МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Концепція Quality-by-design (QbD) у сучасній розробці фітопрепаратів: Вплив екологічних факторів на хімічний склад рослин роду Iris та їх фармакологічну активність

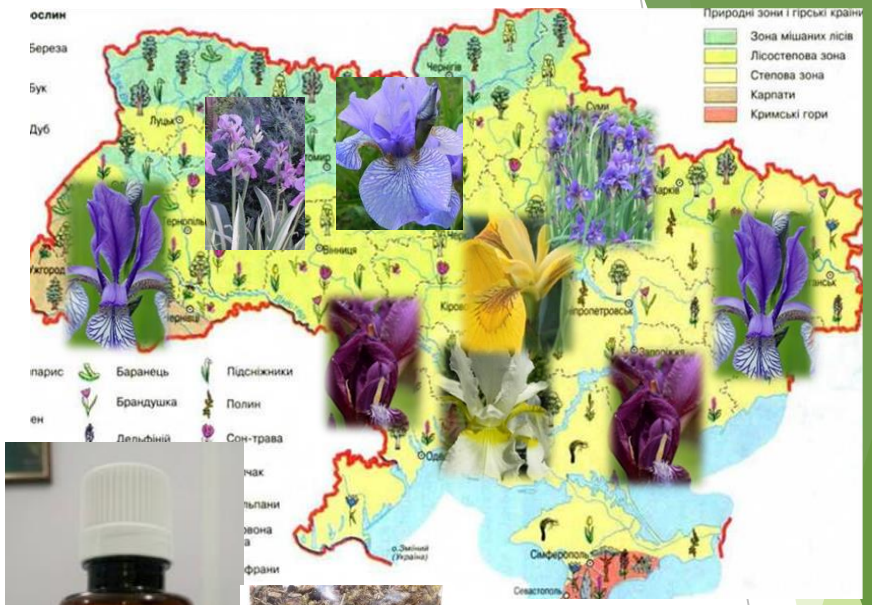
Михайленко Ольга Олександрівна,
кандидат фармацевтичних наук,
доцент кафедри фармацевтичної хімії

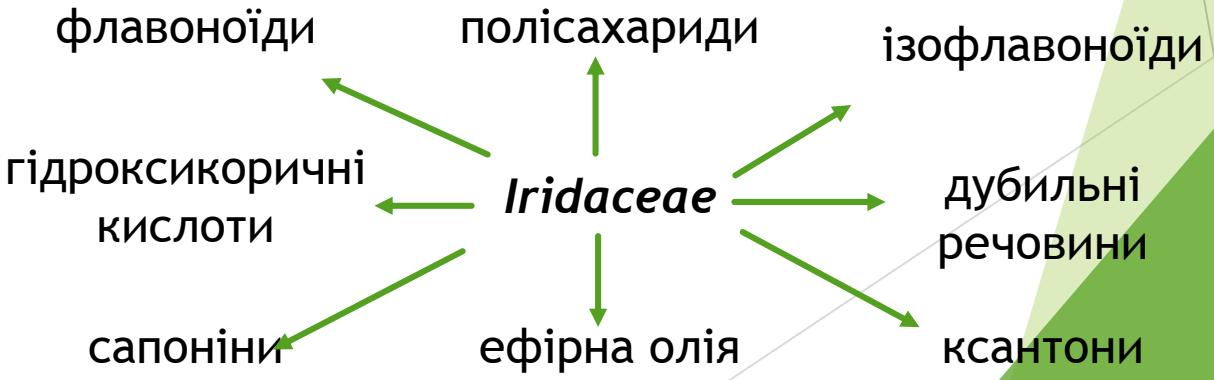
Харків – 2021

Актуальність роботи

- Низька токсичність фітопрепаратів
- Можливість тривалого застосування
- Економічність
- Застосування у лімітованих групах споживачів

✓ Збір М.М. Здренка (Україна; РФ);
✓ Мастодинон (Bionorica, Німеччина);
✓ Панкріофіл (Фітолінія СмартМед, Україна);
✓ Оригінальний великий бальзам Біттнера (Ріхард Біттнер, Австрія);
✓ Лактір (ВИЛАР, РФ).





Мета та завдання дослідження

Мета роботи – комплексне фармакогностичне дослідження півників угорських та сортів: *I. hybrida* 'Little Dream‘, *I. hybrida* 'Mini Dynamo‘, *I. hybrida* 'Bright white‘, *I. hybrida* 'Galleon Gold‘, *I. hybrida* 'Indian Pow Wow', створення нових лікарських рослинних субстанцій на їх основі. Дослідження впливу факторів навколишнього середовища на біосинтез БАР у сировині півників.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати та узагальнити дані літературних джерел щодо сучасного стану дослідження рослин родини Ірисові: ботанічної характеристики, географічного поширення, сировинних запасів, заготівлі, культивування, вивчення хімічного складу, фармакологічних властивостей та застосування в медицині
2. Провести фітохімічне дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР обраних об’єктів дослідження – листя та кореневищ півників угорських та сортів: *I. hybrida* 'Little Dream‘, *I. hybrida* 'Mini Dynamo‘, *I. hybrida* 'Bright white‘, *I. hybrida* 'Galleon Gold‘, *I. hybrida* 'Indian Pow Wow' та додатково 16 видів півників флори України, Литви та Латвії.
3. Виділити в індивідуальному стані природні сполуки з кореневищ півників угорських, півників болотяних та встановити їх структуру. Розробити спосіб виділення ксантону мангіферину з сировини півників
4. Встановити вплив факторів навколишнього середовища на накопичення БАР у сировині півників.
5. Визначити вплив монокомпонентного живлення на біосинтез фенольних сполук у сировині півників.
6. Розробити технології одержання сухих екстрактів з сировини півників угорських та встановити їх фармакологічну активність
7. Розробити проекти методик контролю якості (МКЯ) на сировину та на одержані екстракти з листя та кореневищ півників угорських

Об’єкти дослідження

Місце заготівлі
6
м. Біла Церква, дендрологічний парк «Олександрія»
м. Умань, національний дендрологічний парк «Софіївка»
м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка
м. Харків, ботанічний сад им. В.Н. Каразіна
м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка
м. Донецьк, Донецький ботанічний сад
м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка
м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка
м. Київ, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка

Iris hungarica Waldst et Kit. (n =8)
Iris germanica (n=3)
Iris variegata L.
Iris graminea L.
Iris halophila Pall.
Iris sibirica L. (n=3)
Iris pseudacorus f. alba
Iris sibirica «Snowcrest»
Iris sibirica «Gatinea»
Iris sibirica «Violet harmony»
Iris sibirica «Cambridge»
Iris pseudacorus L. (n=15)
Iris Medwedewii Fomin
Iris Carthaliniae Fomin
Iris imbricata Lindl.
Iris pallida Lam.

Iris hybrida hort. 'Bright white'
Iris hybrida hort. 'Indian Pow Waw'
Iris hybrida hort. 'Galleon Gold'
Iris hybrida hort. 'Mini Dynamo'
Iris hybrida hort. 'Little Dream'
Iris hybrida hort. ‘Welders flame’
Iris hybrida hort. ‘New Snow’
Iris hybrida hort. ‘Lime Smoothy’
Iris hybrida hort. ‘Stockholm’

30 species and variety

54 objects

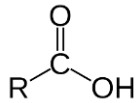
+ зразки з Литви та Латвії

+ 14 екстрактів

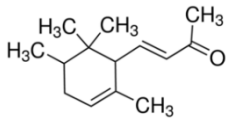
Попереднє фітохімічне дослідження видових сортових півників

За результатами:
- **Якісні реакції;**
- **ПХ та ТШХ;**
- **ВЕТШХ та ВЕРХ;**
- **СФ-аналіз**

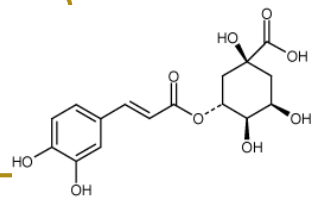
Carboxylic acids
23 *Irises* samples



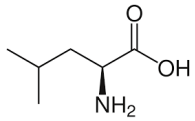
Terpenoids
42 *Irises* samples



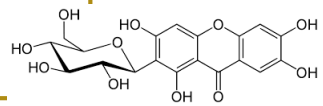
Hydroxycinnamic acids
15 *Irises* species



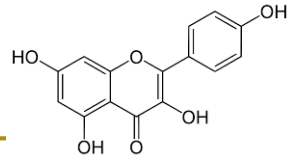
Aminoacids
5 *Irises* species



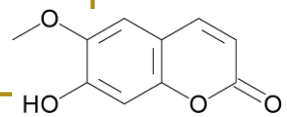
Xanthones
23 *Irises* samples



Flavonoids
23 *Irises* samples

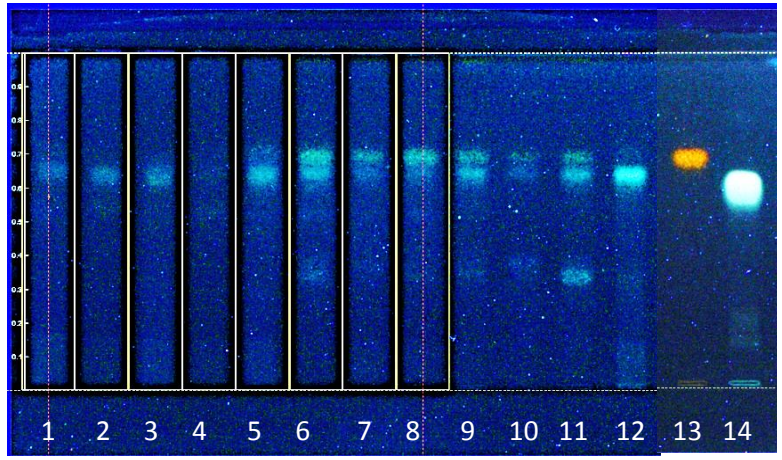


Coumarins
2 *Irises* samples



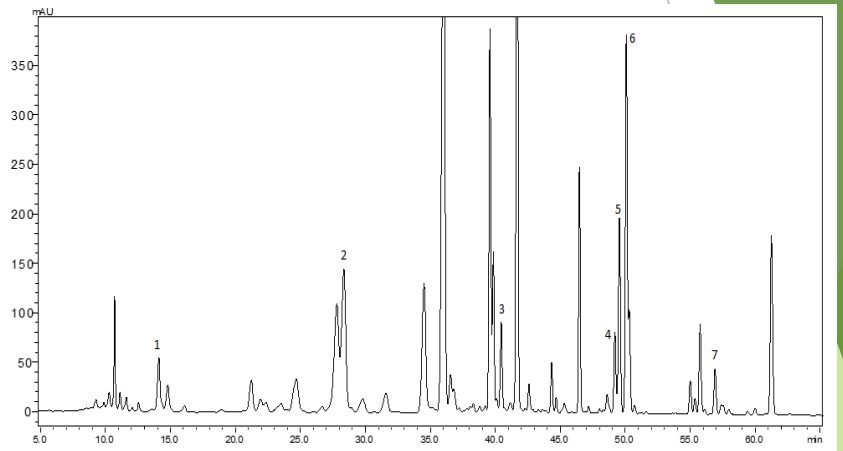
Iris hungarica

Хроматографічне дослідження біологічно активних сполук у сировині півників



ВЕТШХ хроматограма метанольних екстратків півників та СЗ. Рухома фаза: етилацетат – оцтова кислота – мурашина кислота – вода (100:5:5:15)

1 – I. hybrida 'Little Dream' листя
2 – I. hybrida 'Mini Dynamo' листя
3 – I.hybrida 'Galleon Gold' листя
4 – I. hybrida 'Indian Pow Waw' листя
5 – I. hybrida 'Bright white' листя
6 – I. hybrida 'Little Dream' кореневища
7 – I. hybrida 'Mini Dynamo' кореневища
8 – I. hybrida 'Bright white' кореневища
9 – I.hybrida 'Galleon Gold' кореневища
10 – I. hybrida 'Indian Pow Waw' кореневища
11 – I.hungarica кореневища
12 – I.hungarica листя
13 – гіперозод (Fluka)
14 – хлорогенова кислота(Sigma)



Типова ВЕРХ-хроматограма метанольного екстракту кореневищ півників угорських: мангіферин (1), текторідин (2), нігріцин-4′-О-*β*-D-глюкопіранозид (3), іристекторигенін В (4), нігріцин (5), іригенін (6), 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавон (7).

Хроматографічними методами аналізу у сировині півників угорських та сортових півників ідентифіковані різні групи БАР: флавоноїди, ізофлавоноїди, ксантони, гідроксикоричні кислоти, органічні кислоти, вільні амінокислоти

Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

1. Спектрофотометричний метод – фенольні сполуки

Досліджуваний зразок	сировина	Вміст БАР, %				
		гідроксикоричні кислоти	ізофлавоноїди	флавоноїди	ксантони	дубильні речовини
Iris hungarica	листя	4,2±0,28	1,16±0,09	2.10±0.07	1,64±0,03	6,17±0,13
	кореневище	2,2±0,14	2,15±0,16	2.22±0.19	0,86±0,07	5,43±0,09
Iris hybrida `Little Dream`	листя	2,83±0,10	1,33±0,13	2,52±0,11	1,96±0,12	5,88±0,14
	кореневище	2,49±0,12	1,07±0,14	2,89±0,13	0,35±0,09	5,03±0,07
Iris hybrida `Bright White`	листя	2,44±0,09	1,66±0,04	2,90±0,12	2,47±0,10	2,65±0,11
	кореневище	1,25±0,08	1,32±0,12	1,04±0,11	0,26±0,11	5,71±0,15
Iris hybrida `Mini Dynamo`	листя	2,55±0,15	1,73±0,08	2,40±0,09	0,69±0,08	2,95±0,13
	кореневище	1,77±0,10	2,50±0,06	2,35±0,11	0,15±0,13	2,28±0,09
Iris hybrida `Galleon Gold`	листя	2,82±0,12	1,58±0,13	3,55±0,09	0,72±0,07	2,45±0,08
	кореневище	0,79±0,07	3,15±0,09	2,62±0,16	0,61±0,11	4,01±0,12
Iris hybrida `Indian Pow Wow`	листя	1,14±0,13	1,17±0,08	3,01±0,11	0,33±0,13	4,30±0,09
	кореневище	0,97±0,10	1,13±0,11	1,89±0,08	1,48±0,09	5,32±0,11

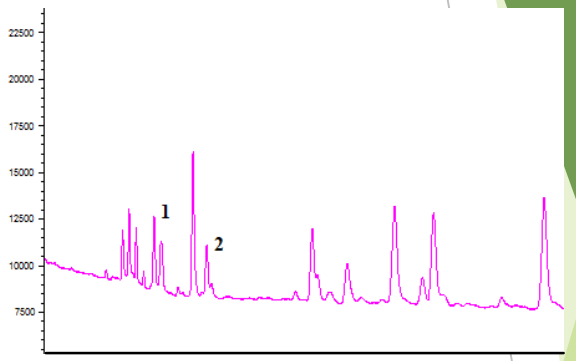
Примітка. Перерахунок суми гідроксикоричних кислот на хлорогенову кислоту, суми ізофлавоноїдів – на ононін, суми флавоноїдів – на рутин, суми ксантонів – на мангіферин, суми дубильних речовин – на галову кислоту.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2019. Т. 12. № 2 (30). С. 135–140

Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

2. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) – фенольні сполуки

Сполука	RT, хв	Вміст, мг/г	
		листя	кореневища
Хлорогенова кислота	9,08	16,4 ± 0,05	-
Мангіферин	14,02	6,62 ± 0,12	2,4 ± 0,023
Текторидин	29,48	-	3,9 ± 0,071
нігріцин-4'-O-β-D-глюкопіранозид	39,27	-	6,3 ± 0,030
Іристекторигенін B	49,04	-	7,5 ± 0,003
Нігріцин	49,41	-	2,3 ± 0,003
Іригенін	49,91	-	4,9 ± 0,038
5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавон	56,0	-	1,0 ± 0,002



Типова ВЕРХ – хроматограма метанольного екстракту листя півників угорських

3. Метод газової хроматографії-мас спектрометрії – вільні амінокислоти

Кореневища півників угорських

№	Rt,хв	амінокислота	Вміст від загальної кількості а/к, %
1	14,98	L-аланін	22,82±0,12
2	16,51	L-валін	7,63±0,06
3	17,00	L-лейцин	4,55±0,09
4	17,34	ізолейцин	6,28±0,10
5	19,84	L-піроглутамова кислота (у перерахунку на L-глутамову кислоту)	51,75±0,19
6	21,86	L-аспарагінова кислота	6,97±0,12

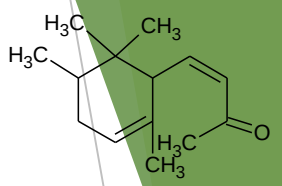
Вміст суми амінокислот у кореневищі півників угорських – **6,25%.** Вперше у кореневищі півників угорських встановили вміст вільних амінокислот

Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

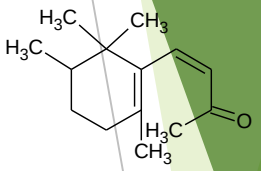
4. Метод хромато-мас-спектрометрії – ефірна олія

Загальний вміст основних компонентних груп ефірної олії півників

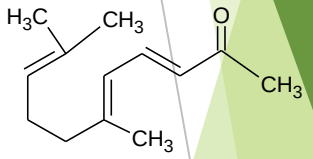
Досліджуваний зразок	сировина	Компоненти ефірної олії, %					
		терпени	альдегіди	кетони	алкани	ароматичні сполуки	карбонові кислоти
Iris hungarica	листя	1,72	0,48	1,71	5,62	0,71	89,76
	кореневище	0,37	0,01	1,46	4,24	0,14	93,74
Iris hybrida `Little Dream`	листя	24,52	1,35	4,74	15,75	0,10	53,54
	кореневище	16,70	2,32	7,02	23,19	3,14	66,66
Iris hybrida `Bright White`	листя	23,71	2,30	8,73	8,65	0,83	55,78
	кореневище	2,73	0,20	2,79	5,09	0,35	88,84
Iris hybrida `Mini Dynamo`	листя	27,38	2,90	7,04	8,37	0,94	53,37
	кореневище	7,15	2,32	6,81	6,49	0,42	76,81
Iris hybrida `Galleon Gold`	листя	19,50	5,52	21,93	4,91	4,75	43,39
	кореневище	4,57	1,01	6,50	3,97	0,56	83,39
Iris hybrida `Indian Pow Wow`	листя	30,22	0,83	5,68	15,47	5,08	42,72
	кореневище	9,10	0,73	5,78	7,00	0,39	77,01



α – ірон



β – ірон



псевдоіонон

Вперше встановлено компонентний склад ефірної олії півників угорських та сортових півників: ідентифіковано від 42 до 48 компонентів.

