

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Шпичак Аліна Олегівна

УДК 615.322:582.29:615.07

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фармакогностичне дослідження вітчизняної сировини
представників роду Цетрарія**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ А. О. Шпичак

Науковий керівник Хворост Ольга Павлівна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Харків – 2024

АНОТАЦІЯ

Шпичак А.О. Фармакогностичне дослідження вітчизняної сировини представників роду Цетрарія. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2024.

Дисертаційна робота присвячена системному фармакогностичному вивченню сировини представників роду цетрарія, зокрема серій сланей *C. islandica*, отриманню та стандартизації лікарського засобу на їх основі.

Першим етапом роботи було вивчення морфолого-анатомічної будови серій сланей *C. islandica* та *C. aculeata* вітчизняної заготівлі. Встановлено морфометричні параметри 7 серій сланей *C. islandica*, у тому числі у кожній із серій визначено фракційний склад за розмірами сланей з відсотковим співвідношенням фракцій. У більшості серій переважав вміст сланей довжиною 3-4 см: серія 1 ($31,6 \pm 0,8 \%$); серія 3 ($30,5 \pm 1,3 \%$); 5 серія ($33,0 \pm 0,7 \%$); серія 7 ($27,8 \pm 1,2 \%$).

Вперше диференційовано частку мінеральних та органічних домішок у серіях сировини, що може доповнити монографію ДФУ 2.0 «Цетрарія ісландська». Вміст мінеральних домішок становив від $0,22 \pm 0,01 \%$ до $2,80 \pm 0,12 \%$. Вміст органічних домішок – від $0,15 \pm 0,01 \%$ до $2,14 \pm 0,11 \%$. Загальний вміст сторонніх домішок у серіях не перевищував 5% , регламентовані монографією ДФУ 2.0.

Досліджено морфологічну та анатомічну будову 7 серій сланей *C. islandica*. Встановлено відповідність опису серій сланей *C. islandica* вимогам розділів «Ідентифікація А» та «Ідентифікація В» монографії «Цетрарія ісландська» ДФУ 2.0. Вперше визначено такі діагностичні особливості морфологічної будови, як: зростання лопатей за допомогою перетинок і розгалуженість війок по краю лопатей. Отримані дані можуть

доповнити розділ «Ідентифікація А» монографії ДФУ 2.0 «Цетрарія ісландська».

Проведено товарознавчий аналіз серій сланей *C. islandica*: домішки, втрата в масі при висушуванні, вміст загальної золи.

За допомогою високоефективної рідинної (ВЕРХ), газової хроматографії (ГХ), хромато-мас-спектрометрії (ГХ/МС), атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС), ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопії було встановлено наявність у сланях *C. islandica* низки груп біологічно активних речовин (БАР): амінокислот, вуглеводів, жирних кислот, сполук, що переганялися з водяною парою, флавоноїдів, карбонових кислот, макро-, мікро- та ультрамікроелементів.

У досліджуваній сировині *C. islandica* ідентифіковано не менше 72 БАР, серед яких: 7 амінокислот, 8 моносахаридів, 6 жирних кислот, 24 сполуки, що переганялися з водяною парою, 4 флавоноїди, 3 карбонові кислоти, 1 лишайникова кислота, 19 мінеральних речовин.

Методом ВЕРХ встановлено компонентний амінокислотний склад сланей *C. islandica*. У досліджуваній сировині було визначено наявність щонайменше 7 АК, з яких 5 належать до замінних (аспарагінова кислота, глутамінова кислота, серин, аргінін та аланін) та 2 – до незамінних (треонін і валін). Кількісний вміст суми вільних замінних АК у сировині становив 698 ± 22 мкг/г, зв'язаних – 2457 ± 67 мкг/г. Кількісний вміст суми вільних незамінних АК становив 98 ± 4 мкг/г, зв'язаних – 826 ± 27 мкг/г. Загальний кількісний вміст суми вільних АК у сировині *C. islandica* становив 796 ± 26 мкг/г, суми зв'язаних АК – 3283 ± 94 мкг/г.

Методом ВЕРХ встановлено компонентний склад вільних та загальних вуглеводів сланей *C. islandica*. Було ідентифіковано у вільному стані багатоатомні спирти *D*-персеїтол, вміст якого становив $6,99 \pm 0,29$ мг/г, та *D*-манітол, вміст якого становив $1,12 \pm 0,05$ мг/г. Із зв'язаних вуглеводів виявлено 7 сполук, з яких 5 належали до моносахаридів, 2 – до багатоатомних спиртів. Серед моносахаридів домінувала *D*-глюкоза – $203,64 \pm 8,96$ мг/г. Також

встановлено високий вміст *D*-манози – $53,74 \pm 2,57$ мг/г і *D*-галактози – $51,71 \pm 2,40$ мг/г. Значно менший вміст спостерігається для *D*-ксилози – $0,83 \pm 0,03$ мг/г і *L*-рамнози – $0,53 \pm 0,02$ мг/г. Виявлено, що кількісний вміст багатоатомного спирту *D*-дульциту (*D*-галактитолу) становив $8,46 \pm 0,39$ мг/г, *D*-манітолу – $3,10 \pm 0,14$ мг/г.

Визначення компонентного складу ЖК у сланях *C. islandica* проводили методом ГХ/МС. Ідентифіковано 6 ЖК, з яких 3 належали до насичених, 3 – до ненасичених. Серед насичених були виявлені ейкозанова (арахінова), пентадеканова (пентадецилова) та октадеканова (стеаринова) кислоти. Серед ЖК, що належать до ненасичених ідентифіковані лінолева, елаїдинова та олеїнова. Кількісний вміст кожної з виявлених ЖК коливався незначно і становив від $1,57 \pm 0,02$ мг/г (арахінова кислота) до $1,95 \pm 0,03$ мг/г (лінолева кислота). Загальний вміст суми ЖК становив $11,10 \pm 0,15$ мг/г. Вміст суми ненасичених ЖК становив $5,66 \pm 0,08$ мг/г і незначно перевищував вміст суми насичених ($5,44 \pm 0,07$ мг/г). Дані щодо кількісного вмісту насичених арахінової, пентадецилової, стеаринової та ненасичених лінолевої, елаїдинової та олеїнової ЖК у сировині *C. islandica*, імовірно, наводяться нами вперше.

Визначено кількісний вміст аскорбінової кислоти (монографія «Шипшина» ДФУ 2.0) у серіях сланей *C. islandica* та у сланях *C. aculeata*. Встановлено нижній рівень вмісту – не нижче 15 мг%. В сланях *C. aculeata* вміст аскорбінової кислоти був нижче в 1,6-1,8 рази та дорівнював $9,67 \pm 0,42$ мг%.

За допомогою ГХ/МС визначено та проаналізовано компонентний склад сполук, що переганялися з водяною парою, сланей *C. islandica*. Загалом ідентифіковано 24 сполуки, серед яких терпеноїди та їх похідні, ациклічні насичені вуглеводні, дієнові вуглеводні, ЖК, естери. Значну частину ідентифікованих речовин складали терпеноїди, що були представлені 10 сполуками та складали $23,57 \pm 0,97$ % від загального кількісного вмісту сполук, що переганялися з водяною парою. Серед них виявлено 3

моноциклічні монотерпеноїди (*cis*-ментон, *trans*-ментон, ментол), біциклічний монотерпеноїд *trans*-каран та 6 сесквітерпеноїдів (каріофілен, β -кубебен, γ -муролен, δ -аморфен, сесквітерпеновий кетон меюрон, гексагідрофарнезилацетон). У сировині було виявлено 6 ациклічних насичених вуглеводнів ($10,99 \pm 0,45$ % від суми сполук): гентріаконтан, 10-метилнонадекан, триаконтан, пентакозан, ейкозан, 3-метил-генейкозан, серед яких за кількісним вмістом домінував ейкозан ($3,99 \pm 0,15$ % від суми сполук). Серед виявлених сполук найвищий кількісний вміст спостерігався для поліненасиченої ω -6 жирної октадекадієнової (лінолевої) кислоти – $20,08 \pm 0,67$ %, насиченої *n*-гексадеканової (пальмітинової) кислоти – $19,21 \pm 0,77$ % та 9,17-октадекадієнового альдегіду – $18,57 \pm 0,56$ % від суми сполук, що переганялися з водяною парою

Встановлено компонентний склад флавоноїдів у сланях *C. islandica* методом ВЕРХ. Нами знайдено не менш 4 сполук флавоноїдної природи, з яких 1 флавоновий аглікон, 2 флавонолових аглікони та один глікозид флавонолу кверцетину. Вперше для сланей *C. islandica* встановлено наявність агліконів лютеоліну ($290,08 \pm 3,89$ мкг/г), кемпферолу ($942,55 \pm 15,27$ мкг/г), кверцетину ($37,15 \pm 1,20$ мкг/г), а також похідного кверцетину – біозиду рутину ($62,49 \pm 1,98$ мкг/г).

Визначено кількісний вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол (ДФУ 2.0) у 7 серіях сланей *C. islandica*. Нижня межа вмісту цієї групи БАР дорівнювала 1,2 %. Кількісний вміст суми поліфенолів у сланях *C. aculeata* дорівнював $0,84 \pm 0,04$ %.

Проведено визначення кількісного вмісту флавоноїдів у серіях сланей *C. islandica* (монографія «Сафлору квітки» ДФУ 2.0) з встановленням нижньої межі, що дорівнювала 0,5 %. Вміст сполук цієї групи у сланях *C. aculeata* дорівнював $0,26 \pm 0,01$ %.

Визначення компонентного складу карбонових кислот у сланях *C. islandica* проводили за допомогою методу ВЕРХ. У сировині було знайдено 3 карбонові кислоти. Вперше у сировині *C. islandica* встановлено наявність

гідроксикоричної синапової кислоти ($3,38 \pm 0,06$ мкг/г), ароматичної ненасиченої карбонової кислоти з групи фенілпропаноїдів – *trans*-цинамової кислоти ($2,74 \pm 0,07$ мкг/г), та одноосновної полігідроксикарбонової хінної кислоти ($6,95 \pm 0,19$ мкг/г).

Проведено визначення кількісного вмісту суми органічних кислот в перерахунку на яблучну кислоту у 7 серіях сланей *C. islandica* (монографія «Шипшини плоди» ДФУ 2.0). Кількісний вміст цієї групи БАР становив не менше 2,8 %. У сланях *C. aculeata* цей показник був значно нижче (в 1,3-1,7 рази) та дорівнював $2,18 \pm 0,10$ %.

Зі сланей *C. islandica* виділено сполуку в індивідуальному стані. Для з'ясування структури отриманої речовини використовували методи хромато-мас-спектрометрії, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопії. Хромато-мас-спектрометричне дослідження показало наявність хроматографічного піку ($\text{RT}=1,147$), що характерно для фумаропротоцетрарової кислоти, мас-спектр якої містить пік молекулярного йону 472,0 (відносна інтенсивність 20 %) та фрагментарні йони 471,2 (60 %), 355,0 (100 %), 356,0 (15 %). Спектральні дані ^1H для виділеної сполуки: ^1H ЯМР (500 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,95 (синглет, 1H, COOH); 10,57 (синглет, 1H, CHO); 6,84 (синглет, 1H); 6,64 (дублет, $J=2,4$ Гц, 2CH=); 5,30 (синглет, 2H, CH_2); 2,44 (синглет, 3H, CH_3); 2,42 (синглет, 3H, CH_3). Спектральні дані ^{13}C для виділеної сполуки: ^{13}C ЯМР (126 МГц, CDCl_3) δ 192,03 (C_{19}); 170,59 (C_{23}); 166,00 (C_{33}); 165,01 (C_{29}); 164,40 (C_2); 164,38 (C_4); 161,28 (C_{11}); 155,78 (C_{15}); 152,51 (C_6); 146,00 (C_9); 142,57 (C_8); 135,44 (C_{32}); 132,59 (C_{30}); 132,37 (C_{13}); 117,66 (C_1); 117,08 (C_{14}); 113,73 (C_{16}); 112,54 (C_3); 112,41 (C_5); 57,17 (C_{27}); 21,68 (C_{17}); 15,07 (C_{22}). Характеристичними були сигнали протонів карбоксильної (23, 33), альдегідної груп (19) та сигнал олефінових протонів фрагменту фумарової кислоти (30, 32). Таким чином, виділена зі сланей *C. islandica* сполука – це фумаропротоцетрарова кислота.

Визначено вміст загальної золи у 7 серіях сланей *C. islandica* вітчизняної заготівлі коливався від $0,61 \pm 0,02$ % (серія 5) до $1,43 \pm 0,05$ % (серія 4), що не перевищувало регламентовані монографією ДФУ 2.0 на сировину 3 %.

Визначено елементний склад 7 серій сланей *C. islandica*. У серіях сировини було виявлено наявність щонайменше 19 макро-, мікро-, та ультрамікроелементів. Вміст калію був найвищим з макроелементів в сировині усіх серій та коливався від 190 мг/100 г (серія 6) до 325 мг/100 г (серія 7). Досить високим був вміст кальцію – від 37 мг/100 г (серія 6) до 86 мг/100 г (серія 4). Вміст силіцію коливався від 30 мг/100 г (серія 1) до 115 мг/100 г (серія 4). Порівняно з іншими мікроелементами значну частку займали цинк – від 5,4 мг/100 г (серія 7) до 28,6 мг/100 г (серія 4) та алюміній – від 4,6 мг/100 г (серія 6) до 12,2 мг/100 г (серія 5).

У всіх серіях сировини кількісний вміст молібдену та кобальту становив менше 0,03 мг/100 г, вміст кадмію, астату та гідраргіруму – менше 0,01 мг/100 г. Кількісний вміст ніколу не перевищував 0,128 мг/100 г.

Вміст важких металів знаходився в межах гранично допустимих норм для ЛРС згідно з вимогами ДФУ 2.0.

Встановлено технологічні параметри сланей *C. islandica*: питому масу, об'ємну та насипну густину, пористистість та нарізність сировини, вільний об'єм шару, коефіцієнти поглинання екстрагентів (води очищеної, 10 % етанолу, 20 % етанолу, 30 % етанолу, 40 % етанолу, 50 % етанолу, 60 % етанолу, 70 % етанолу, 80 % етанолу, 90 % етанолу та 96 % етанолу), показник набухання.

Для розробки технології отримання екстракту густого сланей *C. islandica* визначено динаміку вилучення екстрактивних речовин та суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол при використанні ряду екстрагентів (вода очищена, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % та 96 % етанол). Для отриманих витяжок зі сланей *C. islandica* проведено скринінг антирадикальної активності *in vitro*.

Встановлено, що оптимальну екстракцію суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол із сировини забезпечує 70 % етанол. Визначено оптимальні параметри технологічного процесу отримання екстракту густого зі сланей *C. islandica*. Оптимальний екстрагент – 70 % етанолу, загальне

співвідношення сировина-екстрагент 1:10, кратність зливів – 2, час однієї операції – 12 год, температура процесу – 20 ± 2 °С. Критеріями оцінки обрано вихід екстрактивних речовин та вихід суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол. На основі проведеної роботи розроблено технологію отримання екстракту густого зі сланей *C. islandica*, вихід субстанції у перерахунку на повітряно-суху сировину становив 19,5 %.

Для екстракту густого зі сланей *C. islandica* обрано параметри стандартизації: опис, розчинність, втрата в масі при висушуванні, важкі метали (відповідає зазначеним нормам), мікробіологічна чистота, кількісний вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол (становив не менше 4,0 %).

Для отриманого екстракту густого зі сланей *C. islandica* встановлено антимікробну активність *in vitro* методом дифузії в агар у концентрації 1 %, 5 % та 10 % (розчинник 70 % етанол). Як референс-препарат було використано обраний для отримання екстракту густого екстрагент – 70 % етанол. Отриманий екстракт густий у розчинах з концентрацією 10 % та 5 % здатний пригнічувати ріст практично усіх використаних в експерименті штамів мікроорганізмів (крім *P. vulgaris*). Отримана субстанція є ефективною у концентрації розчину 1 % лише по відношенню до штамів мікроорганізмів *S. aureus*, *B. subtilis* та *C. albicans*. Найбільш прийнятну затримку зон росту досліджуваних штамів було відзначено при використанні 10 % розчину екстракту густого зі сланей *C. islandica*. Найбільш вразливими до дії досліджуваного екстракту густого у цій концентрації є штами *S. aureus*, *S. pyogenes* та *P. aeruginosa*, зона затримки росту яких становила понад 22 мм. Дослідами *in vitro* по відношенню до іону DPPH встановлено антиоксидантну дію субстанції.

Новизна досліджень підтверджена заявками на патент України на корисну модель «Спосіб одержання лікарського засобу у формі пластиру протизапальної, антимікробної, антиоксидантної дії» (№ заявки а202304172, заявл. 04.09.2023) та патент України на винахід «Фармацевтична композиція

протизапальної, протиалергійної та імуномодулювальної дії» (№ заявки u202304173, заявл. 04.09.2023).

Проведені системні фармакогностичні дослідження стали підґрунтям для розробки проєкту МКЯ «Цетрарії ісландської сланей екстракт густий». Результати дослідження хімічного складу та анатомічної будови серій сланей *C. islandica* впроваджено у науково-дослідну роботу споріднених кафедр закладів вищої освіти України.

Ключові слова: *C. islandica*, *C. aculeata*, слані, фармакогностичне вивчення, густий екстракт, антимікробна активність, антиоксидантна активність.

Список публікацій здобувача

1. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of the elemental and amino acid composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli batches harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 3(20). P. 31-39. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.262369> (*Особистий внесок здобувача* – проведено аналіз літературних джерел, участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

2. Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 5(39). P. 4-15. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.265019> (*Особистий внесок здобувача* – заготовлено сировину, проведено інформаційний пошук, участь у плануванні та проведенні експерименту, в обговоренні, узагальненні результатів дослідження та підготовці статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога у плануванні експерименту, узагальненні результатів досліджень, формулюванні висновків).

3. Shpychak A. O., Khvorost, O. P. The study of the carbohydrate composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20(4). P. 21-26. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.267653%20> (Особистий внесок здобувача – проведено інформаційний пошук, пробопідготовку, участь у аналізі та узагальненні результатів дослідження та підготовці статті до друку; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

4. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of fatty acid composition of the raw material of *Cetraria islandica* (L.) Ach, harvested in Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2023. Vol. 2. P. 59 – 63. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8046195> (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, пробопідготовку, брала участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

5. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.299297> (Особистий внесок здобувача – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

6. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The prospects for the use of raw materials of domestic lichen species as medicinal. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали IV міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 26-27 листопада 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 23.

7. Шпичак А. О., Хворост О. П. Порівняльна еколого-морфологічна характеристика *Cetraria aculeata* та *Cetraria islandica*. *Сучасні досягнення*

фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження : матеріали III міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 2 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 194.

8. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення товарознавчих показників якості серій сланей Цетрарії ісландської. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вересня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 266–267.

9. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення технологічних параметрів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 168–169.

10. Шпичак А. О., Хворост О. П. *Cetraria islandica* (L.) Ach. як джерело лікарських засобів актуальної спрямованості дії. *Youth pharmacy science* : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 грудня 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 53 – 54.

11. Шпичак А. О., Хворост О. П. Вивчення антирадикальної активності отриманих за допомогою різних екстрагентів екстрактів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 178.

12. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The dynamics of extraction of total polyphenols by different extractants from *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity* : abstract book of the 1st International Conference, Kaunas, 21st of April 2023. Kaunas, Pharmacognosy Club, Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences. 2023. P. 37.

13. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.

14. Шпичак А. О., Хворост О. П. Динаміка вилучення екстрактивних речовин з сировини *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовленої в Україні, при використанні різних екстрагентів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10-11 травня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 188.

15. Шпичак А. О., Хворост О. П. Дослідження хімічного складу сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* : тези доповідей всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р. Одеса : ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 119 – 121.

16. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти у серіях сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали VI міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 12 квітня 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 195.

ANNOTATION

Shpychak A.O. Pharmacognostic study of the Ukrainian raw material of the representatives of the genus *Cetraria*. – Qualification scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 – Pharmacy, Industrial Pharmacy (22 – Health Care) – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2024.

The dissertation work is devoted to the systematic pharmacognostic study of the raw material of the representatives of the genus *Cetraria*, particularly, the *C. islandica* thalli batches, harvested in Ukraine, the preparation and standardization of the medicinal product based on it.

The first stage of the work was the study of the morphological and anatomical structure of the *C. islandica* and *C. aculeata* thalli batches, harvested in Ukraine. The morphometric parameters of the 7 *C. islandica* thalli batches were determined, including the fractional composition according to the size of thalli in each batch with the percentage of fractions. In the composition of most batches, the content of 3-4 cm long thalli dominated: batch 1 ($31.6 \pm 0.8 \%$); batch 3 ($30.5 \pm 1.3 \%$); batch 5 ($33.0 \pm 0.7 \%$); batch 7 ($27.8 \pm 1.2 \%$).

For the first time, fractions of the mineral and organic foreign matter content in the batches of the raw material were separated, which can supplement the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) 2.0 monograph "*Cetraria islandica*". The mineral foreign matter content ranged from $0.22 \pm 0.01 \%$ to $2.80 \pm 0.12 \%$. The organic foreign matter content ranged from $0.15 \pm 0.01 \%$ to $2.14 \pm 0.11 \%$. The total content of the foreign matter in the batches did not exceed 5 %, regulated by the SPhU 2.0 monograph.

The morphological and anatomical structure of the 7 batches of *C. islandica* thalli was studied. The accordance of description of the *C. islandica* thalli batches to the requirements of the sections "Identification A" and "Identification B" of the SPhU 2.0 monograph "*Cetraria islandica*" was shown. For the first time, such diagnostic features of the morphological structure were determined: coalescence of blades with forming a membrane and branching of cilia along the edge of the blades. The obtained data can supplement the "Identification A" section of the SPhU 2.0 monograph "*Cetraria islandica*".

Commodity analysis of the *C. islandica* thalli batches was carried out: foreign matter content and weight loss during drying.

Using high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), chromatography-mass spectrometry (GC/MS), atomic

absorption spectrometry (AAS), ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, the presence of biologically active substances (BAS) groups in the thalli of *C. islandica* was determined: amino acids, carbohydrates, fatty acids, compounds distilled with water vapor, flavonoids, carboxylic acids, macro-, trace, and ultra-trace elements.

At least 72 BAS were identified in the studied raw material of *C. islandica*, including 7 amino acids, 8 monosaccharides, 6 fatty acids, 24 compounds distilled with water vapor, 4 flavonoids, 3 carboxylic acids, 1 lichenic acid, and 19 minerals.

The component amino acid composition of the *C. islandica* thalli was determined by the HPLC method. The presence of at least 7 amino acids was determined in the raw material studied, 5 of them were nonessential (aspartic acid, glutamic acid, serine, arginine and alanine) and 2 acids were essential (threonine and valine). The quantitative content of the total amount of free nonessential amino acids in the raw material was $698 \pm 22 \mu\text{g/g}$, the bound ones – $2457 \pm 67 \mu\text{g/g}$. The quantitative content of the total amount of free essential amino acids was $98 \pm 4 \mu\text{g/g}$, the bound ones – $826 \pm 27 \mu\text{g/g}$. The total quantitative content of the total amount of free amino acids in the raw material of *C. islandica* was $796 \pm 26 \mu\text{g/g}$, the total amount of bound amino acids was $3283 \pm 94 \mu\text{g/g}$.

The component composition of free and total carbohydrates in the raw material of *C. islandica* was determined by the HPLC method. *D*-perseitol, which quantitative content was $6.99 \pm 0.29 \text{ mg/g}$, and *D*-mannitol, which quantitative content was $1.12 \pm 0.05 \text{ mg/g}$, were identified in the free state. Among the bound carbohydrates, 7 compounds were identified, among them 5 belonged to monosaccharides, and 2 – to sugar alcohols. Among monosaccharides, *D*-glucose dominated – $203.64 \pm 8.96 \text{ mg/g}$. The content of *D*-mannose – $53.74 \pm 2.57 \text{ mg/g}$ and *D*-galactose – $51.71 \pm 2.40 \text{ mg/g}$ was also determined. Much lower content was observed for *D*-xylose – $0.83 \pm 0.03 \text{ mg/g}$ and *L*-rhamnose – $0.53 \pm 0.02 \text{ mg/g}$. The quantitative content of sugar alcohol *D*-dulcitol (*D*-galactitol) was $8.46 \pm 0.39 \text{ mg/g}$, *D*-mannitol – $3.10 \pm 0.14 \text{ mg/g}$.

The determination of the component composition of fatty acids in the *C. islandica* thalli was carried out by the GC/MS method. Six fatty acids were

identified, among them 3 belonged to saturated and 3 to unsaturated ones. Eicosanoic (arachidic), pentadecanoic (pentadecylic) and octadecanoic (stearic) acids were found among the saturated ones. Linoleic, elaidic, and oleic acids were identified among the unsaturated fatty acids. The quantitative content of identified fatty acids differed insignificantly and ranged from 1.57 ± 0.02 mg/g (arachidic acid) to 1.95 ± 0.03 mg/g (linoleic acid). The total quantitative content of fatty acids was 11.10 ± 0.15 mg/g. The content of the sum of unsaturated fatty acids was 5.66 ± 0.08 mg/g and slightly exceeded the content of the sum of saturated fatty acids (5.44 ± 0.07 mg/g). The data regarding the quantitative content of saturated arachidic, pentadecylic, stearic and unsaturated linoleic, elaidic and oleic fatty acids in the raw material of *C. islandica* were presumably given for the first time.

The quantitative content of ascorbic acid (SPhU 2.0 monograph "The Rosehip") in the *C. islandica* thalli batches and in the *C. aculeata* thalli was determined. The level of content was at least 15 mg%. In the *C. aculeata* thalli, the content of ascorbic acid was 1.6-1.8 times lower and equal to 9.67 ± 0.42 mg%.

Using the GC/MS method, the component composition of compounds distilled with water vapor in the *C. islandica* thalli was determined and analyzed. 24 compounds were identified, including terpenoids and their derivatives, acyclic saturated hydrocarbons, dienes, fatty acids, esters.

A significant part of the substances identified were terpenoids, represented by 10 compounds and made up 23.57 ± 0.97 % of the total quantitative content of compounds distilled with water vapor. Among them, 3 monocyclic monoterpenoids (*cis*-menthone, *trans*-menthone, menthol), bicyclic monoterpenoid *trans*-carane and 6 sesquiterpenoids (caryophyllene, β -cubebene, γ -muurolene, δ -amorphene, sesquiterpene ketone mayurone, hexahydrofarnesyl acetone) were found.

Six acyclic saturated hydrocarbons (10.99 ± 0.45 % of the total compounds) were found in the raw material, namely hentriacontane, 10-methyl-nonadecane, triacontane, pentacosane, eicosane, 3-methyl-heneicosane, among them eicosane (3.99 ± 0.15 % of the total compounds) dominated. Among the compounds detected, the highest quantitative content was observed for polyunsaturated ω -6 fatty

octadecadienoic (linoleic) acid – 20.08 ± 0.67 % of the total compounds, saturated *n*-hexadecanoic (palmitic) acid – 19.21 ± 0.77 % of the total compounds and 9,17-octadecadienal – 18.57 ± 0.56 % of the total compounds.

The component composition of flavonoids in the *C. islandica* thalli was determined by HPLC. At least 4 flavonoid compounds were found, namely one flavone aglycone, 2 flavonol aglycones and a glycoside of flavonol quercetin. For the first time for the *C. islandica* thalli, the presence of luteolin (290.08 ± 3.89 µg/g), kaempferol (942.55 ± 15.27 µg/g), and quercetin (37.15 ± 1.20 µg/g), quercetin derivative - rutin bioside (62.49 ± 1.98 µg/g) was determined.

The quantitative content of the total polyphenols in terms of pyrogallol (SPhU 2.0) in the 7 *C. islandica* thalli batches was determined. The lower limit of the quantitative content of this group of BAS was equal to 1.2 %. The quantitative content of the total polyphenols in *C. aculeata* thalli was equal to 0.84 ± 0.04 %.

The quantitative content of total flavonoids in the *C. islandica* thalli batches was determined (SPhU 2.0 monograph "Safflower flower") with the establishment of a lower limit equal to 0.5 %. The content of the compounds of this group in *C. aculeata* thalli was equal to 0.26 ± 0.01 %.

The determination of the component composition of carboxylic acids in the *C. islandica* thalli was carried out using the HPLC method. 3 carboxylic acids were found in the raw material. For the first time in the *C. islandica* raw material, hydroxycinnamic sinapic acid (3.38 ± 0.06 µg/g), aromatic unsaturated carboxylic acid from the group of phenylpropanoids - *trans*-cinnamic acid (2.74 ± 0.07 µg/g), and monobasic polyhydroxycarboxylic quinic acid (6.95 ± 0.19 µg/g) were found.

The quantitative content of the sum of organic acids in terms of malic acid in the 7 *C. islandica* thalli batches was determined (SPhU 2.0 monograph "Rose hips"). The quantitative content of this group of BAS was at least 2.8 %. In the *C. aculeata* thalli, this indicator was significantly lower (1.3-1.7 times) and equal to 2.18 ± 0.10 %.

