3,92 хв), текторидин (4) (5,47 хв), ірисолідон D-глюкозид (6) (6,95 хв), іристоригенін В (7) (7,53 хв), іригенін (9) (7,62 хв), 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавіон (10) (8,19 хв) та ірисолідон (11) (8,47 хв.)

Рис. 5.2 УЕРХ-МС хроматограми сполук у режимі негативних іонів



галова кислота (1), мангіферин (2), кофейна кислота (3), текторидин (4), германізм В (5), ірисолідон-D-глюкозид (6); іристоригенін В (7), нігрицин (8), іригенін (9), 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавіон (10) та ірисолідон (11)

рис. 5.3 ВЕРХ-хроматограми метанольних екстрактів і. білого (А), і. угорського (В), і. строкатого (С), і. сибірського (D)

Сполуку 1 було ідентифіковано як галову кислоту відповідно до максимумів поглинання при 217 нм і 271 нм, характерних для гідроксикоричних кислот. Наявність молекулярного іону при  $m/z$  169 додатково підтвердила його природу. Галова кислота утворюється через шлях шикімової кислоти і є основним компонентом багатьох фенольних сполук [436]. Сполука 3 також показала максимуми поглинання при 236 нм і 324 нм, що відповідає гідроксикоричній групі сполуки. Сполуку 3 елюювали при  $t_R$  3,92 хв і показали іони-фрагменти при  $m/z$  179, 161 і 135 у режимі негативних іонів, що свідчить про структуру кофейної кислоти.

Сполука 2 показала типові максимуми поглинання при 240 (пл.), 257, 318 і 365 нм, які є характерними УФ-особливостями ксантонів (мангіферину). Сполуки 4–11 продемонстрували максимальні піки поглинання при 218–322 нм (плечовий пік) і 218–264 нм, які є характерними піками ізофлавононів (табл. А.7, Додатки). Дані МС вимірювали в режимі негативних іонів, а дані мас-спектроскопії всіх сполук наведено в таблиці А.8 (Додатки).

Виявлені сполуки продемонстрували регулярну поведінку фрагментації МС, що було корисним для надання інформації про їх хімічну структуру. Для флавоноїдних глікозидів спектри МС показали іон при  $m/z$   $[(M-H)-120]^-$ , який представляє характерний іон С-глікозидів, таких як мангіферин (2). Мангіферин був єдиним С-глікозидним похідним ксантону, ідентифікованим у видах ірисів, цим методом, МС-спектри флавоноїдних глікозидів показали втрату 162 Da, що свідчить про наявність одного залишку гексози. Ця картина фрагментації була характерною для О-глікозидів, таких як текторидин (4) та ірисолідон-D-глікозид (6). Втрата іону метильного радикалу (15 Da) була переважаючим напрямком фрагментації для більшості сполук через втрату метоксигрупи. Наприклад, іристоригенін В (7) показав іонний пік при  $m/z$  329 у режимі негативних іонів. Масові дані показали іон-фрагмент при  $m/z$  314, що вказує на втрату метильного залишку. Іригенін (9) втратив три метильні групи, демонструючи фрагменти при  $m/z$  344 і  $m/z$  329. Хроматограми метанольних екстрактів кореневищ і. білого, і. угорського, і. строкатого та і. сибірського зображені на рисунках А.55–А.58 (Додатки). Псевдомолекулярні іонні сигнали

для германаїзму В (5) і нігрицину (8) не спостерігалися в режимі негативних іонів за допомогою діагностики Retro-Diels-Alder (RDA) [437], таким чином, для виявлення 5 і 8 було необхідно застосувати режим позитивних іонів [438]. Галова кислота була ідентифікована лише в кореневищах і. строкатого та і. угорського, тоді як кофейна кислота а мангіферин спостерігалися у всіх проаналізованих зразках. Ізофлавонони та ксантони як основні компоненти і можуть розглядатися як хемотаксономічні маркери для видів ірисів.

*Кількісний аналіз зразків.* Для оцінки потенційної фармакологічної активності досліджуваної сировини проводили порівняльний кількісний аналіз вмісту кожної з фенольних сполук. Екстракт кореневищ і. сибірського можна відрізнити від інших екстрактів за низькою кількістю фенольних сполук (табл. 5.1). Кількість мангіферину (2) ( $0,267 \pm 0,002$  мг/г) і кофейної кислоти (3) ( $0,288 \pm 0,012$ ) була найвищою серед інших ідентифікованих сполук у цьому кореневищі ірису. Проте вміст усіх сполук, включаючи текторидин (4) ( $0,038 \pm 0,001$  мг/г), германаїзм В (5) ( $0,012 \pm 0,000$  мг/г), ірисолідон-D-глюкозид (6) ( $0,115 \pm 0,005$  мг/г), нігрицину (8) ( $0,079 \pm 0,002$  мг/г) та іригеніну (9) ( $0,069 \pm 0,000$  мг/г) була значно нижчою порівняно з іншими видами. Сполуки 1, 7, 10 і 11 були відсутні в екстракті кореневищ цього ірису, що було передбачувано, оскільки вони вважаються другорядними метаболітами рослин ірису.

Дослідження і. білого з України показали, що він не містить великої кількості фенольних сполук порівняно з іншими видами. Було виявлено високий вміст іригеніну (9) ( $3,199 \pm 0,034$  мг/г) і текторидину (4) ( $1,642 \pm 0,023$  мг/г). Текторидин, германаїзм В, ірисолідон-D-глюкозид, іристоригенін В, ірисолідон і 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонон були вперше ідентифіковані в і. білому методом ВЕРХ [439].

Таблиця 5.1

**Вміст фенольних сполук у кореневищах і. білого, і. угорського, і. строкатого та і. сибірського (метод ВЕРХ, мг/г)**

№ піку	Речовина	І. білий	І. угорський	І. сибірський	І. строкатий
1	Галова кислота	- <sup>1</sup>	2,362 ± 0,076	-	3,729 ± 0,134
2	Мангіферин	0,849 ± 0,029	2,368 ± 0,023	0,267 ± 0,002	5,747 ± 0,080
3	Кофейна кислота	0,227 ± 0,033	1,515 ± 0,005	0,288 ± 0,012	1,236 ± 0,005
4	Текторидин	1,642 ± 0,023	3,921 ± 0,071	0,038 ± 0,001	0,989 ± 0,006
5	Германаїзм В	0,534 ± 0,015	6,285 ± 0,030	0,012 ± 0,000	7,089 ± 0,032
6	Ірисолідон-D-глюкозид	0,325 ± 0,030	7,353 ± 0,025	0,115 ± 0,005	7,507 ± 0,005
7	Іристоригенін В	0,354 ± 0,004	0,750 ± 0,003	-	0,204 ± 0,005
8	Нігрицин	0,317 ± 0,003	2,267 ± 0,003	0,079 ± 0,002	0,990 ± 0,010
9	Іригенін	3,199 ± 0,034	4,892 ± 0,038	0,069 ± 0,000	5,518 ± 0,031
10	5,6-Дигідрокси-7,8,3',5'- тетраметоксиізофлавоон	0,457 ± 0,003	1,056 ± 0,002	-	1,512 ± 0,013
11	Ірисолідон	0,264 ± 0,004	4,025 ± 0,005	-	0,437 ± 0,030

Примітка. 1 – речовину не виявлено. Дані виражені як середнє ± SD для кожного зразка  $n = 2$ .

Кількість германаїзму В (5) та ірисолідон-D-глюкозиду (6) була найвищою в метанольних екстрактах кореневищ і. строкатого та і. угорського (від 7,089 до 6,285 мг/г та від 7,507 до 7,353 мг/г, відповідно). Концентрації іригеніну (9) ( $5,518 \pm 0,031$  мг/г) та ксантону мангіферину (2) ( $5,747 \pm 0,080$  мг/г) у і. строкатому також були високими порівняно з іншими дослідженими видами ірисів. Згідно з проведеним аналізом ВЕРХ, кожен зразок кореневищ містив мангіферин, кількість якого коливалася від 0,267 (і. сибірський) до 5,747 мг/г (і. строкатий). Серед гідроксикоричних кислот галова кислота (1) виявлена в екстрактах і. строкатого ( $3,729 \pm 0,134$  мг/г) та і. угорського ( $2,362 \pm 0,076$  мг/г).

Найпоширенішими ізофлавоноїд-О-глюкозидами в кореневищах і. угорського були текторидин (4), германаїзм В (5), ірисолідон-D-глюкозид (6), нігрицин (8), іригенін (9) та ірисолідон (11). Отримані результати показали, що кількість текторидину (3) ( $3,921 \pm 0,071$  мг/г), нігрицину (8) ( $2,267 \pm 0,003$  мг/г) та іристекторигеніну В (7) ( $0,750 \pm 0,003$  мг/г) у цьому ірисі була надзвичайно високою порівняно з іншими видами.

Дослідження якісного та кількісного визначення ізофлавонів, таких як іристекторигенін В, германаїзм В, ірисолідон-D-глюкозид, його аглікон, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон та нігрицин у сировині ірисів проведено вперше. З одинадцяти сполук (табл. 5.1), речовини 2, 3, 4, 5, 6, 8 і 9 були ідентифіковані у всіх видах ірисів, ірисолідон-D-глюкозид (6) був виявлений у трьох видах, крім і. сибірського. Кількість речовин 2, 4, 5, 6, 8 і 9 була найвищою серед усіх ідентифікованих сполук у досліджених зразках. Сполуки 5, 6, 8 і 9 раніше були виділені лише з кореневищ і. німецького [440] і були знайдені в інших видах ірисів [8, 128]. Наші дослідження підтверджують важливість мангіферину, текторидину, германаїзму В, ірисолідон-D-глюкозиду, нігрицину і іригеніну як маркерних сполук рослин роду Ірис, а також їх терапевтичний вклад у фармакологічну дію сухих екстрактів з кореневищ ірисів.

## 5.2 Кореляційний аналіз між екологічними факторами та вмістом фенольних сполук у кореневищах та листі ірисів з природних популяцій

Для оцінки впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез БАР у кореневищах та листі видів ірисів було використано вищеописану методику ВЕРХ, але для ірисів з різних природних середовищ. Для цього було заготовлено види ірисів, що належать до двох підродів – *Iris* subg. *Iris* (і. німецький, *I. germanica* L.) та *Iris* subg. *Limniris* (Tausch) Spach (і. солелюбивий, *I. halophila* Pall., і. болотний, *I. pseudacorus* L., і. сибірський, *I. sibirica* L.) (табл. А.55, Додатки). Популяції видів ірисів для цього дослідження були відібрані в Латвії, Литві та Україні (рис. А.54, Додатки). Кореневища рослин були відібрані протягом вересня – жовтня 2017 року, переважно в природних середовищах існування, за винятком двох зразків і. сибірського та одного зразка і. болотного, які були відібрані з культивованого середовища. Загалом було відібрано дев'ять популяцій і. болотного, три популяції і. германського, три популяції і. сибірського та одна популяція і. солелюбивого. Дослідження включало порівняльний аналіз хімічного складу ґрунту з місць зростання рослин та впливу кліматичних факторів. Листя ірисів заготовляли восени та влітку з тих же популяцій для порівняльного аналізу.

*Характеристика місця та середовища існування ірисів.* У кожному місці відбору проб реєструвались характеристики середовища існування (тип рослинності, тип середовища існування, глибина води). У популяції і. солелюбивого брали вибірки в добре освітлених сухих степових місцях існування з рідкісним чагарниковим шаром. Зразки і. болотного були зібрані у трьох типах контрастних середовищ існування: алювіальні ліси, мезотрофні озерах Литви (табл. 5.2). І. сибірський заготовляли на відкритих, добре освітлених ділянках. І. німецький, який в Литві є натуралізованим чужорідним видом, був відібраний у трьох місцевостях: у півтіні, в розрідженому сосновому лісі (ділянка Пабраде); на узліссі соснового лісу; у сухостійних пасовищах із досить рідким кущовим шаром.



Таблиця 5.2

**Екологічні характеристики місць відбору видів ірисів в  
Латвії, Литві та Україні**

№ сайту	види	Середовище існування	Покриття (%)			Глибина води (м)
			дерева	чагарники	трави	
ІН1	<i>I. halophila</i>	Сухий степ	0	10	80	–
ІР2	<i>I. pseudacorus</i>	Культивування	0	0	50	–
ІР3	<i>I. pseudacorus</i>	Сухий степ	0	10	80	–
ІР4	<i>I. pseudacorus</i>	Край сухого соснового лісу	30	10	60	–
ІР5	<i>I. pseudacorus</i>	Відкриті степи, вологі луки	0	0	70	–
ІР6	<i>I. pseudacorus</i>	Алювіальний вільховий ліс	60	40	60	–
ІР7	<i>I. pseudacorus</i>	Алювіальний вільховий ліс	50	40	70	–
ІР8	<i>I. pseudacorus</i>	Мезотрофне озеро	0	0	60	0,2–0,3
ІР9	<i>I. pseudacorus</i>	Край сухого соснового лісу	20	10	70	–
ІР10	<i>I. pseudacorus</i>	Мезотрофне озеро	0	0	50	0,3–0,4
ІС11	<i>I. sibirica</i>	Культивування	0	0	60	–
ІС12	<i>I. sibirica</i>	Культивування	0	0	50	–
ІС13	<i>I. sibirica</i>	Відкриті степові луки	0	10	80	–
ІГ14	<i>I. germanica</i>	Узлісся соснового лісу	40	40	50	–
ІГ15	<i>I. germanica</i>	Сухий сосновий ліс	40	10	60	–
ІГ16	<i>I. germanica</i>	Сухий лук	0	20	70	–

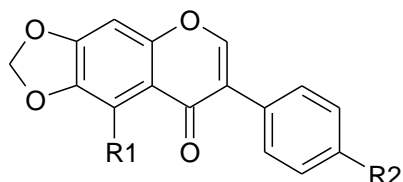
*Результати фізико-хімічного аналізу ґрунту.* Результати агрохімічного аналізу ґрунту виявили широкі варіації досліджуваних властивостей ґрунту серед місць відбору проб. Ph ґрунту в місцях проживання досліджуваних видів у Литві та Латвії був близький до нейтрального, тобто слабокислого (рН 6,1–6,5), нейтрального (рН 6,6–7,3) або слаболужного (рН 7,4–7,8), тоді як в Україні рН ґрунту в більшості випадків був сильно (рН 5,1–5,5), дуже сильно (рН 4,5–5,0) або надзвичайно кислим (3,5–4,4). Детальний аналіз ґрунту представлено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

### Характеристика ґрунтів видів ірисів з Латвії, Литві та України

Код	Вид ірису	Ph, мол/л	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	K <sub>2</sub> O, мг/кг	N, %	Гумус, %	Водні умови (μS)	Вода рН
ІН1	<i>I. halophila</i>	4,9	48	97	0,08	1,98	–	–
ІР2	<i>I. pseudacorus</i>	6,5	207	166	1,10	4,80	–	–
ІР3	<i>I. pseudacorus</i>	5,1	46	100	0,10	2,05	–	–
ІР4	<i>I. pseudacorus</i>	5,6	95	98	1,05	3,40	–	–
ІР5	<i>I. pseudacorus</i>	4,2	81	165	1,24	5,32	–	–
ІР6	<i>I. pseudacorus</i>	7,2	115	63	0,11	5,74	–	–
ІР7	<i>I. pseudacorus</i>	7,6	105	126	0,23	6,41	–	–
ІР8	<i>I. pseudacorus</i>	–	–	–	–	–	565	7,6
ІР9	<i>I. pseudacorus</i>	6,8	38	342	0,26	2,60	–	–
ІР10	<i>I. pseudacorus</i>	–	–	–	–	–	351	7,2
ІС11	<i>I. sibirica</i>	7,3	85	187	0,19	2,21	–	–
ІС12	<i>I. sibirica</i>	5,7	406	248	1,04	5,30	–	–
ІС13	<i>I. sibirica</i>	4,3	90	150	1,17	4,85	–	–
ІГ14	<i>I. germanica</i>	6,3	65	192	0,14	2,68	–	–
ІГ15	<i>I. germanica</i>	6,0	35	68	0,23	2,41	–	–
ІГ16	<i>I. germanica</i>	7,4	187	35	0,05	1,63	–	–

*Фенольні сполуки в кореневищах видів ірисів з різних локацій.* Під час дослідження ми виявили та кількісно визначили 25 фенольних сполук (рис. 5.5) у метанольних екстрактах 16 зразків кореневищ та листя ірисів. Для кореневищ та листя ірисів ми визначили кількісний вміст флавонів, ізофлавонів, ізофлавонових глікозидів, фенольних карбонових кислот та ксантонів як основних діючих сполук (табл. А.56-58, Додатки).

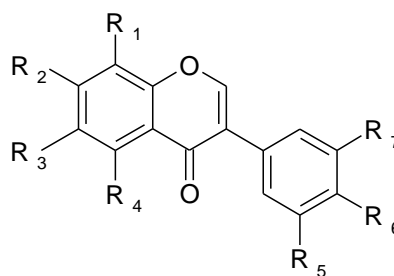


Ізофлавоны:

**Нігрицин-D-глюкозид 13:**

$R_1 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = \text{O-Glu}$ ;

**Нігрицин 20:**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = \text{OH}$



Ізофлавоны:

**Текторидин 10:**  $R_1 = R_5 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_4 = R_6 = \text{OH}$ ;  $R_3 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = \text{O-Glu}$ ;

**Дайдзеїн 12:**  $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_6 = \text{OH}$ ;

**Геністеїн 7-глю 15:**  $R_1 = R_3 = R_5 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{O-Glu}$ ;  $R_6 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{OH}$ ;

**6,7-Дигідроксиізофлаво́н 17:**  $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{OH}$ ;

**Тристе́кторигені́н В 19:**  $R_2 = R_4 = R_6 = \text{OH}$ ;  $R_3 = R_7 = \text{OCH}_3$ ;  $R_5 = \text{H}$ ;

**Іригені́н 21:**  $R_3 = R_5 = R_6 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = R_4 = R_7 = \text{OH}$ ;

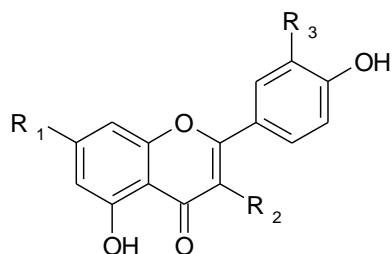
**7-Гідроксиізофлаво́н 22:**  $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;

**Формононетин 23:**  $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  $R_6 = \text{OCH}_3$ ;

**5,6-Дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлаво́н 24:**

$R_1 = R_2 = R_5 = R_7 = \text{OCH}_3$ ;  $R_3 = R_4 = \text{OH}$ ;  $R_6 = \text{H}$ ;

**5,7-Дигідрокси-4'-метоксиізофлаво́н 25:**  $R_1 = R_3 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$ ;  
 $R_2 = R_4 = \text{OH}$ ;  $R_6 = \text{OCH}_3$ ;



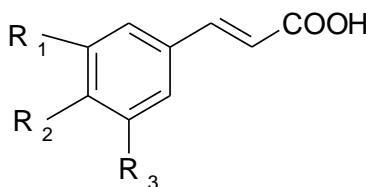
Флавоны:

**Гіперозид 8:**  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{O-Gal}$ ;  
 $R_3 = \text{OH}$ ;

**Ізокверцитрин 9:**  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{O-Glu}$ ;  
 $R_3 = \text{OH}$ ;

**Апігені́н-7-глюкозид 11:**  $R_1 = \text{O-Glu}$ ;  
 $R_2 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{H}$ ;

**Апігені́н 16:**  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{H}$

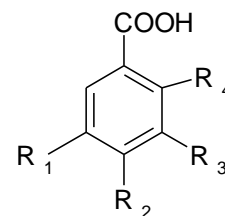


**Кофейна кислота 4:**  $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  
 $R_3 = \text{H}$

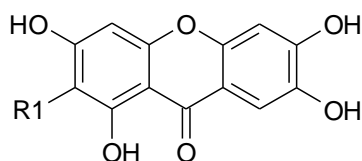
**Кумарова кислота 6:**  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  
 $R_3 = \text{H}$

**Ферулова кислота 7:**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  
 $R_3 = \text{H}$

**Корична кислота 14:**  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{H}$ ;  $R_3 = \text{H}$

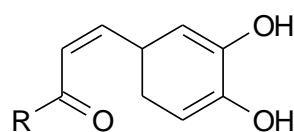


**Галова кислота 1:**  
 $R_1 = \text{OH}$ ;  $R_2 = \text{OH}$ ;  
 $R_3 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{H}$ ;

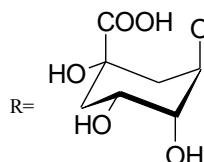


Ксантони:

**Мангіферин 5:**  $R_1 = \text{C-}\beta\text{-D-Glc}$



**Хлорогенова кислота 3:**



**Неохлорогенова кислота 2:**

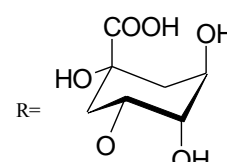
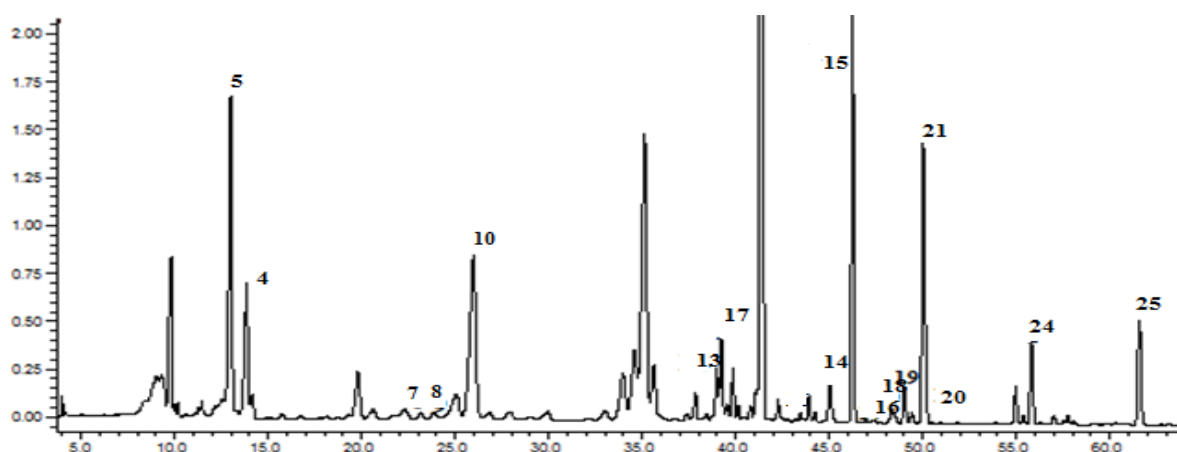


Рис. 5.5 Структурні формули ідентифікованих сполук у видів ірисів

Фенольні карбонові кислоти (галова кислота, неохлорогенова кислота, хлорогенова кислота, кофейна кислота, *p*-кумарова кислота, ферулова кислота та *транс*-корична кислота) були визначені у всіх досліджуваних видах кореневищ ірисів у різному складі та кількісному вмісті. Галова кислота була виявлена в семи зразках з шістнадцяти, і вона домінувала серед усіх кислот, зареєстрованих у кореневищах *Limniris* subg. Високий вміст галової кислоти було встановлено в зразках і. болотного з озера Spindžius (0,08 мг/г) і Meškerinè (0,07 мг/г). Кофейна кислота є другим компонентом по величині накопичення в *Limniris* subg. (від 0,01 до 0,2 мг/г). Слід зазначити, що у представників *Limniris* subg. ферулової кислоти не виявлено. Серед усіх зразків *Limniris* subg. флавоноїд гіперозид (0,003 мг/г) був виявлений лише у і. болотного від Meškerinè, апігенін-7-глюкозид (0,3 мг/г) був виявлений лише у і. сибірському із Закарпатської обл. та формонетин (у незначному вмісті) було виявлено у і. болотного з Lakajai.

Серед фенольних карбонових кислот у зразках кореневищ *Iris* subg. виявлено лише кофейну, ферулову (0,1 – 0,2 мг/г) та коричну кислоти (0,02 – 0,3 мг/г). Серед флавоноїдів були виділені гіперозид, кемпферол, кверцетин 3-глюкозид (0,9 мг/г) у пробі і. німецького із Забараускаї, апігенін-7-глюкозид та апігенін (рис. 5.6). Ізокверцитрин був виявлений лише в і. німецькому (Забараускаї), а 7-гідроксиізофлавонон (0,04 мг/г) – у і. німецькому з Lausgeniai.



кофейна кислота (4); ферулова кислота (6); *t*-корична кислота (7); мангіферин (8); гіперозид (9); кемферол (10); текторидин (12); нігрицин-4'-D-глюкозид (14); геністеїн 7-D-глюкозид (16); апігенін (17); 6,7-дигідроксиізофлавонон (18); іристоригенін В (19); нігрицин (20); іригенін (21); 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонон (24); 5,7-дигідрокси-4'-метоксиізофлавонон (25)

Рис. 5.6 Типова ВЕРХ-хроматограма кореневищ і. німецького (IG15)

Найпоширенішими ізофлавоноїдами ірисів, що були виявлені є нігрицин-4'-глюкозид (виявлений у 13 зразках), іригенін (у 14 зразках) та 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонон (у 12 зразках). Іригенін був виявлений майже у всіх досліджених зразках, і його кількість коливалась від 0,01 мг/г до 2,11 мг/г.

Порівняння вмісту фенольних сполук показало, що іригенін переважав в і. німецькому (1,89 – 2,11 мг/г), в той час як мангіферин переважав (2,70 мг/г) у і. німецькому з Пабраде (Литва) (рис. 5.6). Найвищий вміст геністеїн-7-глюкозиду виявлено також у зразку і. німецького з Пабраде (9,67 мг/г), і трохи менше в і. сибірському з Києва та і. німецькому із Забараускаї та Лосгені (0,3 мг/г, 2,57 мг/г та 3,11 мг/г відповідно). Глюкозид мангіферин був ідентифікований в семи зразках, з середнім вмістом в діапазоні від 0,2 мг/г до 2,7 мг/г. Види *Iris* subg. мали більший вміст усіх сполук порівняно з *Limniris* subg. Аналіз показав, що кількість фенольних сполук у метанольних екстрактах кореневищ і. болотного з Латвії та Литви була більшою, ніж у зразках з України. Слід зазначити, що кількість ксантону мангіферину і геністеїн 7-глюкозиду в зразках ірисів були найвищими у порівнянні з іншими сполуками.

*Фенольні сполуки у листі видів ірисів з різних локацій.* У дослідження були включені листя ірисів, що були заготовлені під час збору кореневищ. ВЕРХ методом було ідентифіковано від 2 до 17 сполук фенольної структури у зразках листя ірисів з різних місць (табл. А.57, А.58, Додатки). Мангіферин, текторидин, 6,7-дигідроксиізофлавонон, іригенін, хлорогенова, кофейна кислоти ідентифіковані в більшості зразків листя незалежно від місця та часу заготівлі але відмічені суттєві відмінності в їх кількісному вмісті (рис. 5.7).

В зразках листя ірисів осіннього збору не виявлено апігенін-7-глюкозиду, 7-гідроксиізофлавонону, ізокверцитрину, астрагаліну, а у листі літніх ірисів – відсутній робінін. Однак, вірогідно, це є винятком, оскільки перераховані речовини були ідентифіковані тільки в окремих видах ірисів. В окремих зразках ірисів названі сполуки не було виявлено або вони перебували у слідових кількостях. Фенольний комплекс листя з різних місць зростання є подібним.

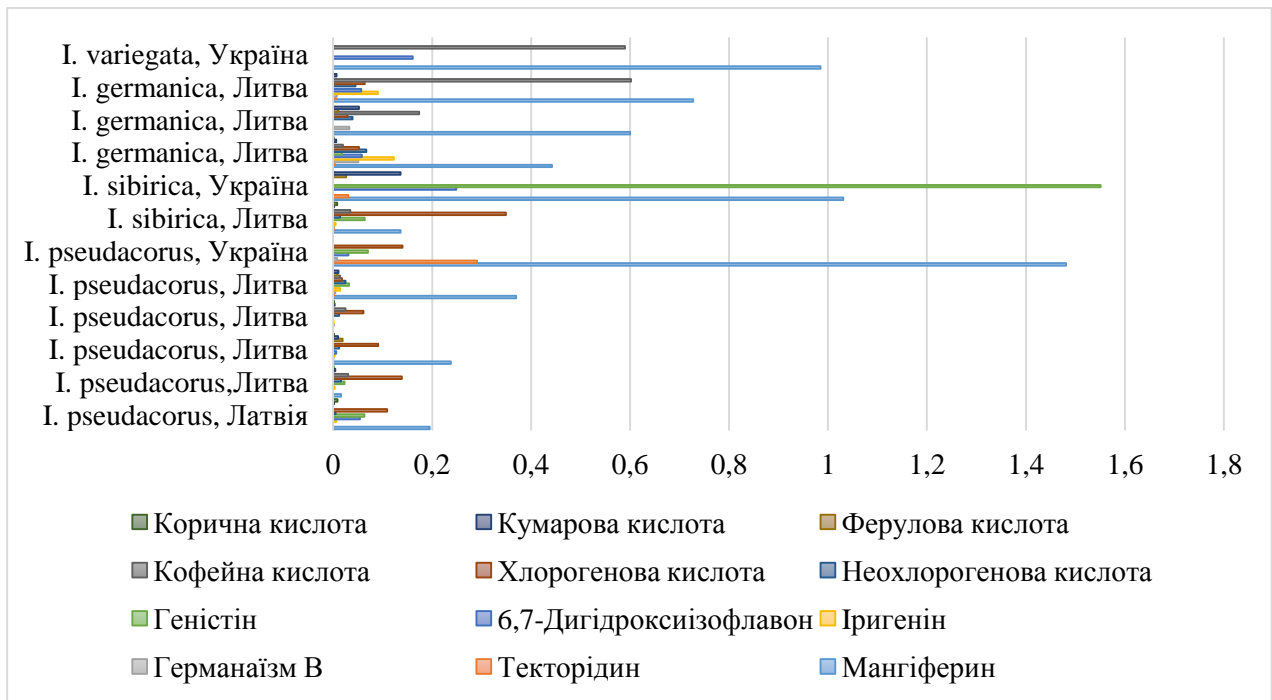


Рис. 5.7 Вміст (мг/г) основних речовин-маркерів у листі видів ірисів, осіннього періоду заготівлі

Загальний аналіз даних показав, що накопичення фенольних речовин більше відбувається у літній період (табл. А.58, Додатки), що обумовлено фактором освітленості, оскільки одна з фізіологічних функцій поліфенольних сполук є захистом рослин від УФ-випромінювання. Заготівля листя ірисів в літні місяці привело до найвищого рівня мангіферину у сировині ірисів (до 0,11 мг/г у листі і. строкатого). Крім того, кількісний вміст мангіферину змінювався в зразках в залежності від місця зростання, тобто спостерігався вплив факторів зовнішнього середовища. Найкращим періодом заготовки сировини листя ірисів є літній період, коли накопичення фенольних сполук відбувається інтенсивніше.

*Якісні варіації фенольних сполук у досліджуваних видів.* Аналіз виявлених фенольних сполук у зразках показав, що галова кислота часто зустрічається у *Limniris* subg. та відсутня у кореневищах *Iris* subg. Неохлорогенова, хлорогенова, кумарова кислоти, ізокверцитрин, апігенін-7-глюкозид, даїдзеїн, формонетин не були виявлені у зразках *Iris* subg., але зрідка були присутні у видів *Limniris*. В той же час, ферулова кислота, що ідентифікована у всіх зразках *Iris* subg., не

виявлено у видів *Limniris* subg. Кемпферол не знайдено у кореневищах *Limniris* subg., але був присутній у 2 популяцій *Iris* subg. (із 3 популяцій, що відібрані).

Для і. німецького (підгрупа *Iris*), застосовуючи індекс подібності Брея-Кертиса (рис. 5.8), було встановлено, що він утворює окрему підгрупу серед інших видів ірисів, усі їх популяції склали чітко визначене скупчення. І. сибірський та і. солелюбивий розташовувались серед і. болотних та всіх вибірових популяцій підгрупи. Види з *Limniris* були дуже різноманітними як за якісним так і кількісним складом сполук. Найвищий показник подібності був виявлений між двома популяціями і. болотного, відібраними з водних середовищ існування, і ці популяції відрізнялись лише наявністю двох сполук (кофейна кислота, гіперозид). Крім того, відмінності серед досліджених популяцій і. болотного в Україні були набагато вищими, ніж відмінності серед популяцій і. болотного з Латвії та Литви.

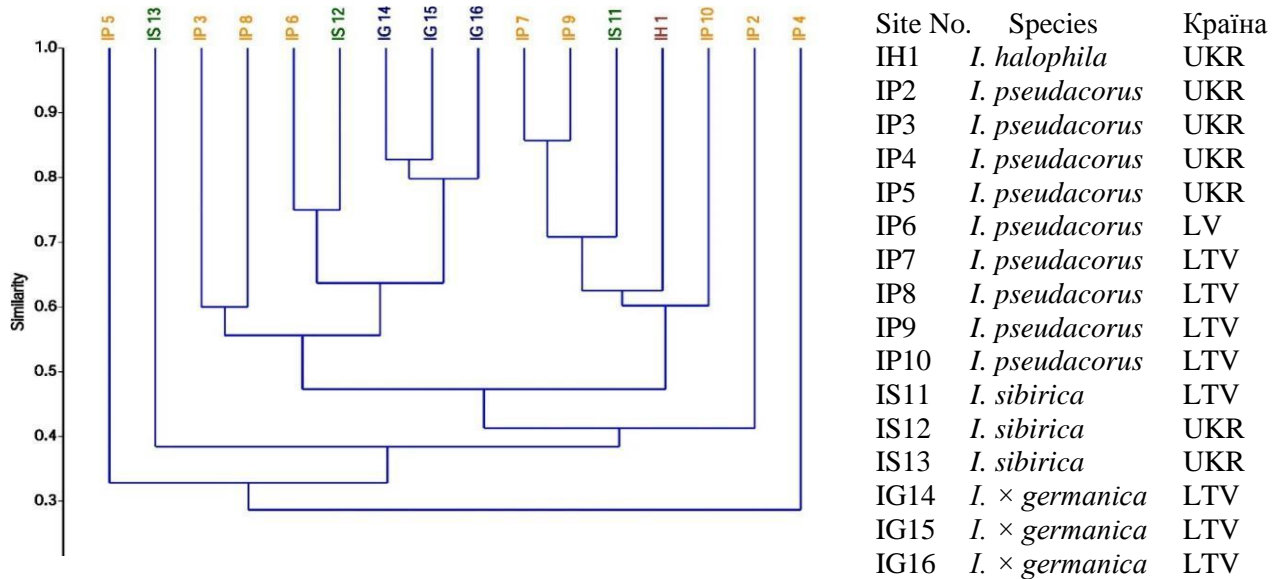


Рис. 5.8 Дендрограма популяцій видів ірисів відповідно до різноманітності проаналізованих фенольних сполук із застосуванням відстані Брея-Кертиса

Кореляційний аналіз (табл. 5.4) кількості фенольних сполук, згрупованих за класами, виявив статистично значущі позитивні зв'язки між ними. Виявлено найсильніші взаємозв'язки між кількістю ізофлавоноїдів та ксантонів ( $r_s = 0,84$ ,  $p = 0,000$ ), а також між кількістю гідроксикоричних кислот та ксантонів ( $r_s = 0,75$ ,  $p = 0,001$ ). Між іншими парами класів фенольних сполук були виявлені помірні та статистично надійні взаємозв'язки.

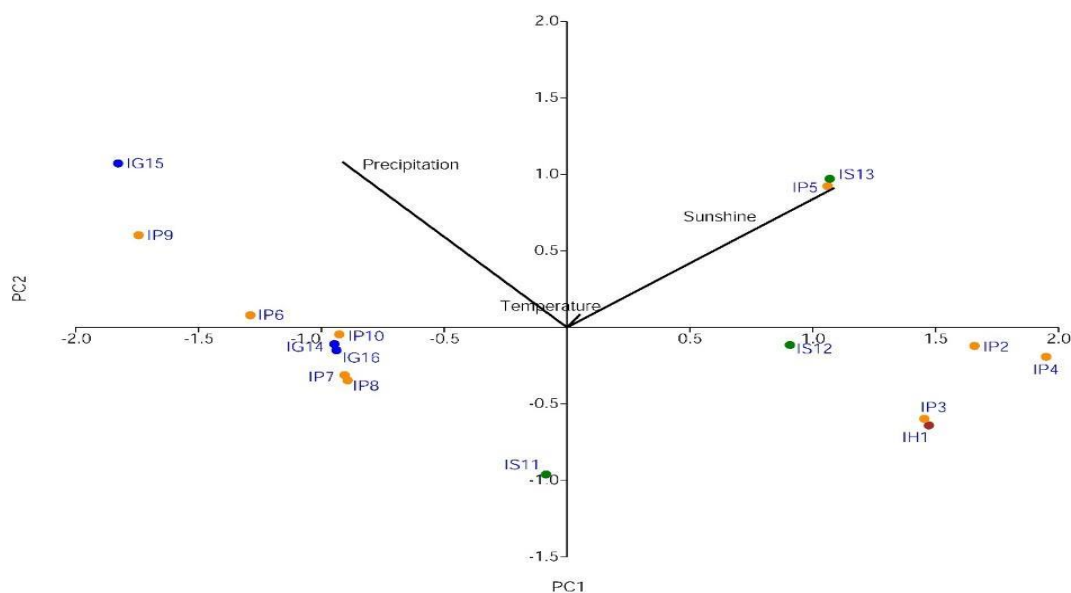
Таблиця 5.4

**Результати кореляційного аналізу Спірмена між вмістом фенольних сполук (значення  $r$  вище діагоналі, значення  $r_s$  нижче діагоналі)**

БАР	Фенолкарбонові кислоти	Ксантони	Флавоноїди	Ізофлавоноїди
Фенолкарбонові кислоти	-	0,001	0,014	0,019
Ксантони	0,75	-	0,013	0,000
Флавоноїди	0,60	0,61	-	0,004
Ізофлавоноїди	0,58	0,84	0,68	-

*Вплив умов навколишнього середовища на кількість фенольних сполук.*

Аналіз основних компонентів, заснований на кількості фенольних сполук у класах та метеорологічних даних, показав, що метеорологічні фактори (PC1) пояснюють 80,07% варіації (навантаження протягом тривалості сонячного сйва 0,76; для річних опадів  $-0,64$ ) (рис. 5.9).



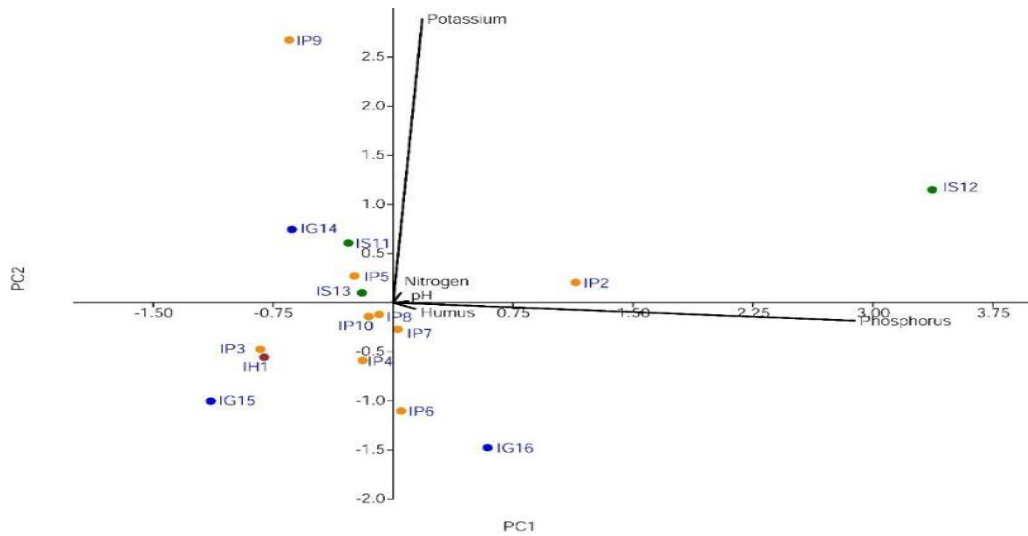
Аналіз основних компонентів досліджуваних видів ірисів на вмісту фенольних сполук, згрупованих за класами, та метеорологічними умовами (річна кількість опадів, мм; тривалість сонячного сйва, години; середньорічна температура, °C). Перші дві осі пояснюють 80,07% та 18,63% варіацій відповідно

Рис. 5.9 Вплив кліматичних показників на біосинтез БАР ірисів

Аналіз впливу властивостей ґрунту на накопичення сполук фенольної природи за класами виявив сильний вплив вмісту фосфору та калію. Перші два



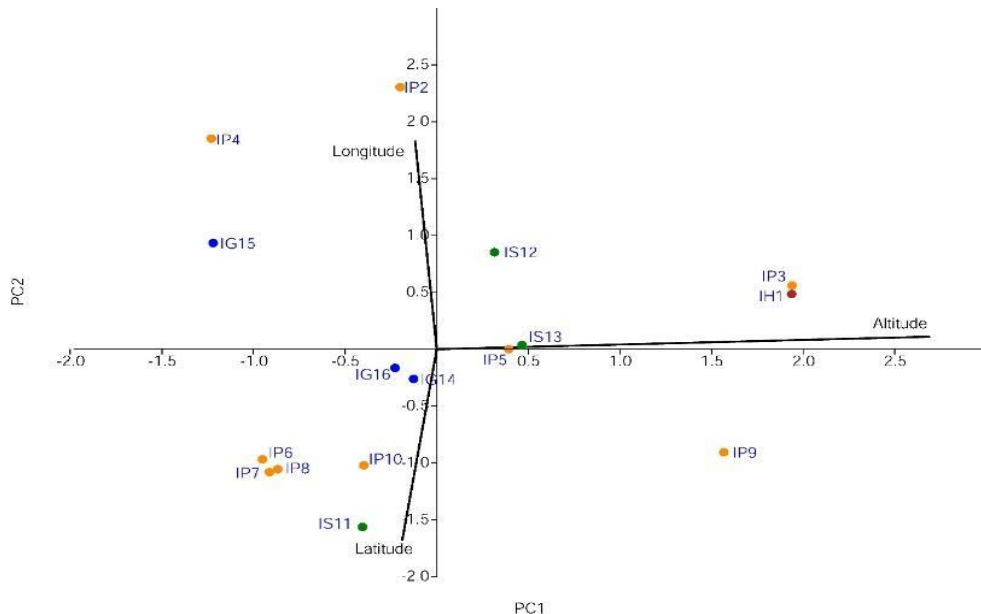
основні компоненти пояснюють 52,35% та 43,07% варіацій відповідно. Як в PC1, так і в PC2 завантаження фосфору та калію було рівним, тобто 0,99 (рис. 5.10.).



Аналіз основних компонентів досліджуваних видів ірисів на основі вмісту фенольних сполук, згрупованих за класами, та агрохімічних властивостей ґрунту (вміст калію, фосфору, азоту та гумусу, рН ґрунту). Перші дві осі пояснюють 52,35% та 43,07% варіацій відповідно

Рис. 5.10 Вплив агрохімічних показників на біосинтез БАР ірисів

Аналіз впливу географічних факторів (довготи, широти та висоти) показав, що перші дві осі пояснюють 80,57% та 8,94% варіацій. У PC1 навантаження для висоти становило 0,99, тоді як у PC2 навантаження для широти становило – 0,62, а для довготи – 0,68 (рис. 5.11).



Аналіз основних компонентів досліджуваних видів ірисів на основі вмісту фенольних сполук, згрупованих за класами, та географічних факторів (висота, довгота та широта). Перші дві осі пояснюють 80,57% та 8,94% варіацій відповідно

Рис. 5.11 Вплив географічних показників на біосинтез БАР ірисів

*Взаємозв'язки з факторами навколишнього середовища.* Результати кореляційного аналізу між кількістю фенольних сполук у кореневищах видів ірисів, згрупованих за класами, та аналізованими метеорологічними факторами були досить несподіваними (табл. 5.5). Надійних кореляційних зв'язків між кількістю досліджуваних сполук та середньорічною температурою, а також річною кількістю опадів не виявлено. Однак була виявлена помірна негативна та статистично достовірна кореляція між кількістю гідроксикоричних кислот та тривалістю сонячного проміння ( $r_s = -0,62$ ;  $p = 0,0110$ ). Крім того, були виявлені негативні, хоч і слабкі та не статистично надійні зв'язки між тривалістю сонячного проміння та іншими класами досліджуваних фенольних сполук.

Таблиця 5.5

**Результати кореляційного аналізу Спірмена між вмістом фенольних сполук за класами та аналізованими метеорологічними параметрами**

БАР	Середньорічна температура	Середньорічні опади (мм)	Тривалість сонячного випромінювання (h)
Гідроксикоричні кислоти	$r_s = -0,24$ ; $p = 0,3661$	$r_s = 0,46$ ; $p = 0,0738$	$r_s = -0,62$ ; $p = 0,0110$
Ксантони	$r_s = 0,08$ ; $p = 0,7747$	$r_s = 0,21$ ; $p = 0,4259$	$r_s = -0,38$ ; $p = 0,1494$
Флавоноїди	$r_s = -0,03$ ; $p = 0,8979$	$r_s = 0,35$ ; $p = 0,1853$	$r_s = -0,38$ ; $p = 0,1579$
Ізофлавоноїди	$r_s = 0,27$ ; $p = 0,3110$	$r_s = 0,28$ ; $p = 0,2924$	$r_s = -0,47$ ; $p = 0,0690$

Аналіз взаємозв'язку метеорологічних показників та кількості окремих фенольних сполук у кореневищах видів ірисів виявив кілька статистично достовірних кореляційних зв'язків. Виявлено значну сильну негативну кореляцію між вмістом 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонолу та тривалістю сонячного випромінювання ( $r_s = -0,75$ ;  $p = 0,0009$ ) і помірну негативну кореляцію вмісту гіперозиду та середньорічної температури ( $r_s = -0,58$ ;  $p = 0,0189$ ). Були виявлені помірні та надійні позитивні кореляційні зв'язки між кількістю гіперозиду та річними опадами ( $r_s = 0,57$ ;  $p = 0,0190$ ), а також між кількістю *p*-кумарової кислоти та середньорічною температурою ( $r_s = 0,58$ ;  $p =$

0,0188). Виявлено помірну позитивну кореляцію між кількістю *p*-кумарової кислоти та вмістом азоту в ґрунті ( $r_s = 0,57$ ;  $p = 0,0209$ ). Більше того, виявлені помірні негативні кореляції між рН ґрунту та кількістю *p*-кумарової кислоти ( $r_s = -0,57$ ;  $p = 0,0210$ ), між вмістом гіперозиду та кількістю фосфору в ґрунті ( $r_s = -0,58$ ;  $p = 0,0196$ ), між кількістю кемпферолу та вмістом калію в ґрунті ( $r_s = -0,53$ ;  $p = 0,0359$ ) та кількістю 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавону та вмістом азоту в ґрунті ( $r_s = -0,52$ ;  $p = 0,0380$ ). Кореляція між вмістом гумусу та вмістом окремих фенольних сполук, а також вмістом фенольних сполук за класами була дуже слабкою або слабкою та статистично ненадійною.