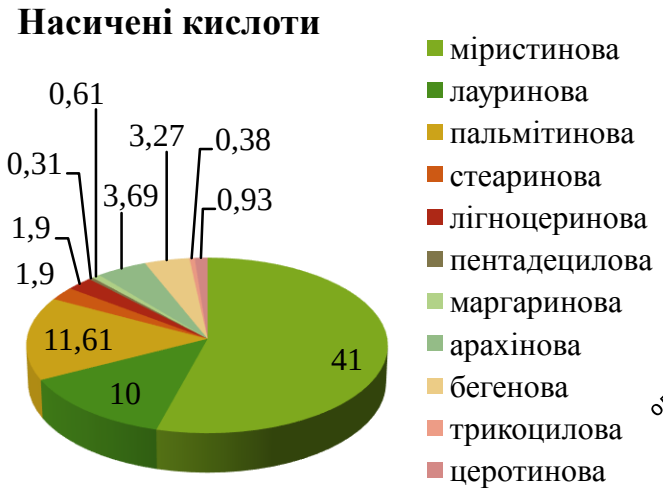
I. hybrida `Little Dream

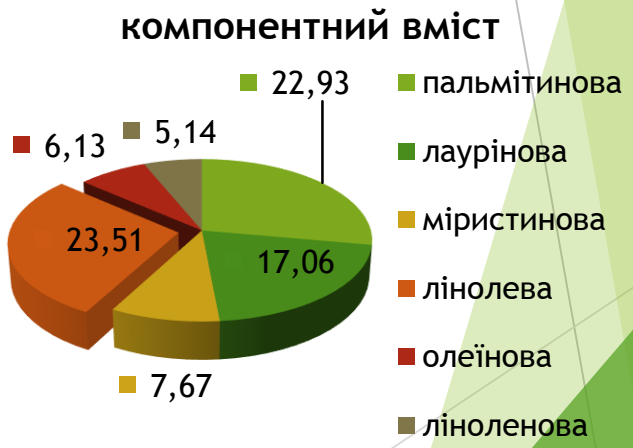
Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

5. Метод хромато-мас-спектрометрії – вищі карбонові кислоти

У **кореневищі** ідентифіковано **19** жирних кислот. Загальний вміст – 0,5%. Насичених жирних кислот міститься 75,5%, ненасичених – 24,5% від загальної кількості кислот.

У **листі** півників угорських ідентифіковано **15** жирних кислот. Насичені жирні кислоти містяться у кількості 63,03%, ненасичені – 36,97% від загальної кількості кислот.





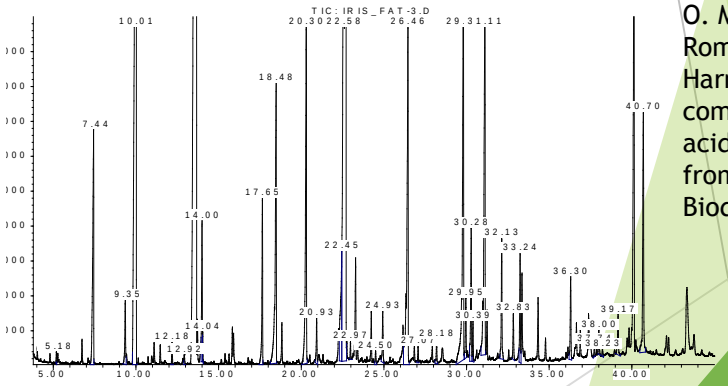
Вперше встановлено компонентний склад ефірної олії сировини півників угорських та сортових півників, встановлено жирнокислотний вміст сировини півників угорських.

Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

6. Метод хромато-мас-спектрометрії – нижчі карбонові кислоти

№	Rt, хв	назва кислоти	вміст, мг/кг	
			листя	кореневища
1	2	3	4	5
1	5,18	капронова кислота	16,5	14,0
2	9,35	каприлова кислота	132,8	131,5
3	10,01	щавлева кислота	3435,2	1651,9
4	12,18	малонова кислота	39,5	29,3
5	12,92	фумарова кислота	19,6	12,6
6	13,99	капринова кислота	247,9	-
7	14,03	бурштинова кислота	37,1	265,5
8	17,64	метоксибурштинова кислота	329,7	154,8
9	20,93	3-окси-2-метилглутарова кислота	95,3	55,9
10	22,57	яблунева кислота	4558,0	290,9
11	22,97	суберова кислота	26,6	35,0
12	24,92	азелаїнова кислота	109,2	100,7
13	29,8	лимонна кислота	1337,5	552,7
14	32,83	ванілінова кислота	90,2	61,5
15	38	4-оксибензойна кислота	54,1	38,2
16	38,22	бузкова кислота	16,3	-
17	40,69	ферулова кислота	638,5	300,7

Загальна кількість нижчих кислот листя півників угорських містять 25,42 % насичених двоосновних кислот, 36,66 % - гідроксикислот, 4,96 % - фенолокислот. Кореневища півників угорських –двоосновні насичені кислоти - 25,35%, фенолокислоти - 4,4%, гідроксикислоти - 9,28%.



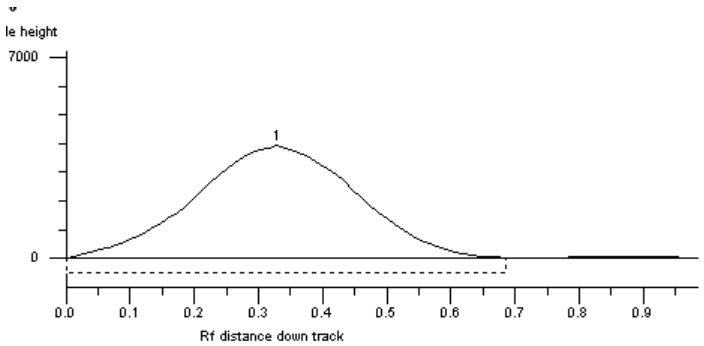
O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, S. Romanova, T. Orlova, S. Kozura, S. Harna, V. Volochai. The comparative analysis of carboxylic acid composition in four Iris species from Ukraine. Chemistry & Biodiversity, 2021, 18, e2000969

Типова ГХ-МС хроматограма екстракту листя півників угорських

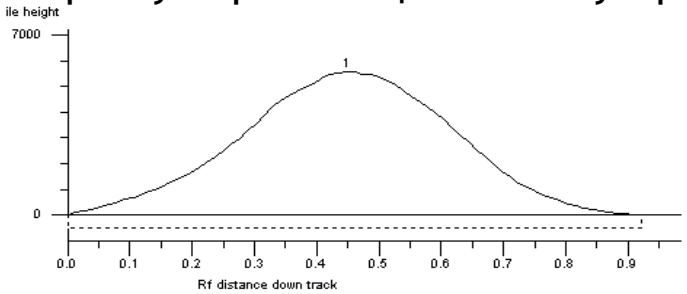
У листі ідентифіковано 17 кислот, у кореневищах – 15 кислот.

Кількісне визначення вмісту БАР у сировині півників

7. Метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) - ксантони

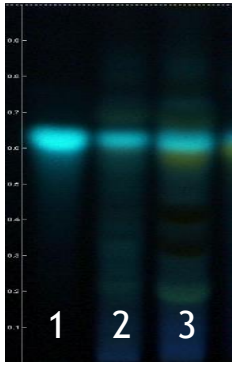


ВЕТШХ-хроматограма метанольного екстракту кореневищ півників угорських (3)



ВЕТШХ-хроматограма метанольного екстракту листя півників угорських (2)

Умови хроматографування:
ВЕТШХ-пластинки 10х10 Merk F_{254},
рухома фаза: етилацетат – оцтова кислота – мурашина кислота – вода (100:5:5:15)
Обробка: розчин дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру у метанолі (10 г/л), стандарт – мангіферин (Fluka); λ = 365 нм.



1-мангіферин (Fluka)
2-екстракт кореневищ *I. hungarica*
3-екстракт листя *I. hungarica*

ВЕТШХ-хроматограма екстрактів листя та кореневищ *I. hungarica*

I. hybrida 'Bright white'

Вперше методом ВЕТШХ встановили вміст ксантонового глікозиду мангіферину у листі та кореневищі півників угорських, що склав **2,47**% у кореневищі, у листі – **4,85**%.

8. Метод атомно-емісійної спектроскопії – макро- та мікроелементи

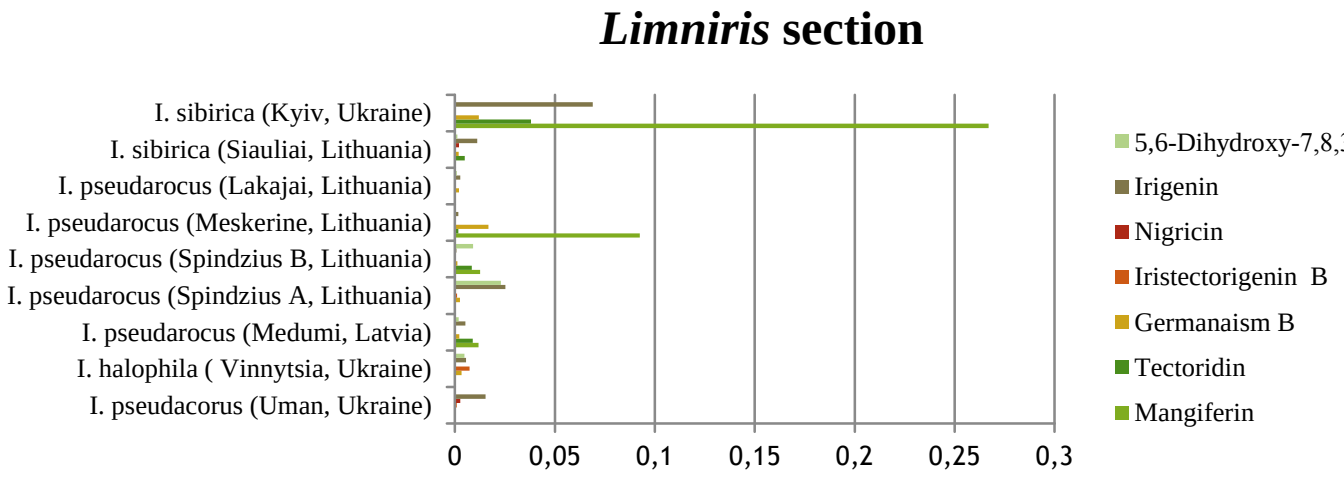
Зразок	Об'єкт дослідження	Вміст елемента, мг/100г.															Вміст золи, %
		Fe	Si	P	Al	Mn	Mg	Pb	Ni	Mo	Ca	Cu	Zn	Na	K	Sr	
Iris hungarica	листя	20	815	100	35	0,6	715	<0,03	<0,03	<0,03	1900	0,6	6,0	24	1190	24	11,93
	кореневище	58	585	80	23	1,9	140	<0,03	<0,03	<0,03	750	0,7	3,8	23	430	4,7	7,32
Iris x hybrid hort. «Galleon Gold»	листя	15,8	84	126	23,1	6,3	365	<0,03	<0,03	0,031	1050	0,31	9,4	52	2100	12,6	10,56
	кореневище	15,2	115	115	38	5,7	215	<0,03	0,076	0,038	685	0,30	15,2	61	1900	13,7	7,6
Iris x hybrid hort. «Little Dream»	листя	20,0	120	160	265	2,0	400	<0,03	<0,03	0,04	1330	0,66	10,6	67	3990	20,0	13,3
	кореневище	21,5	215	145	86	2,1	260	<0,03	0,086	0,043	1030	0,34	21,5	60	2150	17,2	8,61
Iris x hybrid hort. «Bright white»	листя	18,1	100	170	20	12,6	305	<0,03	0,05	0,05	810	0,75	10,0	50	3030	15,1	9,63
	кореневище	28,8	240	125	38	3,4	290	<0,03	0,096	0,096	960	0,48	24,0	67	2880	17,3	9,6
Iris x hybrid hort. «Mini Dynamo»	листя	12,0	86	205	25,8	2,6	515	<0,03	<0,03	0,086	1720	0,70	13,8	52	4300	25,8	17,2
	кореневище	86	430	170	105	3,4	260	0,086	0,043	0,043	1030	0,51	15,5	69	2150	17,2	8,6
Iris x hybrid hort. «Indian Pow Waw»	листя	17	115	170	34	4,0	340	<0,03	<0,03	0,056	1020	0,50	10,2	34	3390	13,5	11,41
	кореневище	87	520	150	87	5,2	260	<0,03	0,043	<0,03	1045	0,43	17,4	43,5	1740	19,1	8,67

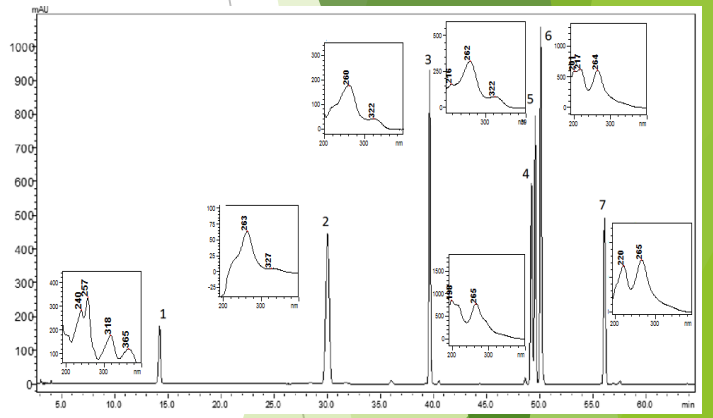
Вміст важких металів в сировині півників угорських та сортових півників знаходиться в межах норми (ДФУ 2.2.14)

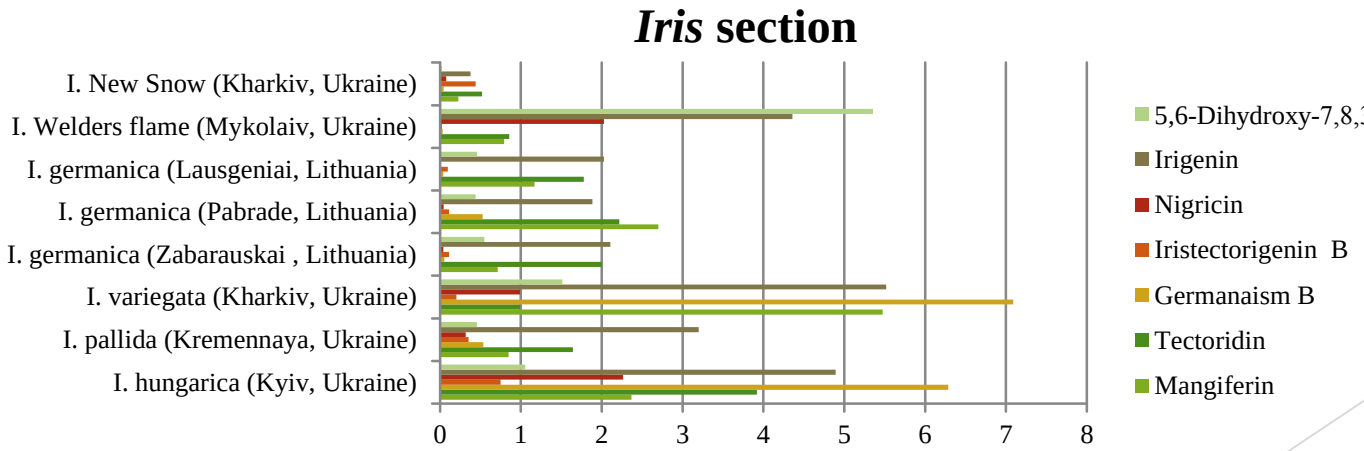
Вісник фармації. 2018. №. 4 (96). С. 9–15