A compound in an individual state was isolated from the thalli of *C. islandica*. Chromatography-mass spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy methods were

used to clarify the structure of the obtained substance. The chromatographic-mass spectrometric study showed the presence of a chromatographic peak ($RT=1.147$), which is characteristic for fumarprotocetraric acid, the mass spectrum of which contains the peak of the molecular ion 472.0 (relative intensity 20 %) and fragment ions 471.2 (60 %). 355.0 (100 %), 356.0 (15 %). 1H spectral data for the isolated compound: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (singlet, 1H, COOH); 10.57 (singlet, 1H, CHO); 6.84 (singlet, 1H); 6.64 (doublet, $J=2.4$ Hz, 2CH=); 5.30 (singlet, 2H, CH₂); 2.44 (singlet, 3H, CH₃); 2.42 (singlet, 3H, CH₃). ^{13}C spectral data for the isolated compound: ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 192.03 (C₁₉); 170.59 (C₂₃); 166.00 (C₃₃); 165.01 (C₂₉); 164.40 (C₂); 164.38 (C₄); 161.28 (C₁₁); 155.78 (C₁₅); 152.51 (C₆); 146.00 (C₉); 142.57 (C₈); 135.44 (C₃₂); 132.59 (C₃₀); 132.37 (C₁₃); 117.66 (C₁); 117.08 (C₁₄); 113.73 (C₁₆); 112.54 (C₃); 112.41 (C₅); 57.17 (C₂₇); 21.68 (C₁₇); 15.07 (C₂₂). The signals of protons of carboxylic (23, 33) and aldehyde groups (19) and the signal of olefinic protons of the fumaric acid fragment (30, 32) are characteristic. Therefore, the compound isolated from *C. islandica* is fumarprotocetraric acid.

The total ash content in the 7 *C. islandica* thalli batches, harvested in Ukraine, ranged from 0.61 ± 0.02 % (batch 5) to 1.43 ± 0.05 % (batch 4) and did not exceed 3 % specified in the monograph SPhU 2.0. The elemental composition of the 7 *C. islandica* thalli batches was determined. The presence of at least 19 macro-, trace, and ultra-trace elements was determined in the batches of the raw material. The potassium content was the highest among macronutrients in all batches of the raw material and ranged from 190 mg/100 g (batch 6) to 325 mg/100 g (batch 7). The calcium content was sufficiently high - from 37 mg/100 g (series 6) to 86 mg/100 g (series 4). The silicon content ranged from 30 mg/100 g (series 1) to 115 mg/100 g (series 4). Compared to other trace elements, a significant part was occupied by zinc – from 5.4 mg/100 g (batch 7) to 28.6 mg/100 g (batch 4) and aluminum - from 4.6 mg/100 g (batch 6) to 12.2 mg/100 g (batch 5). In all batches of the raw material, the quantitative content of molybdenum and cobalt was less than 0.03 mg/100 g, the

content of cadmium, astatine and mercury was less than 0.01 mg/100 g. The quantitative content of nickel did not exceed 0.128 mg/100 g.

The quantitative content of heavy metals was within the maximum allowable norms for the medicinal raw material according to the requirements of SPhU 2.0.

The technological parameters of the *C. islandica* thalli were determined: specific gravity, volume and bulk density, porosity of raw material, free volume of the layer, absorption coefficients of the extractants (purified water, 10 % ethanol, 20 % ethanol, 30 % ethanol, 40 % ethanol, 50 % ethanol, 60 % ethanol, 70 % ethanol, 80 % ethanol, 90 % ethanol and 96 % ethanol), swelling index.

In order to develop the technology for obtaining a thick extract from *C. islandica* thalli, the dynamics of the extraction of the extractive substances and the total polyphenols in terms of pyrogallol with using different extractants (purified water, 10 % ethanol, 20 % ethanol, 30 % ethanol, 40 % ethanol, 50 % ethanol, 60 % ethanol, 70 % ethanol, 80 % ethanol, 90 % ethanol and 96 % ethanol) were determined. For the extracts obtained from the *C. islandica* thalli, antiradical activity screening *in vitro* was carried out.

It was determined that 70 % ethanol provides the optimal extraction of the total polyphenols in terms of pyrogallol from the raw material. The optimal parameters of the technological process of obtaining the thick extract from the *C. islandica* thalli were determined. The optimal extractant is 70 % ethanol, the raw material-extractant ratio is 1:10, the multiplicity of pours is 2, the time of one operation is 12 hours, the temperature of the process is 20 ± 2 °C. The evaluation criteria were chosen as the extractive substances yield and the total polyphenols in terms of pyrogallol yield. Based on the work carried out, the technology for obtaining the thick extract from the *C. islandica* thalli was developed, and the yield of the substance in terms of air-dry raw material was 19.5 %.

The standardization parameters for the thick extract from the *C. islandica* thalli were selected: description, solubility, loss in mass during drying, heavy metals (fulfilled the specified requirements), microbiological purity, quantitative content of the total polyphenols in terms of pyrogallol (was at least 4.0 %).

For the obtained thick extract from the *C. islandica* thalli, antimicrobial activity *in vitro* by the diffusion in agar method at concentrations of 1 %, 5 % and 10 % (solvent 70 % ethanol) was determined. 70 % ethanol, the selected extractant for obtaining the thick extract was used as a reference preparation. The thick extract obtained in solutions with a concentration of 10 % and 5 % could inhibit the growth of almost all strains of the microorganisms used in the experiment (except for *P. vulgaris*). The obtained substance is effective in a solution with a concentration of 1 % only against the strains of *S. aureus*, *B. subtilis* and *C. albicans*. The most acceptable growth retardation of the zones of the studied strains was noted when using a 10 % solution of a thick extract from the *C. islandica* thalli. The strains of *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *P. aeruginosa*, whose growth retardation zone was more than 22 mm, are the most sensitive to the effect of the studied thick extract in this concentration. The antioxidant activity of the thick extract was established by *in vitro* tests in relation to the DPPH ion.

The novelty of the research is confirmed by an application for the Patent of Ukraine for a utility model "Method of obtaining a medicinal product in the form of a patch with an anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant action" (application number a202304172, date of application 04.09.2023) and for a patent of Ukraine for an invention "Pharmaceutical composition with anti-inflammatory, anti-allergic and immunomodulatory action» (application number u202304173, date of application 04.09.2023).

The conducted systematic pharmacognostic studies became the basis for the development of the project of the Methods of quality control "*Cetraria islandica* thalli thick extract". The results of the study of the chemical composition and the anatomical structure of the *C. islandica* thalli batches were implemented into the research work of the related departments of the higher education institutions of Ukraine.

Key words: *Cetraria islandica*, *Cetraria aculeata*, thalli, pharmacognostic study, thick extract, antimicrobial activity, antioxidant activity.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ ЦЕТРАРІЯ (<i>CETRARIA</i> ACH.) (Огляд літератури)	32
1.1 Ботанічна характеристика представників роду <i>Cetraria</i>	32
1.2 Хімічний склад представників роду <i>Cetraria</i>	39
1.3 Застосування сировини представників роду <i>Cetraria</i> у науковій і народній медицині та промисловості	47
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ	53
РОЗДІЛ 3 МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВИНИ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>CETRARIA</i>	74
3.1 Встановлення ознак морфологічної та анатомічної будови серій сланей <i>C. islandica</i>	74
3.1.1 Фракційний склад серій сланей <i>C. islandica</i>	77
3.1.2 Встановлення морфологічних ознак серій сланей <i>C. islandica</i> ...	80
3.1.3 Встановлення анатомічних ознак серій сланей <i>C. islandica</i>	83
3.2 Встановлення ознак морфологічної та анатомічної будови сланей <i>C. aculeata</i>	85
3.2.1 Встановлення морфологічних ознак сланей <i>C. aculeata</i>	85
3.2.2 Встановлення анатомічних ознак сланей <i>C. aculeata</i>	86
Висновки до розділу 3	88
РОЗДІЛ 4 ВСТАНОВЛЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ОСНОВНИХ ГРУП БАР У СИРОВИНІ <i>C. ISLANDICA</i> ТА <i>C. ACULEATA</i>	90
4.1 Вивчення складу АК у сланях <i>C. islandica</i>	90
4.2 Вивчення складу моносахаридів у сланях <i>C. islandica</i>	93
4.3 Вивчення жирнокислотного складу сланей <i>C. islandica</i>	96

4.4	Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти у серіях сланей <i>C. islandica</i> та <i>C. aculeata</i>	98
4.5	Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот у серіях сланей <i>C. islandica</i> та <i>C. aculeata</i>	99
4.6	Вивчення складу сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях <i>C. islandica</i>	100
4.7	Дослідження сполук фенольної природи у сланях <i>C. islandica</i> та <i>C. aculeata</i>	104
4.7.1	Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у сланях <i>C. islandica</i> та <i>C. aculeata</i>	104
4.7.2	Визначення флавоноїдного складу у сланях <i>C. islandica</i>	105
4.7.3	Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у серіях сланей <i>C. islandica</i> та <i>C. aculeata</i>	106
4.8	Дослідження карбонових кислот у сланях <i>C. islandica</i>	107
4.8.1	Визначення якісного складу та кількісного вмісту карбонових кислот у сланях <i>C. islandica</i>	108
4.8.2	Вилучення зі сланей <i>C. islandica</i> однієї з лишайникових кислот та встановлення її структури	109
4.9	Визначення кількісного вмісту загальної золи у серіях сланей <i>C. islandica</i>	112
4.10	Елементний склад серій сланей <i>C. islandica</i>	113
	Висновки до розділу 4	117
	РОЗДІЛ 5 ВИЗНАЧЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ СЛАНЕЙ <i>C. ISLANDICA</i> , ПАРАМЕТРІВ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ СЛАНЕЙ ЦЕТРАРІЇ ІСЛАНДСЬКОЇ ЕКСТРАКТУ ГУСТОГО ТА ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЇ	120
5.1	Визначення основних технологічних показників сировини <i>C. islandica</i>	121

5.2	Визначення динаміки вилучення екстрактивних речовин зі сланей <i>C. islandica</i> в залежності від екстрагенту	126
5.3	Визначення оптимального співвідношення сировина – екстрагент	128
5.4	Визначення оптимального часового терміну екстрагування	129
5.5	Відпрацювання технологічних параметрів отримання цетрарії ісландської екстракту густого	130
5.6	Визначення основних показників якості цетрарії ісландської сланей екстракту густого	132
5.7	Дослідження біологічної активності субстанцій зі сланей <i>C. islandica</i>	140
5.7.1	Дослідження спектру антимікробної активності цетрарії ісландської сланей екстракту густого	140
5.7.2	Дослідження антирадикальної активності різних витяжок сланей <i>C. islandica</i> та цетрарії ісландської сланей екстракту густого.....	141
	Висновки до розділу 5	144
	ВИСНОВКИ	146
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	148
	ДОДАТКИ	169

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

δ	хімічний зсув відносно тетраметилсилану ($\delta_{\text{TMC}} = 0$)
CDCl_3	дейтерований хлороформ
DPPH	2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикал
IC_{50}	концентрація напівмаксимального інгібування
pH	водневий показник
AAC	атомно-абсорбційна спектрометрія
AK	амінокислоти
APA	антирадикальна активність
БАР	біологічно активні речовини
ВЕРХ	високоєфективна рідинна хроматографія
ГХ/МС	газова хроматографія (мас-детектування)
$\text{DMSO-}d_6$	дейтерований диметилсульфоксид
ДФУ 2.0	Державна Фармакопея України 2 видання
ЖК	жирні кислоти
ЛЗ	лікарський засіб
ЛРС	лікарська рослинна сировина
МІК	мінімальна інгібувальна концентрація
МКЯ	методи контролю якості
МОЗ	Міністерство охорони здоров'я
м.ч.	мільйонні частки
СФ	спектрофотометрія
TMC	тетраметилсілан
ТШХ	тонкошарова хроматографія
ЯМР	ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Гострі інфекційні захворювання верхніх дихальних шляхів складають переважну більшість серед інфекційних та паразитарних хвороб в Україні, несуть ризики розвитку хронічних патологічних станів та є одною з найчастіших причин звернення пацієнтів до лікаря [2, 20]. Актуальним питанням залишається терапія COVID-19 та ускладнень, пов'язаних з ним.

Водночас серйозним викликом для системи охорони здоров'я залишається стійкість мікроорганізмів до антибіотиків, що збільшує ризик виникнення ускладнень та смертності, несе великі економічні втрати [44]. Для вирішення цієї проблеми вчені продовжують цілеспрямований пошук потужних біологічно активних речовин природного походження, що мають терапевтичний потенціал. Саме тому лікарські засоби рослинного походження не втрачають свого значення та користуються популярністю навіть незважаючи на наявність широкого асортименту синтетичних лікарських препаратів [44, 112].

Дослідження фармацевтичного ринку України демонструють поступове збільшення кількості лікарських препаратів рослинного походження на 5–7 % щороку, а також збільшення частки вітчизняних лікарських засобів до 30 % [22].

Створення нових вітчизняних препаратів є більш економічно вигідним в умовах зниження платоспроможності населення, зменшує витрати та ризики, пов'язані з логістикою та дозволяє ефективніше забезпечувати пацієнтів необхідною терапією. У цьому аспекті стає особливо доцільною та актуальною заготівля та використання рослинної сировини місцевого походження, у тому числі з переліку добре відомих традиційних об'єктів, що знайшли застосування у світовій фармацевтичній практиці [127, 160].

Флора України багата на різноманітні види лікарських рослин [18, 160]. Одним з таких видів є лишайник цетрарія ісландська (*Cetraria*

islandica (L.) Ach.) родини Пармелієві (*Parmeliaceae*), що зростає на території України та має багатовікову історію застосування у традиційній медицині Європи і Азії, зокрема при захворюваннях верхніх дихальних шляхів і порушеннях травлення [41, 66].

На сьогоднішній день слані *C. islandica* є фармакопейною лікарською сировиною у багатьох країнах та використовуються для виробництва препаратів, що застосовуються при запальних процесах респіраторної системи, сприяють регуляції органів дихання, проявляють антибактеріальну, протизапальну, протикашльову, пом'якшувальну, антиоксидантну дію [11, 64, 170].

Наразі на фармацевтичному ринку України представлені 5 лікарських засобів, 54 дієтичні добавки і 2 косметичні засоби, до складу яких входить сировина *C. islandica* та витяжки з неї. Серед лікарських форм переважають тверді – (54,1 %): пастилки (16,4 %), льодяники (13,1 %), таблетки (8, 2 %), фіточаї (збори) (8,2 %), капсули (4,9 %), пудра (1,6 %) і саше (1,6 %) [41].

Як лікарські засоби зареєстровані: Пектолван фіто ісландський мох (АТ «Фармак», Україна с субстанцією польського виробництва), Екстракт складний відхаркувальний (Phytopharm Klenka S.A., Польща), Гербіон сироп ісландського моху (КРКА, Словенія), Ісла-Моос та Ісла-Мінт (Engelhard Arzneimittel GmbH & Co. KG, Німеччина), що проявляють відхаркувальну, протикашльову, антибактеріальну, антисептичну, протизапальну, імуностимулювальну дію та застосовуються при застудних захворюваннях, запаленні горла і кашлі.

Крім того, *C. islandica* є компонентом дієтичних добавок, що сприяють регуляції функції органів дихання – 38 (70,4 %);, що застосовуються при запальних процесах органів дихання – 9 (16,7 %); комплексної дії – 7 (12,9 %).

За фармакологічною дією вони досить однотипно спрямовані: поділяються на протикашльові, відхаркувальні, протизапальні, антибактеріальні і антисептичні, обволікаючі, зволожуючі та загальнозміцнюючі [41]. Але сировина *C. islandica* також проявляє

імуностимулювальну, онкопротекторну, детоксикувальну дії [58, 84, 99, 168], що дає підстави для розробки на її основі різні лікарські форми для профілактики та лікування дерматологічних захворювань, добро- та злоякісних пухлин, ентеросорбентів, загальнозмічуючих препаратів, тощо.

Також із сировини *C. islandica* відстуній вітчизняний лікарський препарат на фармацевтичному ринку нашої країни [14].

Тому поглиблене системне вивчення хімічного складу сировини *C. islandica* вітчизняного походження є важливим для подальшої переробки, створення на її основі лікарських засобів з розширенням сфери їх застосування.

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

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи – системне фармакогностичне вивчення сланей вітчизняних представників роду *Cetraria*, зокрема *C. islandica*.

Завдання дослідження такі:

- Провести аналіз морфолого-анатомічної будови сланей *C. islandica* та *C. aculeata* вітчизняної заготівлі;
- провести дослідження хімічного складу сланей *C. islandica*;
- провести кількісне визначення основних груп БАР у сировині *C. islandica* та *C. aculeata*;
- визначити основні показники якості сировини *C. islandica*;

- визначити технологічні параметри сировини та основні параметри технологічного процесу отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого;
- стандартизувати екстракт густий;
- підтвердити перспективність розробки визначенням основних аспектів фармакологічної дії;
- розробити проєкт МКЯ на екстракт густий.

Об'єкт дослідження: системне фармакогностичне вивчення серій сланей *C. islandica*, *C. aculeata* вітчизняної заготівлі.

Предмет дослідження: ідентифікація, визначення кількісного вмісту БАР у серіях сланей *C. islandica* вітчизняної заготівлі, розробка технології отримання густого екстракту та його стандартизація.

Методи дослідження

Якісний склад та кількісний вміст БАР визначали фармакопейними методами за допомогою ГХ, ГХ/МС, ВЕРХ, гравіметрії, титриметрії, ААС, СФ, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопії. Морфологічні ознаки досліджували за допомогою збільшувальної апаратури та вимірних засобів. Анатомічну будову сировини встановлювали на препаратах з поверхні, поперечних перерізах. Дослідження біологічної активності проводили *in vitro*. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням критерію Ст'юдента та однофакторного дисперсійного аналізу за ДФУ 2.0.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше проведено системне фармакогностичне вивчення серій сланей *C. islandica* та *C. aculeata* вітчизняної заготівлі. За допомогою хроматографічних методів аналізу в сировині встановлено компонентний склад сполук, що переганялися з водяною парою, вільних та зв'язаних АК, вільних та зв'язаних вуглеводів, ЖК, карбонових кислот та флавоноїдів.

Вперше диференційовано частку мінеральних та органічних домішок у серіях сировини *C. islandica*, заготовленої в Україні, що може доповнити монографію ДФУ 2.0 на сировину.

Вперше для сланей *C. islandica* встановлено наявність флавонового аглікону лютеоліну, флавонолових агліконів кемпферолу та кверцетину, а також похідного кверцетину – біозиду рутину. Вперше для сировини *C. islandica* встановлено наявність гідроксикоричної синапової кислоти, ароматичної ненасиченої карбонової кислоти з групи фенілпропаноїдів – *trans*-цинамової кислоти, та одноосновної полігідроксикарбонової хінної кислоти.

Визначено кількісний вміст суми поліфенолів, суми органічних кислот, суми флавоноїдів у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata*.

Встановлено параметри технологічного процесу (оптимальний екстрагент, часовий термін, співвідношення сировина-екстрагент) отримання екстракту густого сланей *C. islandica*.

Розроблено технологію отримання екстракту густого сланей *C. islandica* вітчизняної заготівлі та визначено основні параметри контролю його якості.

Визначено антиоксидантну та антимікробну активність екстракту густого сланей *C. islandica*.

Новизна досліджень підтверджена заявками на патент України на корисну модель «Спосіб одержання лікарського засобу у формі пластиру протизапальної, антимікробної, антиоксидантної дії» (№ заявки а202304172, заявл. 04.09.2023) та патент України на винахід «Фармацевтична композиція протизапальної, протиалергійної та імуномодулювальної дії» (№ заявки u202304173, заявл. 04.09.2023).

Практичне значення отриманих результатів

Розроблено технологію отримання сланей *C. islandica* екстракту густого.

Розроблено проєкт МКЯ «Цетрарії ісландської сланей екстракт густий».

Результати досліджень впроваджено в науково-дослідну роботу кафедр фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського; кафедри хімії та фармації Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя, кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету імені

О. О. Богомольця, кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором здійснено:

- інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, аналіз стану фармакогностичного вивчення сировини представників роду цетрарія, зокрема цетрарії ісландської;
- встановлено морфолого-анатомічну будову серій сланей *C. islandica* та сланей *C. aculeata* вітчизняної заготівлі;
- встановлено компонентний склад та визначено кількісний вміст основних груп БАР у сировині: вільних та зв'язаних амінокислот, вільних та зв'язаних вуглеводів, сполук, що переганялися з водяною парою, органічних, в тому числі жирних, кислот, мінеральних сполук, основних груп фенольних сполук;
- розроблено технологію отримання екстракту густого цетрарії ісландської сланей, обрано основні параметри контролю його якості та проведено його стандартизацію;
- розроблено проєкт МКЯ «Цетрарії ісландської сланей екстракт густий».

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Хворост О. П.

Співавтором наукових праць є науковий керівник.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом з науковим керівником.

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: IV міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (м. Харків, 26-27 листопада 2020 р.); III міжнародній

науково-практичній інтернет-конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження»* (м. Харків, 2 квітня 2021 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету *«Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи»* (м. Харків, 10 вересня 2021 р.); VI всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю *«Хімія природних сполук»* (м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р.); III всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю *«Youth pharmacy science»* (м. Харків, 7-8 грудня 2022 р.); V міжнародній науково-практичній інтернет-конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження»* (м. Харків, 14 квітня 2023 р.); the 1st International Conference *«Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity»* (Kaunas, Lithuania, 21st of April 2023); XXIX міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів *«Актуальні питання створення нових лікарських засобів»* (м. Харків, 19-21 квітня 2023 р.); X міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 60-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора Гладуха Євгенія Володимировича *«Сучасні досягнення фармацевтичної технології»* (м. Харків, 10-11 травня 2023 р.); the XI Seminars in Pharmaceutical Sciences (University of Tartu, Tartu, Estonia, 23rd of November 2023); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю *«Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку»* (м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р.); VI міжнародній науково-практичній інтернет-конференції *«Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження»* (м. Харків, 12 квітня 2024 р.).

Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 139 машинописних сторінок. Робота проілюстрована 29 таблицями та 33 рисунками.

Список використаних джерел налічує 193 найменування, із них 41 кирилицею та 152 латиницею.

РОЗДІЛ 1

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ ЦЕТРАРІЯ (*CETRARIA* ACH.) (Огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика представників роду *Cetraria*

Цетрарія (*Cetraria* Ach.) – рід лишайників родини Пармелієві (*Parmeliaceae* Zenker.) порядку Леканоральні (*Lecanorales* Nannf.) класу Леканороміцети (*Lecanoromycetes* O. E. Erikss. et Winka) відділу Аскоміцети (*Ascomycota*) [140]. Родина Пармелієві налічує 69 родів та понад 2700 видів лишайників [187, 188].

Назва роду *Cetraria* походить від латинського слова «cetra», що означає невеликий округлий шкіряний щит воїнів Стародавнього Риму, зовнішній вигляд якого схожий на апотеції цих лишайників [155].

Вперше рід *Cetraria* був описаний у 1803 р. шведським ботаніком, «батьком ліхенології» Еріком Ахаріусом і налічував 8 видів лишайників [113]. Перші описи та приналежність видів до роду ґрунтувалися на сукупності морфологічних ознак. Згодом таксономічний склад роду неодноразово зазнавав змін [184]. Кількість видів поступово збільшувалась, але пізніше деякі з них були визнані тотожними або віднесені до інших родів [140]. Сучасні молекулярні методи дозволили більш точно встановити походження видів та зв'язки між родами всередині родини [139, 156, 167, 175, 184], проте нині остаточної та загальноприйнятої класифікації й досі не існує.

Наразі сучасні ліхенологічні бази даних, що оновлюють актуальну інформацію щодо статусу видів, наводять дані про 21 зареєстрований вид лишайників, що включає в себе рід *Cetraria* [102, 129].

Лишайники роду *Cetraria* широко розповсюджені по всій земній кулі [46, 123, 145, 180]. Більшість видів поширені на території Євразії та Північної Америки, у тому числі до арктичного поясу [46, 167, 182].

Деякі види є космополітами: цетрарія колюча (*C. aculeata* (Schreb.) Fr.), ц. настінна (*C. muricata* (Ach.) Roum.), в той час як інші мають більш чи менш чітку приуроченість до певного типу ареалу [48, 59, 62, 85, 123, 130, 146, 174]. Наприклад, циркумполярний тип поширення має ц. чорнувата (*C. nigricans* Nyl.), запаси якої локалізовані навколо Північного полюсу [146]. Ц. вересова (*C. ericetorum* Opiz)) є компонентом рослинного покриву бореальних лісів. Циркумбореальними видами є ц. зубчаста (*C. odontella* (Ach.) Ach.), ц. парканна (*C. sepincola* (Hoffm.) Ach.)), ц. ісландська, підвид кучерява (*C. islandica* (L.) Ach. ssp. *crispiformis* (Räsänen) Kärnefelt), що зростають у помірному поясі північної півкулі [146].

Серед видів *Cetraria* зустрічаються ендемічні: ареал поширення ц. австралійської (*C. australiensis* W. A. Weber ex Kärnefelt) обмежується південно-східною Австралією, ц. підщиткової (*C. subscutata* D.C. Linds.) – Антарктикою [146, 175]. Цетрарія перуанська (*C. peruviana* Kärnefelt & A. Thell)) та ц. вересова, підвид патагонська (*C. ericetorum* Opiz. ssp. *patagonica* Kärnefelt)) є ендеміками центральних та південних регіонів Південної Америки [113, 123, 146].

Представники роду здебільшого є епігейними або епіфітними, тобто ростуть на ґрунті або корі дерев, але деякі види, наприклад *C. ericetorum*, належать до епілітних – зростають на кам'янистому субстраті [145].

Згідно з літературними даними на території України розповсюджені щонайменше 5 видів роду *Cetraria*. Найбільш поширеним видом є ц. ісландська (*C. islandica* (L.) Ach.), її запаси локалізовані переважно у західних областях України у Карпатських лісах [23, 43, 93, 142]. Ц. парканна (*C. sepincola*) та ц. вересова (*C. ericetorum*), поширені здебільшого у лісах центральних, рідше – західних областей, у тому числі у Карпатах [43, 81, 115]. Ц. колюча (*C. aculeata*) та ц. степова (*C. steppae* (Savicz) Kärnefelt), характерні

для степових регіонів Сходу і Півдня України [31, 59, 62, 75]. *C. steppae* має статус вразливого виду та занесено до Червоної Книги України [32].

Найбільш відомим представником роду є цетрарія ісландська (*C. islandica*).

Слань листоподібно-кущова, прямостояча або підведена, звужена біля основи, зазвичай заввишки 10–15 см. Лопаті м'якошкірясті, жолобкуваті, пласкі або трубчастозгорнуті, розширені вгорі, з короткими війками на краях. Ширина лопатей від 0,3 до 1,5 см. Колір верхньої поверхні слані від зеленувато-коричневого до темно-коричневого, нижньої – від світло-коричневого до сірувато-оливкового, біля основи – червонуватий [8, 23, 55, 145, 180]. На верхній поверхні досить часто зустрічаються псевдоцифели – білуваті вдавлені плями різної величини і форми. Апотеції поодинокі, коричневі, дископодібної форми, розташовуються на верхівках термінальних лопатей [8, 145, 180].

Слань утворює дернівник, або інколи суцільний килим. Росте поодинокі або невеликими групами серед інших лишайників, мохів і вищих рослин переважно на відкритих, добре освітлених кам'янистих і трав'янистих місцевостях, торфовищах, на високогірних галявинах, у соснових та мішаних лісах, на болотах, лісотундрах і тундрах [8, 23].

C. islandica має біполярний та циркумбореальний ареал поширення: зростає у високих широтах Північної та Південної півкуль, по всій Європі, у Азії, зустрічається у субарктичних та арктичних регіонах [76, 81, 146, 156, 171, 184].

Для *C. islandica* є характерним поліморфізм, тобто морфологічні ознаки слані можуть змінюватися в залежності від впливу умов місцезростання. Ісландськими вченими (Xu et al., 2018) було описано комплекс хемотипів *C. islandica* з різних регіонів країни, що відрізнялися не тільки за хімічним складом, але і мали відмінності морфологічної будови. Продемонстровані значні внутрішньовидові морфологічні відмінності у розмірах сланей і ширині лопатей [56].

В Україні *C. islandica* найчастіше зростає у соснових та мішаних лісах центральної та північної частини Західного Полісся, у високогір'ї Карпат [21, 93]. Вид поширений у західних: Львівській, Івано-Франківській, Закарпатській, Чернівецькій, а також центральних областях: Київській, Черкаській і Полтавській [23, 142].

Цетрарія вересова (*C. ericetorum*) має куцисту слань заввишки до 6–7 см з вузькими, жорсткими, гладенькими частками 2–10 см завдовжки та до 0,5 см завширшки, що часто загорнуті у трубочку та не зростаються між собою. По краях часток розташовані війки різної форми. Забарвлення слані від зеленувато-коричневого до темно-коричневого, однакове з двох сторін, біля основи темно-червоне. Псевдоцифели відсутні або поодинокі, ізидії чи соредії зустрічаються зрідка. Апотеції розташовані на верхівках часток або близько до них [23, 145, 146].

C. ericetorum має схожість за розмірами і формою лопатей з деякими морфотипами *C. islandica*, але нещодавні дослідження (Xu et al., 2017), проведені з використанням сучасних методів молекулярної ідентифікації дозволили розрізнити ці види [56].