Вивчення впливу екологічних факторів на накопичення вторинних метаболітів у видів ірисів є важливим, оскільки вони сприяють знанням динаміки вмісту вторинних метаболітів у сировині і можуть бути використані для вирощування і збору сировини ірисів в лікувальних цілях. В подальшому це дозволяє надійно сформулювати СОПи для вирощування різних видів ірисів залежно від необхідного фармакологічного маркера.

### 5.3 Дослідження складу карбонових кислот видів ірисів методом ГХ-МС

Для визначення адаптаційних можливостей видів ірисів [441], що зростають в Україні, а також оцінки нутрицевтичних перспектив сировини ірисів, було проведено порівняльне визначення складу карбонових кислот листя та кореневищ рослин. У дослідження було включено кореневища *I. graminea*, *I. sibirica*, *I. halophila*, *I. hungarica*, *I. pallida*, *I. variegata*, *I. pumila*, *I. musulmanica* (види з України та види з Азербайджану), *I. carthaliniae*, *I. medwedewii* та листя 15 видів 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 жирних кислот). Результати складу та вмісту жирних кислот у сировині і. угорського наведено у дисертаційній роботі Кречун А.В. [442] для порівняння та подальших хемометричних досліджень. Розподіл вмісту

насичених та ненасичених жирних кислот у досліджених зразках наведено на рисунку 5.12 та у таблицях А.58 – А.61 (Додатки).

Кореневища і. сибірського виділяються серед українських ірисів високим вмістом насичених кислот. Вміст насичених жирних кислот у кореневищах видів переважає (від 15% до 53%), а в листях видів ірисів більша частка ненасичених (зокрема полієнових) за рахунок полієнових, це підтверджує значення коефіцієнта ненасиченості та індексу подвійних зв'язків (табл. 5.6). Серед  $\omega 9$  моноєнових кислот у кореневищах ірисів ідентифіковано олеїнову, пальмітоолеїнову та 10-октадеценову кислоти.

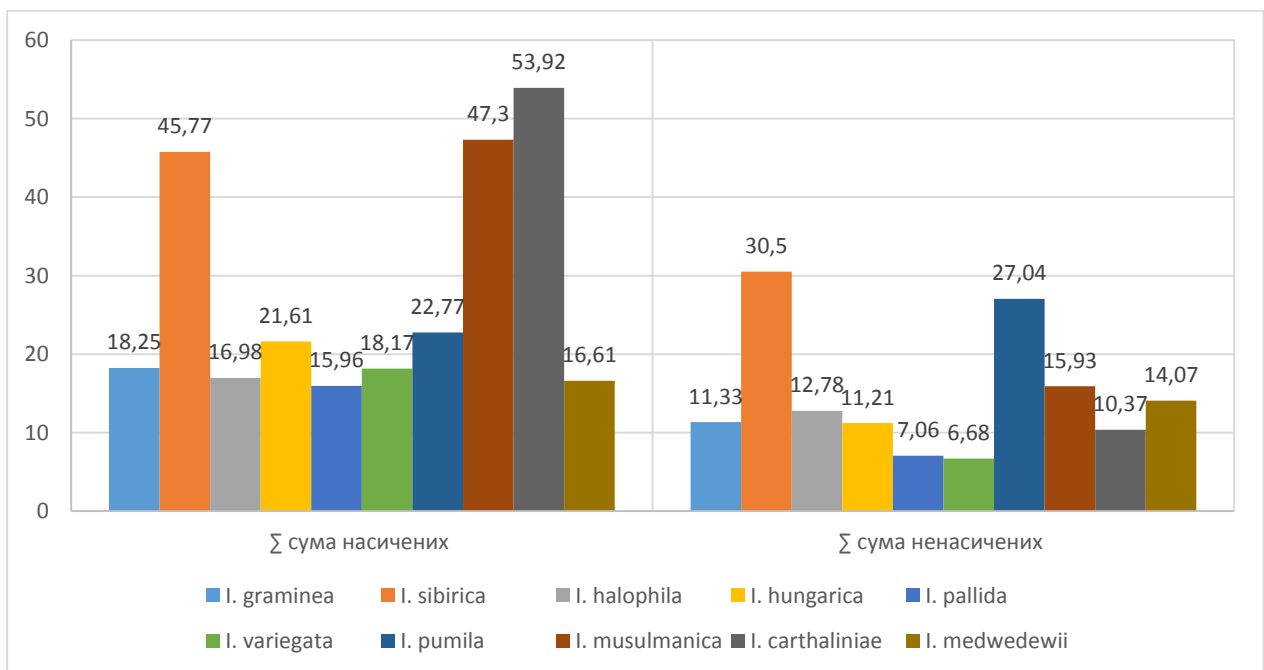


Рис. 5.12 Розподіл жирних кислот (% від загального вмісту карбонових кислот) між дослідженими кореневищами видів ірисів

Біосинтез дієнових і триєнових кислот  $18:2\omega 6$  і  $18:3\omega 3$ ,  $16:3\omega 3$  відіграє визначальну роль в адаптації рослин до гіпотермії. Саме ПНЖК регулюють «текучість» клітинних мембран, впливаючи на стійкість до несприятливих умов середовища. У стресових умовах (низькі температури, заморозки, тощо) кількість ненасичених кислот значно підвищує вміст насичених в органах рослин. З дієнових ЖК, в синтезі яких приймає участь  $\omega 6$  десатураза, аналогічно ідентифіковано лінолеву кислоту ( $C18:2\omega 6$ ), її вміст у кореневищах і.

сибірського та і. солелюбивого становив 18,92% та 5,83% відповідно, інші види ірисів мали нижчий вміст цієї кислоти. Триєнові кислоти в кореневищах представлені тільки  $\alpha$ -ліноленовою (C18:3 $\omega$ 3) кислотою в невеликій кількості (2,07 – 3,04%). У листі і. німецького (869,5 мг/кг), і. блідого (753,3 мг/кг), і. строкатого (250,3 мг/кг), і. угорського (1150,7 мг/кг) серед поліненасичених жирних кислот домінувала  $\alpha$ -лінолева кислота. У таблиці 5.6 наведено розподіл між насиченими та ненасиченими кислотами у сировині і. сібірського.

Таблиця 5.6

**Вміст жирних кислот (% від загального вмісту ЖК), індекси подвійних зв'язків, коефіцієнти ненасиченості, індекс, що відображає активність десатураз  $\omega$ 9 (SDR),  $\omega$ 6 (ODR),  $\omega$ 3 (LDR) у листі і кореневищах і. сібірського**

Показник жирних кислот (ЖК)	Індекс	Кореневища	Листя
Загальна кількість насичених ЖК	$\sum$ SFA	60,09	55,2
Загальна кількість ненасичених ЖК	$\sum$ UFA	40,01	44,82
Загальна кількість мононенасичених ЖК	$\sum$ MUFA	10,28	2,83
	$\sum\omega$ 9	10,28	2,83
Загальна кількість поліненасичених ЖК	$\sum$ PUFA	29,72	41,99
	$\sum\omega$ 3	2,07	23,07
	$\sum\omega$ 6	27,65	18,92
Індекс подвійних зв'язків	DBI	0,72	1,1
Стеароїл-КоА-десатураза	SDR	0,46	0,32
ODR-олеоїл-КоА-десатураза	ODR	0,84	0,96
Лінолеїл-КоА-десатураза	LDR	0,07	0,54
Коефіцієнт ненасиченості	K	0,67	0,81

Коефіцієнт ненасиченості (K) – характеризує зміну плинності мембран із за зміни співвідношення насичених і ненасичених ЖК в мембранних ліпідах. Збільшення K в листях і. сібірського забезпечувалося за рахунок збільшення долі ПНЖК, що дуже важливо для збереження мембран рідкокристалічного стану і підвищення стійкості листя до гіпотермії. У кореневищах K виявився нижче, ніж у листі, що пов'язано зі зниженням їх фізіологічної активності, а клітинні мембрани переходять у фазу гелю і практично не функціонують. Доля C20 – 24 ЖК в кореневищах видів ірисів складала 4 – 7%, в листях – від 4 до 10%.

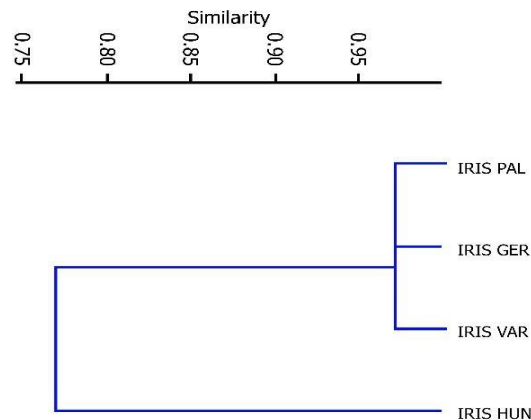
Це підтверджує, що різні види ірисів адаптувалися до умов нашої широти.

Найбільш повний ступінь ненасиченості ліпідів характеризує індекс подвійних зав'язків (DBI) [443]. Як видно на прикладі і. сибірського (табл. 5.6), DBI у листі вище (1,10), ніж у кореневищ (0,72), що обумовлено механізмами адаптації листа до дії негативних температур з настанням осінньо-зимового періоду. При зниженні температури відбувається зменшення плинності мембран і, як наслідок, посилення синтезу ферментів, десатураз в клітині і підвищення кількості ПНЖК [444]. Активність десатураз є визначальною в адаптації рослин до низьких температур. Для і. сибірського активність стериол- (SDR), олеїл- (ODR) і лінолеїл- (LDR) десатураз виявлялася різною. Значення  $\omega^9$  десатурази (SDR) менше, можливо, це пов'язано з тим, що в кореневищах зміст коротколанцюгових ЖК вище, а вони здатні підтримувати плинність мембрани на необхідному рівні, т.ч. реакція підземних органів на адаптацію проходить швидше. Значення ODR для листа є високим – 0,96, що свідчить про те, що олеїнова кислота активно перетворює ацил-ліпідну  $\omega^6$ -десатуразу в лінолеву кислоту. У той же час реакція  $\omega^3$  десатурази (LDR), яка обумовлює введення третьої подвійної зв'язку різна: у кореневища всього лише 0,07, в той час як у листя це значення становить 0,54, за рахунок прояву гексадекатрієнової кислоти і підвищення вмісту  $\alpha$ -ліноленової кислоти. При адаптації листа ірису до похолодання основна роль належить  $\omega^3$  десатуразі, оскільки підвищення її активності призводить до перетворення лінолевої кислоти на ліноленову. Адаптація кореневищ досягається за рахунок збільшення активності  $\omega^6$  десатурази, відповідальної за біосинтез лінолевої кислоти, і в меншій мірі –  $\omega^3$  десатурази [443]. Подібна картина встановлена для переважної більшості ірисів з України. Дані якісного складу та кількісного вмісту вищих карбонових кислот для видів ірисів наведено у таблицях А.58 – А.61 (Додатки).

Для листя видів ірисів більш значущим виявився аналіз нижчих карбонових кислот. Для листя і. угорського, і. німецького, і. блідого, і. строкатого вміст таких кислот, такі 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. Серед фенольних кислот найпоширенішими були ферулова, *p*-кумарова та ванілінова кислоти.

За наявністю чи відсутністю досліджуваних карбонових кислот досліджувані види поділяються на дві групи. Першу групу складають три види і. німецького, і. блідого, і. строкатого (індекс подібності Брея-Кертіса 0,97 або 97%). Всі ці види мають майже однаковий склад карбонових кислот. Лише три карбонові кислоти відрізняють ці види: глутарова (виявлена лише в і. блідому), церотинова (виявлена в і. німецькому) і капронова (виявлена в і. блідому та і. строкатому). За наявністю карбонових кислот і. угорський відрізняється від інших трьох досліджених видів більш суттєво (індекс подібності Брея-Кертіса від 0,76 до 0,79) (рис. 5.12). Вісім карбонових кислот, ідентифікованих у всіх інших досліджених видах, не були знайдені у і. угорському, а шість карбонових кислот, визначених у цьому виді, були відсутні у і. німецькому, і. блідому, і. строкатому (табл. А.59, А.61, Додатки).



IRIS PAL – і. блідий, IRIS GER – і. німецький, IRIS VAR – і. строкатий, IRIS HUN – і. угорський

Рис. 5.12 Дендрограма листя видів ірисів, досліджених за наявністю карбонових кислот (парна група, відстань Брея-Кертіса)

Висока подібність складу карбонових кислот у і. німецького, і. блідого та і. строкатого підтверджує близьке споріднення цих видів. І. німецький розглядається як природний гібрид між і. блідим та і. строкатим, таким чином, він успадкував певні морфологічні та біологічні особливості від обох родинних видів [445]. Склад карбонових кислот у і. угорському більше відрізняється від інших

досліджених видів, що можна пояснити більш віддаленою філогенетичною спорідненістю між ними. Отримані дані хімічного складу, можуть бути основою для розробки харчових добавок та лікарських засобів на основі листя ірисів.

#### 5.4 Дослідження складу терпеноїдів у видів ірисів методом ГХ-МС

Методом ГХ/МС у кореневищах та листі 27 видів та сортів рослин роду Ірис досліджено компонентний склад летких сполук, вміст основних компонентів відрізнявся в залежності від виду та типу сировини. Одержані результати профілю маркерних компонентів ефірної олії різних видів та сортів ірисів описано у власних публікаціях [446 – 451] та наведено у таблиці табл. 5.7, а також у таблицях А.62 – А.64 (Додатки). Як зразок для аналізу даних наведено результати та обговорення для кореневищ і. блідого, який традиційно вирощують для одержання ефірної олії у Італії та Франції, у порівнянні з іншими видами.

Загальний вихід ефірної олії ірисів становить від 0,02% у і. блідого до 0,60% та 0,58% у кореневищ і. карталінського та і. молочно-блідого відповідно. Але незважаючи на досить великий вихід олії у останнього, компонентний склад олії і. молочно-білого є бідним та навіть не містить маркерної речовини  $\alpha$ -ірону, який є індикатором справжності олії ірисів. Домінуючою сполукою ефірної олії кореневищ і. блідого та і. угорського є  $\alpha$ -ірон (2,85 % та 2,76%), кореневища і. різнокольорового містять менше  $\alpha$ -ірону, а саме 0,12%. Вміст  $\alpha$ -ірону та  $\gamma$ -ірону прийнято як найважливіший критерій комерційної якості ефірної олії ірису. Більшість компонентів складу ефірної олії кореневищ і. блідого: жирні кислоти (89%), алкани (8,29%), ароматичні сполуки (1,36%), сесквітерпени (4,53%), тритерпени (0,69%); монотерпенів і дитерпенів не виявлено (табл. А.63, Додатки). Основними насиченими аліфатичними монокарбоновими кислотами були каприлова (1,72 %), капринова (14,50 %), лауринова (15,42 %), тридеканова (0,21 %), пальмітинова (1,13 %) і міристинова (56 %) кислоти.



Таблиця 5.7

## Компоненти-маркери (%) ефірної олії кореневищ ірисів, ГХ-МС метод

	<i>I. lactea</i>	<i>I. versicolor</i>	<i>I. pumila</i>	<i>I. × pallida</i>	<i>I. variegata</i>	<i>I. hungarica</i>	<i>I. Carthaginiensis</i>	<i>I. medwedewii</i>
$\beta$ -Іонон	-	0,48	0,20	-	0,15	-	0,04	-
$\alpha$ -Ірон	-	0,12	-	2,75	-	2,76	0,04	0,01
<i>транс</i> -2,6- $\gamma$ -ірон	-	0,08	0,06	1,22	-	0,76	0,1	0,01
Псевдоіонон	-	1,71	-	-	-	-	-	-
Міристинова кислота	5,95	16,11	38,54	56	5,55	42,79	28,80	9,2
Метил меристат	0,12	0,12	0,71	0,17	0,17	0,06	0,97	-
Лауринова кислота	0,63	46,66	9,17	15,42	0,70	27,86	1,22	1,2
Пальмітинова кислота	21,84	2,45	8,77	1,13	18,04	4,98	8,51	25,6
Сквален	29,29	2,01	8,38	0,69	42,58	0,96	15,58	27,6
Вихід олії	0,58	0,28	0,48	0,03	0,47	0,21	0,20	0,60
Ідентифіковані речовини	36	51	44	18	38	22	42	40

Примітка. – речовина відсутня.

Тритерпеноїди у всіх видах ірисів були представлені лише скваленом (вміст від 0,6% до 29,29%). Найрізноманітніший склад нортерпеноїдів виявлено в олії кореневищ і. білого.  $\alpha$ -Дигідро- $\beta$ -ірон (0,25%), *транс*-2,6- $\gamma$ -ірон (1,22%) та  $\beta$ -ізометиліонон (0,21%) ідентифіковані лише в кореневищах. Наявність іронів та іононів визначає характерний запах фіалки у кореневищ ірисів.

Компонентами ефірної олії листя ірисів переважно є тритерпеноїди ефірної олії, жирні кислоти, їх естери, аліфатичні вуглеводні та їх похідні. Серед зразків листя і. німецького, і. різнокольорового, і. злаколистого, і. солелюбивого найбільший вміст маркерних речовин  $\alpha$ -ірона та *транс*-2,6- $\gamma$ -ірона встановлено в ефірній олії листя і. злаколистого 2,71 % та 1,00 %, відповідно. Виявлено такі сполуки, як  $\beta$ -дамасценон (1,11% та 0,50% у і. різнокольоровому та і. німецькому, відповідно), фітол (виявлено лише у і. різнокольоровому, 22,40%), сквален (у всіх

видів 5–30%). Домінуючими терпенами в ефірній олії листя і. блідого [446] були сквален (6%), гексагідрофарнезилацетон (8%) і неофітадієн (до 6%). Аналогічні дані по розподілу речовин було отримано для інших видів та сортів ірисів: головними компонентами у всіх зразках ірисів були ірони,  $\beta$ -іонон-5,6-епоксид; вперше у рослинах роду Ірис виявлено  $\beta$ -дамасценон і сквален.

Слід зазначити, що такі кореневища наступних видів ірисів, як *I. musulmanica*, *I. virginica*, *I. notha*, *I. halophila* (рис. А. 61, Додатки), *I. hybrida* *Stocholm* за вмістом маркерних сполук ( $\beta$ -іонон,  $\alpha$ -ірон, *транс*-2,6- $\gamma$ -ірон) ефірної олії ірисів (табл. А.64, Додатки) навіть переважають показники для ефірної олії кореневищ і. флорентійського та і. блідого, але в Україні сировинна база даних видів та сортів ірисів, обмежена БС. Враховуючи гарні показники компонентів ефірної олії ірисів, що заговлені у центральній Україні (М. Київ), у подальшому слід звернути увагу на центральні регіони країни для масового культивування ірисів як ефіроолійної сировини. Вцілому результати аналізу терпеноїдного складу ірисів України показує подальшу перспективність дослідження та використання сировини, як джерела регенеративних, омоложуючих, антиоксидантних (сквален), протизапальних ( $\beta$ -дамасценон), анксиолітичних та протисудомних (неофітадієн) речовин та екстрактів.

### 5.5 Одержання екстрактів з видів ірисів та дослідження їх хімічного профілю

За результатами попередніх досліджень хімічного складу кореневищ ірисів, було встановлено, що найбільшу загальну кількість фенольних сполук виявили і. угорський, і. строкатий та і. сибірський, тому саме ці види ірисів було обрано для одержання сухих екстрактів, хімічного скринінгу екстрактів та проведення фармакологічного скринінгу активності

Нами було заплановано дослідження фармакологічної активності як неочищених екстрактів з ірисів, так і їх індивідуальних компонентів. Як і у випадку з підбором екстрагента для сировини к. посівного, для рослин роду ірис

також було обрано воду та етанол у якості розчинників, що вилучають різні групи БАР. Розроблено технологічні параметри одержання суми БАР у вигляді сухих екстрактів з кореневищ і. угорського [442, 452], і. строкатого [432], і. сибірського [277], сортів ірисів [442]. Оптимальними розчинниками для вилучення БАР є вода очищена та етанол (70%). Оптимальне співвідношення між сировиною і екстрагентом – 1:10. Однак, на відміну від екстрактів і угорського, що раніше були одержані нами разом з Кречун А.В. [442], було вдосконалено методику одержання екстрактів за рахунок використання рідкого азоту для поліпшення подрібнення сировини, застосовано екстракцію при нагрівання на УЗ-бані з наступною ліофілізацією екстрактів для м'якого висушування. Використання такої технології одержання екстрактів із кореневищ та листя видів ірисів дозволили вилучити більше компонентів, що підтверджено методом ВЕРХ. Для всіх екстрактів (водних та етанольних) нами встановлено хімічний профіль.

*Фенольні сполуки сухих екстрактів кореневищ ірисів.* У досліджуваних екстрактах ірисів ідентифіковано від 8 до 14 фенольних сполук (рис. А.64, Додатки). Кількість відповідних сполук коливалася від 0,01 мг/г (у перерахунку на суху сировину) у і. строкатому до 9,78 мг/г у водному екстракті і. угорського. Основними компонентами екстрактів кореневищ були іристекторигенін В, іригенін, нігрицин та його глюкозид, мангіферин. Домінуючими компонентами є мангіферин (0,63 – 7,34 мг/г), кікалідон (до 24,20 мг/г), іригенін (до 35,04 мг/г), ірисолідон (до 25,70 мг/г) та германаїзм В (до 94,76 мг/г) у етанольному екстракті кореневищ і. угорського вдосконаленим методом одержання сухих екстрактів. Рівень накопичення іригеніну та мангіферину був найвищим у водному екстракті кореневищ і. угорського (9,86 та 7,34 мг/г відповідно). Низькі кількості нігрицину виявлені в і. строкатому 0,004 мг/г та у і. сибірського 0,02 мг/г. За кількісним вмістом компонентів переважав етанольний екстракт кореневищ і. угорського, натомість водний екстракт мав більш різноманітний склад.

*Фенольні сполуки сухих екстрактів листя ірисів.* Для листя і. угорського було одержано водний, етанольний екстракти та полісахаридний комплекс для фармакологічних досліджень (табл. 5.8).

Таблиця 5.8

## Хімічний склад сухих екстрактів (мг/г) і. угорського, і. строкатого та і. сибірського (метод ВЕРХ)

Речовина	І. угорський, кореневища		І. угорський, листя		І. строкатий, кореневища	І. сибірський, кореневища
	Вода	70% етанол	Вода	70% етанол	Вода	Вода
Галова кислота	3,84 ± 0,12	5,73 ± 0,05	-	-	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,01
Хлорогенова кислота	0,78 ± 0,01	- <sup>1</sup>	1,24 ± 0,05	0,38 ± 0,03	-	-
Кумарова кислота	-	-	-	0,06 ± 0,01	-	-
Ферулова кислота	-	-	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,01	-	-
t-Корична кислота	0,27 ± 0,01	0,94 ± 0,02	-	-	-	-
Кофейна кислота	0,85 ± 0,02	4,98 ± 0,05	-	-	-	0,55 ± 0,01
Мангіферин	7,34 ± 0,04	3,85 ± 0,03	0,80 ± 0,01	5,75 ± 0,02	0,63 ± 0,01	0,84 ± 0,02
Германаїзм В	2,27 ± 0,03	94,76 ± 0,45	-	-	0,12 ± 0,002	-
Кікалідон	2,83 ± 0,01	24,20 ± 0,20	0,05 ± 0,001	-	7,51 ± 0,002	1,06 ± 0,03
Іристекторигенін В	4,34 ± 0,01	9,25 ± 0,05	-	-	-	-
Нігрицин	5,94 ± 0,04	-	0,60 ± 0,004	0,02 ± 0,00	0,004 ± 0,000	0,02 ± 0,000
Іригенін	9,86 ± 0,09	35,04 ± 0,26	-	5,75 ± 0,03	-	2,03 ± 0,02
5,6-Дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізоплавон	1,06 ± 0,01	5,04 ± 0,03	-	-	-	-
Ірисолідон	3,67 ± 0,02	25,70 ± 0,25	0,06 ± 0,00	-	0,44 ± 0,003	-
Геністеїн-7-глюкозид	4,32 ± 0,13	35,44 ± 0,33	0,08 ± 0,00	-	0,53 ± 0,01	0,42 ± 0,01
Біоханін А	3,11 ± 0,03	22,05 ± 0,21	0,04 ± 0,03	0,10 ± 0,02	-	-
6,7-Дигідроксиізоплавон	-	-	0,03 ± 0,02	0,18 ± 0,02	-	-
Апігенін	-	-	0,07 ± 0,01	-	-	-
Астрагалін	7,92 ± 0,16	-	-	-	-	-
Гіперозид	0,33 ± 0,01	-	-	-	-	-
Ізокверцитрин	-	1,28 ± 0,02	-	-	-	-
Кемпферол	-	-	-	-	0,01 ± 0,00	-
Ізоорієнтин	-	-	5,22 ± 0,12	-	-	-

Примітка. 1 – речовину не виявлено.

Водний екстракт листя і. угорського має невисокий вміст компонентів, порівняно зі етанольним, але у водному екстракті листя ірису встановлено високий вміст ізоорієнтину (5,25 мг/г). Етанольний екстракт мав вищий вміст як мангіферину (5,75%), іригеніну (5,75%), так і інших сполук (табл. 5.8).

*Амінокислоти.* У кореневищах водних екстрактів і. угорського та і. строкатого методом ГХ-МС було ідентифіковано піроглутамінову кислоту (1,34 мг/г та 0,78 мг/г відповідно), а також в екстракті кореневищ і. строкатого виявлено аланін, валін, ізолейцин, пролін, серин, аспарагінову кислоту [343]. Повні дані аналізу наведено у таблиці А.46 (Додатки).

*Карбонові кислоти.* Профіль карбонових кислота та амінокислот у сухих водних екстрактах кореневищ і. угорського та і. строкатого наведено у таблиці А.65 (Додатки). Відмічено високий вміст для яблучної кислоти (15,89%), 2-піролідон-5-карбонової кислоти (10,37%) та молочної кислоти (5,34%) у екстракті і. угорського, а також L-піроглутамінової кислоти (21,85%) та лимонної кислоти (5,65%) у екстракті кореневищ і. строкатого.

Таким чином, за результатом комплексного дослідження БАР екстрактів нами було надано перевагу водному екстракту і. угорського для подальших фармакологічних досліджень. Але у деякі дослідження включали також спиртові екстракти та екстракти ірису строкатого для порівняння.

## 5.6. Обговорення результатів фармакологічного скринінгу екстрактів ірисів

### 5.6.1 Антиоксидантна дія

Активність поглинання радикалів, яка була виражена як еквівалентна антиоксидантна здатність Trolox (TEAC, тролокс мкмоль/г), була різною для водних і етанолових екстрактів ірисів (табл. 5.9). Серед досліджуваних екстрактів ірисів, найвищу загальну антиоксидантну здатність проявили етанольний та водний екстракти листя і. угорського (TEAC 279,42 та 129,66 мкмоль/г відповідно).

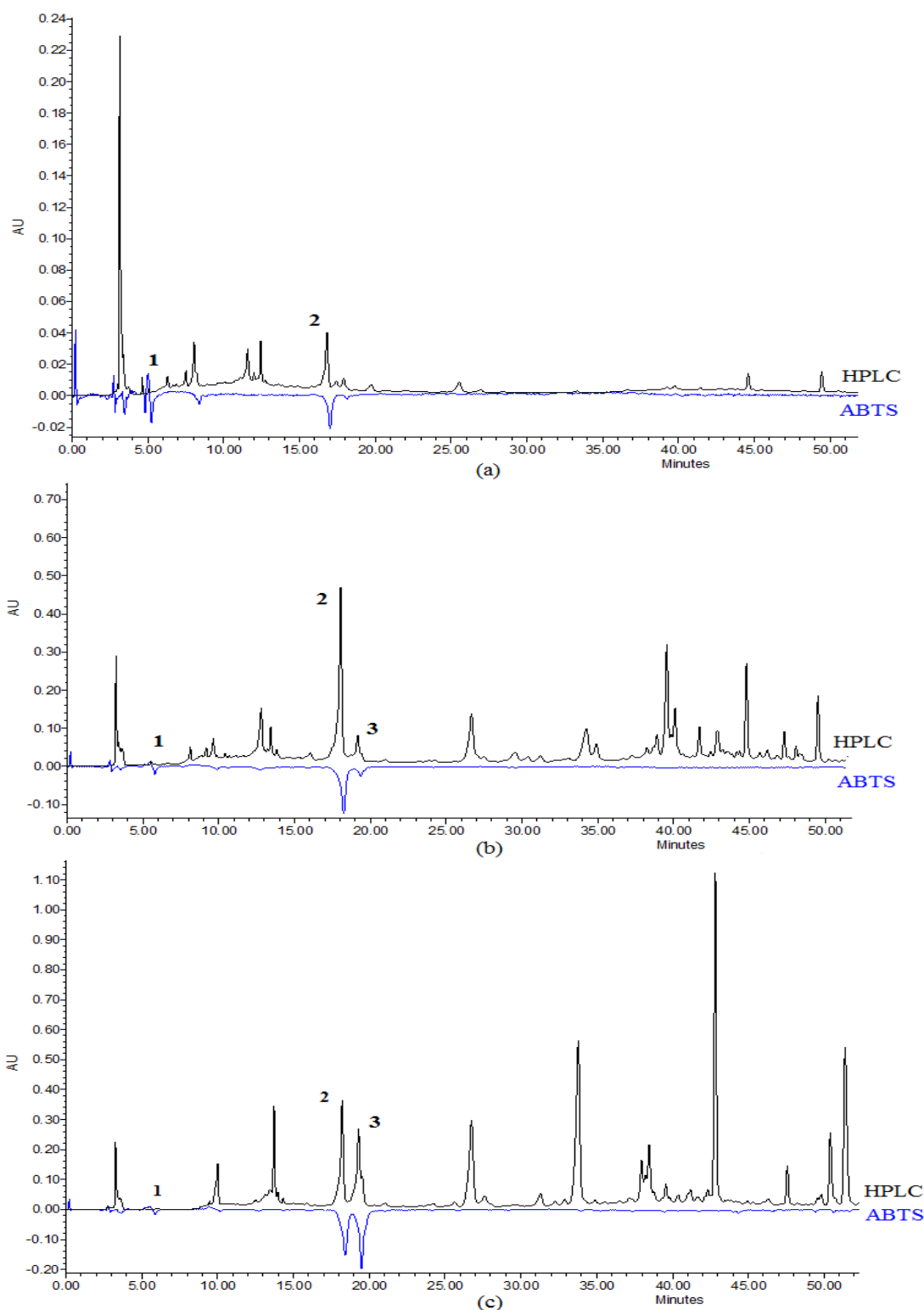
Високий вміст мангіферину разом з хлорогеновою кислотою в етанольному екстракті пояснюють більш виражений антиоксидантний ефект етанольного екстракту порівняно з водним. Антиоксидантна активність водного екстракту і. строкатого була найнижчою (ТЕАС  $2,92 \pm 0,07$  мкмоль/г) (рис. 5.13а). З іншого боку, кореневища і. угорського продемонстрували потужну антиоксидантну здатність водного екстракту (ТЕАС  $23,11 \pm 0,90$  мкмоль/г) (рис. 5.13b), а етаноловий – мав найвищу загальну антиоксидантну здатність (ТЕАС  $50,32 \pm 1,09$  мкмоль/г) серед кореневищ ірисів (рис. 5.13с). Вищій вміст мангіферину в кореневищах і. угорського разом з галовою кислотою в етанольному екстракті пояснюють більшу антиоксидантну здатність етанольного екстракту порівняно з водними.

Таблиця 5.9

**Антирадикальна активність сполук екстрактів і. строкатого та і. угорського (ВЕРХ/АВТС, еквівалент тролоксу ммоль/г)**

Речовина	Rt	І. строкатий	І. угорський			
		Кореневища	Кореневища		Листя	
		вода	вода	Етанол (70%)	Вода	Етанол (70%)
Галова кислота	5.78	$0,52 \pm 0,01$	$2,83 \pm 0,14$	$3,13 \pm 0,14$	-	-
Мангіферин	12,68	$2,40 \pm 0,06$	$18,01 \pm 0,87$	$20,55 \pm 1,01$	$11,95 \pm 0,75$	$268,87 \pm 4,73$
Кофейна кислота	15.80	- <sup>1</sup>	$2,27 \pm 0,10$	$26,64 \pm 1,28$	-	-
Ізоорієнтин	18.54	-	-	-	$112,73 \pm 1,97$	-
Хлорогенова кислота	23.83	-	-	-	$4,98 \pm 0,09$	$10,55 \pm 0,19$
Загальна активність		$2,92 \pm 0,07$	$23,11 \pm 0,90$	$50,32 \pm 1,09$	$129,66 \pm 2,30$	$279,42 \pm 4,91$

Примітка. <sup>1</sup> - Речовину не виявлено.



Галова кислота (1), мангіферин (2) і кофейна кислота (3)

Рис. 5.13 Хроматограми ВЕРХ-АВТС (а) кореневищ і. строкатого (водний) при 247 нм (HPLC, чорний) і 650 нм (АВТС, синій); (б) екстракт кореневищ і. угорського (водний) при 255 нм/650 нм і (с) екстракт кореневищ і. угорського (70% етанол) при 314 нм/650 нм

Наступним було визначення антиоксидантної здатності, вираженої як активність NRF2. Два методи дають більшу інформацію про антиоксидантну здатність речовин та їхній потенціал пом'якшувати пошкодження, пов'язані з окислювальним стресом. Зв'язок між ними полягає в їхній ролі в оцінці клітинних механізмів антиоксидантного захисту та прямого видалення активних форм кисню, що в кінцевому підсумку сприяє підтримці клітинного гомеостазу та захисту від окисного пошкодження. Фактор 2, пов'язаний з ядерним фактором еритроїдного походження 2, є ядерним транскрипційним фактором, який зазвичай активується у відповідь на активні форми кисню.

NRF2 підвищує антиоксидантну здатність усіх клітин у відповідь на стрес, тому його активація корисна для здоров'я. Відомо також, що рівень NRF2 вказує на антиоксидантну здатність клітин і його підвищення пов'язане з посиленою здатністю поглинати радикали [453]. Активність NRF2 оцінювали в лінії нормальних клітин шкіри НасаТ. Кореневища і угорського показали легкий ефект посилення активності NRF2 на 72,7% у нормальних клітинах шкіри, що вказує на цитопротекторні ефекти (табл. 5.10), однак ефект не корелює з вмістом фенолів, але корелює з даними BEPX/ABTS.

### 5.6.2 Активність утворення ліпідів

Неалкогольна жирова хвороба печінки є поширеним захворюванням печінки, спричиненим переважно ожирінням і метаболічним синдромом [274]. Крапельки ліпідів є внутрішньоклітинними органелами для накопичення жиру, які містяться в більшості клітин і є важливими для всіх організмів. Порушення регуляції накопичення ліпідів у клітинах призводить до багатьох розладів здоров'я, включаючи неалкогольний стеатогепатит (ожиріння печінки), ожиріння, діабет 2 типу та навіть сприяє зараженню вірусом гепатиту типу С [454]. Утворення крапель ліпідів відіграє важливу роль не лише в жировій дистрофії печінки, але й у процесі атеросклерозу, де триаксин С, довголанцюговий інгібітор жирної ацил-КоА-синтетази, продемонстрував сильний вплив [455]. Згідно з



нашими результатами, водний екстракт кореневищ і. угорського продемонстрував 35,1% інгібуючий ефект на ліпідні краплі в клітинах печінки Huh7 (табл. 5.10), тобто помірний вплив.

Таблиця 5.10

**Антиоксидантна здатність, виражена як активність NRF2 і активність ліпідних крапель екстрактів кореневищ ірисів**

Зразок	Відносна активність NRF2 <sup>a</sup> в клітинах HacaT <sup>b</sup>	Relative NRF2 activity <sup>a</sup> in Huh7 cells <sup>c</sup>	Активність інгібування ліпідних крапель <sup>c</sup>
I. строкатий кореневища (H <sub>2</sub> O)	172,7	180,3	95,1 ± 11,6
I. угорський кореневища (H <sub>2</sub> O)	119,9	98,3	64,9 ± 8,1
I. угорський кореневища (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	130,8	159,2	101,5 ± 6,8
I. угорський листя (H <sub>2</sub> O)	87,8	104,2	87,9±14,4
I. угорський листя (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	145,7	108,3	93,2±18,7
Лютеолін <sup>g</sup>	684,3±53,3	-	-
Зенамівір <sup>h</sup>		23,8±0,3	-
ТС <sup>i</sup>	-	-	16,3±0,2

Примітка. <sup>a</sup>Відносна активність люциферази була розрахована шляхом нормалізації активності люциферази до життєздатності клітин і представлена як кратність до контролю розчинника. <sup>b</sup>HacaT, нормальна лінія клітин шкіри. Концентрація препарату становила 100 мкг/мл, ТВНҚ. 2-(1,1- диметилетил)-1,4-бензондіол (10 мкМ), використовувався як позитивний контроль для активації NRF2 і показав 684,3 ± 37,7% активності NRF2. <sup>c</sup>Кількість крапель ліпідів, середня кількість крапель ліпідів/клітин олеїнової кислоти використовували як стандарт, що представляє 100% ліпідного навантаження в лінії клітин печінки Huh7, % середнє ± S.E.M. Triacsin C (1 мкМ), інгібітор довголанцюгової ацил-КоА-синтетази, використовувався як позитивний контроль і показав 16,3 ± 0,1% ліпідоутворення.

### 5.6.3 Протиалергійна дія

Оцінка протиалергійної активності екстрактів проводили шляхом інгібування дегрануляції клітин RBL-2H3. Захворюваність на алергічні захворювання різко зростає, і велике значення набуває пошук нових ліків із природних джерел. Ми використовували аналіз дегрануляції для оцінки протиалергійної дії екстрактів видів ірисів. Щоб перевірити ефекти зразків, які могли бути викликані інгібуванням життєздатності клітин, усі зразки були оцінені

на токсичність щодо RBL-2H3 (клітини базофільного лейкозу щурів) за допомогою аналізу життєздатності МТТ. Зразки виявилися нетоксичними (життєздатність була понад 96% порівняно з контролем) при 100 мкг/мл (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

### Протиалергійна активність екстрактів видів ірисів

Зразок	% Життєздатність, RBL-2H3 <sup>a</sup>	% Інгібування дегрануляції, викликаного A23187 <sup>b</sup>		% Інгібування антиген-індукованої дегрануляції <sup>b</sup>	
	100 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
I. строкатий кореневища (H <sub>2</sub> O)	96,3 ± 0,7	16,7 ± 7,2*	36,0 ± 11,4**	10,7 ± 7,0	27,0 ± 9,6*
Ірис угорський					
кореневища (H <sub>2</sub> O)	96,7 ± 1,7	8,7 ± 7,8	0,7 ± 1,2	4,0 ± 6,9	12,7 ± 3,5
кореневища (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	96,3 ± 1,9	3,3 ± 3,1	4,3 ± 5,9	4,7 ± 8,1	38,7 ± 18,0***
листя (H <sub>2</sub> O)	96,0 ± 4,6	4,7 ± 4,5	5,3 ± 6,8	0,3 ± 0,6	12,0 ± 7,5
листя (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	97,7 ± 2,5	1,3 ± 1,5	16,3 ± 3,1*	10,3 ± 6,7	12,0 ± 10,8

Примітка. <sup>a</sup>Цитотоксичність зразків для RBL-2H3 оцінювали за допомогою аналізу життєздатності МТТ. Результати представлені як середнє значення ± S.E.M (n = 3) порівняно з необробленим контролем (DMSO). Розглядалися зразки з життєздатністю вище 85%, нетоксичний щодо клітин RBL-2H3, <sup>b</sup>Інгібування дегрануляції оцінювали за індукованим A23187 та антигеном вивільнення β-гексозамінідази в клітинах RBL-2H3. Результати представлені як середнє ± S.E.M. (n = 3); \* p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 (Prism, ANOVA, тест Данета) порівняно з контрольним значенням (A23187 або лише антиген), дексаметазон (10 нМ) використовувався як позитивний контроль та інгібував 65,7 ± 5,4% \*\*\* індуковану A23187 та 66,3 ± 4,8% \*\*\* індуковану антигеном дегрануляцію.

Потім зразки оцінювали на антиалергічну активність за допомогою аналізу дегрануляції (аналіз виявлення вивільнення β-гексозамінідази), індукованого іонофором кальцію (A23187) або антигеном (анти-DNP IgE плюс DNP-BSA). Іонофор кальцію служить прямим активатором, сприяючи надходженню кальцію в клітину, тоді як антиген імітує фізіологічні умови зв'язування комплексу IgE-антиген з рецептором FcεRI на мембрані тучних клітин [456]. Результати показали, що водний екстракт кореневищ і. строкатого (100 мкг/мл) інгібував дегрануляцію

тучних клітин, стимульовану A23187 або антигеном, на 38,3% і 27,0% відповідно, а етанольний екстракт кореневищ і. угорського (100 мкг/мл) 22,0% і 46,7% відповідно. Дексаметазон, позитивний контроль, інгібував вивільнення  $\beta$ -гексозамінідази, індуковане A23187 або антигеном, на 65,7% і 66,3% відповідно.

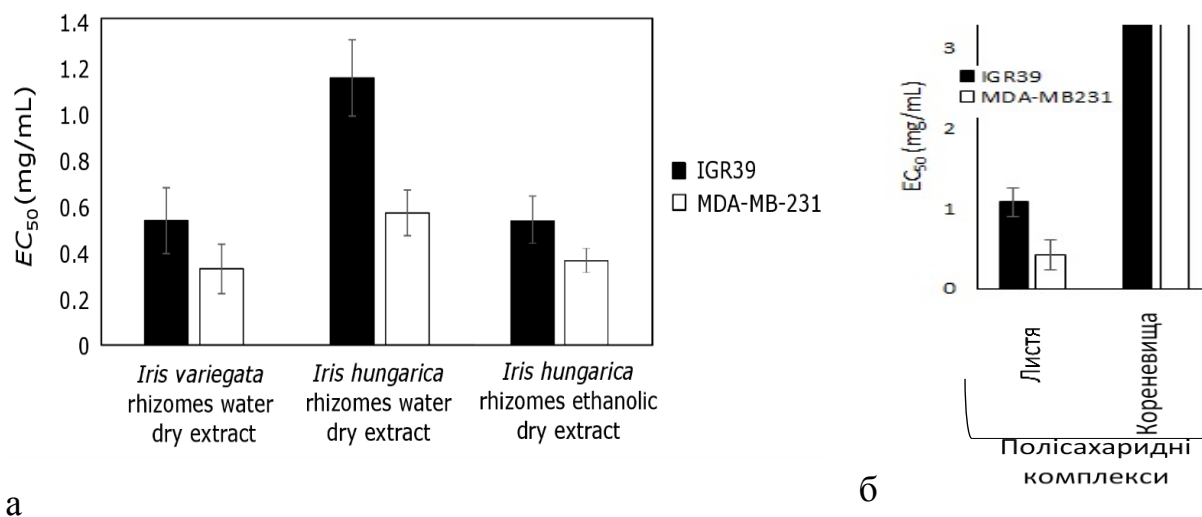
Водний екстракт листя і. угорського (100 мкг/мл) інгібував дегрануляцію тучних клітин, стимульовану A23187 або антигеном, на 5,3% і 12,0%, що свідчить про дуже слабку антиалергічну активність.

#### 5.6.4 Антибактеріальна дія

У дисертаційній роботі Кречун А.В. [442] та у сумісних публікаціях [434, 277] наводяться результати антибактеріальної дії тільки для водних (з концентрацією 1%) екстрактів кореневищ та листя і. угорського. Враховуючи перспективні отримані дані дії по відношенню до шести тест-штамів мікроорганізмів, дослідження було розширено та одержано спиртові екстракти з кореневищ та листя і. угорського, а також водний екстракт кореневищ і. строкатого та водні і спиртові екстракти листя та кореневищ і. сибірського (табл. А.26-А.27, Додатки). Найбільш виражену антибактеріальну активність проявили спиртовий екстракт кореневищ і. угорського та спиртовий екстракт листя і. сибірського по відношенню до *B. subtilis*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *C. albicans* (діаметри затримки зросту склали більше 19 мм). Екстракти кореневищ і. строкатого та і. сибірського були більш чутливі до грампозитивних бактерій *St. aureus*, *B. subtilis* та *C. albicans* (діаметр затримки зросту становив 16,0 – 20,3 мм). Екстракти кореневищ та листя видів ірисів проявили бактеріостатичну дію по відношенню до широкого кола тест штамів мікроорганізмів, а також грибів рода *Candida*. МПК для *B. subtilis* в середньому для екстрактів складала 125 – 250 мкг/мл, *S. aureus* – 250 мкг/мл, для *E. coli* – 500 мкг/мл. Таким чином, слід продовжити дослідження для спиртового екстракту листя і. сибірського, який був найбільш активним особливо по відношенню до грам-позитивних бактерій *B. subtilis* (МПК 125 мкг/мл, діаметр затримки зросту становить 20,30 мм).

### 5.6.5 Цитотоксична дія

Водні екстракти кореневищ і. строкатого та і. угорського знижували життєздатність меланоми (IGR39) ( $IC_{50}$  0,53 та 1,15 мг/мл, відповідно) та потрійного негативного раку молочної залози (MDA-MB-231) ( $IC_{50}$  0,33 та 0,57 мг/мл, відповідно) клітинних ліній (рис. 5.14).



(а): *I. variegata* water dry extract – водний екстракт і. строкатого; *I. hungarica* water dry extract – водний екстракт і. угорського; *I. hungarica* ethanolic dry extract – етанольний екстракт і. угорського. (б) полісахаридні комплекси і. угорського. Значення  $EC_{50}$  для досліджуваних екстрактів ірисів та цитотоксична активність проти клітинних ліній MDA-MB-231 і IGR39 через 72 год (\* $p < 0,05$ ,  $n = 3$ )

Рис. 5.14 Цитотоксичний ефект досліджуваних екстрактів кореневищ і. строкатого та і. угорського проти ліній клітин IGR39 і MDA-MB-231

Етанольний екстракт кореневищ і. угорського продемонстрував співставну ефективність з водним екстрактом і. строкатого. Усі екстракти продемонстрували меншу активність проти клітин меланоми. Тричі негативні клітини раку молочної залози виявилися в 1,5–2 рази чутливішими до досліджуваних екстрактів. Це є важливим, оскільки саме ці клітини не мають рецепторів до естрогену, прогестерону та рецепторів HER-2 і зазвичай характеризуються більш агресивною природою порівняно з іншими лініями ракових клітин [394]. Порівнюючи цитотоксичний ефект обох екстрактів кореневищ і. угорського, етанольний екстракт був більш ефективним як проти клітин меланоми (IGR39), так і проти клітин потрійного негативного раку молочної залози (MDA-MB-231).

