

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,
докторант кафедри фармацевтичної хімії, доцент кафедри
фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету.**

ТОМ 1

Харків - 2021

Реферат роботи

Ми живемо у складний фінансово-економічний, соціальний час, коли людство зайнято вирішенням завдань виживання, вирішення проблем світової кризи. Крім того, останнім часом все частіше ми чуємо про проблеми з кліматом, глобальне потепління, забрудненням повітря, зникненням рослин і тварин, забруднення річок та про інші проблемами. Ці екологічні проблеми країни генеруються, як правило, інтенсивним і все наростаючим агресивним впливом людини на природу. А з бурхливим розвитком науково-технічного прогресу, впровадженням нових технологій, наслідки цього впливу менш передбачувані і більш катастрофічні. У якийсь момент необхідно зупинитися і звернути свою увагу на багатства нашої планети, нашої рідної землі. Україна одна з найбільш забезпечених сировинними ресурсами країна у світі. Територія країни і її континентальний шельф багаті різними видами корисних копалин, основними є нафта, газ, вугілля і ліс, а також родючий чорнозем. Флора і фауна України надзвичайно різноманітні. Рослинний світ нашої країни налічує до 16 тис. різновидів рослин.

За підрахунками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 85–90% населення світу споживає традиційні рослинні ліки, прямо чи опосередковано. Актуальність дослідження лікарської рослинної сировини зумовлюється трьома концепціями: по-перше, вторинні метаболіти (вони ж біологічно активні речовини) рослинного походження мають більшу спорідненість до людського організму, ніж синтетичні препарати, тому мають набагато меншу токсичну дію; по-друге, лікарські засоби рослинного походження за рахунок своєї м'якої та помірної дії можуть застосовуватися у лімітованих групах споживачів, серед яких літні люди, вагітні, діти, хворі із супутніми захворюваннями. Третя концепція включає в себе економічний фактор – лікарські засоби на рослинній основі мають меншу вартість, тому є доступними. Таким чином, дослідження лікарських рослин та створення

субстанції на їх основі є досить перспективним напрямом у сучасній фармацевтичній галузі.

Незважаючи на зростаючу популярність рослинних препаратів, також з'явилося багато звітів, що описують несприятливі наслідки для здоров'я через зміну якості, ефективності та вмісту рослинних продуктів, оскільки вони є класом фармацевтичних продуктів і повинні відповідати вимогам якості, безпеки та ефективності. Повідомлялося про фальсифікації токсичних сполук, забруднення патогенними мікробами або наявність природних токсинів, таких як афлатоксини у рослинних продуктах та рослинах. У зв'язку з цим ВООЗ розробила декілька настанов щодо проведення процедур стандартизації сирих рослинних продуктів для стандартизації певних рослинних продуктів.

Основна увага при розробці фармацевтичних продуктів полягає у забезпеченні отримання високоякісної продукції в кінці економічно ефективного процесу. Концепція Quality-by-Design (QbD), що заявлена в керівництві ICHQ8 «Фармацевтична розробка», зміщує фокус із забезпечення якості через тестування на контроль якості шляхом розуміння процесів, що призводить до дуже надійних процесів із високоякісною продукцією. Концепція QbD уже використовувалася та виявилася ефективною у багатьох різних галузях промисловості вже більше 40 років тому. У 2004 році Адміністрація США з питань харчових продуктів та медикаментів також представила у фармацевтичній та біотехнологічній галузях дану концепцію якості за проектом (QbD). Якість продукції також слід контролювати за допомогою відповідних процесів та операцій.

Ці вимоги були розроблені з метою підвищення безпеки пацієнтів за рахунок оптимальної якості ліків при більш ефективних виробничих процесах, що зменшує витрати на системи охорони здоров'я. Крім того, виробництво біопрепаратів включає мінливість вихідної сировини та складні багатоступеневі виробничі процеси у партійній роботі із змінними партіями – умовою, що стосується і лікарських рослин.

Використання суворого (фізико-хімічного) моделювання процесів у поєднанні з QbD призводить до високого ступеня розуміння процесу. Це пропонує, на відміну від поширених забобонів, велику користь для виробників, не докладаючи особливих зусиль під час розробки. Методичний підхід, заснований на QbD, застосовується для розробки процесу одержання лікарських субстанцій на основі сировини рослин роду Ірис із протівірусною, анаболічною, протизапальною, антибактеріальною дією.