Існують декілька підвидів *C. ericetorum*, що мають незначні відмінності морфологічної будови, але досить чітко відрізняються за географічним поширенням. Виділяють підвиди: євразійський – ц. вересова, підвид вересова (*C. ericetorum* ssp. *ericetorum*), північноамериканський – ц. вересова, підвид сітчаста (*C. e.* ssp. *reticulata*) та південноамериканський – ц. вересова, підвид патагонська (*C. e.* ssp. *patagonica*) [113].

В Україні вид *C. ericetorum* зустрічається у Київській, Чернігівській та Черкаській областях, рідше – у високогір'ї Карпат та на Прикарпатті. Зростає на ґрунтовому субстраті у соснових лісах, в горах, на пісках, добре освітлених відкритих місцях [23, 43].

Цетрарія колюча (*C. aculeata*) є куцистим епігейним лишайником, що характеризується значною морфологічною мінливістю та широкою амплітудою поширення [48, 59, 85].

Слань має вигляд сильно розгалужених кущистих пучків заввишки 1–6 см. Ширина основних розгалужень становить від 1 до 4 мм, ширина кінцевих – до 1 мм. Розгалуження циліндричні або дещо приплюснуті, блискучі, жорсткі, з чисельними короткими виростами та численними видовженими псевдоцифелами, всередині полі або з дещо пухкою серцевиною. Колір варіює від світло-коричневого до коричнювато-чорного. Ізидії та соредії відсутні, апотеції зустрічаються зрідка та мають колір слані [62].

C. aculeata має різні морфотипи, що можуть відрізнятися за розмірами, шириною розгалужень, забарвленням, характером прикріплення до субстрату (прикріплені до ґрунту або кочівні) [85]. Слань прикріплюється до субстрату нещільно, а округла форма дозволяє їй переноситися на відкритій місцевості за допомогою вітру та тварин [77, 130].

Науковцями з Іспанії (Pérez-Ortega et al, 2012) було описано анатомічні та фізіологічні відмінності між типовими та кочівними морфотипами *C. aculeata* [85]. Кочівні морфотипи відрізнялися тоншим коровим шаром та щільнішим шаром менших за розміром клітин водоростей. Крім того, типові морфотипи мали меншу водопоглинальну здатність у порівнянні з кочівними формами [85].

C. aculeata широко розповсюджена по всьому світу, зростає на ґрунті у бореальних та степових зонах, високогірних гірських поясах, прибережних піщаних дюнах [59, 130, 156, 171]. Описані також місцезростання виду у Антарктиці та на островах у південній та антарктичній частині Атлантичного океану [123].

На території України вид поширений на піщаних ґрунтах Півдня України, а також частково у Донецькій, Луганській і Харківській областях [62, 75].

Цетрарія степова (*C. steppae*) має відносно кулясту дихотомічно або неправильно розгалужену кущисту слань від коричневого до темно-коричневого і чорного кольору заввишки 1–3 см. Розгалуження циліндричні, матові, ширина основних розгалужень 0,5 мм – 2,0 см, бічних – від 0,1 до

0,5 мм. Псевдоцифели вдавнені, слабо помітні, ізидіюдні вирости відсутні. Розмножується фрагментами слані та пікноконідіями [62, 180].

Зростає на ґрунті у злакових, злаково-лучних та піщаних степах у південних регіонах України [32]. *C. steppae* належить до кочівних видів лишайників, її слань не прикріплюється до субстрату і може переноситися за допомогою вітру. Вид занесений до Червоної Книги України, має статус вразливого та охороняється у заповідниках і національних природних парках степової зони [32].

C. steppae та *C. aculeata* вважаються близькими видами. Для їх розмежування традиційно використовувалися морфологічні ознаки: ширина основних та бічних розгалужень, характер поверхні талому, прикріплення до субстрату, проте наприкінці ХХ ст. у сировині *C. steppae* було виявлено наявність норстикової лишайникової кислоти, що стало важливим критерієм для ідентифікації виду [62].

Цетрарія парканна (*C. sepincola*) помітно відрізняється від інших представників роду за морфологічною будовою, оскільки її листувата слань значно меншого розміру – 0,3–1 см заввишки та 0,4–2,5 см завширшки, має вигляд розетки та прикріплюється до деревного субстрату за допомогою центральної частини. Лопаті від світло-коричневого до оливково-бурого кольору, по краю хвилясті, іноді з війками. Верхня поверхня лопатей шкіряста, зморшкувата, нижня – блідо-коричневого кольору, зморшкувата або сітчаста з поодинокими ризинами. На кінцях і по краю лопатей розташовані численні великі апотеції (1–5 мм у діаметрі), що іноді займають майже всю верхню частину лопаті [145].

C. sepincola росте на гілках, рідше на стовбурах переважно хвойних дерев та чагарників на рівнинних місцевостях та у горах. Вид поширений у Центральній та Східній Європі, Північній та Південній Америці, Австралії та Новій Зеландії, Східній Азії (Індія, Японія), Скандинавському та Балканському півостровах [145, 146].

На території України зустрічається у Івано-Франківській, Закарпатській, Черкаській, Полтавській, Київській та Чернігівській областях [23].

Рід *Cetraria* та його окремі представники неодноразово ставали об'єктом вивчення українських вчених, але здебільшого розглядались з ботанічної точки зору.

Значна частина даних була отримана у ході експедиційних зборів, пов'язаних із геоботанічними флористико-таксономічними та фітогеографічними дослідженнями. Поповнення колекцій ліхенологічних гербаріїв дозволило встановити склад ліхенофлори України та більш точно визначити місцезнаходження видів [7, 23, 43, 67, 75, 142].

Наприкінці ХХ ст. у праці українського ліхенолога Окснера А. М. «Флора лишайників України» були узагальнені дані щодо систематики, філогенетичних зв'язків, морфологічних та анатомічних ознак представників роду, а також особливостей їх географічного поширення [23]. Пізніше у результаті ревізії систематичної приналежності деякі з цих видів були включені до складу інших родів [102].

Вітчизняний ботанік і ліхенолог Кондратюк С. Я. разом з українськими та словацькими колегами створили Каталог лишайників Східних Карпат [43], який включає в себе дані про місцезнаходження лишайників в українських, польських, словацьких і румунських Карпатах, у тому числі види цетрарії. Громакова А. Б. [7] наводить дані про знахідки ц. ісландської у соснових борах Зміївського району Харківської області. Згадки про місцезнаходження видів *Cetraria* як хазяїна ліхенофільних грибів наводять також Пірогов М. В. [142], Дармостук В. В. [67] та Ходосовцев О. Є. [75] зі співдослідниками.

Дослідження тиреотропних властивостей сланей *C. islandica* проводились українськими вченими (Владимирова І. М. та ін.) у ході пошуку лікарських засобів рослинного походження для лікування захворювань щитоподібної залози [3, 4, 19, 190].

1.2 Хімічний склад представників роду *Cetraria*

Речовини, що синтезуються лишайниками, поділяються на первинні та вторинні метаболіти. Первинні метаболіти знаходяться всередині клітин, переважно водорозчинні та неспецифічні для лишайників, виробляються як грибним, так і водоростевим компонентом, можуть зустрічатися у водоростях, грибах та вищих рослинах [12]. До них належать полісахариди, білки, амінокислоти, вітаміни, каротиноїди. Вторинні метаболіти зазвичай накопичуються на поверхні гіф мікобіонта у формі нерозчинних кристалів, є специфічними для лишайників та майже не зустрічаються у вищих рослинах чи грибах [15, 121, 147, 153]. Утворення вторинних метаболітів відбувається за трьома хімічними шляхами: мевалоновим, шикімовим та ацетил-полімалоновим [126, 147].

За деякими даними кількість вторинних метаболітів, виявлених у лишайниках перевищує 1000 [126, 131]. Наявність у лишайниках цих специфічних речовин дозволяє більш точно встановити приналежність виду до роду чи родини за допомогою хемотаксономічних методів [56].

Первинні лишайникові речовини. На сьогодні полісахаридний склад визначено лише для невеликої кількості лишайників, серед яких представники родини *Parmeliaceae* та роду *Cetraria* зокрема [42, 105, 168, 172]. Зазначається, що полісахариди лишайників не вирізняються значною варіативністю моносахаридів, що входять до їх складу. Зазвичай переважають *D*-глюкоза, *D*-галактоза і *D*-маноза у різному співвідношенні, рідше зустрічаються *L*-рамноза, *L*-арабіноза і *D*-ксилоза [42, 165]. Основними структурними формами, що зустрічаються у лишайниках є β -, α -глюкани та α -манани [135].

Специфічними полісахаридами для *C. islandica* є β -*D*-1,3/1,4-глюкан ліхенін (Рис. 1.1) та α -*D*-1,3/1,4-глюкан ізоліхенін (Рис. 1.2) [105, 168].

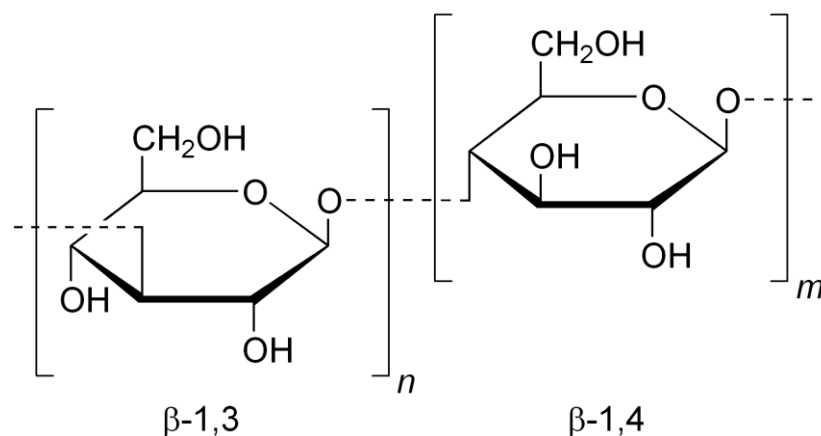


Рис. 1.1 Структурна формула ліхеніну

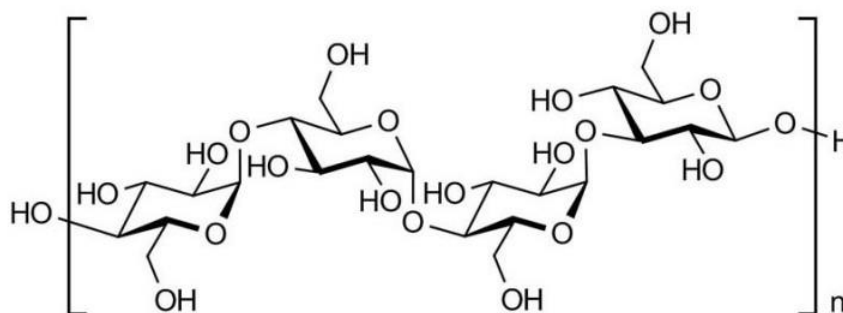


Рис. 1.2 Структурна формула ізоліхеніну

Ліхенін ($C_6H_{10}O_5$)_n – лінійний полімер, що складається із залишків *D*-глюкози, зв'язаних між собою β -1,3- та β -1,4-глікозидними зв'язками (співвідношення зв'язків 3:7) [172, 193, 97].

За деякими даними кількісний вміст ліхеніну може досягати до 27 % від суми полімерних вуглеводів у сухій речовині [172]. Ліхенін розчинний у гарячій воді та не змінює свого забарвлення при додаванні розчину йоду [165].

Ізоліхенін ($C_6H_{10}O_5$)_n – α -глюкан, що складається із залишків *D*-глюкози, зв'язаних між собою β -1,3- та β -1,4-глікозидними зв'язками у співвідношенні 3:2 [97, 165].

Ізоліхенін розчиняється у холодній воді та при додаванні розчину йоду змінює забарвлення на синій колір [165].

Оскільки вилучення ліхеніну та ізоліхеніну із сировини потребує особливих умов, зокрема температури і рН екстрагента [180, 193], є дослідження, присвячені оптимізації способу отримання цих та інших полісахаридів з *C. islandica* [97, 99, 150].

У науковому сенсі питання виявлення полісахаридів у сировині *C. islandica* представляє особливу цінність, пов'язану зі стандартизацією цього виду лишайників. Так, в рослинних водних та етанольних екстрактах при розробці комбінованих фітопрепаратів деякі автори пропонують для стандартизації *C. islandica* як маркер застосовувати саме полісахариди при їх дослідженні методом ТШХ [87].

Наприкінці 1990-х – на початку 2000-х років активно проводились дослідження вуглеводного складу *C. islandica* [97, 98, 135, 172]. Роботи були пов'язані з виділенням, дослідженням будови і компонентного складу полісахаридів, зокрема визначенням співвідношення моносахаридів [97, 98], а також у аспекті харчової цінності лишайника як корму для північних оленів [172]. У сировині *C. islandica*, зібраній у Норвегії, було виявлено *D*-глюкозу, *D*-галактозу, *D*-манозу, *L*-рамнозу, *L*-арабінозу, *D*-ксилозу та *L*-фукозу [172].

Існують нечисленні дані щодо вуглеводного складу сировини *C. islandica*, заготовленої в Україні: були досліджені полісахариди у сировині українського походження [13].

Інші полісахариди також були виділені з цього виду лишайників, такі як лужнорозчинний галактоманан і кілька розчинних полісахаридів [97, 98, 105].

Сербськими дослідниками (Grujić-Injac et al., 1976) у сировині *C. islandica* визначено наявність 17 амінокислот, серед яких переважали аспарагінова і глутамінова кислоти, аланін і лейцин [90].

Лишайники мають високу здатність поглинати мінеральні речовини з субстрату, повітря, атмосферних опадів [82]. Накопичені мінеральні речовини можуть утворювати комплексні сполуки з первинними метаболітами лишайника [153].

У одному з перших досліджень елементного складу сланей *C. islandica* фінськими вченими (Airaksinen et al., 1986) вивчалась токсичність сировини лишайників, які традиційно використовувалися в цьому регіоні у харчовій промисловості, як їжі під час надзвичайних ситуацій та як кормів для худоби [47]. У ході дослідження було виявлено високий вміст важких металів, зокрема плумбуму (30 мг/кг сухої маси сировини), та показано необхідність додаткової обробки сировини для подальшого безпечного використання [47].

Елементний аналіз сланей *C. islandica* італійського походження (Meli et al., 2017) показав високий вміст у сировині кальцію, калію і феруму [79]. Результати ретроспективного аналізу концентрацій мікро- та рідкісноземельних елементів у гербарних зразках *C. islandica*, зібраних у Італії протягом 1981–2007 років, виявили тенденції накопичення елементів, пов'язані з антропогенним впливом на місцезростання сировини [173].

Вітчизняними вченими було зазначено переважання у сировині *C. islandica* калію (170,0 мкг/100г), силіцію (75,0 мкг/100г) та кальцію (68,0 мкг/100г) [190]. Аналіз сировини *C. islandica* та лікарських засобів і харчових добавок на її основі, представлених на європейському ринку, показав відсутність чіткої залежності між походженням сировини та її елементним складом (Giordani et al., 2017) [107].

Вторинні лишайникові речовини охоплюють різноманітні класи сполук, серед яких: аліфатичні та ароматичні кислоти, депсидони, дибензофурани, ксантони, хромони, терпеноїди, каротиноїди та інші [16 60, 74, 121, 149, 171, 192].

Аліфатичні кислоти

Ліхестеринова кислота ($C_{19}H_{32}O_4$) – міститься у *C. aculeata*, *C. sepincola* [72, 145], *C. ericetorum* [95] та *C. muricata* (рис. 1.3) [140].

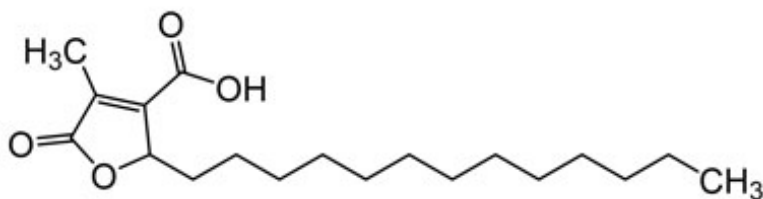


Рис. 1.3 Структурна формула ліхестеринової кислоти

Протоліхестеринова кислота ($C_{19}H_{32}O_4$) – була виявлена у *C. islandica* [55, 92, 95, 100, 128, 185], *C. aculeata* [72, 145, 177], *C. sepincola*, *C. nigricans* [145], *C. ericetorum* [74, 95], *C. muricata* (рис. 1.4) [140].

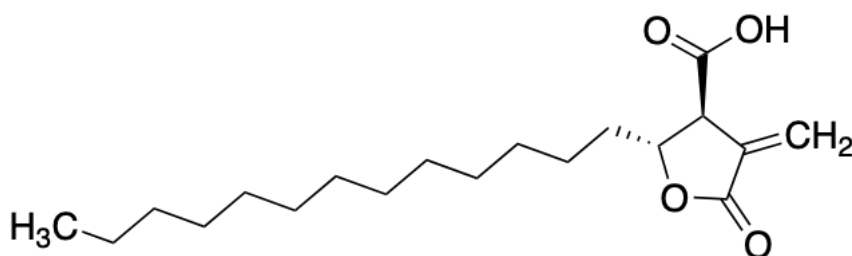


Рис. 1.4 Структурна формула протоліхестеринової кислоти

Ісландські вчені (Gudjónsdóttir et al, 1997) за допомогою методу ВЕРХ встановили, що кількісний вміст протоліхестеринової кислоти у сировині *C. islandica*, зібраної у різних регіонах Ісландії, становив від 1,4 до 5,3 мг/г сухої сировини [92].

Кількісний вміст протоліхестеринової кислоти у водних екстрактах *C. islandica* коливався у межах 73-232 мкг/г сировини залежно від часу екстракції [100]. Протоліхестеринова кислота, виділена з *C. islandica*, пригнічувала ріст клітинних ліній раку молочної залози та стимульованих мітогеном лімфоцитів [122].

Ароматичні кислоти

Депсидони

Норстиктова кислота ($C_{18}H_{12}O_9$) – має важливе значення для ідентифікації *C. steppae*, оскільки дозволяє відокремити цей вид від *C. aculeata* (Рис. 1.5) [62].

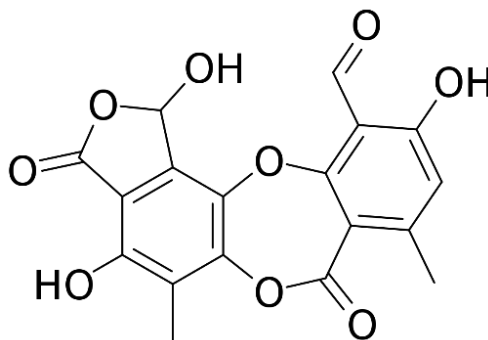


Рис. 1.5 Структурна формула норстикової кислоти

Протоцетрарова кислота ($C_{18}H_{14}O_9$) – міститься у *C. islandica* (Рис. 1.6) [56].

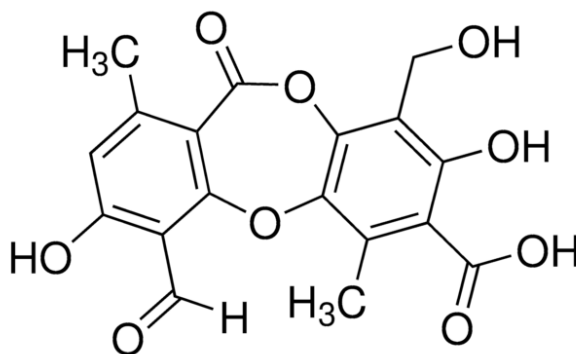


Рис. 1.6 Структурна формула протоцетрарової кислоти

Фумаропротоцетрарова кислота ($C_{22}H_{16}O_{12}$) – виявлена у *C. islandica* [56, 92, 95, 120, 134, 166], ц. згладжених (*C. laevigata* Rass.) (Рис. 1.7) [180].

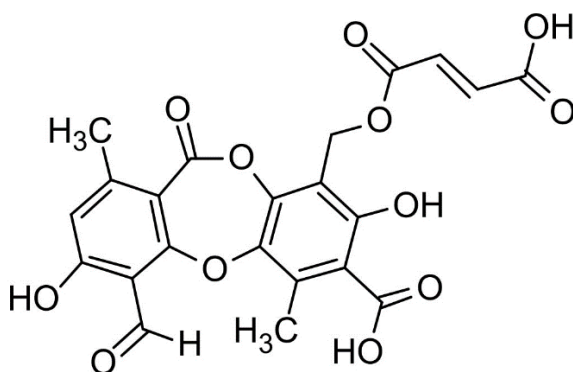


Рис. 1.7 Структурна формула фумаропротоцетрарової кислоти

Дибензофурани

Уснінова кислота ($C_{18}H_{16}O_7$) згідно з деякими літературними даними [13, 65, 186, 189] була виявлена у сировині *C. islandica* (26,0 мг/кг; 0,944 г/100г сировини), а також у отриманих з неї етанольних (4,782 мкг/мкл) та ацетонових екстрактах (5,600 мкг/мкл) (рис. 1.8) [64]. Однак, деякі автори зазначають, що уснінова кислота була наявна у сировині у слідових кількостях (0,04 %) [47, 55], або зовсім відсутня [100, 104].

Наявність уснінової кислоти також була встановлена для таких видів, як: *C. steppae* [62] та ц. Анни (*C. annae* Oхner) [140].

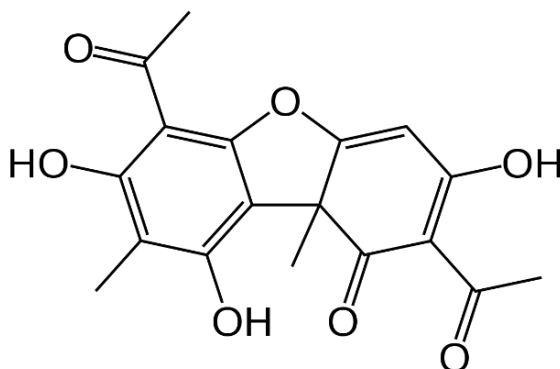


Рис. 1.8 Структурна формула уснінової кислоти

За допомогою ТШХ румунськими вченими (Voicu et al., 2019) було виявлено лейкоїтову кислоту, 4-хлоро-3-О-метилнорліхексантон, паннарин-метилетер та уснінову кислоту у хлороформних та депсидони (конпротоцетрарову та криптостиктову кислоти) у ацетонових екстрактах *C. islandica* [65].

Фенольні сполуки. Кількісний вміст суми поліфенолів та суми флавоноїдів визначали у водних (Kosanić et al., 2011) метанольних (Kosanić et al., 2011, Grujić et al., 2014), ацетонових (Kosanić et al., 2011, Tas et al., 2017) та етанольних (Stadnytska et al., 2020) екстрактах *C. islandica* [71, 78, 84, 117], але індивідуальні фенольні сполуки у цих дослідженнях не були ідентифіковані.

Була спроба визначити якісний склад деяких фенольних сполук у водних та етанольних екстрактах *C. islandica* за допомогою методу ВЕРХ (Yıldız, 2021) [73]. Ідентифікувати всі речовини не вдалося, але автори вказують на наближеність спектру 4-гідроксибензойної кислоти до отриманих результатів та припускають наявність протоцетрарової кислоти [73].

Ученими з Іспанії (Ureña-Vacas et al., 2022) було встановлено вміст суми поліфенолів у перерахунку на галову кислоту у метанольних екстрактах видів роду *Cetraria*: *C. ericetorum* – (41,7 мкг/мг), ц. сніжної (*C. nivalis* (L.) Ach) (44,7 мкг/мг), *C. islandica* (57,3 мкг/мг) [141].

Жирні кислоти. У літературних джерелах наводяться фрагментарні та застарілі відомості, пов'язані із жирнокислотним складом представників роду *Cetraria* [68]. Нідерландськими вченими за допомогою методу ТШХ у сировині *C. islandica* серед інших були ідентифіковані такі жирні кислоти, що характерні також для вищих рослин, як: пальмітинова, стеаринова, олеїнова, лінолева та ліноленова. Також були ідентифіковані довголанцюгові жирні кислоти: бегенова та ейкозадієнова [68].

Терпеноїди. Існують дані щодо наявності у сировині ц. ісландської монотерпеноїду (-)-карвону та сесквітерпеноїдів фукінаноліду А та баккеноліду А [95].

1.3 Застосування сировини представників роду *Cetraria* у науковій і традиційній медицині та промисловості

Відомості про застосування представників роду *Cetraria* у традиційній медицині описані у різноманітних довідниках, збірниках і фармакогностичних текстах та стосуються переважно *C. islandica* [55, 66, 114, 125, 128, 181].

Сировина *C. islandica* найчастіше традиційно використовувалася як протизапальний засіб для лікування подразнення ротової порожнини і горла та пов'язаного з ним сухого кашлю, а також для лікування тимчасової втрати апетиту [89]. На Скандинавському півострові протягом століть з неї готували відвари і настоянки, що застосовувалися при застуді, виразках шлунку та дванадцятипалої кишки, цукровому діабеті та нефриті [132, 180, 191].

У Західній Європі та деяких країнах Азії відвари *C. islandica* використовували для зменшення кашлю при туберкульозі [2, 55, 66, 104, 114, 180].

У Північній Європі лишайники роду *Cetraria* були джерелом корму для корів та оленів, їх споживали у їжу під час голоду та надзвичайних ситуацій [47, 157]. Крім того, *C. islandica* є одним з небагатьох лишайників, які широко використовувалися у кулінарії [157]. Подрібнені слані лишайника додавали як приправи і наповнювачі у каші, хліб, ковбаси і сири [56, 83, 132, 154]. *C. ericetorum* використовувалася як ароматна приправа у супах, *C. laevigata* – у стравах традиційної кухні у Гімалаях та у південно-західних регіонах Китаю [83, 180].

Із наявністю вторинних лишайникових речовин пов'язують широкий спектр фармакологічної дії витяжок із лишайників роду *Cetraria*, а саме антибактеріальної, протигрибкової, противірусної, протизапальної, антиоксидантної, антипроліферативної тощо [52, 119, 121, 170].

Учені з Туреччини (Türk et al., 2003) досліджували антибактеріальну дію екстрактів *C. aculeata*, отриманих за допомогою етанолу, діетилового етеру та ацетону. Найсильнішим антибактеріальним ефектом володів екстракт,

отриманий діетиловим етером, що був активний проти грампозитивних (*Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) та грамнегативних (*Pseudomonas aeruginosa* і *Proteus vulgaris*) бактерій [177].

У іншому дослідженні (Tas et al., 2017) наводяться дані щодо антибактеріальної активності ацетонового та метанольного екстрактів *C. islandica*. Найвища антибактеріальна активність ацетонового екстракту була показана проти грампозитивних бактерій (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *S. pyogenes*) із зонами затримки росту від 20,3–28,0 мм [71]. Метанольний екстракт *C. islandica* не виявив активності проти грамнегативних бактерій, але ацетоновий екстракт показав активність проти *Pseudomonas aeruginosa* та *Proteus vulgaris* (10,0 та 8,3 мм відповідно) [71].

Метанольний екстракт *C. islandica* виявився найбільш активним проти *Bacillus cereus* (МІК 0,312 мкг/мл) та *Bacillus subtilis* (МІК 0,625 мкг/мл) [84].

Метанольний екстракт ц. соснової (*C. pinastri* (Scop.) Gray) проявив антимікробну активність проти *Escherichia coli* (МІК 1,87 мг/мл) [148].

Ісландські вчені (Ingolfssdottir et. al., 1997) вивчали здатність протоліхестеринової кислоти, вилученої з *C. islandica*, інгібувати ріст стандартного штаму *Helicobacter pylori* та 34 штамів, відібраних зі зразків біопсії шлунка людини та визначили для них МІК, що становила від 16 до 64 мкг/мл [101].

Лишайникові речовини також показали здатність пригнічувати ріст патогенних грибів [80, 88, 192]. За результатами дослідження протигрибкової активності чутливими до дії метанольного екстракту *C. islandica* виявилися такі штами патогенних грибів: *Candida albicans* (МІК 1.25 мкг/мл), *Fusarium oxysporum* (МІК 2,5 мкг/мл), *Trichoderma harsianum* (МІК 2,5 мкг/мл), *Aspergillus flavus* (МІК 5.0 мкг/мл), *Penicillium purpurescens* (МІК 5,0 мкг/мл) [84].

Ацетонові, метанольні та хлороформні екстракти *C. aculeata* інгібували ріст штамів грибів *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium moniliforme*, *F. solani* [152].

Ліхенін, отриманий зі сланей *C. islandica*, пригнічував розвиток симптомів зараження вірусом тютюнової мозаїки у деяких видів роду Тютюн (*Nicotiana*): *N. tabacum*, *N. benthamiana* *N. glutinosa* [169].

Проведені дослідження (Igoli, 2014) антипаразитарної активності виділених із *C. islandica* протоліхестеринової, ліхестеринової, протоцетрарової та фумаропротоцетрарової кислот проти *Trypanosoma brucei brucei*, збудника трипаносомозу, або сонної хвороби, показали, що найбільш ефективними виявилися протоліхестеринова (МІК 6,30 мкг/мл) та ліхестеринова (МІК 12,5 мкг/мл) кислоти [54].