Цитотоксична дія полісахаридного комплексу листя і. угорського до лінії клітин меланоми (IGR39) та потрійно негативного раку молочної залози (MDA-MB-231, хоча і була більш вираженою, ніж дія екстракту кореневищ ірису (рис. 5.146), але вона значно поступалась цитотоксичній дії з екстрактів к. посівного.

#### 5.6.6 Противірусна дія

Етанольний екстракт кореневищ і. угорського показав виражену захисну дію щодо ентеровірусу D68 від 40% до 55% (токсичність 50%), вірогідно за рахунок глікозидів – кікалідону, германаїзм В та ононіну (табл. А.28, Додатки). Водний екстракт кореневищ і. угорського (при концентрації 500 мкг/мл) показав 80% захисний ефект (токсичність 20%) зі значенням  $EC_{50}$  125 мкг/мл, що свідчить про значний протигрипозний ефект. Екстракт містив переважно аглікони флавоноїдів та ізофлавоноїдів. Водний екстракт кореневищ і. строкатого (500 мкг/мл) показав захисний ефект проти ентеровірусу D68 30% (близько 20% токсичності), етанольний екстракт кореневищ і. угорського мав захисну дію від 40% до 55% (близько 50% токсичності).

Коронавірус людини 229Е (HCoV-229Е) є штамом сімейства вірусів коронавірусу, який викликає синдром верхніх дихальних шляхів [457]. Під час перевірки на антикоронавірусну активність екстракти і. угорського та і. строкатого не показали жодних захисних ефектів проти інфекції коронавірусу людини 229Е (HCoV-229Е) при 10 мкг/мл (рис. А.62, Додатки).

Серед екстрактів листя і. угорського, етанольний екстракт проявив помірну противірусну дію по відношенню до вірусу і виявляв пригнічуючий ефект (при концентрації 500 мкг/мл) на 8,00% (табл. А.28, Додатки).

#### 5.6.7 Протизапальна активність екстрактів ірисів

Протизапальну дію екстрактів ірисів *in vitro* визначали на моделях респіраторного сплеску та дегрануляції нейтрофілами людини. Дихальний вибух

і дегрануляція нейтрофілів є важливими процесами для підтримки здоров'я людини, але вони потребують ретельного регулювання, щоб запобігти розвитку хронічних та аутоімунних захворювань. Супероксид є основним радикалом, що виробляється нейтрофілами, і його надмірна кількість сприяє розвитку ряду гострих і хронічних захворювань, включаючи пошкодження легенів, сепсис або артрит [458]. Ми оцінили вплив екстрактів ірису на генерацію аніонів супероксиду та вивільнення еластази, викликане fMLF, у нейтрофілах людини. Результати показали, що водні екстракти кореневищ і. строкатого та і. угорського показали протизапальний потенціал і пригнічували утворення супероксид-аніону при 10 мкг/мл на 41,0% і 45,7% відповідно (табл. 5.13, табл. A29, Додатки). Крім того, як етанольний, так і водний екстракти кореневищ і. угорського показали посилюючий вплив на вивільнення еластази нейтрофілами людини і, можуть мати імуностимулювальні ефекти, пов'язані з дегрануляцією. Спостережувані ефекти водних екстрактів ірису можуть бути пов'язані з високим вмістом ізофлавонів.

Таблиця 5.13

### Протизапальна активність сухих екстрактів видів ірисів

Зразок	Утворення супероксид-аніону	Вивільнення еластази
	Inh% (10 мкг/мл)	Inh% (10 мкг/мл)
І. строкатий кореневища (H <sub>2</sub> O)	41,0 ± 0,6 ***	13,8 ± 5,1
І. угорський кореневища (H <sub>2</sub> O)	45,7 ± 1,4 ***	посилення <sup>a</sup>
І. угорський кореневища (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	23,6 ± 1,3 ***	посилення <sup>a</sup>
І. угорський листя (H <sub>2</sub> O)	24,17 ± 3,41**	21,63 ± 5,65*
І. угорський листя (70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	29,87 ± 2,93***	25,05 ± 5,37**
І. угорський листя полісахариди	7,84 ± 2,76*	39,02 ± 2,98***
І. угорський кореневища полісахариди	1,04 ± 0,80	1,43 ± 3,34

Примітка. Відсоток інгібування (Inh%) при концентрації 10 мкг/мл, результати представлені як середнє значення ± S.E.M. (n=3), \*\*\*p<0,001 порівняно з контролем (fMLF/СВ), подано геністеїн як позитивний контроль і інгібував 99,7 ± 0,6% утворення аніону супероксиду при 10 мкг/мл і 101,2 ± 6,3% вивільнення еластази при 30 мкг/мл, а кореневища і. угорського водний і етанольний екстракт (оба у дозі 10 мкг/мл) індукували вивільнення еластази в присутності цитохалазину В на 59,6 ± 8,1% і 42,4 ± 7,1%, результати представлені як середні ± S.E.M. (n=3), клітинні відповіді, індуковані fMLF/СВ, були виражені як 100%.

Результати для полісахаридного комплексу кореневищ і. угорського показали слабкий протизапальний потенціал і схильність до пригнічування утворення супероксид-аніону при 10 мкг/мл на 1,04% вивільнення еластази в нейтрофілах людини, індукованих FMLP/CB на 1,43%. Полісахаридний комплекс листя і. угорського мав трішки більший протизапальний потенціал і пригнічував утворення супероксид-аніону при 10 мкг/мл на 7,84 %, вивільнення еластази в нейтрофілах людини, індукованих FMLP/CB, на 39,02 % (табл.А.29, Додатки).

## 5.7 Індивідуальні речовини ірисів та їх фармакологічна дія

Потужні антиоксидантні та імуномоделюючі ефекти екстракту кореневищ і. угорського спонукали нас до вдосконалення методики виділення індивідуальних речовин з кореневищ ірису та вивчення їх біоактивності.

### 5.7.1 Виділення та встановлення структури речовин з кореневищ і. угорського

Раніше нами разом з Кречун А.В. [434, 435, 442] було виділено та описано 18 речовин (мангіферин, ізомангіферин; нігрицин, іригенін, текторидин, текторигенін, геністеїн, даїдзеїн, ононін, формонетин; хлорогенова, неохлорогенова, кофейна, ферулова кислоти; кверцетин, апігенін, ембінін, гіперозид) з і. угорського. Але при проведенні досліджень модифікованим методом ВЕРХ, нами було виявлено значно більше речовин [432]. Тому нами було проведено дослідження з оптимізації виділення речовин з кореневищ і. угорського шляхом модифікації застосованої раніше методики, а також залучення сучасних інструментів комплексного доведення будови виділених речовин.

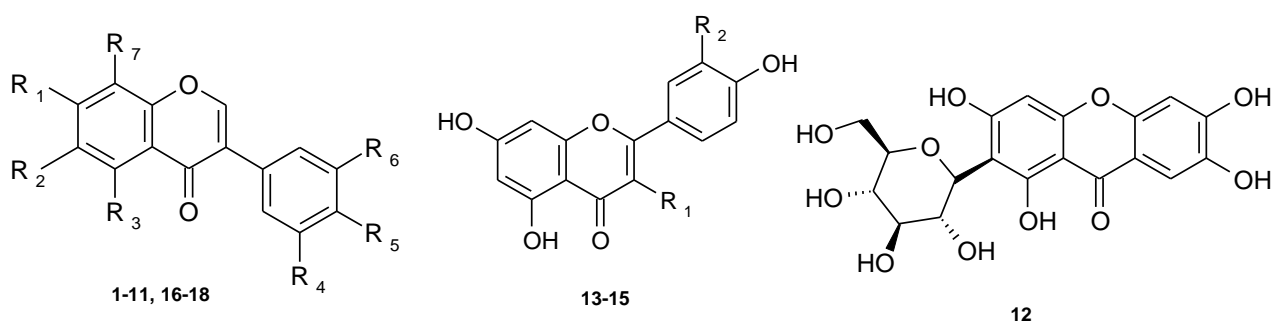
Для поліпшення розділення речовин в методику було внесено такі зміни: збільшена маса досліджуваної сировини, екстракцію сировини проводили 70% етанолом при нагріванні, об'єднували етилацетатну та бутанольну фракції. Методом фракціонування з етилацетатної, хлороформної, бутанольної фракції та

водного залишку за модифікованою методикою на вдалось виділити та ідентифікувати 30 сполук замість 18, описаних раніше. Схема виділення речовин наведена у Розділі 2. Сучасні інструментальні методи аналізу (мас-спектрометрія, двомірна ЯМР спектроскопія) дозволили вирішити спірні питання щодо положення замісників у видо-специфічних ізофлавоноїдах і надійно довести їх будову.

Сполуки **1 – 11** і **13-17** (схема 2.1) були виділені з етилацетатної та бутанольної фракції кореневищ і. угорського за допомогою колонкової хроматографії, а сполуку **12** одержали з бутанольної фракції. Сполуку **18** одержали з фракції хлороформу. Рідкісні природні сполуки **1-5** були знайдені лише у видах ірисів, однак це перший точний опис з'ясування структури сполук та їх виділення з кореневищ і. угорського (рис. 5.16).

*Хімічний аналіз на функціональні групи.* Якісний аналіз функціональних груп дозволив згрупувати виділені речовини за результатами хімічних реакцій. Сполуки (ірисолон, даїдзеїн) давали чорно-зелене забарвлення 1% спиртовим розчином  $\text{FeCl}_3$  і фіолетово-коричневе забарвлення 1% водним розчином  $\text{FeCl}_3$ . Сполуки іригенін та ірисолідон-7-глюкозид забарвлювалися в зелений колір при обробці 1% спиртовим розчином  $\text{FeCl}_3$  і світло-коричневий в 1% водному розчині  $\text{FeCl}_3$ , що вказувало на наявність фенольних гідроксильних груп у їх молекулах. Також спостерігалось фіолетове забарвлення сполук з розчином хромотропової кислоти в конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Це вказувало на наявність метоксильного фрагмента в молекулах іригеніну, ірисолону, ірилону, формонетину. Було проведено тест на ціанідин для визначення флавоноїдів, і сполуки забарвлювалися в яскраво-жовтий колір після реакції з порошком металевого магнію та конц.  $\text{HCl}$ . Наявність метилендіоксигрупи встановлювали якісною реакцією з 5% розчином галової кислоти в присутності концентрованої сірчаної кислоти та хромотропової кислоти (проба Лабата [459]). Наявність зеленого кольору порівняно з контрольним тестом свідчить про наявність метилендіоксигрупи в ірилоні.





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)  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3=R_4=R_6=R_7=H$ ;  $R_5=OCH_3$ ; Германайзм В (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 В (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'-тетраметоксиізофлавіон (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. 5.16 Фенольні сполуки, виділені з кореневищ і. угорського та в подальшому оцінені в аналізах біоактивності

*TLC*-аналіз сполук іригеніну та ірисолону ( $R_f$  0,87), ірилону та ірисолідон-7-глюкозиду з використанням системи: *n*-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2) дає плями з темною флуоресценцією, які стають темними під дією парів амоніаку. Це є характерним для 5-гідроксиізофлавіонів. Крім того, даїдзеїн і формононетин показали яскраво-блакитну флуоресценцію за тих самих умов після обробки парами амоніаку, що характерно для ізофлавіонів без ОН-групи в положенні С-5. Хроматографічний аналіз мангіферину дав пляму ( $R_f$  0,55) з темно-жовтою флуоресценцією. Після обробки парами амоніаку пляма набула оранжевого кольору, характерного для дибензо- $\gamma$ -пірону. Крім того, після додавання 2%  $AlCl_3$  пляма забарвилася в зелений колір, що підтвердило ксантонну природу сполуки.

*УФ*-спектри ізолюваних сполук іригеніну, ірисолону, ірилону, ірисолідон-7-глюкозиду, ононіну, геністеїну, даїдзеїну, формононетину в етанолі показали лише один максимум поглинання між 250-276 нм і «плече» при 300-340 нм, що свідчить про наявність ізофлавонового скелета. Це відповідає гідроксильній структурі В-кільця сполук (4'-ОН). *УФ*-спектр сполуки ірисолідон показав максимум при 268 і 330 нм (sh). Додавання до розчину безводного  $AlCl_3$  зсувало

$\lambda_{\max}$  до 278 нм без змін після додавання HCl. Подальше додавання ацетату натрію показало батохромний зсув цієї смуги на 8 нм. Результати УФ-спектрофотометрії дозволили припустити, що молекула містить ізофлавоновий скелет разом із хелатною 5-ОН групою і групою 7-ОН. Сполуку ірилон виділили у вигляді жовтого кристалічного порошку. УФ-спектр дав смугу II та смугу I при 270, 330 нм (sh.) відповідно, що вказує на наявність ізофлавонового скелета. Максимум низької інтенсивності (смуга I) був пов'язаний з поглинанням фенольної системи В-кільця, а інтенсивний пік при 269 нм (смуга II) включав бензоїльну систему А-кільця. Додавання AlCl<sub>3</sub> показало батохромний зсув смуги II на 13 нм, який не змінився після додавання HCl. Це явище вказувало на наявність у молекулі групи 5-ОН. Додавання плавленого ацетату натрію до системи не вплинуло на УФ-спектр. Сполука ірисолідон-7-глюкозид дала позитивний результат реакції в тесті на фенольні гідроксильні групи, демонструючи чорнувато-зелене забарвлення з 1% спиртовим FeCl<sub>3</sub> і фіолетово-коричневе забарвлення з водним 1% розчином FeCl<sub>3</sub>. УФ-спектр цієї ж сполуки показав поглинання  $\lambda_{\max}$  при 268 і 330 нм (sh), що свідчить про наявність ізофлавонового скелета. Крім того, протонний резонанс для ізофлавоону С-2 був розташований при  $\delta$  8,45 (1H, c) ppm, що також підтвердило ізофлавонову природу кільця. Кислотний гідроліз ірисолідон-7-глюкозиду з 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> дав аглікон I і D-глюкозу, які були ідентифіковані спільною ПХі спільною ТШХ. Після виділення кількох ізофлавоноїдів колонку елюювали сумішшю хлороформ-етанол (85:15), щоб отримати сполуку мангіферин. Її перекристалізували з EtOH, в результаті отримали блідо-жовтий аморфний порошок з молекулярною масою 422,35 г/моль. Температура плавлення (безводного) мангіферину становить 271°C. Мангіферин розчиний в таких розчинниках, як ДМСО, вода та метанол; дав позитивну реакцію (зеленувате забарвлення) у тесті на фенольні гідроксильні групи з використанням 3% FeCl<sub>3</sub>. УФ-спектр речовини показав поглинання  $\lambda_{\max}$  при 369, 318, 259 і 241 нм, що свідчить про ксантоновий скелет. Характерний батохромний зсув максимумів УФ-поглинання на 11 нм після додавання безводного ацетату натрію вказує на

наявність вільної гідроксильної групи в положенні С-3. Подальше додавання 3% розчину борної кислоти призвело до характерного батохромного зсуву, характерного для двох ОН-груп кільця В у орто-положенні.

Нижче наведено обговорення встановлення структури нових речовин для і. угорського, які не описані раніше, всі спектральні дані речовин наведено на рисунках А.4–А.38 та у таблицях А.15–А.18 (Додатки).

Молекулярна формула сполуки **1** була визначена як  $C_{17}H_{14}O_6$  з квазімолекулярного іонного піку  $[M+H]^+$  при  $m/z$  315 у LC-MS спектрі в поєднанні з даними  $^{13}C$  ЯМР. У спектрі  $^1H$  ЯМР **1** (табл. А.78, Додатки) пара сигналів 2H при  $\delta_H$  7,49 (d,  $J = 8,5$  Гц) і 7,00 (d,  $J = 8,5$  Гц) вказує на те, що В-кільце було замінено на С-4'. Характерний ізофлавоновий сигнал Н-2 спостерігався при  $\delta_H$  8,37(с), разом із лише одним ароматичним протоном при  $\delta_H$  6,50 (с), призначеним Н-8, що вказує на те, що три замісники були пов'язані з А-кільцем. Схема заміщення була встановлена на основі хімічних зсувів  $^{13}C$  ЯМР і 2D ЯМР спектрів (NOESY, HSQC і HMBC) (рис. 5.17; табл. А.16, Додатки). ОН-група в положенні С-5 ( $\delta_H$  13,02, с) була виведена з діагностичного резонансу С-4 ( $\delta_C$  180,95). Спостережувані ефекти NOE між групою ОН у С-5 та метоксигрупою у С-6 ( $\delta_H$  3,74, с), а також між ароматичним протоном у Н-8 та групою ОН у С-7 ( $\delta_H$  10,79, brs) уможливили призначення повного шаблону заміщення кільця А. Що стосується кільця В, розташування метоксигрупи в С-4' ( $\delta_H$  3,78, s) було виведено з ключових кореляцій HMBC від метоксигрупи до С-4', і від ефекту NOE між метоксигрупою та Н-3',5' (рис. 5.16А). Інший ефект NOE був виявлений між Н-2 і Н-2',6'. Таким чином, сполука **1** була ідентифікована як 5,7-дигідрокси-6,4'-диметоксиізофлавоон (ірисолідон). Структуру було підтверджено порівнянням даних ЯМР з даними, наведеними для ірисолідону [10]. Це рідкісний ізофлавоон, який був виділений вперше з існуючих видів.

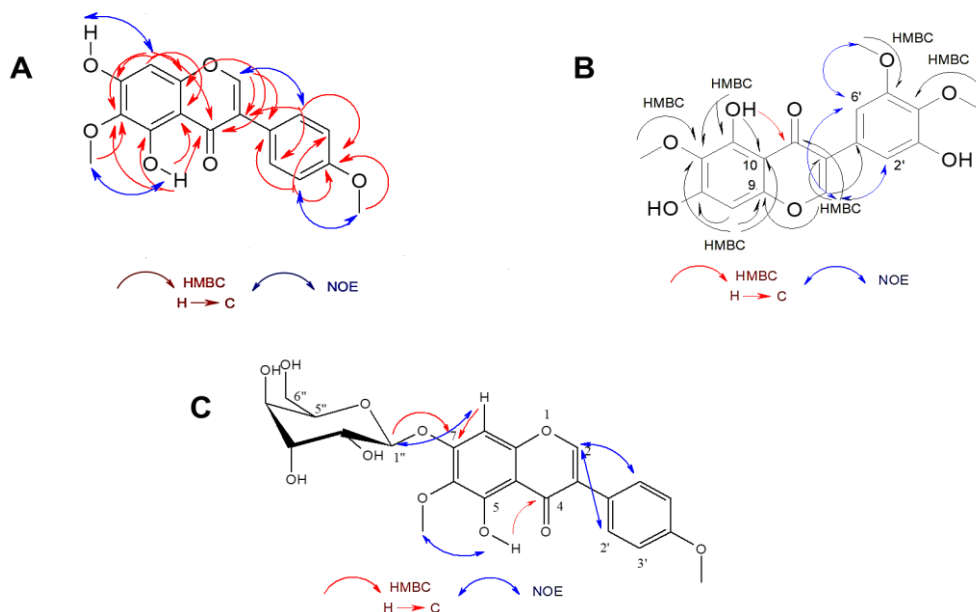


Рис. 5.17 Ключові кореляції НМВС і ефекти NOE у сполуках 1 (А), 2 (В), 5 (С)

LC-MS спектр сполуки **2** показав квазімолекулярний іонний пік  $[M+H]^+$  при  $m/z$  361. У поєднанні з даними  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектру молекулярна формула сполуки **2** була визначена як  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ . Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР **2** (Табл. А.17, Додатки) містив характерний сигнал Н-2 ізофлавону при  $\delta_{\text{H}}$  8,36(с), сигнали трьох метоксигруп ( $\delta_{\text{H}}$  3,79, с; 3,75, с; 3,70, с), трьох груп ОН ( $\delta_{\text{H}}$  13,03, с; 10,22, уш; 9,28, уш), ароматичний протон при  $\delta_{\text{H}}$  6,49 (с), віднесений до Н-8, і два ізольовані ароматичні протони ( $\delta_{\text{H}}$  6,72, с і  $\delta_{\text{H}}$  6,66, с) кільця В, модель заміщення кільця А була подібною до такої для сполуки **1** і була визначена шляхом інтерпретації спектрів NOESY, HSQC і НМВС (Рис. 5.17В; Табл. А.17, Додатки). Інтерпретацію розташування ароматичних протонів кільця В було зроблено за допомогою ключових кореляцій НМВС від Н-2' і Н-6' до С-3, а також з ефекту NOE між Н-2'/Н-6' і Н-2. Метоксигрупи при  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (с) і 3,79 (с) можуть бути розташовані в С-4' і С-5', відповідно, завдяки тому факту, що ефект NOE був виявлений між Н-6' і метоксигрупою в С-5'. Кореляція НМВС спостерігалася від метоксигрупи до С-4'. Таким чином, сполука **2** була ідентифікована як 5,7,3'-тригідрокси-6,4',5'-триметоксиізофлавіон, або іригенін. Спектроскопічні характеристики сполуки **2** були ідентичні літературним даним [460]. Іригенін

раніше виділяли з висушеного кореневища пардантописса вільчастого (*I. dichitoma*), ірису кровельного (*I. tectorum*), ірису німецького (*I. germanica*) [8].

LC-MS спектр сполуки **4** показав квазімолекулярний іонний пік  $[M + H]^+$  при  $m/z$  298. У поєднанні з даними  $^{13}\text{C}$  ЯМР молекулярна формула сполуки **4** була визначена як  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_6$ . Дані  $^1\text{H}$ -ЯМР та  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сполуки **4** показали характерні сигнали для ізофлавану. У спектрі  $^1\text{H}$ -ЯМР він демонструє різкий синглет при  $\delta_{\text{H}}$  8,47 (1H, c), який приписується Н-2 ізофлавоновому скелету. Окремий протон у слабкому полі при  $\delta_{\text{H}}$  12,83 (1H, c) вказував на сигнал 5-ОН. Пара сигналів *орто*-зв'язаних протонів (система AA'BB') при  $\delta_{\text{H}}$  7,50 (2H, d,  $J = 8,7$  Гц) і 7,05 (2H, d,  $J = 8,7$  Гц) відповідали Н-2',6' і Н-3',5' у В-кільці. Єдиний гострий пік при  $\delta_{\text{H}}$  6,15 (с) був характерним для метилендіоксигрупи, яка може бути розміщена в положеннях 6,7 або 7,8. Синглет при  $\delta_{\text{H}}$  6,84 свідчить про наявність протону в С-8, оскільки ЯМР-сигнал протону С-6 в ізофлавах виглядав трохи сильнішим у порівнянні з протоном С-8. Таким чином, метилендіоксигрупа була встановлена в 6 і 7 положеннях. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР **4** показав характерні резонанси для всіх атомів вуглецю. Сигнал при  $\delta_{\text{C}}$  89,7 свідчить про відсутність замісника в С-8, а сигнал при  $\delta_{\text{C}}$  180,9 (С-4) вказує на те, що С-5 заміщено гідроксигрупою. Таким чином, **4** було виведено як 5,4'-дигідрокси-6,7-метилендіоксиізофлаван або ірилон, що вперше виділено з кореневищ і. угорського [10].

Молекулярна формула **5** була визначена як  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$  з квазімолекулярного іонного піку  $[M+H]^+$  при  $m/z$  477 у LC-МС спектрі разом з даними  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Протонний резонанс ізофлавану С-2 знаходився при  $\delta_{\text{H}}$  8,45 (1H, c) ppm, що також підтверджувало ізофлавонову природу циклу. Кислотний гідроліз **5** з 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  дав аглікон **1** (ірисолідон) і D-глюкозу, які були ідентифіковані за допомогою спільної ПХ та спільної ТШХ. У спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР **5** (табл. А.80, Додатки) характерний сигнал Н-2 ізофлавану було виявлено при  $\delta_{\text{H}}$  8,48 (с), а висновок про 4-метоксифенільну природу В-кільця було зроблено за сигналами при  $\delta_{\text{H}}$  7,52 (2H, d,  $J = 8,4$  Гц, Н-2',6') і 7,01 (2H, d,  $J = 8,4$  Гц, Н-3',5'). Значення  $J$  (7,7 Гц) аномального протону при  $\delta_{\text{H}}$  5,09 (d) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) вказувало на те, що цукор був у  $\beta$ -конфігурації. У спектрі NOESY **5** було встановлено, що цукор знаходиться в С-7 з кореляції між

аномерним протоном D-glc ( $\delta_{\text{H}}$  5,09) і характерним одиночним протоном Н-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,90, 1H, s). Метоксигрупа при  $\delta_{\text{H}}$  3,77 була розташована в С-6, оскільки група ОН при С-5 ( $\delta_{\text{H}}$  12,90) корелювала з метоксипротонами (рис. 8.4С). У спектрі також виявлені сигнали для двох метоксигруп при  $\delta_{\text{H}}$  3,78 (3H, с, 4'-ОСН<sub>3</sub>) та  $\delta_{\text{H}}$  3,74 (3H, с, 6-ОСН<sub>3</sub>) м.ч. та синглет для гідроксигрупи при  $\delta_{\text{H}}$  12,9 (1H, с, 5-ОН) м.ч. (табл. А.18, Додатки). На підставі цих даних ми зробили висновок, що **5** – це ірисолідон-7-*O*- $\beta$ -D-глюкопіранозид або кікалідон, який вперше виділено з кореневищ і угорського. Кікалідон та ірисолідон раніше виділяли лише з квітки пуерарії дольчастої та кореневищ і. німецького [461].

Молекулярна формула **17** була визначена як  $C_{17}H_{14}O_7$  з квазімолекулярного іонного піку  $[M+H]^+$  при  $m/z$  330. В УФ-спектрі речовини **17** спостерігаються максимуми поглинання 272 і плече при 341 нм, що свідчить про його ізофлавоноїдну природу, це додатково підтверджується синглетним сигналом  $\delta$  8.32 м.ч. (1H, с) при Н-2. В ІЧ-спектрі відзначено смуги поглинання при 3752  $\text{cm}^{-1}$  (ОН), 2960, 2836  $\text{cm}^{-1}$  (ОСН<sub>3</sub>), 1660  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1622, 1582, 1522  $\text{cm}^{-1}$  (C=C), 1372, 1061, 1008 (ОСН<sub>3</sub>). У <sup>1</sup>H ЯМР-спектрі речовини **17** відзначені сигнали при  $\delta$  8.35 м.ч. (1H, с), 7.12 (1H, д,  $J = 1.8$  Гц), 6.60 (1H, д,  $J = 2.4$  Гц) та 6.67 (1H, дд,  $J = 2.4$ ; 1,8 Гц), які пояснюють наявність Н-2 у ізофлавонового скелета і утворюють спіновою взаємодію (Н-5', Н-2' і Н-6'). Сигнал при  $\delta$  6.40 м.ч. (1H, с, 8-Н) свідчить, що тільки один протон присутній в кільці А ізофлавону і є два сигнали двох метоксильних груп при  $\delta$  3.73 м.ч. (3H, с, 3'-ОСН<sub>3</sub>) і 3.75 м.ч. (3H, с, 6-ОСН<sub>3</sub>). У спектрі зазначено наявність трьох синглетних сигналів гідроксильних груп при 13.05 м.ч. (1H, с, 5-ОН), 10.08 м.ч. (1H, с, 7-ОН), 9.20 м.ч. (1H, с, 4'-ОН).

За допомогою NOESY-спектру для **17** були уточнені розташування замісників при С-3 і С-4. Аналіз показав наявність двох крос-пиків, що показують резонанс ядер, які близькі до просторово (Ядерний ефект Оверхаузера спостерігається на відстані 0,03–0,4 нм між атомами). Таким чином, спостерігаємо взаємодію протона Н-2 з протонами Н-2 і Н-6. Н-2' протон дає крос-пик з протонами метоксигрупи, тобто остання знаходиться в 3-положенні.

Отримані спектральні дані відповідають літературним значенням для іристекторигеніна В або 5,7,4'-тригідрокси-6,3'-диметоксиизофлавона.

Молекулярна формула речовини **19**  $C_{23}H_{24}O_{12}$  відповідає мас-спектру з молекулярним йоном  $m/z$ : 330 ( $-C_6H_{11}O_5$ ) ( $M^+$ ). В УФ-спектрі речовини **19** спостерігаються максимуми поглинання 272 і плече при 340 нм, а в  $^1H$  ЯМР-спектрі зазначено наявність синглетного сигналу при  $\delta$  8.32 м.ч. (1H, с), що характерно для ізофлавоноїдів. В ІЧ-спектрі речовини **19** відзначено смуги поглинання при 3423  $cm^{-1}$  (ОН), 2959, 2844  $cm^{-1}$  (ОСН<sub>3</sub>), 1660  $cm^{-1}$  (C=O), 1623, 1583, 1523  $cm^{-1}$  (C=C). При 1100 – 1010  $cm^{-1}$  є три смуги поглинання С-Н вуглеводного залишків, що характеризує піранозну форму, а смуга при 890  $cm^{-1}$  –  $\beta$ -глікозидний зв'язок. При проведенні кислотного гідролізу речовина розщеплюється на іристекторигенін та *D*-глюкозу (ПХ).

Аналіз  $^1H$ -ЯМР-спектру речовини **19** показав, що спинова система ароматичного ядра така ж, як і у речовини **17**. Сигнал при  $\delta$  8.32 м.ч. (1H, с, H-2) ізофлавонового скелета підтверджує природу циклу. Відзначено сигнали при  $\delta$  7.15 м.ч. (1H, д,  $J = 1.8$  Гц), 6.90 (1H, д,  $J = 2.4$  Гц) та 6.70 м.ч. (1H, дд,  $J = 2.4$ ; 1.8 Гц), утворюють спін-спінову взаємодію (H-2', H-6' та H-5'). Сигнал при  $\delta$  6.47 м.ч (1H, с, 8-H) свідчить, що тільки один протон присутній в кільці А ізофлавоноу і є два сигнали двох метоксильних груп при  $\delta$  3.75 м.ч. (3H, с, 3'-ОСН<sub>3</sub>) і 3.70 м.ч. (3H, с, 6-ОСН<sub>3</sub>). У спектрі зазначено наявність двох синглетних сигналів гідроксильних груп при  $\delta$  13.10 м.ч. (1H, с, 5-ОН), 9.15 м.д. (1H, с, 4'-ОН).

У  $^1H$ -ЯМР-спектрі, на відміну від спектрів аглікону іристекторигеніну В, додатково зазначено наявність групи сигналів, відповідних наявності шести протонів, що підтверджує монозидну природу даного глікозиду. Сигнал аномального протона *D*-глюкози проявляється при  $\delta$  5.1 м.ч. у вигляді дуплетів з КССВ 7.2 Гц, що характеризує наявність  $\beta$ -глікозидний зв'язку та піранозного окисного циклу (табл. А.15, Додатки). На підставі спектрального аналізу, а також при порівнянні з літературними даними будова речовини **19** охарактеризовано як іристекторигенін-7-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопіранозид або іристекторин [461] та вперше виділено з кореневищ і. угорського.

Пік псевдомолекулярного іона **11** спостерігався при  $m/z$  475,1235, що свідчить про молекулярну формулу  $C_{23}H_{23}O_{11}$  за даними  $^{13}C$  ЯМР. Спектри  $^1H$ -ЯМР **11** показали декілька сигналів, характерних для фрагментів цукру та ізофлавонолу. Спектр  $^1H$ -ЯМР показав синглети при  $\delta_H$  8,10 (H-2) і 6,80 (H-8), характерні для бензопіранового фрагмента. Синглет 2H метилendioксигрупи при  $\delta_H$  6,14 і метоксигрупа при  $\delta_H$  3,93 з'явився в спектрі  $^1H$ -ЯМР. В області  $\delta_H$  4,41–5,18 виявлено характерну групу сигналів, що відповідає наявності 6 протонів, що підтверджує монозидну природу досліджуваного глікозиду. Сигнал аномерного протона D-глюкози спостерігався в області  $\delta_H$  4,91 як дублет з константою зв'язку  $J = 7,2$  Гц, цей сигнал припустив аксіально-осьову взаємодію аномерного протона та підтвердив  $\beta$ -конфігурацію глікозидного зв'язку. Сигнали на  $\delta_H$  8,10 і 6,80 відповідали протонам у C-2 і C-8 ізофлавонового скелета відповідно. Наявність двох дублетів при  $\delta_H$  7,05 (d,  $J = 8,8$  Гц) і  $\delta_H$  7,41 (d,  $J = 8,8$  Гц) характерний для протонів у C-3', C-5', C-2', C-6'. Порівняння спостережуваних сигналів  $^1H$ -ЯМР з наведеними даними показало, що аглікон **11** є нігрицином. Таким чином, **11** ідентифікували як нігрицин 4'-O- $\beta$ -D-глюкопіранозид або германайзм В та вперше виділено з кореневищ і. угорського.

Структури **7**, **8**, **9** і **10** були підтверджені даними ЯМР. У ЯМР спектрах цих сполук були виявлені наступні сигнали протонів: H-2 ( $\delta_H$  8,15-8,36 м.ч.), H-2', H-6' (d,  $\delta_H$  7,43-7,55 м.ч.,  $J = 8,5-9,0$  Гц), H-3', H-5' (d  $\delta_H$  6,94-7,03 м.ч.,  $J = 8,5-9,0$  Гц), H-8 (dd,  $\delta_H$  6,44-7,23 м.ч.,  $J = 2,0$  Гц), H-6 (dd,  $\delta_H$  6,32-6,96 м.ч.,  $J_1 = 2,0 - 2,5$  Гц,  $J_2$  8,0 Гц). Крім того, протонний сигнал на C-5 в області  $\delta_H$  8,03-8,05 м.ч. у вигляді дублету з константою спінової взаємодії  $J = 8,0-8,5$  Гц, виявлено в сполуках **9** і **10**. Синглет метоксигрупи при  $\delta_H$  3,8 м.ч. було знайдено в спектрі сполуки **10**. На основі порівняння з літературними даними встановлено структуру **8** як 5,7,4'-тригідроксіізофлавонолу (геністеїн), **9** як 7,4'-дигідроксіізофлавонолу (дайдеїн), **10** як 7-гідрокси-4'-метоксиізофлавонолу (формонетин), і **7** як формонетин-7-O-глюкозид (ононін). Сполуки **13**, **14**, **15** були ідентифіковані як апігенін, кемпферол, кверцетин шляхом порівняння даних їхніх УФ-, ІЧ-,  $^1H$  ЯМР та мас-спектрів з даними літератури (Рис. А.27–А.34, Додатки). Ізофлавоноли **6**, **16** і **17** із заміщенням 4',5-



дигідрокси та 5,7,4'-тригідроксигрупами є дуже рідкісними. Такі речовини були присутніми серед виділених нами з кореневищ і. угорського Сполуку **18** окремо виділяли з екстракту хлороформу та ідентифікували як 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавіон шляхом порівняння її спектроскопічних даних з даними, доступними в літературі. Цей ізофлавіон вперше описаний у і. болотному [462]. Сполуки **13-18** є відомими компонентами, але були виділені з і. угорського вперше.

### 5.7.2 Прогнозування протівірусної та нейрамінідазної дії фенольних речовин з використанням Chem-GPS аналізу

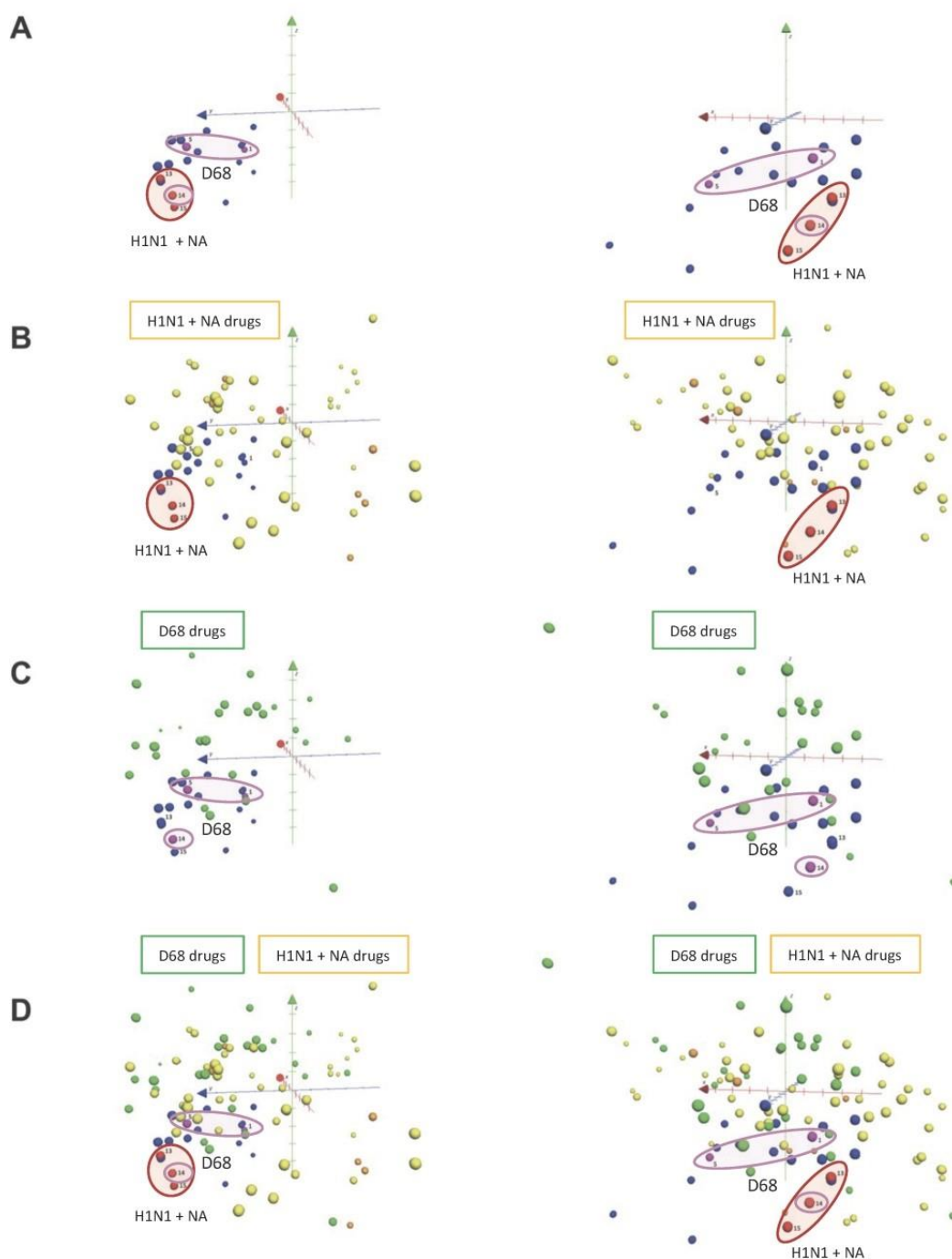
Для подальшого співвіднесення спостережуваних протівірусних ефектів флавоноїдів ірису з клінічними та експериментальними протівірусними препаратами було проведено моделювання *in silico* за допомогою хімічної глобальної системи позиціонування для природних продуктів (ChemGPS-NP).

ChemGPS – це інструмент для прогнозування біоактивності молекул у хімічному просторі на основі їхніх фізико-хімічних властивостей. Він призначений для дослідження та розробки натуральних продуктів [268]. Його використовували для скринінгу специфічних біологічно активних природних сполук, а також для порівняння властивостей досліджуваних сполук із клінічними препаратами. Виділені флавоноїди (рис. 5.17) були розміщені в хімічному просторі за допомогою вхідних даних SMILES в веб-систему ChemGPS-NP (рис. 5.17A). Було побудовано власну базу даних протигрипозних та протиентеровірусних препаратів на різних стадіях клінічної розробки (табл. А.20–А.22, Додатки). Відповідно до аналізу ChemGPS-NP, виділені сполуки утворили кластер, який частково перекривався з еталонними препаратами проти грипу (жовті крапки) та інгібіторами нейрамінідази (помаранчеві крапки) (рис. 5.18B). Флавоноїди з вищою ароматичністю (до позитивного синього PC2, вісь у) і гідрофільністю (до негативного зеленого PC3, вісь z) виявили захисний ефект проти інфекції грипу H1N1, тоді як інші флавоноїди були менш активними. Не було явної кореляції між активними флавоноїдами, апігеніном (**13**), кемпферолом (**14**), кверцетином (**15**) (червоні крапки) і групою

інгібіторів нейрамінідази (помаранчеві крапки), що вказує на те, що вплив на нейрамінідазу лише частково сприяє антивірусній дії, властивості активних протигрипозних флавоноїдів ірису (червоні точки; **13**, **14**, **15**), які також спостерігалися *in vitro* (табл. А.65, Додатки).

Ізольовані фенольні сполуки ірису, включаючи активний проти ентеровірусу ірисолідон (**1**), ірисолідон-7-глюкозид (кікалідон) (**5**) і кемпферол (**14**) (рожеві крапки), і неактивні (блакитні крапки) сполуки були нанесені на графік разом із референтними препаратами проти ентеровірусів (зелені крапки) (рис. 5.18С). Кластер, що перекривається, спостерігався з подібністю в ароматичності (синя вісь, РС2, вісь у) і рівнях ліпофільності (зелений РС3, вісь z), тоді як розмір активних молекул відрізнявся через присутність глюкози в кікалідоні (**5**). Загалом результати продемонстрували подібність у фізико-хімічних властивостях активних фенольних сполук ірису з відомими протигрипозними та ентеровірусними засобами (рис. 5.18D).

Фенольні сполуки ірису виявляли протигрипозну, протиентеровірусну та протизапальну дію *in vitro* у подальшому експерименті, а їхні фізико-хімічні властивості корелювали з противірусними препаратами на різних стадіях клінічної розробки за допомогою глобальної космічної карти ChemGPS-NP. Фенольні речовини ірису показали цікаву противірусну активність, що свідчить про їх потенційне застосування в лікуванні грипу та ентеровірусних інфекцій.



(a) (сині неактивні та червоні крапки активні) були нанесені разом із протигрипозними препаратами (жовті крапки), включаючи інгібітори нейрамінідази (помаранчеві крапки); (b) Фенольні речовини іриса (сині неактивні та червоні точки активні) були нанесені разом із протигрипозними препаратами (жовті точки), включаючи інгібітори нейрамінідази (помаранчеві точки) (c) Фенольні речовини іриса (сині неактивні та рожеві точки активні) були нанесені разом із антиентеровірусними препаратами (зелені точки) (d) Фенольні речовини іриса (сині крапки неактивні; червоні протигрипозні; рожеві антиентеровірусні) були нанесені разом із протигрипозними (жовті та 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)

Рис. 5.18 ChemGPS-NP аналіз фенольних сполук, виділених із кореневищ

і. угорського

### 5.7.3 Фармакологічний скринінг індивідуальних речовин методом *in vitro*

Усі сполуки були оцінені *in vitro* на предмет їх захисної дії проти ентеровірусу D68, вірусу грипу H1N1 та коронавірусу 229E. Протизапальну активність виділених сполук перевіряли на нейтрофілах людини (інгібіторна активність нейрамінідази) (табл. 5.15). Згідно з попереднім аналізом, водний екстракт кореневищ і. угорського (500 мкг/мл) захищав 80% клітин від летального ефекту інфекції грипу H1N1 з 50% інгібуючим ефектом при 125 мкг/мл (табл. 5.15, рис. А.66, Додатки), завдяки вмісту суміші поліфенолів. Виділені сполуки були протестовані при 50 мкМ, і результати показали, що апігенін (**13**) пригнічує загибель клітин, спричинену інфекцією H1N1, майже на 100%, кемпферол (**14**) на 92%, а кверцетин (**15**) на 47,5% (рис. А.65, Додатки). Інгібувальне співвідношення **13** і **14** було порівняним із занамівіром (Реленза), який використовувався як позитивний контроль, що призвело до 82,5% інгібування при 10 мкМ [280]. Результати показали, що серед усіх протестованих флавоноїдів (**1-3, 5, 8-11, 13-17**) наявність гідроксильних груп у А- та В-кільцях (**13-15**) є важливою для активності проти H1N1. Було встановлено, що активність дещо зменшилася з наявністю меншої кількості ОН-груп у В і С-кільці, причому апігенін демонструє найвищу активність, за яким слідує кемпферол (3-гідроксіапігенін; **14**) і кверцетин (3,3'-дигідроксиапігенін; **15**). Це добре підтверджується попередніми повідомленнями про протигрипозну дію апігеніну [463] з відносно хорошою біодоступністю та властивостями ADMET (поглинання, розподіл, метаболізм, виведення та токсичність) [464]. Однак пероральна біодоступність флавоноїдів обмежена через їх низьку жиророзчинність, що обмежує їхню здатність проходити через багаті ліпідами біологічні мембрани. Для глікозидів їх гідроліз відбуватиметься відносно швидко після перорального введення. Мангіферин (**12**) має низьку біодоступність. Таким чином, кікалідон (**5**), може мати кращий потенціал для розробки (рис. 5.19).