Одним з критеріїв отримання якісної рослинної сировини є підбір належних умов вирощування рослин, які базуються на дослідження впливу екологічних факторів навколишнього середовища на накопичення біологічно активних речовин (далі – БАР) видами рослин. Визначення саме тих факторів, які у природніх умовах мають позитивний вплив на біосинтез первинних та вторинних метаболітів рослин. Саме вміст біологічно активних речовин визначає цінність лікарської сировини. Хімічний склад рослини, якість і кількість діючих речовин схильні до значних коливань і залежать від багатьох факторів. Одна і та ж рослина може містити різні хімічні сполуки в різних кліматичних і географічних зонах. Вміст біологічно активних речовин 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.

Одним із джерел БАР є рослини родини півників, роду Ірис. Завдяки чудовим лікувальним властивостям *Iris* spp. комерційний попит на рослину постійно на підйомі як на європейському, так і на світовому ринку. Півники мають давню історію свого медичного застосування у багатьох країнах світу, а також визнані багатими джерелами БАР, входять до складу 9 дієтичних добавок. Завдяки своїм декоративним якостям, півники широко розповсюджені майже на всіх континентах, а також на території України. Ареал роду *Iris* L. охоплює регіони з помірним і субтропічним кліматом. До флори України входять 15 видів півників: болотяні, злаколисті, угорські,

солелюбні, германські, сибірські, бліді, різнокольорові та інші. Також півники широко культивуються та селекціонуються, завдяки чому у світі виведено більше, ніж 35 тисяч сортів. Історично склалось, що вирощування *Iris germanica*, *Iris florentina*, *Iris pallida* та інших видів та заготівля кореневищ півників у якості ефіроолійної сировини в Україні було зосереджено тільки у АР Крим. У зв'язку із складною політичною ситуацією, заготівля півників для потреб косметичної та фармацевтичної галузі України останнім часом є обмеженою. Слід зазначити, що основним недоліком аграрного комплексу з вирощування ефіроолійних культур в Україні є його розміщення саме в одному регіоні, тому важливою проблемою є дослідження можливостей поширення цих культур на інші регіони країни. Крім того, різні види та сорти півників містять широкий спектр найцінніших речовин флавоноїдної природи, що проявляють широкий спектр біологічної активності – флавоноїди, ізофлавоноїди, ксантони, сапоніни, дубильні речовини, прості феноли. Отримані фітохімічні речовини можуть бути використані в косметиці, фармації, медицині і харчових добавках або використані в агропродовольчій промисловості, зокрема, в якості натуральних пігментів, антиоксидантів або протимікробних засобів. У зв'язку з тим, що кількість рослин, які акумулюють ізофлавоноїди та ксантони, досить обмежена, то дослідження сировини півників є актуальним.

Сировинна база півників в Україні є досить потужною, що робить можливим дослідження півників і як перспективної ефіроолійної сировини для розвитку косметичної та парфумерної індустрії у країні, та, крім того, дослідження біологічно активних речовин з різних видів сировини, стандартизація лікарської сировини та розробка нових вітчизняних фітосубстанцій для потреб фармацевтичної та медичної галузі. Слід зазначити, що науковий підхід, що буде включати комплексну переробку сировини півників, забезпечить прибуток для місцевої економіки. Таким чином, сировина півників є джерелом БАР, що обґрунтовує перспективність дослідження, а також розробку лікарських препаратів на її основі.

Сортові півники культивуються все місцево, що робить заготівлю і розмноження півників більш простим і контрольованим на усіх етапах вирощування. Хімічний склад культивованих півників схожий з дикорослими видами півників, є альтернативною сировиною для одержання біологічно активних речовин, але все ж потребує дослідження, що дозволить розширити сировинну базу для заготівлі.

До останнього часу дослідження щодо виявлення залежності вмісту фенольних сполук у рослин роду півники від умов навколишнього середовища не проводились. Більше того, не було виявлено даних літератури про подібні дослідження в межах усього ареалу розповсюдження видів, їх біологічно активних речовин і методів аналізу розвитку.

Нами за мету було поставлено дослідити вплив екологічних факторів (тип та склад ґрунту, кліматичні дані, географічне розповсюдження, тощо) на біосинтез основних БАР у листях та кореневищах різних видів та сортів півників, провести фітохімічний аналіз і відбір найбільш перспективних видів і сортів. Крім того, наша увага була приділена вивченню впливу елементів мінерального живлення на вміст БАР у сировині півників. В значній мірі це пояснюється тим, що застосування мінеральних добрив як засобу впливу на утворення та накопичення біологічно активних речовин найбільш доступно і легко реалізується в польових умовах. Об'єктами дослідження були більше ніж 30 видів та сортів лікарських (ароматичних) рослин з роду півників, заготовлені в Україні, Литві, Латвії.