Є відомості про захисну активність терапевтичного засобу на основі комбінації екстракту *C. islandica*, солі срібла та гіалуронату натрію з метою підтримання здорового стану епітелію [183].

Із наявністю у сировині *C. islandica* полісахаридів пов'язують прояв вираженої протизапальної та відхаркувальної дії при захворюваннях верхніх дихальних шляхів, а також стимулювальний вплив на різні ланки імунного захисту [58, 63, 80, 103, 105, 151].

Ісландськими вченими було проведено ряд досліджень імуностимулювальної дії БАР, вилучених із екстрактів *C. islandica* [97, 98, 99, 105, 137, 138]. Ліофілізований водний екстракт та окремо виділені фракції полісахаридів *C. islandica* показали виражену імуностимулювальну активність у аналізі фагоцитозу *in vitro* та стимулювали швидкість елімінації вуглецю в аналізі очищення вуглецю *in vivo* [97, 98, 105]. Було оцінено вплив водного екстракту *C. islandica* на дозрівання дендритних клітин шляхом вимірювання секреції цитокінів ІЛ-10 та ІЛ-12p40 та показано посилення їх секреції переважно за рахунок наявності ліхеніну [99]. Показано, що полісахариди *C. islandica* мають здатність зменшувати гемоліз, індукований системою комплементу [105, 165].

За результатами нещодавніх досліджень (Surayot et al., 2019) полісахариди *C. islandica* та їх сульфатовані та гідролізовані похідні проявляли імуномодулювальну активність шляхом покращення активації природних

кілерів NK92 та макрофагоподібних клітин RAW264.7 через сигнальні шляхи CR3 та TLR-4 та індукували цитотоксичність у клітинах HeLa [168].

Досліджувалися механізми ранозагоювальної та протипухлинної дії ліхеніну, а також була показана відсутність такої активності для олігосахаридів – похідних ліхеніну [1, 193].

Сербські вчені (Grujičić et al., 2014) показали, що метанольний екстракт *C. islandica* виявляв активність поглинання вільних радикалів DPPH зі значенням IC_{50} 678,38 мкг/мл та активність поглинання супероксид-аніонів зі значенням 792.48 мкг/мл [84].

Питанню вивчення антиоксидантної активності екстрактів *C. islandica* присвячений ряд наукових публікацій [70, 94, 108, 116, 178]. Так, наприклад, продемонстровано високу антиоксидантну активність та антимікробну дію як ацетонових і етанольних екстрактів, так і чистої уснівової кислоти, отриманої з сировини румунської заготівлі *C. islandica* [64].

Метанольний екстракт *C. islandica* проявив антиоксидантну дію на моделі окисного стресу та у результаті тесту поглинання радикалів [86, 134, 144].

Дослідження цитотоксичності метанольного екстракту *C. islandica* показали, що концентрації екстракту 50, 100 і 200 мкг/мл викликали генотоксичний ефект у лімфоцитах периферичної крові людини [84].

Вивчення протиракової активності метанольного екстракту *C. islandica*, проведене на клітинних лініях гепатоцелюлярної карциноми людини HepG2 та аденокарциноми молочної залози людини MCF-7, дозволило визначити значення IC_{50} на рівні 19,51 мкг/мл для HepG2 та 181,05 мкг/мл – для MCF-7 [134]. Етанольний екстракт *C. islandica* також стимулював апоптоз клітин раку молочної залози людини MCF-7 [176].

Протоліхестеринова кислота, виділена з *C. islandica* проявляла антипроліферативну активність на клітинних лініях пухлини молочної залози SK-BR-3 і T47D, а також пригнічувала проліферацію клітин множинної

мієломи RPMI 8226 та U266 і карциноми підшлункової залози людини AsPC-1 [53].

Згідно з даними Європейського агентства з лікарських засобів у країнах Європейського Союзу зареєстровані як монопрепарати на основі лікарської сировини *C. islandica*, так і комбіновані засоби у поєднанні з іншими лікарськими рослинами у формі сиропу, збору, льодяників, таблеток та капсул, для лікування запальних процесів верхніх дихальних шляхів, полегшення болю в горлі, кашлю та захриплості [2, 20, 55].

Відповідно до Державного реєстру лікарських засобів України на фармацевтичному ринку України зареєстровано 5 лікарських засобів на основі сировини *C. islandica*, що застосовуються при кашлі та застудних захворюваннях, чинять протикашльову, відхаркувальну, протизапальну, імуностимулюючу та антибактеріальну дію: Гербіон сироп ісландського моху (КРКА, Словенія), пастилки Ісла-Моос та Ісла-Мінт (Енгельгард Арцнайміттель ГмбХ & Ко. КГ, Німеччина), Пектолван фіто ісландський мох у формі рідкого екстракту (АТ «Фармак», Україна) та Екстракт складний відхаркувальний (Фітофарм Кленка С.А., Польща) [14].

Крім того, *C. islandica* є компонентом дієтичних добавок, що сприяють регуляції функції органів дихання: Бронхалік льодяники (ОАО «Фармак», Україна), Фіточай «Ісландський мох» (ООО «Ключи здоров'я», Україна), Фіорда пастилки та Фіорда спрей (ПрАТ «Ліктрави», Україна), Ісландський мох і чабрець сироп (ТОВ «Науково-виробнича фармацевтична компанія «ЕЙМ»), а також дієтичних добавок, що застосовуються при запальних процесах органів дихання: Іслалор пастилки (Stella Nutrition, Польща), Bazooka Ісландський мох еліксир (Delta Medical Promotions AG, Україна), Сироп ісландського моху (Ananta Medicare Ltd, Індія), Ісландський мох фітосироп (ООО «НПЛ «Фітопродукт», Україна), Іслафіліпт таблетки (ТОВ «Здравофарм», Україна) [11, 22].

Сировина та витяжки із *C. islandica* входять до складу кремів, лосьйонів, бальзамів з протизапальною, тонізувальною, протинабряковою,

пом'якшувальною дією, що застосовуються при подразненнях шкіри, куперозі, у комплексному лікуванні вугрової хвороби, а також шампунів, кондиціонерів для зміцнення волосся, зменшення лупи. *C. nivalis* використовується в омолоджувальних кремах як компонент, що збільшує пружність шкіри [11, 180].

Таким чином, вищенаведене свідчить про те, що застосування представників роду *Cetraria* перспективно медицині, фармації, косметології для профілактики та лікування захворювань шкіри, шлунко-кишкового тракту, а також про актуальність створення на їх основі вітчизняних стандартизованих фітопрепаратів різної спрямованості дії: протизапальних, детосиккувальних, онкопротекторних, тощо.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження були 7 серій сланей *C. islandica* та 1 серія сланей *C. aculeata*. Сировина *C. islandica* була зібрана протягом серпня – вересня 2019 р. у соснових та мішаних лісах на території західних областей України (місця та термін заготівлі наведені у табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Місця та термін заготівлі серій сланей *C. islandica*, що використані у дослідженнях

№ серії	Місця збору сировини	Географічні координати місць заготівлі	Термін заготівлі
1	2	3	4
1	Волинська область, Камінь-Каширський район, біля с. Прилісне	51°39'43.5"N, 25°53'60.3"E	Серпень 2019 р.
2	Закарпатська область, Тячівський район, біля с. Чумальово	48°18'01.6"N, 23°54'50.9"E	Вересень 2019 р.
3	Закарпатська область, Ужгородський район, біля с. Ужок	48°98'11.5"N, 22°87'15.6"E	Вересень 2019 р.
4	Закарпатська область, Рахівський район, с. Костилівка	47°98'88.5"N, 24°20'40.3"E	Вересень 2019 р.
5	Івано-Франківська область, Надвірнянський район, біля с. Максимець	48°51'39.6"N, 24°25'69.6"E	Серпень 2019 р.

1	2	3	4
6	Чернівецька область, Сторожинецький район, біля с. Комарівці	48°19'47.9"N, 25°56'10.5"E	Серпень 2019 р.
7	Рівненська область, Сарненський район, біля с-ща Рокитне	51°25'84.1"N, 27°18'94.9"E	Вересень 2019 р.

Сировина *C. aculeata* була зібрана у вересні 2020 р. у сосновому лісі біля м. Зміїв Чугуївського району Харківської області (49°70'49.6"N, 36°35'70.2"E).

Слані лишайників *C. islandica*, та *C. aculeata* збирали з ґрунтового субстрату, висушували до повітряно-сухого стану на відкритому повітрі під накриттям і зберігали у паперових пакетах з етикетками, на яких вказували місце заготівлі, умови зростання і дату збору.

Для дослідження висушені слані подрібнювали за допомогою лабораторного млина ЛЗМ-1 («Оліс», Україна) до розміру частинок 1-2 мм.

2.2 Методи аналізу морфологічної та анатомічної будови сланей

Морфометричне дослідження сланей *C. islandica* та *C. aculeata* проводили за загальноприйнятими методиками [9, 136, 179].

Макроскопічні особливості визначали неозброєним оком та за допомогою лупи $\times 2$, $\times 10$. Для вимірювання розмірів сланей використовували вимірювальні прилади: лінійку та штангенциркуль.

Для виготовлення препаратів з поверхні та поперечних перерізів сланей використовували як повітряно-суху, так і фіксовану у суміші гліцерин-етанол-вода (1:1:1) сировину [26]. Мікроскопічні особливості визначали за допомогою мікроскопа Delta Optical BioLight 300 (Польща) при збільшенні в 40, 100 і 400 разів. Для фіксації результатів використовували відеокамеру DLT-Cam Basic 2,0 mp та комп'ютерну програму DLTCamViewer 2015 з

подальшою обробкою фотографій за допомогою програми Adobe Photoshop CS4 11.0.1.

2.3 Методика визначення компонентного складу АК у сланях *C. islandica*

Визначення компонентного складу вільних та зв'язаних АК у сировині проводили методом ВЕРХ.

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Хроматографічне розділення проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent technologies, USA). Колонка Zorbax AAA довжиною 150 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм, діаметр зерна сорбенту 3 мкм. Мобільна фаза А – 40 mM Na_2HPO_4 pH 7.8; В – $\text{AcCN}:\text{MeOH}:\text{water}$ (45:45:10, v/v/v). Режим розділення градієнтний із постійною швидкістю потоку 1,5 мл/хв. Температура термостату колонки 40 °C. Передколоночну дериватизацію проводили в автоматичному програмованому режимі з використанням FМОС реагенту (Agilent 5061-3337) та ОРА реагенту (Agilent 5061-3335). Детекцію дериватизованих АК проводили за допомогою флуоресцентного детектора [69, 110].

Пробопідготовка сировини.

Вільні АК. Наважку перетертого до порошкоподібного стану препарату поміщали у віалу, додавали 2 мл водного розчину 1N хлористоводневої кислоти та витримували на ультразвуковій бані при 50 °C впродовж 3 год.

Сума вільних та зв'язаних АК. Наважку сировини поміщали у віалу, додавали 2 мл водного розчину 6N хлористоводневої кислоти та поміщали в термостат при 110 °C. Гідроліз проводили впродовж 24 год. 0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на роторному випаровувачі, тричі промиваючи водою очищеною для видалення хлористоводневої кислоти. Ресуспендували в 0,5 мл води очищеної та фільтрували крізь мембранні фільтри із регенерованої целюлози з порами 0,2 мкм.

Отримання флуоресцентних похідних проводили в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку.

Ідентифікацію АК проводили шляхом порівняння часів утримування з сумішшю стандартів АК (Agilent 5061-3334).

Кількісний вміст зв'язаних АК визначали шляхом віднімання значення кількісного вмісту вільних АК від значення кількісного вмісту суми вільних та зв'язаних АК [109].

2.4 Методика визначення складу моносахаридів у сланях *C. islandica*

Визначення компонентного складу вільних та суми вільних та зв'язаних моносахаридів у сировині проводили методом ГХ/МС. Для аналізу вільних та суми вільних та зв'язаних моносахаридів після відповідної пробопідготовки отримували ацетати їх альдонітрильних похідних [91].

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N з мас-спектрометричним детектором 5973inert (Agilent technologies, USA). Колонка капілярна HP-5ms довжиною 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм (Agilent technologies, USA). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури: початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN у діапазоні (38-400 m/z). Як газ-носіє використовувався гелій зі швидкістю потоку крізь колонку 1,2 мл/хв [51].

Пробопідготовка сировини. Наважку 335 мг подрібненої сировини поміщали у круглодонну колбу, додавали 10 мл 80 % етанол із внутрішнім стандартом – D-сорбітолом (Sigma-Aldrich, USA) (500 мкг на пробу). Екстракцію вільних моносахаридів проводили на киплячій водяній бані зі

зворотнім холодильником впродовж 2 год. Після цього відокремлювали 2 мл екстракту, упарювали до видалення розчинників у роторному випаровувачі та ресуспендували додаванням водного розчину внутрішнього стандарту (250 мкг в 2 мл води на пробу).

Для визначення суми вільних та зв'язаних моносахаридів наважку 90 мг подрібненої сировини поміщали у круглодонну колбу та додавали 5 мл 2 М трифтороцтової кислоти. Гідроліз проводили на киплячій водяній бані зі зворотнім холодильником впродовж 6 год. Потім відокремлювали 2 мл гідролізату, упарювали до видалення розчинників, у процесі декілька разів додавали воду з подальшим її видаленням для повного усунення трифтороцтової кислоти. Ресуспендували додаванням водного розчину внутрішнього стандарту (250 мкг в 2 мл води на пробу) [49, 91].

Дериватизація. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів відбирали попередньо оброблені проби витяжки та додавали до кожної по 0,3 мл дериватизувального реактиву (32 мг/мл гідроксиламіну гідрохлориду у суміші піридин/метанол (4:1 v/v)). Отриману суміш витримували у сушильній шафі при 75 °C впродовж 25 хв. Для ацетилювання альдонітрильних похідних моносахаридів додавали 1 мл оцтового ангідриду та витримували у сушильній шафі при 75 °C впродовж 15 хв. До реакційної суміші додавали 2 мл дихлоретану, надлишок дериватизаційних реагентів видаляли послідовною обробкою суміші 1 N розчином кислоти хлористоводневої та водою. Дихлоретановий шар висушували досуха у роторному випаровувачі та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 v/v) [91, 144].

Ідентифікацію моносахаридів досліджуваної суміші проводили шляхом порівняння часів утримування стандартних моносахаридів (Sigma-Aldrich, USA) та з використання бібліотеки мас-спектрів NIST 02.

Кількісний вміст моносахаридів (мг/г) розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_x \times m_{\text{вст}} \times V_{\text{розч}} \times 1000}{S_{\text{вст}} \times m \times V_{\text{екстр}}}, \quad (2.1)$$

де: S_x – площа піку сполуки;

$S_{\text{вст}}$ – площа піку внутрішнього стандарту;

$m_{\text{вст}}$ – наважка внутрішнього стандарту на пробу, мг;

m – наважка зразка, мг;

$V_{\text{розч}}$ – об'єм розчинника для екстракції, мл;

$V_{\text{екстр}}$ – об'єм витяжки для дериватизації, мл [91].

2.5 Методика визначення якісного складу та кількісного вмісту ЖК у сланях *C. islandica*

Визначення компонентного складу ЖК у досліджуваній сировині проводили методом ГХ/МС. Для подальшого аналізу отримували метилові естери ЖК [45].

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA). Колонка капілярна HP-5ms довжиною 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм (Agilent technologies, USA). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкову температуру 60 °С витримували впродовж 4 хв, піднімали з градієнтом 4 °С/хв до 250 °С, витримували 6 хв, з градієнтом 20 °С піднімали до 300 °С, витримували 5 хв. Пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі поділу потоку 1:20. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z). Швидкість потоку газу носія (гелій) через колонку 1,0 мл/хв.

Пробопідготовка сировини. Попередньо подрібнену сировину перетирали до порошкоподібного стану в скляній ступці. після чого наважку 500 мг поміщали в скляну віалу та додавали реакційну суміш метанол-толуол-сірчана кислота (44:20:2 об/об) 3,3 мл на пробу та розчин внутрішнього

стандарту в гептані 1,7 мл. Досліджувану пробу витримували при температурі 80 °С впродовж 2 год, охолоджували до кімнатної температури, центрифугували 10 хв при 5000 об/хв. Відбирали 0,5 мл верхньої гексанової фази, яка містить метилові естери ЖК.

Ідентифікацію метилових естерів ЖК досліджуваної суміші проводили шляхом порівняння часу утримування з даними бібліотеки мас-спектрів NIST 02.

Кількісний вміст розраховували з використанням методу внутрішнього стандарту. Як внутрішній стандарт використовували розчин ундеканової кислоти.

Масу ЖК на 1 кг сировини в мг розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_x \times M_{\text{вст}} \times 1000}{S_{\text{вст}} \times m}, \quad (2.2)$$

де: S_x – площа піку досліджуваної ЖК;

$M_{\text{вст}}$ – маса внутрішнього стандарту на пробу;

$S_{\text{вст}}$ – площа піку внутрішнього стандарту;

m – наважка зразка сировини [45].

2.6 Методика визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти у серіях сланей *C. islandica*

Вміст аскорбінової кислоти встановлювали спектрофотометричним методом за методикою ДФУ 2.0, т. 3 (монографія «Шипшина») [8].

Випробовуваний розчин. 0,500 г свіжоздрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) поміщали у круглодонну колбу, додавали розчин 1,0 г щавлевої кислоти P у 50,0 мл метанолу P , кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджували у льодяній бані до температури (15-20) °С і фільтрували. 2,0 мл фільтрату переносили у конічну колбу місткістю 50 мл, послідовно додавали, обережно струшуючи після кожного додавання, 2,0 мл дихлорфеноліндофенолу стандартного розчину P , потім, точно через 60 с,

0,5 мл розчину 100 г/л тіосечовини P в етанолі (50 %, об/об) P та 0,7 мл динітрофенілгідразину-сірчаної кислоти розчину P , нагрівали зі зворотним холодильником при температурі 50 °С протягом 75 хв і відразу поміщали у льодяну баню протягом 5 хв. Додавали краплями 5,0 мл суміші 12 мл води P і 50 мл сірчаної кислоти P , проводячи додавання за період не менше 90 с і не більше 120 с, енергійно струшуючи колбу у льодяній бані. Витримували протягом 30 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну густину (2.2.25) за довжини хвилі 520 нм, використовуючи розчин А як компенсаційну рідину.

Розчин А. 2,0 мл фільтрату, отриманого при приготуванні випробовуваного розчину, обробляли як описано вище, додаючи динітрофенілгідразину-сірчаної кислоти розчин P безпосередньо перед вимірюванням оптичної густини.

Розчин порівняння. 40,0 мг аскорбінової кислоти P розчиняли у свіжоприготованому розчині 20 г/л щавлевої кислоти P у метанолі P , доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 5,0 мл отриманого розчину доводили свіжоприготованим розчином 20 г/л щавлевої кислоти P у метанолі P , до 100,0 мл. 2,0 мл отриманого розчину обробляли, як описано вище для фільтрату, отриманого при приготуванні випробовуваного розчину.

Оптичну густину (2.2.25) вимірювали за довжини хвилі 520 нм, використовуючи розчин В як компенсаційну рідину.

Розчин В. 2,0 мл розчину порівняння обробляли, як описано вище для розчину А.

Вміст аскорбінової кислоти, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$\frac{2,5 \times A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1}, \quad (2.3)$$

де: A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

A_2 – оптична густина розчину порівняння;

m_1 , – маса наважки випробовуваної сировини, г;

m_2 – маса наважки аскорбінової кислоти, г.

2.7 Методика визначення кількісного вмісту суми органічних кислот у серіях сланей *C. islandica*

Кількісне визначення суми органічних кислот проводили титриметричним методом за методикою монографії «Шипшини плоди^N» ДФУ 2.1 [8] з використанням 0.1 М розчину натрію гідроксиду та фенолфталеїну в перерахунку на яблучну кислоту.

25,0 г здрібненої на порошок сировини (1000) (2.9.12) поміщали у колбу місткістю 250 мл, заливали 200 мл води *P* і витримували протягом 2 год на киплячій водяній бані, охолоджували і кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл, доводили об'єм витяжки водою *P* до позначки і перемішували. Відбирали 10 мл витяжки, поміщали у колбу місткістю 500 мл, додавали 200-300 мл води *P*, 1 мл фенолфталеїну розчину *P1*, 2 мл розчину 1 г/л метиленового синього *P* та титрували 0,1 М розчином натрію гідроксиду до появи в піні світло-фіолетово-червоного забарвлення.

Вміст органічних кислот, в перерахунку на яблучну кислоту, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{V \times 0,0067 \times 2500}{m}, \quad (2.4)$$

де: 0,0067 – кількість яблучної кислоти, що відповідає 1 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, г;

V – об'єм 0,1 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування, мл;

m – маса наважки випробовуваної сировини, г.

2.8 Методика визначення якісного складу та кількісного вмісту сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica*

Визначення якісного складу сполук, що переганялися з водяною парою, у сировині проводили за допомогою методу ГХ/МС [27, 118].

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA). Колонка капілярна HP-5ms, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 мкм. Розділення проводили у градієнтному режимі. Початкова температура 50°C витримувалась впродовж 5 хв з наступним градієнтом 4 °C/хв до 220 °C, градієнт 10 °C до 300 °C – витримували впродовж 10 хв. Швидкість потоку газу-носія (гелій) крізь колонку 1,0 мл/хв. Температура випаровувача 300 °C, режим вводу проби з поділом потоку з коефіцієнтом 1:50, об'єм інжекції 2 мкл. Детектування проводили в режимі SCAN у діапазоні (38-400 m/z) [57, 106].

Пробопідготовка сировини. Попередньо подрібнену сировину перетирали до порошкоподібного стану в скляній ступці. Після чого до 5,00 г (точна наважка) сировини додавали 300 мл води очищеної та переганяли зі зворотним холодильником при температурі 100 °C впродовж 3 год. Відігнані води екстрагували гептаном. Витяжку упарювали до 100-200 мкл у потоці азоту [124].

Ідентифікацію сполук, що переганялися з водяною парою, у досліджуваних пробах проводили з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Відсоток співпадань виявлених сполук із тими, що є в бібліотеці мас-спектрів NIST 02, становив 80-99 %.

Кількісний вміст розраховували по відношенню площі піків компонентів до суми площ усіх піків на хроматограмі [106, 118].

2.9 Методика визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у серіях сланей *C. islandica*

Кількісне визначення суми поліфенолів у серіях сировини проводилось спектрофотометричним методом за довжини хвилі 760 нм у перерахунку на пірогалол та суху сировину відповідно до вимог монографії «Деревію трава^N» ДФУ 2.3 (2.8.14) [8].

Випробовуваний розчин. 1000,0 мг здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщали у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води *P*, нагрівали протягом 30 хв на водяній бані, охолоджували під проточною водою та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл. Круглодонну колбу обполіскували водою *P*, промивні води переносили у мірну колбу та доводили об'єм розчину водою *P* до 250,0 мл. Давали осаду осісти та фільтрували рідину крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм, відкидаючи перші 50 мл фільтрату.

5,0 мл отриманого фільтрату доводили водою *P* до об'єму 25,0 мл. До 2,0 мл отриманого розчину додавали 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву P*, 10,0 мл води *P*, перемішували після кожного додавання, та доводили *натрію карбонату розчином P* до об'єму 25,0 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину воду *P*.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг *ФСЗ ДФУ пірогалолу* розчиняли у воді *P* і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 5,0 мл отриманого розчину доводили водою *P* до об'єму 100,0 мл.

До 2,0 мл отриманого розчину додавали 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву P*, 10,0 мл води *P*, перемішуючи після кожного додавання, та доводили *натрію карбонату розчином P* до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину воду *P* [30].

Вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у відсотках розраховували за формулою:

$$\frac{62,5 \times A_1 \times m_2 \times P}{A_0 \times m_1 \times 100}, \quad (2.5)$$

де: A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_1 – маса наважки випробовуваної сировини, мг;

m_2 – маса наважки ФСЗДФУ пірогалолу, мг;

P – вміст пірогалолу у ФСЗДФУ пірогалолу, %.

2.10 Методика визначення якісного складу флавоноїдів у сланях *C. islandica*

Визначення компонентного складу флавоноїдів проводили методом ВЕРХ.

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Хроматографування здійснювали на хроматографі Agilent Technologies 1200 (USA). Як рухомих фаз використовували ацетонітрил (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти в воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30 %) : В (70 %); 20 хв – А (70 %) : В (30 %); 22 хв – А (100 %) : В (0 %); 30 хв – А (100 %) : В (0 %). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150 × 4,6 мм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку крізь колонку 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 280 та 365 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [111].

Пробопідготовка сировини. Наважку сировини кожної проби 0,3-0,6 г, екстрагували в 5 мл 70 % розчину етанолу на ультразвуковій бані при 80 °С впродовж 5 год в скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою.

Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Ідентифікацію проводили з використанням розчинів стандартних зразків флавоноїдів (рутину, кверцетин-3-*b*-глікозиду, нарінгіну, неогесперідину, кверцетину, нарінгеніну, кемпферолу, лютеоліну).

Кількісний вміст флавоноїдів (X , мкг/г) визначали за формулою:

$$X = \frac{c \times V}{m}, \quad (2.6)$$

де: c – концентрація сполуки, визначена хроматографічно, мкг/мл;

V – об'єм витяжки, мл;

m – маса сировини з якої проводили екстракцію, г [111].

2.11 Методика визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у сировині

Кількісне визначення суми флавоноїдів проводили за методикою монографії ДФУ 2.2 «Сафлору квітки» спектрофотометричним методом за довжини хвилі 505 нм та у перерахунку на гіперозид [8].

Вихідний розчин. 4,00 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщали у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали 1 мл розчину 5 г/л гексаметилентетраміну P , 20 мл ацетону P і 2 мл хлористоводневої кислоти $P1$. Отриману суміш кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30 хв і фільтрували крізь тампон із вати у колбу місткістю 100 мл. Додавали тампон із вати до залишку у круглодонну колбу й екстрагували трьома порціями, по 20 мл кожна, ацетону P , кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв і охолоджували до кімнатної температури. Кожну витяжку фільтрували крізь тампон із вати у колбу. Після охолодження об'єднані ацетонові витяжки фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу та доводили об'єм розчину ацетоном P до 100 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр. 20,0 мл отриманого розчину поміщали у ділильну лійку, додавали 20 мл води P і струшували суміш із 15 мл етилацетату P , а потім із

трьома порціями, по 10 мл кожна, *етилацетату Р*. Отримані етилацетатні витяжки об'єднували у ділильній лійці, промивали двома порціями, по 50 мл кожна, *води Р*, фільтрували над 10 г *натрію сульфату безводного Р* у мірну колбу та доводили об'єм розчину *етилацетатом Р* до 50,0 мл.

Випробовуваний розчин. До 10,0 мл вихідного розчину додавали 1 мл алюмінію хлориду реактиву *Р* і доводили розчином 5 % (об/об) *оцтової кислоти льодяної Р* у *метанолі Р* по об'єму 25,0 мл.

Компенсаційний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводили розчином 5 % (об/об) *оцтової кислоти льодяної Р* у *метанолі Р* до об'єму 25,0 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірювали через 30 хв після приготування за довжини хвилі 425 нм відносно компенсаційного розчину. Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у відсотках, визначали за формулою:

$$\frac{A \times 1,25}{m}, \quad (2.7)$$

де: *A* – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм,

m – маса наважки випробуваної сировини, г.

Використовували питомий показник поглинання гіперозиду, що дорівнює 500.

2.12 Методика визначення якісного складу та кількісного вмісту карбонових кислот у сировині

Визначення компонентного складу карбонових кислот проводили методом ВЕРХ.

Обладнання та умови хроматографічного розділення. Рідинну хроматографію проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200 (USA). В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти в воді (В). Елюювання проводили в градієнтному

режимі: 0 хв – А (25 %) : В (75 %); 25 хв – А (75 %) : В (25 %); 27 хв – А (100 %) : В (0 %); 35 хв – А (100 %) : В (0 %). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм × 150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку через колонку 0,5 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 250 та 275 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [96].

Пробопідготовка сировини. Наважку сировини кожної проби 0,4-06 г, екстрагувалася в 5 мл 60 % розчину метанолу на ультразвуковій бані при 80 °С впродовж 4 год в скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою. Отриманий екстракт центрифугували при 3 тис об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Ідентифікацію проводили з використанням розчинів стандартних зразків карбонових кислот (галової, гідроксифенілоцтової, хлорогенової кислоти, кофеїної, сирінгової, *n*-кумарової, *trans*-ферулової, синапової, *trans*-цинамової, хінної кислоти).

Кількісний вміст карбонових кислот (X , мкг/г) визначали за формулою:

$$X = \frac{c \times V}{m}, \quad (2.8)$$

де: c – концентрація сполуки, визначена хроматографічно, мкг/мл;

V – об'єм витяжки, мл;

m – маса сировини з якої проводили екстракцію, г.

2.13 Хромато-мас спектри реєстрували за допомогою пристрою Agilent 1100 HPLC з діодним матричним детектором.

2.14 ^1H та ^{13}C ЯМР-спектри реєстрували на спектрометрі Varian WXR (^1H : 500 МГц, DMSO-d_6 ; ^{13}C : 126 МГц, CDCl_3) з використанням ТМС як внутрішнього стандарту (хімічний зсув, м.ч.).