Таблиця 5.15

**Захисний ефект екстрактів кореневищ і. угорського та його індивідуальних компонентів щодо ентеровірусної інфекції D68, грипу H1N1 та коронавірусу 229E**

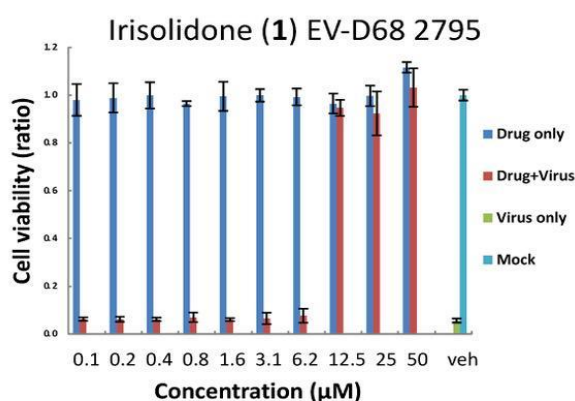
Компонент	Ентеровірус D68 <sup>a</sup>	Грип H1N1 <sup>a</sup>	Активність нейрамінідази	Коронавірус 229E <sup>b</sup>
	Inh%	Inh%	Inh%	Inh%
1	2	3	4	5
I. угорського спиртовий екстракт	Active 40 <sup>e</sup>	–	–	–
I. угорського водний екстракт	–	Active 80 <sup>f</sup>	–	–
Ірисолідон (1)	100 <sup>c</sup>	–	–	–
Іригенін (2)	–	–	–	–
Ірисолон (нігрицин) (3)	–	–	–	–
Ірисолідон-7-глюкозид (кікалідон ) (5)	93,4 ± 4,7	–	5	–
Геністеїн (8)	–	–	–	–
Даїдзеїн (9)	–	–	– (40 μM)	–
Формонетин (10)	–	–	– (40 μM)	–
Нігрицин-4'-глюкозид (германаїзм В) (11)	–	–	–	–
Мангіферин (12)	–	–	–	–
Апігенін (13)	–	100	38,1 ± 3,8	–
Кемпферол (14)	83,4 ± 8,7	92,5 ± 8,5	35,0 ± 1,5	–
Кверцетин (15)	–	47,5 ± 5,4	29,7 ± 3,2	–

Закінчення табл. 86

1	2	3	4	5
Текторидин (16)	–	–	–	–
Ірисктекторигенін В (17)	–	–	–	–
5,6-Дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон (18)	–	–	–	–
С-22 (10 мкМ) <sup>d</sup>	96,1 ± 3,6	–	–	–
Занамівір (10 мкМ) <sup>d</sup>	–	82,5 ± 3,7	99,5 ± 1,1 (0,25 μМ)	–

Примітка. <sup>a</sup> Відсоток захисного ефекту (Inh%) проти ентеровірусної та грипозної інфекції при 50 мкМ для сполук і 500 мкг/мл для сухих екстрактів. Результати представлені як середнє ± SD (n = 2) порівняно з контролем (ДМСО). Зразки були нетоксичними для клітин RD (ентеровірус) і MCDK (грип) при 50 мкМ. Ірисолідон (**1**) і апігенін (**13**) продемонстрували 100% інгібування при 50 мкМ, – неактивний (менше 40% інгібування). Значення, що перевищували 100%, були представлені як 100% (ірисолідон **1** та апігенін **13**). <sup>b</sup> Відсоток інгібування (Inh%) нейромінідази при 200 мкМ для сполук і 100 мкг/мл для сухих екстрактів. Результати представлені як середнє ± SD (n = 2) порівняно з контролем (ДМСО). Дайдзеїн (**9**) і формонетин (**10**) тестували при 40 мкМ. Занамівір (0,25 мкМ) використовували як позитивний контроль, – неактивний (менше 20% інгібування). Заготовки не тестувалися. <sup>c</sup> Відсоток захисного ефекту (Inh%, n = 1) проти інфекції коронавірусу 229Е при 10 мкМ для сполук і 10 мкг/мл для екстрактів. Дані порівнювали з контролем (DMSO) – неактивний (менше 20% інгібування). <sup>d</sup> Водно-спиртовий екстракт кореневищ і. угорського інгібував 40% ентеровірусної інфекції D68 при 500 мкг/мл. Проте зразок показав бл. 50% токсичність для клітин. Не впливає на грип H1N1 500 мкг/мл. <sup>e</sup> Водний екстракт кореневищ пригнічував 80% інфекції грипу при 500 мкг/мл. Зразок показав бл. 20% токсичність для клітин. Значення EC<sub>50</sub> було розраховано як 125 мкг/мл. Не впливає на ентеровірус D68 при 500 мкг/мл. <sup>f</sup> Етанольний (1,3 ± 1,2% інгібування) і водний (6,6 ± 3,0% інгібування) екстракти кореневищ були неактивними проти нейрамінідази при 100 мкг/мл. <sup>g</sup> Ірисолідон повністю захищав від інфікування ентеровірусом D68 (майже 100%) з половинною інгібіторною концентрацією між 6,2 і 12,5 мкМ. <sup>h</sup> С-22 (10 мкМ) і занамівір (10 мкМ) служили позитивним контролем для інфікування ентеровірусом D68 і грипу H1N1 відповідно.

Нейрамінідаза відіграє важливу роль у вивільненні реплікованих вірусних частинок із клітин господаря [279, 280, 281]. Апігенін (**13**), кемпферол (**14**), кверцетин (**15**) показали дозо-залежний інгібувальний ефект при 25 – 200 мкМ з піком інгібування 29,7 – 38,1%. Крім того, апігенін (**13**), кемпферол (**14**) [465] і кверцетин (**15**) (рис. А.65, Додатки) добре зв'язувалися з ферментом нейрамінідазою *in silico*, як продемонстрували різні моделі докінгу. Це добре підтверджує отримані експериментальні дані та вказує на потужну антивірусну дію флавоноїдів (**13-15**). Для оцінки захисного ефекту зразків ірисів проти ентеровірусу D68 використовували модель клітин рабдоміосаркоми (RD), інфікованих ентеровірусом 68. Етанольний екстракт кореневищ і. угорського захищав 40% клітин від летального ефекту ентеровірусу D68 при 500 мкг/мл (табл. 5.15, рис. А.67, Додатки), однак показав приблизно 50% токсичність для RD клітин. Виділені чисті сполуки були додатково оцінені, і результати показали, що ірисолідон (**1**), рідкісний ізофлавонон ірису, виявляв найсильніший захисний ефект проти ентеровірусної інфекції D68 з майже повним інгібуванням у діапазоні концентрацій від 12,5 мкМ до 50 мкМ (рис. 5.19) без токсичного впливу на RD клітини. Ірисолідон-7-глюкозид (кікалідон) (**5**) (93%) і кемпферол (**14**) (83%) також показали інгібіторну активність при 50 мкМ.



Клітини RD, інфіковані EV-68, обробляли сполуками (червоним або оранжевим) або носієм (зеленим або сірим), де різниця між цими двома групами вказувала на захисні ефекти проти інфекції EV-D68. Неінфіковані клітини також обробляли зразками (темно-синій) або лише носієм (світло-блакитний), що служило контролем життєздатності клітин (n=2). Veh, vehicle, Ctr, контроль, C-22 служив позитивним контролем

Рис. 5.19 Захисна активність ірисолідону щодо ентеровірусної інфекції D68 (EV-D68)

Синтетична сполука С-22 служила позитивним контролем і показала 95% інгібування при 10 мкМ [466]. Ірисолідон (**1**) і кікалідон (**5**) містять однаковий аглікон, який може служити важливим фармакофором для активності ентеровірусу D68. Встановлено, що активність цих сполук спостерігалася саме проти ентеровірусної інфекції, а не проти грипозної інфекції. Навпаки, кемпферол (**14**) був активним проти обох вірусів. Ці результати виявили нову протівірусну біоактивність і. угорського і його характерні компоненти, такі як **1** і **5**, які служать маркерними сполуками для видів ірис.

В іншому тесті, ізольовані сполуки оцінювали на захисний ефект проти інфекції коронавірусу людини 229Е (HCoV-229E) [467] *in vitro*. Результати виявили відсутність захисного ефекту при 10 мкМ (табл. 5.16, рис. А.68, Додатки) із низькою токсичністю для клітин Huh7. Вірогідно, для подальших досліджень слід використовувати більш високу концентрацію флавоноїдів.

Водний екстракт і. угорського мав протизапальний потенціал і пригнічував утворення супероксид-аніону при 10 мкг/мл на 45,7% [432]. Серед протестованих сполук апігенін (IC<sub>50</sub> 2,19 і 2,59 мкМ) і кверцетин (IC<sub>50</sub> 6,81 і 6,82 мкМ) виявили потужний інгібуючий ефект на генерацію супероксид-аніонів, а також на вивільнення еластази (табл. 5.16). У той же час кверцетин (10 мкМ) суттєво взаємодіяв з ферицитохромом с (Fe<sup>3+</sup>), що вказує на його антиоксидантну та можливу дію на зниження гема. Мангіферин пригнічував лише утворення супероксиду (IC<sub>50</sub> 5,24 мкМ) завдяки його антиоксидантним ефектам.



Таблиця 5.16

**Вплив індивідуальних сполук на утворення супероксид-аніону та вивільнення еластази в нейтрофілах людини, індукованих fMLF/СВ**

Речовина	Супероксид-аніон		Еластаза	
	IC <sub>50</sub> (мкМ) <sup>a</sup>	Inh%	IC <sub>50</sub> (мкМ) <sup>a</sup>	Inh%
Ірисолідон (1)		0,92±2,42		30,19±3,11***
Іригенін (2)		8,44±4,75		Посилення <sup>b</sup>
Ірисолон (3)		39,10±5,04**		24,67±2,73***
Кікалідон (5)		12,63±1,54**		5,17±6,73
Геністеїн (8)	1,84	81,67±2,67***		29,44±3,73**
Даїдзеїн (9)		6,52±1,81*		11,68±4,00
Формононетин (10)		1,95±4,15		3,36±1,87
Германаїзм В (11)		8,82±1,61**		10,76±5,51
Мангіферин (12)	5,24	65,89±2,09***		14,02±6,80
Апігенін (13)	2,19	100,59±0,67***	2,49	111,23±1,89***
Кемпферол (14)		24,91±7,01*		20,69±7,35*
Кверцетин (15)	6,81	68,03±6,15 <sup>c</sup> ***	6,82	61,91±3,36***
Текторидин (16)		7,72±1,16**		5,48±4,90
Іристекторигенін В (17)		27,29±5,96*		10,27±4,25
5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметокси-ізофлавіон (18)		7,51±5,47		3,36±3,65

Примітка. <sup>a</sup> Відсоток інгібування (Inh%) при 10 мкМ. Результати представлені як середнє ± SEM (n=3–5) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 порівняно з контролем (DMSO). Геністеїн (8) служив позитивним контролем. <sup>a</sup> Концентрація, необхідна для 50% інгібування (IC<sub>50</sub>). <sup>b</sup> Іригенін індукував вивільнення еластази на 88,21±4,77% у нейтрофілах людини в присутності цитохалазину В (СВ). Результати представлені як середнє ±SEM (n=3). Відповіді клітин, індуковані fMLF/СВ, виражаються як 100%, \*\*\*p<0,001 порівняно з ДМСО. <sup>c</sup> Кверцетин (10 мкМ) суттєво взаємодіяв із фероцитохромом с (Fe<sup>3+</sup>), спричиняючи його відновлення до фероцитохрому с (Fe<sup>2+</sup>), що могло вплинути на спостережуваний інгібуючий ефект на утворення супероксид-аніонів, показник поглинання при 550 нм OD різниця >0,4.

Геністеїн, відомий інгібітор протеїн-тирозинкінази, інгібував супероксид ( $IC_{50}$  1,84 мкМ), тоді як вплив на вивільнення еластази був слабким (29,44% при 10 мкМ). Ізофлавіон геністеїн, і флавіон апігенін мають гідроксильний замісник у положеннях С-4', С-5 і С-7, що сприяє потужному антинейтрофільному ефекту. Цікаво, що ізофлавіони, у яких відсутній один із цих гідроксилів, були неактивними. У той час як ізофлавіон і ристекторигенін В (**17**), який містить С-4', С-5 і С-7 гідроксили з додатковими метоксигрупами у С-3' і С-6 також був неактивним. Серед протестованих флавіонів із С-4', С-5 та С-7 гідроксилом, подібно до результатів проти грипу H1N1, найкращу антинейтрофільну активність виявляв апігенін (**13**), у якому відсутній С-3 гідроксил порівняно з кверцетином (3,3'-дигідроксиапигенін; **15**) і кемпферол (3-гідроксиапигенін; **14**).

#### 5.8 Обґрунтування вибору речовин-маркерів у сировині та екстрактах і. угорського

Для обґрунтування вибору Q-маркерів для і. угорського при використанні сировини для лікування вірусно-запальних захворювань, ми застосували критерії Herb MaRS аналогічно сировині та екстрактам к. посівного. Відповідно до умов скринінгу, сполуки є оптимальними Q-маркерами за умови, що їх концентрація в ЛРС є домінуючою відносно інших речовин ( $> 50$  мкг/г), та сполука має найвищу біологічну активність, що пов'язана з основними симптомами захворювання (у цьому випадку, антивірусна та протизапальна активність), для якої є достатні докази на підтримку її активності ( $\geq 2$  опублікованих дослідження високої якості). Для визначення основних компонентів кореневищ та листя і. угорського використовували базу даних Medchemexpress, PubChem та доступні публікації про хімічний склад рослин роду Ірис. Враховуючи, аналіз власних даних (розділ 5.1, 5.2, 5.6) та дані літератури (табл. 5.17), потенційними маркерами протівірусної активності для рослин роду ірис можуть бути ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин та, ймовірно,  $\alpha$ -ірон, завдяки наявності достатньої кількості експериментальних публікацій.

Таблиця 5.17

**Хімічний склад кореневищ і листя і. угорського та відповідний бал Herb MaRS на основі потенційної  
протівірусної та протизапальної дії**

Сполука	Виявлена фармакологічна активність відповідно до даних літератури <sup>1</sup>	Herb MaRS Рейтинг	Сировина	Наявність стандарту (CAS N)	Посилання
Кверцетин	Протівірусна, протиракова, протимікробна, протизапальна	5	Кореневища	849061-97-8	[463, 384]
Апігенін	Протиракова, протівірусна, протизапальна, антиоксидантна	5	Кореневища	578-74-5	[468, 388]
Кемпферол	Антиоксидантна, протизапальна, протимікробна, протипухлинна	5	Кореневища	520-18-3	[91, 469]
Мангіферин	Протівірусна, протиракова, протизапальна, імуномодельюча	5	Кореневища, листя	4773-96-0	[470-473]
Ірисолідон	Протівірусна, протипухлинна, антиоксидантна, протимікробна, протизапальна	5	Кореневища	2345-17-7	[474, 475]
Іригенін	Протизапальна, антиоксидантна, антиапоптозна, протиракова	5	Кореневища, листя	548-76-5	[158, 460, 476]
Текторидин	Протівірусна, протипухлинна, антиоксидантна, протизапальна	4	Кореневища	611-40-5	[477]
$\alpha$ -Ірон	Протівірусна, протиракова	3	Кореневища	1309-37-1	[478]
Хлорогенова кислота	Протизапальна, антиоксидантна, антибактеріальна, протівірусна	5	Листя	327-97-9	[407.408]

Флавоноїди мають протівірусні властивості проти широкого спектру вірусів за данами *in vitro* та *in vivo*. Кверцетин пригнічує активність ВСС-1/КМС клітин аденовірусу [467], апігенін – MDCK клітин вірусу грипу [468], кемпферол – Vero клітини простого герпесу HSV-1 [469], ірисолідон проявив дію на моделі *Primary astrocytes* по відношенню до Вірусу Джона Каннінгема [475] та проти вірусу грипу А [477]: текторидин призводив до захисного антиоксидантного шляху Nrf2/НО-1, виявляв захисну дію *in vivo*, пригнічуючи експресію TLR4, MYD88 і NF-κB, які були двома основними медіаторами запалення [477].

Іригенін проявив виражену протизапальну активність у макрофагов RAW264.7, знижуючи рівень активності ядерного фактора каппаВ (NF-каппаВ) [476]. Він також мав потужну протівірусну активність у інгібуванні вірусу простого герпесу типу 2 (HSV-2) [135, 470–473]. Результати ряду досліджень свідчать про те, що мангіферин пригнічує пізню реплікацію HSV-2 [472].

Мангіферин виявляв *in vitro* та *in vivo* протівірусну активність для штамів HSV-1 AR-29 та KOS [473]. Рослинні ефірні олії та їх компоненти показали виражений протигрипозний потенціал [478]. Це свідчить про можливий вклад і α-ірону у протівірусну дію кореневищ ірису, але подальші дослідження необхідні.

Враховуючи встановлений кількісний вміст фенольних речовин у сировині та екстрактах кореневищ видів ірисів (від 2 до 30 мг/г), їх можна розглядати як потенційні Q-маркери видів ірисів з точки зору відносної важливості в лікуванні вірусних захворювань, крім того вони виявлені в досліджуваних зразках і є доступними стандартами. Структурні формули речовин-маркерів для кореневищ і угорського наведено на рисунку 5.20. 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 на основі їх протівірусного та протизапального, цитотоксичного потенціалу. Фармакологічні дослідження підтверджують їх значний вплив на ефективність. Обрані маркери якості сировини видів ірисів у подальшому було використано при розробці стандартизації вирощування рослин з стабільним вмістом діючих речовин.

Оскільки для екстрактів з листя і. угорського не було визначено найвираженішої фармакологічної дії, окрім антиоксидатної та антибактеріальної, були запропоновані потенційні «хімічні маркери», тобто речовини, що не мають відношення до активності фітопрепарату (або це не доведено), але характерні (специфічні) для цього виду рослини (табл. А.98, Додатки). Враховуючи експериментальні дані літератури щодо антиоксидатної [11, 52, 142, 146, 147, 148], протизапальної [158, 411, 474, 479], антимікробної [152, 277], імуномодельючої [5, 11], противірусної [480, 481] та цитотоксичної дії [126, 156, 440] фенольних сполук ірисів, було обрано три основні сполуки, включаючи мангіферин, іригенін, хлорогенову кислота (рис. 5.20) для аналітичного контролю сировини та екстрактів листя і. угорського.

## Висновки до розділу 5

1. Для якісного аналізу та кількісного визначення видо-специфічних ізофлавоноїдів у рослинах роду Ірис, було модифіковано ВЕРХ методику. Використання обернено фазної колонки АСЕ С18 зі змінами у пропорції градієнтну (0,1% розчином оцтової кислоти у воді (А) та ацетонітрил (В)), призвело до кращого розділення сполук з гарною симетрією піку. Методику було апробовано на кореневищах і. білого, і. угорського, і. строкатого, і. сибірського, а ідентифікація речовин підтверджена даними УЕРХ-МС. Найбільший кількісний вміст для текторидину (3,921 мг/г), нігрицин (2,267) та іристекторигеніну В (0,750 мг/г) встановлено у зразку і. угорського. Кількісний вміст германайзму 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 до 6,285 мг/г та від 7,507 до 7,353 мг/г, відповідно) порівняно з іншими дослідженими видами ірисів.

2. Досліджено вплив факторів навколишнього середовища на вміст 25 фенольних сполук у кореневищах та листі і. німецького, і. солелюбивого, і. сибірського, і. болотного із 16 популяцій ірисів Латвії, Литви та України.

Домінуючими речовинами були: мангіферин, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон, текторидин, германаїзм В, іристекторигенін В, іригенін, ірисолон. Кореляційний аналіз показав, що метеорологічні фактори пояснюють 80,07% варіації; вміст фосфору та калію – 52,35% та 43,07% варіацій відповідно; географічні фактори – 80,57% та 8,94% варіацій. Таким чином, тривалість сонячного випромінювання, вміст фосфору та калію, висота місцевості, мали ключовий вплив на накопичення фенольних сполук у кореневищах видів ірисів.

3. Досліджено профіль карбонових кислот у кореневищах ірисів (*I. graminea*, *I. sibirica*, *I. halophila*, *I. hungarica*, *I. pallida*, *I. variegata*, *I. pumila*, *I. musulmanica*, *I. carthaliniae*, *I. medwedewii*) та 15 зразків листя ірисів, домінантними визначено: лимонну, яблучну, щавлеву,  $\alpha$ -лінолеву кислоту.

4. Аналіз компонентів ефірної олії ірисів України, показав перспективність впровадження у вирощування ефіроолійної сировини і. блідого та і. угорського та крім того відмічене високий вміст маркерних сполук ( $\beta$ -іонон,  $\alpha$ -ірон (до 2,2%), *транс*-2,6- $\gamma$ -ірон) у малодосліджених видах чи сортах ірисів (серед них *I. musulmanica*, *I. virginica*, *I. notha*, *I. halophila*, *I. hybrida Stocholm* та інші).

5. ВЕРХ аналіз водних та етанольних екстрактів кореневищ та листя і. угорського, і. сибірського та і. строкатого, які одержано за удосконаленою методикою з УЗ-екстракцією та ліофілізованим висушування, показав більший вихід БАР. Було ідентифіковано до 23 фенольних сполук у екстрактах, крім того вміст мангіферину (вміст від 0,80 до 7,34 мг/г), германаїзм В (від 0,12 до 90,76 мг/г), іристекторигенін В (2,82 – 9,25 мг/г), іригенін (2,03 – 35,04 мг/г) та 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон (1,06 – 5,04 мг/г) був домінантним.

6. Екстракти і. угорського продемонстрували антиоксидантну активність (50,32 мкмоль/г) методом ВЕРХ-АВТS завдяки наявності мангіферину, галової та кофейної кислот. Екстракт кореневища і. строкатого показав легкий ефект посилення активності NRF2 на 72,7% у нормальних клітинах шкіри, що вказує на цитопротекторні властивості. Етанольний екстракт кореневищ і. угорського мав виражену цитотоксичну активність проти потрійно негативних клітинних ліній раку молочної залози (EC<sub>50</sub> 0,57 мг/мл). Екстракти ірисів також мали виражену

антибактеріальну дію до *St. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* (16,0 – 19,3 мм). Екстракти та полісахаридний комплекс з листя і. угорського проявили помірну противірусну та протизапальну дію, але етанольний екстракт листя і. сибірського мав виражену антибактеріальну дію. Одержані екстракти видів ірисів належать до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова.

7. Водний екстракт кореневищ і. угорського (0,5 мг/мл) мав 80% захисний ефект до вірусу грипу (EC<sub>50</sub> 125 мкг/мл), виражений протизапальний потенціал з пригніченням утворення супероксид-аніону (10 мкг/мл) на 41,0%. Водний екстракт і. строкатого (0,5 мг/мл) мав виражений захисний ефект проти ентеровірусу D68 від 30%. Вдосконалення методики виділення речовин з кореневищ і. угорського, дозволило виділити 12 нових речовин (іристекторигенін В, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон, кікалідон, ірисолідон, іристекторін В, германізм В, ірилон, апігенін-7 глюкозид, кемпферол, ізокверцитрин, коричну та кумарову кислоти), та крім того 18 раніш описаних речовин. Із застосуванням ChemGPS-NP було оцінено противірусний потенціал фенольних сполук, що було підтверджено тестами *in vitro*: протигрипозний ефект встановлено для апігеніну (100% інгібування при 50 мкМ), кемпферолу (92%), кверцетину (48%), протиентевірусна активність є для: ірисолідону (1,95% інгібування при 50 мкМ, IC<sub>50</sub> 9,2 мкМ), кікалідону (5,93%) та кемпферолу (14,83%).

8. Базуючись на критеріях Herb MaRS було запропоновано вісім речовин-маркерів для контролю якості кореневищ та листя і. угорського та видів ірисів, включаючи ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин та  $\alpha$ -ірон на основі їх противірусного та цитотоксичного потенціалу; а для листя ірисів – мангіферин, іригенін, хлорогенову кислота. Обрані речовини та параметри впливу факторів навколишнього середовища на БАР ірисів, враховані при розробці умов стандартизації вирощування видів та сортів ірисів.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [38, 277, 343, 348, 430, 423, 432, 446 – 450, 479 – 492].*

## 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. На урожайність та якість ЛРС впливають умови навколишнього середовища, методи культивування та післязбиральна практика. Розробка етапів культивування відповідно до рекомендацій GACP є гарантом якості сировини та стабільного вмісту БАР. Наші дослідження хімічного складу сировини к. посівного та рослин роду Ірис дозволили ідентифікувати специфічні маркерні речовини для кожного виду сировини. Ці маркерні сполуки, включаючи ізофлавоноїди, ксантони та апокаротиноїди, служать індикаторами ідентичності, якості та ефективності ЛРС. Наявність цих маркерних сполук у сировині має вирішальне значення для підтримки якості та надійності майбутніх фітопрепаратів. Забезпечення наявності маркерних сполук у ЛРС формує фундаментальний аспект доказової фармації, забезпечуючи наукову основу для ефективності та безпеки ЛРЗ.

#### 6.1 Імплементация принципів Належного культивування к. посівного в Україні

Належне виробництво ЛРС включає не тільки слідуванню принципам GACP, але і комплексне, тобто раціональне використання побічних продуктів виробництва основного виду сировини. Наше дослідження було зосереджено, як на розробці етапів належного вирощування к. посівного для одержання вихідної сировини – приймочок, так і на дослідження побічних продуктів – листя, оцвітини та дрібних БЦ к. посівного, в рахуванням раніше одержаних даних щодо впливу факторів навколишнього середовища на накопичення речовин-маркерів.



### 6.1.1 Дослідження умов культивування рослин роду Крокус в Україні

Дослідження були започатковані у ФГ «Шафран Любимівський» (снт. Любимівка, Херсонська область; на 2016 рік назва була ЧП «Демченко») та проводили впродовж 2017 – 2021 рр. на базі ФГ «Шафран Любимівський». З 2018 по 2021 р. до проекту долучились ще 22 фермерських господарства з інших регіонів України (рис. 6.1), що дало можливість порівнювати умови вирощування шафрану, кліматичні характеристики різних районів, склад ґрунту та хімічний склад сировини [23]. В результаті було запропоновано стандартизовані умови вирощування к. посівного на території України з одержанням якісної ЛРС.

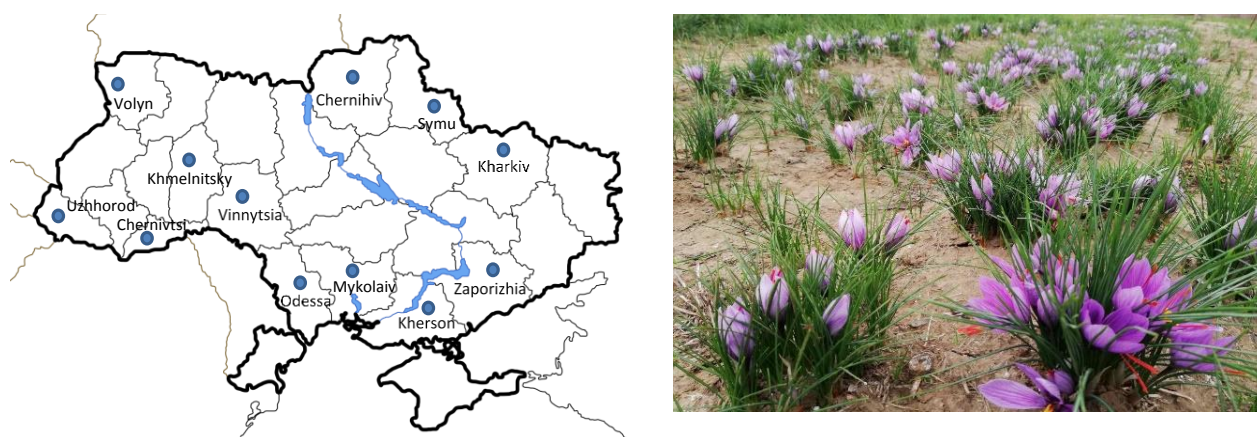


Рис 6.1 Регіони України, задіяні у дослідженнях умов вирощування к. посівного та визначенні його показників якості та зовнішній вигляд плантації з ФГ «Шафран Любимівський» з дотриманням вимог GACP

На сьогодні основними регіонами масового вирощування к. посівного в Україні є Херсонська та Волинська області. Селище Любимівка (висота 58 м н.р.м., північна широта 47.39278N; східна довгота 33.71667E) – невеликий населений пункт Каховського району з помірно-континентальним посушливим кліматом у степовому півдні України. Середньорічні температури: влітку +25,4°C, взимку – 2,1°C. Тривалість безморозного періоду 179 днів на рік. Середньорічна кількість опадів становить від 320 мм до 400 мм. Селище Борочиче розташоване в Горохівському районі Волинської області України (50°25'46" пн.ш.; 24°49'25" сх.д.) на висоті 222 м н.р.м. Кліматичні дані інших

приватних шафранових фермерства в Україні наведені в таблиці 2.2. Дані наведено за 2018 рік, коли розпочалося масове вирощування культури.

*Грунт.* Зразки ґрунту для дослідницької роботи першими заготовляли у смт. Любимівка з «експериментальної ділянки» (ЕД) по вирощуванню к. посівного відповідно до вимог ГАСР, а також з основної плантації вирощування (ОП, 3 га). З 2018 року, зразки ґрунту були заготовлені в усіх регіонах у передпосадковий час, де було започатковано вирощування к. посівного. Порівняльний аналіз агрохімічних показників різних плантацій з культивування к. посівного по регіонам України наведено у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

**Агрохімічні показники ґрунту з основних регіонів культивування к.  
посівного в Україні**

Зразок з ґрунту	Гумус, %	pH води	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	K <sub>2</sub> O, мг/кг	N, мг/кг
Херсонська обл. (ЕД <sup>а</sup> )	1,42	8,01	847,0	132,0	72,8
Херсонська обл. (ОП <sup>б</sup> )	1,12	6,50	187,0	236,6	42,0
Одеська обл. (ЕД)	4,36	7,00	147,0	151,6	61,6
Запорізька обл. (ЕД)	3,59	7,12	463,0	571,2	56,0
Вінницька обл. (ЕД)	3,21	7,22	712,0	975,6	310,8
Чернігівська обл. (ЕД)	2,98	7,40	856,0	195,6	92,4
Харківська обл. (ЕД)	2,21	6,50	455,0	223,0	33,6
Закарпатська обл. (ЕД)	3,87	5,58	436,9	261,9	99,4
Миколаївська обл. (ЕД)	3,50	6,55	348,0	457,1	60,6
Хмельницька обл. (ЕД)	2,75	4,80	363,0	276,2	42,8
Луцьк обл. (Волинь) (ЕД)	2,61	7,42	10,0	94,0	126,0
Чернівецька обл. (ЕД)	3,25	6,82	438,0	278,2	76,5
Сумська обл. (ЕД)	2,17	6,77	451,0	137,9	42,6

Примітка. <sup>а</sup> Експериментальна ділянка; <sup>б</sup> Основна плантація.

Результати аналізу «ЕД» показали, що кислотність ґрунтів у регіонах можна охарактеризувати як середньо лужну (рН 8,52), вміст гумусу низький (1,4%), забезпеченість азотом дуже низька (72,8 мг/кг). Показники фосфору та калію мають підвищений вміст на ділянці, за рахунок того, що попередньо, до посадки БЦ у ґрунт вносили перегній.

На відміну від «ЕД», вміст гумусу на основній плантації був значно меншим (0,9%), вміст рухомого фосфору був досить високим (187 мг/кг), але меншим у порівнянні з «ЕД» (табл. 6.1), напевне, за рахунок того, що на «ОП» не вносили перегній для додаткового збагачення ґрунту органічними добривами. Ступінь кислотності на плантації був нейтральним (рН 6,5), але для кращого вирощування к. посівного потрібні слабко лужні ґрунти [17 – 19]. На формування ґрунтового покриву в місцях збору ЛРС помітний вплив робить рельєф місцевості. Для вирощування к. посівного було обрано оптимальний тип місцевості – рівнинна, добре освітлена [497]. Виробництво шафрану проводилось без додавання мінеральних добрив, фумігантів або пестицидів.

Впродовж кожного року фіксувались кліматичні показники у кожному регіоні для оцінки їх впливу на дати висаджування та збору сировини та вибору оптимальних кліматичних регіонів для вирощування.

Враховуючи експериментальні дані, щодо впливу складу ґрунту, особливо вмісту фосфору, на накопичення обраних маркерів шафрану – кроцину та рутину, ґрунти у Херсоні (експериментальна ділянка) та у Чернігові мали гарні показники вмісту БАР, але об'єми врожаїв шафрану у Чернігові значно менші, що обумовлено більш холодним та вологим кліматом регіону.

*Клімат.* У кінці серпня, коли розпочинають підготовку ґрунту для посадки БЦ к. посівного середньодобова температура у Херсонській обл. становить 22–30°C, при цьому перепад із нічною температурою складає 5–7°C. Кількість опадів на кінець серпня ще досить низька 5–10 мм. Таким чином, відсутність надлишку вологи сприяє доброму укоріненню БЦ, і компенсується поливами раз у 15 днів. На початок цвітіння (кінець вересня – початок жовтня) середньодобова температура знижується до +10°C, а кількість опадів становить 30 мм. Крім того, тривалість сонячного випромінювання на жовтень складає 173–175 год. К. посівний продовжує цвітіння до кінця жовтня – першої половини листопада. Середньодобова температура у листопаді становить 4–5°C, а кількість опадів 27–35 мм. Таким чином, умови для збору врожаю сприятливі. Кліматичні умови Херсону дещо схожі із Середземноморським регіоном Сардинія (Італія). Вони

знаходяться на одній висоті над рівнем моря (58 м), а середньорічна температура Сардинії (16–20 °С) трохи вище, ніж в Україні (10–12 °С), а кількість опадів (Сардинія 300–600 мм/рік, Україна 350–450 мм/рік) приблизно однакові, що обумовлює схожі показники вмісту БАР. За результатами порівняльного аналізу було розроблено параметри СОП культивування к. посівного в Україні.

Як нами встановлено у розділі 3, на загальний вміст кроцинів та пікрокроцину у шафрані найбільший вплив чинять показники тривалості сонячної радіації, сонячного УФ-індексу та тип ґрунту. Таким чином, при вирощуванні к. посівного в умовах України, перевагу слід надавати північно-східним регіонам, які відповідно до ґрунтово-кліматичних особливостей є більш придатними для вирощування рослини та видобутку ЛРС із надійним складом БАР. У випадку переважно виробництва побічних продуктів шафрану, увагу слід звернути на південно-західні регіони (Херсон, Вінниця, Одеса), так як на біосинтез їх маркерів-якості (фенольні сполуки) найбільший вплив чинили тривалість сонячного сьйва, сонячний УФ-індекс, тип ґрунту та тип клімату.

### 6.1.2 Розробка СОП культивування к. посівного в Україні

До сьогодні не проводилась системна дослідницька робота, яка б представляла науково-обґрунтовані етапи культивування к. посівного в Україні. Застосування розроблених принципів GACP забезпечуватиме вирощування сировини належної і стандартної якості в областях з різними кліматичними та агрохімічними умовами. Для запровадження принципів GACP при культивуванні к. посівного була експериментальним шляхом розроблена та науково обґрунтована СОП для одержання якісної вихідної сировини, яка були імплементована у промислове виробництво шафрану в Україні (ТОВ «Агрофокус»; ФГ «Шафран Любимівський», «Крокус.про»; «Агроленд») та у Нідерландах («Mts Schipper & Elberse»). Серед положень є загальні статті для забезпечення якості ЛРС, такі як «Персонал і навчання», «Будівлі і приміщення», «Обладнання» та «Документація», «Насіння та посадковий матеріал», які повинні

відповідати нормам GACP для гарантування якості виробництва. Враховуючі кліматичні відмінності регіонів вирощування к. посівного в Україні та методи післязбиральної практики, були запропоновані етапи виробництва з дотриманням критичних точок виробництва для гарантування належної якості шафрану.

Слід враховувати, що екологічні умови мають великий вплив на якість сировини, тому ми проводили дослідження хімічного складу шафрану із різних регіонів України та порівнювали показники українських зразків із зарубіжними зразками шафрану (розділ 3) та побічних продуктів його виробництва (розділ 4), окрім того у дослідження включали кліматичні, географічні та агрохімічні показники, для визначення впливу цих факторів на накопичення маркерів-якості шафрану. В результаті, було створено СОП для належного вирощування к. посівного відповідно до вимог GACP на території нашої країни. Дані етапи відображають вимоги до екологічно обґрунтованої технології вирощування, правила збору ЛРС (приймочки), переробки, збереження, які гарантують високу якість та безпечність продукції.

У вересні 2017 року було вперше проведено дослідницьку роботу по методам культивування к. посівного, визначення врожайності в основній зоні вирощування шафрану у Херсонській обл. Площа плантації становила 3 га. На рівнинній, добре освітленій плантації у вересні було висаджено 13 тон БЦ крокусу кулястої форми 3–5 см у діаметрі, вага 15–30 г. Для посадки було використано БЦ з попереднього врожаю даної ферми. При цьому вирощування українського шафрану проводилось відповідно до розроблено плану по нормам GACP і мало такі ж вимоги до культивування, яких дотримуються основні виробники: однаковий спосіб обробки і зберігання.

СОП: Виробництво приймочок шафрану.

*Визначення:* Культивована рослина: крокус посівний, *Crocus sativus* L., Saffran. Рід: *Crocus* L., Родина: *Iridaceae* Juss.

*Зібрана частина рослини:* три нитко-подібні червоні приймочки (не включаючи жовтої частини), довжиною 25 – 30 мм, які опускаються над світло-

фіолетовими пелюстками квітки (рис. 1.2). Крім того, у комплексне використання сировини включають побічні продукти виробництва шафрану.

*Опис рослини.* Багаторічна, низькоросла (висотою 8 – 30 см), цибулинна трав'яниста рослина з підземною кулястою БЦ, від якої відростає від шести до дев'яти сидячих листків, оточених у своїй нижній частині чотирма або п'ятьма широкими плівковими лусками. Кожна квітка утворена з блідо-червоно-пурпурової оцвітини, з циліндричної трубки довжиною близько 10 см та шістьох подовжених овальних сегментів, андроцею з трьох тичинок і гінецею з трьох синкарпних плодолистиків. Тичинки стрункі, витягнуті і блідо-жовті у середині трубки, розділені у верхній частині на три пониклі, глибоко-червоні приймочки [493]. Основні складові шафрану це пікрокроцин (4%), шафраналь, каротиноїдні глюкозиди (кроцини (2%) та їх аглікони кроцетин) (рис. 1.9).

Технологія культивування к. посівного згідно з традиційними методами і Настановою ГАСР складається зі стадій: вибір посадкового матеріалу, вибір місця культивування, аналіз ґрунту, кліматичний аналіз, підготовка ґрунту, внесення добрив, посів, розпушування, прополка, збір, висушування та пакування. Основні етапи особливостей вирощування шафрану в Україні:

*Опис посадкового матеріалу.* Сухі, м'ясисті БЦ кулястої форми, до 3–5 см в діаметрі, вагою 15–30 г, вкриті світло коричневими лусками.

*Місце вирощування.* Вирощування необхідно проводити на відкритій рівній місцевості, з добрим освітленням. Продуктивне вирощування рослини на одному місці можливе до 5–8 років, далі необхідно проводити сівозміну.

Для досягнення стабільного вмісту маркерів якості шафрану (кроцин, шафраналь, пікрокроцин, рутин, апігенін), перевагу слід надавати південно-східним регіонам України. При виробництві сировини листя, оцвітина, БЦ к. посівного вирощувати рослини слід у південних та південно-західних регіонах України, де більш інтенсивне відбувається природне накопичення маркерів якості – мангіферину, кемпферолу, кверцетину, ізоорієнтину, рутину, ізокверцитрину, ферулової кислоти в умовах клімату регіонів.

*Тип ґрунту.* Крокус вимагає розсипчастого, добре дренованого ґрунту для підтримання здоров'я БЦ через вологу зиму України. В умовах регіонів з низьким рівнем опадів важливим є добра водоутримуюча здатність. Рослина добре зростає в широкому діапазоні типів і текстур ґрунту, але найкраще продукує на ділянках з піщаною або суглинної текстурою. Оптимальним рівнем рН ґрунту вважають від слабкокислого до нейтрального. У зв'язку зі зміною сезонності в Україні, особливо для її південних областей характерне сильне пересушування ґрунту наприкінці літа, при цьому відбувається підвсмоктування карбонатів догори, за рахунок чого верхні шари ґрунту стають слабко лужними, що потрібно враховувати перед висаджуванням рослини, яка краще зростає саме на лужних ґрунтах. Слід звернути особливу увагу, що при вирощуванні з метою використання рослини, як лікарської сировини, ґрунт не повинен містити важких металів [211, 299, 494, 495]. Обов'язковим є проведення агрохімічного аналізу ґрунту [496]. У досліджуваному ґрунті важкі метали не знайдені.

*Збагачення ґрунту.* На кислих ґрунтах перед оранкою вноситься вапно в кількості, що дозволяє довести гідролітичну кислотність до рН 5–8. Для збагачення ґрунту плантації можна вносити органічне добриво (перегній) (10 кг/м<sup>2</sup>). Мінеральні добрива, фуміганти або пестициди при вирощуванні не застосовуються.

*Внесення добрив.* В перші роки вегетації після цвітіння та збору врожаю, на початку відростання листя проводять розпушування міжрядь з одночасним внесенням азотних добрив в дозі 75–100 кг/га. Глибина обробітку становить 8–10 см. В кінці вегетації, рекомендовано проводиться культивація з внесенням фосфорно-калійних добрив у дозі 60–90 кг/га діючої речовини.

*Кліматичні умови.* У кінці серпня, коли розпочинають підготовку ґрунту для посадки БЦ крокусу середньодобова температура у різних областях України становить від 19 до 28 °С, при цьому перепад із нічною температурою складає 5–7 °С. Кількість опадів на кінець серпня ще досить низька 5–30 мм. Таким чином, відсутність надлишку вологи, сприяє доброму вкоріненню БЦ, і компенсується поливами раз у 10–15 днів. На початок цвітіння (кінець вересня – початок жовтня) середньодобова температура знижується до +10°С, а кількість опадів становить 30

мм. Тривалість сонячного випромінювання на жовтень складає 173–175 годин. К. посівний продовжує цвітіння до кінця жовтня – першої половини листопада. Середньодобова температура у листопаді становить 0 – 5°C, а кількість опадів 27 – 35 мм. Кліматичні умови південної частини країни є особливо сприятливими.

*Умови висаджування.* 7–10 т/га сухих БЦ, глибина посадки – 15 см, відстань між БЦ – 10 см, відстань між рядками 15 см.

*Иригація.* Рекомендовано застосовувати підґрунтовий полив на 10 – 12 день після посадки, до періоду цвітіння. Виключення: наявність опадів, підґрунтових вод, які роблять ґрунт занадто вологим. В Україні, культура повинна отримувати близько 800–1200 мм води щорічно, через опади та/або зрошення. Експериментальний досвід показує, що дощ за 10–15 днів до цвітіння призводить до гарного цвітіння і високої продуктивності, тоді як в умовах посухи можна очікувати невеликих квіток з невеликими приймочками.

*Бур'яни, шкідники та хвороби.* Контроль бур'янів проводять за допомогою гербіцидів влітку або восени, до початку нового сезону крокусу. Крім того, гарні результати дає метод фрезування на глибину 5 см в літку після відмирання надземної частини. Ризик грибкових захворювань у БЦ може бути мінімізований методами лікування під час ротаційного пересадження.

*Збирання врожаю та врожайність.* В Україні, к. посівний квітне з початку жовтня та до кінця листопада. В ранковий час, ще до повного розпуску квіток, їх збирають вручну. Звіти про врожайність шафрану в Україні свідчать про 5 – 12 кг/га в рік відповідно до даних з фермерства.

*Первинна обробка: Сушіння.* Приймочки відокремлювали від оцвітини вручну. Висушують цілі (не подрібнені) приймочки у електричній сушарці з регульованою температурою 36–40°C та примусовою вентиляцією протягом 2 годин до появи ламкості на інтенсивне-брунатного забарвлення сировини.

*Зберігання.* Продукт має бути упакований в герметичні і світлозахищені контейнери, або у банки з темного скла, повинні бути підписані серійний номер, необхідно відправити його на якісний аналіз. Зберігання при температурі 4°C.



*Контроль якості.* Визначають якість шафрану щодо вимог харчової промисловості (ISO 3632 [15, 16]) та фармацевтичної галузі (ДФУ 2.4. «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup> [335]), де показники якості відрізняються (табл. 6.2). На рисунку 6.2 наведено порівняльні результати вмісту речовин-маркерів у зразках шафрану, що заготовлено з ділянок у Херсоні при слідуванні принципам GACP (експериментальна ділянка) та без (основна плантація). Як видно з рисунка, при дотриманні запропонованих вимог до вирощування к. посівного, вміст кроцинів, шафранлю та пікрокроцину значно збільшується.

Таблиця 6.2

### Основні показники визначення якості шафрану до ISO 3632 та ДФУ

Назва показника	Характеристика та норма	
	ISO 3632	ДФУ 2.4
Зовнішній вигляд	Висушені, темно-червоні, переплутані, поодинокі або сидячі на коротких стовпчиках по три приймочки з зубчастим краєм на дистальному кінці.	
Запах	Пряний, специфічний	
Смак	Пряно-гіркуватий, злегка терпкий	
Довжина	Не менше 2 см	2 – 4 см
Втрата в масі при висушуванні	не більше 12%	не більше 12%
Масова частка загальної золи	не більше 8.0%	не більше 7.0%
Масова частка золи, що нерозчинна в 10% HCl	не більше 1.0% - категорія I та II; не більше 1.5 % - III	вимоги відсутні
Ідентифікація (ТШХ)	ТШХ та/або ВЕРХ: штучні барвники мають бути відсутні	ТШХ встановлення наявності кроцину та виключення фальсифікації
Кількісне визначення	<i>Смак</i> (вміст пікрокроцинів $\lambda_{\max}$ 257 нм) max/min 70 – 30; <i>аромат</i> (вміст шафраналю $\lambda_{\max}$ 330 нм) max/min 50 – 20; <i>зabarвлення</i> (вміст кроцинів $\lambda_{\max}$ 440 нм) max/min 190 – 80	За визначенням питомого показника поглинання: для кроцину – не менше 180, для шафраналю – не менше 30, для пікрокроцину – не менше 60, у перерахунку на суху сировину

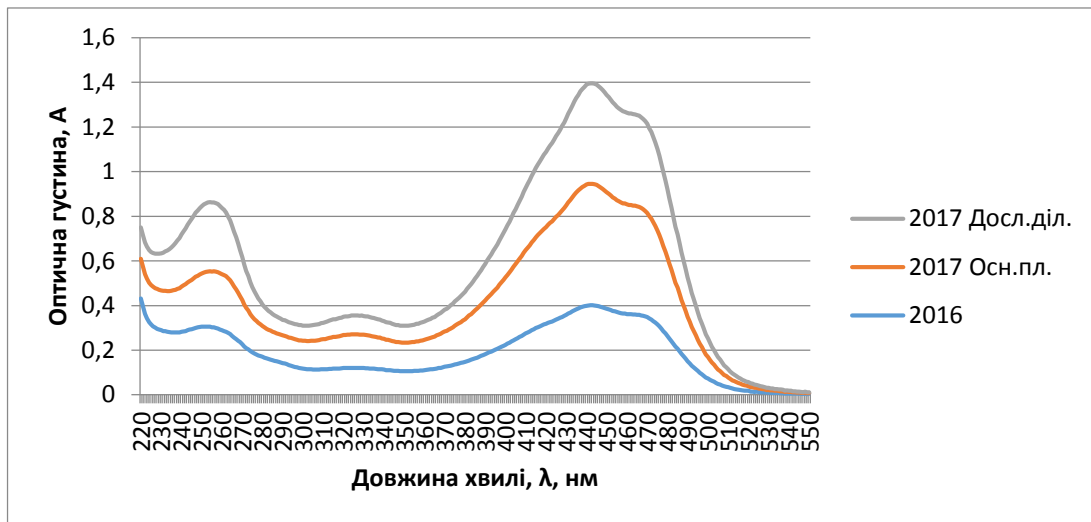


Рис. 6.2 Порівняльні спектри поглинання водних екстрактів шафрану (з основної та експериментальної ділянок, Херсон) відповідно до вимог ISO 3632

Для проведення зовнішнього аудиту господарства на відповідність технологічних процесів європейським вимогам з культивування к. посівного, було розроблено та опрацьовано протоколи проходження аудиту, узгоджені та адаптовані до умов вирощування в господарстві технологічні регламенти виробництва продукції, в які внесені відповідні строки здійснення контролю процесів вирощування, якості отриманої сировини, у відповідності до ґрунтово-кліматичних умов господарства [498, 499, 500].