Розподіл фенольних сполук у кореневищах півників

O. Mykhailenko, Z. Gudžinskas, V. Kovalyov, V. Desenko, L. Ivanauskas, I. Bezruk, V. Georgiyants. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic compounds in Iris species from Latvia, Lithuania and Ukraine. Phytochemical Analysis. 2020; 31(1): 1–19

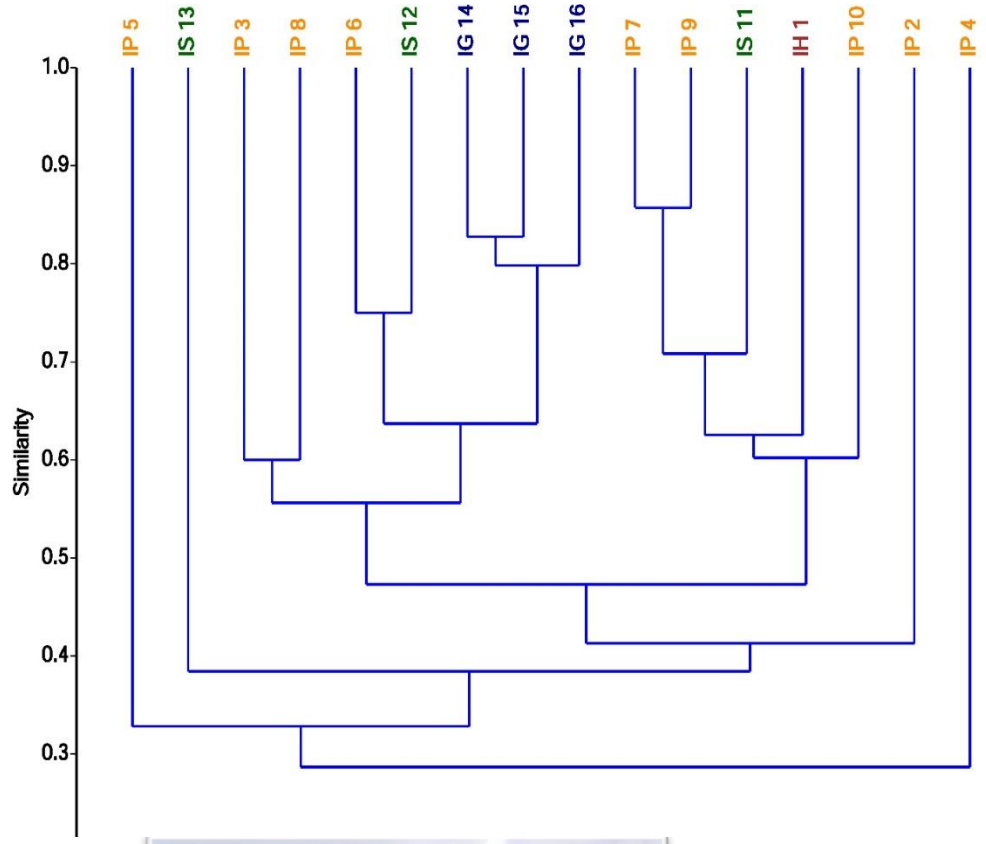






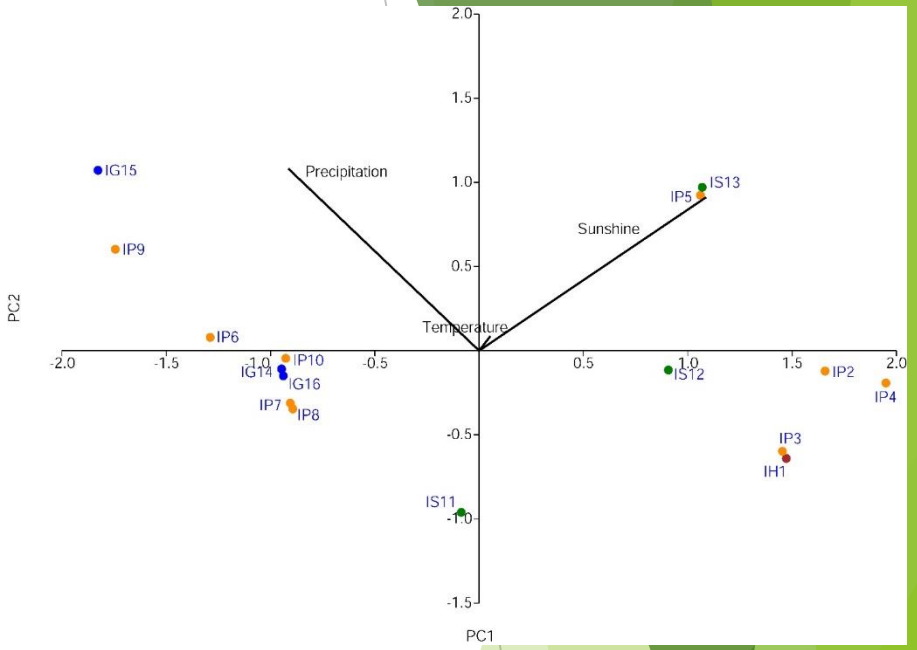
Chromatographic conditions: Chromatographic separation was conducted in the Shimadzu Nexera X2 LC-30AD HPLC system using ACE C18 column in the solvent system with 0.1% acetic acid in water under gradient increase elution of acetonitrile from 5 to 95%. The identification of the compounds was based on the UV/MS spectral data as well as co-chromatography with the control compounds, which were isolated from *Iris pseudacorus* and *Iris hungarica*

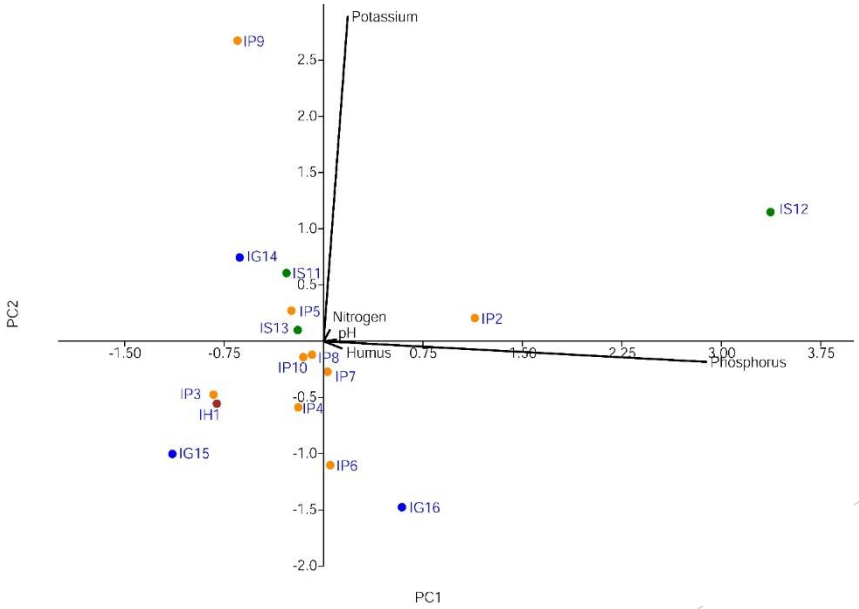
Вплив факторів навколишнього середовища на накопичення БАР у півниках. Кластеризація за вмістом сполук у півниках



Екологічні фактори:

- **Грунт**
- **Клімат**
- **Висота над рівнем моря**

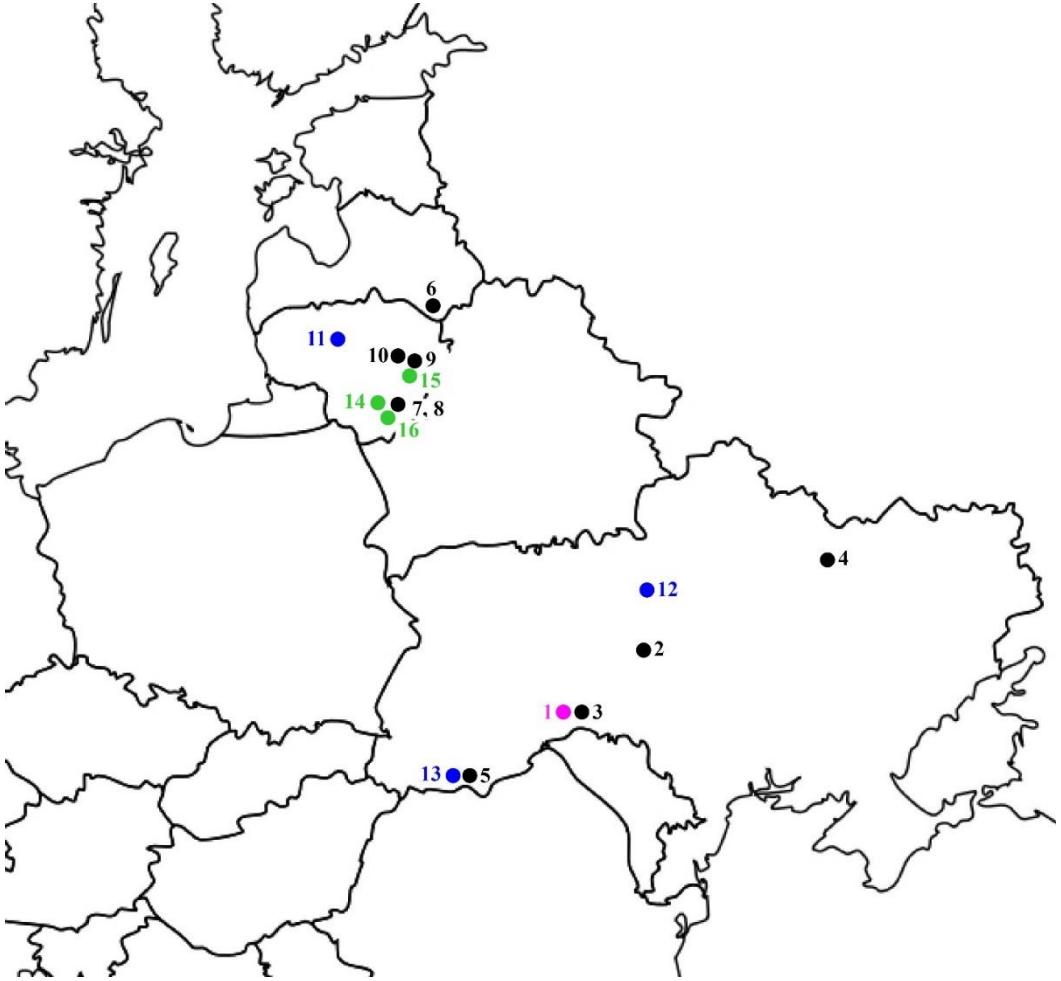




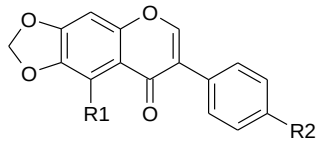
11 Iris species from Ukraine, Lithuania, Latvia

Dendrogram of studies *Iris* sect. *Limniris* species according to the presence of phenolic compounds (Paired group, Bray-Curtis distance). *Iris* species: green – *Iris halophila*, black – *Iris pseudacorus*, red – *Iris sibirica*.

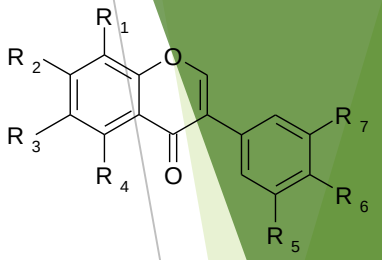
Кластеризація за вмістом сполук у півниках



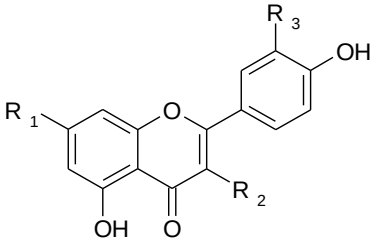
Карта місцевостей відбору проб кореневищ Iris halophila (пурпурний), Iris pseudacorus (чорний), Iris sibirica (синій) та Iris germanica (зелений) в Латвії, Литві та Україні



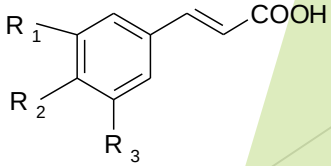
Isoflavones:
Nigricin-D-glu 13: R_1=OCH_3; R_2=O-Glu;
Nigricin 20: R_1=OCH_3; R_2=OH



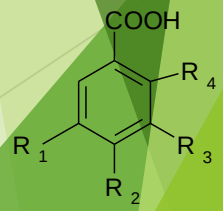
Isoflavones:
Tectoridin 10: R_1=R_5=R_7=H; R_4=R_6=OH; R_3=OCH_3; R_2=O-Glu;
Daidzein 12: R_1=R_3=R_4=R_5=R_7=H; R_2=R_6=OH;
Genistein 7-glu 15: R_1=R_3=R_5=R_7=H; R_2=O-Glu; R_6=OH; R_4=OH;
6,7-Dihydroxyisoflavone 17: R_1= R_4=R_5=R_6=R_7=H; R_2=R_3=OH;
Iristectorigenin B 19: R_2=R_4=R_6=OH; R_3=R_7=OCH_3; R_5=H;
Irigenin 21: R_3=R_5= R_6=OCH_3; R_2=R_4=R_7=OH;
7-Hydroxyisoflavone 22: R_1=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=H; R_2=OH;
Formononetin 23: R_1=R_3=R_4=R_5= R_7=H; R_2=OH; R_6=OCH_3;
5,6-Dihydroxy-7,8,3′,5′-tetramethoxyisoflavone 24: R_1=R_2=R_5=R_7=OCH_3; R_3=R_4=OH; R_6=H;
5,7-Dihydroxy-4′-methoxyisoflavone 25: R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=H; R_2=R_4=OH; R_6=OCH_3;



Flavones:
Hiperoside 8: R_1=OH; R_2= O-Gal; R_3=OH;
Isoquercitin 9: R_1=OH; R_2= O-Glu; R_3=OH;
Apigenin-7-glu 11: R_1= O-Glu; R_2=H; R_3=H;
Apigenin 16: R_1= OH; R_2=H; R_3=H

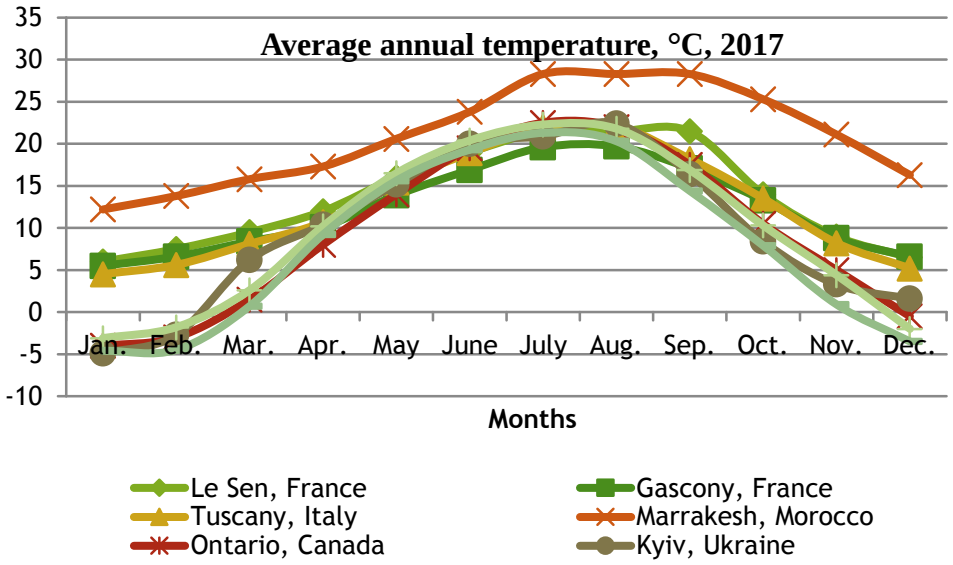


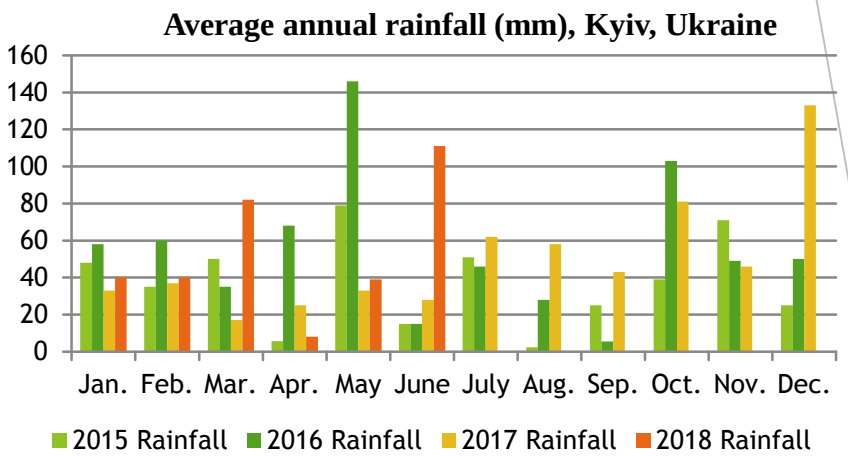
Caffeic acid 4: R_1=OH; R_2=OH; R_3=H
Coumaric acid 6: R_1=H; R_2=OH; R_3=H
Ferulic acid 7: R_1=OCH_3; R_2=OH; R_3=H
Cinnamic acid 14: R_1=H; R_2=H; R_3=H