Дослідження лікарської рослинної сировини включало фармакогностичний аналіз, морфо-анатомічні дослідження, хімічного аналіз відбитки пальців різних екстрактивних речовин з використанням сучасних екстракторів, хроматографічні та спектроскопічні методи, фітохімічний скринінг, кількісний аналіз БАР і стандартизація з особливим наголосом на маркерні сполуки в рослинних видах і їх відбитки пальців та аналіз сучасних перспектив даних рослин.

Крім рослин роду Ірис, дослідження впливу екологічних факторів проводять для рослин роду Крокус, Гладіолус, що також входять до родини Ірисові.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше за допомогою ТШХ, ПХ, ВЕТШХ та ВЕРХ у досліджуваній сировині півників було ідентифіковано сполуки ксантонової природи, похідні гідроксикоричної кислоти, флавоноїди, ізофлавоноїди, амінокислоти.

Методом ГХ у кореневищі півників угорських встановили вміст вільних амінокислот, що склав 6,25 %. Методом спектрофотометрії у листі та кореневищі півників угорських та сортових півників встановлено вміст основних груп БАР – флавоноїдів, ізофлавоноїдів, гідроксикоричних кислот, ксантонів. Встановлено, що в листях півників у більшій кількості накопичуються гідроксикоричні кислоти (1,14-4,2 %) та ксантони (0,33-2,47 %), вміст флавоноїдів у листі та кореневищі півників знаходиться в середніх значеннях 1,04-3,55 %. Вміст ізофлавоноїдів, в середньому, вищий у кореневищі півників та складає від 1,07 до 3,15 %. Вперше проведено дослідження вмісту основних груп БАР в листі та кореневищі півників угорських з різних місць зростання на території України.

Методом ВЕРХ у кореневищі півників угорських ідентифіковано 7 сполук: мангіферин, текторидін, нігрицин-4'-O- β -D-глюкопіранозид, іристекторигенін В, нігріцин, іригенін, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонол; у листі півників угорських – хлорогенова кислота і мангіферин, встановлено їх вміст. Вперше методом ВЕТШХ встановили вміст ксантонового глікозиду мангіферину у листях та кореневищах півників угорських, який склав 4,85 % і 2,47 % відповідно.

Вперше хромато-мас-спектрометричним методом у листі та кореневищі півників угорських та сортових півників досліджено компонентний склад ефірної олії – вихід ефірної олії коливався від 0,1 до 0,3%.

Вперше встановлено мінеральний склад сировини півників угорських та сортових півників: за кількісним вмістом елементів домінує калій (К), кальцій

(Ca) і магній (Mg), більша кількість яких накопичуються у листі півників. Такі елементи як залізо (Fe), алюміній (Al), натрій (Na), стронцій (Sr), цинк (Zn) та кремній (Si) мають більший вміст у кореневищі півників. Важкі метали містяться у допустимих межах.

Вперше за допомогою методу колонкової хроматографії з кореневищ півників угорських було виділено 18 речовин, структуру яких встановлено з використанням спектральних методів аналізу (УФ-, ІЧ- спектрофотометрія, Н¹ЯМР-спектроскопія). Серед ідентифікованих речовин ксантони – мангіферин, ізомангіферин, ізофлавоноїди – нігріцин, іригенін, текторидин, текторигенін, геністеїн, даїдзеїн, ононін, формонетин, гідроксикоричні кислоти – хлорогенова, неохлорогенова, кавова, ферулова кислоти, флавоноїди – кверцетин, апігенін, ембінін, гіперозид.

Розроблено технологію одержання біологічно активних речовин у вигляді сухого екстракту з листя та кореневищ півників угорських.

Експериментальні дослідження фармакологічної активності проводились згідно вимог комісії з біоетики та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей». Встановлено, що екстракти проявляють антигерпетичну, анаболічну, протизапальну активність у дозі 150 мг/кг.

Вперше встановлено основні морфолого-анатомічні діагностичні ознаки сировини півників угорських, розроблені проекти методик контролю якості сировини півників угорських та сухих екстрактів.

Фактори зовнішнього середовища можуть впливати на склад первинних та вторинних метаболітів у рослинах. У цьому дослідженні ми дослідили вплив факторів зовнішнього середовища на вміст фенольних сполук у кореневищах чотирьох видів ірисів із 16 популяцій Латвії, Литви та України. Це дослідження показало, що *Iris germanica* накопичує різноманітніші фенольні сполуки, і їх кількість, як правило, вища, ніж у інших досліджуваних видів. Аналіз метеорологічних умов виявив позитивний вплив тривалості

сонячного проміння та негативний вплив кількості річних опадів на кількість фенольних сполук у кореневищах видів ірисів. Вміст фосфору та калію суттєво позитивно впливає на кількість фенольних сполук, тоді як вміст азоту в ґрунті не має значного впливу на накопичення аналізованих речовин. Серед географічних факторів найбільш значущим позитивним впливом на вміст фенольних сполук було встановлено висоту місцевості.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено проекти МКЯ «Півників угорських листя», «Півників угорських кореневища», «Півників угорських листя екстракт сухий», «Півників угорських кореневища екстракт сухий», «Півників угорських листя екстракт водний сухий», що може бути використано для впровадження у промислове виробництво.