При виробництві СОП для одержання побічних продуктів виробництва шафрану, зібраною частиною рослини є листя, оцвітина або дрібні, різані, неякісні БЦ к. посівного. Збір сировини проводять після збору шафрану до заморозків. Висушують при 30–50°C, зберігають у сухому місці. Стандартизовані умови вирощування к. посівного наведено у таблиці А.66 (Додатки).

### 6.1.3 Дослідження впливу методів передпосівної обробки к. посівного для впливу на біосинтез вторинних метаболітів

Передпосівна обробка посівного рослинного матеріалу є новим сучасним екологічним методом впливу на фізіологічні процеси у рослинних клітинах, які

призводять до стимуляції росту рослин, а також до численних фізіологічних і біохімічних змін, включаючи збільшення кількості цінних вторинних метаболітів [266]. Застосування фізичних методів передпосівної обробки до бульбоцибулинних рослин, включаючи к. посівний, раніше не проводили.

Тому було проведено дослідження реакції к. посівного на передпосівну обробку БЦ різними екологічними факторами стресу, такими як холодною плазмою (CP, 3 та 5 хв), вакуумом (V, 3 хв) та електромагнітним полем (EMF, 5 хв). 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.

*Оцінка впливу на кінетику проростання, зріст розсади та кількість листових трихом.* Контрольні та оброблені БЦ к. посівного висаджували на польових дослідних ділянках через 4 дні після обробки. БЦ починали проростати на 17-й день після висаджування, і динаміку їх сходів спостерігали та реєстрували кожні два дні до 49-го дня після садіння (рис. 6.3).

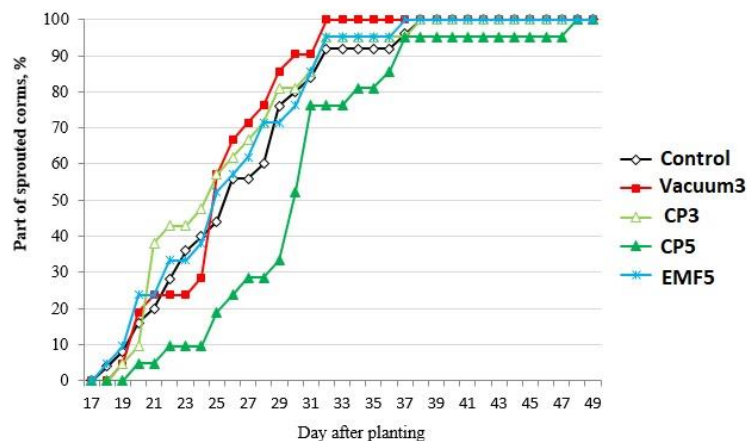
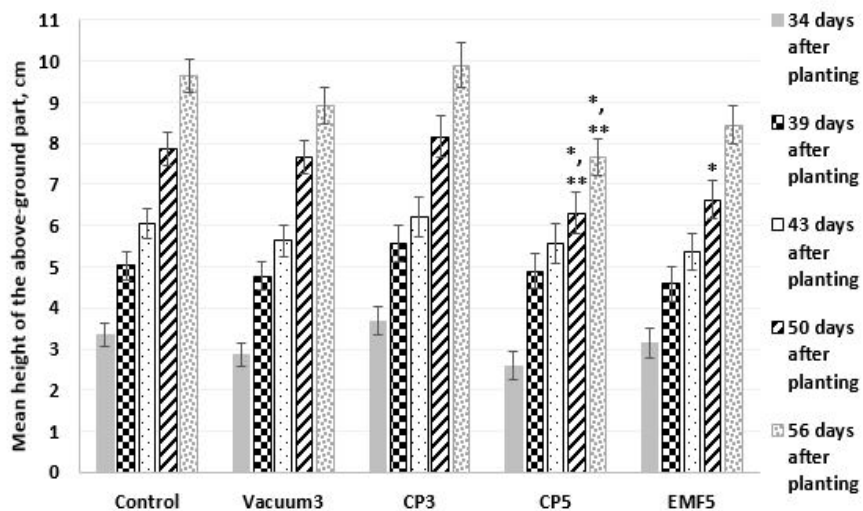


Рис. 6.3 Кінетичні криві проростання БЦ к. посівного

Встановлено, що максимальна схожість (життєздатність) в області контролю та оброблених БЦ становила 100% (рис. 6.3). Однак більш тривала (5 хв) обробка CP відзначалась затримкою проростання, тоді як обробка вакуумом

збільшувала рівномірність проростання на 28%. Зростання рослин у групах CP5 та EMF було уповільненим порівняно з контролем.

Висота надземної частини проростків не відрізнялася між групами на ранніх стадіях росту паростків (рис. 6.4). Ріст проростків у період 56 діб після висадки у групах вакууму, CP3 та EMF5 був таким же, як і в контролі, за винятком меншої на 15 % висоти розсади EMF5 на 50-й день після висаджування. Однак у групі CP5 на 50-56-й день після висаджування спостерігалось достовірне зниження висоти сходів – на 50-56-й день висота була на 19% і 28% меншою порівняно з контролем; тоді як відповідні цифри становили 17 і 13%, порівняно з групою V3.

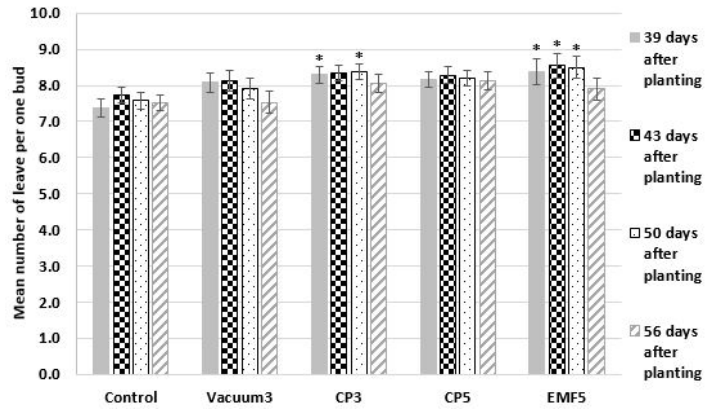


\* - достовірно відрізняється від контрольної групи ( $p < 0,05$ ); \*\* - значно відрізняється від групи V3 ( $p < 0,05$ ). Представлені середні значення  $\pm$  стандартна помилка ( $n=24$ )

Рис. 6.4 Динаміка висоти надземної частини (см) ростків к. посівного

Середню кількість листків, що розвинулися на одну бруньку, підраховували, починаючи з 34-го дня до 56-го дня після садіння (рис. 6.5). Кількість листя в групах V3 і CP5 не відрізнялася від контролю, тоді як обробки CP3 і EMF5 збільшили середню кількість листків на бруньку приблизно на 10%.

Мікроскопічний аналіз трихом листків проводили на 56 добу після посадки БЦ. На абаксіальній поверхні крипт виявлено прості одноклітинні трихоми різного розміру (рис. 6.6, 6.7).



\* - достовірно відрізняється від контрольної групи ( $p < 0,05$ ); середні значення  $\pm$  стандартна помилка ( $n=24$ )

Рис. 6.5 Середня кількість листків на одну бруньку у к. посівного

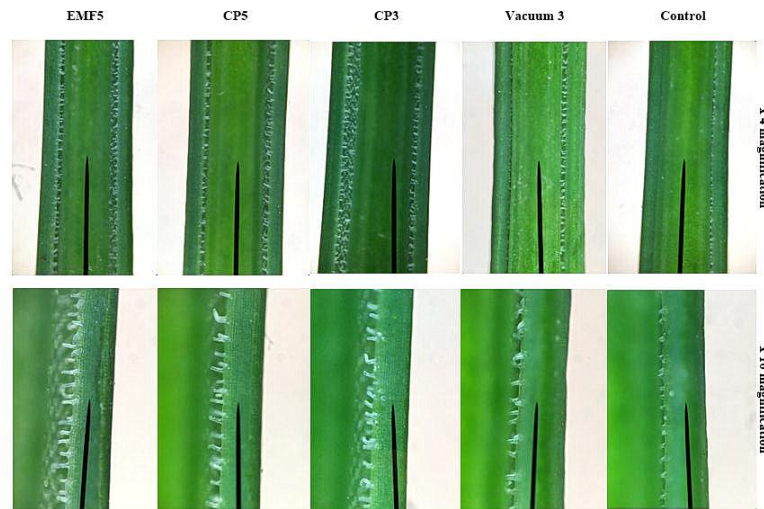
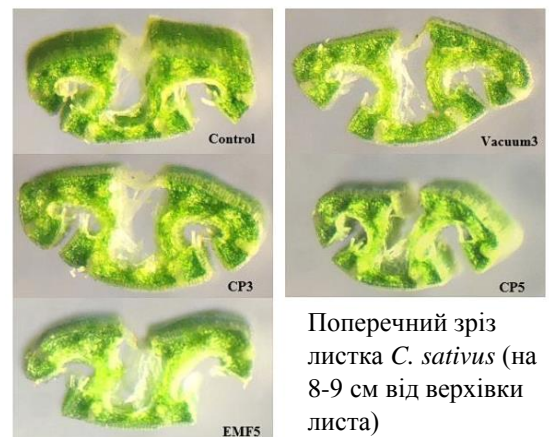
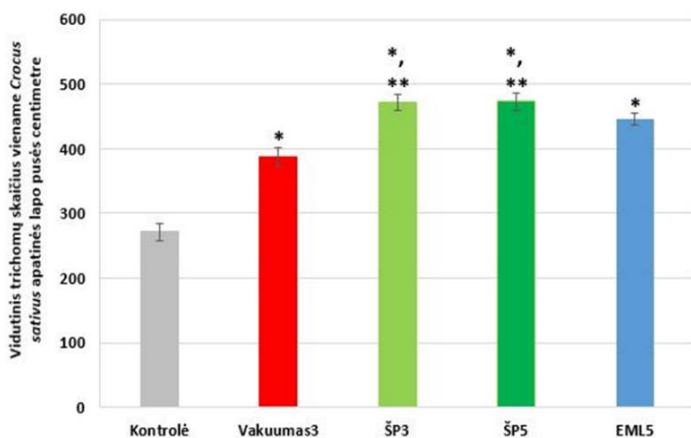


Рис. 6.6 Трихоми в листках к. посівного на абаксіальній поверхні апертури крипти (зображення на відстані 8–9 см від кінчика листка)



Наведено середні результати  $\pm$  стандартна помилка ( $n = 7$ )

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

\*\* - статистично достовірна різниця порівняно з групою V3 ( $p \leq 0,05$ )

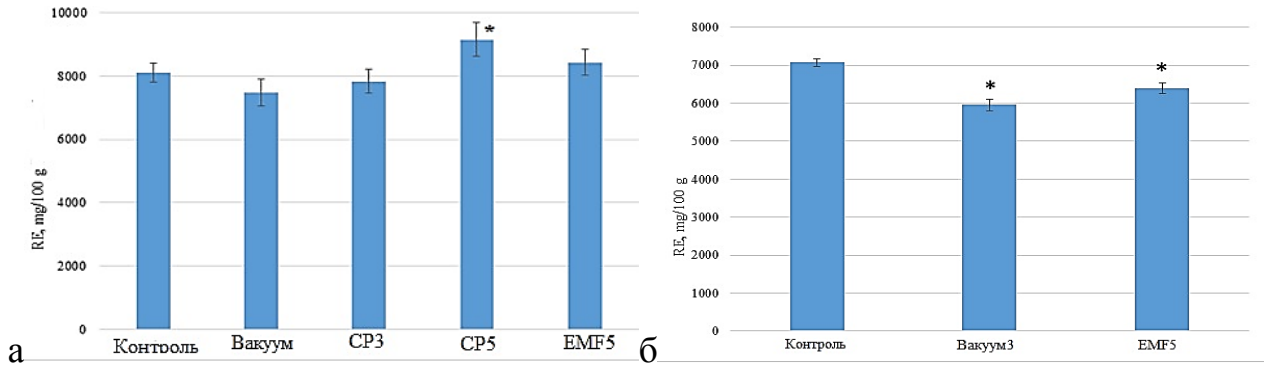
Рис. 6.7 Кількість трихом в нижній частині листя к. посівного

Визначення щільності трихом листка, спеціалізованих волосків, є важливим, оскільки волоски необхідні для захисту рослин від біотичних і абіотичних факторів та накопичують вторинні метаболіти. Обробка БЦ к. посівного усіма стресорами призвела до збільшення щільності трихом листя (рис. 6.7), і найбільший ефект (74%) спостерігався в двох групах, які отримували СР, тоді як обробки V3 і EMF5 були дещо менш ефективними (43 і 63%, відповідно). Щільність трихом в обох групах, які отримували СР, була на 23% більшою порівняно з групою V3, що свідчить про те, що обидва стресори сприяють ефекту. Рисунок 6.6 показує, що розмір трихом був більшим у всіх оброблених групах порівняно з контролем. Аналіз трихом листя є необхідним для визначення антиоксидантного потенціалу цієї сировини, оскільки основними БАР трихом, є терпеноїди, флавоноїди, метилкетони, ацильні цукри та захисні білки. І саме ці речовини були визначені нами як маркери активності.

Отримані результати показали, що обробка БЦ СР3 значно зменшила довжину та суху масу (43 та 60% відповідно) квіток. Результати показали негативний вплив СР на цвітіння, який прогресує з тривалістю обробки, так що рослини з групи СР5 не розвивали квіток. Обробка EMF5 мала позитивний ефект і збільшила довжину квітки на 27% порівняно з контролем. Відмінностей між дослідними групами за морфометричними показниками приймочок не виявлено.

*Оцінка впливу обробки БЦ вакуумом, СР та EMF на антиоксидантну активність листя та квіток крокусу.* Результати визначення антиоксидантної активності в екстрактах листя та квіток к. посівного з реактивом DPPH наведені на рисунках 6.8а та 6.8б. В екстрактах листя найвища активність поглинання радикалів була виявлена в групі СР5, яка була на 13% вищою порівняно з контролем. Активність поглинання радикалів в інших групах впливу статистично не відрізнялася від контролю. Антиоксидантну активність екстрактів квіток к. посівного визначали у 3 групах. Найвищу активність поглинання радикалів виявлено у контрольних екстрактах –  $7067,9 \pm 98,1$  мг RE/100 г (рис. 6.8б). Достовірно найнижчу (16% порівняно з контролем) активність поглинання радикалів визначено в екстрактах вакуумної групи –  $5956,2 \pm 149,3$  мг RE/100 г. В

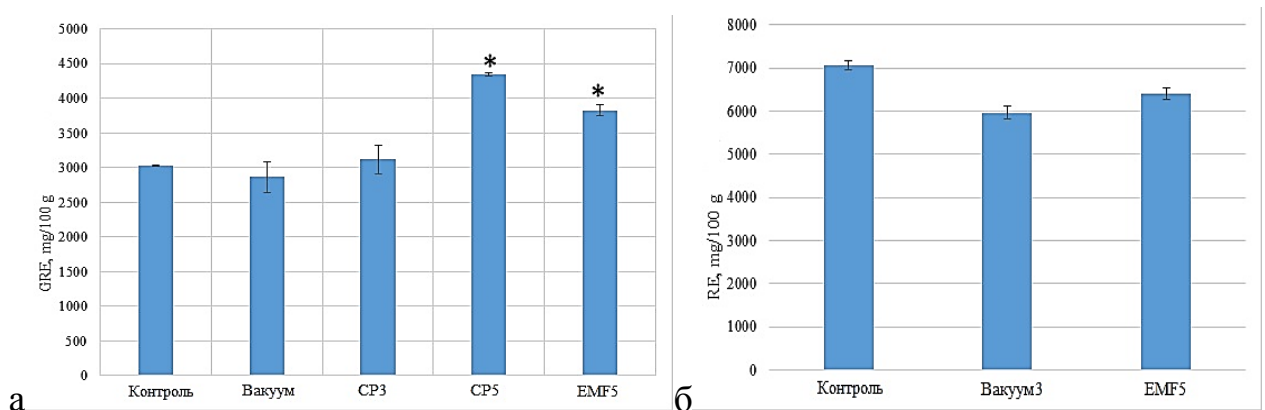
екстрактах групи EMF5 активність радикального зв'язування достовірно нижча порівняно з контролем на 10 %. В цілому спостерігалось, що активність поглинання радикалів DPPH екстрактів оцвітини (рис. 6.8б) на 13-20% нижча порівняно з екстрактами листя (рис. 6.8а).



Результати представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка ( $n = 2$ ), \* - статистично значуща різниця порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ )

Рис. 6.8 Антиоксидантна активність (а) листя та (б) квіток к. посівного

*Оцінка впливу обробки БУ вакуумом, CP та EMF на вміст фенольних сполук у листі та квітках крокусу.* СФ-методом встановлено, що в екстрактах з листя найбільшу сумарну кількість фенольних сполук виявлено для груп CP5 та EMF5. Значення для CP5 достовірно вище порівняно з контрольною групою на 44%, а EMF5 – достовірно вище на 27% (порівняно з контролем) (рис. 6.9а). Загальний вміст фенольних сполук V3 та CP3 групи був таким ж, як і контролю. Загальна кількість фенольних сполук на 5% нижча у V3 групі та на 3% вища у CP3.



Результати представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка ( $n = 2$ ), \* - статистично значуща різниця порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ )

Рис. 6.9 Загальний вміст фенольних сполук в екстрактах (а) листя та (б) квіток к. посівного після передпосівної обробки

Загальний вміст фенольних сполук в екстрактах оцвітини крокусу визначали у 3 групах. Найбільшу загальну кількість фенольних сполук виявлено в контрольній групі –  $9074,6 \pm 968,1$  мг ЕГА/100 г (рис. 6.9б). Загальний вміст фенолів у групах вакууму та EMF5 подібний, але відмінності порівняно з контролем не є статистично достовірними. Загальна кількість фенольних сполук в екстрактах квіток була значно (в 1,9 – 2,3 рази) вищою, ніж в екстрактах листя.

*Оцінка впливу вакуумної, СР та EMF обробки БЦ на вміст вторинних метаболітів приймочок к. посівного.* Методом ВЕРХ у зразках шафрану було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 26 сполук, з них 23 сполуки – естери кроцетину (кроцини), а також рутин, пікрокроцин та шафраналь. Типова хроматограма показана на рисунку 6.10, а хроматографічні характеристики (час утримування (Rt) при 440 нм та УФ-видимі спектри) ідентифікованих естерів кроцетину, шафраналю, пікрокроцину, рутину наведено у таблиці А.67 (Додатки).

Основними естерами 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 кроцинів показали додаткову смугу поглинання близько 324 нм у своїх спектрах поглинання. Що стосується частки естерів *цис/транс*-кроцетину, то хроматографічна площа естерів *транс*-кроцетину становила 85% від загальної хроматографічної площі при 440 нм. Зміни, викликані вакуумною обробкою, були меншими порівняно з змінами, викликаними СР та EMF. Найбільший ефект впливу на вміст вторинних метаболітів мала обробка EMF, зокрема – підвищення кількості G і S у 22 і 19 разів, C і L у 9 і 7 разів; суми F і H – в 4 рази відповідно.

Кількість пікрокроцину підвищувалася під впливом вакууму та EMF (34 і 18%), а в СР3 знижувалася на 45%. Певні сполуки, яких не було в контрольній групі (наприклад, P, R, U, X, Z, AA), були ідентифіковані лише в шафрані після стресових факторів. Результати кількісного визначення компонентів наведено у Табл. А.68 (Додатки). Застосований підхід є екологічним та перспективним для впровадження у виробництво [501].



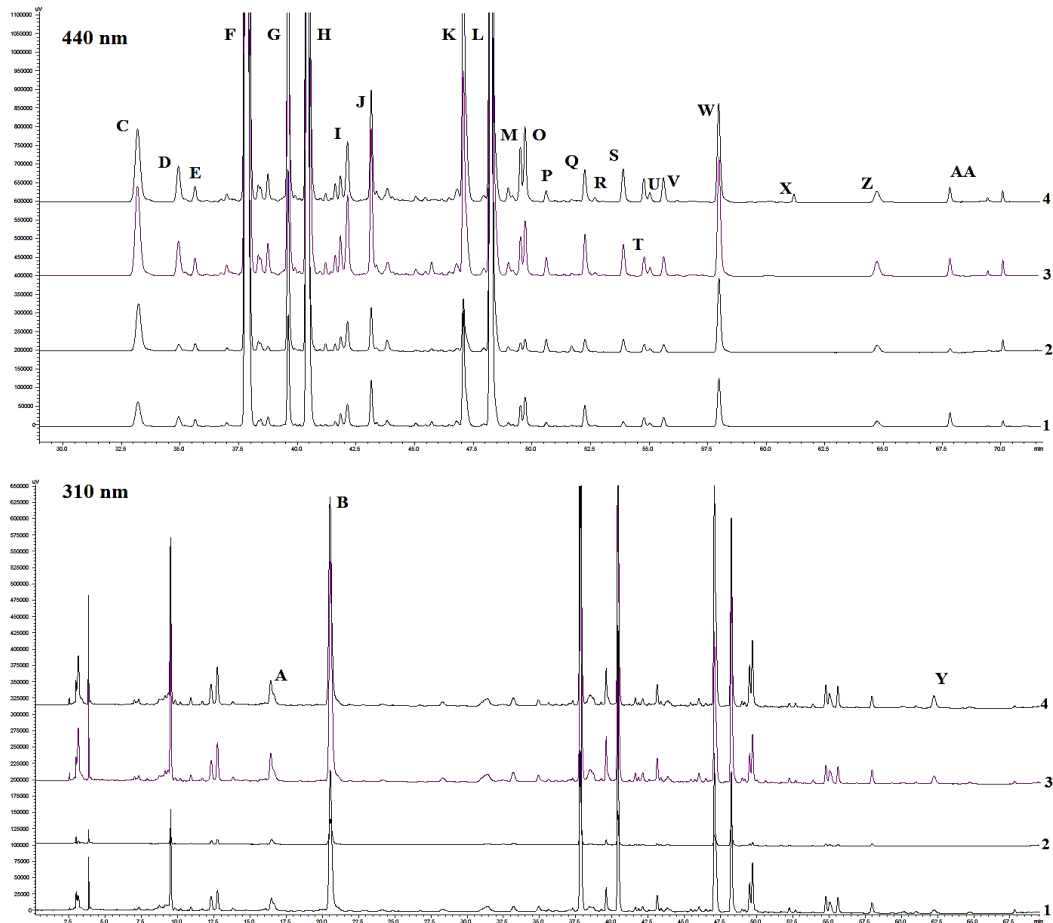


Рис. 6.10 ВЕРХ-хроматограма метанольних екстрактів шафрану, детектовані за довжині хвилі – 440 нм (а) і 310 нм (б)

Таким чином, враховуючи ґрунтово-кліматичні особливості регіонів України, застосування нового методи передпосівної обробки посівного матеріалу к. посівного може мати великий потенціал для забезпечення стабільного вмісту маркерів-якості (кроцин, пікрокроцин, шафраналь, рутин), з порівняно більшим вмістом речовин, на відміну від традиційного вирощування.

## 6.2 Імплементация принципів Належного культивування рослин роду Ірис в Україні та заготівля сировини у дикій природі

Для визначення оптимальних умов вирощування рослин роду Ірис та розробки етапів належного культивування рослин в Україні, ми порівняли екологічні характеристики основних місць вирощування ірисів у світі з ірисами

України. Відомо, що і. флорентійський, і. блідий, і. німецький як ефіроолійна сировина культивуються лише в Італії, Франції та Марокко [502, 503], і. різнокольоровий та і. болотний вирощують у США та Канаді як компонент біологічно активних добавок. Наприклад, в Італії (Тоскана) середньорічна температура (16–25°C) дещо вища, ніж в Україні (12–15°C), а кількість опадів (876 мм/рік) приблизно така ж. Ґрунт не може бути вапняковим, але піщана земля або чорнозем з нейтральним або слабкокислим середовищем (рН 6–6,5) ідеально підходить для вирощування рослин з кореневищами, наприклад, ірису. Іриси є теплолюбивими, тому місце зростання повинно бути максимально відкритим для сонячних променів. За кліматичними (табл. А.2, Додатки) та агрохімічними показниками типу ґрунту, а також багаторічним досвідом селекціонерів та ботаніків Україна має хороші показники для масового вирощування ірисів як ефіроолійної та ЛРС, що також обґрунтовано нашими дослідження БАР видів ірисів в залежності від факторів навколишнього середовища.

### 6.2.1 Дослідження умов культивування рослин роду Ірис в Україні

В Україні іриси зростають як у дикій природі такі у ботанічних садах, заповідниках, приватних колекціях та і по клумбам у містах. Іриси нашої країни є мезофітами, види досить екологічно пластичні, непримхливі до умов існування, успішно розмножуються, відносно стійкі до шкідників та хвороби, що робить ці рослини перспективними для введення в культуру. Для визначення умов вирощування ірисів в Україні було взято за основу, культивування ірисів у НБС ім. М.М. Гришка НАН України (Київ), БС ХНУ ім. В. Н. Каразіна (Харків), БС НФаУ (Харків) та у «Навчально-дослідницькій ділянці» (Миколаїв).

*Ґрунти.* Ґрунти з Києва, Миколаєва та Харкова, де культивують іриси, мають ряд схожих ознак (табл. 6.3). Вміст рухомого фосфору та обмінного калію в зразках дуже високий, 406, 435 та 520 мг/кг для фосфору та 284, 235 та 290 мг/кг для калію. Кислотність ґрунтів різна: слабкокисла для ґрунту з Києва, середньо лужна – для зразка з Миколаєва, та нейтральна – для зразка з Харкова.

Аналіз ґрунту з Києва показав дуже високий вміст гумусу (5,3%) у порівнянні з Харковом (1,5%) та Миколаєвом (1,2%), де вміст органічних речовин занадто низький. Порівнюючи дані літератури та власні дані, встановлено, що оптимальними для вирощування видів та сортів ірисів є пухкі ґрунти з нейтральним або слабкокислим середовищем (рН 6–6,5).

*Клімат.* Оптимальна температура для вирощування ірисів складає 15–17 °С. Ірис витримує температуру не більше 20 °С та не нижче – 0+ °С, при вирощуванні у відкритому ґрунті. Дослідження ритму сезонного зростання і розвитку сортових ірисів показало, що вегетація рослин починається при температурі 5 °С, бутонізація – при температурі понад 6 °С. Цвітіння бородатих ірисів відбувається при температурі понад 10 °С, що варіюється в залежності від сорту (12,5–19 °С). Відзначено, що висока температура повітря (понад 25 °С) і недостатнє зрошення сприяє більш швидкому зростанню і розвитку генеративних органів рослин. Взимку іриси знаходяться в стані відносного спокою.

Для Києва, Харкова, Миколаєва та України в цілому характерним є помірно континентальний клімат, із м'якою зимою і теплим літом. Середньомісячні температури для Києва на 2–3 °С нижчі ніж у Харкові. Середньорічна кількість опадів для Харкова становить 500–515 мм, що дещо менше ніж у центрі країни. Але іриси витримують коливання температури від 5 до 20 °С та надмірне зволоження чи тимчасове пересушування, бо є мезофітами, ксеромезофітами.

Враховуючи попередні експериментальні дані (розділ 5), щодо основного позитивного впливу на біосинтез фенольних сполук у рослинах роду Ірис наступних факторів навколишнього середовища: тривалість сонячного випромінювання, вміст фосфору та калію, висота місцевості, незважаючи на адаптацію ірисів до всіх регіонів України, з метою одержання ЛРС перевагу слід надавати центральним та південним регіонам країни 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 запропоновано експеримент по оцінці впливу монокомпонентних добрив на вміст фенольних сполук рослин роду Ірис.

Таблиця 6.3

## Агрохімічні показники ґрунтових зразків, в залежності від місця зростання ірисів в Україні

Місце зростання	БС ХНУ ім. В.Н. Каразіна, Харків	БС НФаУ, Харків	НБС ім. М.М. Гришка НАН України, Київ	Навчально- дослідницька ділянка, Миколаїв
Широта	50°00'16"N	49°58'50"N	50°27'16"N	46°57'57"N
Довгота	36°13'42"E	36°15'09"E	30°31'25"E	31°59'50"E
Висота н.р.м, м	123	122	187	18
Середньорічна t, °C	8,8	8,8	8,4	10
Середньорічна кількість опадів, мм	516	515	621	472
Відносна вологість, %	73	73	74	73
Потужність сонячного випромінювання, кВт/м <sup>2</sup> /день	3,9	3,9	3,10	3,55
pH водн.	6,12	6,70	5,65	7,89
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	455,0	435,15	406,0	520,28
K <sub>2</sub> O, мг/кг	223,9	235,12	248,2	290,90
N, мг/кг	33,6	98,7	103,6	138,0
Вміст гумусу, %	2,2	1,5	5,3	1,2

## 6.2.2 Вплив монокомпонентного живлення на біосинтез фенольних сполук у сировині ірисів

Метаболічні та клітинні функції вимагають мікроелементів, які необхідні для росту рослин, крім того вони мають значний вплив на біосинтез фенольних сполук. Однією з основних функцій магнію є участь у процесі фотосинтезу, оскільки  $Mg^{2+}$  входить до складу основного пігменту зеленого листа – хлорофілу [172]. Крім того, магній бере участь у метаболізмі як специфічний активатор чи ко-фактор низки ферментних систем [175] (рис. 1.14). У зв'язку з цим усі реакції, що включають перенесення фосфатної групи (більшість реакцій біосинтезу, а також багато реакцій енергетичного обміну) вимагають присутності магнію. Калій активує роботу багатьох ферментних систем [504], наприклад, фермент, що каталізує фосфорилування цукрів, – гексокіназу, ферменти, що каталізують перенесення фосфорної кислоти з пірувату на АДФ (піруваткіназа), а також ферменти, що беруть участь в утворенні АТФ у процесі окисного фосфорилування [505]. Залізо входить до складу каталітичних центрів багатьох окислювально-відновних ферментів (цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза та пероксидаза) [506]. Ціла низка ферментів містить залізо в негеміновій формі. Таким чином, іони  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  та  $K^+$  діють як кофактори різних ферментів, які беруть участь у біосинтезі фенілпропаноїдів у рослинах. Тому нами було висловлено припущення про те, що застосування кореневого та позакореневого підживлення хелатом заліза ( $Fe^{2+}$ ), хелатом калію ( $K^+$ ) та сульфатом магнію ( $Mg^{2+}$ ) у процесі вегетації сортових ірисів через регуляцію біосинтезу фенілпропаноїдів може підвищити рівень основних фенольних сполук у сировині. Дизайн експерименту наведено у таблиці А.69 (Додатки).

Для оцінки впливу монокомпонентного живлення на фенольні сполуки спершу було проведено тестове дослідження на прикладні ірису малого (*Iris pumila*). Було визначено розподіл основних мікроелементів в зразках кореневищ та ґрунтах, їх зв'язок з наявністю мінеральних відкладень, а також встановити зміну вмісту суми флавоноїдів у сировині при внесенні до ґрунту добрив, що

містять переважно іони цинку, магнію, калію або заліза. Добрива вносили на ділянки з ірисами на території БС НФаУ, одна ділянка була відведена під контроль (без внесення добрив). Добрива вносили у ґрунт у середині квітня 2018 р., сировину заготовляли через місяць у суху погоду. Результати аналізу ґрунту (табл. 6.4) показали, що усі 5 зразків мають дуже низький вміст гумусу (0,5 – 1%), ступінь кислотності слабколужна та нейтральна (6,9 – 7,3), показники фосфору дещо відрізняються – середній, високий та дуже високий вміст; вміст калію – дуже високий, а вміст гідролізуемого азоту навпаки низький (28 – 45 мг/кг).

Було проведено лабораторний аналіз зразків ґрунту та кореневищ ірису і розрахований коефіцієнт біологічного поглинання (КБП). КБП – це відношення концентрації елемента в рослинній золі до концентрації його в субстраті (табл. 6.5). Результати показують наявність певних елементів у сировині ірисів і ґрунтах, що можна пояснити біогеохімічним циклом елементів, механізмами виключення і біодоступністю, але який ступінь зв'язування не відомо. Для кореневищ ірису КБП іонів магнію, заліза та калію досить високі, що говорить про виражену здатність до накопичення зазначених металів. Отримані результати підтверджують, що кореневища ірису значно зв'язують калій (КБП = 14,4 – 2,42), магній (КБП = 5,2 – 953,5), цинк (КБП = 3,1 – 812,5). І, як наслідок, можна зробити висновок про вплив даних елементів на біосинтез флавоноїдів.

За результатами досліджень встановлено, що при додаванні у ґрунт добрив з основним вмістом магнію, калію та заліза (табл. А.70, Додатки) вміст суми флавоноїдів становив 2,1 – 2,2% у порівнянні з контролем (вміст флавоноїдів 1,8%), що свідчить про потенціювання метаболізму флавоноїдів. З урахуванням позитивної динаміки впливу добрив на загальний вміст фенольних сполук у сировині ірисів, дослідження було модифіковано та включало три сорти ірисів та обробку трьома монокомпонентними добривами.

Таблиця 6.4

Результати основних агрохімічних показників, а також вміст обраних елементів (мг/кг) у ґрунті та вміст суми флавоноїдів (%) у кореневищах і. малого (*Iris pumila*) “Violet carpets”

Зразок № / Внесено у ґрунт	Вміст гумусу, %	pH, сол,	Вміст у ґрунті Zn, мг/кг	Вміст у ґрунті CaMg мг,екв/100г	Вміст у ґрунті K <sub>2</sub> O, мг/кг	Вміст у ґрунті P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/кг	Вміст у ґрунті N легкогідр., мг/кг	Вміст суми флавоноїдів, %
1 -ZnSO <sub>4</sub> (22% Zn)	1,07	6,98	0,64	20	379	356,0	28,0	1,39 ± 0,03
2 -MgSO <sub>4</sub> (17% MgO)	1,00	7,21	0,43	20	301,9	258,0	29,4	2,09 ± 0,05
3 – FeEDTA (13% Fe)	0,90	7,24	0,43	24	193,4	88,6	44,08	2,20 ± 0,12
4 - K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (52% K)	0,82	7,26	0,63	19,2	187,5	88,3	42,0	2,19 ± 0,05
Контроль	0,51	7,30	0,38	19,2	131,2	174,0	40,6	1,86 ± 0,31

Таблиця 6.5

Вміст обраних елементів та їх коефіцієнти біологічного поглинання і. малий (*Iris pumila*) “Violet carpets”

Зразок № / Внесено у ґрунт	Вміст елемента (мг/100г)						КБП у кореневищах			
	Zn	Ca	Mg	Fe	K	P	Zn	CaMg	K	P
1 - ZnSO <sub>4</sub>	52	775	190	130	2000	110	812,5	9,5	52,77	3,1
2 - MgSO <sub>4</sub>	41	775	275	110	2275	135	953,5	13,75	75,4	5,2
3 - FeEDTA	48	695	190	87	1740	105	1116,3	7,92	89,9	11,9
4 - K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	71	810	200	121	2220	130	1126,9	10,42	118,4	14,7
Контроль	44	640	160	72	1760	120	1157,9	8,33	134,1	6,9

Для дослідження було обрано три сорти стандартних карликових ірисів DSB ірисів вітчизняної та зарубіжної селекції, а саме іриси сортів «Цікавинка», «Талібо», «Widcombe Fire». Перевагу було надано додатковому кореневому живленню, оскільки під час обмінної адсорбції рослини поглинають понад 90% поживних речовин (до 0,2%) з ґрунту підземними органами рослин. Цей процес відбувається на поверхні корневих волосків шляхом поглинання катіонів і супроводжується перенесенням у зовнішній розчин іонів водню [507, 508]. Було обрано два методи обробки: кореневе ( $MgSO_4$ ) та позакореневе (хелат заліза та хелат калію) підживлення для визначення їх впливу на біосинтез фенольних сполук.

*Зміни у складі ґрунту.* Гумус уповільнює зв'язування калію. При повільному окисленні гумусу вуглець виділяється у вигляді вуглекислого газу, що сприяє кращому розчиненню деяких мінеральних речовин ґрунту та полегшує їх засвоєння рослиною. При цьому після внесення добрив вміст гумусу збільшився до 6,21 %, а рівень вмісту обмінного калію різко знизився до 176,8 мг/г ґрунту (табл. 6.6), але все одно залишався досить високим.

Таблиця 6.6

#### Агрохімічний аналіз проб ґрунту

Ґрунт з ділянки	pH, мол/л	$P_2O_5$ , мг/кг	$K_2O$ , мг/кг	N (%)	Гумус, мг/кг	Ca, Mg, мг/кг	Zn, мг/кг
Ґрунт після живлення	6,74 ± 0,12	161,32 ± 2,84	176,80 ± 3,11	103,61 ± 1,82	6,21 ± 0,11	26,41 ± 0,46	3,27 ± 0,06
Контроль	6,63 ± 0,12	256,02 ± 4,50	290,42 ± 5,11	93,83 ± 1,65	5,58 ± 0,10	24,02 ± 0,42	3,07 ± 0,05

Примітка. Значення представлені як середнє ± стандартне відхилення від трикратних досліджень. Статистичні порівняння проводили за допомогою тесту ANOVA ( $p < 0,05$ )

Аналіз розподілу рухомого фосфору показав, що ґрунт після додаткового живлення має значно нижчий його вміст 161,3 мг/кг. Але це свідчить про високий вміст фосфору згідно ДСТУ 4115-20002. Отримані дані щодо вмісту калію і фосфору в ґрунті взаємопов'язані: зі збільшенням внесення калійних добрив засвоєння фосфору сповільнюється. Реакція



середовища в обох дослідях нейтральна, але після внесення додаткового живлення її зміщують на слабколужне середовище (рН сольового розчину 6,74 моль/л), що сприяє хорошему засвоєнню катіонів із ґрунту. Сума поглинених основ та вміст цинку були приблизно незмінними та високими за вмістом.

*СФ-дослідження фенольних сполук.* Оцінювали загальний вміст основних груп фенольних сполук (флавоноїдів, ізофлавоноїдів, ксантонів та гідроксикоричних кислот) у кореневищах, листі та квітках ірисів. Результати знаходились в діапазоні від 1,61 до 18,81% щодо загального вмісту ізофлавоноїдів, від 0,99 % до 19,82% для – суми гідроксикоричних кислот, від 0,70% до 20,04% для – суми ксантонів та від 3,57% до 65,18% для флавоноїдів у екстрактах кореневищ ірисів (рис. 6.11). Вміст речовин різнився в залежності від виду сировини (квітки, листки, кореневища), а також наявності або відсутності підживлення. Для листя ірисів також було відмічене підвищення загального вмісту фенольних сполук при застосуванні монокомпонентних добрив (рис. 6.12, табл. А.70, Додатки). Була відмінність для зразка сорту ірису “Widcombe Fire”: у контрольного зразка загальний вміст речовин був вищим, вірогідно це обумовлено біологічними особливостями сорту та потребують подальшого дослідження у динаміці. Аналіз загального вмісту фенольних сполук у квітках ірисів показав обернену залежність (рис. 6.13): у контрольних зразках вміст речовин був вищим, за виключенням сорту “Widcombe Fire”.

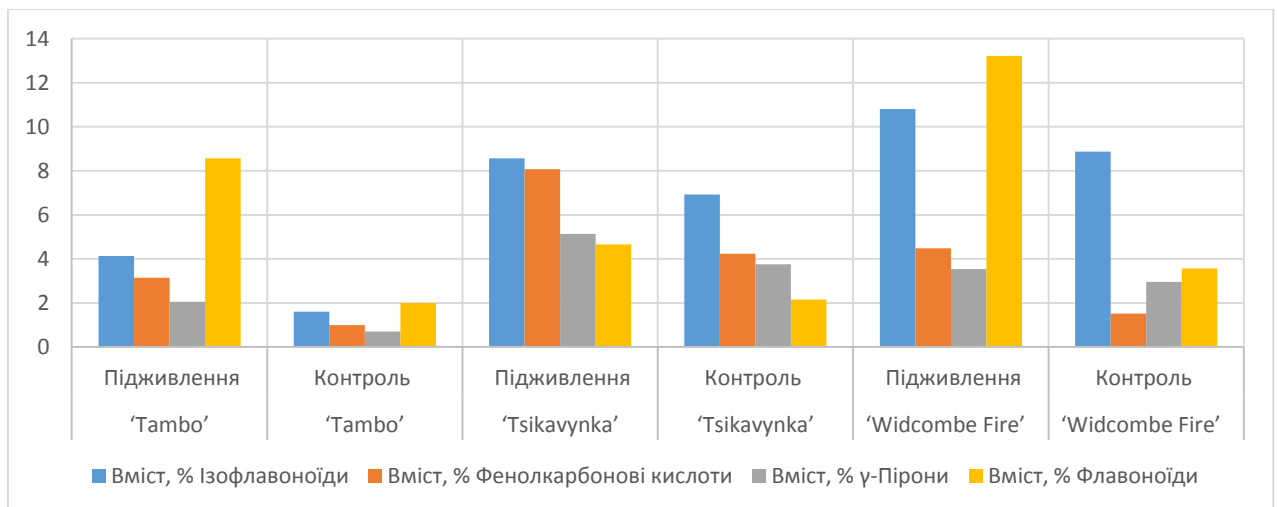


Рис. 6.11 Результати загального вмісту груп БАР у кореневищах ірисів СФ-методом

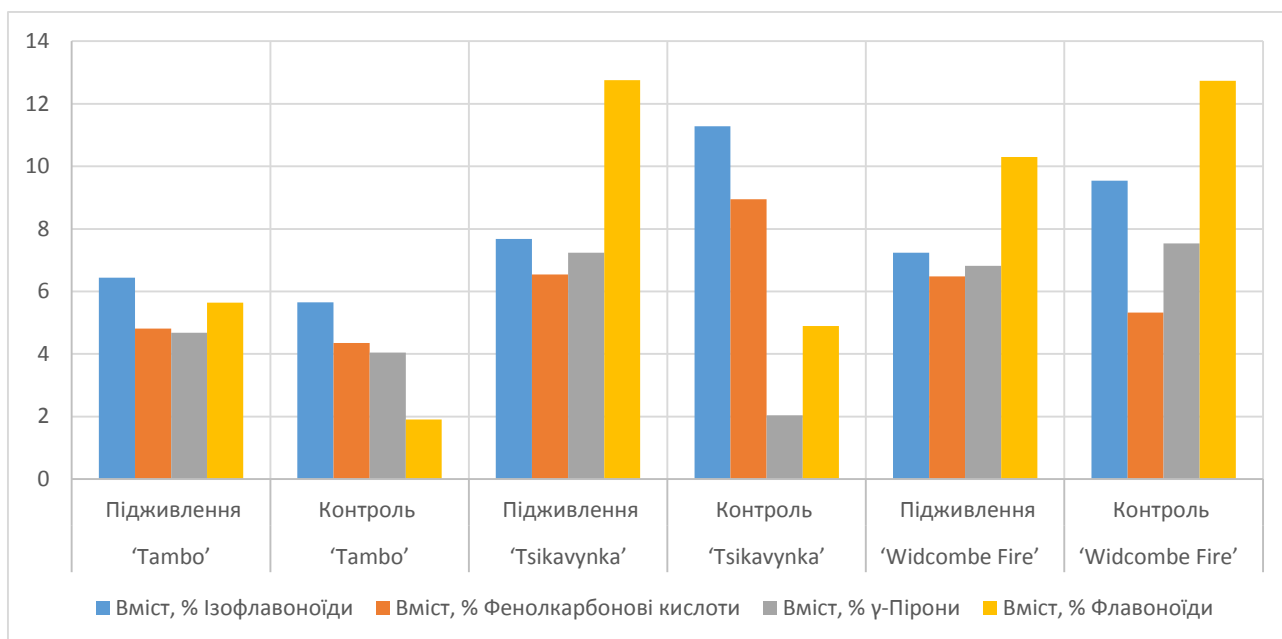


Рис. 6.12 Загальний вміст груп БАР у дослідних зразках листя ірисів при застосуванні та без застосування монокомпонентного живлення

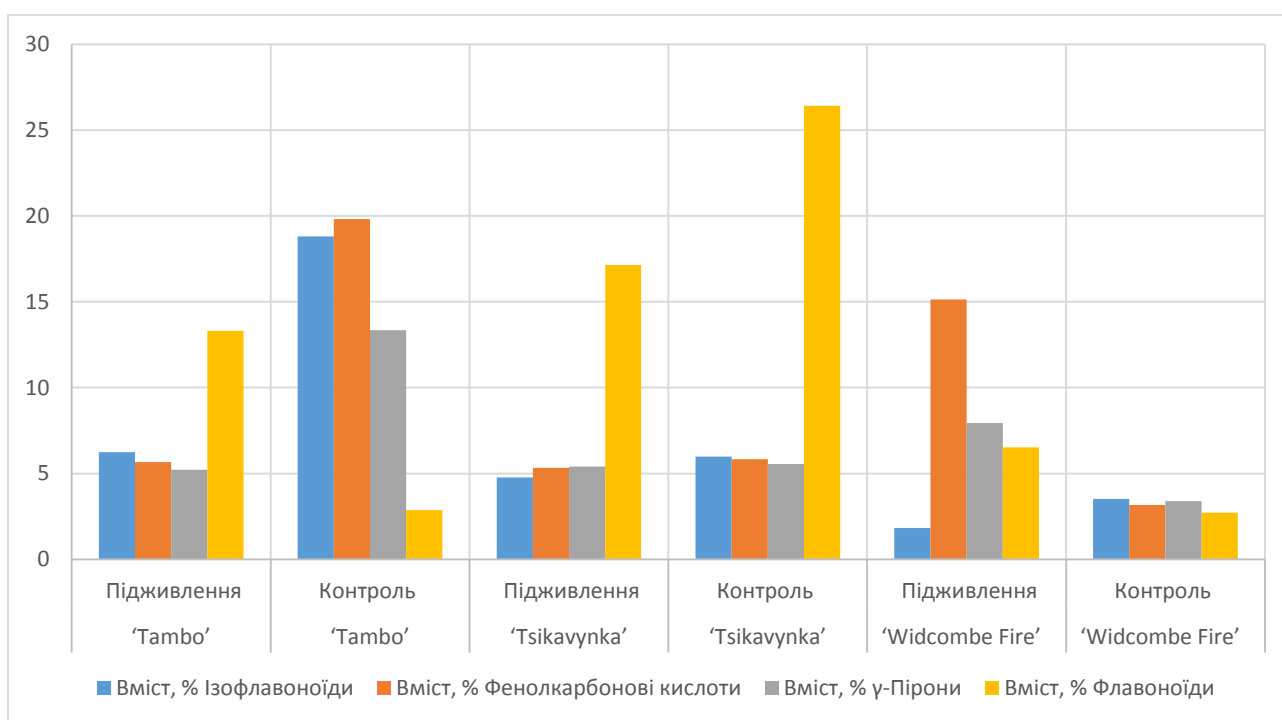


Рис. 6.13 Загальний вміст груп БАР у дослідних зразках квітів ірисів при застосуванні та без застосування монокомпонентного живлення

Це обґрунтовує застосування живлення для збільшення накопичення БАР у відповідних органах – кореневищах та листі ірисів. Слід відмітити, що експериментальні дані загального вмісту фенольних сполук на пряму корелювали з даними кількісного вмісту окремих речовин за методом ВЕРХ.