Gallic acid 1: R_1=OH; R_2=OH; R_3=OH; R_4=H;

Екологічні фактори та культивування півників



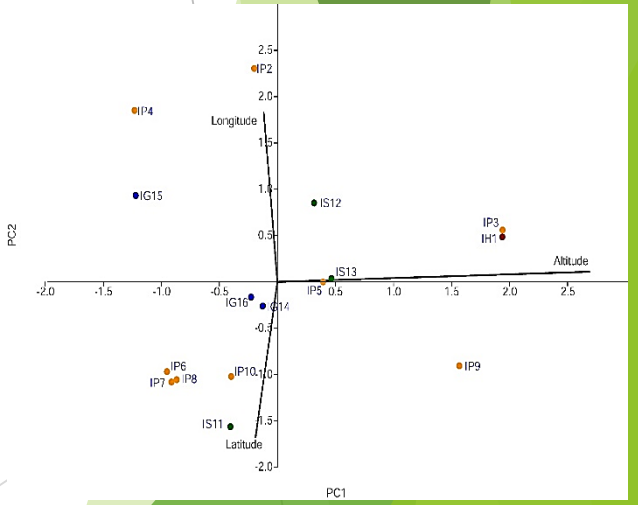


Soil characteristic of different irises plantations, 2017

Sample of soil	Humus, %	pH water	P_2O_5, mg/kg	K_2O, mg/kg	N, mg/kg
Kyiv, Grushka	5.3	5.6	406	249	104
Kharkiv, Karazina	2.2	6.12	455	223	33.6
Kharkiv, NUPh	1.2	7.46	181	142	23.8
Kharkiv, Kitchenkivka	3.8	6.17	334	86	44.8
Mykolaiv, Exper. plot	1.2	7.9	520	291	95

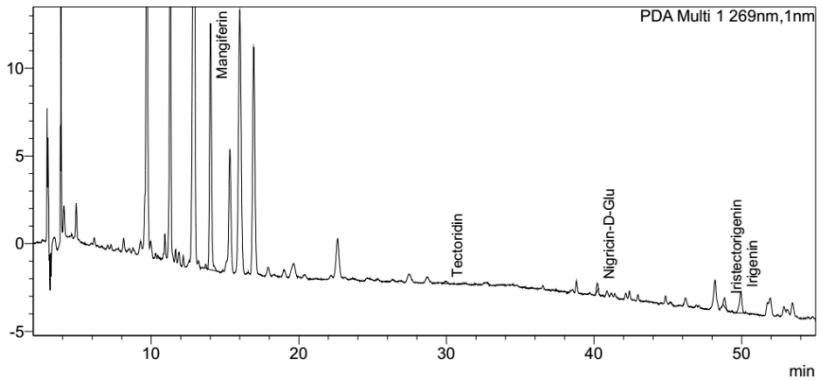
Optimal conditions for iris cultivation are:

- seasonably dry soil, humus-rich and well-drained soil;
- pH between 3.6 to 7.7.;
- climate: hot, dry summers and mild winters;
- Optimum temperature between 15 and 17°C, with a min of 8 and a max of 22°C.
- It requires high levels of soil
- nitrogen

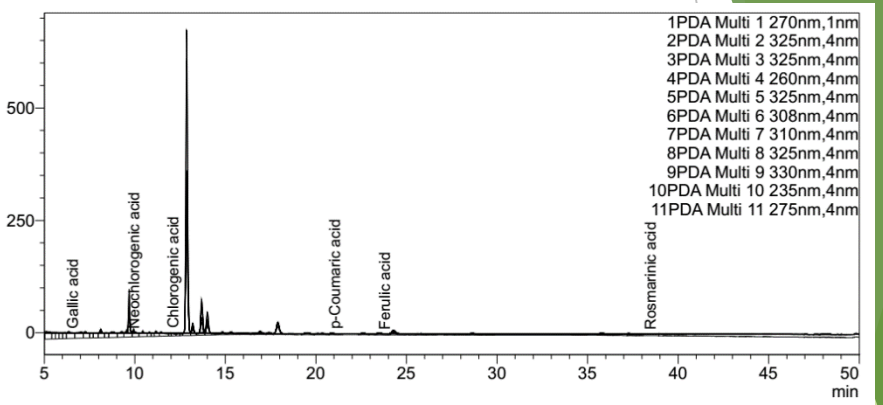


Фенольні сполуки півниеків та вплив місця зростання (висота над рівнем моря) на біосинтез БАР

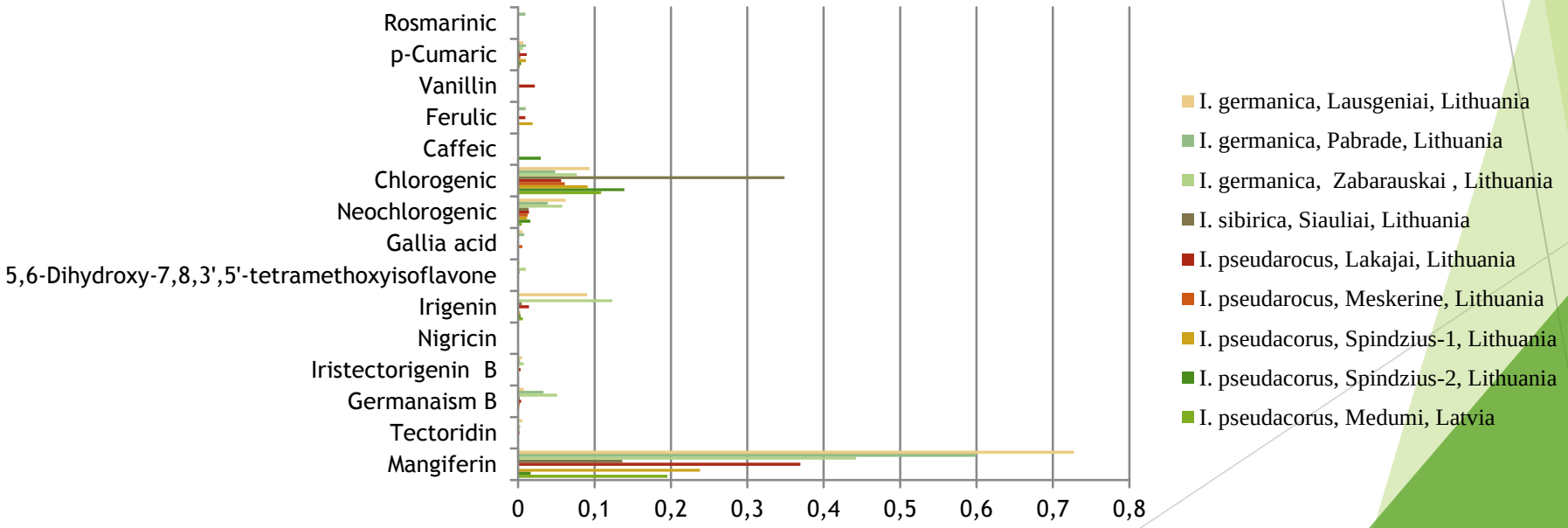
Розподіл фенольних сполук у листі півників з різних місць заготівлі



HPLC chromatograms of isoflavones & xanthone recorded at 269 nm of *Iris pseudacorus* leaves (Lakajai, Lithuania)

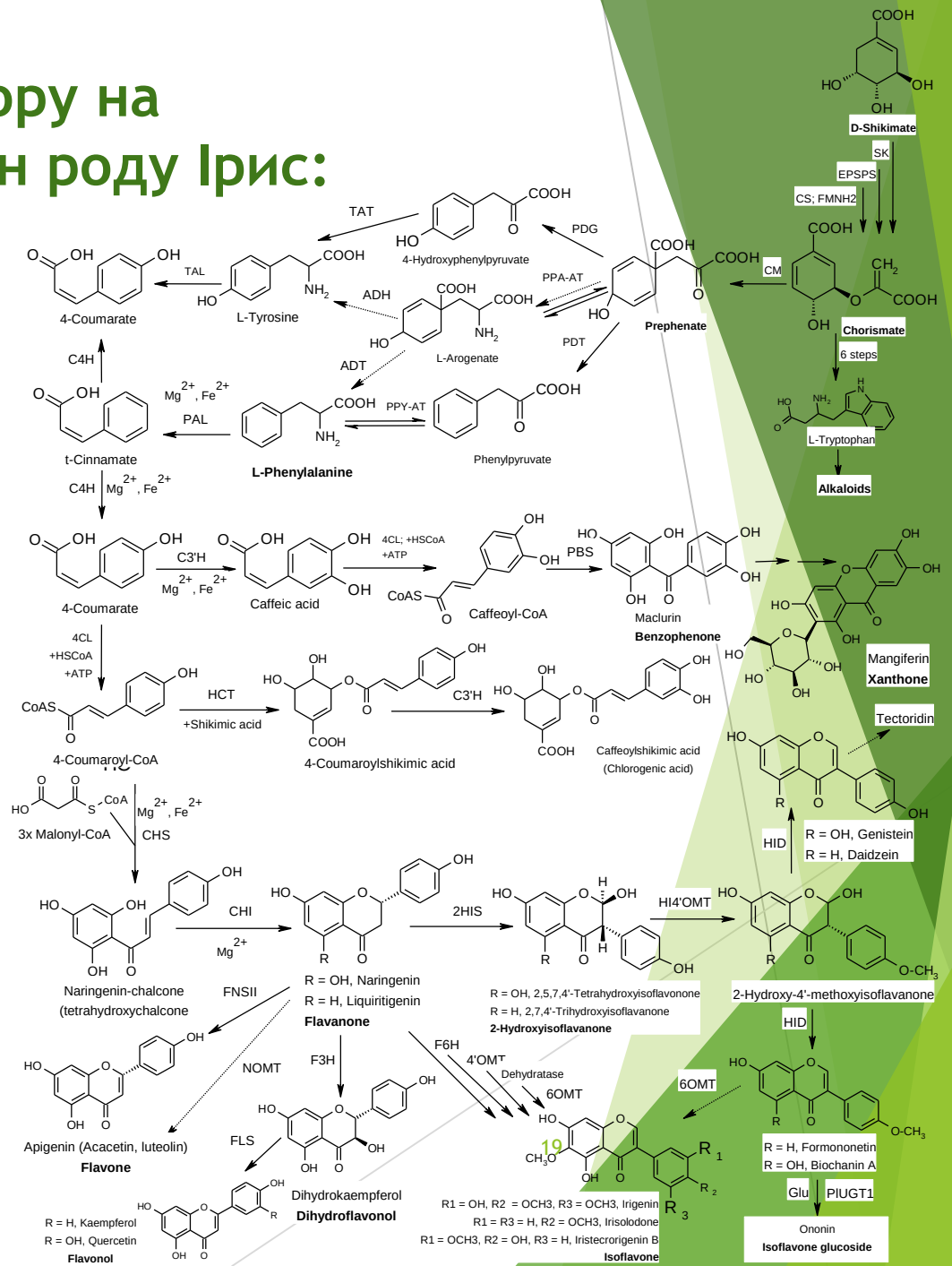


HPLC chromatograms of hydroxycinnamic acids of *Iris germanica* leaves (Pabrade, Lithuania)



Вплив компонентів едафічного фактору на біосинтез фенольних сполук у рослин роду Ірис: мінеральне живлення

- Додаткове живлення Fe2+, Mg2+ та K+ збільшувало вміст ізофлавоноїдів та ксантону у кореневищах;
- Вміст хлорогенової кислоти був вищим у листі ірисів;
- Вміст мангіферна у квітів після живлення був значно вищим;
- Живлення мало вплив на кореляцію вмісту речовин у сировині ірисів.



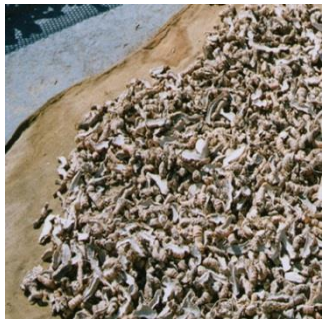
Загальний шлях використання півників

Mykhailenko O., Desenko V., Ivanauskas L., Georgiyants V. Standard operating procedure of Ukrainian saffron cultivation according with Good Agricultural and Collection Practices to assure quality and traceability. Industrial Crops and Products. 2020.151, 112376-112387; 2. Інформаційний лист № 375-2018. Випуск 48 з проблеми «Фармація». Михайленко О.О., Ковальов В.М., Буйдіна Ю.В., Кречун А.В. Оптимальні умови вирощування лікарської та ефіроолійної рослинної сировини кореневищ сортових ірисів (Iris hybrida) в Україні. Київ, 2018. НФаУ, УКРМЕДПФТЕНТІНФОРМ МОЗ України. 4 с

Harvesting

Cleaning

Drying



Storage for 3 years

Extraction

Dried Herbal Extract → **ISO control** → **Dried Herbal Product** → **Cosmetology Industry**

Pure phytochemical → **Ph. Eur. • SPhU** → **Pharmaceutical / Medical Industry**

Виділення індивідуальних сполук з кореневищ півників угорських

Здрібнене кореневище півників угорських

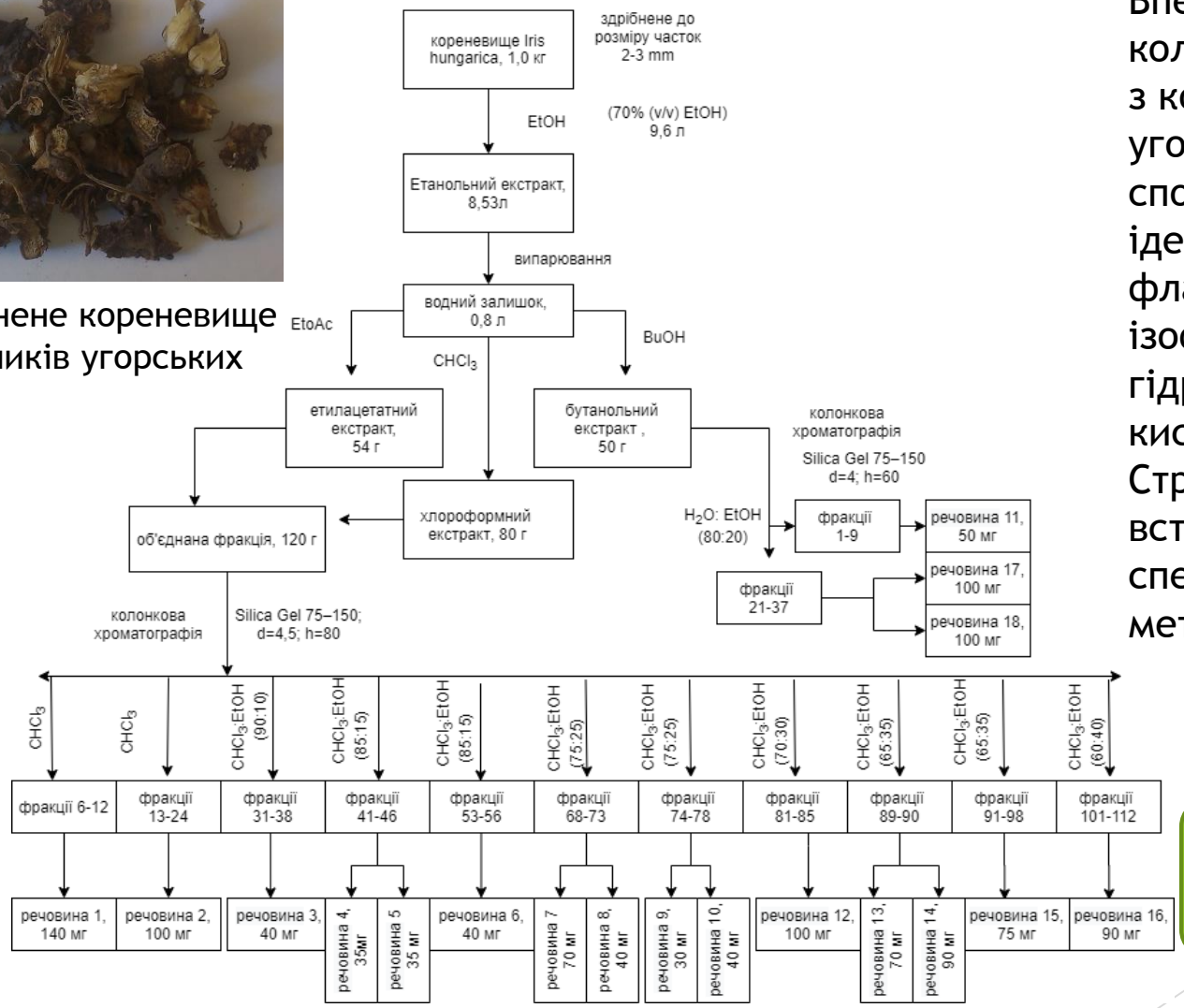


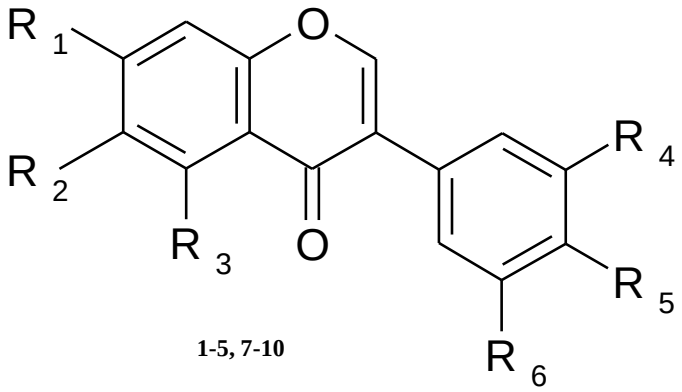
Схема виділення індивідуальних сполук з кореневищ півників угорських