2.15 Методика визначення загальної золи у сланях *C. islandica*

Визначення вмісту загальної золи у серіях сланей проводили відповідно до вимог монографії «Загальна зола» (2.4.16) ДФУ 2.0 [9].

2.16 Методика визначення елементного складу у сланях *C. islandica*

Елементний склад сировини досліджували методом атомно-абсорбційної спектрометрії з фотографічною реєстрацією за загальноприйнятою методикою [50].

Дослідження проводили на базі НТК «Інститут монокристалів» НАН України (м. Харків).

Зразки сировини, попередньо оброблені сірчаною кислотою, обвуглювалися при нагріванні у муфельній печі (температура не вище 500 °С). Випарювання зразків проводили з кратерів графітових електродів у розряді дуги змінного струму (джерело збудження спектрів типу ІВС-28) силою 16 А при витримці 60 с. Отримання та реєстрацію спектрів на фотопластинках проводили на спектрографі ДЕС-8 з дифракційною ґраткою 600 штр/мм. Вимірювання інтенсивності емісійних ліній у спектрах аналізованих та калібрувальних зразків (КЗ) проводили за допомогою мікрофотометра МФ-1.

Фотографування спектрів проводили за наступних умов: дуга змінного струму – 16А, фаза запалювання – 60 °С, частота імпульсів запалювання – 100 біт/с; аналітичний інтервал – 2 мм; ширина щілини спектрографа – 0,015 мм; експозиція – 60 с. Спектри фотографували в діапазоні довжин хвиль 230-330 нм. Фотопластинки проявляли, сушили, потім спостерігали емісійні лінії (нм) у спектрах аналізованих та калібрувальних зразків, а також фон навколо них [29].

Для кожного елемента розраховували різницю почорніння між емісійною лінією та фоном ($S = S_{\lambda} + \phi - S_{\phi}$) для спектрів аналізованих зразків

(Sin) та калібрувальних зразків (SK3). Потім будували калібрувальний графік у координатах: середнє значення різниці почорніння між емісійною лінією і фоном (S) – логарифм вмісту елемента у калібрувальному зразку ($\lg C$), де C було виражено у відсотках. За цим графіком розраховували вміст елемента в золі (a, %) [17].

Вміст елемента у сировині (X, %), розраховували за формулою:

$$X = \frac{a \times m}{M}, \quad (2.9)$$

де: m – маса золи, г;

M – маса сировини, взятої на аналіз, г;

a – вміст елемента в золі, % [50].

2.17 Методики визначення основних технологічних показників сланей *C. islandica*

Визначення об'ємної густини. Об'ємну густину d_0 (г/см³) визначали як співвідношення маси неподрібненої сировини за природної або наведеної вологості до її повного об'єму, разом з щілинами, порами та капілярами, що заповнені повітрям.

Визначення насипної густини. Насипну густину (d_n) визначали як відношення маси подрібненої сировини за природної або наведеної вологості до повного об'єму, який займає сировина разом з порами частинок та вільним об'ємом між ними.

Визначення питомої маси. Питома маса (d_y) є відношенням маси абсолютно сухої подрібненої сировини до об'єму рослинної тканини.

Визначення пористості сировини. Пористість (P_c) сировини характеризує величину внутрішнього вільного простору частинок сировини і визначається як відношення різниці між питомою масою та об'ємною густиною до питомої маси.

Визначення порізності сировини. Порізність (P_{cl}) шару характеризує величину вільного простору між частинками рослинного матеріалу та визначається як відношення різниці між об'ємною та насипною густиною до об'ємної густини.

Визначення вільного об'єму шару. Вільний об'єм шару (V) характеризує відносний об'єм вільного простору в одиниці матеріалу сировини (внутрішній вільний простір частинок та між частками) та визначається як відношення різниці між питомою масою і насипною густиною до питомої маси

2.18 Методика визначення втрати в масі при висушуванні сланей *C. islandica*

Визначення втрати в масі при висушуванні сировини проводилось з використанням аналізатора вологості марки «Sartorius» MA–150, виробництва концерну «Sartorius» AG, Німеччина. Досліджувану наважку сировини у кількості близько 5,0 г (точна наважка) висушували за температури 120 °C впродовж 3 год. Насипний об'єм— величину, яка є здатністю рослинного матеріалу до (V_0) та після усадки (V_{1250} або V_{2500}), визначали при 10, 500, 1250 та 2500 зіскоків градуїзованого циліндра.

2.19 Методика визначення мікробіологічної чистоти субстанції

Перевірку придатності методики проводили відповідно до вимог ДФУ 2.1 (п. 2.6.12, п. 2.6.13).

Для перевірки придатності запропонованої для випробувань методики використовували наступні штами тест-мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella typhimurium* ATCC 55; *Candida albicans* ATCC 885-653 та *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Зразок екстракту густого в умовах випробування на мікробіологічну

чистоту, зазначених в ДФУ 2.0 (методом висівання на живильні середовища із розведенням препарату у співвідношенні 1:10 в фосфатному буферному розчині з натрію хлоридом та пептоном при рН 7,0) проявляв антимікробну активність по відношенню до тест-штамів *S. aureus* ATCC 6538 (на густому живильному середовищі № 1 та на рідкому живильному середовищі № 8), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (на рідкому живильному середовищі № 8), та не проявляв антимікробну активність по відношенню до тест-мікроорганізмів *B. cereus* ATCC 10702 (на густому живильному середовищі № 1), *E. coli* ATCC 25922 (на густому живильному середовищі № 1 та рідкому живильному середовищі № 3), *S. typhimurium* ATCC 55 (на рідкому живильному середовищі № 3), *C. albicans* ATCC 885-653 (на густому живильному середовищі № 2) та *A. niger* ATCC 16404 (на густому живильному середовищі № 2).

З метою перевірки придатності методики визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів зразок препарату готували відповідно до методики, використовуючи фосфатний буферний розчин з натрію хлоридом та пептоном при рН 7,0, що містить 30 г/л полісорбату–80, та від 10 до 100 КУО/мл монокультур кожного з тест-мікроорганізмів відповідно до вимог ДФУ 2.0 (п. 2.6.12, N).

Підготовлені зразки висівали на живильні середовища відповідно до методики. Далі підраховували число колоній тест-мікроорганізмів на чашках Петрі, за присутністю або відсутністю випробуваного зразка, після проведення інкубації посівів.

Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) має бути не більше 10^4 КУО/г (ДФУ 2.1 п. 2.6.12, п. 5.1.8). Загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) має бути не більше 10^2 КУО/г (ДФУ 2.1 п. 2.6.12, п. 5.1.8). Не більше 10^2 толерантних до жовчі грамнегативних бактерій в 1,0 г (ДФУ 2.1 п. 2.6.31, п. 5.1.8).

Дослідження проводили під керівництвом професорки кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти, д. мед. н , проф. Савінової Олени Михайлівни.

2.20 Методика дослідження спектру антимікробної активності *C. islandica* сланей екстракту густого

Антимікробну активність визначали методом дифузії в агар по відношенню до наступних штамів мікроорганізмів: *S. aureus* ATCC 25923 та *S. aureus* ATCC 6538, *P. vulgaris* 4636, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 885/653, *S. pyogenes* Dick-1.

Дослідження по визначенню антимікробної активності екстракту густого проводили під керівництвом професорки кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти, д. мед. н., проф. Савінової Олени Михайлівни.

При оцінюванні здатності досліджуваного зразка проявляти антибактеріальну активність були застосовані наступні критерії:

- мікроорганізм нечутливий до засобу;
- зони затримки росту відсутні або діаметр не більше 10 мм – мала чутливість, діаметр затримки росту 10-15 мм;
- мікроорганізм чутливий до засобу, діаметр зон затримки росту 15-25 мм; – висока чутливість, діаметр зон затримки росту більше 25 мм.

2.21 Методика дослідження АРА різних витяжок сланей *C. islandica* та *C. islandica* сланей екстракту густого

Дослідження АРА проводили в дослідах *in vitro*, вимірюючи оптичну густину розчину радикала 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (DPPH) (0,04 мг/мл) до та після додавання досліджуваних тест-зразків екстрактів з використанням методу абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda=520$ нм. Значення АРА обчислювали за формулою:

$$АРА, \% = [(А_{\text{контр}} - А_{\text{екстр}})] / (А_{\text{контр}}) \times 100 , \quad (2.10)$$

де: $A_{\text{контр}}$ – оптична густина спиртового розчину DPPH;

$A_{\text{екстр}}$ – оптична густина спиртового розчину DPPH після додавання досліджуваного екстракту густого.

Як препарати порівняння були використані аскорбінова кислота ($АРА=95,38\%$), кверцетин ($АРА=80,72\%$) та дигідрокверцетин ($АРА=82,13\%$) [25].

РОЗДІЛ 3

МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВИНИ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CETRARIA*

3.1 Встановлення ознак морфологічної та анатомічної будови серій сланей *C. islandica*

У літературних джерелах є відомості про результати вивчення морфологічної та анатомічної будови *C. islandica*, але при цьому не вказані місце заготівлі сировини та кількість досліджуваних серій (Сіра, 2012) [28].

Перш ніж провести дослідження ми проаналізували дані, наведені у монографіях на слані *C. islandica*, що входять до низки фармакопей різних країн [6, 8, 61, 179]. Монографія «Цетрарія ісландська» також входить до Державної фармакопеї України 2.0, але не містить національної частини [8]. Вищезгадані документи регламентують якість сировини *C. islandica* для використання як лікарської за морфологічними ознаками, вмістом сторонніх домішок і свинцю, втратою в масі при висушуванні, відсотком загальної золи та показником набухання. Монографії фармакопей не регламентують кількісний вміст БАР у сировині та не містять розділу «Кількісне визначення» [6, 8, 61, 179].

У табл. 3.1 наведена порівняльна характеристика макро- і мікроскопічних параметрів сланей *C. islandica*, що включені до монографій фармакопей України [8], Європейського Союзу [179], Великої Британії [61] і Республіки Казахстан [6]. Згідно з даними, наведеними у табл. 3.1, більшість описів ознак морфологічної та анатомічної будови сланей *C. islandica* є спільними для монографій фармакопей різних країн. Монографії фармакопей України, Європейського Союзу, Великої Британії та Республіки Казахстан регламентують сировину за 13 макроскопічними та 7 мікроскопічними ознаками. Але не наведено розміри фрагментів сланей, що присутні у сировині та неповно описано краї лопатей сланей.

Таблиця 3.1

**Порівняльна характеристика морфолого-анатомічних показників
сланей *C. islandica*, зазначених у фармакопеях різних країн**

Параметр	Державна Фармакопея України 2.0 [8]	Європейська Фармакопея 6.0. [179]	Британська Фармакопея [61]	Фармакопея Республіки Казахстан [6]
1	2	3	4	5
Макроскопічні ознаки				
Сировина	Цілі або різані, висушені слані <i>C. islandica</i>	Цілі або різані, висушені слані <i>C. islandica</i>	Цілі або різані, висушені слані <i>C. islandica</i>	Цілі або різані, висушені слані <i>C. islandica</i>
Розміри слані				
Довжина	Близько 15 см	До 15 см	До 15 см	До 15 см
Ширина лопатеї	0,3-1,5 см	0,3-1,5 см	0,3-1,5 см	0,3-1,5 см
Товщина лопатеї	0,5 мм	0,5 мм	0,5 мм	0,5 мм
Галуження	Неправильне дихотомічне	Неправильне дихотомічне	Неправильне дихотомічне	Нерівномірно- дихотомічне
Характер поверхні слані	Гола, борозенчаста або майже плоска, жорстка, крихка	Гладенька, борозенчаста або майже плоска, жорстка, ламка	Гладенька, борозенчаста або майже плоска, жорстка, ламка	Гладенька, жолобоподібна
Колір слані				
Верхня поверхня	Зеленуватий або зеленувато- коричневий	Зеленуватий або зеленувато- коричневий	Зеленуватий або зеленувато- коричневий	Зеленуватий або зеленувато- коричневий
Нижня поверхня	Сірувато-білий або світло- коричневий	Сірувато-білий або світло- коричневий	Сірувато-білий або світло- коричневий	Сірувато-білий або світло- коричневий

1	2	3	4	5
Війки	По краям лопатей	По краям лопатей	По краям лопатей	По краям лопатей
Псевдоци-фели	Білуваті, вдавнені плями	Білуваті, вдавнені плями	Білуваті, вдавнені плями	Білуваті, вдавнені плями
Апотеції				
Розташування	На верхівках кінцевих лопатей, дуже рідко	На верхівках термінальних лопатей, дуже рідко	На верхівках термінальних лопатей, дуже рідко	На верхівках розгалужених долей слані, дуже рідко
Колір	Коричневі	Коричневі	Коричневі	Коричневі
Форма	Дископодібні	Дископодібні	Дископодібні	Дископодібні
Мікроскопічні ознаки				
Фрагменти псевдопаренхіми				
Гіфи крайового шару	Вузькопорожні, товстостінні	Вузькопорожні, товстостінні	Вузькопорожні, товстостінні	Вузькопорожні, товстостінні
Гіфи сусіднього шару	Широкопорожні, вільно переплетені	Широкопорожні, вільно переплетені	Широкопорожні, вільно переплетені	Широкопорожні, вільно переплетені
Клітини водоростей				
Розташування	У середній зоні	У серцевинній зоні	У серцевинній зоні	У серцевинній зоні
Колір	Зеленуваті або коричнюваті	Зеленуваті або коричнюваті	Зеленуваті або коричнюваті	Зеленуваті або коричнюваті
Розміри	15 мкм у діаметрі	15 мкм у діаметрі	15 мкм у діаметрі	15 мкм у діаметрі
Спермогонії				
Форма	Трубчаста або циліндрична	Трубкаподібні або циліндричні	Трубкаподібні або циліндричні	Трубкаподібні або циліндричні
Розміри	Ширина 160 мкм, довжина 400 мкм	Ширина до 160 мкм, довжина до 400 мкм	Ширина до 160 мкм, довжина до 400 мкм	Ширина до 160 мкм, довжина до 400 мкм

3.1.1 Фракційний склад серій сланей *C. islandica*

Зовнішній вигляд 7 серій сировини ц. ісландської наведено на рис 3.1, А. Вага серій коливалася від 525 г (серія 2) до 533 г (серія 4). У складі кожної серії виділено фракції сировини за розмірами сланей, а також вміст мінеральних та органічних домішок. Фракційний склад серії сировини на прикладі серії 1 наведено на рис 3.1, Б.



А



Б

Рис. 3.1 Зовнішній вигляд сланей *C. islandica*: серії сировини (А); фракційний склад серії 1 (Б)

Сировина була представлена цілими сланями та їх частинами переважно прямокутної чи квадратної форми різних розмірів. Можна було виокремити

цільні слані завдовжки 6-10 см, 4-6 см та 3-4 см та окремі лопаті або їх фрагменти довжиною 1-2 см і менше 1 см. Співвідношення фракцій у серіях сировини є нерівномірним (рис. 3.2) [40].

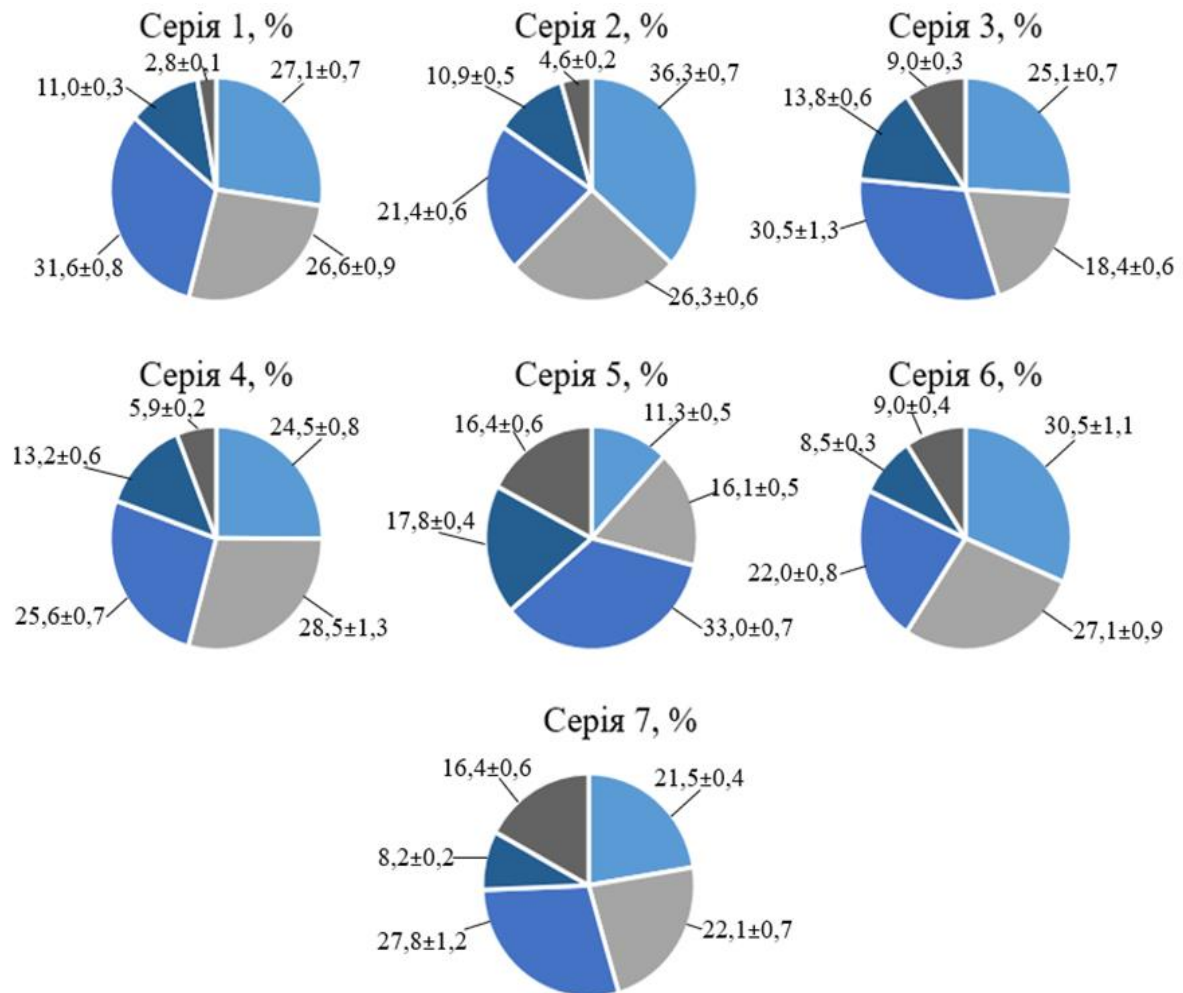


Рис. 3.2 Розподіл фракцій у серіях сировини за розмірами фрагментів (n=3): ■ – 6–10 см; ■ – 4–6 см; ■ – 3–4 см; ■ – 1–2 см; ■ – менше 1 см

Так, вміст сланей довжиною 3-4 см переважає у серіях 1 ($31,6 \pm 0,8$ %); 3 ($30,5 \pm 1,3$ %); 5 ($33,0 \pm 0,7$ %); і 7 ($27,8 \pm 1,2$ %). Найбільша кількість сланей довжиною 6-10 см спостерігалась у серіях 2 ($36,3 \pm 0,7$ %) і 6 ($30,5 \pm 1,1$ %). У серії 4 переважали слані довжиною 4-6 см ($28,5 \pm 1,3$ %).

Монографія ДФУ 2.0 регламентує вміст сторонніх домішок у сланях *C. islandica* не більше 5 % [8]. Нами вперше було диференційовано сторонні домішки на частки мінерального та органічного походження. Мінеральні домішки включали в себе пил, пісок, невеликі камінці, їх вміст становив від $0,22 \pm 0,01$ % (серія 2) до $2,80 \pm 0,12$ % (серія 5) (рис. 3.3) [36, 40].

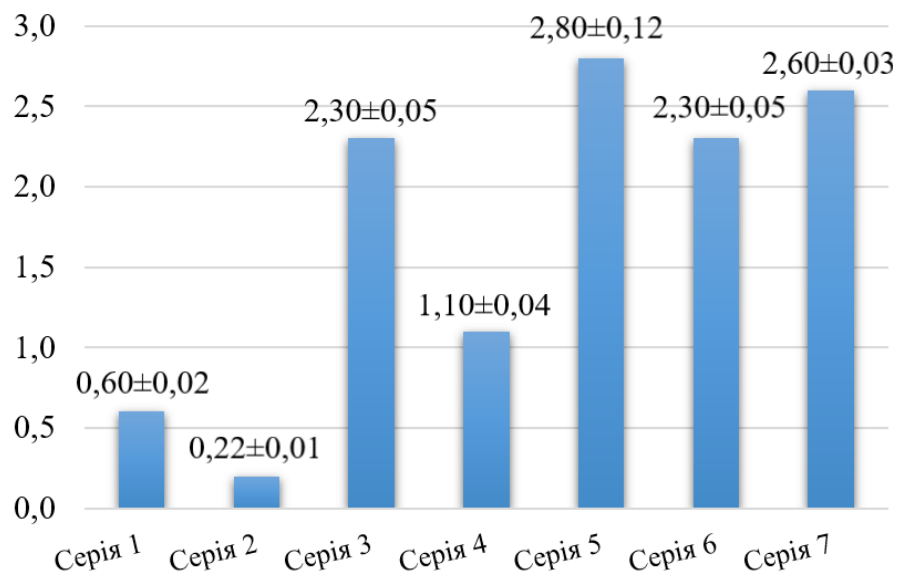


Рис 3.3 Вміст мінеральних домішок у серіях сировини *C. islandica* (n=3)

Органічні домішки були представлені частинами інших видів рослин: гілки та листя дерев, голки хвойних, фрагменти мохо- і плауноподібних. Компонентний склад та кількісний вміст органічних домішок у кожній із серій наведено у табл 3.2.

Вміст органічних домішок у досліджуваних серіях сировини *C. islandica* коливався у межах від $0,15 \pm 0,01$ % (серія 6) до $2,14 \pm 0,11$ % (серія 5). Загальний вміст сторонніх домішок у серіях не перевищував 5 %, регламентовані монографією ДФУ 2.0 [40].

Вміст органічних домішок у серіях сировини *C. islandica* (n=3)

№ серії	Компонентний склад органічних домішок, %				Загальний вміст органічних домішок, %
	Листя	Гілки	Голки хвойних дерев	Інші види рослин	
1	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,25 ± 0,02
2	0,01 ± 0,00	0,20 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,27 ± 0,02
3	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,52 ± 0,02
4	0,02 ± 0,00	—	0,81 ± 0,04	0,01 ± 0,00	0,83 ± 0,04
5	0,80 ± 0,04	0,20 ± 0,01	1,12 ± 0,06	0,02 ± 0,00	2,14 ± 0,11
6	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,15 ± 0,01
7	—	0,08 ± 0,01	1,40 ± 0,03	—	1,48 ± 0,04

Примітка: «—» -домішки відсутні

3.1.2 Встановлення морфологічних ознак серій сланей *C. islandica*

Особливості морфологічної будови наведені на рис. 3.4. Сировина являє собою листуваті слані, що мають багато лопатей, добре розгалужені, але дихотомічне галуження чітко не прослідковується, що більш помітно на розправлених лопатях (рис. 3.4, А). Лопаті пласкі, тонкі, вузькі біля основи, розширені на верхівці, сильно увігнуті й загорнуті по краях, іноді майже утворюють трубку, переплетені між собою.

Важливою характерною ознакою, що не зазначена у розділі «Ідентифікація А» монографії ДФУ 2.0 є те, що у деяких місцях лопаті зростаються за допомогою перетинок, що допомагає слані щільно тримати форму і вертикальне положення у просторі (рис. 3.4, Б).

Довжина слані зазвичай не перевищувала 10 (12) см (рис. 3.4, В), що не співпадає з описаною у монографії ДФУ 2.0 довжиною у 15 см (табл 3.1). Ширина лопатей у досліджуваних серіях становила 0,2-4,0 см (рис. 3.3, Г), на відміну від 0,3-1,5 см, зазначених у монографії ДФУ 2.0 (табл. 3.1). Товщина лопатей – приблизно 0,5 мм, що відповідає заявленому у монографії ДФУ 2.0 (табл 3.1). Висушені слані ламкі, мають жорстку і хрящувату структуру. Поверхня лопатей зморшкувата, зібрана у складки, з невеликими жолобами та заглибленнями.

Верхній бік слані темніший, від зеленувато-сірого до бурувато-коричневого кольору. Нижній – світліший, від сірувато-оливкового до коричневого кольору. Іноді присутні ризини, за допомогою яких відбувається прикріплення слані до ґрунту. Згодом органи прикріплення відмирають, внаслідок чого основа слані набуває червонуватого кольору (рис. 3.4, Д), а утримання на субстраті відбувається за допомогою зв'язків з іншими видами рослин, що утворюють дернину [39].

По усій площині нижньої поверхні слані зустрічаються псевдоцифели – структури, не покриті коровим шаром, що сприяють обміну води та повітря між лишайником і навколишнім середовищем. Псевдоцифели чітко окреслені, ледь вдавлені, білуваті, різної форми та розмірів, більша кількість спостерігається на вершинах лопатей (рис. 3.4, Е). Іноді псевдоцифели покриті зернистими виростами – ізидіями (з коровим шаром) або соредіями (без корового шару).

По краю лопатей розташовані жорсткі, прямі, щетиноподібні війки довжиною 0,1-1,0 мм. Більшість війок прості, але зустрічаються і розгалужені. (рис. 3.4, Ж). Така важлива діагностична ознака як розгалуженість війок нами встановлена вперше і раніше не вказувалася в описах сировини. Колір війок зазвичай співпадає з кольором лопатей: від сіро-оливкового до темно-коричневого.

На верхній поверхні лопатей зрідка зустрічаються апотеції блюдцеподібної форми на коротких ніжках діаметром до 10,0 мм (рис. 3.4, З).

Диски темно-коричневі, опуклі, зморшковаті, з цільним або переривчастим краєм.



Рис. 3.4 Особливості морфологічної будови слані *C. islandica*: А – зовнішній вигляд лопатей одної слані у розправленому вигляді; Б – місце зростання лопатей за допомогою перетинок; В – зовнішній вигляд та розміри

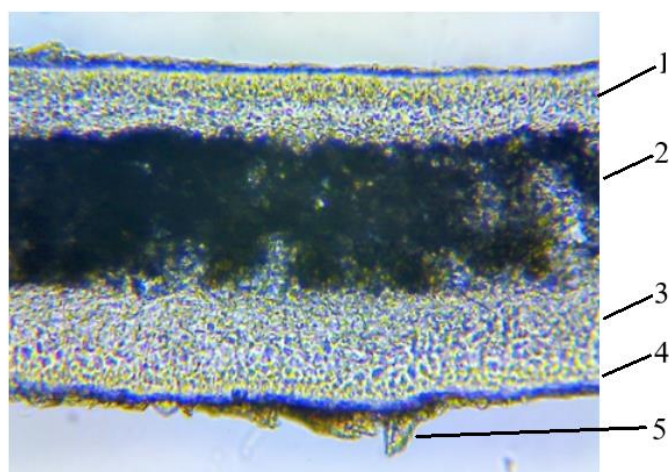
окремих сланей; Г – зовнішній вигляд та розміри окремих лопатей; Д – основа слані; Е – псевдоцифели на нижній поверхні слані; Ж – прості та розгалужені війки по краю лопатей; З – апотеції на верхній поверхні лопаті

3.1.3 Встановлення анатомічних ознак серій сланей *C. islandica*

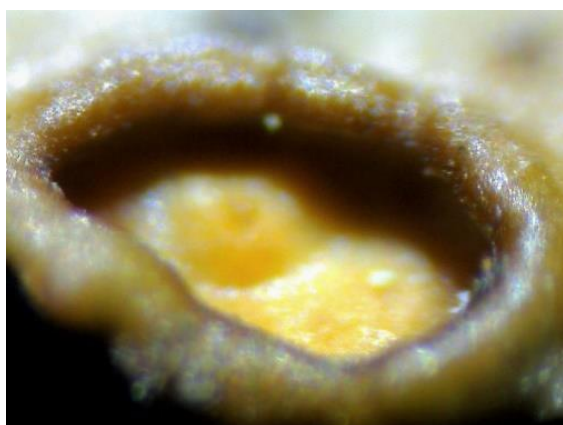
Особливості анатомічної будови слані *C. islandica* наведено на рис. 3.5. Тип слані гетеромерний, тобто можна окремо виділити гонідіальний шар, у якому сконцентровані клітини водоростей, та серцевинний шар. На поперечних перерізах сланей можна виділити чітко диференційовані структури, розташовані згори донизу (рис. 3.5, А). Верхній коровий шар являє собою прозоплектенхіму – переплетення витягнутих (анізодіаметричних) клітин гіф мікобіонта (рис. 3.5, А.1).

Під коровим шаром розташований гонідіальний шар, поділений на окремі фрагменти з груп клітин водоростей, оточених розгалуженнями грибних гіф (рис. 3.5, А.2). Розташований нижче серцевинний шар складається з переплетених гіф мікобіонта і утворює пухку плектенхіму (рис. 3.5, А.3). Нижній коровий шар складається зі щільно переплетених грибних гіф (рис. 3.5, А.4). Іноді зустрічаються ризини – багатоклітинні вирости нижнього корового шару, що проникають у субстрат і виконують функцію прикріплення слані (рис. 3.5, А.5).