*ВЕРХ* аналіз речовин-маркерів. На основі результатів попередніх досліджень хімічного складу видів ірисів, було обрано дев'ять маркерних сполук (хлорогенова кислота, мангіферин, германаїзм В, геністин, текторидин, іристоригенін В, нігрицин, іригенін, ірисолідон) для оцінки впливу мінерального живлення, як абіотичного стресу, на біосинтез БАР ірису. Виділені сполуки поширені в рослинах роду Іриси та утворюються на різних стадіях їх формування. Хроматографічний профіль екстрактів кореневищ, листя та квітів сортових ірисів після внесення монокомпонентного живлення та їх контроль наведено на рисунках А.69-71 (Додатки). Результати кількісного вмісту речовин-маркерів у дослідних зразках кореневищ ірисів наведено на рисунку 6.14.

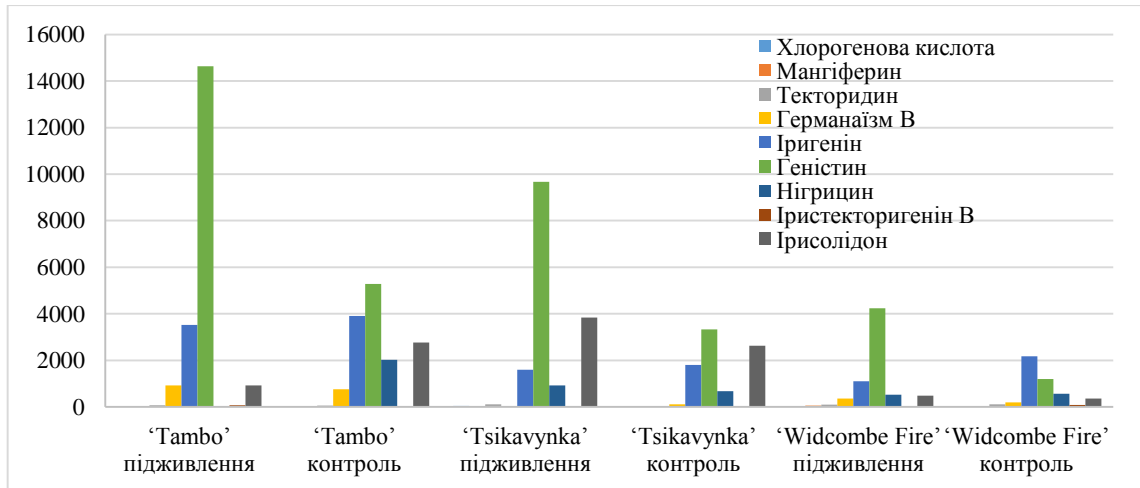


Рис. 6.14 Вміст маркерних сполук у кореневищах ірисів (ВЕРХ, мкг/г)

*Гідроксикоричні кислоти.* В загальному шляху фенілпропанної кислоти перетворення на етапі гідроксилювання під дією 4-гідроксилази корична кислота перетворюється у 4-кумарову кислоту, та у подальшому за шикімаатним шляхом перетворення утворюються інші гідроксикоричні кислоти (кофейна, ферулова, синапова). Кофейна кислота утворює димери з

ациклічними кислотами – хінною та шикимовою з утворенням хлорогенової кислоти.

Хлорогенова кислота була визначена практично в усіх зразках. Її вміст у листках ірисів усіх зразків був значно вищим ( $p \leq 0,05$ ) аніж у кореневищах. Це обумовлено тим, що активність 4-гідроксилази *транс*-коричної кислоти індукується освітленням за участі фотохромної системи. У зразках кореневищ ірису “Тамбо” хлорогенову кислоту не ідентифіковано, вірогідно, це обумовлено біологічними особливостями сорту, крім того вміст інших речовин також був менше, аніж у інших сортів. У експериментальному зразку кореневищах ірису “Цікавинка” вміст хлорогенової кислоти був незначним (37,95 мкг/г), проте у контролю речовина була відсутня взагалі. А зразки листя даного сорту мали високий вміст хлорогенової кислоти: 114,99 мкг/г (контроль) та 159,80 мкг/г (експеримент) (рис. 6.15).

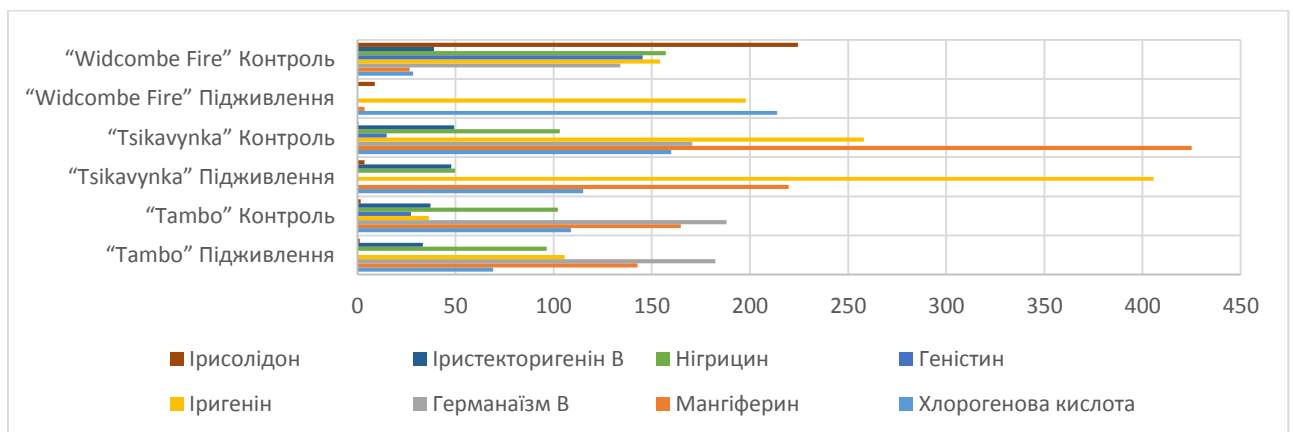


Рис. 6.15 Розподіл кількісного вмісту (мкг/г) у зразках листя ірисів при монокомпонентному живленні (метод ВЕРХ)

Сорт “Widcombe Fire” став виключенням, де вміст хлорогенової кислоти у експериментальному зразку є значно вищим, ніж у контрольному: 213,87 мкг/г та 28,49 мкг/г відповідно, але при цьому залежність балансу гідроксикоричні кислоти – флавоноїди зберігається. У всіх зразків, квітки експериментальних рослин містять менше хлорогенової кислоти, ніж контрольні – 31,67 мкг/г, 163,87 мкг/г та 123,34 мкг/г відповідно. Було відмічено, що при збільшенні вмісту хлорогенової кислоти, синтез

ізофлавоноїдів уповільнюється та, відповідно, їх вміст також зменшується, що узгоджується з даними фенілпропаноїдного біосинтезу [170]. Аналіз отриманих даних дозволяє висловити припущення, що монокомпонентне живлення пригнічує етап гідроксилування та синтез гідроксикоричних кислот, наприкладі хлорогенової кислоти, та в той же час посилює синтез ізофлавоноїдів та ксантону через L-арогенову кислоту. Гідроксикоричні кислоти є активаторами ростових процесів [174] і у даному випадку всі зразки були заготовлені у фазу активної вегетації, тому в кореневищах синтез гідроксикоричних кислот вже не відбувається.

*Ксантони.* Ксантони, як вторинні метаболіти рослин, мають схожу структурну будову із флавоноїдами, тому їх біосинтез є також дещо подібним, Авторами [509] було доведено шикиматно-ацетатного шляху біосинтезу мангіферину: кільце А утворене ацетат-малонатним полікетидним шляхом, тоді як кільце В утворюється шляхом шикімової кислоти,  $Mg^{2+}$  як і  $Fe^{2+}$  є кофакторами ферментів (PAL, C4H, 4Cl, C3'H) у шляху біосинтезу фенілпропаноїдів [172, 510], у тому числі мангіферину [511] (рис. 6.16). Саме  $Mg^{2+}$  разом з  $Mn^{2+}$  активують малік-ензим, супероксиддисмутазу та декілька ферментів шикіматного шляху утворення фенілпропаноїдів [175, 169], тому  $Mg^{2+}$  було обрано для з'ясування впливу підживлення рослин на вміст мангіферину.

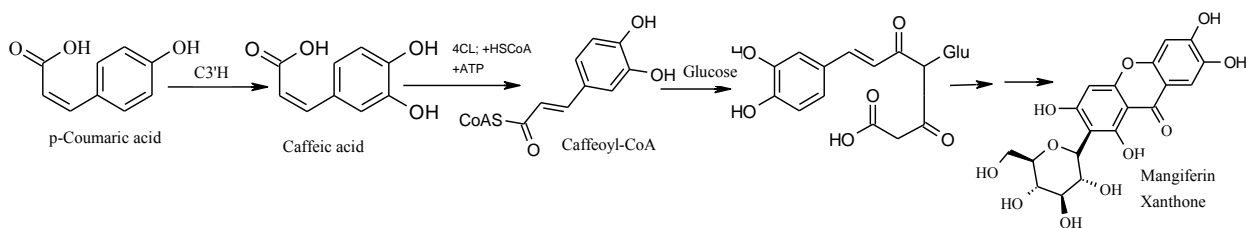


Рис.6.16 Схема біосинтезу мангіферину відповідно до [509]

У кореневищах контрольних зразків ірисів “Цікавинка” та “Widcombe Fire” відмічено значно більше мангіферину, ніж у експериментальних. Слід відмітити, що простежується залежність: при підживленні вміст мангіферину у кореневищах збільшується, а у листі – зменшується, у квітках знову

збільшується, при цьому хлорогенова кислота знаходиться у меншій кількості ніж мангіферин, або відсутня зовсім. Біосинтез хлорогенової кислоти та мангіферину йдуть різними шляхами, єдиним попередником є 4-кумарова кислота, активаторами ферменту на даній стадії є іони  $Mg^{2+}$  та  $Fe^{2+}$ . У подальшому вони не приймають часті у біосинтезі цих сполук. Загальний вплив підживлення для усіх ірисів був в цілому подібним.

*Ізофлавоноїди.* Загальну масу фенольних сполук в рослині формують гідроксикоричні кислоти, саме вони беруть участь в утворенні В-кільця флавоноїдів та ізофлавоноїдів. Тому визначення їх вмісту та складу було актуальним для спостереження біосинтетичних перетворень. Вміст ізофлавоноїдів у дослідних зразках кореневищ ірисів достовірно підвищувався порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ), а вміст хлорогенової кислоти знижувався. Вміст іригеніну у експериментальних зразках кореневищ ірису “Тамбо” порівняно з контролем є дещо нижчим (3,5 мг/г та 3,9 мг/г відповідно), для сорту “Цікавинка” – 1,6 мг/г та 1,8 мг/г відповідно, для сорту “Widcombe Fire” – 1,1 мг/г та 2,2 мг/г відповідно. У той же час, вміст германаїзм В, геністину, іристоригеніну В, ірисолідону значно збільшувався у зразках кореневищ порівняно з квітками та листям.

З урахуванням загальноприйнятих тенденцій у біосинтезі фенольних сполук у рослинах, було запропоновано схему біосинтезу (рис. 6.17), яка вірогідно відбувається для видо-специфічних ізофлавоноїдів ірису (іригенін, ірисолідон, іристоригенін В), що раніше не описано.

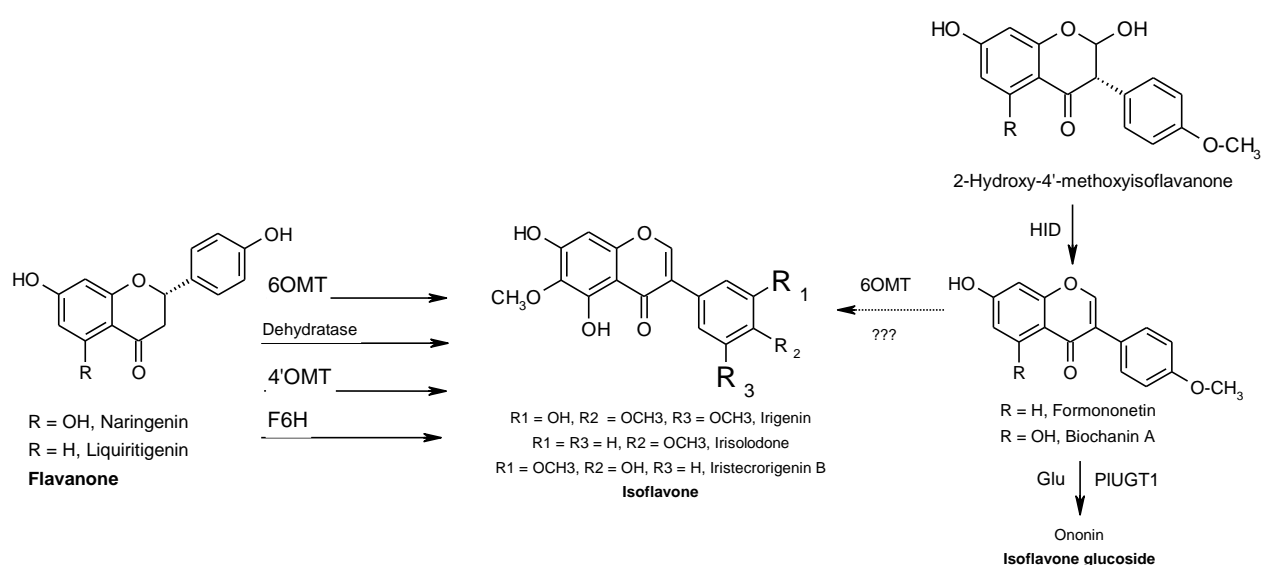


Рис. 6.17 Можливі шляхи біосинтезу іригеніну, ірисолідону та іристекторигеніну В у рослинах роду Ірис (власна пропозиція)

Глюкозид текторидин зазнає подібного перетворення через геністеїн /даїздеїн під дією ферменту ізофлавоно-метилтрансферази та ізофлавоно-глюкозилтрансферази. Ми також запропонували вірогідний шлях біосинтезу текторидину у рослинах роду Ірис (рис. 6.18).

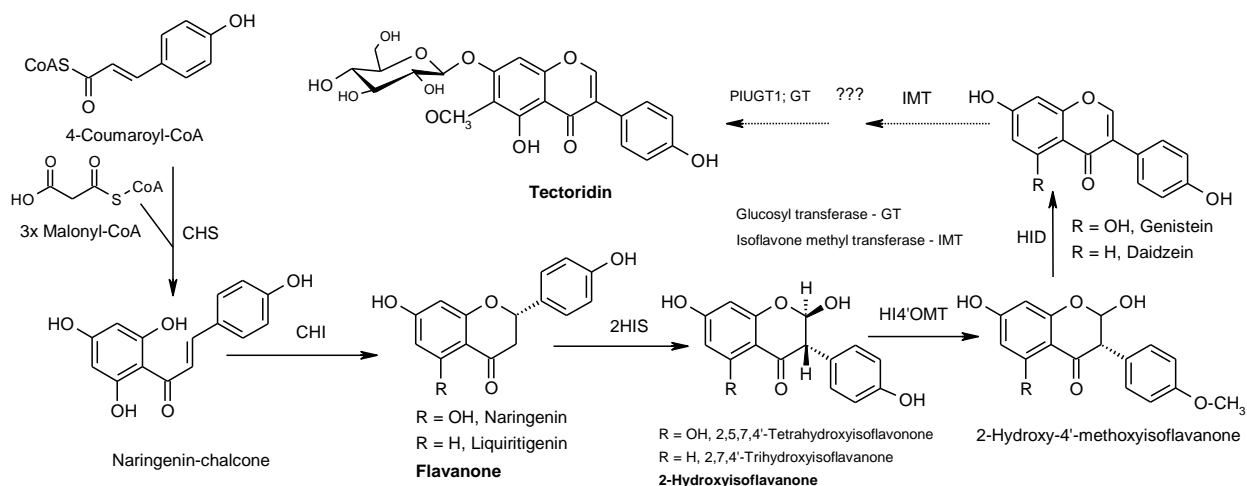


Рис. 6.18 Можливі шляхи біосинтезу текторидину у рослинах роду Ірис

Внаслідок активації ферментів біосинтезу фенілпропаноїдів при надлишковому надходженні іонів  $\text{Fe}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$  спостерігається помітне підвищення вмісту ізофлавоноїдів у кореневищах. Синтез ізофлавоноїдів, таких як геністин, іригенін, текторидин, іристектогенін В будуть стимулювати ферменти

PAL, C4H, 4Cl, CHS-CHR, CHI, IFS шляхом входу двовалентних іонів  $Fe^{2+}$  і 3-дезоксид-Д-арабінозо-гептулозонат-7-фосфатсинтази, іонів двовалентних металів  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  і  $Mn^{2+}$  [172], що є результатом додаткового мінерального живлення.

Значне підвищення іригеніну та текторідину відмічено у сировині літнього збору: на даний час вміст гідроксикоричних кислот зменшується в наслідок формування ізофлавоноїдів. Крім того, однією з біологічних функцій поліфенольних сполук є захист рослин від УФ-випромінювання сонця. Тому в періоди найбільшого освітлення (літо) накопичення фенольних сполук відбувається більш інтенсивне, що підтверджено хімічним аналізом. У листі ірисів відносно зростання вмісту ізофлавоноїдів відбулось за рахунок підвищення рівня фотосинтезу, внаслідок збільшення продукування хлорофілів за допомогою індукованого біосинтезу терпеноїдів [512]. Дані кількісного вмісту речовин-маркерів у сировині трьох сортів ірисів наведено у таблиці А.71 (Додатки).

*Кореляційний аналіз між мінеральним живленням і вмістом поліфенолів у ірисів, показав (табл. А.72, Додатки), що для більшості визначених сполук ґрунт не мав великого впливу. Проте помірний зв'язок і статистично достовірні кореляції були виявлені у зразках листя ірисів ( $p < 0,01$ ), зокрема для іригеніну ( $r_s = -0,933$ ;  $p = 0,007$ ) і геністину ( $r_s = -0,878$ ;  $p = 0,021$ ). Така кореляція пояснюється відсутністю геністину в зразках ірису, зібраних із ґрунту, який не був удобрений. Крім того, кількість іригеніну була вищою у зразках із удобреного ґрунту, хоча декілька зразків, таких як ірис «Widcombe Fire» (листя, після живлення) та ірис «Widcombe Fire» (листя, контроль) показали несприятливі результати: 0,21 мг/г і 1,5 мг/г відповідно. Одержані результати є багатообіцяючими, однак необхідні подальші дослідження впливу мінерального живлення на накопичення маркерних сполук.*

Таким чином, іриси після підживлення мали підвищений вміст загального вмісту фенольних сполук (до 10% від загального вмісту ізофлавоноїдів, до 8% фенольних кислот, до 5%  $\gamma$ -піронів, до 13% флавоноїдів). Встановлено позитивний вплив живлення на біосинтез і вміст



ізофлавоноїдів та ксантону мангіферину в кореневищах ірисів. Крім того, зафіксовано збільшення кількості хлорогенової кислоти в листках ірисів. З урахування ґрунтово-кліматичних особливостей регіонів України, а також обґрунтованим застосуванням монокомпонентного живлення при вирощування рослин роду Ірис, було запропоновано СОП культивування ірисів з надійним досягненням стабільного вмісту маркерних сполук (ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин,  $\alpha$ -ірон, хлорогенова кислота) у ЛРС.

### 6.2.3 Розробка СОП культивування ірисів в Україні

Одержані результати покладено в основу розробки СОП для належного вирощування і. угорського та сортів відповідно до принципів GACP для досягнення стабільного накопичення маркерних сполук у сировині. У досліді використовували два сорти ірисів: *I. x hybrida hort. 'Indian Pow Wow'*, *I. x hybrida hort. 'Galleon Gold'* та і. угорський. Іриси вирощувались у відкритому ґрунті. Вирощування з виконанням вимог GACP проводилося за рекомендаціями, наведеними нижче. Кожен сорт ірису мав контрольну групу зразків того ж сорту, до яких не застосовувалися особливості культивування. Слід зазначити, що особливих морфометричних відмінностей не спостерігалось, за винятком того, що іриси при контрольованому вирощуванні мали дещо більшу фітомасу. Застосування розроблених підходів монокомпонентного живлення забезпечило одержання сировини із стабільним вмістом фенольних сполук. Для уточнення відмінності в хімічному складі зразків проводили ВЕРХ аналіз компонентів (рис. А.72, Додатки).

Стандартна робоча процедура: Виробництво кореневищ ірису.

Визначення:

Культивована рослина: *Iris hungarica* Waldst. et Kit. (також сортові ірису: *Iris Indian Pow Wow* (Alta Brown. R. 1971), *Iris hybrida hort.*); DSB Iris; ірис сортовий. Рід: *Iris* L. Родина: *Iridaceae* Juss.

*Зібрана частина рослини:* А. кореневища; Б. листя.

*Опис рослини:* стандартний карликовий борідковий ірис. Багаторічна трав'яниста рослина, кореневище світло-буре, м'ясисте, розгалужене, горизонтальне, повзуче, до 1–15 см товщиною, 7–10 см довжиною і більше, з великою кількістю тонких коренів. Листя прикореневі, дворядні, мечоподібні, зелені, загострені, цільокрайові, довжиною 25–27 см, шириною 1–2 см. Квітка 9 см. Двоколірні: верхні частки оцвітини кремово-танжеринові світліше по краях і темніше до середини; нижні частки (відгін) темно-коричневі; борідка – яскраво-синя. Аромат сильний. Квітконос 13–20 см, несе 1–2 квітки. Ранній. Цвіте протягом 12–18 днів, травень – червень.

Кореневища накопичують ізофлавоноїди та терпеноїди; листя містять флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, карбонові кислоти, елементи [513].

*Термін посадки:* II-III декада червня.

*Місце вирощування:* легкий, добре розораний піщаний ґрунт. При виборі місця випробування перевагу слід надавати регіонам України з більшою кількістю сонячних днів для забезпечення стабільного накопичення маркерів якості (фенольні сполуки) у ЛРС ірисів.

Умови посіву: Для посадки відбирають відрізки кореневищ масою 30-50 г з мичкуватою системою корінців і кількома листками. Листя на дві третини вкорочують. Оранку проводять на глибину 27–30 см. Ірис висаджують в ґрунт з площею живлення 70×30 см на глибину 8–10 см (рис. 6.19).



а) Загальний вигляд б) *Iris* при вирощуванні с) посадковий матеріал д) рослинна сировина

Рис. 6.19 На прикладі сорту ірису “Indian Pow Wow” показано ЛРС в процесі вирощування та збору

*Підкореневе монокомпонентне живлення:* I фаза підживлення – I декада квітня. Розчин семиводного сульфату магнію (склад: Mg 16%, S 32%) в кількості 0,012 кг/м<sup>2</sup>. Наважку сульфату магнію розчиняли в бані з водою, використаний об'єм розчину – 5 л). II фаза підживлення – II декада травня. Так само на етапі I.

*Обприскування листової пластинки:* Зразки, одночасно з підкореневим підживленням, обприскували готовими рідкими препаратами: розчином хелату заліза (склад, кг/л – Fe 0,032, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 0,032, K<sub>2</sub>O – 0,032). Обприскування хелатами заліза та калію проводили окремо з інтервалом 1 добу.

*Обслуговування поля:* підґрунтовий полив по необхідності; прополка та контроль бур'янів вручну; періодично культивують і боронують.

*Хвороби і шкідники:* можуть вражатися іржею, сірою та бактеріальною гниллю, гетероспоріозом, гниллю, фузаріозом, вірусом штрихової мозаїки, попелицею, гладіолусовим трипсом, слимаками, кореневим кліщем, нематодами.

*Подальший догляд поля:* з другого року життя ірисів плантацію підтримують в рихлому і чистому від бур'янів стані, проводять культивацію.

*Сівозміна:* добре вирощувати після зернових або просапних культур.

A. Зібраний матеріал: *кореневища*, зовні світло-коричневі, щільні. Поверхня жорстка, зморщена, вкрита тонкими бурими коренями. На зламі є видимі сліди від жилок листя. Запах приємний, слабкий, трав'янистий.

*Збирання врожаю і зберігання сировини:* На другий рік після посадки в липні-серпні викопують, відчищають від землі, видаляють кореневі волоски, розрізають уздовж, розташовують тонким шаром на папері, сушать під дахом на відкритому повітрі, або в спеціальних сушарках, при температурі не більше 35–40 °С. Зберігають його в сухому приміщенні. Урожайність: становить 5–8 т/га.

B. Зібраний матеріал: *листя*, пласкі, лінійні, зеленого кольору, 15–20 см у довжину. На листовій пластині чітко виділяються жилки, розташовані паралельно одна одній, поверхня гладка. Листя має приємний трав'яний запах.

*Збирання врожаю і зберігання сировини:* зрізають у серпні, залишаючи

5-10 см над землею. Розрізають на частини, висушують при температурі не більше 40°C. Упаковують в паперові мішки. Зберігають при температурі 15°C.

*Контроль якості сировини.* Визначення вмісту БАР у сировині проводять методом ВЕРХ. На рисунку 6.20 та у таблиці А.73 (Додатки) наведено дані розподілу фенольних сполук у зразках листя дослідних ірисів.

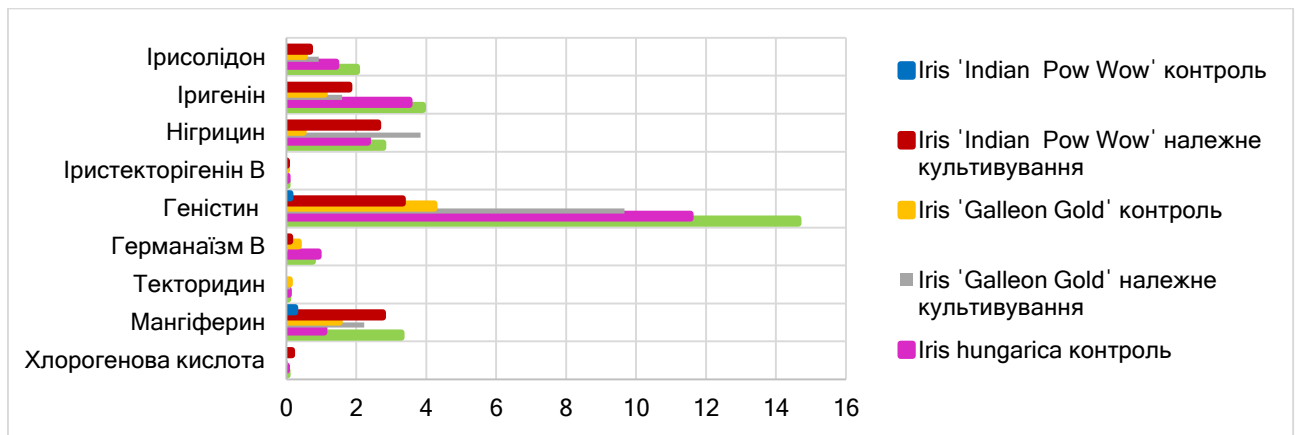


Рис. 6.20 Розподіл фенольних сполук у листях зразків сортових ірисів (мг/г)

Вміст хлорогенової кислоти у зразках листя ірису “Galleon Gold” та ірису “Indian Pow Wow” при належному вирощуванні, становив 37,95 і 163,87 мкг/г відповідно. Серед усіх зразків домінував ізофлавоон геністин. Його вміст коливається від 113,86 (ірис “Indian Pow Wow”) до 14642,10 мкг/г (і. угорський). Іригенін і нігрицин присутні в менших кількостях. Вміст іригеніну в листі ірисів коливається від 1095,05 мкг/г (“Galleon Gold” контроль) до 3904,37 мкг/г (і. угорський). Найбільшу кількість нігрицину виявлено в листках ірис “Galleon Gold” культивованих (3835,03 мкг/г), а найменший вміст – у листках того ж сорту, але без відповідного культивування (487,71 мкг/г). Ксантон мангіферин був ідентифікований у всіх зразках ірисів при належному культивуванні та у двох контрольних зразках ірисів без належного догляду. Вміст у зразках листя коливається від 7,57 мкг/г (ірис «Indian Pow Wow») до 28,75 мкг/г (і. угорський). Водночас лише в одному контрольному зразку ірис «Galleon Gold» вміст мангіферину був найвищим і становив 52,80 мкг/г.

Загальний висновок щодо вмісту БАР: у зразках листя та кореневищ сортових ірисів, вирощених з дотриманням розроблених етапів GACP, виявлено всі ізофлавоноли (текторидин, германаїзм В, іригенін, геністин, ірисолідон, іристекторігенін В, нігрицин, мангіферин). При цьому їх вміст був у середньому вищим порівняно з ірисами без дотримання принципів належного вирощування.

Стандартизовані умови СОП належного вирощування ірисів при слідуванні принципами GACP, при внесенні мінеральних добрив, своєчасному поливі та догляді, ЛРС мала стабільний вміст фенольних сполук. Домінуючі 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. Етапи відображають вимоги до екологічно чистої технології вирощування, правила збору сировини, переробки, зберігання, що гарантують високу якість і безпеку рослинної сировини. Етапи GACP наведено у таблиці А.74 (Додатки). Дотримання наведених вимог щодо клімату та географічних особливостей регіонів, хімічного складу ґрунту з місця вирощування ірисів, буде гарантувати одержання ЛРС із стабільним вмістом речовин-маркерів.

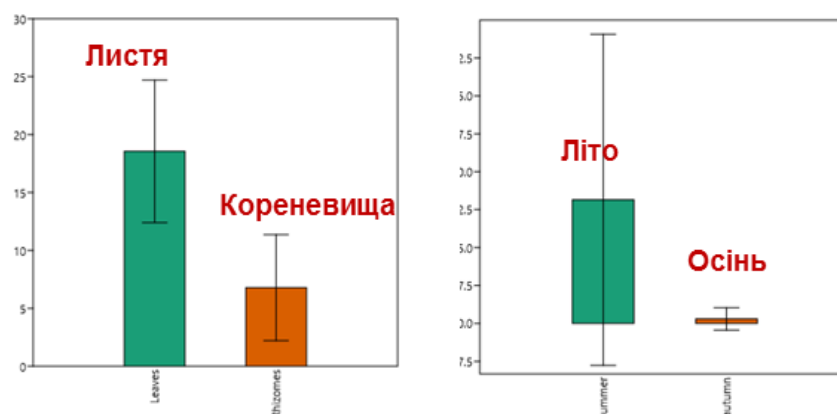
#### 6.2.4 Оцінка оптимальних термінів заготівлі сировини ірисів

Визначення оптимального періоду заготівлі є ключовим фактором для одержання сировини із максимальним вмістом БАР. Раніше нами з Кречун А.В. було проведено визначення загального вмісту груп фенольних сполук у листі та кореневищі і. угорського, що заготовляли в різних БС України [258 500]. Встановлено, що оптимальним часом для заготівлі сировини є весняна пора року. Але для уточнення наукових даних, нами було розширено вибірку видів ірисів до 16 популяцій та заготовлено різні види ірисів в Україні, Литві та Латвії. Ірис угорський не включали. Крім того, сировину заготовляли

восени та влітку, а кількісний вміст речовин-маркерів визначали ВЕРХ методом.

*Фенольні сполуки.* Заготівля рослинної сировини у природі в період максимального накопичення ізофлавоноїдів є ґрунтовою та обумовлює наявність терапевтичного ефекту ЛРЗ. Проведені дослідження впливу факторів навколишнього середовища (підрозділ 5.2) та сезону заготівлі листя та кореневищ ірисів з 16 популяцій на вміст їх БАР дали можливість визначити оптимальні періоди для збору сировини ірисів у природних умовах. Назви видів, що включено до дослідження, наведено у таблиці 5.2.

*Ксантони.* 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 ( $Q = 7,64$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 6.21).



Розподіл ксантонів у різні сезони (червень, вересень),  $F = 12,35$ ;  $p = 0,001$

Рис. 6.21 Загальний розподіл ксантонів у листі та кореневищах ірисів

Порівняння часу заготівлі сировини ірисів з різних секцій було кардинально різним. Мангіферин накопичувався у значній кількості (до 60 мг/г) листі та кореневищах і. німецького (секція *Iris*) значно більше у літній період, ніж у осінній. В той же час, у сировині і. болотного з секції *Limniris* вміст мангіферину і у листі, і у кореневищі осінньої заготовки був дуже низьким (не більше 0,4 мг/г) (Рис. 6.22). Вірогідно, це обумовлено процесами онто- та

філогенезу даних рослин. Але це свідчить про вибір належних умов заготівлі сировини. Розподіл вмісту мангіферину за органами та видами ірисів наведено на рисунку 6.23.

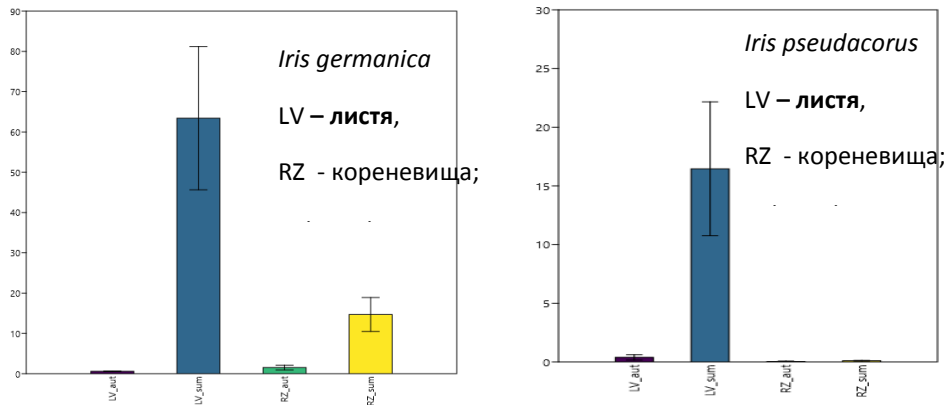


Рис. 6.22 Розподіл мангіферину у сировині і. німецького (*I. × germanica*) та і. болотного (*I. pseudacorus*) у різні сезони заготовки

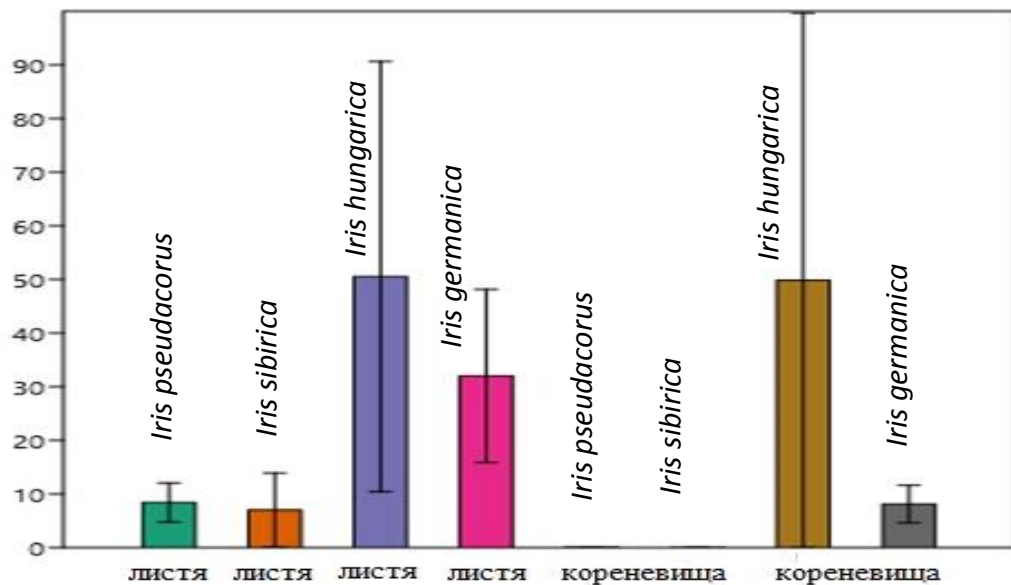


Рис.6.23 Розподіл мангіферину за органами та видам ірисів

*Ізофлавоноїди.* На концентрацію ізофлавононів у листі і кореневищах ірису суттєво впливають усі досліджені фактори, але вони впливають по-різному. Ізофлавононів значно більше накопичуються у кореневищах, ніж у листі ( $Q = 3,75, p = 0,012$ ), а концентрація ізофлавононів у кореневищах є значно нижчою восени, ніж влітку ( $Q = 2,93, p = 0,046$ ) (рис. 6.24).

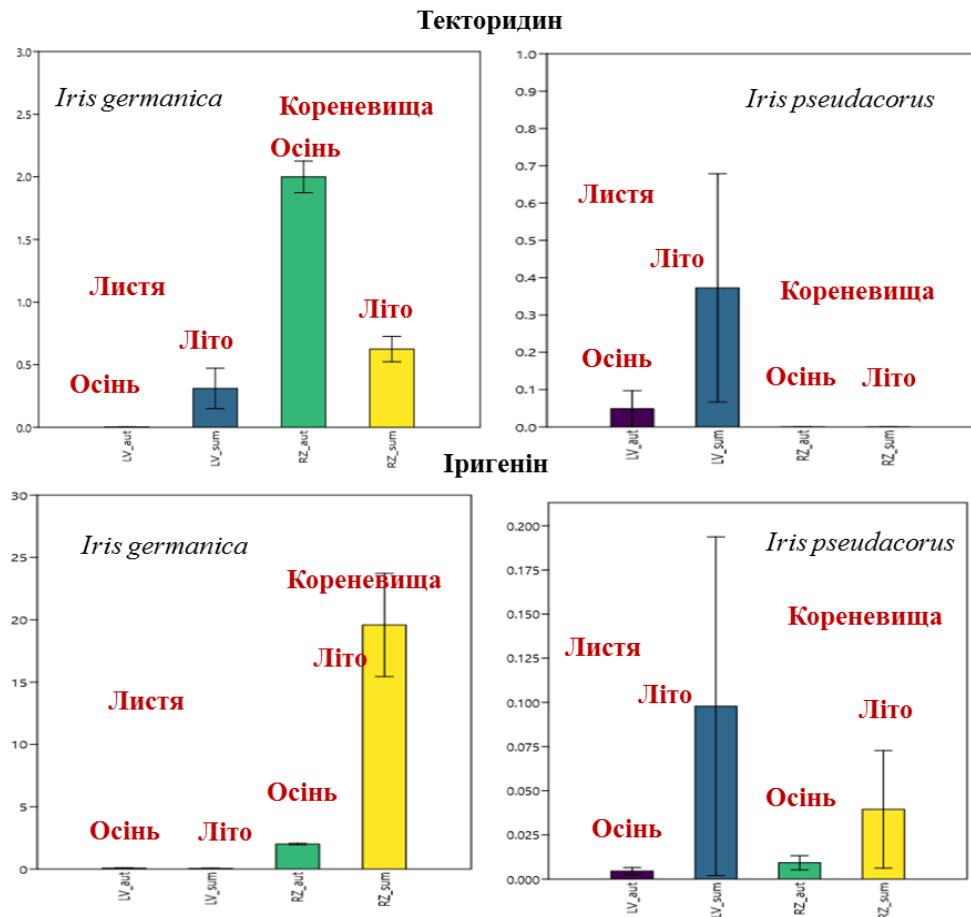


Рис. 6.24 Загальний розподіл ізофлавонів (на прикладі текторидину та іригеніну) у листі та кореневищах ірисів

**Флаволи.** Концентрація флавонів у сировині ірису не залежить від сезону, а залежить від виду рослини (табл. 6.6).

**Гідроксикоричні кислоти.** На концентрацію гідроксикоричних кислот суттєво впливають пора року та вид, тоді як суттєвих відмінностей між їх концентраціями в кореневищах і листках немає. Влітку вміст кислот є достовірно вищим, ніж восени ( $Q = 3,45, p = 0,019$ ). Восени концентрація кислот значно знижується в усіх видів ірисів ( $Q = 4,01, p = 0,005$ ). Немає відмінностей між листям і кореневищами влітку, але значно меншою є їх кількість восени (рис. 6.25).



Таблиця 6.6

**Результати двостороннього (two-way ANOVA) дисперсійного аналізу накопичення фенольних сполук у листках і кореневищах ірису. Органи рослин, сезон збирання та види вважалися фіксованими ефектами**

Змінні	df	Ксантони		Ізофлавоноїди		Флавоони		ГКК	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Орган	1; 1; 40	3.08	0.087	4.92	0.032	1.48	0.230	0.34	0.560
Сезон	1; 1; 40	12.35	0.001	3.79	0.058	1.60	0.213	5.95	0.019
Взаємодія	1; 1; 40	2.63	0.112	2.33	0.135	1.34	0.254	0.56	0.459
Орган	1; 3; 36	3.01	0.091	7.05	0.011	2.49	0.123	0.46	0.503
Сезон	1; 3; 36	5.48	0.003	5.04	0.005	5.93	0.002	4.20	0.012
Взаємодія	1; 3; 36	0.43	0.731	4.97	0.005	6.11	0.002	4.38	0.009
Орган	1; 3; 36	29.16	<0.001	4.29	0.045	2.45	0.126	8.82	0.005
Сезон	1; 3; 36	13.25	<0.001	3.98	0.015	5.42	0.003	4.69	0.007
Взаємодія	1; 3; 36	10.74	<0.001	1.82	0.160	4.47	0.009	3.51	0.025

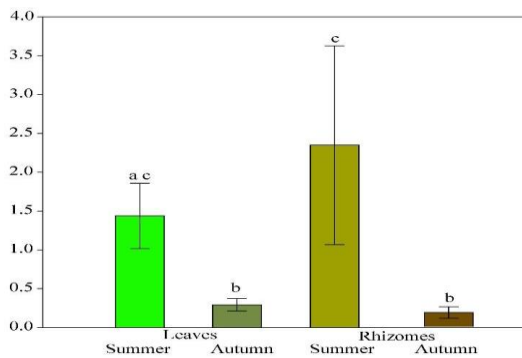


Рис. 6.25 Загальний розподіл вмісту гідроксикоричних кислот у листі та кореневищах ірисів

Таким чином, стадія вегетації після цвітіння є періодом максимального розвитку рослин роду Ірис. У літній період присутні одночасно кілька видів абіотичного стресу (високі температури, нестача води, сонячна радіація). Накопичення фенольних сполук цього сезону може бути пов'язане з тим, що в цей стресовий період року захист рослини в основному забезпечується синтезом фенольних сполук, рясно накопичених протягом цього сезону. Флавоноїди, фенольні кислоти та ліпіди відіграють важливу роль у механізмах адаптації рослин до стресових факторів за допомогою різних механізмів: генетичних, біохімічних, фізіологічних, морфолого-анатомічних та ін. [441]. Таким чином, збір листя та кореневищ ірисів слід проводити у літку (червень). Що стосується вмісту ізофлавоноїдів, то їх вміст значно вищий у кореневищах, а мангіферин та гідроксикоричні кислоти накопичуються переважно у листі.

## Висновки до розділу 6

1. Для оптимізації умов вирощування к. посівного в умовах України, було заготовлено ґрунти з 12 регіонів та досліджено їх характеристики, що впливають на склад БАР. Тип ґрунту переважно однаковий та традиційний для України – чорнозем, тобто багатий гумусом, з високим забезпеченням фосфору та калію, що має позитивний вплив на біосинтез речовин-маркерів шафрану. Крім того, регіони з більшою тривалістю сонячного випромінювання (південно-східні) є найбільш оптимальними для вирощування к. посівного з метою одержання шафрану. Додатково встановлено, що для одержання сировини листя, оцвітини, БЦ к. посівного із стабільним складом речовин-маркерів (фенольні сполуки) перевагу слід надавати південно-західним регіонам. Проведена оцінка реакції к. посівного на стрес, спричинений обробкою БЦ холодною плазмою (СР, 3 та 5 хв), електромагнітним полем (ЕМФ, 5 хв.) та вакуумом (V3 хв) на кінетику проростання в польових умовах, на морфометричні параметри рослини, на зміни кількості трихомів листя, на вміст вторинних метаболітів (ідентифіковано та визначено кількісний вміст 23 естерів кроцетину, пікрокроцин, шафраналь, рутин) та антиоксидантну активність листя та оцвітини. Обробка ЕМФ призвела до суттєвого збільшення вмісту кроцинів у шафрані (збільшення вмісту кроцин-4 у 4 рази).

2. Для визначення оптимальних умов вирощування рослин роду Ірис та розробки етапів належного культивування рослин в Україні, вперше було проведено порівняння екологічних характеристик основних місць вирощування ірисів у світі з ірисами України. За кліматичними та агрохімічними показниками типу ґрунту, Україна має хороші показники для масового вирощування ірисів. Застосування кореневого та позакореневого монокомпонентного живлення, при розробці етапів культивування ірисів, проявляло вплив на біосинтез БАР у зразків кореневищ, листя та квітів ірису «Цікавинка», ірису «Талібо», ірису «Widcombe Fire» та показало підвищення загального вмісту ізофлавоноїдів, флавоноїдів, ксантонів та фенолкарбонових кислот та індивідуальних сполук. Додатковий аналіз термінів заготівлі для

сировини ірисів, показав максимальний період накопичення фенольних сполук у сировині ірисів літнього збору.

3. З використанням отриманих даних залежності хімічного складу рослин від факторів навколишнього середовища, були розроблені параметри стандартизації вирощування к. посівного та рослин роду Ірис. Розроблено етапи СОП культивування та післязбиральної практики для шафрану та його побічних продуктів виробництва, а також листя та кореневища і. угорського та сортів ірисів ('Indian Pow Wow' та Galleon Gold') з урахуванням принципів GACP, що включають опис рослини, посівного матеріалу, первинної обробки, умов посіву, транспортування та зберігання, пакування, контролю якості та документації. Дотримання принципів належного вирощування рослин мало позитивний ефект на стабільний вміст маркерних сполук у відповідній сировині.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [23, 497, 514 – 520].*

## 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, протівірусних 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. При слідуванні підходу «Якість шляхом розробки» сплановано дизайн дослідження, визначено критичні атрибути якості рослинних екстрактів, а саме: контроль якості ЛРС, 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<sup>N</sup>» (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  $\alpha$ -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 speciosus* 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. білого, 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, германазм В, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавоон, 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 (15%-53%) вміст насичених, а в листі – ненасичені кислоти. Серед органічних доміантними 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%. Доміантною сполукою є  $\alpha$ -ірон (до 2,85 %). Вперше у видах ірисів виявлені нортерпеноїди та їх похідні:  $\beta$ -дамаскенон,  $\beta$ -іонон-5,6-епоксид,  $\beta$ -іонон. Встановлено перспективність кореневищ малодосліджених ірисів (*I. musulmanica*, *I. virginica*, *I. notha*, *I. halophila*, *I. hybrida* *Stocholm* ін.) за рахунок високого вмісту маркерних речовин ефірної олії ( $\beta$ -іонон,  $\alpha$ -ірон, транс-2,6- $\gamma$ -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'-тетраметоксиізофлавоон, германаїзм В, ірилон, апігенін-7-глюкозид, ізокверцитрин, кемпферол, корична та кумарова кислоти. Крім того виділено: нігрицин, іригенін, ононін, геністеїн, дайдзеїн, формонетин, 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-піроглутамінова кислота на основі їх протиракового потенціалу. Для сировини ірисів сполуками-маркерами вставновлено: ірисолідон, іригенін, текторидин, кемпферол, кверцетин, апігенін, мангіферин, хлорогенова кислота,  $\alpha$ -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 і. угорського 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); злякисні новоутворення (C43; C50; C71).