Вперше методом колонкові хроматографії з кореневищ півників угорських виділено **18** сполук, серед яких ідентифіковано флавоноїди, ізофлавоноїди, похідні гідроксикоричної кислоти, ксантони. Структуру речовин встановлювали спектральними методами аналізу

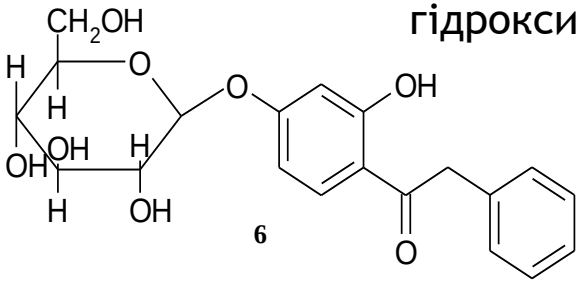
Ars Pharmaceutica. 2017. Vol. 58. № 1. P. 39-45 (ISSN: 2340-9894)

Виділені речовини з півників

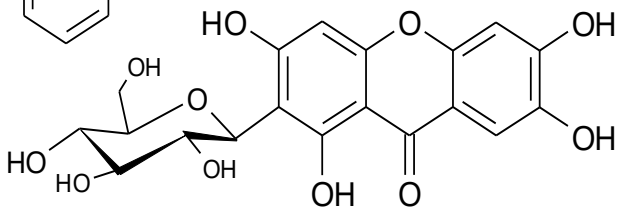
З кореневищ Iris hungarica вперше були виділені відомі ізофлавони іризолідон, кікалідон, іригенін, іризолон, ірилон, геністеїн, дайдзеїн, ононін, формононетин, а також ксантоновий мангіферин та 4′-метокси-3-гідрокси-халкон



1-5, 7-10



6



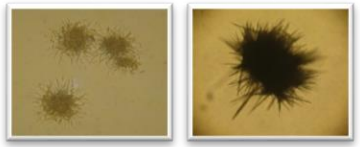
11

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. Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian Iris species: A fresh look on their content and biological activities. Molecules 2020, 25(19), 4588-4612

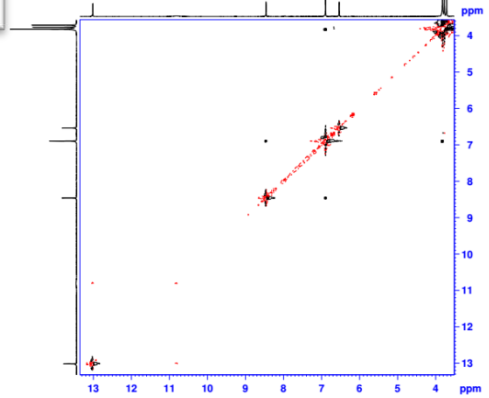
Irisolidone 1: R_1 = OH; R_4 = R_6 = H; R_2 = R_5 = OCH_3;
Irigenin 2: R_2 = R_5 = R_6 = OCH_3; R_1 = R_4 = OH;
Irisolone 3: R_1 (R_2) = -O-CH_2-O-; R_3 = OCH_3; R_5 = OH; R_4 =R_6 = H
Irilone 4: R_1 (R_2) = -O-CH_2-O-; R_3 = R_5 = OH; R_4 =R_6 = H;
Irisolidone 7-O-*β*-D-glucoside 5: R_1 = O-Glu; R_4 = R_6 = H; R_2 = R_5 = OCH_3;
2′-hydroxy-4′-glucosyl chalcon 6 1-(2-hydroxy-4-glucosylphenyl)-2-phenylethan-1-one
Ononin 7 R_1 = O-Glu; R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H; R_5 = OCH_3
Genistein 8: R_1 = R_3 = R_5 = OH; R_2 = R_4 = R_6 = H;
Daidzein 9: R_1 = R_5 = OH; R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H;
Formononetin 10: R_1 = OH; R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H; R_5 = OCH_3

Mangiferin 11

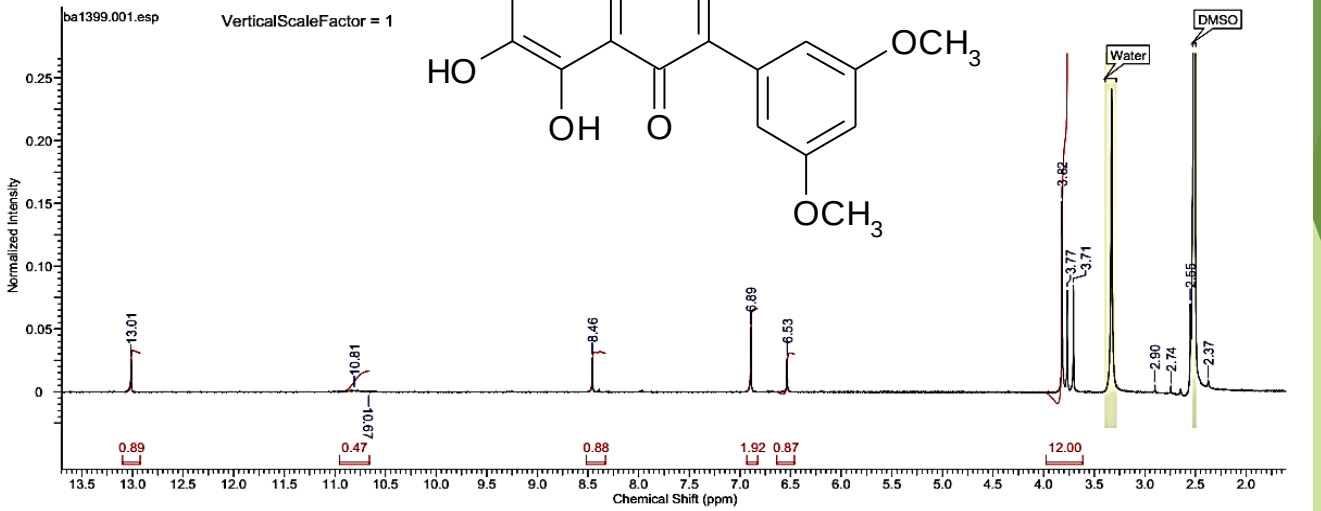
5,6-Dihydroxy-7,8,3′,5′-tetramethoxy isoflavone - нова природна сполука, виділена з кореневищ півника болотяного



$C_{19}H_{18}O_8$, , MW 374.,3414 mg/kg
T.melting. 231 ºC

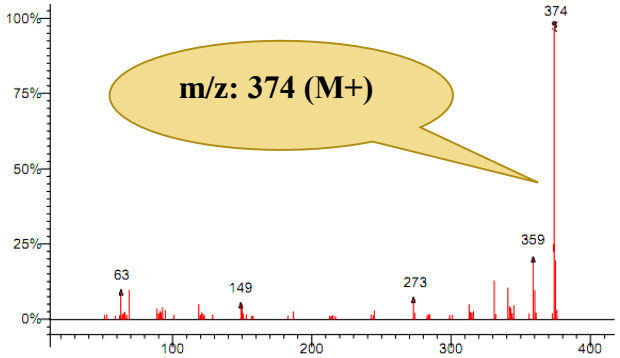


NOESY spectrum



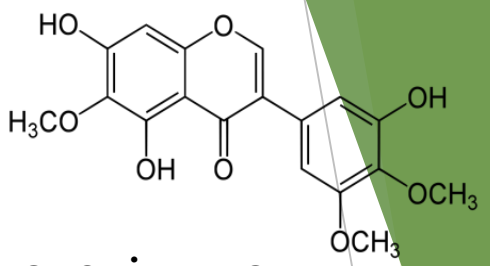
NMR spectrum (500 MHz, DMSO-D6)

A new isoflavone from Iris pseudacorus / V. N. Kovalev, O. A. Zatyl'nikova, S. V. Kovalev / Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49(1). – P. 34 – 35



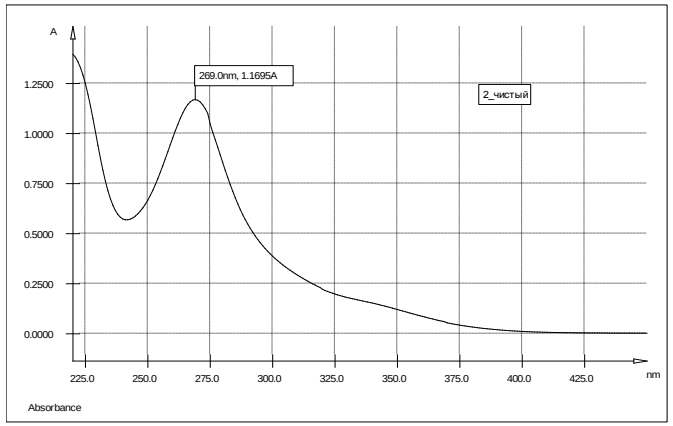
5,6-Dihydroxy-7,8,3′,5′-tetramethoxyisoflavone. UV spectrum (EtOH, λ_{max}, nm): 270, 335; (+$ZrOCl_2$) 270, 380. IR spectrum (KBr, ν, см$^{-1}$): 3251, 3070 (OH), 1672 (-pyrone C=O), 1628, 1585, 1509, 1464 (C=C), 2994, 2941, 2839, 1376, 1091, 1058, 1007 (OCH_3). NMR spectrum (500 MHz, DMSO-D_6, δ, ppm, J/Hz): 13.01 (1H, s, 5-OH), 10.81 (1H, s, 6-OH), 8.46 (1H, s, H-2), 6.89 (2H, s, H-2′,6′), 6.53 (1H, s, H-4′), 3.82 (6H, s, 3′5′-OCH_3), 3.77 (3H, s, 7-OCH_3), 3.71 (3H, s, 8-OCH_3). Mass spectrum (EI, 70 eV, m/z, I*rel*, %): 374 (M^+, 100), 359 (M –CH_3^+, 95), 273 (73), 149 (40), 63 (17).

Речовина 1 - іригенін

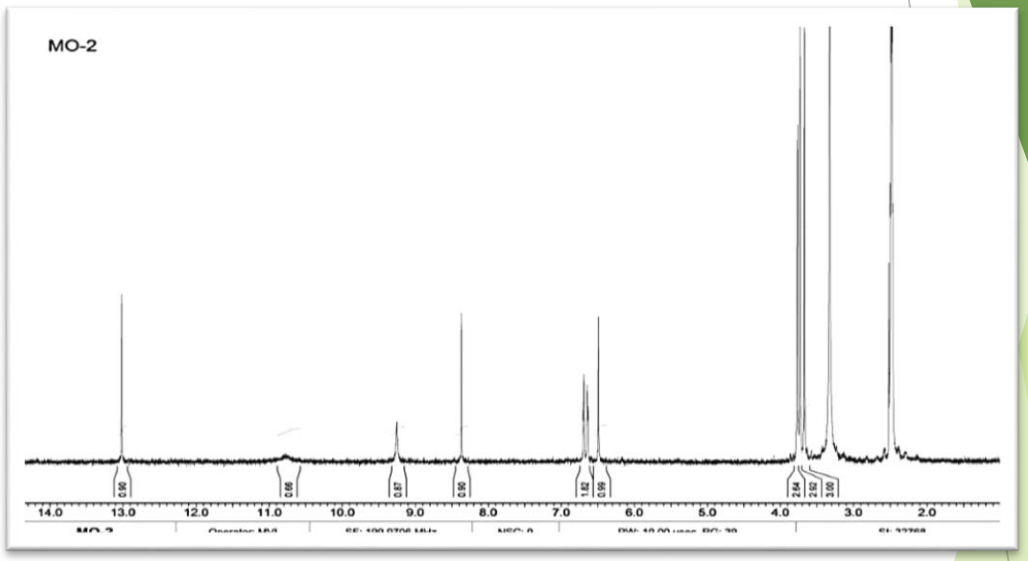


3´,5,7-тригідрокси-4´,5´,6-триметоксиізофлавон ($C_{18}H_{16}O_8$),

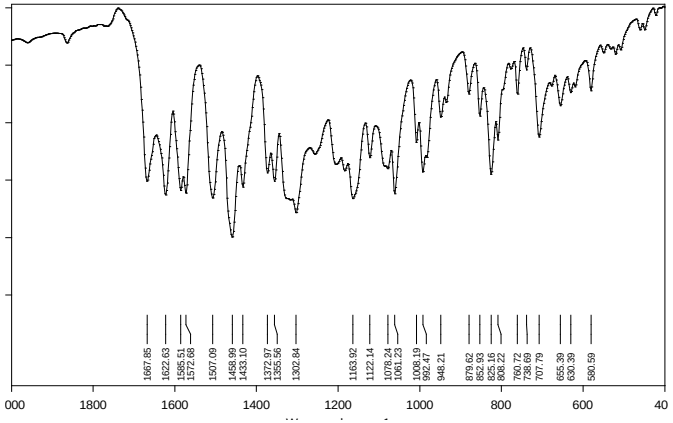
білий, дрібнокристалічний порошок, добре розчинний у етанолі, лугах.



УФ-спектр



^{1}H-ЯМР – спектр

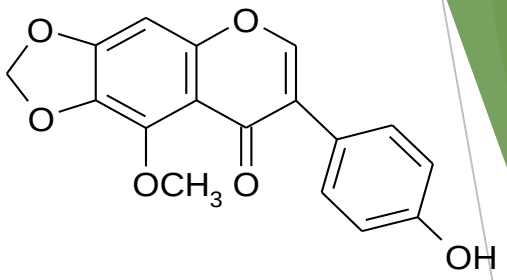


ІЧ-спектр

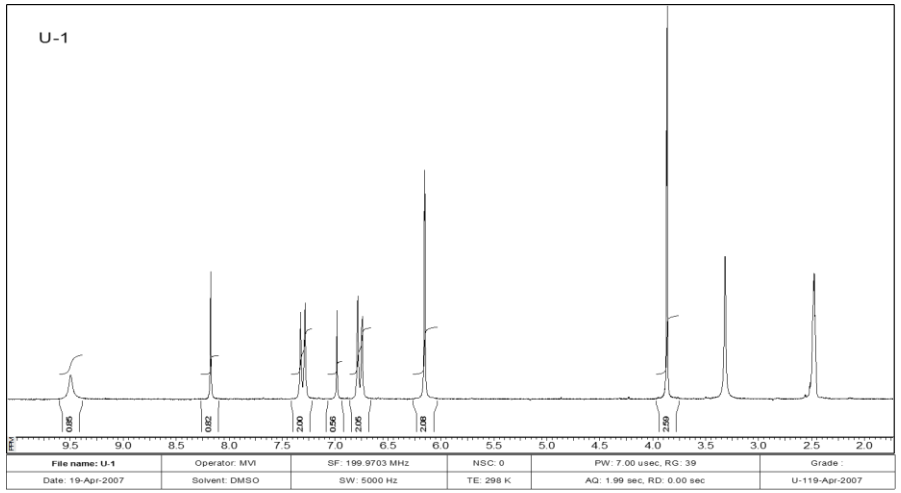
^{1}H-ЯМР (DMSO-D6, 400 MHz): (200 MHz, DMSO-д6) δ,: 13,0 (1H, с, 5-OH), 10,75 (1H, с, 7-OH), 9,21 (1H, с, 3'-OH), 8,35 (1H, с, H-2), 6,65 (2H, д, J = 1,8 Hz, H-2′), 6,62 (2H, д, J = 1,8 Hz, H-6′), 6,42 (1H, с, H-8), 3,3 (3H, с, 4'-OCH3), 3,55 (3H, с, 5-OCH3), 3,8 (3H, с, 6-OCH3). ІЧ (KBr) см$^{-1}$: 3380 (OH), 2975, 2945, 2834 (OCH_3), 1667 (C=O), 1622, 1585, 1507, 1572 (C=C), 1372, 1061, 1008 (C-O).УФ: 269 нм.Тпл=170-172 °С.

Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2016. Т. 14, № 4 (56). С. 63–66.

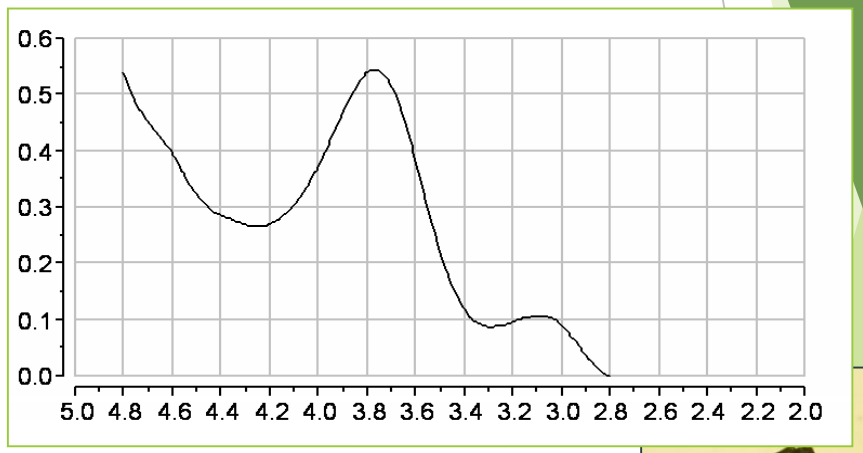
Речовина 3 - нігріцин



5-метокси-4´-гідрокси-6,7-метилендіокси ізофлавон ($C_{17}H_{12}O_6$), дрібнокристалічний порошок світло-жовтого кольору, добре розчинний у метанолі, етанолі, лугах.

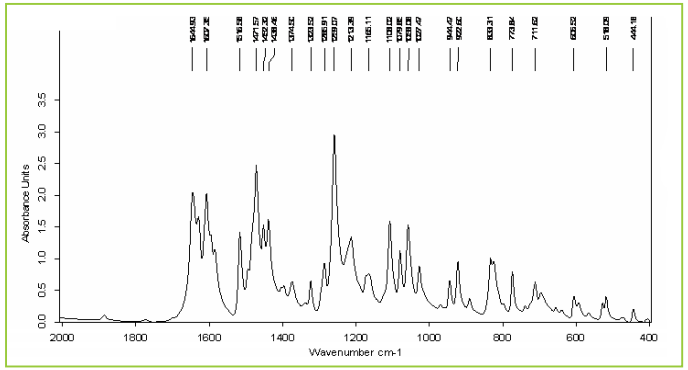


^{1}H-ЯМР-спектр



УФ-спектр

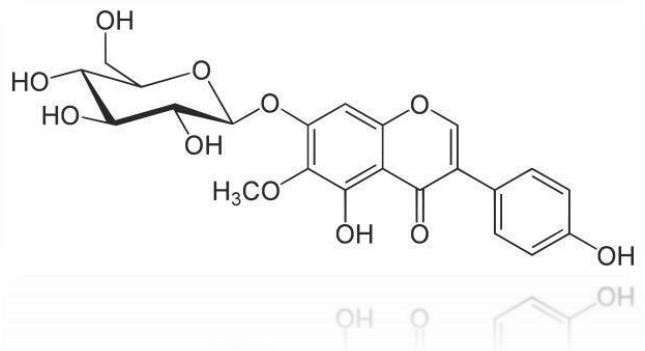
Т. пл. 271-273 °С



ІЧ-спектр

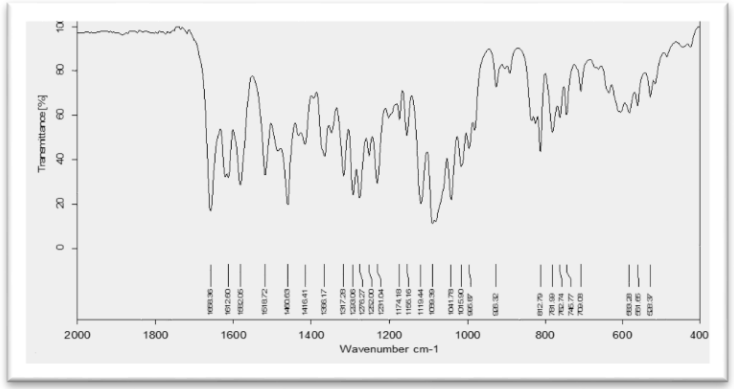
^{1}H-ЯМР (DMSO-D6, 400 MHz): *δ* 6.95, *δ* 8.2 (1H, C-8,C-2), *δ* 9.53 (C-4´), *δ* 7.32 (2H, д, *J*=8.5 Гц), 6.75 (2H, д, *J*=8.5 Гц) (C-2', C-6', C-3', C-5'), *δ* 3.85 м.ч.(C-5-OCH_3) ІЧ (KBr) см$^{-1}$: 3420 (OH), 3060 (=C-H), 1680, 1625, 1615 (C=O), 1590 (C-O), 1555-1270 см$^{-1}$ (C=C).УФ, нм: 263, 323 пл.

Речовина 15 - тектoрідин

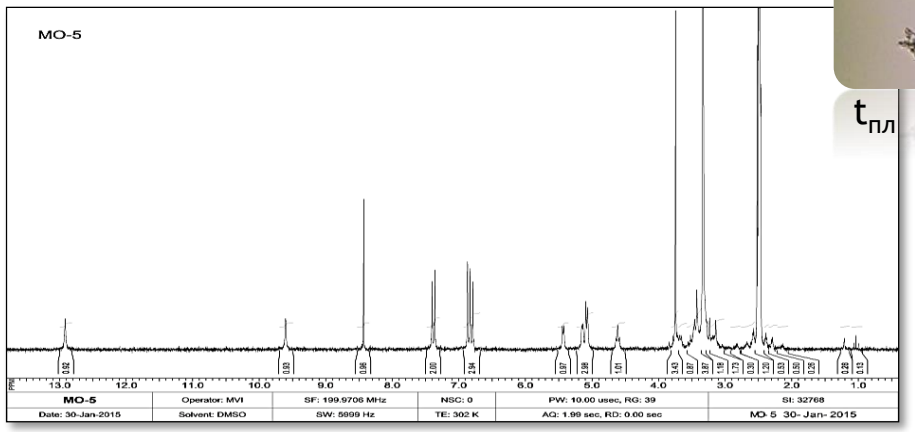


- 4',5-дигідрокси-6-метокси-7-*O*-*B*-*D*-глюкозид ізофлавона ($C_{22}H_{22}O_{11}$), кристали жовтого кольору, розчинні у метанолі, етанолі, хлороформі

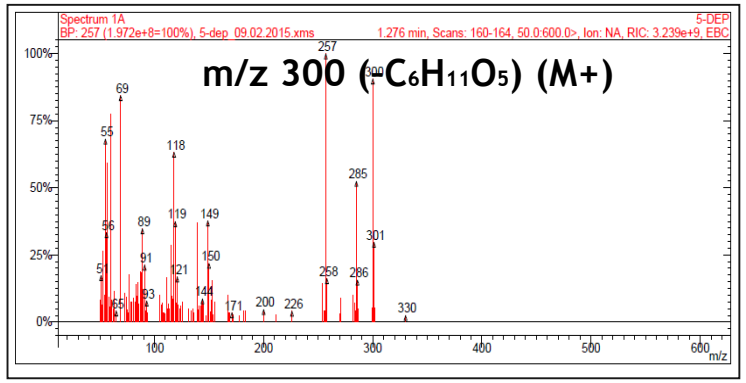
$t_{пл}$ 273 – 274 °C



ІЧ-спектр



^{1}H-ЯМР-спектр

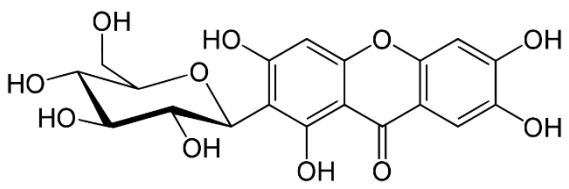


Мас-спектр

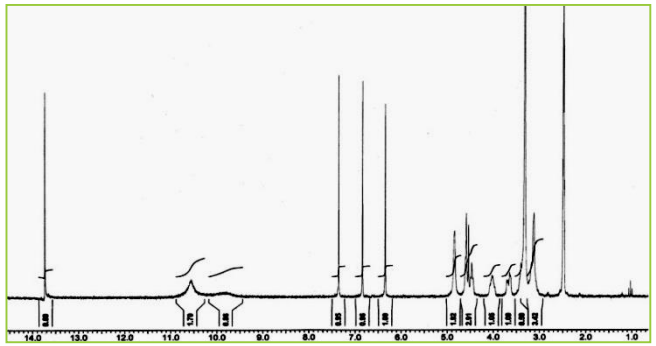
^{1}H-ЯМР (DMSO-D6, 400 MHz): δ 8,45 м.д. (C-2), δ 7.38 м.д. (2H, д, *J* = 10 Гц, H-2´, 6´), 6,79 м.д. (2H, д, *J* = 10 Гц, H-3´, 5´); при 6.86 м.д. (C-8), δ 3.75 м.д. (с, 3H, C-6), δ 12.91 м.д., 9.59 м.д (C-5-OH, C-4'-OH). ІЧ (KBr) см$^{-1}$: 3473 см$^{-1}$ (-OH), 1658 см$^{-1}$ (C=O, *γ*-пірону), 1612, 1518 см$^{-1}$ (C=C, ароматичного кільця), 1089 см-1 (-OCH_3) та 812 см$^{-1}$ (*B*-глікозидний зв'язок). УФ, нм: 257, 332.

Речовина 17 - мангіферин

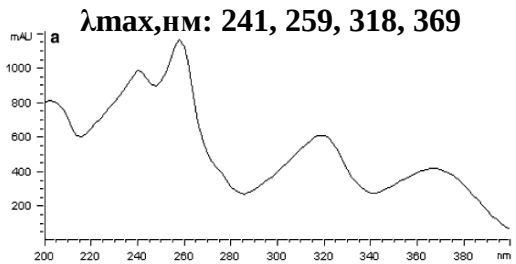
– 2-С-*β*-D-глюкопіранозил-1,3,6,7-тетрагідроксиксантон ($C_{19}H_{18}O_{11}$)



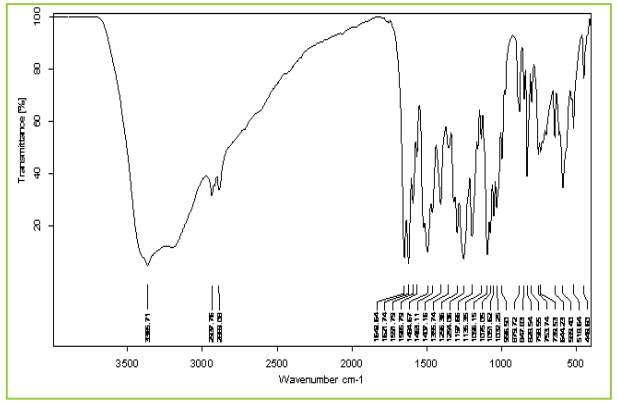
Світло-жовтий дрібнокристалічний порошок, добре розчинний у метанолі, етанолі, лугах і не розчиний у воді, ефірі, хлороформі



^{1}H-ЯМР-спектр



УФ-спектр



ІЧ-спектр

Т.пл. 267 – 269 °С

Підтвердження вмісту виділених сполук у кореневищі півників угорських методом ВЕРХ

Сполука	RT, хв	Вміст сполук ,мг/г
Мангіферин	14,02	2,4 ± 0,023
Текторідин	29,48	3,9 ± 0,071
Нігріцин	49,41	2,3 ± 0,003
Іригенін	49,91	4,9 ± 0,038

$C_{19}H_{18}O_{11}$, m/z: 423 (M^+); $t_{пл}$. 267-269 °С, УФ λ_{max} (C_2H_5OH) нм: 364, 315, 257, 240; ІЧ (KBr) $см^{-1}$: 1650 (С=О), 3100-37000 (OH^-), 1591, 1565, 1494 (С=С); ЯМР ^{1}H (200 МГц, ДМСО-D_6) δ: 6.35 (1H, H-4), 6.83 (1H, s, H-5), 7.38 (1H, c, H-8) 13.77, 10.65, 9.85 (1H, c, OH).

Розробка методу виділення мангіферину з листя півників угорських

Листя півників угорських

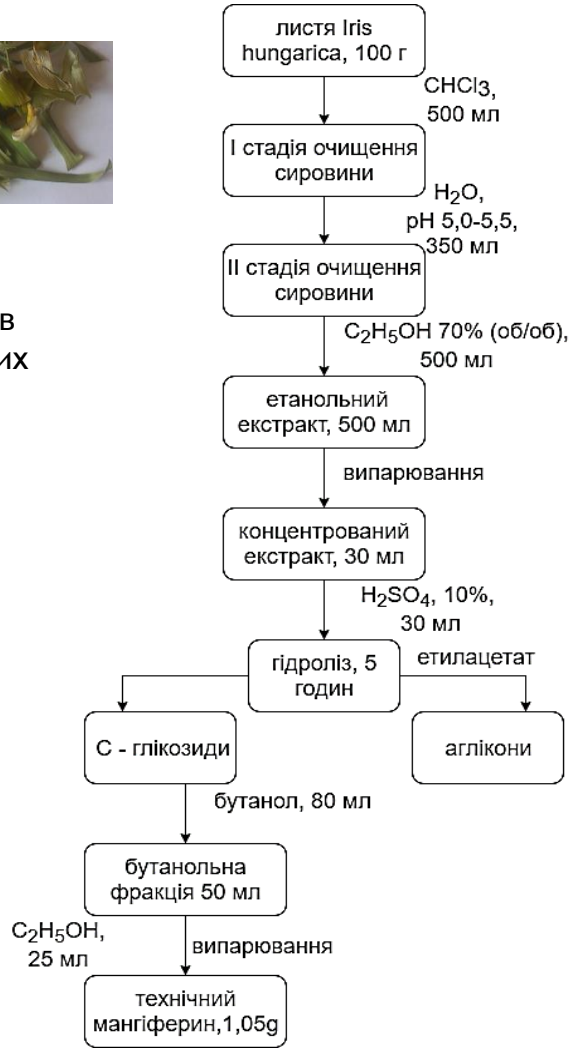
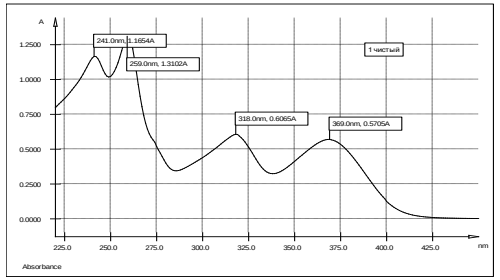
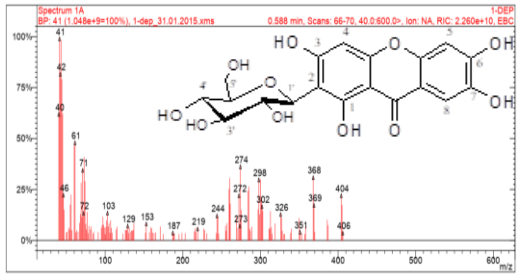


Схема виділення мангіферину



УФ-спектр мангіферину



Мас-спектр мангіферину

Фізико-хімічні характеристики: світло-жовтий дрібнокристалічний порошок, розчинний в метанолі, етанолі, лугах і нерозчинний у воді, ефірі, хлороформі. Хімічна будова – $C_{19}H_{18}O_{11}$, m/z: 423 (M^+); $t_{пл}$. 267 – 269 °С, УФ λ_{max} (C_2H_5OH) нм: 364, 315, 257, 240; ІЧ (KBr) $см^{-1}$: 1650 (C=O), 3100-37000 (OH^-), 1591, 1565, 1494 (C=C); ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО-D_6) δ: 6.35 (1H, H-4), 6.83 (1H, s, H-5), 7.38 (1H, c, H-8) 13.77, 10.65, 9.85 (1H, c, OH).

Вихід чистого продукту - 1,05%.