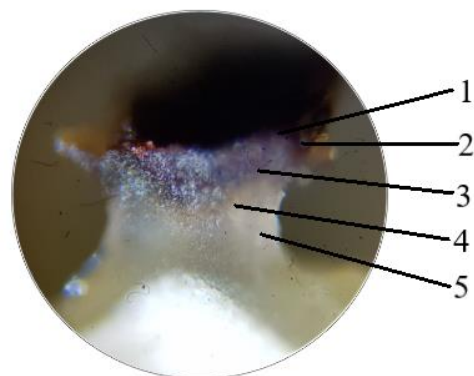
Апотеції леканорового типу, тобто мають добре розвинений сланевий край (рис. 3.5, Б), у якому можна виділити шар клітин водоростей та серцевину. Поверхня апотеція вкрита тонким шаром – епітецієм, що виконує захисну функцію (рис. 3.5, В.1). Під ним розташований гіменій (тецій) – генеративна частина апотеція, у якій знаходяться сумки зі спорами (рис. 3.5, В.2). Нижче знаходиться стерильна частина апотеція – гіпотецій (рис. 3.5, В.3). Під гіпотецієм, а також по периферії диска апотеція знаходиться переривчастий шар клітин водоростей (рис. 3.5, В.4), нижче за ним – серцевинний шар, утворений гіфами мікобіонта (рис. 3.5, В.5).



А



Б



В

Рис. 3.5 Особливості анатомічної будови слані *C. islandica*: А – поперечний зріз слані гетеромерного типу: А.1 – верхній коровий шар; А.2 – гонідіальний шар; А.3 – серцевина; А.4 – нижній коровий шар; А.5 – ризини; Б – сланевий край апотеція (вид зверху); В – поперечний зріз апотеція: В.1 – епітецій; В.2 – гіменій; В.3 – гіпотецій; В.4 – шар водоростей; В.5 – серцевинний шар

3.2 Встановлення ознак морфологічної та анатомічної будови сланей *C. aculeata*

3.2.1 Встановлення морфологічних ознак сланей *C. aculeata*

Сировина *C. aculeata* представлена кущеподібними прямостоячими сланями неправильної форми заввишки 1-4 (10) см (рис. 3.6, А). Слані помірно ізо- або анізотомічно-дихотомічно розгалужені, складаються з кутуватих зближених розгалужень завширшки 1-4 мм (термінальні – до 1 мм), направлених у різні сторони (рис. 3.6, Б). Розгалуження місцями потовщені або вздуті, часто з ямками [39].

Поверхня слані жорстка, крихка, матова, від коричневого до темно-коричневого або чорного кольору (рис. 3.6, В). На поверхні слані часто зустрічаються заглиблені псевдоцифели округлої або видовженої форми від білуватого до світло-коричневого кольору. На відміну від сланей *C. islandica*, псевдоцифели менші за розмірами, менш чітко виражені.

Ізидії та соредії на поверхні слані відсутні. Апотеції леканорового типу, від коричневого до темно-коричневого кольору, нечисленні, розташовуються по краях або на кінцях розгалужень слані.

На нижній поверхні сланей зрідка можна знайти ризини, за допомогою яких кущики прикріплюються до субстрату.

Цей вид різко відрізняється від *C. islandica* за розмірами, характером розгалуження та забарвленням сланей.



А



Б



В

Рис. 3.6. Особливості морфологічної будови слані *C. aculeata* : А – зовнішній вигляд та розміри окремих сланей; Б – розгалуження слані; В – поверхня розгалужень

3.2.2 Встановлення анатомічних ознак сланей *C. aculeata*

Розгалуження слані мають вигляд полої, дещо сплюснутої трубки, що добре помітно на поперечечному зрізі слані (рис. 3.7).

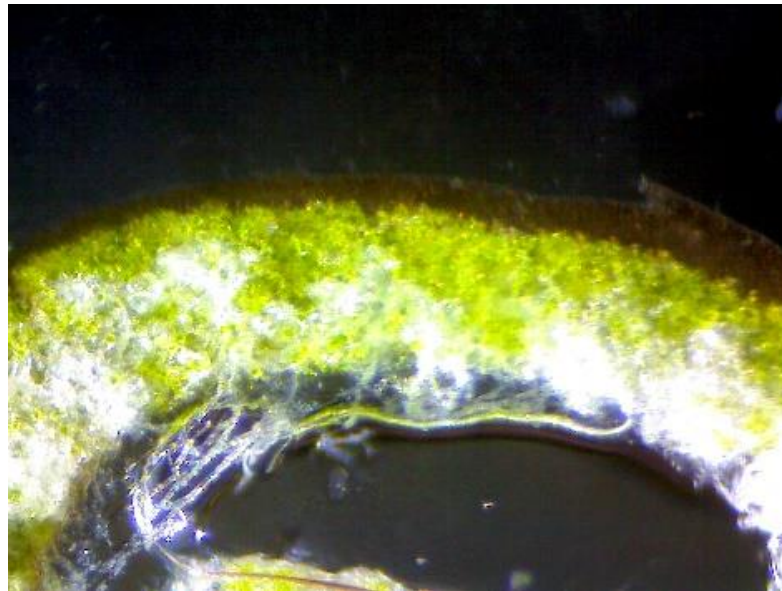


Рис. 3.7 Поперечний зріз слані гетеромерного типу *C. aculeata*

Поперечний переріз розгалуження має витягнуту еліпсоїдну форму. Слань гетеромерна – можна диференціювати верхній коровий шар, під яким знаходиться шар більш-менш однорідно розташованих клітин водоростей. Зустрічаються ділянки без клітин водоростей, що співпадають з місцем розташування псевдоцифел. Під шаром водоростей знаходиться пухкий серцевинний шар, що містить багато грибних гіф, покритих кристалами кальцію оксалату, під ним нижній шар водоростей та нижній коровий шар. Центральна частина порожниста та містить мало гіф.

На відміну від анатомічної будови слані *C. islandica* на поперечному зрізі слані *C. aculeata* менш чітко прослідковуються шари фотобіонта і мікобіонта, а також помітні кристали кальцію оксалату, розташовані на гіфах мікобіонта.

Висновки до розділу 3

1. Встановлено морфометричні параметри 7 серій сланей *C. islandica*, у тому числі у кожній із серій визначено фракційний склад за розмірами сланей з відсотковим співвідношенням фракцій. У більшості серій переважав вміст сланей довжиною 3-4 см: серія 1 ($31,6 \pm 0,8 \%$); серія 3 ($30,5 \pm 1,3 \%$); серія 5 ($33,0 \pm 0,7 \%$); серія 7 ($27,8 \pm 1,2 \%$).

2. Вперше диференційовано частку мінеральних та органічних домішок у серіях сировини. Вміст мінеральних домішок становив від $0,22 \pm 0,01 \%$ до $2,80 \pm 0,12 \%$. Вміст органічних домішок – від $0,15 \pm 0,01 \%$ до $2,14 \pm 0,11 \%$. Загальний вміст сторонніх домішок у серіях не перевищував 5% , регламентовані монографією ДФУ 2.0.

3. Досліджено морфологічну та анатомічну будову 7 серій сланей *C. islandica*. Встановлено відповідність опису серій сланей *C. islandica* вимогам розділів «Ідентифікація А» та «Ідентифікація В» монографії «Цетрарія ісландська» ДФУ 2.0. Вперше визначено такі діагностичні особливості морфологічної будови, як: зростання лопатей за допомогою перетинок і розгалуженість війок по краю лопатей.

4. Досліджено особливості морфолого-анатомічної будови сланей *C. aculeata*. Встановлено морфометричні параметри цілих сланей та характерні для виду ознаки: розміри, характер розгалуження, колір сланей, особливості поверхні – заглиблені псевдоцифели округлої або видовженої форми.

5. Встановлені діагностичні ознаки сланей *C. islandica* можуть бути підставою включення їх до відповідного розділу національної частини монографії ДФУ 2.0 «Цетрарія ісландська».

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:

1. Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 5 (39). P. 4–15. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.265019>
2. Шпичак А. О., Хворост О. П. Порівняльна еколого-морфологічна характеристика *Cetraria aculeata* та *Cetraria islandica*. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : мат. III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 2 квітня 2021 р. Харків. 2021. С. 194.
3. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення товарознавчих показників якості серій сланей Цетрарії ісландської. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : мат. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вересня 2021 р. Харків. 2021. С. 266–267.
4. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : мат. XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.

РОЗДІЛ 4

ВСТАНОВЛЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ОСНОВНИХ ГРУП БАР У СИРОВИНІ *C. ISLANDICA* ТА *C. ACULEATA*

4.1 Вивчення складу АК у сланях *C. islandica*

Якісний склад та кількісний вміст о вільних та зв'язаних замісних та незамінних АК проводили за допомогою методу ВЕРХ (методика – розд.2, п.2.3. Приклади ВЕРХ-хроматограм вільних та зв'язаних АК у сировині *C. islandica* наведені на рис 4.1 та рис. 4.2. Результати визначення узагальнено у табл.4.1 [40, 164].

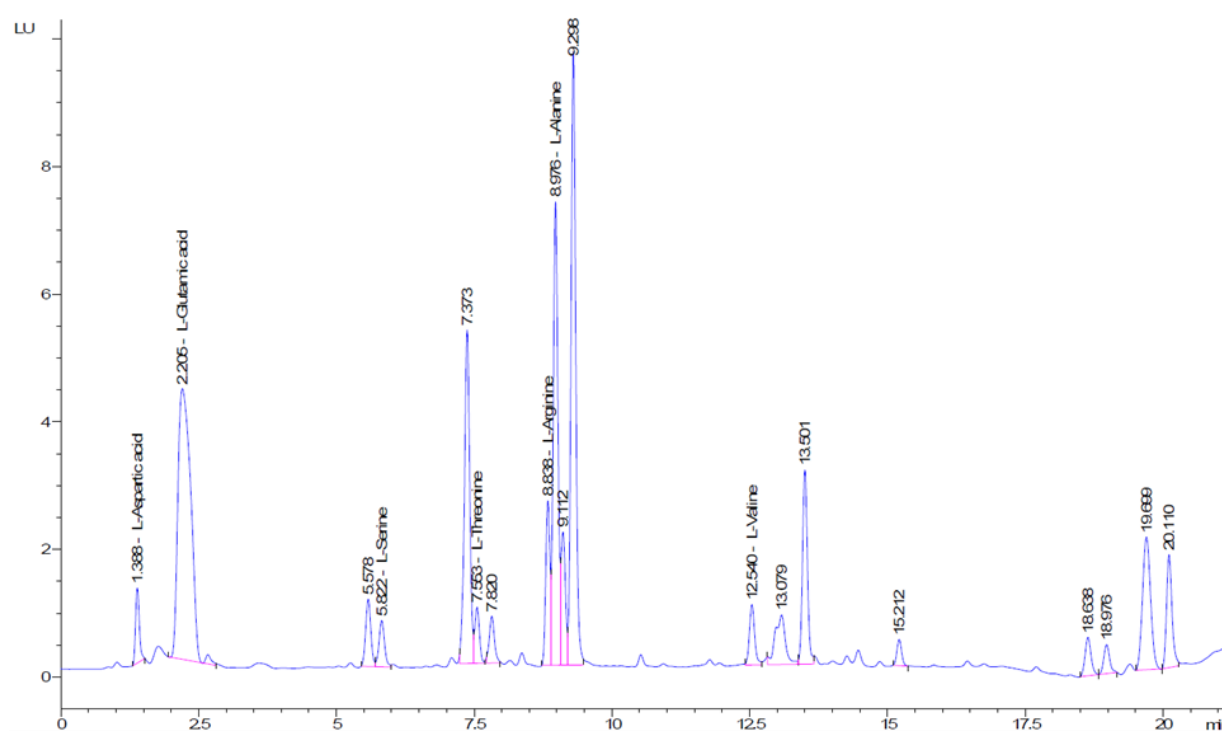


Рис. 4.1 Приклад ВЕРХ-хроматограми вільних АК у сланях *C. islandica*

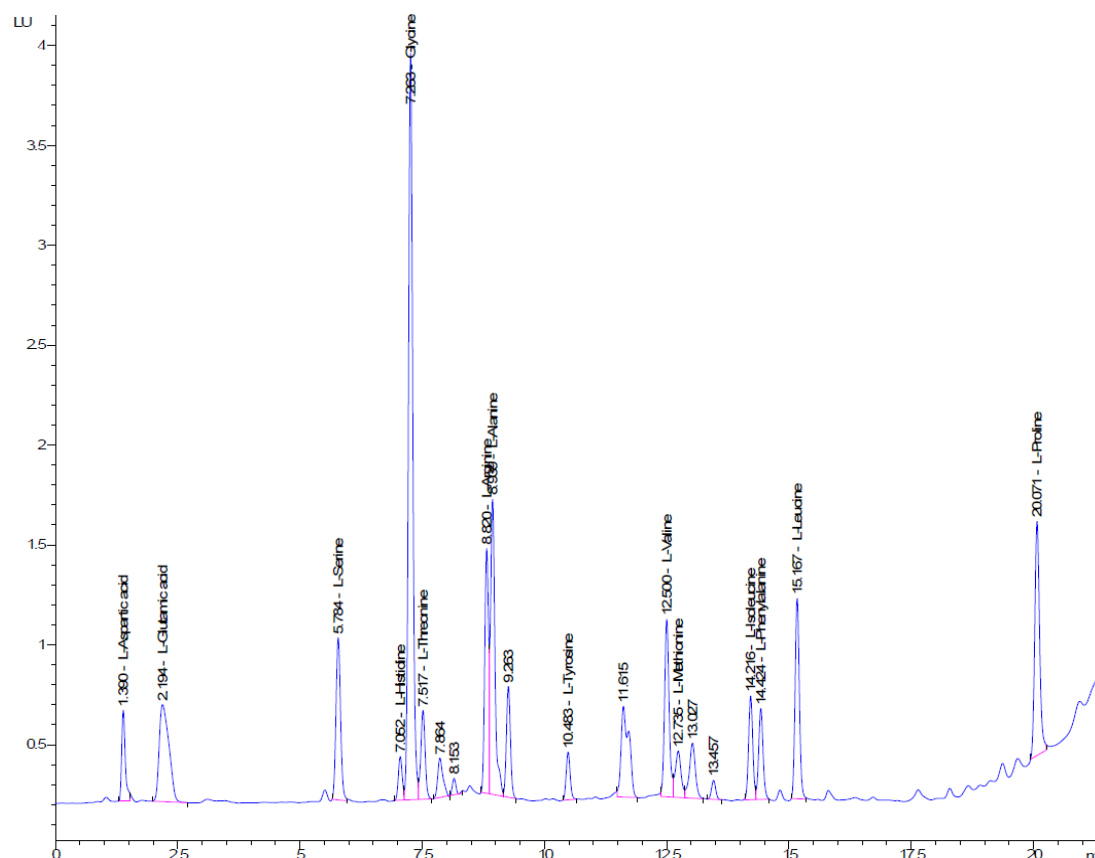


Рис. 4.2 Приклад ВЕРХ-хроматограми зв'язаних АК у сланях *C. islandica*

Таблиця 4.1

Компонентний склад АК у сланях *C. islandica* (n=5)

Час утримування, хв	Назва АК	Кількісний вміст у сировині, мкг/г	
		ВІЛЬНИХ	ЗВ'ЯЗАНИХ
1	2	3	4
Замінні АК			
1,39	L-Аспарагінова кислота	75 ± 3	327 ± 8
2,19	L-Глутамінова кислота	117 ± 4	30 ± 1
5,78	L-Серин	45 ± 2	552 ± 14

1	2	3	4
7,26	<i>L</i> -Гліцин	—	—
8,82	<i>L</i> -Аргінін	173 ± 4	994 ± 20
8,94	<i>L</i> -Аланін	288 ± 9	554 ± 24
10,48	<i>L</i> -Тирозин	—	—
20,07	<i>L</i> -Пролін	—	—
Сума замінних АК		698 ± 22	2457 ± 67
Незамінні АК			
7,05	<i>L</i> -Гістидин	—	—
7,52	<i>L</i> -Треонін	51 ± 2	305 ± 15
12,50	<i>L</i> -Валін	47 ± 2	521 ± 12
12,74	<i>L</i> -Метіонін	—	—
14,43	<i>L</i> -Фенілаланін	—	—
14,22	<i>L</i> -Ізолейцин	—	—
15,17	<i>L</i> -Лейцин	—	—
15,75	<i>L</i> -Лізін	—	—
Сума незамінних АК		98 ± 4	826 ± 27
Всього		796 ± 26	3283 ± 94

Примітка: «—» - АК не знайдена

У досліджуваній сировині було визначено наявність щонайменше 7 АК, з яких 5 належать до замінних (*L*-аспарагінова кислота, *L*-глутамінова кислота, *L*-серин, *L*-аргінін та *L*-аланін) та 2 – до незамінних (*L*-треонін і *L*-валін). Кількісний вміст суми вільних замінних АК у сировині становив 698 ± 22 мкг/г, зв'язаних – 2457 ± 67 мкг/г.

Кількісний вміст суми вільних незамінних АК становив 98 ± 4 мкг/г, зв'язаних – 826 ± 27 мкг/г. Загальний кількісний вміст суми вільних АК у сировині *C. islandica* становив 796 ± 26 мкг/г, суми зв'язаних АК – 3283 ± 94 мкг/г.

4.2 Вивчення складу моносахаридів у сланях *C. islandica*

Вивчення компонентного складу моносахаридів у сланях *C. islandica* проводили за методом ГХ/МС (методика – розд.2, п.2.4).

Приклад ГХ/МС хроматограми вільних моносахаридів наведений на рис. 4.3.

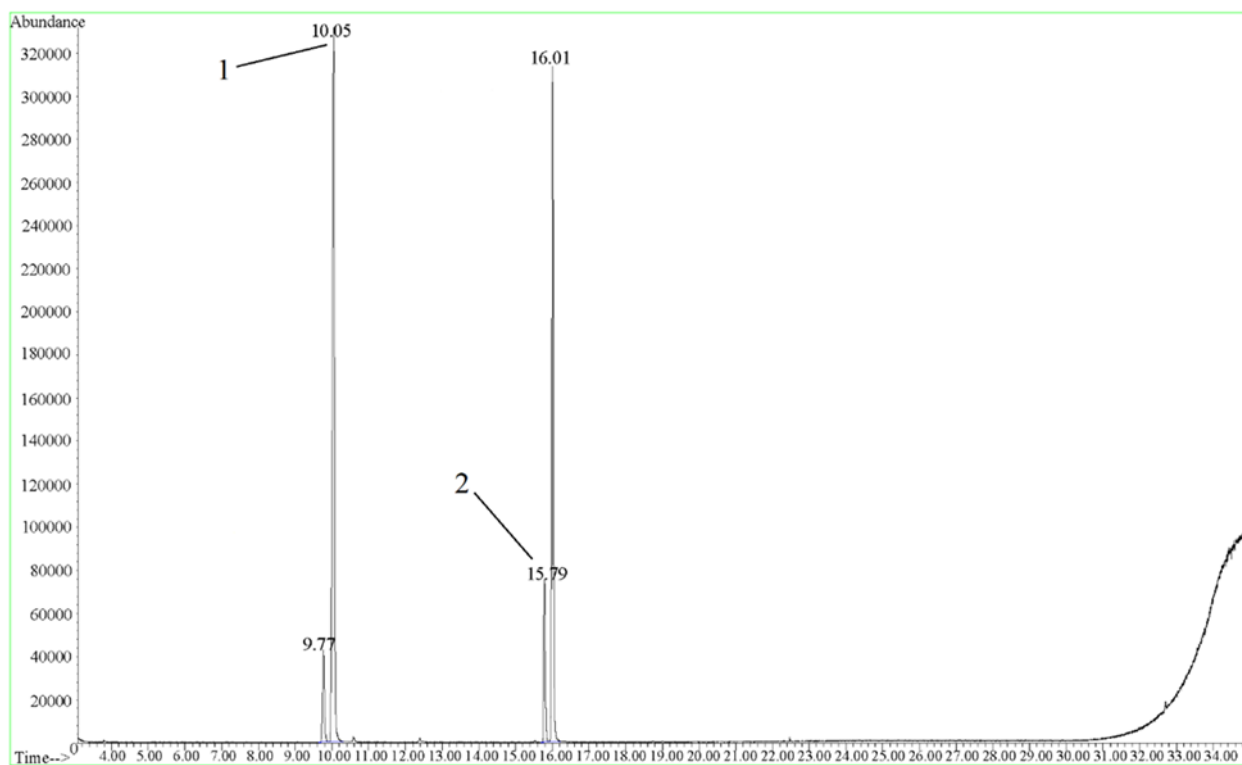


Рис. 4.3 Приклад ГХ/МС-хроматограми вільних моносахаридів у сланях *C. islandica*

Результати визначення компонентного складу та кількісного вмісту вільних моносахаридів у сировині *C. islandica*, а також їх хроматографічні параметри представлені у табл. 4.2 [40, 163].

Таблиця 4.2

**Якісний склад та кількісний вміст склад вільних моносахаридів у
сланях *C. islandica* (n=5)**

№ піку	Час утримування, хв	Назва сполуки	Вміст, мг/г
1	10,05	<i>D</i> -Персеїтол	$6,99 \pm 0,29$
2	15,79	<i>D</i> -Манітол	$1,12 \pm 0,05$

Згідно з даними табл. 4.2 було ідентифіковано багатоатомні спирти *D*-персеїтол, вміст якого становив $6,99 \pm 0,29$ мг/г, та *D*-манітол, вміст якого становив $1,12 \pm 0,05$ мг/г.

Приклад ГХ/МС хроматограми вільних та зв'язаних моносахаридів після кислотного гідролізу наведено на рис. 4.4.

Результати визначення компонентного складу та кількісного вмісту суми вільних і зв'язаних моносахаридів, а також їх хроматографічні параметри представлені у табл. 4.3 [163].

Згідно з даними табл. 4.3 було виявлено 7 сполук, серед яких 5 належали до моносахаридів, 2 – до багатоатомних спиртів. Серед моносахаридів домінувала *D*-глюкоза – $203,64 \pm 8,96$ мг/г. Також виявлено високий вміст *D*-манози – $53,74 \pm 2,57$ мг/г і *D*-галактози – $51,71 \pm 2,40$ мг/г.

Значно менший вміст спостерігається для *D*-ксилози – $0,83 \pm 0,03$ мг/г і *L*-рамнози – $0,53 \pm 0,02$ мг/г. Виявлено, що кількісний вміст багатоатомного спирту *D*-дульциту (*D*-галактитолу) становив $8,46 \pm 0,39$ мг/г, *D*-манітолу – $3,10 \pm 0,14$ мг/г.

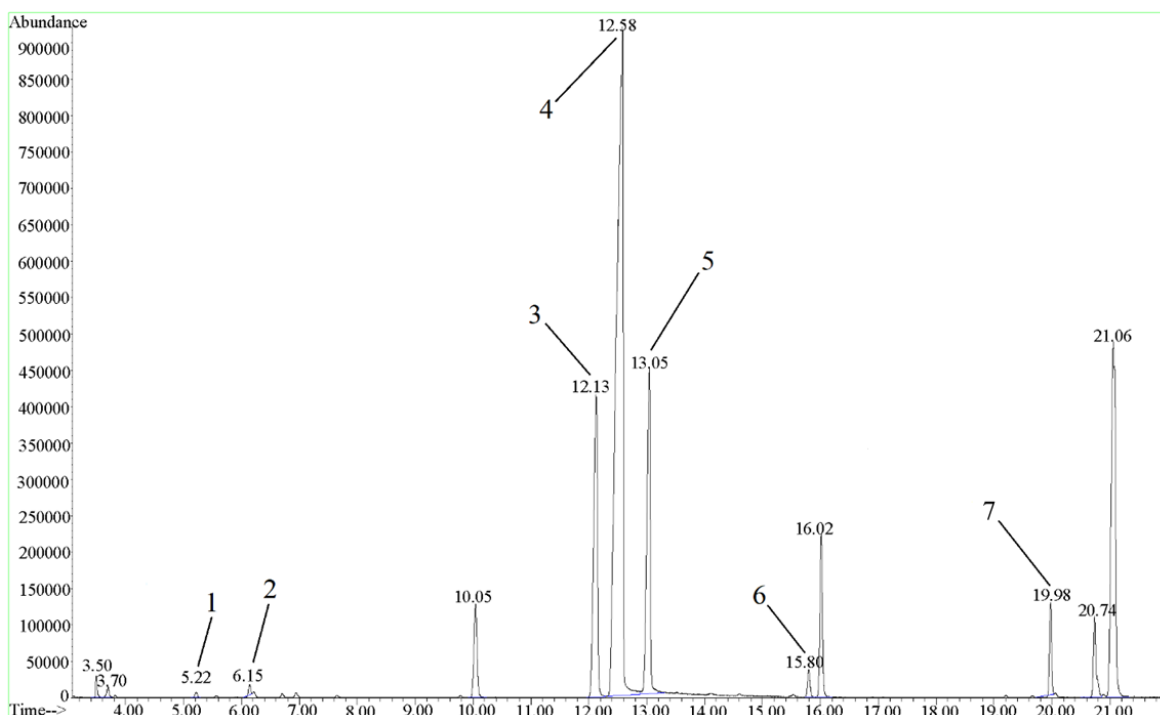


Рис. 4.4 Приклад ГХ/МС-хроматограми вільних і зв'язаних моносахаридів у сланях *C. islandica*

Таблиця 4.3

Якісний склад та кількісний вміст вільних і зв'язаних моносахаридів та їхніх похідних у сланях *C. islandica* (n=5)

№ піку	Час утримування, хв	Назва сполуки	Вміст, мг/г
1	5,22	<i>L</i> -Рамноза	$0,53 \pm 0,02$
2	6,14	<i>D</i> -Ксилоза	$0,83 \pm 0,03$
3	12,13	<i>D</i> -Маноза	$53,74 \pm 2,57$
4	12,58	<i>D</i> -Глюкоза	$203,64 \pm 8,96$
5	13,05	<i>D</i> -Галактоза	$51,71 \pm 2,40$
6	15,80	<i>D</i> -Манітол	$3,10 \pm 0,14$
7	19,99	<i>D</i> -Дульцит	$8,46 \pm 0,39$

4.3 Вивчення жирнокислотного складу сланей *C. islandica*

Жирнокислотний склад сланей *C. islandica* визначали методом ГХ/МС (методика – розд.2, п. 2.5). Приклад ГХ/МС хроматограми ЖК сланей *C. islandica* наведено на рис. 4.5.

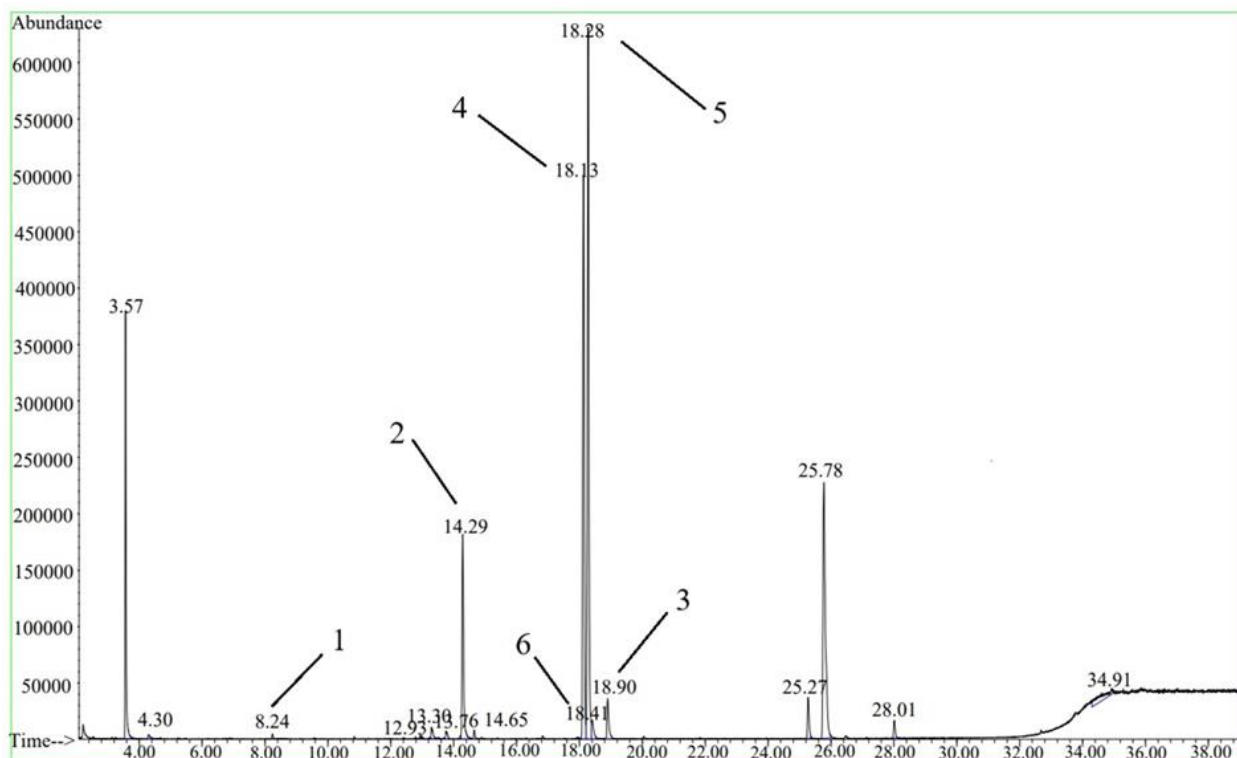


Рис. 4.5 Приклад ГХ/МС-хроматограми ЖК сланей *C. islandica*

Результати визначення якісного складу та кількісного вмісту ЖК у сланях *C. islandica*, а також їх хроматографічні параметри представлені у табл. 4.4 [162]. У сировині *C. islandica* ідентифіковано 6 ЖК, з яких 3 належали до насичених, 3 – до ненасичених. Серед насичених були виявлені ейкозанова (арахінова), пентадеканова (пентадецилова) та октадеканова (стеаринова) кислоти. Серед ЖК, що належать до ненасичених ідентифіковані ліолева, елаїдинова та олеїнова. Олеїнова кислота, що належить до ω -9 мононенасичених ЖК та виконує ряд важливих функцій в організмі людини, серед яких пластична та енергетична, міститься у кількості $1,77 \pm 0,03$ мг/г.