Вперше розроблений новий метод виділення мангіферину з листя півників угорських (заявки на винахід а 2019 10508; патент на корисну модель № 135620 Україна МПК (2018.01): А61К 36/88, А61К 127/00. Спосіб одержання засобу з антигерпетичною, антиоксидантною та антимікробною активністю з листя півників угорських). Проведений аналіз протівірусних фітопрепаратів, свідчить, що даний сегмент ринку України є незаповненим. Таким чином, актуальність пошуку та розробки нового протигерпетичного препарату на основі рослин роду *Iris* є обґрунтованою. Серед світових аналогів можна назвати – ацикловір, алпізарин, що також є рослинними протигерпетичними засобами.

Результати досліджень щодо оптимальних умов культивування та заготівлі півників викладено у інформаційних листах. Матеріали роботи впроваджені у навчальний процес кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акти впровадження від 13.01.2020, 6.01.2020).

Результати роботи були представлені на конференціях. Результати

наукової роботи та обраного наукового напрямку досліджень викладено та обговорено на більш ніж 60 наукових конгресах і конференціях, серед них «Sciences and Practice» на базі Литовського університету наук про здоров'я (Lithuanian University of Health Sciences) у Каунасі, Литовська Республіка (2015, 2017, 2018, 2019, 2020 pp.); у 35th симпозиумі натуральних продуктів у Тайпеї Medical University of Graduate Institute of Pharmacognosy (Тайвань, 2020); у конференції “Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” на базі Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (2020); у віртуальній постерній сесії у конференції «EFMC-ISMC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session» у Бельгії (2020); у конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» на базі кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету (2020); у IX Міжнародній науково-практичній конференції «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике», посвященной памяти профессора Кияшева Даулеткелды Каримовича, в рамках «90-летия Казахского Национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан (2020); XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Students «Topical issues of new drugs development» (10-12.04.2019, Kharkiv, Ukraine), «Актуальні питання біології та медицини» (25.05.2018, м. Старобільськ, Україна); «Relevant issues of modern medicine: the experience of Poland and Ukraine» (20.10.2017-21.10.2017, Lublin, Republic of Poland), «Phytopharm 2013» (8-10.07.2013, Vienna, Austria), «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (19-20.04.2017, Витебск, Республика Беларусь); «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (Казахстан, 2017), «IV International Scientific Conference of Young Researchers» (Азербайджан, 29-30.04.2016), «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации» (Узбекистан, 2016), «Honors high school – 2010» (Болгарія, 17-25.11.2010), «Achievements and prospects for the development of phytochemistry : International research and practice conference» (Караганда, 10-11.04.2015), «Внедрение достижений медицинской науки в клиническую

практику» (Таджикистан, 24.05.2015), «Фармація Казахстан» (Казахстан, 2009), та крім того конференції в Україні: «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (2007-2019) та інші.

За загальним напрямком наукової роботи опубліковано більше 160 робіт, серед них 23 наукові статі включені до наукометричних баз Scopus та Web of Science; статей у провідних фахових виданнях України – 20; у міжнародних виданнях – 11 статей; патенти – 7 (подано 8 заявок); монографій – 1; інформаційні листи – 3, авторське свідотство – 1. Згідно бази даних Scopus, *h-index* становить 5. За тематикою роботи автором захищено магістерську роботу, кандидатську дисертацію та проводиться робота над докторською дисертацією. Таким чином, отримані результати, вдосконалені підходи до аналізу вмісту БАР, новий розроблений спосіб отримання ксантону мангіферину з протигерпетичною активністю, можуть бути використані та впроваджені у фармацевтичне виробництво; визначення факторів впливу на вміст речовин, що забезпечать належне вирощування лікарських рослин, отримання нової стандартизованої сировини із визначеним складом може істотно вдосконалити шляхи отримання виробничої сировини, технологічні рішення, завершені випробування, розробки, можуть бути впроваджені в суспільну практику.

Доцент кафедр фармацевтичної хімії
Національного фармацевтичного університет,
кандидат фармацевтичних наук

Михайленко О.О.