УКРАЇНА

ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 142932

СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ МАНГІФЕРИНУ З ЛИСТЯ ПІВНИКІВ УГОРСЬКИХ

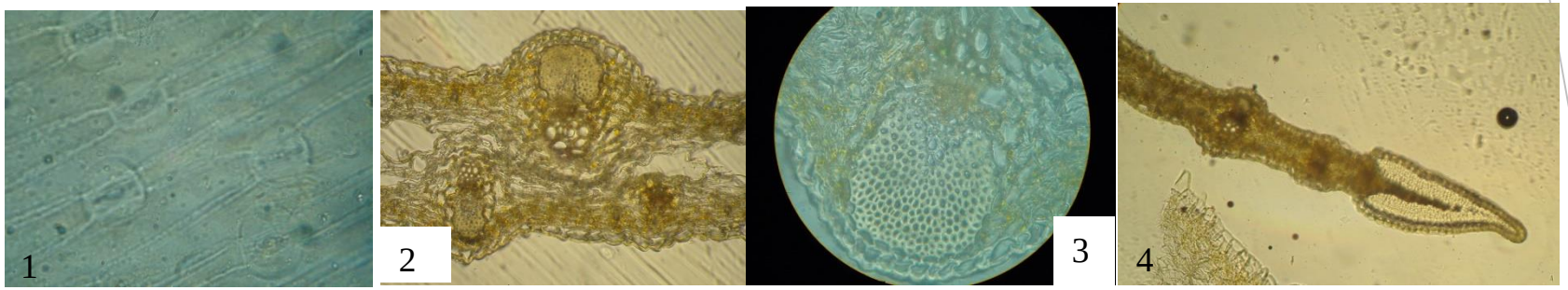
Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.07.2020.

Заступник Міністра розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України Д.О. Романович

Морфолого-анатомічне дослідження сировини півників угорських

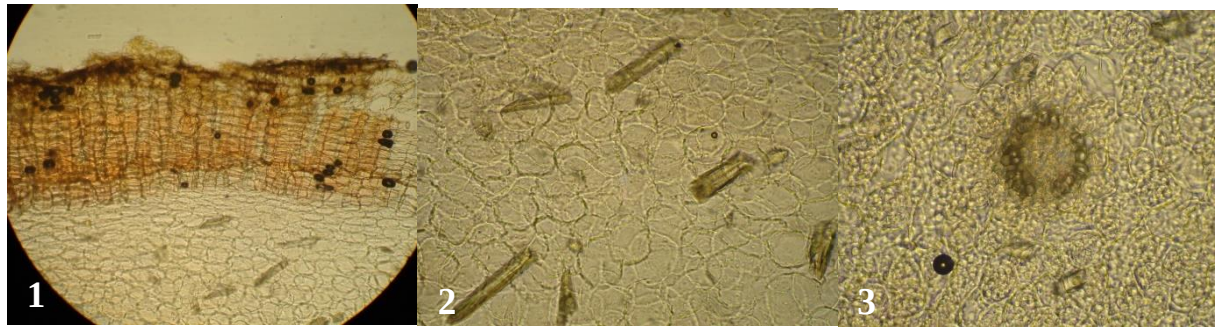
1. Основні діагностичні ознаки листя півників угорських



1 – тетрацитний продиховий апарат; 2 – поперечний зріз листової пластинки (провідний пучок, аеренхіма); 3 – колатеральний провідний пучок; 4 – сосочковидний виріст.

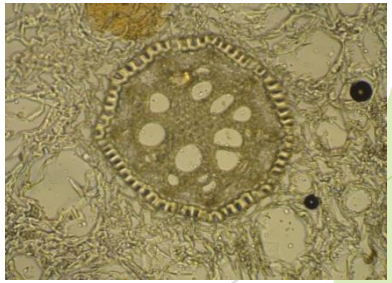
б

2. Основні діагностичні ознаки кореневища півників угорських



1 – поперечний зріз кореневища, 2 - запасаюча паренхіма, стилоїди, первинна кора; 3 – центрофлоемний провідний пучок.

3. Основні діагностичні ознаки кореня півників угорських



поперечний зріз кореня (паренхіма; провідний пучок; U-подібні потовщення клітин ендодерми)

Методики контролю якості «Півників угорських листя»

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Листя лінійно-мечевидне, близько 45 см у довжину, 3-4 см в ширину, на кінцях звужене в гострокінцеве. Тонке, гладке, світло-зелене, сизе, з добре вираженими паралельним жилкуванням.	Візуальний
	Ідентифікація:	
Мікроскопія	Порошок світло-зеленого кольору переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату *Р*. У порошку виявляються такі діагностичні структури: епідерма однорядна, вкрита кутикулою, з рівномірно потовщеними оболонками клітин. Продиховий апарат тетрацитного типу. Під епідермою краю листової пластинки розташована 4 – 5 шарова кутикова коленхіма.	Візуальний
Метод ТШХ	Проводять на ТШХ – пластинках із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 10×10 см, розчин порівняння: 10 мг мангіферину у 10 мл метанолу. Рухома фаза: оцтова кислота *Р* – мурашина кислота безводна *Р* – вода *Р* – етилацетат *Р* (11:11:27:100). Відстань, що має пройти рухома фаза – 8 см від лінії старту. Проявляють 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. На хроматограмі випробованого розчину можуть проявлятися світло-коричнева та блакитна флуоресціюючі зони нижче зони, відповідно мангіферину на хроматограмі розчину порівняння.	ДФУ,1 вид.2.2.27
	Випробування:	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 12%	ДФУ,1 вид.2.2.32
Загальна зола	Не більше 10%	ДФУ,1 вид.2.4.16
Сторонні домішки	Лікарська рослинна сировина не повинна містити цвілі, комах та інших домішок тваринного походження. Кількість інших сторонніх часток не має перевищувати 2,0 %.	ДФУ,1 вид.2.8.2
Частина листя, що потемніла або побуріла	Не більше 5%	ДФУ,1 вид.2.8.2
	Кількісне визначення:	
Сума ксантонів	Спектрофотометричний метод. При аналітичній λ=369 нм у перерахунку на мангіферин. Питомий показник поглинання мангіферину при λ=369±2 нм рівний 295.Сума ксантонів у перерахунку на мангіферин має бути не менше 1,0%.	ДФУ,1 вид.2.2.25

Research Journal of Pharmacy and Technology. 2019. Vol. 12. № 7. P. 3359–3364 (ISSN 0974-360X)

Методики контролю якості «Півників угорських кореневища»

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Ціле кореневище вузлувате, округле, 4-10 см завдовжки та 2-4 см у діаметрі, розгалужене. На поверхні наявні залишки листя, знизу кореневище має відрости чисельних тонких корінців 1-3 мм в діаметрі. На поверхні наявні рубці від стебел та корінці. Поверхня темно-коричнева, на зламі – світло-жовта, коричнево – жовта. Текстура тверда, злам щільний.	Візуальний
	Ідентифікація:	
Мікроскопія	У порошку кореневищ, використовуючи розчин хлоральгідрату *Р*, виявляються діагностичні структури: верхні шари первинної кори опробковілі, клітини корової паренхіми і центрального циліндру заповнені крохмалом. Зустрічаються стилоїди і призматичні кристали. Центрофлоемні судинні пучки розташовані хаотично.	Візуальний
Метод ТШХ	1) Пластинки із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 5×10 см, рухома фаза: оцтова кислота льодяна Р – бутанол Р (5:95). Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту. Розчин порівняння - 10 мг ононіну у 10 мл етанолу Р. На хроматограмі випробованого розчину можуть проявлятися одна темно – коричнева флуоресціююча зона вище зони, відповідно ононіну на хроматограмі розчину порівняння. 2) Пластинки із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 5×10 см, рухома фаза: толуол Р – етилацетат Р – мурашина кислота Р – (5:4:1). Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту. Розчин порівняння - 10 мг нігрицину у 10 мл етанолу Р. На хроматограмі випробуваного розчину можуть проявлятися одна темно – коричнева флуоресціююча зона вище зони, відповідно нігрицину на хроматограмі розчину порівняння.	ДФУ,1 вид.2.2.27
	Випробування:	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 12%	ДФУ,1 вид.2.2.32
Загальна зола	Не більше 10%	ДФУ,1 вид.2.4.16
Сторонні домішки	Лікарська рослинна сировина не повинна містити цвілі, комах та інших домішок тваринного походження. Кількість інших сторонніх часток не має перевищувати 2,0 %.	ДФУ,1 вид.2.8.2
Частина кореневищ, що згнила або зіпсувалася	Не більше 1%	ДФУ,1 вид.2.8.2
	Кількісне визначення:	
Сума ізофлавоноїдів	Спектрофотометричний метод. При аналітичній λ=260 нм у перерахунку на ононін. Питомий показник поглинання ононіну при λ=260±2 нм рівний 715.Сума ізофлавоноїдів у перерахунку на ононін має бути не менше 1,0%.	ДФУ,1 вид.2.2.25
Ксантон (мангіферин)	Рідинна хроматографія. Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 258 нм, розчин порівняння – розчин стандарту мангіферину у метанолі *(50% об/об)*. Вміст мангіферину у сировині не менше 1,0%	2.2.29

Технологія одержання сухих екстрактів з сировини півників угорських

Kovalyov V., Chetvernia S., Krechun A., Mykhailenko O. Establishment of the main technological parameters of Iris raw material. ResearchJ ournal of Pharmacy and technology 2019. – 12(7). – с. 3359-3364.

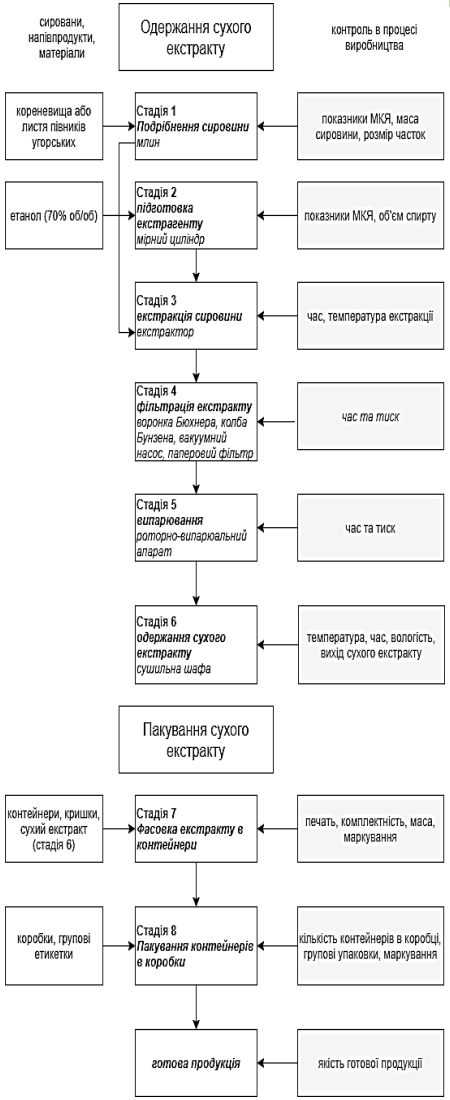


Схема одержання екстракту сухого з сировини півників угорських (ЕКС, ЕЛС)

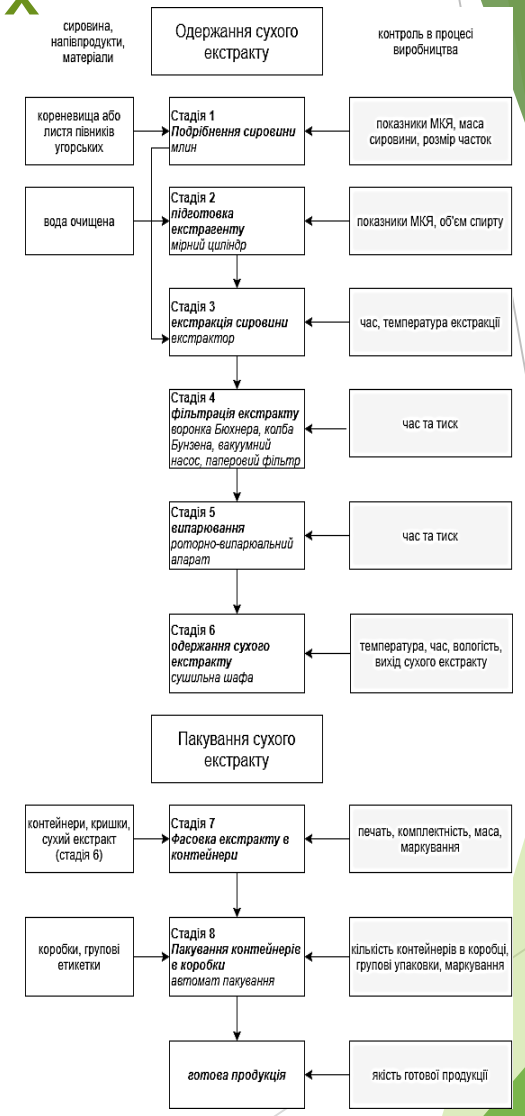


Схема одержання екстракту водного сухого з листя півників угорських (ЕКВ, ЕЛВ)

Встановлення фармакологічної активності сухих екстрактів листя та кореневища півників угорських

Центральна науково-дослідна лабораторія Національного фармацевтичного університету під керівництвом д.б.н., доц. каф. патологічної фізіології Рибак В. А.

Антиексудативна активність

Умови досліду	Субстанція, мг/кг	Приріст об'єму стопи, умов. од	Протизапальна активність, %
Контрольна патологія (без лікування)	-	0,89±0,021	-
Диклофенак натрію	8	0,46±0,056*	48,3
Альтан	5	0,54±0,044*	39,3
Сухий екстракт листя півників угорських	150	0,60±0,042*	32,6
Сухий екстракт кореневищ півників угорських	150	0,52±0,046	41,6

Ефективність досліджуваних екстрактів мала гальмівний вплив на розвиток набряку в порівнянні з контрольною патологією, а саме, антиексудативна активність склала 32,6% і 41,6%, що є достатньо виразною.

Дослідження гострої токсичності

Сухий екстракт листя півників угорських		Сухий екстракт кореневищ півників угорських	
Доза, мг/кг	Смертність тварин/кількість тварин	Доза, мг/кг	Смертність тварин/кількість тварин
500	0/4	500	0/4
1000	0/4	1000	0/4
1500	0/4	1500	0/4
2000	0/4	2000	0/4
2500	0/4	2500	0/4

За класифікацією К.К. Сидорова досліджувані зразки були віднесені до класу практично нетоксичних речовин.

Доза препаратів – 150 мг/кг

Ukrainian Biopharmaceutical Journal. 2019. № 4 (61). P. 55-58.

Визначення анаболічної активності

Центральна науково-дослідна лабораторія Національного фармацевтичного університету

Вплив екстрактів півників угорських на динаміку маси тіла тварин з нормальним гомеостазом

Групи тварин	Термін спостереження				
	Вихідні дані	1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	4 тиждень
I	240,0 ±7,1	233,1 ± 10,1	249,8 ± 10	261,3 ± 10,2	288,1 ± 10,8
II	242,0 ± 15,9	250,5 ± 19,9	265,1 ± 12,6	270,2 ± 11,6	279,7 ± 12,3
III	220,0 ± 11,5	247,7 ± 16	249,0 ± 15,2	258,0 ± 12,4	266,8 ± 15,0
IV	241,0 ± 16,5	247,6 ±1 5,6	255,6 ± 14,2	256,8 ± 12,2	277,5 ± 13,4
V	233,3 ± 8,8	256,50 ± 7,3	262,7 ± 9,4	260,5 ± 8,7	275,1 ± 7,8

Вплив екстрактів півників угорських на відносну масу внутрішніх органів щурів з нормальним гомеостазом

Групи тварин	Відносна маса органів, %		
	серця	литкового м'яза	сім'яників
I	0,30 ± 0,02	0,50 ± 0,01	1,1 ± 0,08
II	0,31 ± 0,02	0,56 ± 0,03	1,2 ± 0,05
III	0,31 ± 0,01	0,54 ± 0,02	0,16 ± 0,05
IV	0,30 ± 0,01	0,52 ± 0,02	1,27 ± 0,04
V	0,30 ± 0,003	0,46 ± 0,15	1,16 ± 0,05

Вплив екстрактів півників угорських на обмін білка у щурів з нормальним гомеостазом

Групи тварин	Загальний білок, мг/г		
	у сироватці	у литковому м'язі	у серцевому м'язі
I	55,55±0,55	123,11±2,34	119,08±4,28
II	60,99±0,19$^{\alpha\#}$	141,4±7,36*	116,12±2,60
III	58,21±1,81	125,53±3,20^{ЕКС}	111,95±2,56
IV	52,78±2,61	134,00±2,63	115,31±6,75
V	53,20±1,73	147,8±1,25*	116,39±5,08

Дослідні групи тварин

Групи тварин	
I	Негативний контроль
II	сухий екстракт кореневищ півників угорських (150 мг/кг)
III	сухий екстракт листя півників угорських (150 мг/кг)
IV	калію оротат (100 мг/кг)
V	екстракт кореневищ левзеї (150 мг/кг)

Вперше встановлено анаболічну активність сухих екстрактів листя і кореневищ півників угорських. Екстракти кореневища проявляв помірний анаболічний ефект у дозі 150 мг/кг.