Якісний склад та кількісний вміст ЖК у сланях *C. islandica* (n=5)

№ піку	Час утримування, хв	Назва ЖК	Вміст, мг/г
Насичені ЖК			
1	8,24	Ейкозанова (арахінова) кислота C 20:0	1,57 ± 0,02
2	14,29	Пентадеканова (пентадецилова) кислота C 15:0	1,93 ± 0,02
3	18,90	Октадеканова (стеаринова) кислота C 18:0	1,94 ± 0,03
Сума насичених ЖК			5,44 ± 0,07
Ненасичені ЖК			
4	18,13	Октадекадієнова (лінолева) кислота C 18:2	1,95 ± 0,03
5	18,28	Елаїдинова кислота C 18:1 (9- <i>trans</i>)	1,94 ± 0,02
6	18,41	Олеїнова кислота C 18:1 (9- <i>cis</i>)	1,77 ± 0,03
Сума ненасичених ЖК			5,66 ± 0,08
Загальна сума ЖК			11,10 ± 0,15

Лінолева кислота – незамінна поліненасичена ω -6 ЖК, що входить до складу клітинних мембран та є необхідною для синтезу простагландинів, була виявлена у кількості $1,95 \pm 0,03$ мг/г. Кількісний вміст кожної з виявлених ЖК коливався незначно і становив від $1,57 \pm 0,02$ мг/г (арахінова кислота) до $1,95 \pm 0,03$ мг/г (лінолева кислота). Кількісний вміст суми ЖК становив $11,10 \pm 0,15$ мг/г. Вміст суми ненасичених ЖК становив $5,66 \pm 0,08$ мг/г і незначно перевищував вміст суми насичених ($5,44 \pm 0,07$ мг/г).

У літературних джерелах наводяться відомості, що елаїдинова, олеїнова, лінолева, арахінова, пентадецилова та стеаринова кислоти були ідентифіковані методом ТШХ у сировині *C. islandica*, а також у деяких інших видах епігейних та епіфітних лишайників [68], що також підтверджується результатами нашого дослідження. Проте, у доступній нам науковій літературі нами не було виявлено даних щодо кількісного вмісту у сировині *C. islandica* вищезгаданих ЖК.

Результати визначення кількісного вмісту насичених арахінової, пентадецилової, стеаринової та ненасичених лінолевої, елаїдинової та олеїнової ЖК у сировині *C. islandica* отримано вперше.

4.4 Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти у сланях *C. islandica* та *C. aculeata*

Кількісне визначення аскорбінової кислоти у серіях сланей *C. islandica* та серії сланей *C. aculeata* проводили методом СФ за методикою, наведеною у розд.2, п.2.6. Результати наведені у табл. 4.5 [34].

Таблиця 4.5

Кількісний вміст аскорбінової кислоти у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* (n=5, в мг%, у перерахунку на абсолютно суху сировину)

Номер серії сировини	Кількісний вміст аскорбінової кислоти, мг%
1	2
1	16,72 ± 0,47
2	15,55 ± 0,65
3	16,38 ± 0,58
4	17,64 ± 0,73
5	16,08 ± 0,56

Продовж. табл 4.5

1	2
6	15,11 ± 0,53
7	17,39 ± 0,60
1 А	9,67 ± 0,42

Проведені нами дослідження показали, що кількісний вміст аскорбінової кислоти в серіях сланей *C. islandica*, становив не менше 15,00 мг%, в сланях *C. aculeata* вміст нижче в 1,6-1,8 рази та дорівнював 9,67 ± 0,42 мг%.

4.5 Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот у сланях *C. islandica* та *C. aculeata*

Кількісне визначення суми органічних кислот у серіях сланей *C. islandica* проводили титриметричним методом за методикою, що наведено у розд.2, п.2.7) [8]. Результати наведено у табл. 4.6 [34].

Таблиця 4.6

Кількісний вміст суми органічних кислот у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* (n=5, в %, у перерахунку на яблучну кислоту та абсолютно суху сировину)

Номер серії сировини	Кількісний вміст суми органічних кислот, %
1	2
1	3,28 ± 0,10
2	3,32 ± 0,08
3	2,84 ± 0,08
4	3,54 ± 0,10
5	3,43 ± 0,09

1	2
6	$3,19 \pm 0,12$
7	$3,71 \pm 0,12$
1 A	$2,18 \pm 0,10$

Проведені нами дослідження показали, що кількісний вміст суми органічних кислот в серіях сланей *C. islandica*, склав не менше 2,8 %, в сланях *C. aculeata* цей показник значно нижче (в 1,3-1,7 рази) – $2,18 \pm 0,10$ %.

4.6 Вивчення складу сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica*

Вивчення якісного складу сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica* проводили за допомогою методу ГХ/МС (методика – розд. 2, п. 2.8).

Приклад ГХ/МС хроматограми сполук, що переганялися з водяною парою, наведений на рис. 4.6.

Результати визначення компонентного складу та кількісного вмісту сполук, що переганялися з водяною парою, сировини *C. islandica*, а також їх хроматографічні параметри представлені у табл. 4.7 [161].

У результаті проведеного дослідження у сланях *C. islandica*, заготовлених в Україні, було ідентифіковано 24 сполуки, що переганялися з водяною парою, серед яких: терпеноїди та їх похідні, ациклічні насичені вуглеводні, дієнові вуглеводні, ЖК, естери.

Деякі з ідентифікованих сполук (циклотрисилоксан, гексаметил-; диізобутилфталат; 5-метил-2-феніліндолізін), імовірно, могли потрапити до досліджуваних зразків ззовні під час заготівлі сировини або у процесі транспортування.

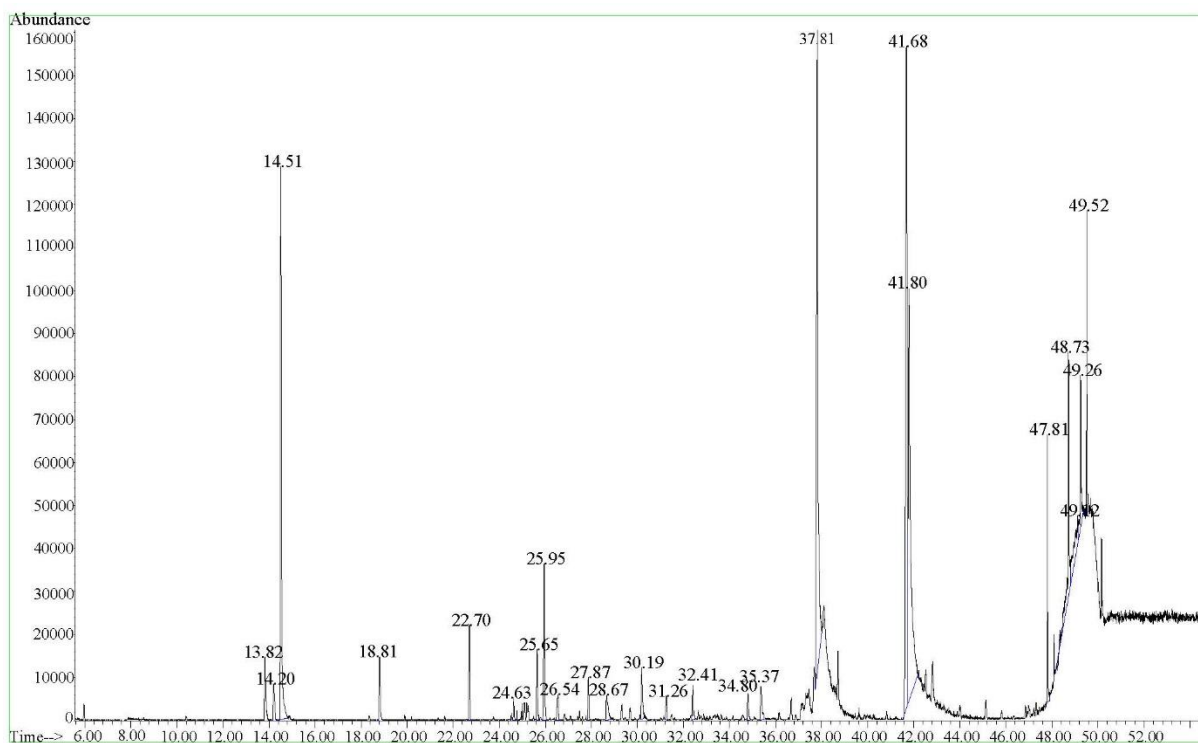


Рис. 4.6 Приклад ГХ/МС-хроматограми сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica*

Таблиця 4.7

Якісний склад та кількісний вміст сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica* (n=5)

№ піку	Час утримування, хв	Тривіальна назва речовини	Вміст, % від суми сполук
1	2	3	4
1	13,83	<i>cis</i> -Ментон	1,59 ± 0,04
2	14,20	<i>trans</i> -Ментон	1,03 ± 0,05
3	14,51	Ментол	11,95 ± 0,49
4	18,80	<i>trans</i> -Каран	1,27 ± 0,06
5	22,70	Каріофілен	1,73 ± 0,08
6	24,63	β -Кубебен	0,38 ± 0,02

1	2	3	4
7	25,65	γ -Муролен	$1,27 \pm 0,06$
8	25,95	δ -Аморфен	$2,99 \pm 0,12$
9	26,55	Гентріаконтан	$0,69 \pm 0,03$
10	27,87	Меюрон	$0,79 \pm 0,02$
11	28,67	Циклогексилметилформіат	$0,98 \pm 0,04$
12	30,19	1,13- Тетрадекадієн	$1,24 \pm 0,06$
13	31,26	Нонадекан	$0,47 \pm 0,02$
14	32,41	Триаконтан	$0,68 \pm 0,03$
15	34,80	Гексагідрофарнезилацетон	$0,57 \pm 0,03$
16	35,37	Диізобутилфталат	$0,97 \pm 0,04$
17	37,81	<i>n</i> -Гексадеканова (пальмітинова) кислота	$19,21 \pm 0,77$
18	41,68	Октадекадієнова (лінолева) кислота	$20,08 \pm 0,67$
19	41,80	9,17-Октадекадієновий альдегід	$18,57 \pm 0,56$
20	47,81	Пентакозан	$2,38 \pm 0,12$
21	48,73	Ейкозан	$3,99 \pm 0,15$
22	49,13	Циклотрисилоксан, гексаметил-	$2,28 \pm 0,11$
23	49,25	5-Метил-2-фенілндолизин	$2,13 \pm 0,8$
24	49,52	Генейкозан	$2,78 \pm 0,10$

Серед виявлених сполук найвищий кількісний вміст спостерігався для поліненасиченої ω -6 жирної октадекадієнової (лінолевої) кислоти – $20,08 \pm 0,67$ %, насиченої *n*-гексадеканової (пальмітинової) кислоти – $19,21 \pm 0,77$ % та 9,17-октадекадієнового альдегіду – $18,57 \pm 0,56$ % від суми сполук, що переганялися з водяною парою.

Значну частину ідентифікованих речовин склали терпеноїди, що були представлені 10 сполуками та складали $23,57 \pm 0,97$ % від загального кількісного вмісту сполук, що переганялися з водяною парою. Серед них ідентифіковано 3 моноциклічні монотерпеноїди (*cis*-ментон, *trans*-ментон, ментол), біциклічний монотерпеноїд *trans*-каран та 6 сесквітерпеноїдів (каріофілен, β -кубебен, γ -муролен, δ -аморфен, сесквітерпеновий кетон меюрон, гексагідрофарнезилацетон).

У сировині було виявлено 6 ациклічних насичених вуглеводнів ($10,99 \pm 0,45$ % від суми сполук): гентріаконтан, 10-метилнонадекан, триаконтан, пентакозан, ейкозан, 3-метил-генейкозан, серед яких за кількісним вмістом домінував ейкозан ($3,99 \pm 0,15$ % від суми сполук).

Такі групи БАР як похідні жирних кислот, альдегіди, дієнові вуглеводні, що були встановлені у результаті наших досліджень, також були виявлені в результаті попередніх досліджень сировини *C. islandica*, проведених методом ГХ-МС (Vladimirova et al., 2013) [189]. Однак, у вищезазначеному джерелі не згадується наявність у досліджуваній сировині терпеноїдів та їх похідних, отже, дані щодо наявності у слані *C. islandica* *cis*-ментону, *trans*-ментону, ментолу, *trans*-карану, каріофілену, β -кубебену, γ -муролену, δ -аморфену, меюрону, гексагідрофарнезилацетону наводяться вперше.

Згідно з літературними даними серед виявлених сполук у сировині домінували феноли та їх етери, альдегіди та лишайникові кислоти, в той час як за результатами нашого дослідження у відсотковому співвідношенні переважали ЖК та їх похідні.

4.7 Дослідження сполук фенольної природи у сланях *C. islandica* та *C. aculeata*

4.7.1 Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у сланях *C. islandica* та *C. aculeata*

Кількісний вміст суми поліфенолів визначали СФ-методом за методикою, що наведено у розд. 2, п. 2.9 [9].

Результати визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* наведено у вигляді діаграми на рис. 4.6. Найвищий вміст суми поліфенолів – $1,73 \pm 0,04$ % спостерігався у сировині *C. islandica* серії 3, найнижчий – $1,21 \pm 0,05$ % – у серії 4 (рис. 4.7) [158]. Кількісний вміст сполук цієї групи БАР серіях сланей *C. islandica* становив не менше 1,2 % у перерахунку на пірогалол. Кількісний вміст суми поліфенолів у сланях *C. aculeata* дорівнював $0,84 \pm 0,04$ %.

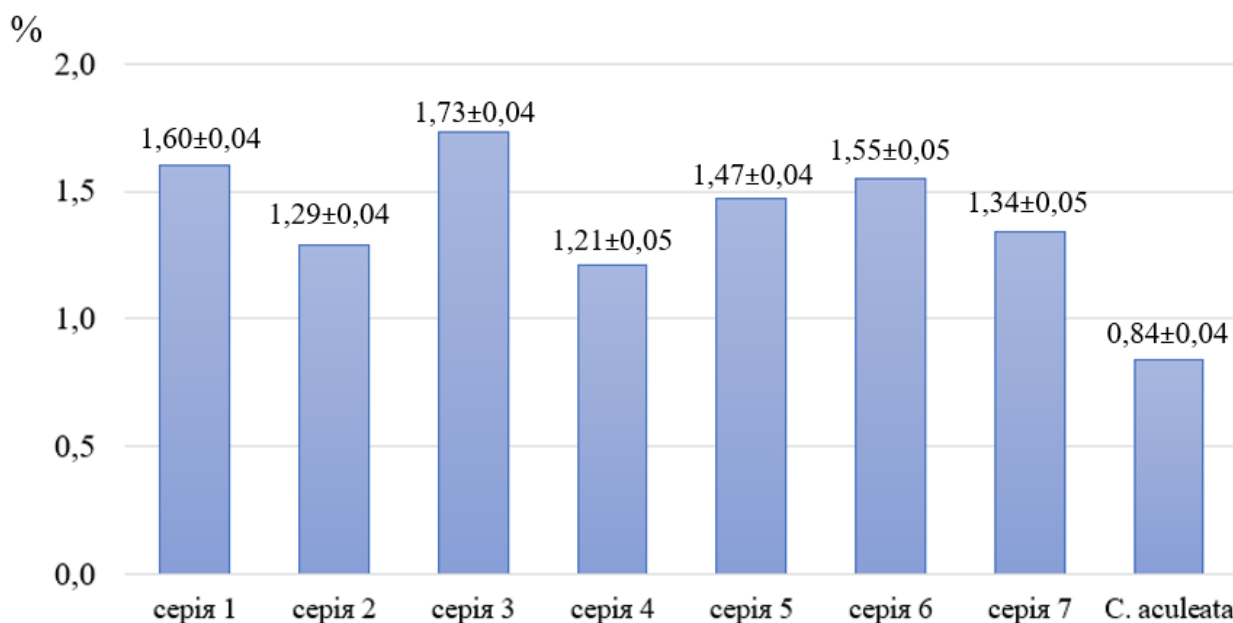


Рис 4.7 Кількісний вміст суми поліфенолів у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* (n=5, %, у перерахунку на пірогалол та суху сировину)

4.7.2 Визначення флавоноїдного складу у сланях *C. islandica*

Визначення компонентного складу флавоноїдів у сланях *C. islandica* проводили методом ВЕРХ (методика – розд.2, п.2.10).

Приклад ВЕРХ-хроматограми наведено на рис. 4.8, результати визначення кількісного вмісту сполук – у табл. 4.8.

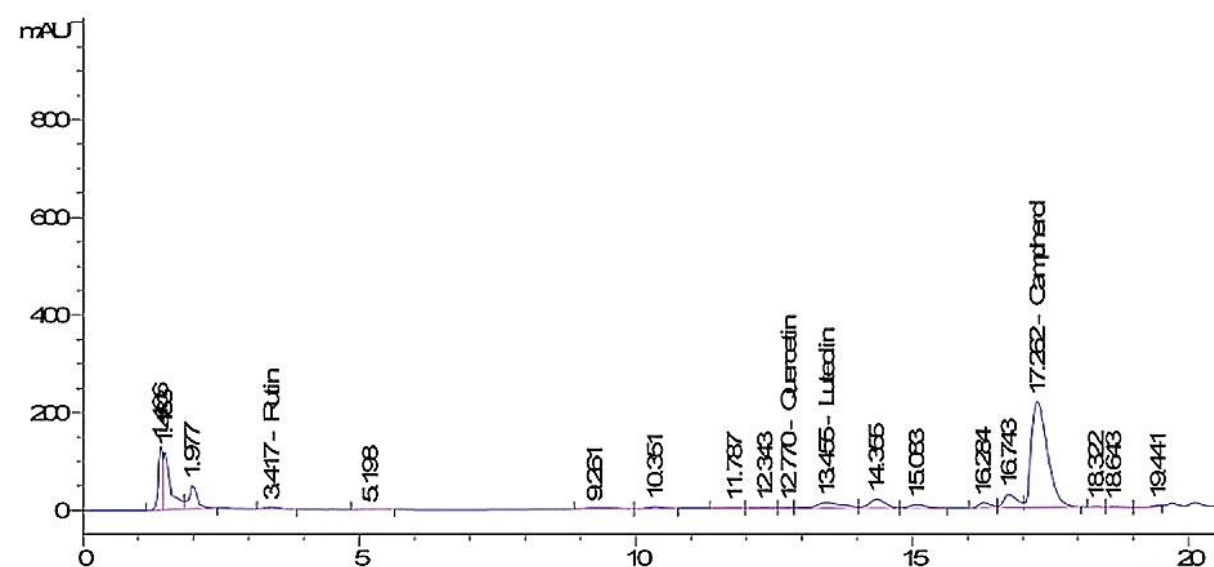


Рис 4.8 Приклад ВЕРХ-хроматограми флавоноїдів у сланях *C. islandica*

Таблиця 4.8

Флавоноїдний склад *C. islandica* (n=5, мкг/г)

Час утримування, хв	Назва сполуки	Вміст сполуки, мкг/г
1	2	3
3,42	Рутин	62,49±1,98
4,80	Ізокверцетин	—
5,79	Нарінгін	—
8,05	Неогесперидин	—
12,77	Кверцетин	37,15±1,20

1	2	3
13,46	Лютеолін	290,08±3,89
15,44	Нарінгенін	—
17,26	Кемпферол	942,55±15,27

Примітка: «—» - флавоноїд не знайдено

У сировині було виявлено 4 сполуки, що мають флавоноїдну природу. Вперше для сланей *C. islandica* встановлено наявність флавонового аглікону лютеоліну, флавонолових агліконів кемпферолу та кверцетину, а також похідного кверцетину – біозиду рутину (рис. 4.8) [40, 158].

4.7.3 Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у сланях *C. islandica* та *C. aculeata*

Результати визначення СФ-методом кількісного вмісту суми флавоноїдів у серіях сланей *C. islandica* та *C. aculeata* в перерахунку на гіперозид та абсолютно суху сировину (методика – розд.2, п.2.11) наведені у таблиці 4.9.

Таблиця 4.9

Кількісний вміст суми флавоноїдів у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* (n=5, у %, в перерахунку на гіперозид та абсолютно суху сировину)

Номер серії сировини	Кількісний вміст суми флавоноїдів
1	2
1	0,63 ± 0,03
2	0,61 ± 0,02
3	0,57 ± 0,02

Продовж. табл. 4.9

1	2
4	$0,64 \pm 0,03$
5	$0,70 \pm 0,03$
6	$0,67 \pm 0,03$
7	$0,59 \pm 0,02$
1 А	$0,26 \pm 0,01$

Кількісний вміст суми флавоноїдів коливався від $0,57 \pm 0,02$ % у сировині *C. islandica* серії 3 до $0,70 \pm 0,03$ % у серії 5. Вміст сполук цієї групи у сланях *C. aculeata* дорівнював $0,26 \pm 0,01$ %.

4.8 Дослідження карбонових кислот у сланях *C. islandica*

4.8.1 Визначення якісного складу та кількісного вмісту карбонових кислот у сланях *C. islandica*

Визначення складу карбонових кислот проводили за допомогою методу ВЕРХ (методика – розд. 2, п. 2.12).

Приклад ВЕРХ хроматограми наведено на рис. 4.9, результати визначення узагальнено у табл. 4.10.

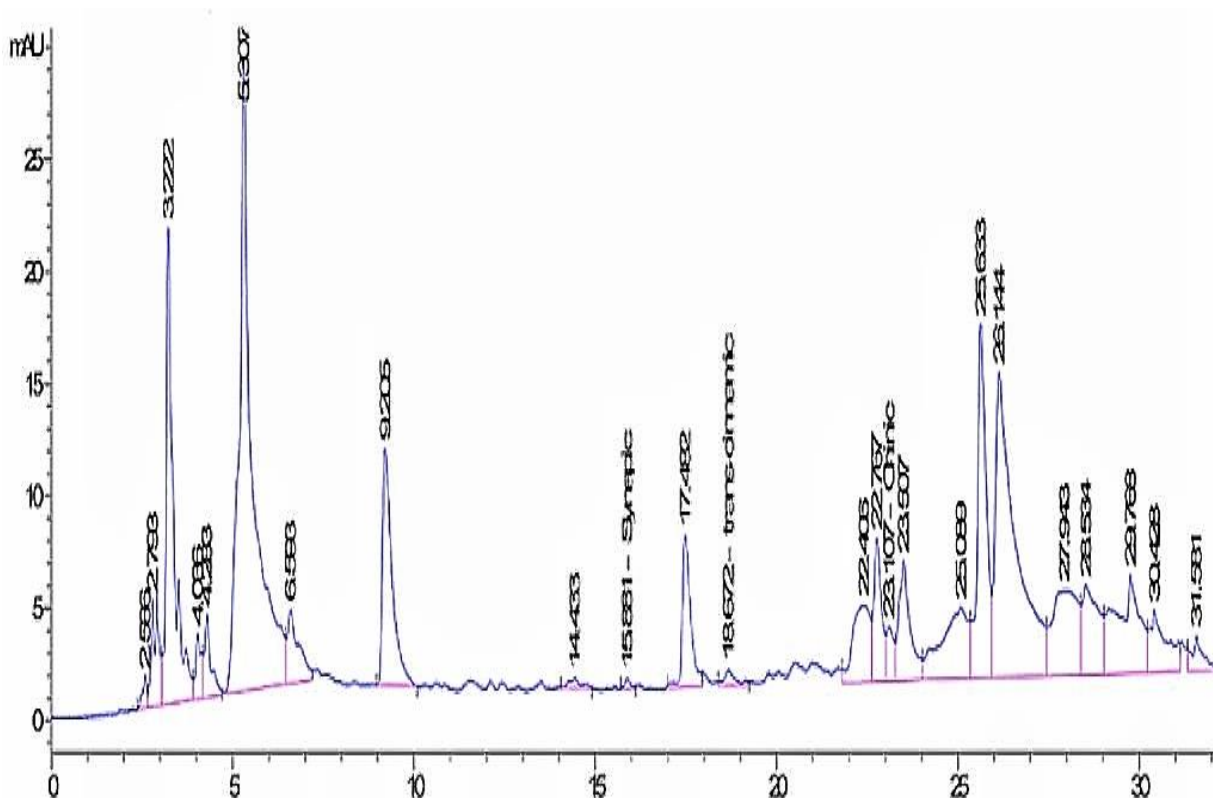


Рис 4.9 Приклад ВЕРХ-хроматограми карбонових кислот у сланях *C. islandica*

Таблиця 4.10

Якісний склад карбонових кислот у сланях *C. islandica* (n=5)

Час утримування, хв	Назва сполуки	Вміст, мкг/г
1	2	3
5,31	Галова кислота	—
8,18	Гідроксифенілоцтова кислота	—
10,26	Хлорогенова кислота	—
10,56	Кофеїнова кислота	—
12,49	Сирінгова кислота	—
13,83	<i>n</i> -Кумарова кислота	—

1	2	3
14,61	<i>trans</i> - Ферулова кислота	—
15,78	Синапова кислота	3,38 ± 0,06
18,00	<i>trans</i> - Цинамова кислота	2,74 ± 0,07
22,68	Хінна кислота	6,95 ± 0,19

Примітка: «—» - карбонову кислоту не знайдено

У сировині було знайдено 3 карбонові кислоти. Вперше у сировині *C. islandica* встановлено наявність гідроксикоричної синапової кислоти, ароматичної ненасиченої карбонової кислоти з групи фенілпропаноїдів – *trans*-цинамової кислоти та одноосновної полігідроксикарбонової хінної кислоти [40, 158].

4.8.2 Вилучення зі сланей *C. islandica* однієї з лишайникових кислот та встановлення її структури

Повітряно-сухі слані *C. islandica* (50 г) подрібнювали та тричі екстрагували методом мацерації за допомогою метанолу при кімнатній температурі (співвідношення сировина: екстрагент – 1:5; часовий термін кожної екстракції – 48 год). Після цього з об'єднаного метанольного екстракту видаляли у вакуумі екстрагент, суспендували у воді та послідовно екстрагували у системі «рідина-рідина» петролейним ефіром і етилацетатом.

Після концентрування етилацетатного розчину отримували порошок, який промивали у суміші хлороформ-метанол (2:1), у результаті чого отримали аморфний порошок блідо-жовтого кольору (0,358 г) – фумаропротоцеттарову кислоту (формула – рис. 4.10).

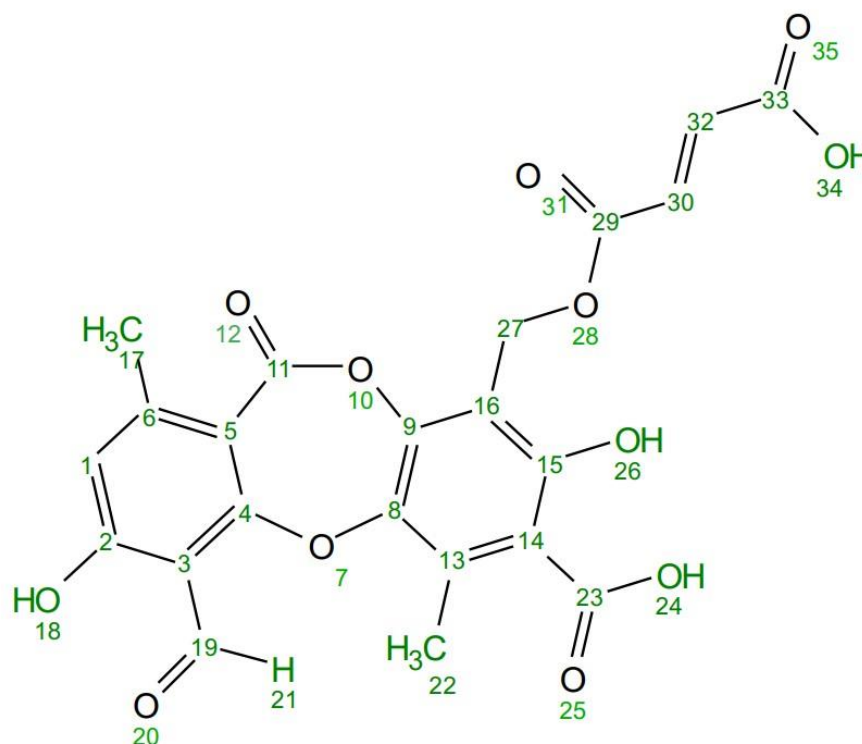


Рис. 4.10 Структурна формула фумаропротоцетрарової кислоти

Для встановлення структури отриманої речовини використовували методи хромато-мас-спектрометрії, ^1H та ^{13}C ЯМР-спектроскопії [133, 186] (прибори див. розд.2, п.2.13 та 2.14).