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Goldblatt P., Manning J. C. The *Iris* family: natural history and classification. London : Portland, 2008. 336 p.
2. Goldblatt P. Phylogeny and classification of the Iridaceae and the relationships of *Iris*. *Annali di Botanica*. 2000. Vol. 58. P. 13–28.
3. Glimn-Lacy J., Kaufman P. B. Botany illustrated: introduction to plants, major groups flowering plant families. London : Springer, 2006. 291 p.
4. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC–PDA–MS analysis / C. Schütz et al. *Fitoterapia*. 2011. Vol. 82. P. 1021–1026.
5. Shedding the light on Iridaceae: ethnobotany, phytochemistry and biological activity / A. N. B. Singab et al. *Industrial Crops and Products*. 2016. Vol. 92. P. 308–335.
6. Kassák P. Secondary metabolites of the choosen genus *Iris* species. *Mendeliana Brunensis*. 2012. Vol. 60. P. 269–280.
7. Major secondary metabolites of *Iris* spp. / W. Kukula-Koch et al. *Phytochemistry Reviews*. 2013. Vol. 14. P. 1–30.
8. Iwashina T., Mizuno T. Flavonoids and xanthones from the genus *Iris*: phytochemistry, relationships with flower colors and taxonomy, and activities and function. *Natural Product Communication*. 2020. Vol. 15. P. 1–35.
9. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review / O. Mykhailenko et al. *Phytochemistry*. 2019. Vol. 162. P. 56–89.
10. Ibrahim S. R., Mohamed G. A., Al-Musayeib N. M. New constituents from the rhizomes of Egyptian *Iris germanica* L. *Molecules*. 2012. Vol. 17. P. 2587–2598.
11. Hacibekiroglu I., Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytotherapy Research*. 2011. Vol. 25(4). P. 522–529.

12. Phytochemistry and biological activities of *Iris* species growing in iraqi kurdistan and phenolic constituents of the traditional plant *Iris postii* / H. I. M. Amin et al. *Molecules*. 2021. Vol. 26. P. 264–285.
13. Alsayied N. F., Fernández J. A., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S. Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by inter-retroelement amplified polymorphism (IRAP). *Annals of botany*. 2015. Vol. 116. P. 359–368.
14. Ault A. On Food and Cooking. The Science and Lore of the Kitchen (McGee, Harold). *Journal of Chemical Education*. 2003. Vol. 80. P. 880.
15. ISO 3632-1:2011. Spices Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specification (2 Ed.). Switzerland: International Organization for Standardization. Genève, 2011 6 p.
16. ISO 3632-2:2010. Spices Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 2: Test methods (1 Ed.). Switzerland: International Organization for Standardization. Genève, 2010. 42 p.
17. Gohari A. R., Saeidnia S., Mahmoodabadi M. K. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacognosy Reviews*. 2013. Vol. 7. P. 61–66.
18. CrocusBank Project. URL: <http://crocusbank.uclm.es/>. (Date of access: 02.01.2024).
19. Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview / L. Cardone et al. *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 272. P. 109560–109573.
20. The world saffron and crocus collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilization / J. A. Fernández et al. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2011. Vol. 58. P. 125–137.
21. Red Gold Rush: Managing Quality for Afghan Saffron Exports. Geneva, 2018. 135 p. URL: [https://intracen.org/file/redgoldrushfinalallowrespdf\\_](https://intracen.org/file/redgoldrushfinalallowrespdf_) (Date of access: 02.01.2024).

22. Gresta F., Lombard G. M., Siracusa L., Ruberto G. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2008. Vol. 28. P. 95–112.
23. 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. Vol. 151. P. 112376–112387.
24. Rikabad M. M., Pourakbar L., Siavash Moghaddam S., Popović-Djordjević J., Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus* L.) exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Industrial Crops and Products*. 2019. Vol. 37. P. 137–143.
25. Mathew B. Some aspects of the ‘*Juno* group’ of irises. *Annali di Botanica*. 2000. Vol. 58. P. 113–122.
26. Crespo M. B., Martínez-Azorín M., Mavrodiev E. Can a rainbow consist of a single colour? A new comprehensive generic arrangement of the ‘*Iris sensu lato*’ clade (*Iridaceae*), congruent with morphology and molecular data. *Phytotaxa*. 2015. Vol. 232. P. 1–78.
27. The genus *Iris* L. s. l. (Iridaceae) in the Mountains of Central Asia biodiversity hotspot / A. Sennikov et al. *Plant Diversity of Central Asia*. 2022. Vol. 2, № 1. P. 1–104.
28. *Iris* Tourn. ex L. / Plants of the World Online. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:326330-2>. (Date of access: 02.01.2024).
29. Mathew B. F. *The Iris*. 2<sup>nd</sup> ed. Portland: Timber Press, 1989. P. 202.
30. Molecular phylogenetics of the *juno* irises, *Iris* subgenus *Scorpiris* (Iridaceae), based on six plastid markers / N. İkinci et al. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2011. Vol. 167. P. 281–300.
31. Crespo M. B., Martínez-Azorín M., Mavrodiev E. V. Notes on taxonomy and nomenclature of *juno* irises (*Juno*, Iridaceae). *Phytotaxa*. 2018. Vol. 376. P. 185–200.

32. Rodionenko G. I. A new system of the genus *Iris* (Iridaceae). *Botanicheskii Zhurnal*. 2009. Vol. 94. P. 423–435.
33. Wilson C. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon*. 2011. Vol. 60. P. 27–35.
34. Wilson C. A. Sectional relationships in the Eurasian bearded *Iris* (subgen. *Iris*) based on phylogenetic analyses of sequence data. *Systematical Botany*. 2017. Vol. 42(3). P. 392–401.
35. Wilson C. A. Resolving sectional relationships in subgenus *Iris*, the Eurasian bearded species. *Systematical Botany*. 2017. Vol. 42. P. 392–401.
36. Wilson C. A., Padiernos J., Sapir Y. The royal irises (*Iris* subg. *Iris* sect. *Oncocyclus*): Plastid and low-copy nuclear data contribute to an understanding of their phylogenetic relationships. *Taxon*. 2016. Vol. 65. P. 35–46.
37. Mavrodiev E. V., Martínez-Azorín M., Dranishnikov P., Crespo M. B. At least 23 genera instead of one: The case of *Iris* L. s.l. (Iridaceae). *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. P. e106459–e106465.
38. Класифікації роду *Iris* L. на біологічному та молекулярному рівні як основа для сучасних філогенетичних досліджень / М. О. Троїцький та ін. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2021. № 4. С. 12–19.
39. Molecular study of selected taxonomically critical taxa of the genus *Iris* L. from the broader Alpine-Dinaric area / T. Weber et al. *Plants*. 2020. Vol. 9 (9). P. 1229–1245.
40. Pignatti A., Ubrizsy Savoia A., Varoli Piazza S. *Iris*: a significant element of the Mediterranean landscape. *Annales di Botanica*. 2000. Vol. 58. P. 161–166.
41. Zhao Y., Noltie H. J., Mathew B. F. *Iris* Linnaeus. *Flora of China*. 2000. Vol. 24. P. 297–312.
42. Burkhart E. P. Flora of North America North of Mexico. Vol. 26: Magnoliophyta: Liliidae: Liliales and Orchidales. *Economic Botany*. 2003. Vol. 57 (4). P. 658–659.

43. Mosyakin S.L., Fedoronchuk M. M. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist. Kiev, 1999. 369 s.
44. Червона книга України. Рослинний світ / відп. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко Київ : Українська енциклопедія ім. М.П. Бажана, 1996. 608 с.
45. Червона книга України. Рослинний світ / під ред. Я. П. Дідуха Київ : Глобалконсалтинг, 2009. 912 с.
46. Жигалова С. Л., Футорна О. А. Поширення видів роду *Iris* L. (Iridaceae), занесених до «Червоної Книги України». *Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин* : матеріали II Міжнар. наук. конф., м. Умань, 9-12 жовт. 2012 р. Київ : ПАЛИВОДА А. В., 2012. С. 94–97.
47. Буйдін Ю. В. Ботанічні класифікації та видовий склад роду *Iris* L. в Україні. *Український ірис*. 2013/14. Вип. 3. С. 30–50.
48. *Iris* encyclopedia (a wiki). URL: <https://wiki.irises.org/Main/WebHome> (Date of access: 02.01.2024).
49. Dabrowska A., Smigala M., Denisow B., Winiarczyk K. Biology of flowering and insect visitors of *Iris aphylla* L. (Iridaceae). *Turkish Journal of Botany*. 2019. Vol. 43. P. 798–808.
50. Troitskii M., Buidin Y. Palinomorphological analysis of *Iris hybrida* hort. (Rodion.) cultivars plant. *Plant Introduction*. 2018. Vol. 78. P. 36–46.
51. Crişan I., Vidican R., Morea A., Simea Ş. Dyeing potential of linen fabric with *Iris* flower extracts. *ProEnvironment*. 2018. Vol. 11. P. 223–227.
52. Khatib S., Faraloni C., Bouissane L. Exploring the use of *Iris* species: antioxidant properties, phytochemistry, medicinal and industrial applications. *Antioxidants*. 2022. Vol. 11. P. 526–556.
53. Identification of floral scent profiles in bearded irises / Y. Yuan et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24 (9). P. 1773–1790.
54. Швець Т. А. Біологічні особливості видів роду *Iris* L. у зв'язку з інтродукцією в умови Правобережжя Лісостепу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.05. Київ, 2006. 20 с.

55. Швець Т. А. Онтоморфогенез видів роду *Iris* L. підроду *Xyridion* в умовах культури у правобережному лісостепу України. *Роль ботанічних садів і дендропарків у збереженні та збагаченні біологічного різноманіття урбанізованих територій* : матеріали міжнар. наук. конф., м. Київ, 28–31 трав. 2013 р. Київ : НЦЕБМ НАН України, ПАТ «Віпол», 2013. С. 294–295.
56. Lim T. K. Edible medicinal and non medicinal plants. Flowers. *Crocus sativus*. New York, London: Springer Netherlands 8, 2014. P. 77–136.
57. Saffron: an old medicinal plant and a potential novel functional food / M. José Bagur et al. *Molecules*. 2018. Vol. 23. P. 30–51.
58. Abbasvali M., Ranaei A., Shekarforoush S. S., Moshtaghi H. The effects of aqueous and alcoholic saffron (*Crocus sativus*) tepal extracts on quality and shelf-life of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Journal of Food Quality*. 2016. Vol. 39. P. 732–742.
59. Serrano-Díaz J., Sánchez A. M., Alvarruiz A., Alonso G. L. Preservation of saffron floral bio-residues by hot air convection. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 141. P. 1536–1543.
60. Smolskaite L., Talou T., Fabre N., Venskutonis P. R. Valorization of saffron industry by-products: Bioactive compounds from leaves. *Innovations for Food Science and Production «FOODBALT-2011»* : Conference Proceedings 6th Baltic Conference on Food Science and Technology, May 5–6, 2011, Jelgava, Latvia. Riga : Faculty of Food Technology, 2011. P. 67–72.
61. Santana-Méridas O., González-Coloma A., Sánchez-Vioque R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. 2012. Vol. 11. P. 447–466.
62. Chen N., Yang B. Research progress of chemical components and pharmacological effects of non-medicinal parts of *Crocus sativus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2018. Vol. 43. P. 2884–2891.

63. Jameel Q. Y., Mohammed N. K., Ajeel M. A. Fabrication of nutraceutical beverage from saffron (*Crocus sativus* L.) extract and studying its health effects. *International Journal of Food Science*. 2023. Vol. 3. P. 1–10.
64. Comparative study of composition of essential oil from stigmas and of extract from corms of *Crocus sativus* / Yu-Zhu et al. *Chemistry of Natural Compounds*. 2008. Vol. 44. P. 666–667.
65. Elaraby A., Ali H., Zhou B., Fonseca J. M Digging for gold: evaluating the authenticity of saffron (*Crocus sativus* L.) via deep learning optimization. *Frontiers in Horticulture*. 2023. Vol. 2. P. 1225683–1225691.
66. Pfander H., Wittwer F. Carotinoid-glykoside 2. Mitteilung untersuchungen zur carotinoidzusammensetzung im safran. (Carotenoid-glycosides. Investigation of carotenoid-composition of saffron). *Helvetica Chimica Acta*. 1975. Vol. 58. P. 1608–1620.
67. 13-Cis crocin: a new crocinoid of saffron / G. Speranza et al. *Gazzetta Chimica Italiana*. 1984. Vol. 114. P. 189–192.
68. Tarantilis P. A., Tsoupras G., Polissiou M. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995. Vol. 699. P. 107–118.
69. Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS / M. Carmona et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54. P. 973–979.
70. Effects of crocetin esters and crocetin from *Crocus sativus* L. on aortic contractility in rat genetic hypertension / S. Llorens et al. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 17570–17584.
71. Rychener M., Bigler P., Pfander H. Isolierung und strukturaufklärung von neapolitanose (O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-(D-glucose), einem neuen trisaccharid aus den stempeln von

- gartenkrokussen (*Crocus neapolitanus* var.). *Helvetica Chimica Acta*. 1984. Vol. 67. P. 386–391.
72. Glycosylation of encapsulated crocetin by a *Crocus sativus* L. cell culture / C. Dufresne et al. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999. Vol. 24. P. 453–462.
73. Gregory M. J., Menary R. C., Davies N. W. Effect of drying temperature and air flow on the production and retention of secondary metabolites in saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. Vol. 53. P. 5969–5975.
74. Hu J., Fang L., Wang R., Wang P. The influence of different drying methods on constituents and antioxidant activity of saffron from China. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 2015. P. 1–8.
75. Ordoudi S. A., Tsimidou M. Z. Saffron quality: effect of agricultural practices, processing and storage. *Production practices and quality assessment of food crops*. 2004. Vol. 1. P. 209–260.
76. Kyriakoudi A., Chrysanthou A., Mantzouridou F., Tsimidou M. Z. Revisiting extraction of bioactive apocarotenoids from *Crocus sativus* L. dry stigmas (saffron). *Analytica Chimica Acta*. 2012. Vol. 755. P. 77–85.
77. Moraga Á. R., Mozos A. T., Ahrazem O., Gómez-Gómez L. Cloning and characterization of a glucosyltransferase from *Crocus sativus* stigmas involved in flavonoid glucosylation. *BMC Plant Biology*. 2009. Vol. 9. P. 109–125.
78. Lage M., Cantrell C., Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae*. 2009. Vol. 21. P. 366–373.
79. Tarantilis P. A., Polissiou M. G. Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997. Vol. 45. P. 459–462.
80. Agnihotri V. *Crocus sativus* Linn.: an informative review. *Aperito Journal of Advanced Plant Biology*. 2015. Vol. 1. P. 103–132.



81. Yao J., Jin H., He H., Wang R. Study on specific chromatograms of *Crocus sativus* and authenticity identification. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2015. Vol. 6. P. 1378–1380.
82. Alonso G. L., Salinas M. R., Sánchez-Fernández M. A., Garijo J. Physical parameters in controlling saffron quality. *Food Science and Technology International*. 2000. Vol. 6. P. 59–65.
83. Comparative evaluation of an ISO 3632 method and an HPLC-DAD method for safranal quantity determination in saffron / M. V. García-Rodríguez et al. *Food Chemistry*. 2017. Vol. 221. P. 838–843.
84. Phytochemical composition of Moroccan saffron accessions by headspace solid-phase-microextraction / M. Lage et al. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2015. Vol. 2. P. 1–7.
85. Changes in saffron volatile profile according to its storage time / L. Maggi et al. *Food Research International*. 2010. Vol. 43. P. 1329–1334.
86. Kanakis C. D., Daferera D. J., Tarantilis P. A., Polissiou M. G. Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. Vol. 52. P. 4515–4521.
87. Bononi M., Milella P., Tateo F. Gas chromatography of safranal as preferable method for the commercial grading of saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*. 2015. Vol. 176. P. 17–21.
88. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins / M. Carmona et al. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 100. P. 445–450.
89. Characterization of by-products of Saffron (*Crocus sativus* L.) production / P. Vignolini et al. *Natural Product Communications*. 2008. Vol. 3. P. 1959–1962.
90. Tung N. H., Shoyama Y. New minor glycoside components from saffron. *Journal of Natural Medicines*. 2013. Vol. 67. P. 672–676.

91. Straubinger M., Jezussek M., Waibel R., Winterhalter P. Two kaempferol sophorosides from *Crocus sativus*. *Natural Product Letters*. 1997. Vol. 10. P. 213–216.
92. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast / S. A. Baba et al. *South African Journal of Botany*. 2015. Vol. 99. P. 80–87.
93. Gismondi A., Serio M., Canuti L., Canini A., Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian saffron (*Crocus sativus* L.). *American Journal of Plant Sciences*. 2012. Vol. 3. P. 1573–1580.
94. UHPLC analysis of saffron (*Crocus sativus* L.): optimization of separation using chemometrics and detection of minor crocetin esters / A. A. D'Archivio et al. *Molecules*. 2018. Vol. 23 (8). P. 1851–1917.
95. Rödel W., Petrzika M. Analysis of the volatile components of saffron. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1991. Vol. 14. P. 771–774.
96. Kyriakoudi A., Ordoudi S. A., Roldán-Medina M., Tsimidou M. Z. Saffron, a functional spice. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2015. Vol. 3. P. 1059–1064.
97. Fernández J. A. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent research developments in plant science*. 2004. Vol. 2. P. 27–159.
98. Устименко О. В., Глущенко Л. А., Куценко Н. І., Колосович М. П. Агроекологічні дослідження у розвитку лікарського рослинництва. *Агроекологічний журнал*. 2017. № 3. С. 18–26.
99. Dawalbhakta M., Telang M. Patents on therapeutic and cosmetic applications of bioactives of *Crocus sativus* L. and their production through synthetic biology methods: a review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2017. Vol. 11. P. 3–19.
100. Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats / L. Fernández-Sánchez et al. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. e43074–e43085.

101. Khare C. P. *Indian Medicinal Plants—An Illustrated Dictionary*. First Indian Reprint, Springer (India) Pvt. Ltd., New Delhi, 2007. P. 717–718.
102. Abdullaev F. I., Espinosa-Aguirre J. J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention*. 2004. Vol. 28. P. 426–432.
103. Розробка методик стандартизації приймочок крокуса посівного (шафран) для включення у проект монографії Державної Фармакопеї України / О. О. Михайленко та ін. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2021. Т. 19, № 1 (73). С. 32–41.
104. Inhibitory activity on amyloid- $\beta$  aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents / M. A. Papandreou et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol. 54. P. 8762–8768.
105. Noorbala A. A., Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Jamshidi A. H. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. Vol. 97. P. 281–284.
106. The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review / M. R. Khazdair et al. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2015. Vol. 5. P. 376–391.
107. Pitsikas N. Constituents of saffron (*Crocus sativus* L.) as potential candidates for the treatment of anxiety disorders and schizophrenia. *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 303–314.
108. Babaei A., Arshami J., Haghparast A., Mesgaran D. M. Effects of saffron (*Crocus sativus*) petal ethanolic extract on hematology, antibody response, and spleen histology in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2014. Vol. 4. P. 103–109.
109. Mokhtari-Zaer A., Khazdair M. R., Boskabady M. H. Smooth muscle relaxant activity of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents: possible mechanisms. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2015. Vol. 5. P. 365–375.

110. Bhandari P. R. *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2015. Vol. 5. P. 81–87.
111. Boskabady M. H., Farkhondeh T. Antiinflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Crocus sativus* L. and its main constituents. *Phytotherapy Research*. 2016. Vol. 30. P. 1072–1094.
112. Razavi B. M., Hosseinzadeh H. Saffron: a promising natural medicine in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017. Vol. 97. P. 1679–1685.
113. Manthey J. A., Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. Vol. 50. P. 5837–5843.
114. Polyphenol composition and *in vitro* antiproliferative effect of corm, tepal and leaf from *Crocus sativus* L. on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) / R. Sánchez-Vioque et al. *Journal of Functional Foods*. 2016. Vol. 24. P. 18–25.
115. *Crocus cancellatus* subsp. *damascenus* stigmas: chemical profile, and inhibition of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase, key enzymes related to type 2 diabetes and obesity / M. R. Loizzo et al. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 31. P. 212–218.
116. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L. petals and leaves / S. M. Jadouali et al. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2018. Vol. 9. P. 113–118.
117. Satybaldiyeva D., Mursaliyeva V., Mammadov R., Zayadan B. Phenolic profiles and brine shrimp cytotoxicity of the ethanolic extract from the aerial part of *Crocus alatavicus* L. *International Journal of Biological Chemistry*. 2016. Vol. 9. P. 38–41.
118. Esmaeili N., Ebrahimzadeh H., Abdi K., Safarian S. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy Magazine*. 2011. Vol. 7. P. 74–80.

119. Chemical characterization and antioxidant compounds of flower parts of Moroccan *Crocus sativus* L. / S. M. Jadouali et al. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2019. Vol. 18. P. 476–480.
120. Antidepressant properties of bioactive fractions from the extract of *Crocus sativus* L. / Y. Wang et al. *Journal of Natural Medicines*. 2010. Vol. 64. P. 24–30.
121. Kell G., Rao A., Beccaria G., Clayton P. Affron® a novel saffron extract (*Crocus sativus* L.) improves mood in healthy adults over 4 weeks in a double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*. 2017. Vol. 33. P. 58–64.
122. Eusano GmbH & Co. K. G. Saffron extract Powder Crocin <http://www.eusano.com/botanical-raw-materials-and-extracts/saffron-crocus-sativus/35-saffron-extract> (accessed Dec 11, 2023)
123. Saffr'Activ® is a branded saffron extract (*Crocus sativus* red stigmas). URL: <http://www.saffractiv.com/> (Date of access: 25.11.2023).
124. Milajerdi A., Djafarian K., Hosseini B. The toxicity of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents against normal and cancer cells. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2016. Vol. 3. P. 23–32.
125. Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin / P. Lari et al. *Toxicology and Industrial Health*. 2015. Vol. 31. P. 367–376.
126. A review on phytochemical and therapeutic potential of *Iris germanica*. / B. S. Yousefsani et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021. Vol. 73. P. 611–625.
127. Boland G. M., Donnelly D. M. X. Isoflavonoids and related compounds. *Natural Product Reports*. 1998. Vol. 15. P. 241–261.
128. Iwashina T., Ootani S. Flavonoids of the genus *Iris*; structures, distribution and function: review. *Annals of the Tsukuba Botanical Garden*. 1998. Vol. 17. P. 147–183.

129. Williams C. A., Harborne J. B., Colasante M. Flavonoid and xanthone patterns in bearded *Iris* species and the pathway of chemical evolution in the genus. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1997. Vol. 25, № 4. P. 309–325.
130. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update / J. Reynaud et al. *Natural Product Reports*. 2005. Vol. 22. P. 504-515.
131. Wang H., Cui Y., Zhao C. Flavonoids of the genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 10, № 7. P. 643–661.
132. Harborne J. B., Williams C. A. The Phytochemical Richness of the Iridaceae and its systematic significance. *Annali Di Botanica*. 2000. Vol. 58. P. 43–50.
133. Chemical composition of saffron (*Crocus sativus* L.) from four countries / H. Caballero-Ortega et al. *Acta Horticulturae*. 2004. Vol. 650. P. 321–326.
134. Bate-Smith E. C., Harborne J. B. Mangiferin and other glycophenolics in *Iris* species. *Nature*. 1963. Vol. 198. P. 1307–1308.
135. Mangiferin: a review of dietary sources, absorption, metabolism, bioavailability, and safety / S. Mei et al. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. Vol. 63. P. 3046–3064.
136. Harborne, Jeffrey B.; Baxter, John Wiley & Sons. *Herbert Chemical Dictionary of Economic Plants*. (2001-08-30). 85. 236 p.
137. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves, rhizomes, and bulbs of the wild Iraqi Kurdish plant *Iris persica* / H. I. M. Amin et al. *Natural Product Communications*. 2017. Vol. 12. P. 441–444.
138. Lamshöft M., Marner F. J. Analysis of the iridals in rhizome extracts of *Iris variegata* Linn. *Natural Product Research*. 2005. Vol. 19. P. 57–60.
139. Chemical composition and biological activities of essential oil from the rhizomes of *Iris bulleyana* / G. B. Deng et al. *Agricultural Sciences in China*. 2009. Vol. 8. P. 691–696.

140. Composition of volatiles from three *Iris* species of Turkey / K. H. C. Başer et al. *Journal of Essential Oil Research*. 2011. Vol. 23. P. 66–71.
141. Al-Jaber H. I. Variation in essential oil composition of *Iris nigricans* Dinsm. (Iridaceae) endemic to Jordan at different flowering stages. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016. Vol. 9. P. S1190–S1196.
142. Antioxidant activity of the aqueous extract of *Iris taochia* and identification of its chemical constituents / H. Askin et al. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 80. P. 802–812.
143. Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) from Algeria / I. Chikhi et al. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012. Vol. 6. P. 1961–1968.
144. Genetic and environmental factors jointly impact leaf phenolic profiles of *Iris variegata* L. / U. Živković et al. *Plants*. 2021. Vol. 10. P. 1599–1617.
145. Tsarong T. J. Handbook of Traditional Tibetan Drugs: their nomenclature, composition, use, and dosage. New York, 1986. 101 p.
146. Phytochemical analysis and total antioxidant capacity of rhizome, above-ground vegetative parts and flower of three *Iris* species / A. Ž. Kostić et al. *Chemistry & Biodiversity*. 2019. Vol. 16. P. e1800565–e1800573.
147. Hacıbekiroğlu I., Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytotherapy Research*. 2011. Vol. 25. P. 522–529.
148. Selvi B., Demir M. Polyphenol contents and antioxidant, antibacterial, and DNA protective effects of *Iris orientalis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2021. Vol. 57. P. 367–370.
149. Antioxidant properties of the Lebanese plant *Iris x germanica* L. crude extracts and antagonism of chlorpromazine toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* / K. Sayyed et al. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022. Vol. 45. P. 1168–1179.
150. A comprehensive evaluation of the chemical profiles and biological properties of six geophytes from Turkey: sources of bioactive compounds for

- novel nutraceuticals / M. Fawzi Mahomoodally et al. *Food Research International*. 2021. Vol. 140. P. 110068–110077.
151. Asghar S. F., Habib-ur-Rehman, Choudahry M. I., Atta-ur-Rahman. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of petroleum ether extract (oil) and bio-assays of crude extract of *Iris germanica*. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 2011. Vol. 3. P. 95–100.
152. Antimicrobial and antioxidant activity of *Carum copticum* (L.) link and *Iris pseudacorus* L. essential oils before and after the encapsulation in polyamide / M. Ramtin et al. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022. Vol. 46. P. e16447–e16454.
153. Soy Isoflavones induce cell death by copper-mediated mechanism: understanding its anticancer properties / M. Farhan et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28. P. 2925–2941.
154. The role of isoflavones in the prevention of breast cancer and prostate cancer / T. Pejčić et al. *Antioxidants*. 2023. Vol. 12. P. 368–395.
155. Conforti F., Menichini F., Rigano D., Senatore F. Antiproliferative activity on human cancer cell lines after treatment with polyphenolic compounds isolated from *Iris pseudopumila* flowers and rhizomes. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 2009. Vol. 64. P. 490–494.
156. Cancer chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica* / E. Wollenweber et al. *Planta Medica*. 2003. Vol. 69. P. 15–20.
157. Protective effects of a standardized extract of *Iris germanica* on pancreas and liver in streptozotocin-induced diabetic rats / M. R. Mahdinezhad et al. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 16. P. 71–78.
158. Iridin, a novel lead from *Iris confusa* for management of *Helicobacter pylori* infection with selective COX-2 and HpIMP2DH inhibitory



- potential / P. M. Abdel-Baki et al. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12 (1). P. 11457–11468.
159. Iris Florentina. Florentine Orris. Henriette's Herbal Homepage. URL: <https://www.henriettes-herb.com/eclectic/kings/iris-flor.html> (Date of access: 02.01.2024).
160. Кречун А. В., Михайленко О. О. До питання стандартизації сировини півників. *Управління якістю в фармації* : матеріали XII наук.–практ. конф., м. Харків, 18 трав. 2018 р. Харків : НФаУ, 2018. С. 106–107.
161. Cadmium tolerance and accumulation by two species of *Iris* / Y. L. Han et al. *Ecotoxicology*. 2007. Vol. 16. P. 557–563.
162. Arthur O. Tucker, Thomas DeBaggio. The Encyclopedia of Herbs: A Comprehensive Reference to Herbs of Flavor and Fragrance. Edited by Francesco DeBaggio; Timber Press; 2nd edition (1 Jan. 2010). P. 264–267.
163. Co-oxidation of  $\beta$ -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenase / Z. Wu et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Vol. 47. P. 4899–4906.
164. Bosser A., Belin J. M. Synthesis of  $\beta$ -ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/ $\beta$ -carotene system involving free radical formation. *Biotechnology Progress*. 1994. Vol. 10. P. 129–133.
165. Mir J. I., Ahmed N., Wafai A. H., Qadri R. A. Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2012. Vol. 18. P. 371–375.
166. Determination of free amino acids and ammonium ion in saffron (*Crocus sativus* L.) from different geographical origins / C. P. Del Campo et al. *Food Chemistry*. 2009. Vol. 114. P. 1542–1548.
167. Ruban A. V., Young A. J., Pascal A. A., Horton P. The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-

- harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiology*. 1994. Vol. 104. P. 227.
168. Othman R., Mohd Hassan N., Ayuni Mohd Hatta F. Influence of environmental stress toward carotenogenesis regulatory mechanism through *in vitro* model system. *IntechOpen Book*. 2017. Chapter 6. P. 87–104.
169. Ferrer J. L., Austin M. B., Stewart C. Jr., Noel J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008. Vol. 46. P. 356–370.
170. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds, plant physiological aspects of phenolic compounds / N. F. Santos-Sánchez et al. New York : IntechOpen, 2019. P. 1-15. URL: <https://www.intechopen.com/books/plant-physiological-aspects-of-phenolic-compounds/shikimic-acid-pathway-in-biosynthesis-of-phenolic-compounds>). (Date of access: 02.01.2024).
171. Yonekura-Sakakibara K., Higashi Y., Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers of plant science*. 2019. Vol. 10. P. 943.
172. Schmid J., Amrhein N. Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*. 1995. Vol. 39. P. 737–749.
173. Seigler D. S. Tetraterpenes or carotenoids. *Plant secondary metabolism*. Boston, 1998. P. 486-505.
174. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants / R. Marchiosi et al. *Phytochemistry Reviews*. 2020. Vol. 19. P. 865–906.
175. Kinetic mechanism determination and analysis of metal requirement of dehydroquinase synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: An essential step in the function-based rational design of anti-TB drugs / J. D. De Mendonça et al. *Molecular BioSystems*. 2011. Vol. 7. P. 119–128.
176. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress / A. Sharma et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 2452–2474.

177. Mierziak J., Kostyn K. Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*. 2014. Vol. 19. P. 16240–16265.
178. Ramakrishna A., Ravishankar G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011. Vol. 6. P. 1720–1731.
179. The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites / J. P. Guyonnet et al. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017. Vol. 93 (4). P. 1–17.
180. Collection Practices: World Health Organization. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for Medicinal Plants. Geneva, 2003. 80 p.
181. Association: Guidelines for good agricultural and wild collection practices for medicinal and aromatic plants (GACP-MAP). European Herb Growers Association. Brussels, 2010. 13 p.
182. Association: A practical implementation guide to good agricultural and wild collection practices (GACP). European Herb Growers Association (EUROPAM), GACP Working Group. Brussels, 2016. 47 p.
183. Leung P.-C., Cheng K.-F. Quality Control of Medicinal Herbs Has Good Agricultural Practice (GAP) Helped? *Open Access Library Journal*. 2021. Vol. 8. P. 1–6.
184. Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження. СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012. Київ : МОЗ України, 2012. 18 с.
185. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review / A. Raza et al. *Plants*. 2019. Vol. 8. P. 34–63.
186. Bhatla Rajeev, Adarsh Tripathi R. S. Singh. Analysis of rainfall pattern and extreme events during southwest monsoon season over Varanasi during 1971-2010. *Mausam*. 2021. Vol. 67, № 4. P. 903–912.

187. Xie Y., Wang X., Silander J. A. Deciduous forest responses to temperature, precipitation, and drought imply complex climate change impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112. P. 13585–13590.
188. Springate D. A., Kover P. X. Plant responses to elevated temperatures: a field study on phenological sensitivity and fitness responses to simulated climate warming. *Global Change Biology*. 2014. Vol. 20. P. 456–465.
189. Millar Constance, Stephenson Nathan L., Stephens Scott L. Climate Change and Forests of the Future: Managing in the Face of Uncertainty. *Ecological Applications*. 2007. Vol. 17. P. 2145–2151.
190. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance / A. Shomali et al. *Plants* (Basel). 2022. Vol. 11. P. 3158–3185.
191. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits / L. Zoratti et al. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 534–551.
192. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments / M. Shamloo et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 9133–9146.
193. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties / K. Sharma et al. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015. Vol. 23. P. 243–252.
194. Jamloki A., Bhattacharyya M., Nautiyal M. C., Patni B. Elucidating the relevance of high temperature and elevated CO<sub>2</sub> in plant secondary metabolites (PSMs) production. *Heliyon*. 2021. Vol. 7. P. e07709–e07722.
195. Alhaithloul H. A. S., Galal F. H., Seufi A. M. Effect of extreme temperature changes on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *PeerJ*. 2021. Vol. 9. P. e11193–e11221.

196. Adegbaju O. D., Otunola G. A., Afolayan A. J. Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. *Heliyon*. 2020. Vol. 6. P. e04086–e04097.
197. Effects of environmental factors on anthocyanin accumulation in the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray across different desert grasslands / J. Li et al. *Deng Journal of Plant Physiology*. 2022. Vol. 279. P. 153828–153839.
198. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues / A. J. Stewart et al. *Plant, Cell and Environment*. 2001. Vol. 24. P. 1189–1197.
199. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium formula fertilization on the yield and berry quality of blueberry / X. Zhang et al. *PLoS ONE*. 2023. Vol. 18. P. e0283137–e0283150.
200. Accumulation of phosphorus and calcium in different cells protects the phosphorus-hyperaccumulator *Ptilotus exaltatus* from phosphorus toxicity in high-phosphorus soils / D. Ye et al. *Chemosphere*. 2020. Vol. 264. P. 128438–128405.
201. Muszyńska E., Labudda M. Dual role of metallic trace elements in stress biology-from negative to beneficial impact on plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. P. 3117–3144.
202. Morrissey J., Guerinot M. L. Trace elements: too little or too much and how plants cope. *F1000 Biology Reports*. 2009. Vol. 1. P. 14–18.
203. Посудін Ю. І. Біофізика рослин : підручник. Вінниця : Нова Книга, 2004. 256 с.
204. Григорюк І. П., Бойко О. А., Прилуцька С. В. Фізіологія рослин з основами біохімії : практикум. Київ : ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2014. 144 с.
205. Разумова С. Т. Екологія рослин з основами ботаніки та фізіології : конспект лекцій. Одеса, 2013. 197 с.
206. Забродоцька Л. Ю. Основи агрономії : навч. посіб. Луцьк : Інформ.-вид. відділ Луцького НТУ, 2019. 360 с.

207. Medicines Agency. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP); Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2, EMA/CVMP/814/00 Rev. 2, EMA/HMPC/201116/2005 Rev. 2. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products, Traditional Herbal Medicinal Products. London, 2011. 11 p.
208. Manufacturing Practice. World Health Organization. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, 2007. 92 p.
209. Medicines Agenc. European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Doc. Ref. EMEA/HMPC/246816/2005. Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for Starting Materials of Herbal Origin. London, 2006. 30 p.
210. Medicines Agency. European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). EMA/HMPC/139800/2004 Rev.5. HMPC Rules of procedure. London, 2021. 7 p.
211. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Допов. 5. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021, 424 с.
212. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций) / А. П. Шретер и др. Москва : Медицина, 1985. 328 с.
213. Справочник по заготовкам лекарственных растений : справ. изд. / Д. С. Ивашин и др. 6-е изд., испр. и доп. Киев : Урожай, 1989. 288 с.
214. Traditional Medicine. World Health Organization. WHO/EDM/TRM/2000.1. Programme on Traditional Medicine. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva, 2000. 80 p.

215. WHO traditional medicine strategy 2002–2005 / Traditional Medicine. World Health Organization. WHO/EDM/TRM/2002.1. Programme on Traditional Medicine. Geneva, 2002. 74 p.
216. Manufacturing Practice. World Health Organization. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, 2007. 92 p.
217. Working Document. World Health Organization. Working document QAS/19.793. Good storage and distribution practices. Draft document for comments, May 2019. Geneva, 2019. 38 p.
218. Quality Control. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998. 122 p.
219. Medicines Agency. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP); Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). EMA/CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2; EMA/CVMP/815/00 Rev. 2; EMA/HMPC/162241/2005 Rev. 2. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products, traditional herbal medicinal products. London, 2006. 19 p.
220. Report of the 3<sup>rd</sup> session of the Codex Committee on spices and culinary herbs. REP17/SCH. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee. 40th Session, CICG, Switzerland. Geneva, 2017. 98 p.
221. Franic D. M., Kleyman K. A qualitative study of herbal medicine use in the Ukraine: implications for US pharmacy practice. *Journal of pharmacy practice*. 2012. Vol. 25 (1). P. 96–100.
222. Nano-derived formulations with curcumin in inflammation-related diseases / C. Quispe et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021. Vol. 2021. P. 3149223.

223. Bioaccumulation abilities of different parts of *Iris pumila* L. / S. N. Avramov et al. *3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology* (9-12 June 2018). Belgrade : Serbia Volume, 2018. P. 125–126.
224. Український гідрометеорологічний центр : офіційний сайт. .URL: <https://meteo.gov.ua/> (дата звернення:12.01.2024).
225. Maps.ie. URL: <https://www.maps.ie/> (Date of access:12.01.2024).
226. World Map of the Köppen-Geiger climate classification Updated / M. Kottek et al. *Meteorologische Zeitschrift*. 2006. Vol. 15. P. 259.
227. Карти ґрунтів України. URL: <https://superagronom.com/karty/karta-gruntiv-ukrainy> (дата звернення:12.01.2024).
228. Soil Atlas of Europe, European Soil Bureau Network European Commission. Office for Official Publications of the European Communities, L-2995 Luxembourg, 2005. 128 p.
229. File: Europe sunshine hours map.png. Wikimedia Commons. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Europe\\_sunshine\\_hours\\_map.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Europe_sunshine_hours_map.png) (Date of access:12.01.2024).
230. Global solar UV index: a practical guide / World Health Organization, World Meteorological Organization, United Nations Environment Programme & International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. World Health Organization. 2002, 18 p. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42459> (Date of access:12.01.2024).
231. Brugger K., Rubel F. Characterizing the species composition of European Culicoides vectors by means of the Köppen-Geiger climate classification. *Parasites Vectors*. 2013. Vol. 6. P. 333–339.
232. Weather Online. URL: <https://www.woeurope.eu/>(Date of access:12.01.2024).
233. ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development. Step 5; EMA/CHMP/ICH/167068/2004; European Medicines Agency. Amsterdam : The Netherlands, 2017. 21 p.



234. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products; EMA/HMPC/201116/2005 Rev. 2; Euro-pean Medicines Agency. Amsterdam : The Netherlands, 2011. 20 p.
235. EMA-FDA Pilot Program for Parallel Assessment of Quality-by-Design Applications: Lessons Learnt and Q&A Resulting from the First Parallel Assessment; EMA/430501/2013; European Medicines Agency and U.S. Food and Drug Administration. Human Medi-cines Development and Evaluation. Amsterdam, 2013. 3 p.
236. Overview of Comments Received on Draft ‘Reflection Paper on Markers Used for Quantitative and Qualitative Analysis of Herbal Medic-inal Products and Traditional Herbal Medicinal Products’; EMEA/HMPC/253629/2007; European Medicines Agency. Amsterdam, 2008. 12 p.
237. Questions and Answers on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products–Revision 6; EMA/HMPC/41500/2010 Rev.6; European Medicines Agency. Amsterdam : The Netherlands, 2018. 20 p.
238. Guideline on Specifications Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Substances Herbal Preparations and Herbal Medicinal Products Traditional Herbal Medicinal Products-Revision 2; EMA/HMPC/162241/2005 Rev. 2; European Medicines Agency. Amsterdam : The Netherlands, 2011. 32 p.
239. Excess deaths from COVID-19 and other causes in the US, March 1, 2020, to January 2, 2021. Woolf SH, Chapman DA, Sabo RT, Zimmerman EB. *The Journal of the American Medical Association*. 2021. Vol. 325. P. 1786–1789.
240. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management / M. Hussain et al. *Infection and Drug Resistance*. 2017. Vol. 10. P. 121–134.

241. Михайленко О. О. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку противірусних лікарських засобів. *Збірника наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика*. 2015. Кн. 24. Р. 336–343.
242. Zhang L., Mao S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 12. P. 1–8.
243. ICH Guideline Q9 on Quality Risk Management; EMA/CHMP/ICH/24235/2006; European Medicines Agency. Amsterdam : The Netherlands, 2015. 38 p.
244. Quality by design I: Application of failure mode effect analysis (FMEA) and Plackett-Burman design of experiments in the identification of "main factors" in the formulation and process design space for roller-compacted ciprofloxacin hydrochloride immediate-release tablets / R. Fahmy et al. *AAPS PharmSciTechnol*. 2012. Vol. 13. P. 1243–1254.
245. Schmidt A., Strube J. Distinct and quantitative validation method for predictive process modeling with examples of liquid-liquid extraction processes of complex feed mixtures. *Processes*. 2019. Vol. 7. P. 298–318.
246. Medicinal plants: influence of environmental factors on the content of secondary metabolites / C. V. Borges et al. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. 2017. Vol. 15. P. 259–277.
247. Uhlenbrock L., Sixt M., Strube J. Quality-by-Design (QbD) process evaluation for phytopharmaceuticals on the example of 10-deacetylbaicatin III from yew. *Resource-Efficient Technologies*. 2017. Vol. 3. P. 137–143.
248. Risk assessment for compounding ointments quality by Ishikawa diagram construction / L. Savchenko et al. *Farmacia*. 2021. Vol. 69. P. 688–696.
249. Indrayanto G. Recent development of quality control methods for herbal derived drug preparations. *Natural product communications*. 2018. Vol. 13 (12). P. 1599–1606.
250. Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal

- products / Medicines Agency. European Medicines Agency. EMEA/HMPC/253629/2007. London, 2008. 19 p.
251. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines / C. Liu et al. *Chinese Herbal Medicines*. 2017. Vol. 9 (1). P. 3–13.
252. Choosing chemical markers for quality assurance of complex herbal medicines: Development and application of the herb MaRS criteria / A. Bensoussan et al. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2015. Vol. 97. P. 628–640.
253. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Харків : Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр», 2015. 1152 с.
254. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts / N. Cicco et al. *Microchemical Journal*. 2009. Vol. 91. P. 107–110.
255. Estimation of the influence of the environmental factors on the accumulation of phytochemicals and antioxidant capacity in the ivy leaves (*Hedera helix* L.) / I. Bezruk et al. *Natural Products Research*. 2020. Vol. 34. P. 1–6.
256. Hamidu L., Ahmad A. R., Najib A. Qualitative and quantitative test of total flavonoid buni fruit (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) with UV-Vis spectrophotometry method. *Pharmacognosy Journal*. 2018. Vol. 10. P. 60–63.
257. Практикум по фармакогнозии : учеб. пособие для студ. вузов / В. Н. Ковалев и др. ; под общ. ред. В. Н. Ковалева. Харьков : Изд-во НФаУ : Золотые страницы, 2003. 512 с.
258. Кречун А. В., Михайленко О. О., Ковальов В. С., Орлова Т. Г. Скринінг накопичення біологічно активних речовин в ірисі угорському впродовж вегетаційного періоду. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12, № 2 (30). С. 135–140.

259. Modified 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo thiazoline)-6-sulphonic acid radical cation decolorization assay for antioxidant activity of human plasma and extracts of traditional medicinal plants / M. N. Asghar et al. *Acta Chimica Slovenica*. 2008. Vol. 55. P. 408–418.
260. ICH Guidance Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-step-5-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-step-5-first-version_en.pdf) (accessed 22<sup>nd</sup> April 2023).
261. Marksa M., Radušienė J., Jakštas V., Ivanauskas L. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers. *Natural Products Research*. 2016. Vol. 30, № 5. P. 536–543.
262. Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants / C. Cassagne et al. *Progress in Lipid Research*. 1994. Vol. 33. P. 55–69.
263. Carrapiso A. I., García C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids*. 2000. Vol. 35, № 11. P. 1167–1177.
264. Lyons J. M., Weaton T. A., Pratt H. K. Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plants. *Plant Physiology*. 1964. Vol. 39. P. 262–270.
265. Changes in growth and production of non-psychoactive cannabinoids induced by pre-sowing treatment of hemp seeds with cold plasma, vacuum and electromagnetic field / A. Ivankov et al. *Applied Sciences*. 2020. Vol. 10. P. 8519–8533.
266. Pre-sowing seed treatment with cold plasma and electromagnetic field increases secondary metabolite content in purple coneflower (*Echinacea purpurea*) leaves / V. Mildaziene et al. 2017. *Plasma Processes and Polymers*. 2017. Vol. 15. P. 1700059–1700070.
267. Muravnik L. E., Ramawat K. G., Ekiert H. M., Goyal S. The structural peculiarities of the leaf glandular Trichomes: A review. In plant cell and tissue

- differentiation and secondary metabolites: fundamentals and applications. Springer International Publishing. Switzerland, 2021. P. 63–97.
268. Larsson J., Gottfries J., Muresan S., Backlund A. ChemGPS-NP: tuned for navigation in biologically relevant chemical space. *Journal of Natural Products* 2007. Vol. 70. P. 789–794.
269. ChemGPS-NP. URL: <http://chemgps.bmc.uu.se>. (Date of access:12.01.2024).
270. Anti-allergic hydroxy fatty acids from *Typhonium blumei* explored through ChemGPS-NP / M. Korinek et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2017. Vol. 8. P. 356–363.
271. ChemBL. URL: [https://www.ebi.ac.uk/chembl/g/#search\\_results/all/query=influenza](https://www.ebi.ac.uk/chembl/g/#search_results/all/query=influenza) (Date of access:12.01.2024).
272. Amarelle L., Lecuona E., Sznajder J. I. Anti-Influenza treatment: drugs currently used and under development. *Archivos de Bronconeumología*. 2017. Vol. 53. P. 19–26.
273. Hu Y., Musharrafieh R., Zheng M., Wang J. Enterovirus D68 antivirals: past, present, and future. *ACS Infectious Diseases*. 2020. Vol. 6. P. 1572–1586.
274. High-content screening of a taiwanese indigenous plant extract library identifies *Syzygium simile* leaf extract as an inhibitor of fatty acid uptake / C. H. Yen et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19. P. 2130–2145.
275. Identification of compound isolated from *Beilschmiedia tsangii* as a liver cancer specific NRF2 inhibitor / Y. S. Chen et al. *Cancer Research*. 2017. Vol. 77. P. 190.
276. Vilkickyte G., Raudone L., Petrikaite V. Phenolic fractions from *Vaccinium vitis-idaea* L. and assessment of their antioxidant and anticancer activities. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. P. 1261–1281.