Антибактеріальна активність сухих екстрактів півників угорських

Визначення проводили в Лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України

Штами мікроорганізмів	Діаметри зон затримки росту в мм, кількість дослідів n=3	
	Сухий екстракт листя півників угорських	Сухий екстракт кореневищ півників угорських
S. aureus	18,16±0,03	15,6±0,12
E. coli	19,30±0,02	14,60±0,08
P. vulgaris	14,60±0,10	13,60±0,10
P. aeruginosa	15,10±0,07	13,1±0,13
B. subtilis	19,10±0,06	16,00±0,12
C. albicans	16,10±0,2	16,30±0,09

Мінімальна інгібуюча концентрація

Штами мікроорганізмів	МІК, мкг/мл екстрактів	
	Сухий екстракт листя півників угорських	Сухий екстракт кореневища півників угорських
S. aureus	250	250
E. coli	500	500
P. aeruginosa	500	1000
P. vulgaris	500	500
B. subtilis	125	125
C. albicans	500	250

Мікробіологічна чистота сухих екстрактів з листя та кореневищ півників угорських

Зразки	Кількість субстанції в пробірці (мл або г)	Умови культивування		
		Соєво-казеїновий бульйон	Тіогликолеве середовище	Рідке середовище Сабуро
Сухий екстракт листя півників угорських	1,0	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	0,1	Ріст мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
	0,01	Ріст мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
Сухий екстракт кореневищ півників угорських	1,0	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
	0,1	Ріст мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
	0,01	Ріст мікроорганізмів	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній

Антибактеріальна активність сухих екстрактів з листя та кореневищ сортових півників

Сировина	Препарати	Діаметри зон затримки росту в мм, кількість дослідів n=3					
		S. aureus	*E. coli*	*P. vulgaris*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*C. albicans*
листя	Irii hybrida hort. 'Galleon Gold'	17,6±0,10	16,6±0,15	14,3±0,11	14,0±0,13	19,6±0,10	17,6±0,14
	Iris hybrida hort. 'Mini Dynamo'	17,6±0,12	16,3±0,13	14,3±0,14	14,6±0,10	18,3±0,12	17,3±0,09
	Iris hybrida hort. 'Little Dream'	17,6±0,15	16,0±0,10	14,6±0,16	14,6±0,14	18,6±0,16	17,0±0,15
	Iris hybrida hort. 'Indian Pow Waw'	18,0±0,10	16,3±0,16	14,3±0,09	14,0±0,13	18,3±0,10	16,3±0,18
	Iris hybrida hort. 'Bright white'	17,3±0,13	16,6±0,14	14,3±0,11	14,0±0,09	18,6±0,11	17,3±0,14
кореневище	Irii hybrida hort. 'Galleon Gold'	17,0±0,09	15,3±0,15	13,3±0,13	13,0±0,12	17,3±0,15	17,0±0,12
	Iris hybrida hort. 'Mini Dynamo'	16,3±0,12	15,0±0,10	14,3±0,14	14,6±0,15	17,3±0,11	16,0±0,09
	Iris hybrida hort. 'Little Dream'	16,6±0,17	15,3±0,11	13,3±0,18	13,0±0,12	17,0±0,14	16,0±0,13
	Iris hybrida hort. 'Indian Pow Waw'	16,3±0,10	15,3±0,13	13,0±0,15	12,6±0,12	17,3±0,15	15,3±0,12
	Iris hybrida hort. 'Bright white'	16,0±0,12	15,6±0,11	13,3±0,10	13,3±0,10	17,0±0,11	16,0±0,15

Вперше встановлено антимікробну активність сухих екстрактів листя та кореневищ сортових півників: сухі екстракти у концентрації 1% проявляють бактеріостатичну активність до наведених штамів мікроорганізмів та грибів. МІК для сухих екстрактів склала від 32,35 до 500 мкг/мл.

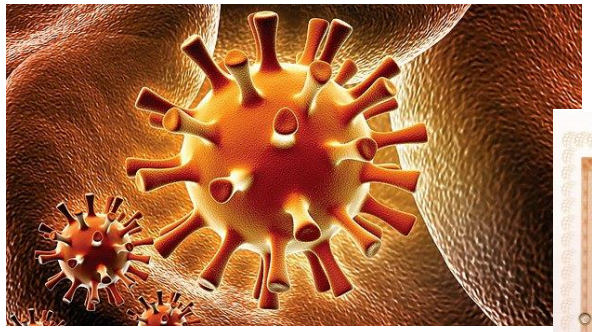
Анали Мечниковського Інституту. 2017. № 2. С. 57-64

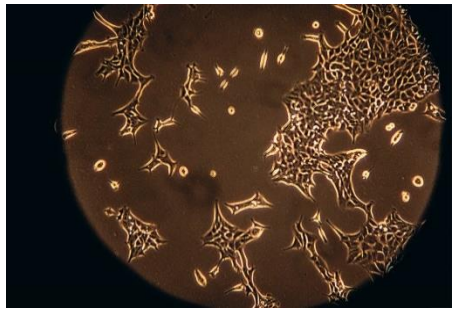
Дослідження антигерпетичної активності сухого екстракту листя півників угорських

Кількість клітин, що загинули під дією вірусу герпесу

Концентрація сухого екстракту листя *Iris hungarica*, (мкг/мл)	Показники цитопатогенної дії, число дослідів n=4			
	1	2	3	4
5	75 %	100 %	100 %	100 %
5	75 %	100 %	100 %	100 %
5	75 %	100 %	100 %	100 %
50	50 %	50 %	75 %	100 %
50	50 %	50 %	75 %	75 %
50	50 %	75 %	100 %	100 %
100	25 %	50 %	100 %	100 %
100	50 %	75 %	75 %	100 %
100	25 %	50 %	100 %	100 %
Контроль к/к	—	—	—	—
Контроль вірусу	75 %	100 %	100 %	100 %

Дослідження проводили на штамі вірусу простого герпесу на культурі клітин епітеліальної карциноми гортані людини.





УКРАЇНА

ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 135620

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З АНТИГЕРПЕТИЧНОЮ, АНТИОКСИДАНТНОЮ ТА АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ З ЛИСТЯ ПІВНИКІВ УГОРСЬКИХ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.07.2019.

Заступник Міністра економічного розвитку і торгівлі України Ю.П. Бровченко

Вперше досліджено антигерпетичну активність екстракту листя півників угорських: сухий екстракт у концентрації 100 мкг/мл проявляє найбільш виражену дію до вірусу просто герпесу, кількість клітин, що вижило, складає у середньому **27,08** %.

Фармакологічні дослідження лікарських рослинних засобів на основі ірисів

Антибактеріальна активність

МПК 5,0 мг/мл (кореневища)
МПК 10,0 мг/мл (листя) *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*

Протизапальна активність

Доза – 25 мг/кг
Кореневища: виражена антиексудативна активністі

Антигіпоксична активність

Доза – 150 мг/кг
Кореневища: збільшення тривалості життя у 1,5 рази

Адаптогенна активність

Доза – 150 мг/кг
Кореневища: виражений ерготропний ефект, стимулюючий та тонізуючий вплив на ЦНС

Анаболізуюча активність

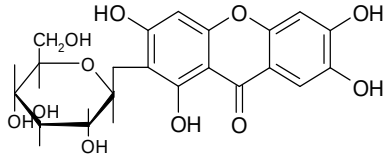
Доза – 150 мг/кг
Кореневища: зниження вмісту сечовини у сироватці крові та сечі відповідно на 52% та 61%,. Листя – зниження на 77% та 75%, у порівнянні з контролем. Препарати збільшують вміст загального білка у серці, та в литковому м’язі у порівнянні з Калій оротатом.

Діуретична активність

Доза - 25, 40, 150 мг/кг
Листя: збільшення продуктивністі сечі, у порівнянні з фурацемідом (10 мг/кг) та ортосифоном (40 мг/кг)

Протигерпетична активність

Доза – 5, 50, 100 мкг/мл
Листя: виражений антивірусний ефект у дозі 50 мкг/мл на клітинній культурі Hep-2 з вірусом простого герпесу ((HSV 1, 2 типу)



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. Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian Iris species: A fresh look on their content and biological activities. Molecules 2020, 25(19), 4588-4612

Проект МКЯ «Півників угорських листя екстракт сухий»

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Крупно-зернистий порошок темно- коричневого кольору, запах ароматний, смак в'яжучий.	Візуальний
Розчинність	Розчинний у етанолі (70 % об/об), при нагріванні у воді Р.	Хімічний
	Ідентифікація:	
Метод ТШХ Метод ВЕТШХ	А. Проводять на ТШХ – пластинках із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 10×10 см, розчин порівняння: 10 мг мангіферину у 10 мл метанолу. Рухома фаза: оцтова кислота Р – мурашина кислота безводна Р – вода Р – етилацетат Р (11:11:27:100). Відстань, що має пройти рухома фаза – 8 см від лінії старту. Проявляють 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. На хроматограмі випробуваного розчину можуть проявлятися світло – коричнева та блакитна флуоресціюючі зони нижче зони, відповідно мангіферину на хроматограмі розчину порівняння. В. Проводять на пластинках ВЕТШХ із шаром силікагелю 5×10 см, розчин порівняння: кверцетин, ізокверцетин у метанолі. Рухома фаза: оцтова кислота Р – бутанол Р – вода Р – етилацетат Р (5:10:5:80). Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту. Проявляють 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. На хроматограмі випробуваного розчину можуть проявлятися блакитна флуоресціююча зона нижче зони, відповідно ізокверцетину та кверцетину на хроматограмі розчину порівняння.	ДФУ,1 вид.2.2.27
	Випробування:	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 8%	ДФУ, I вид., 2.2.32
Загальна зола	Не більше 10%	ДФУ, I вид., 2.4.16
Важкі метали	Не більше 100 ppm	ДФУ II вид. 2.2.102
Мікробіологічна кислота	У 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій у 1 г. Не допускається наявність Pseudomonas aeruginosa у 1 г. Не допускається наявність Staphylococcus aureus у 1 г.	ДФУ, I вид., 2.6.12, N; 2.6.13, N. Категорія 4 А, 5.1.4, N
	Кількісне визначення:	
Сума ксантонів	Спектрофотометричний метод. При аналітичній λ=369 нм у перерахунку на мангіферин. Питомий показник поглинання мангіферину при λ=369±2 нм рівний 295.Сума ксантонів у перерахунку на мангіферин має бути не менше 9,0%.	ДФУ,1 вид.2.2.25

Проект МКЯ «Півників угорських кореневищ екстракт сухий»

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Крупно- зернистий порошок коричневого кольору, запах ароматний, смак в'яжучий.	Візуальний
Розчинність	Розчинний у етанолі (70 % об/об), при нагріванні у воді Р.	Хімічний
	Ідентифікація:	
Метод ТШХ	А. Проводять на ТШХ – пластинках із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 5×10 см, розчин порівняння: 10 мг ононіну 10 мл етанолу Р.. Рухома фаза: оцтова кислота льодяна Р – бутанол Р (5:95). Відстань, що має пройти рухома фаза – 8 см від лінії старту. Висушують на повітрі протягом 30 хв, переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм. На хроматограмі випробованого розчину можуть проявлятися одна темно – коричнева флуоресціююча зона вище зони, відповідно ононіну на хроматограмі розчину порівняння. В. Проводять на пластинках ТШХ із шаром силікагелю 5×10 см, розчин порівняння: 10 мг нігрицин 10 мл етанолу Р. Рухома фаза: толуол Р – етилацетат Р – мурашина кислота Р – (5:4:1). Висушують на повітрі протягом 30 хв, переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм. На хроматограмі випробуваного розчину можуть проявлятися одна темно – коричнева флуоресціююча зона вище зони, відповідно нігрицину на хроматограмі розчину порівняння.	ДФУ,1 вид.2.2.27
	Випробування:	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 8%	ДФУ, I вид., 2.2.32
Загальна зола	Не більше 10%	ДФУ, I вид., 2.4.16
Важкі метали	Не більше 100 ppm	ДФУ II вид. 2.2.102
Мікробіологічна кислота	У 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій у 1 г. Не допускається наявність Pseudomonas aeruginosa у 1 г. Не допускається наявність Staphylococcus aureus у 1 г.	ДФУ, I вид., 2.6.12, N; 2.6.13, N. Категорія 4 А, 5.1.4, N
	Кількісне визначення:	
Сума ізофлавоноїдів	Спектрофотометричний метод. При аналітичній λ=260 нм у перерахунку на ононін. Питомий показник поглинання ононіну при λ=260±2 нм рівний 715.Сума ізофлавоноїдів у перерахунку на ононін має бути не менше 8,0%.	ДФУ,1 вид.2.2.25
Ксантони (мангіферин)	Метод ВЕРХ. Вміст мангіферину не менше 0,5 %	ДФУ,1 вид 2.2.29

Проект МКЯ «Півників угорських листя екстракт водний сухий»

Найменування показника	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Крупно-зернистий порошок темно- коричневого кольору, запах ароматний, смак в'яжучий.	Візуальний
Розчинність	Розчинний у воді Р, при нагріванні у етанолі.	Хімічний
	Ідентифікація:	
Метод ТШХ	А. Проводять на ТШХ – пластинках із шаром силікагелю F_{254} Р розміром 10×10 см, розчин порівняння: 10 мг мангіферину у 10 мл метанолу. Рухома фаза: оцтова кислота Р – мурашина кислота безводна Р – вода Р – етилацетат Р (11:11:27:100). Відстань, що має пройти рухома фаза – 8 см від лінії старту. Проявляють 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. На хроматограмі випробуваного розчину можуть проявлятися світло – коричнева та блакитна флуоресціюючі зони нижче зони, відповідно мангіферину на хроматограмі розчину порівняння.	ДФУ,1 вид.2.2.27
	Випробування:	
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 8%	ДФУ, I вид., 2.2.32
Загальна зола	Не більше 10%	ДФУ, I вид., 2.4.16
Важкі метали	Не більше 100 ppm	ДФУ II вид. 2.2.102
Мікробіологічна кислота	У 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій у 1 г. Не допускається наявність Pseudomonas aeruginosa у 1 г. Не допускається наявність Staphylococcus aureus у 1 г.	ДФУ, I вид., 2.6.12, N; 2.6.13, N. Категорія 4 А, 5.1.4, N
	Кількісне визначення:	
Сума ксантонів	Спектрофотометричний метод. При аналітичній λ=369 нм у перерахунку на мангіферин. Питомий показник поглинання мангіферину при λ=369±2 нм рівний 295.Сума ксантонів у перерахунку на мангіферин має бути не менше 9,0%.	ДФУ,1 вид.2.2.25

Вперше розроблено проекти МКЯ «Півників угорських листя екстракт сухий», «Півників угорських кореневища екстракт сухий», «Півників угорських листя екстракт водний сухий».

Інші об’єкти дослідження у даному науковому напрямку

***Crocus sativus* L.**

Saffron stigma samples (n)

Morocco (Taliouine) 2017
India (Uttar pradesh) 2016
India (Maharashtra) 2017
India (Kashmir) 2012
India (Mumbai) 2016
Azerbaijan (Absheron) 2016, 2017 (n =2)
Spain (La Manch) 2017
Australia (Tasmania) 2017
Iran (Khorasan) 2017
Ukraine (Kherson) 2016 (n=4)
Ukraine (Kherson) 2017 (n=12)

Saffron corms

Ukraine (Kherson) 2016
Ukraine (Kherson) 2017

Saffron leaves

Ukraine (Kherson) 2017
Azerbaijan (Absheron) 2017

Saffron petals

Ukraine (Kherson) 2017

Рослини роду Крокус Повний аналіз C. sativus. 10 зразків стигми з України; 10 зі світу. Попередній відбір 15 видів і сортів. Огляд літературних даних

Інші рослини з родини Ірисові: Iridodictyum reticulatum (n = 9), Juno bucharica (n = 1), гібриди гладіолусів (n = 4) Аналіз фенольних сполук, терпеноїдів, карбонових кислот, амінокислот.

Публікації:

Загальна кількість посилань на публікації авторів/ h-індекс роботи, згідно баз даних для Михайленко О.О. складає відповідно: Web of Science - 30/3, Scopus - 60/5, Google Shcolar - 169/8.

Статті - 43

Іноземні видання Scopus або Web of Science – 23 (+1 accepted)
Вітчизняні фахові видання – 20
Іноземні фахові видання – 11
Нефахові видання – 1

Тези доповідей - 89

Вітчизняні фахові видання – 58
Іноземні фахові видання – 31,
з них 6 – постерні презентації та 9 - доповіді

Патенти

Патенти на корисні моделі – 4
Патенти на винахід - 4
Заявки – 7

Інші публікації

Авторське свідоцтво на твір – 1
Інформаційні листи – 3
Проект монографії – 1
Акти впровадження – 8

Mykhailenko O., Kovalyov V., Goryacha O., Ivanauskas L., Georgiyants V. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus Crocus: A review. Phytochemistry. – 2019. - Vol. 162. – P. 56-89

Дякую за увагу!

Protect yourself from coronavirus

Запланована докторська дисертація: Стандартизація умов вирощування представників родини *Iridaceae* в Україні, їх хімічний склад та біологічна активність

Наук. консультант: проф. Георгіянц В.А.