277. 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. P. 57–64.
278. Затильнікова О. О., Осолодченко Т. П., Ковальов В. М. Антимікробна активність екстрактів з *Iris pseudacorus* L. *Анали Мечниковського Інституту*. 2010. № 4. С. 43–47.
279. Identification of BPR3P0128 as an inhibitor of cap-snatching activities of influenza virus / J. T. A. Hsu et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012. Vol. 56. P. 647–657.
280. Mechanism by which ma-xing-shi-gan-tang inhibits the entry of influenza virus / C. F. Hsieh et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012. Vol. 143. P. 57–67.
281. Rosmarinic acid exhibits broad anti-enterovirus A71 activity by inhibiting the interaction between the five-fold axis of capsid VP1 and cognate sulfated receptors / C. F. Hsieh et al. *Emerging Microbes & Infections*. 2020. Vol. 9. P. 1194–1205.
282. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory*. 1968. Vol. 97. P. 77–89.
283. Randialic acid B and tomentosolic acid block formyl peptide receptor 1 in human neutrophils and attenuate psoriasis-like inflammation *in vivo* / M. Korinek et al. *Biochemical Pharmacology*. 2021. Vol. 190. P. 114596–114616.
284. Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1 / S. C. Yang et al. *The Journal of Immunology*. 2013. Vol. 190. P. 6511–6519.

285. Suppression of superoxide anion and elastase release by C18 unsaturated fatty acids in human neutrophils / T. L. Hwang et al. *Journal of Lipid Research* 2009. Vol. 50. P. 1395–1408.
286. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells / D. C. Marks et al. *Leukemia Research*. 1992. Vol. 16. P. 1165–1173.
287. Anti-allergic potential of *Typhonium blumei*: Inhibition of degranulation via suppression of PI3K/PLC $\gamma$ 2 phosphorylation and calcium influx / M. Korinek et al. *Phytomedicine*. 2016. Vol. 23. P. 1706–1715.
288. Antiallergic potential on RBL-2H3 cells of some phenolic constituents of *Zingiber officinale* (ginger) / B. H. Chen et al. *Journal of Natural Products* 2009. Vol. 72. P. 950–953.
289. Probing the antiallergic and anti-inflammatory activity of biflavonoids and dihydroflavonols from *Dietes bicolor* / I. M. Ayoub et al. *Journal of Natural Products*. 2018. Vol. 81. P. 243–253.
290. Експериментальне (докліщчне) вивчення фармакологічних речовин, які пропонуються як нестероїдні протизапальні засоби / С. М. Дроговоз та ін. *Докліщчні дослідження лікарських засобів* : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. С. 292–306.
291. Западнюк М. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте. Киев : Высш. шк., 1983. 382 с.
292. Кожем`якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдинова Г. А. Науково практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ : Авіцена, 2002. 145 с.
293. Директива Совета ЕС о сближении законов, постановлений и администрирование положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС). *Надлежащая производственная практика*

- лекарственных средств* / под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загория, В. П. Георгиевского, Е. П. Безуглой. Киев : Морион, 1999. С. 508–545.
294. Коваленко В. М., Стефанов О. В., Максимов Ю. М., Трахтенберг І. М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів : метод. рек. Київ, 2000. С. 74–97.
295. Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів, Порядку визначення установ, які проводять доклінічне вивчення лікарських засобів : наказ МОЗ України від 14.12.2009 р. № 944. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0972-01#Text> (дата звернення: 12.01.2024).
296. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика. Київ : Міністерство охорони здоров'я України, 2009. 27 с.
297. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2001. 556 с.
298. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р. П. Барыкина и др. Москва : Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
299. European Pharmacopoeia. 9<sup>th</sup> Ed.; European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, 2014. Vol. 1. 1694 p.
300. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид., доп. 1. Харків, 2016. С. 124.
301. Mango (*Mangifera indica* L.): a magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential / В. Mirza et al. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021. Vol. 61, № 13. P. 2125-2151.
302. *Crocus sativus* L. Cultivation in Alpine environments: stigmas and tepals as source of bioactive compounds / М. Caser et al. *Agronomy*. 2020. Vol. 10. P. 1473–1494.
303. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity / Е. Karimi et al. *Molecules*. 2010. Vol. 15. P. 6244–6257.



304. Chemical composition and sensory evaluation of saffron / S. Predieri et al. *Foods*. 2021. Vol. 10. P. 2604–2612.
305. Investigation of organic acids in saffron stigmas (*Crocus sativus* L.) extract by derivatization method and determination by GC/MS / L. Jarukas et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 3427–3437.
306. Hu T., Liu S. Q., Amombo E., Fu J. M. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photo-chemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 16. P. 403–416.
307. The hypolipidemic activity of furoic Acid and furylacrylic Acid derivatives in rodents / I. H. Hall et al. *Pharmaceutical research*. 1985. Vol. 2. P. 233–238.
308. Jitan S. A., Alkhoori S. A., Yousef L. F. Phenolic acids from plants: extraction and application to human health. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2018. Vol. 58, Chapter 13. P. 389–398.
309. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry / J. Gullberg et al. *Analytical Biochemistry*. 2004. Vol. 331. P. 283–295.
310. Giorgi A., Pentimalli D., Giupponi L., Panseri S. Quality traits of saffron (*Crocus sativus* L.) produced in the Italian Alps. *Open Agriculture*. 2017. Vol. 2. P. 52–57.
311. Effective isolation of picrocrocin and crocins from saffron: from HPTLC to working standard obtaining / L. Jarukas, K. Vitkevicius, O. Mykhailenko, I. Bezruk, V. Georgiyants, L. Ivanauskas. *Molecules*. 2022. № 27 (13). P. 4286–4300.
312. Михайленко О. О. Дослідження біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного (шафран) з України. *Фармацевтичний журнал*. 2019. №74 (6). С. 70–77.

313. Chen N., Yang B. Research progress of chemical components and pharmacological effects of non-medicinal parts of *Crocus sativus*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2018. Vol. 43 (14). P. 2884–2891.
314. Comparative analysis of the major metabolites of Ukrainian saffron samples by HPLC / O. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021. № 76. P. 394–396.
315. Comparative analysis of apocarotenoids and phenolic constituents of *Crocus sativus* stigmas from eleven countries: ecological impact / O. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Archiv der Pharmazie*. 2022. № 355 (4). P. e2100468–e2100484.
316. 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.
317. Development and validation of HPLC method for determination of biological active substances of *Crocus sativus* L / V. Karpinskaite, I. Bezruk, R. Marksienė, O. Mykhailenko, V. Georgiyants, L. Ivanauskas. Topical issues of new medicines development: мат. XXVI Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, 10-12 квітня 2019 р. Харків, НФаУ, 2019. С. 83–84.
318. Moore J. C., Spink J., Lipp M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* 2012. Vol. 77. P. R118–R126.
319. Accidental poisoning with autumn *Crocus*. / L. Gabrscek et al. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2004. Vol. 42. P. 85–88.
320. Alali F. Q., El-Alali A., Tawaha K., El-Elimat T. Seasonal variation of colchicine content in *Colchicum brachyphyllum* and *Colchicum tunicatum* (Colchicaceae). *Natural Product Research*. 2006. Vol. 12. P. 1121–1128.
321. Niel E., Scherrmann J. M. Colchicine today. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. 2006. Vol. 73. P. 672–678.

322. Two fatal intoxications by colchicine taken for saffron. Clinical, medico-legal and forensic toxicological implications / A. Giorgetti et al. *Legal Medicine*. 2019. Vol. 38. P. 64–68.
323. Agayev Y. M., Fernandez J., Zarifi E. Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. *Euphytica*. 2009. Vol. 169. P. 81–99.
324. COST Action FA 1101. Saffronomics: omics technologies for crop improvent, traceability, determination of authenticity, adulteration and origin in saffron. O. Santana. 2012. 231 p. URL: <https://www.cost.eu/actions/FA1101/> (Date of access:12.01.2024).
325. Effect of the extraction process on the biological activity of lyophilized apricot extracts recovered from *Apricot pomace* / D. Cheaib et al. *Antioxidants* 2018. Vol. 7. P. 11–21.
326. Lech K., Witowska-Jarosz J., Jarosz M. Saffron yellow: Characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Mass Spectrometry*. 2009. Vol. 44. P. 1661–1667.
327. A review on medicinal properties of saffron toward major diseases / S. Abd Razak et al. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2017. Vol. 23. P. 98–116.
328. British Pharmacopoeia. Materials for use in the Manufacture of Homoeopathic Preparations, «Saffron for Homoeopathic Preparations». London, 2009. Vol. III. P. 7603.
329. German Homoeopathic Pharmacopoeia, “*Crocus*. Safran”, CRC Press. London, 2003. Vol. 1. P. 547.
330. Deutscher Arzneimittel-Codex/Neues Rezeptur-Formularium (DAC/NRF). Ergänzungsbuch zum Arzneibuch, Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA), Govi-Verlag, 2016. S005, 6000 p.

331. Ayurvedic Pharmacopoeia of India, «Kumkuma (Style and stigma)», Publisher: CreateSpace Independent Publishing Platform. Deli, 2015, Part-I, Vol. IV. P. 59.
332. Taiwan Herbal Pharmacopeia. 2<sup>nd</sup> Ed. English Version. «Crocus stigma», Ministry of Health and Welfare, Republic of China. Taiwan, 2016. 480 p.
333. The Japanese Pharmacopoeia. 17<sup>nd</sup> Ed. English Version, «Crude Drugs Saffron». The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016. 44 P.
334. Chinese Pharmacopoeia. “Stigma Croci. Xihonghua”. 2005. p. 310–311.
335. FDA PART 73 - Listing of color additives exempt from certification Subpart A Foods. Sec. 73.500 Saffron.
336. Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices - Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 2. Test Methods [(first revision of IS 5453 (Part 2)] (Adoption of ISO 3632 - 2 : 2010).
337. Doc. No. FAD 9(2515)C Draft Indian Standard Spices — Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1. Specification [third revision of IS 5453 (Part 1)] (Adoption of ISO 3632 - 1 : 2011).
338. National Iranian Standards 259-1: Saffron specifications and 259-2: Saffron test methods.
339. Шафрану посівного приймочки <sup>N</sup> / О. О. Михайленко та ін. Державна Фармакопея України. Харків, 2020. С. 535–536.
340. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model *in vivo* / J. P. Lin et al. *Environmental Toxicology*. 2012. Vol. 27. P. 480–484.
341. Screening of neuraminidase inhibitory activities of some medicinal plants traditionally used in Lingnan Chinese medicines / J. Liu et al. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2018. Vol. 18. P. 102–113.
342. Novel alpha- and beta-amino acid inhibitors of influenza virus neuraminidase / W. M. Kati et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. Vol. 45. P. 2563–2570.

343. 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 / O. Mykhailenko et al. *Scientia Pharmaceutica*. 2020. Vol. 88. P. 8–21.
344. Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (*Crocus sativus* stigma): Moving from Correlation toward Causation / O. Mykhailenko et al. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021. Vol. 21. P. 203–218.
345. Anti-allergic inflammatory potential of herbs and herbal natural products / O. O. Mykhailenko, M. Korinek, M. El-Shazly, Y.-C. Tsai, I. M. Ayoub, A. A. Thabet, F. S. Youssef, Y.-C. Wu, F.-R. Chang, B.-H. Chen, T.-L. Hwang, V. M. Kovalyov, V. A. Georgiyants. Topical issues of new medicines development: мат. XXVI Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, 10 – 12 квітня 2019 р. Харків, НФаУ, 2019. С. 52–53.
346. Anti-allergic activities of saffron extracts / O. Mykhailenko, M. Korinek, B.-H. Chen, T.-L. Hwang, V. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. Sciences and Practice: abstract of 10<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, 15 November 2019, Kaunas, Lithuania, 2019. P. 80 p.
347. The HPLC post-column antioxidant assay and effect on respiratory burst in human neutrophils of *Crocus sativus* extracts / O. Mykhailenko, M. Korinek, T.-L. Hwang, C.-H. Yen, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. 35<sup>th</sup> Symposium on the Natural Products, Poster A01. 11 – 13 September 2020, Taipei Medical University of Graduate Institute of Pharmacognosy, Taiwan.
348. Шаталова О. М., Михайленко О. О. Експериментальне дослідження протизапальної активності екстрактів з рослин родини *Iridaceae*. Український біофармацевтичний журнал. 2019. № 1 (58). С. 39–43.

349. Mykhailenko O., Georgiyants V. The quality of Ukrainian saffron and its antibacterial activity. E-Poster 9. 4<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, November 30 – December 5, 2020, Xi'an, China.
350. Activity of *Crocus sativus* L. extracts on human brain cancer cell lines / A. Dabrišiūtė, O. Mykhailenko, V. Georgiyants, L. Ivanauskas, V. Petrikaitė. Achievements of Pharmaceutical Science and Practice: book of abstracts of International conference of the Lithuanian Pharmaceutical Association, 16 October 2020, Lithuanian Pharmaceutical Association, Vilnius, Lithuania, 2020. P. 19.
351. Михайленко О. О., Георгіянец В. А. Історичне та сучасне фармакологічне використання шафрану. Planta+. Наук., практи. та освіта: мат. Міжнар. наук-практи. конф., 19 лютого 2021, м. Київ, Україна, 2021. С.144–148.
352. Mykhailenko O., Georgiyants V. Potential Benefits of Ukrainian *Crocus sativus* as Anti-inflammatory agent. MOL2NET'22, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 8<sup>th</sup> ed. congress MODECO-07: Molec. Sci., Develop., Environ. Sustainability and Economy Congress, Paris, France-Ohio, USA, 2022.
353. Effective and simple approach for colchicine determination in saffron parts / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, M. Marksa, O. Borodina, V. Georgiyants. *Food Chemistry*. 2022. № 368. P. 130862–130867.
354. Mykhailenko O., Ivanauskas L., Georgiyants V. Identification of saffron adulteration by thin-layer chromatography coupled with high performance liquid chromatography. Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations: abstract of International E-conference, 23<sup>rd</sup> October, 2020. Kaunas, Lithuania, 2020. P. 51.
355. Mykhailenko O. O., Ivanauskas L., Georgiyants V. A. Analytical method of picrocrocin isolation from saffron. Сучасні проблеми хімії: Мат. XXII Міжнар. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, 19 – 21

- травня 2021, Хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна, 2021. С. 26.
356. Isolation of naturally compounds crocins from *Crocus sativus* L. stigma as anticancer agents / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Georgiyants. *Vanguards of Natural Product Research*, 16<sup>th</sup>, 23<sup>rd</sup>, 30<sup>th</sup> July 2021, American Society of Pharmacognosy, USA, 2021. P-065.
357. The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds / I. Lahmass et al. *Journal of Functional Foods*. 2017. Vol. 35. P. 341–351.
358. Santana-Méridas O., González-Coloma A., Sánchez-Vioque R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*. 2012. Vol. 11. P. 447–466.
359. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2001. Vol. 12. P. 707–715.
360. Integrated phytochemical analysis based on UPLC-MS and network pharmacology approaches to explore the quality control markers for the quality assessment of *Trifolium pratense* / L. Luo et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 3787.
361. Potassium, magnesium and calcium content in individual parts of *Phaseolus vulgaris* L. plant as related to potassium and magnesium nutrition / J. Tůma et al. *Plant, Soil and Environment*. 2004. Vol. 50. P. 18–26.
362. Distinctive physi-ological and molecular responses to cold stress among cold-tolerant and cold-sensitive *Pinus halepensis* seed sources / K. Taïbi et al. *BMC Plant Biology*. 2018. Vol. 18. P. 236–247.
363. Keller B., Keller E., Salcher O., Lingens F. Arogenate (Pretyrosine) pathway of tyrosine and phenylalanine biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926. *Microbiology*. 1982. Vol. 128. P. 1199–1202.

364. Igamberdiev A. U., Eprintsev A. T. Organic acids: The pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1042–1057.
365. Fatty acid composition of lipids of *Iris sibirica* / O. Mykhailenko et al. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017. Vol. 66. P. 220–227.
366. Hu T., Liu S. Q., Amombo E., Fu J. M. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photo-chemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*. 2015. Vol. 16. P. 403–416.
367. Metabolic shift in sugars and amino acids regulates sprouting in saffron corm / J. Bagri. et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 11904–11914.
368. Samarghandian S., Borj, A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 6. P. 99–107.
369. Di Rosa M., Giround J. P., Willoughby D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology*. 1971. Vol. 104(15). P. 29.
370. Owen D. A. A, Woodward D. F. Histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists in acute inflammation. *Biochemical Society Transactions*. 1980. Vol. 8(1). P. 150–155.
371. Kazlauskienė G., Laukevičienė A. Experimental investigation of antihistamine action of A new vegetable orginal preparation. *Immunopathology Allergic Infection*. 2002. Vol. 3. P. 52–56.
372. Yu L., Li J., Xiao M. Picrocrocic exhibits growth inhibitory effects against SKMEL- 2 human malignant melanoma cells by targeting JAK/STAT5 signaling pathway, cell cycle arrest and mitochondrial mediated apoptosis. *Journal of Balkan Union of Oncology*. 2018. Vol. 23. P. 1163–1168.



373. Isolation, purification and characterization of naturally derived crocetin  $\beta$ -D-glucosyl ester from *Crocus sativus* L. against breast cancer and its binding chemistry with ER-alpha/HDAC2. / M. A. Mir et al. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020. Vol. 27. P. 975–984.
374. Colapietro A., Mancini A., D'Alessandro A. M., Festuccia C. Crocetin and crocin from saffron in cancer chemotherapy and chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 19. P. 38–47.
375. Lambrianidou A., Koutsougianni F., Papapostolou I., Dimas K. Recent advances on the anticancer properties of saffron (*Crocus sativus* L.) and its major constituents. *Molecules*. 2020. Vol. 26. P. 86–102.
376. Escribano J., Alonso G. L., Coca-Prados M., Fernandez J. A. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*. 1996. Vol. 100 (1-2). P. 23–30.
377. Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9): Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.2:2011 / розроб. М. Ляпунов та ін. Вид. офіц. К.: МОЗ України, 2011. 26 с.
378. Evaluation of antiinflammatory properties of isoorientin isolated from tubers of *Pueraria tuberosa* / K. Anilkumar et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. Vol. 2017. P. 5498054–5498065.
379. Investigation of the anticancer mechanism of isoorientin isolated from *Eremurus spectabilis* leaves via cell cycle pathways in HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells / G. Gundogdu et al. *The Eurasian Journal of Medicine*. 2018. Vol. 50. P. 168–172.
380. Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice / G. Zhang et al. *International Immunopharmacology*. 2019. Vol. 75. P. 105753–105765.
381. Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells / R. Caparica et al. *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. P. 233–248.

382. Rutin: A flavonoid as an effective sensitizer for anti-cancer therapy; insights into multifaceted mechanisms and applicability for combination therapy / A. Satari et al. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021. Vol. 2021. P. 9913179–9913189.
383. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential / M. Imran et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 2277–2293.
384. The effects of quercetin and kaempferol on multidrug resistance and the expression of related genes in human erythroleukemic K562/A cells. / H. Yanqiu et al. *African Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10. P. 13399–13406.
385. Gao Y., Yin J., Rankin G. O., Chen Y. C. Kaempferol induces G2/M cell cycle arrest via checkpoint kinase 2 and promotes apoptosis via death receptors in human ovarian carcinoma A2780/CP70 Cells. *Molecules*. 2018. Vol. 23. P. 1095–1107.
386. Kim T. H., Ku S. K., Lee I. C., Bae J. S. Anti-inflammatory effects of kaempferol-3-O-sophoroside in human endothelial cells. *Inflammation Research*. 2012. Vol. 61. P. 217–224.
387. Bauer D., Mazziro E., Soliman K. F. A. Whole transcriptomic analysis of apigenin on TNF $\alpha$  immuno-activated MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019. Vol. 16. P. 421–431.
388. Rajendran I., Ponrasu T., Rajaram R., Suguna L. The apoptotic effect of Ferulic acid-synthesized gold nanoparticles against human epidermoid carcinoma (A431) cells via activation of caspase-3 pathway. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021. Vol. 63. P. 102478–102488.
389. Chen D., Landis-Piwowar K. R., Chen M. S., Dou Q. P. Inhibition of proteasome activity by the dietary flavonoid apigenin is associated with growth inhibition in cultured breast cancer cells and xenografts. *Breast Cancer Research*. 2007. Vol. 9. P. R80–R88.

390. Isoquercitrin inhibits bladder cancer progression *in vivo* and *in vitro* by regulating the PI3K/Akt and PKC signaling pathways / F. Chen et al. *Oncology Reports*. 2016. Vol. 36. P. 165–172.
391. Isoquercitrin inhibits the progression of pancreatic cancer *in vivo* and *in vitro* by regulating opioid receptors and the mitogen-activated protein kinase signalling pathway / Q. Chen et al. *Oncology Reports*. 2014. Vol. 33. P. 840–848.
392. Astragalin inhibits the proliferation and migration of human colon cancer HCT116 cells by regulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway / M. Yang et al. *J. Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 467–415.
393. Wang Z., Lv J., Li X., Lin Q. The flavonoid astragaln shows anti-tumor activity and inhibits PI3K/AKT signaling in gastric cancer. *Chemical Biology & Drug Design*. 2021. Vol. 98. P. 779–786.
394. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine / J. Hu et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019. Vol. 38. P. 225–241.
395. Isorhamnetin inhibited the proliferation and metastasis of androgen-independent prostate cancer cells by targeting the mitochondrion-dependent intrinsic apoptotic and PI3K/Akt/mTOR pathway / F. Cai et al. *Bioscience Reports*. 2020. Vol. 40. P. BSR20192826–BSR20192840.
396. Gold-Smith F., Fernandez A., Bishop K. Mangiferin and cancer: mechanisms of action. *Nutrients*. 2016. Vol. 8. P. 396–421.
397. Mangiferin is a new potential antimalarial and anticancer drug for targeting serine hydroxymethyltransferase / S. Maenpuen et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2023. Vol. 745. P. 109712–109725.
398. Guha S., Ghosal S., Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*. 1996. Vol. 42. P. 443–451.

399. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition / X. Zhang et al. *Oncology Reports*. 2016. Vol. 36. P. 271–278.
400. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line / P. N. Rajendra et al. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011. Vol. 349. P. 11–19.
401. Khan F. A., Maalik A., Murtaza G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016. Vol. 24. P. 695–702.
402. Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica* / A. U. Rahman et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003. Vol. 86. P. 177–180.
403. Iristectorigenin B isolated from *Belamcanda chinensis* is a liver X receptor modulator that increases ABCA1 and ABCG1 expression in macrophage RAW 264.7 cells / H. J. Jun et al. *Biotechnology Letters*. 2012. Vol. 34. P. 2213–2221.
404. Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: Effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation / H. Lim et al. *Archives of Pharmacal Research*. 2017. Vol. 40. P. 524–535.
405. *In vitro* evaluation of tectoridin, tectorigenin and tectorigenin sodium sulfonate on antioxidant properties / T. Han et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2012. Vol. 50. P. 409–414.
406. Tectoridin, a poor ligand of estrogen receptor alpha, exerts its estrogenic effects via an ERK-dependent pathway / K. Kang et al. *Molecules and Cells*. 2009. Vol. 27. P. 351–357.
407. Li H-R., Habasi M., Xie L-Z., Aisa H. A. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. *Molecules*. 2014. Vol. 19. P. 12940–12948.

408. Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF- $\kappa$ B signaling pathway / A. Zeng et al. *Oncology Reports*. 2021. Vol. 45. P. 717–727.
409. Saponins from saffron corms inhibit the gene expression and secretion of pro-inflammatory cytokines / M. Keller et al. *Journal of Natural Products*. 2021. Vol. 84. P. 630–645.
410. Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model *in vivo* / K. A. Lúcio et al. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P. e28596–e28606.
411. Yan S. L., Huang C. Y., Wu S. T., Yin M. C. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2010. Vol. 24. P. 842–848.
412. Ursolic acid inhibits breast cancer metastasis by suppressing glycolytic metabolism via activating SP1/caveolin-1 signaling / S. Wang et al. *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11. P. 745584–745600.
413. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 reprograms proline metabolism to drive breast cancer stemness under psychological stress. / B. Cu et al. *Cell Death and Disease*. 2023. Vol. 14, 682–698.
414. Phang J.M. Proline metabolism in cell regulation and cancer biology: recent advances and hypotheses. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2019. Vol. 30. P. 635–649.
415. Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma / J. De Ingeniis et al. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. e45190–e45199.
416. 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: А61К 36/88 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01), А61Р 39/06 (2006.01). № а 2019 10648 ; заявл. 28.10.2019 ; опубл. 04.08.2021, Бюл. № 31.

417. 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): А61К 36/00, А61Р 31/04 (2006.01), А61Р 39/06 (2006.01). № у 2020 05762 ; заявл. 07.09.2020 ; опубл. 03.03.2021, Бюл. № 9.
418. Characterization of phytochemical components of *Crocus sativus* leaves using HPLC-MS/MS and GC-MS: a new potential by-product / О. Mykhailenko, I. Bezruk, L. Ivanauskas, R. Lesyk, V. Georgiyants. *Scientia Pharmaceutica*. 2021. № 89 (2). P. 28–45.
419. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Crocus speciosus* leaves / О. Mykhailenko, V. Volochai, I. Bezruk, V. Mishchenko, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 2022. Vol. 91(1). P. 207–221.
420. Pharmacological potential and chemical composition of *Crocus sativus* leaf extracts / О. Mykhailenko, V. Petrikaite, M. Korinek, F.-R. Chang, M. El-Shazly, C.-H. Yen, I. Bezruk, B.-H. Chen, C.-F. Hsieh, D. Lytkin, L. Ivanauskas, V. Georgiyants, T.-L. Hwang. *Molecules*. 2022. Vol. 27. P. 10–27.
421. Application of Quality-by-Design approach to the pharmaceutical development of anticancer crude extracts of *Crocus sativus* perianth / О. Mykhailenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Petrikaitė, V. Georgiyants. *Scientia Pharmaceutica*. 2022. Vol. 90 (1). P. 19–42.
422. Михайленко О. О., Козира С. А., Георгіянц В. А. Порівняльне дослідження фенольних сполук різних видів та сортів Крокусів. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: мат. VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23 – 24 вересня 2020 р., Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського, МОЗ України, 2020. С. 40–42.

423. Anti-allergic activity of various natural product samples from Ukraine / O. Mykhailenko, M. Korinek, B.-H. Chen, M. El-Shazly, Y.-C. Wu, F.-R. Chang, C.-F. Hsieh, J.-T. Horng, T.-L. Hwang, V. Georgiyants. EFMC-ISMIC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session. Poster P208. Powered by the EFMC Young Scientists Network, 9 September, 2020, Belgium, 2020. P. 201.
424. Mykhailenko O., Georgiyants V. Quality control of *Crocus sativus* leaves. 5<sup>th</sup> International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (5-ISPMPF), 25 – 30 August, 2021, Nanchang University, Nanchang, China, 2021. P. 404.
425. Михайленко О. О., Осолодченко Т. П., Георгіянц В. А. Антибактеріальна активність екстрактів Крокусу посівного. Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи: мат. Наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячену 100-річчю Національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021, Харків, НФаУ, 2021. С. 222–223.
426. The used of Herb MaRS approach for selection of chemical markers for the quality control of *Crocus sativus* leaves / O. Mykhailenko, M. Korinek, M. El-Shazly, T.-L. Hwang, V. Georgiyants. 100 років успіху та якості: мат. міжнар. наук.-практ. симпозіуму, присвяченого 100-річчю кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, 18 жовтня 2021, м. Харків, НФаУ, 2021. С. 66.
427. Antiviral activities of *Juno* and *Crocus* corms extract / O. Mykhailenko, M. Korinek, B.-H. Chen, T.-L. Hwang, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. The Joint International Pharmacy Symposium “Contemporary Pharmacy: Issues Challenges and Expectations 2021“ and “11<sup>th</sup> Conference: Pharmacy Science and Practice“, 22 October 2021, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, 2021. P. 29.
428. Sophoraflavonoloxide and cosmosiin from *Crocus sativus* perianth / O. Mykhailenko, M. Korinek, T.-L. Hwang, C.-H. Yen, F.-R. Chang, B.-H. Chen, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. Poster NPC59. 36<sup>th</sup> Symposium on the

- Natural Products & Symposium on Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 15 – 16 October, 2021, Taipei Medical University. Taiwan, 2021. P. 62.
429. Bioactive compounds from saffron flowers / O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, M. Korinek, T.-L. Hwang, C.-H. Yen, F.-R. Chang, B.-H. Chen, V. Georgiyants. *Planta+*. наука, практика та освіта: мат. III Наук.-прак. конф. з міжнар. участю, присвяченої 180-річчю Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ, 18 лютого 2022 р. Київ, 2022. Т.1. С. 82–84.
430. 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, that will be held in Iasi, Romania, on September, 19 – 22, 2022. P. 158.
431. Pall Wei Y., Shu P., Hong J., Qin M. Qualitative and quantitative evaluation of phenolic compounds in *Iris dichotoma*. *Phytochemical Analysis*. 2012. Vol. 23. P. 197–207.
432. Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian *Iris* species: A fresh look on their content and biological activities / O. Mykhailenko et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 4588–4612.
433. Исаев Д. И., Керимов Ю. Б., Ковалев С. В., Затыльникова О. А. Изофлавоноиды корневищ *Iris imbricate* и *Iris pseudacorus*. *Фармаком*. 2010. № 1. С. 38–42.
434. Mykhailenko O., Kovalyov V., Kovalyov S., Krechun A. Isoflavonoids from the rhizomes of *Iris hungarica* and antibacterial activity of the dry rhizomes extract. *ARS Pharmaceutics*. 2017. Vol. 58. P. 39–45.
435. Mykhailenko O. O., Kovalyov V. M., Kovalyov S. V., Krechun A. V. Biologically active compounds from the rhizomes of *Iris hungarica*. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2016. Vol. 14. P. 63–66.
436. Rafiee S. A., Farhoosh R., Sharif A. Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative



- environments. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018. Vol. 120. P. 18–39.
437. Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MSn / P. Shu et al. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2010. Vol. 8. P. 202–207.
438. Metabolic profiling of rhizomes of native populations of the strictly endemic Croatian species *Iris adriatica* / F. Alperth et al. *Plant Biosystems*. 2019. Vol. 153. P. 317–324.
439. Characterisation and quantification of flavonoids in *Iris germanica* L. and *Iris pallida* Lam. resinoids from Morocco / B. Roger et al. *Phytochemical Analysis*. 2012. Vol. 23. P. 450–455.
440. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica* / R. Atta Ur et al. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo). 2002. Vol. 50. P. 1100–1102.
441. Єфіменко Т. С., Антонюк М. З. Молекулярні механізми стійкості рослин до низьких температур. *Наукові Записки* (Біологія та екологія). 2014. № 158. С. 1–11.
442. Кречун А. В. Вивчення біологічно активних речовин півників угорських та розробка субстанцій на їх основі : дис. ... д-ра філософії : 226 - Фармація (22 - Охорона здоров'я). Харків, 2020. 250 с.
443. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels / G. Zheng et al. *Plant, Cell & Environment*. 2011. Vol. 34. P. 1431–1442.
444. Gunstone F. D. Fatty acids and lipid chemistry, 1<sup>st</sup> Ed. London : Blackie Academic and Professional, 1996. 252 p.
445. Henderson N. C. *Iris* Linnaeus. In: Flora of North America Editorial Committee (eds) 1993+. Flora of North America North of Mexico' New York : Oxford, 2002. Vol. 26. P. 371–376.

446. Mykhailenko O. Composition of volatile oil of *Iris pallida* Lam. from Ukraine. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. № 15. P. 85–90.
447. Kovalev V. N., Mikhailenko O. A., Vinogradov B. A. Aromatic compounds and terpenoids of *Iris hungarica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2014. № 50 (1). P. 161–162.
448. 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*. *Фармація Казахстана*. 2015. № 3 (166). P. 38–41.
449. 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. Vol. 52 (3). P. 748–750.
450. Mykhailenko O., Kovalyov V., Orlova T. Chemical composition of the essential oil of several *Iris* species. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 44 (3). P. 178–185.
451. Krechun A. V., Mykhailenko O. O., Kovalev V. N. Analysis of essential oils from several hybrid *Iris* varieties. *Chemistry of Natural Compounds*. 2020. Vol. 56 (2). P. 361–363.
452. Kovalyov V., Chetvernia S., Krechun A., Mykhailenko O. Establishment of the main technological parameters of *Iris* raw material. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019. Vol. 12 (7). P. 3359–3364.
453. Antioxidant and adaptative response mediated by NRF2 during physical exercise / N. Vargas-Mendoza et al. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8. P. 196–223.
454. Rohwedder A., Zhang Q., Rudge S. A., Wakelam M. J. Lipid droplet formation in response to oleic acid in Huh-7 cells is mediated by the fatty acid receptor FFAR4. *Journal of Cell Science*. 2014. Vol. 127. P. 3104–3115.

455. Anti-atherosclerotic activity of triacsin C, an acyl-CoA synthetase inhibitor / D. Matsuda et al. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo). 2008. Vol. 61. P. 318–321.
456. Temperature effect on IgE binding to CD23 versus FC $\epsilon$ RI / B. H. Chen et al. *The Journal of Immunology*. 2003. Vol. 70. P. 1839–1845.
457. Macartney A. I., Maresca B., Cossins A. R., Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition. Temperature adaptation of biological membranes. London, 1999. P. 129–139.
458. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting RAF1 activity / S. C. Yang et al. *Biochemical Pharmacology*. 2018. Vol. 154. 384–396.
459. Markham K. R. Techniques of flavonoid identification. London : Academic Press, 1982. 322 p.
460. Buch S. M., Mir F. A., Rehman S., Qurishi M. A. Iriogenin an isoflavone: a brief study on structural and optical properties. *The European Physical Journal Applied Physics*. 2013. Vol. 62. P. 31201–31205.
461. Zhou J., Xie G., Yan X. Encyclopedia of Traditional Chinese medicines. Berlin ; New York, Springer, 2011. Vol. 3.
462. Kovalev V. N., Zatylnikova O. A., Kovalev S. V. A new isoflavone from *Iris pseudacorus*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013. Vol. 49 (1). P. 34–35.
463. Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* / A. L. Liu et al. *Planta Medica*. 2008. Vol. 74. P. 847–51.
464. Alhazmi M. I. Molecular docking of selected phytochemicals with H1N1 Proteins. *Bioinformation*. 2015. Vol. 11. P. 196–202.
465. Sadati S., Gheibi N., Ranjbar S., Hashemzadeh M. Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomedical Reports*. 2018. Vol. 10. P. 33–38.

466. Design, synthesis & structure-activity relationships of a new class of antihuman enterovirus D68 & A71 agents / B. Sethy et al. *Future Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 10. P. 1333–1347.
467. Chiang L. C., Chiang W., Liu M. C., Lin C. C. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. Vol. 52. P. 194–198.
468. Anti-influenza A virus activity of flavonoids *in vitro*: a structure-activity relationship / R. Morimoto et al. *Journal of Natural Medicines*. 2023. Vol. 77. P. 219–227.
469. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis / M. Amoros et al. *Journal of Natural Products*. 1992. Vol. 55. P. 1732–1740.
470. Zheng M. S., Lu Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chinese Medical Journal (Engl)*. 1990. Vol. 103. P. 160–165.
471. Saha S., Sadhukhan P., Sil P. C. Mangiferin: A xanthone with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors*. 2016. Vol. 42. P. 459–474.
472. Zhu X. M., Song J. X., Huang Z. Z., Wu Y. M. Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1993. Vol. 14. P. 452–454.
473. Mangiferin: a promising natural xanthone from *Mangifera indica* for the control of acyclovir resistant herpes simplex virus 1 infection / D. Z. Rechenchoski et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 28, № 4. P. 115304–115310.
474. Irisolidone, an isoflavone metabolite, represses JC virus gene expression via inhibition of Sp1 binding in human glial cells / S. Y. Kim et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. Vol. 344. P. 3–8.

475. Antiviral activity of iridoid glycosides extracted from fructus *Gardeniae* against influenza A virus by PACT-dependent suppression of viral RNA replication / S. Guo et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. P. 1897–1909.
476. Inhibitory effects of irigenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E2 production in murine macrophage RAW 264.7 cells / K. S. Ahn et al. *Life Sciences*. 2006. Vol. 78. P. 2336–2342.
477. Neuroprotective effect of tectoridin extracted from flowers of *Pueraria lobate* in a stroke model via the PI3K/AKT/mTOR, TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1channel. / Yao Lu et al. *Authorea*. 2023. P. 1–5.
478. Choi H. J. Chemical constituents of essential oils possessing anti-influenza A/WS/33 virus activity. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2018. Vol. 9. P. 348–353.
479. Phenolic compounds from *Iris hungarica* as potential anti-inflammatory agent / O. Mykhailenko, M. Korinek, B. H. Chen, T. L. Hwang, V. Georgiyants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021, № 165, P. 44–45. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting of SFRR International. 15 – 18<sup>th</sup> March 2021, Spain, 2021. Poster NC067 Spain.
480. Anti-viral and anti-inflammatory isoflavonoids from Ukrainian *Iris aphylla* rhizomes: structure-activity relationship coupled with ChemGPS-NP analysis / O. Mykhailenko, C.-F. Hsieh, M. El-Shazly, A. Nikishin, V. Kovalyov, P. Shynkarenko, L. Ivanauskas, B.-H. Chen, F.-R. Chang, J.-T. Horng, T.-L. Hwang, V. Georgiyants, M. Korinek. *Planta Medica*. 2023. Vol. 89 (11). P. 1063–1073.
481. Antiviral effects of herbs from Ukraine against influenza and enterovirus / M. Korinek, O. Mykhailenko, C.-F. Hsieh, V. Georgiyants, M. El-Shazly, H. Handoussa, J.-T. Horng, T.-L. Hwang. The 34<sup>th</sup> symposium of Natural products, 17-19<sup>th</sup> October 2019, Chang Gung University of Science and Technology, Taoyuan, Taiwan, 2019. P. 97.

482. Quantitative determination of mangiferin in rhizomes of *Iris hungarica* and *Iris sibirica* by HPLC / V. N. Kovalyov, O. A. Mykhailenko, D. I. Isaev, G. M. Gurbanov. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*. 2016. № 1. P. 13–17.
483. Mykhailenko O. O., Kovalyov V. M. Phenolic compounds of the genus *Iris* plants (Iridaceae). *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2016. № 65 (2). P. 70–77.
484. Gas chromatography-mass spectrometry studies of the component composition of carboxylic acids of the rhizomes of *Iris medwedewii* and *Iris carthaliniae* (Iridaceae) / J. I. Isaev, O. O. Mykhailenko, V. N. Kovalyov, G. M. Gurbanov, M.Y. Suleymanov. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2017. № 66. P. 9–14.
485. Mikhailenko O. A., Krechun A. V., Kovalev V. N. Carboxylic acids from *Iris graminea* and *I. halophila*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2018. Vol. 54 (5). P. 956–958.
486. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in *Iris* species from Latvia, Lithuania and Ukraine / O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov, V. Desenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Georgiyants. *Phytochemical Analysis*. 2020. Vol. 31 (1). P. 1–19.
487. Phenolic compounds of the rhizomes of *Iris variegata* / O. Mykhailenko, A. Myhal, S. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. The 8<sup>th</sup> International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice dedicated to the 80<sup>th</sup> anniversary of the Museum of History of Lithuanian Medicine and Pharmacy, 15 December 2017, Kaunas, Lithuania, 2017. P. 74–77.
488. Comparative study on the composition of phenolic compounds in *Iris* species from Ukraine, Lithuania and Latvia / O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. Sciences and Practice: abstract of 9<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference dedicated to the 100<sup>th</sup> years

- anniversary of independent Lithuanian's Pharmacy, 9 November 2018, Kaunas, Lithuania, 2018. P. 27.
489. The comparative analysis of carboxylic acid composition in four *Iris* species from Ukraine / O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, S. Romanova, T. Orlova, S. Kozura, S. Harna, V. Volochai. *Chemistry and Biodiversity*. 2021. № 18. P. e2000969–e2000978.
490. 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). P. 574–578.
491. Mykhailenko O. A., Kovalev V. N. Chemical composition of essential oil from leaves of *Iris versicolor*. X<sup>th</sup> International symposium on the chemistry of natural compounds, 21–23 November 2013, Tashkent-Bukhara, Republic of Uzbekistan, 2013. P. 280.
492. Mykhailenko O. O. Analysis of essential oil of leaves of *Iris germanica* L. Science and Practice 2015: abstracts of the 6<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, 5–6<sup>th</sup> November 2015, Kaunas, Lithuania, 2015. P. 30–31.
493. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 3. World Health Organization. Spain, 2007. P. 126–135.
494. Homoeopathic Pharmacopoeia: *Crocus*. Safran / German Homoeopathic Pharmacopoeia, 1. Stuttgart, 2003. P. 547.
495. Pharmacopoeia. The United States Pharmacopoeia. The National Formulary USP 33–NF 28. Rockville, 2009. P. 47.
496. Грунти, 1991: [МВВ 31-497058-016-2003. Грунти. Визначення вмісту міцно фіксованих форм важких металів (Co, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn, Mn, Fe) у ґрунті у хлороводневому (1Н) екстракті на атомно-абсорбційному спектрофотометрі. *Методи аналізу ґрунтів і рослин*. Харків, 2003. С. 175–192.
497. 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.
498. Model implementation of the legal regulation on medicinal plant cultivation for pharmaceutical purposes. Case study of *Crocus sativus* cultivation in Ukraine / O. Mykhailenko, N. B. Saidov, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Botanica*. 2022. Vol. 28 (1). P. 27–38.
499. Михайленко О. О., Ковальов В. М., Георгіянец В. А., Демченко О. М., Шакало В.В. Спосіб культивування, збирання та зберігання шафрану: пат. 135685 на кор. мод. України МПК (2019.01): А01В 79/00, А01С 14/00, А01D 91/00, А01F 25/00. № u 201901401 ; заявл. 11.02.2019 ; опубл. 10.07.2019, Бюл. № 13.
500. 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.
501. Changes in bioactive compounds content of *Crocus sativus* stigma during pre-sowing corms treatment / V. Mildaziene, O. Mykhailenko, A. Malakauskiene, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Synthesis and Analysis of Drugs*, 7 – 9<sup>th</sup> September, 2022, Brno, Czech Republic, Faculty of Pharmacy, Masaryk University. P23. P.60.
502. Ricketts H. E. The use of *Iris* in medicine and perfumery. *Les Iris Cultivés* 1923 p. 175–183.
503. Ioana C., Cantor M. New perspectives on medicinal properties and uses of *Iris* sp. *Hop and Medicinal Plants*. 2016. № 1–2. P. 24–37.
504. Cui J., Tcherkez G. Potassium dependency of enzymes in plant primary metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021. Vol. 166. P. 522–530.
505. Potassium in plants: growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance / R. Johnson et al. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2022. Vol. 172. P. 56–69.



506. Connorton J. M., Balk J., Rodríguez-Celma J. Iron homeostasis in plants - a brief overview. *Metallomics*. 2017. Vol. 9. P. 813–823.
507. Do leaves of plants on phosphorus-impooverished soils contain high concentrations of phenolic defence compounds / D. M. Wright et al. *Functional Ecology*. 2010. Vol. 24. P. 52–61.
508. Ronen E. Micro-elements in agriculture, practical hydroponics and green-houses. *International journal of agriculture and crop science*. 2007. Vol. 3. P. 39–48.
509. Fujita M., Inoue T. Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: hydroxylation of the shikimate-derived ring. *Phytochemistry*. 1981. Vol. 20. P. 2183–2185.
510. Vithana M. D. K., Singh Z., Johnson S. K. Levels of terpenoids, mangiferin and phenolic acids in the pulp and peel of ripe mango fruit influenced by pre-harvest spray application of  $\text{FeSO}_4$  ( $\text{Fe}^{2+}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ) and  $\text{MnSO}_4$  ( $\text{Mn}^{2+}$ ). *Food Chemistry*. 2018. Vol. 256. P. 71–76.
511. Li Y., Kim J. I., Pysh L. Clint Chapple. Four isoforms of Arabidopsis 4-coumarate: CoA ligase have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism1 [open]. *Plant Physioliology*. 2015. Vol. 169. P. 2409–2421.
512. McGarvey D. J., Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*. 1995. Vol. 7. P. 1015.
513. Затильнікова О. О. Елементний склад *Iris sibirica* L. Український медичний альманах. 2013. № 16(2). С. 30–31.
514. Михайленко О.О., Георгіянц В.А. Імплементация принципів GACP та QbD у процес вирощування шафрану в Україні для харчової промисловості та фармацевтики : мат. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Хімія природних сполук», Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 27-28 жовтня, 2022 року, Тернопіль. С. 157–159.

515. Mykhailenko O. Cultivated medicinal plants in Ukraine: achievements and prospects. “Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity”, 21<sup>st</sup> of April 2023, dedicated to the 1<sup>st</sup> anniversary of the Pharmacognosy Club of LSMU. 24 p.
516. Mykhailenko O. Saffron: the “golden flower» of Ukraine. 71<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Trinity College, Dublin, 2-5 July. P. 109.
517. Михайленко О. О., Ковальов В. М., Георгіянец 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.
518. Влияние удобрений на биоаккумуляционных свойства корневищ *Iris pumila* «Violet carpets» и их химический состав / О. А. Михайленко, В. Г. Десенко, Т. Е. Дмитренко, В. А. Георгиянц. *Наука и инновация*. 2020. № 4. С. 92.
519. Bioactive Constituents of *Iris hybrida* (Iridaceae): processing effect / O. Mykhailenko, S. Chetvernyia, I. Bezruk, Y. Buydin, N. Dhurenk, O. Palamarchuk, L. Ivanauskas, V. Georgiyants. *Biomedical Chromatography*. 2022. Vol. 36 (7). P. 5369 – 5381.
520. Innovative GACP approaches for obtaining the quality *Iris hybrida* leaves for the pharmaceutical industry / O. Mykhailenko, Y. Buydin, L. Ivanauskas, A. Krechun, V. Georgiyants. *Chemistry and Biodiversity*. 2022. Vol. 19. P. e202200149–e202200160.