Хромато-мас-спектрометричне дослідження показало наявність хроматографічного піку ($R_T=1,147$) фумаропротоцетрарової кислоти (рис 4.11), мас-спектр якої містив пік молекулярного йону 472,0 (відносна інтенсивність 20 %) та фрагментарні йони 471,2 (60 %), 355,0 (100 %), 356,0 (15 %) (рис. 4.12).

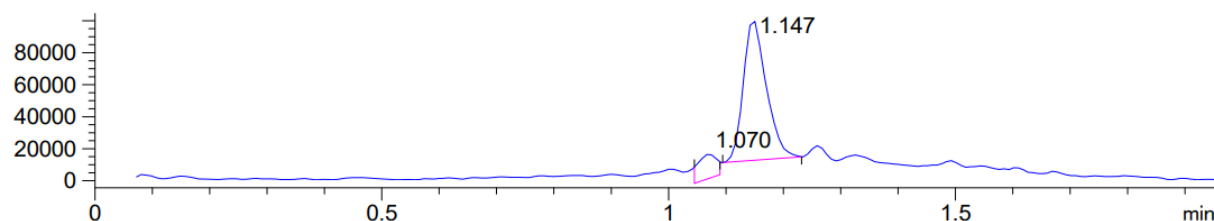


Рис. 4.11 Мас-спектр досліджуваного зразка

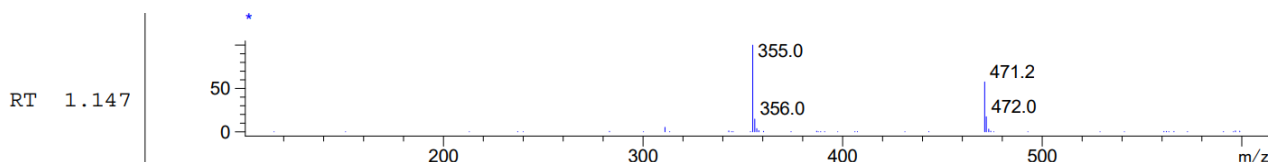
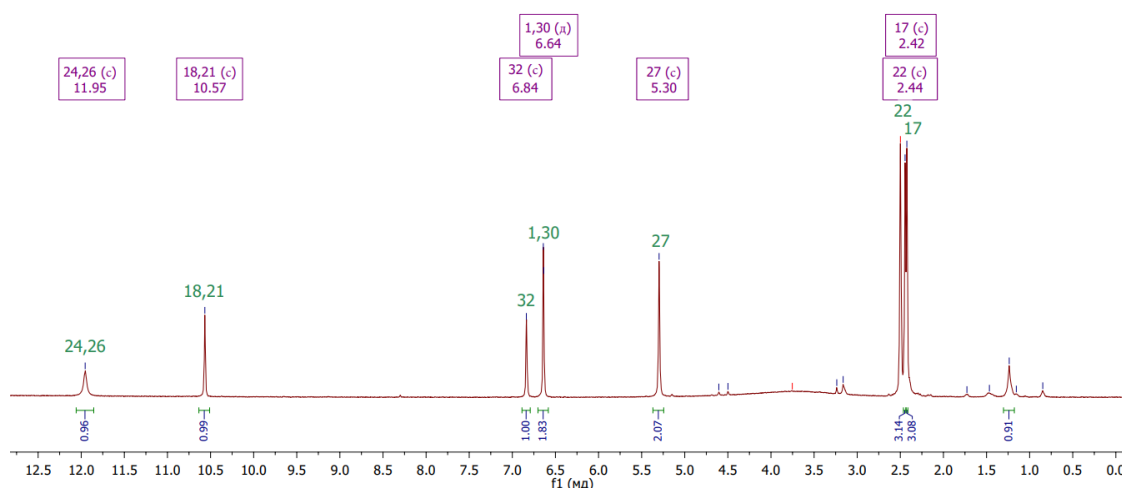


Рис. 4.12 Мас-спектр фумаропротоцетрарової кислоти (Б)

Спектральні дані ^1H для виділеної сполуки: ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,95 (синглет, 1H, COOH); 10,57 (синглет, 1H, CHO); 6,84 (синглет, 1H); 6,64 (дублет, $J=2,4$ Гц, 2CH=); 5,30 (синглет, 2H, CH₂); 2,44 (синглет, 3H, CH₃); 2,42 (синглет, 3H, CH₃) (спектр ^1H ЯМР – рис. 4.13).

Рис 4.13 ^1H ЯМР-спектр фумаропротоцетрарової кислоти

Спектральні дані ^{13}C для виділеної сполуки: ^{13}C ЯМР (126 МГц, CDCl_3) δ 192,03 (C₁₉); 170,59 (C₂₃); 166,00 (C₃₃); 165,01 (C₂₉); 164,40 (C₂); 164,38 (C₄); 161,28 (C₁₁); 155,78 (C₁₅); 152,51 (C₆); 146,00 (C₉); 142,57 (C₈); 135,44 (C₃₂); 132,59 (C₃₀); 132,37 (C₁₃); 117,66 (C₁); 117,08 (C₁₄); 113,73 (C₁₆); 112,54 (C₃); 112,41 (C₅); 57,17 (C₂₇); 21,68 (C₁₇); 15,07 (C₂₂) (спектр ^{13}C ЯМР – рис. 4.14).

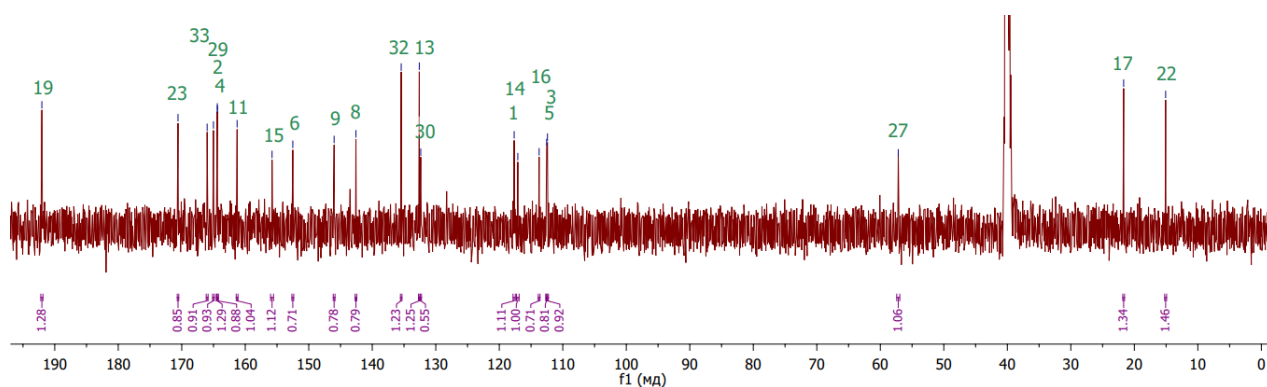


Рис 4.14 ^{13}C ЯМР-спектр фумаропротоцетрарової кислоти

Характеристичними були сигнали протонів карбоксильної (23, 33), альдегідної груп (19) та сигнал олефінових протонів фрагменту фумарової кислоти (30, 32).

Таким чином, виділена зі сланей *C. islandica* сполука – це фумаропротоцетрарова кислота [38].

4.9 Визначення кількісного вмісту загальної золи у серіях сланей *C. islandica*

Результати визначення вмісту загальної золи гравіметричним методом після озолення серій сланей (методика – розд. 2, п. 2.15) наведені у вигляді діаграми на рис. 4.15. Вміст загальної золи становив від $0,61 \pm 0,02$ % (серія 5) до $1,43 \pm 0,05$ % (серія 4), що не перевищувало 3 %, регламентовані монографією ДФУ 2.0. [8, 164].

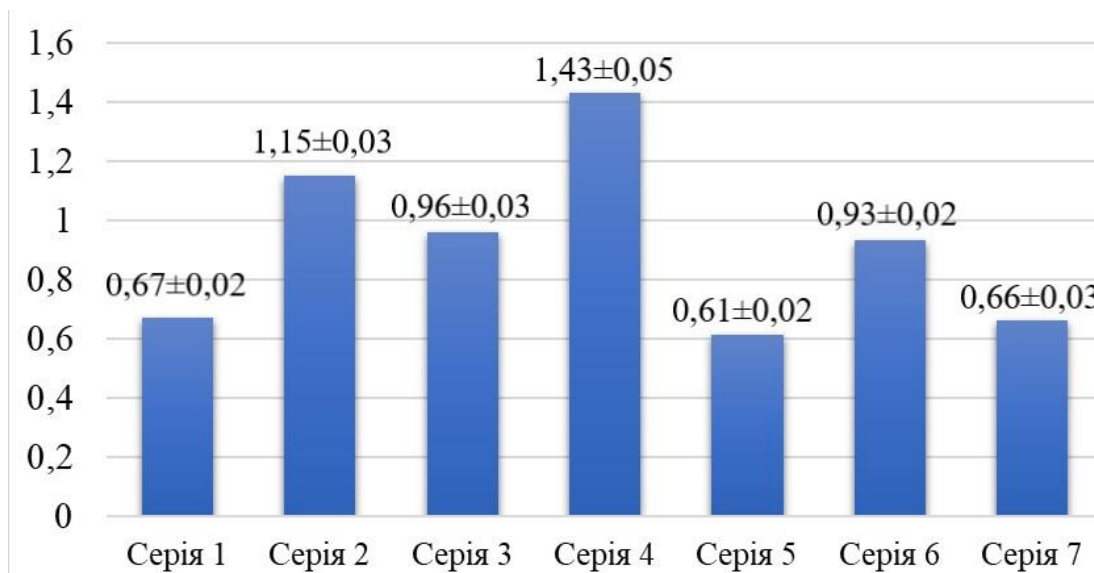


Рис. 4.15 Вміст загальної золи (%) у серіях сланей *C. islandica*

4.10 Елементний склад серій сланей *C. islandica*

Визначення елементного складу серій сланей *C. islandica* проводили за методом ААС, методика наведена у розд.2, п. 2.16.

У серіях сировини було виявлено наявність щонайменше 19 макро-, мікро-, та ультрамікроелементів [40, 164].

Результати визначення макроелементного складу серій сланей *C. islandica*, заготовлених в Україні, наведено у вигляді діаграм на рис. 4.16. Встановлено кількісний вміст таких макроелементів, як: калій, кальцій, магній, натрій та фосфор. Вміст калію був найвищим з макроелементів у сировині усіх серій та коливався від 190 мг/100 г (серія 6) до 325 мг/100 г (серія 7). Досить високим був вміст кальцію – від 37 мг/100 г (серія 6) до 86 мг/100 г (серія 4) (рис. 4.15).

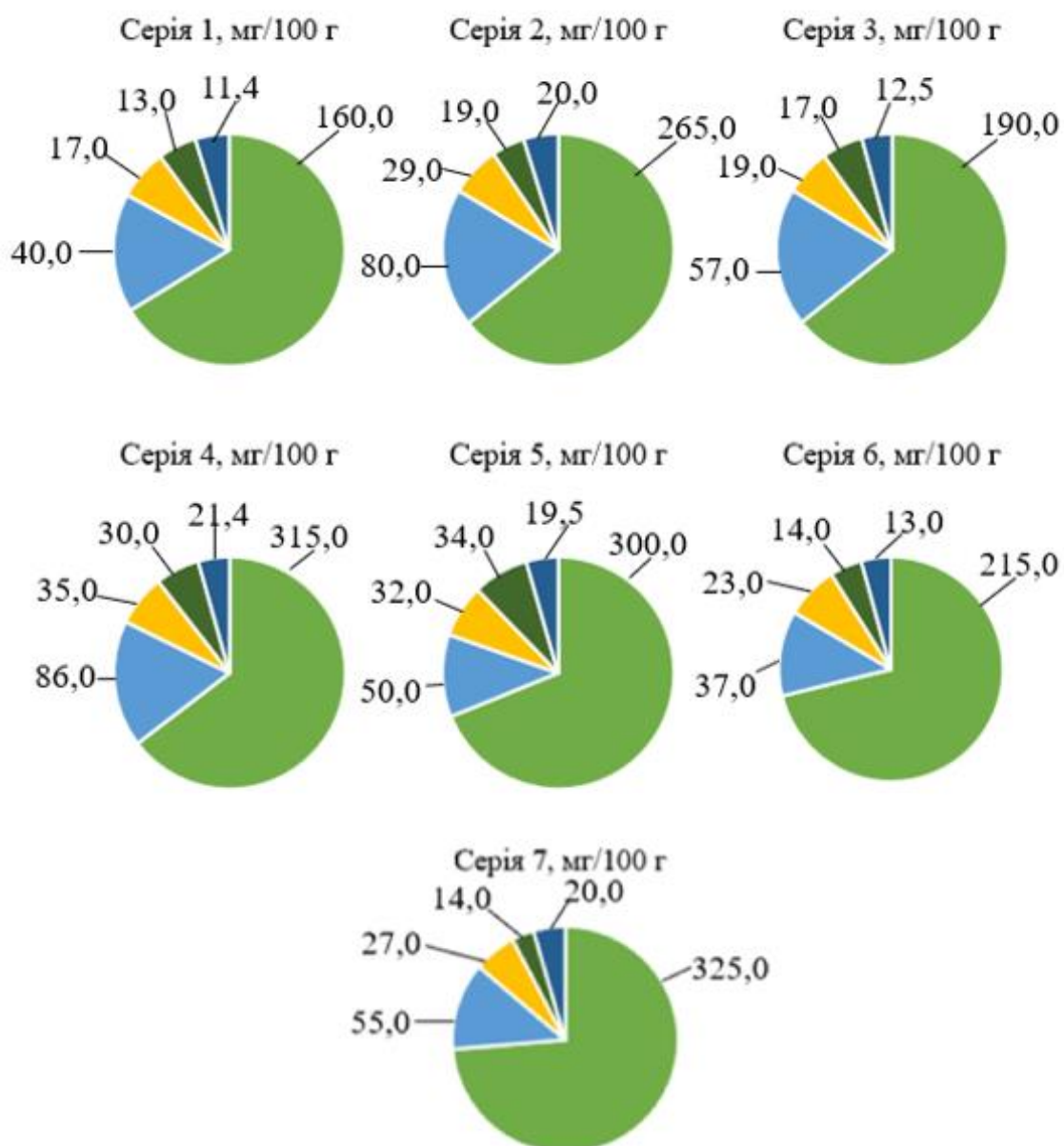


Рис. 4.16 Макроелементний склад серій сланей *C. islandica* (мг/100 г):

■ – К; ■ – Са; ■ – Мг; ■ – Na; ■ – Р

Результати визначення мікроелементного складу серій сировини, наведено у вигляді діаграм на рис. 4.17. Встановлено кількісний вміст мікроелементів силіцію, цинку, алюмінію, мангану, феруму, стронцію, купруму та молібдену. Вміст силіцію був високим— від 30 мг/100 г (серія 1) до 115 мг/100 г (серія 4).

Порівняно з іншими мікроелементами значну частку займали цинк – від 5,4 мг/100 г (серія 7) до 28,6 мг/100 г (серія 4) та алюміній – від 4,6 мг/100 г (серія 6) до 12,2 мг/100 г (серія 5).

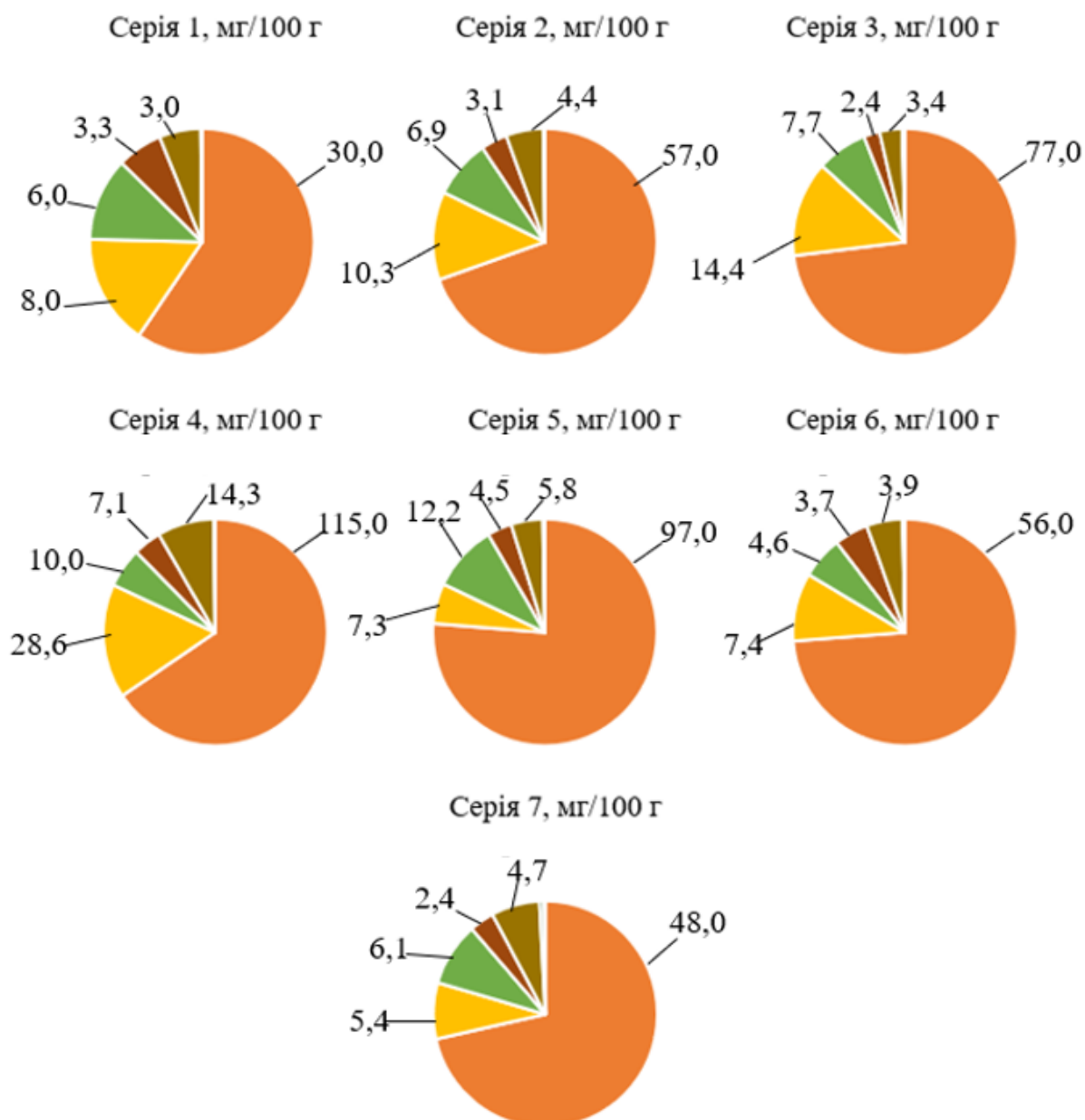


Рис. 4.17 Мікроелементний склад серій сланей *C. islandica* (мг/100 г):

■ – Si; ■ – Zn; ■ – Al; ■ – Mn; ■ – Fe

Закономірність накопичення елементів для кожної з досліджуваних серій сировини мала наступний вигляд:

серія 1: K > Ca > Si > Mg > Na > P > Zn > Al > Mn > Fe > Sr > Cu > Mo;

серія 2: K > Ca > Si > Mg > P > Na > Zn > Al > Fe > Mn > Sr > Cu > Mo;

серія 3: $K > Si > Ca > Mg > Na > P > Zn > Fe > Al > Mn > Sr > Cu > Mo$;

серія 4: $K > Si > Ca > Mg > Na > P > Zn > Al > Mn > Fe > Sr > Cu > Mo$;

серія 5: $K > Si > Ca > Na > Mg > P > Al > Zn > Fe > Mn > Cu > Sr > Mo$;

серія 6: $K > Si > Ca > Mg > Na > P > Zn > Al > Fe > Mn > Sr > Cu > Mo$;

серія 7: $K > Ca > Si > Mg > P > Na > Al > Zn > Fe > Mn > Sr > Cu > Mo$.

У всіх серіях сировини кількісний вміст молібдену та кобальту становив менше 0,03 мг/100 г, вміст кадмію, аstatу та гідраргіруму – менше 0,01 мг/100 г. Кількісний вміст ніколу не перевищував 0,128 мг/100 г.

Важливо зазначити, що кількісний вміст плюмбуму у сировині становив від 0,067 мг/100 г, або 0,67 ppm (серія 1) до 0,18 мг/100 г або 1,8 ppm (серія 4), що не перевищує 10,0 ppm, тобто ту межу значення, що наведено у монографії ДФУ 2.0 [8].

Висновки до розділу 4

1. Проведено системне вивчення якісного складу сировини *C. islandica* та кількісного вмісту основних груп БАР у серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata*.
2. Методом ВЕРХ у сировині *C. islandica* ідентифіковано щонайменше 7 АК, з яких 5 належать до замінних (аспарагінова кислота, глютамінова кислота, серин, аргінін та аланін) та 2 – до незамінних (треонін і валін). Серед вільних замінних АК переважали аланін (288 ± 9 мкг/г) та аргінін (173 ± 4 мкг/г), серед вільних незамінних – треонін (51 ± 2 мкг/г).
3. Методом ГХ/МС ідентифіковано у сланях *C. islandica* не менше 2 вільних моносахаридів (з домінуванням персеїтолу – $6,99 \pm 0,29$ мг/г) та не менше 7 зв'язаних моносахаридів (домінувала D-глюкоза – $203,64 \pm 8,96$ мг/г).
4. Методом ГХ/МС встановлено жирнокислотний склад сировині *C. islandica* (3 насичені та 3 ненасичені). Кількісний вміст кожної з виявлених ЖК коливався незначно і становив від $1,57 \pm 0,02$ мг/г (арахінова кислота) до $1,95 \pm 0,03$ мг/г (лінолева кислота). Загальний вміст суми ЖК становив $11,10 \pm 0,15$ мг/г. Дані кількісного вмісту насичених арахінової, пентадецилової, стеаринової та ненасичених лінолевої, елаїдинової та олеїнової ЖК у сировині *C. islandica*, визначено нами вперше.
5. Кількісний вміст аскорбінової кислоти у 7 серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* визначили за методом СФ-метрії, що становило, відповідно, не менше 15,0 мг% та 9,0 мг%.
6. Кількісний вміст суми органічних кислот у 7 серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata* визначили титриметричним методом в перерахунку на яблучну кислоту. Цей показник був не менше 2,8 % у сировині *C. islandica* та у сланях *C. aculeata* становив 2,1 %.
7. У результаті проведеного за допомогою ГХ/МС дослідження сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica*, заготовлених в Україні, було ідентифіковано 24 сполуки цієї групи, в тому числі: терпеноїди

та їхні похідні, ациклічні насичені вуглеводні, дієнові вуглеводні, ЖК, естери, тощо.

8. Кількісний вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у серіях сировини *C. islandica* був не менше 1,2 %, в сланях *C. aculeata*. – 0,8 %.

9. У сировині *C. islandica* методом ВЕРХ було виявлено 4 сполуки, що мають флавоноїдну природу. Вперше для сланей встановлено наявність флавонового аглікону лютеоліну, флавонолових агліконів кемпферолу та кверцетину, а також похідного кверцетину – біозиду рутину. Кількісний вміст в сланях *C. islandica* суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид був не менше 0,5 %. та сланях *C. aculeata* – 0,2 %.

10. Методом ВЕРХ досліджено якісний склад карбонових кислот (3 сполуки) сланей *C. islandica* та виділена в ідивідуальному стані одна з лишайникових кислот, структуру якої було встановлено як фумаропротоцетрарова кислота.

11. Вміст загальної золи у серіях сировини *C. islandica* становив від $0,61 \pm 0,02$ % (серія 5) до $1,43 \pm 0,05$ % (серія 4), що не перевищувало 3 %, регламентовані монографією ДФУ 2.0.

12. Елементний склад серій сировини *C. islandica* визначений методом ААС та представлений 19 сполуками з домінуванням калію, вміст якого коливався від 190 мг/100 г (серія 6) до 325 мг/100 г (серія 7).

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:

1. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of the elemental and amino acid composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli batches harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 3 (20). P. 31–39. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.262369>

2. Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 5 (39). P. 4–15. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.265019>

3. Shpychak A. O., Khvorost, O. P. The study of the carbohydrate composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20 (4). P. 21–26. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.267653>
4. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of fatty acid composition of the raw material of *Cetraria islandica* (L.) Ach, harvested in Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2023. Vol. 2. P. 59 – 63. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8046195>
5. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.299297>
6. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : мат. XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.
7. Шпичак А. О., Хворост О. П. Дослідження хімічного складу сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* : тези доповідей всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р. Одеса : ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 119 – 121.
8. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти у серіях сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали VI міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 12 квітня 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 195.

РОЗДІЛ 5

ВИЗНАЧЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ СЛАНЕЙ *C. ISLANDICA*, ПАРАМЕТРІВ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ СЛАНЕЙ ЦЕТРАРІЇ ІСЛАНДСЬКОЇ ЕКСТРАКТУ ГУСТОГО ТА ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЇ

В сучасних умовах виробництва фітохімічних препаратів визначення основних технологічних параметрів досліджуваної рослинної сировини є однією з важливих операцій, що проводиться на етапі фармацевтичної розробки ЛЗ. Ці показники дозволяють підібрати найбільш раціональний підхід до виробничого процесу, для визначення ступеня подрібнення сировини, її просіювання, дозування, транспортування та установа витратних норм рослинного матеріалу, екстрагенту [5, 24].

Найбільш значущими технологічними характеристиками для рослинної сировини є: питома маса, об'ємна та насипна густина, плинність, пористість, нарізність, вільний об'єм шару, кут природного укусу, питома поверхня, середній розмір часток, втрата маси при висушуванні та ін. параметри [9].

Нами були проведені дослідження щодо визначення основних технологічних параметрів серій *C. islandica*, в яких були визначені і розраховані: втрата маси при висушуванні питома, об'ємна і насипна густина, пористість, порізність, вільний об'єм шару, коефіцієнти поглинання ряду екстрагентів та ін.

Випробування досліджуваних серій сланей *C. islandica* проводили за методиками викладеними в ДФУ 2.0 [9] та у розд.2, п.17. Сировину попередньо подрібнювали на лабораторному млині марки ЛЗМ-1 (виробництва «Оліс», Україна) до ступеня дисперсності $2,0 \pm 0,5$ мм. Залишок порошку, що не проходив крізь сито № 34, складав не більше 10 % [9].

5.1 Визначення основних технологічних показників сировини *C. islandica*

Результати випробування об'ємної густини наведені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Результати визначення об'ємної густини сланей *C. islandica* (n=5)

Об'ємна густина сланей <i>C. islandica</i> , (d_0) г/см ³	Результати статистичної обробки
0,272	0,275 ± 0,007
0,278	
0,282	
0,268	
0,273	

Об'ємна густина сланей *C. islandica* дорівнювала 0,275 ± 0,007, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати випробування насипної густини наведені в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Результати визначення насипної густини сланей *C. islandica* (n=5)

Насипна густина сланей <i>C. islandica</i> , (d_n) г/см ³	Результати статистичної обробки
0,265	0,266 ± 0,007
0,272	
0,258	
0,263	
0,270	

Об'ємна густина сланей *C. islandica* дорівнювала $0,275 \pm 0,007$, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати випробування питомої маси наведені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Результати визначення питомої маси сланей *C. islandica* (n=5, г/см³)

Питома маса сланей <i>C. islandica</i> , (d_y) г/см ³	Результати статистичної обробки
0,617	0,615 $\pm$ 0,016
0,628	
0,610	
0,595	
0,623	

Об'ємна густина сланей *C. islandica* дорівнювала $0,615 \pm 0,016$ г/см³, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати визначення пористості наведені в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Результати визначення пористості сланей *C. islandica* (n=5)

Пористість сланей <i>C. islandica</i> , (P_c) г/см ³	Результати статистичної обробки
0,550	0,552 $\pm$ 0,014
0,557	
0,568	
0,537	
0,548	

Пористість сланей *C. islandica* дорівнювала $0,552 \pm 0,014$, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати встановлення нарізності наведені в табл. 5.5.

Нарізність сланей *C. islandica* (n=5)

Нарізність сланей <i>C. islandica</i> , ($\Pi_{сл}$)	Результати статистичної обробки
0,036	$0,035 \pm 0,001$
0,035	
0,034	
0,034	
0,036	

Нарізність сланей *C. islandica* дорівнювала $0,035 \pm 0,001$, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати визначення вільного об'єму шару наведені в табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Вільний об'єм шару сланей *C. islandica* (n=5)

Вільний об'єм шару сланей <i>C. islandica</i> , (V)	Результати статистичної обробки
0,583	$0,567 \pm 0,014$
0,573	
0,566	
0,560	
0,554	

Вільний об'єм шару сланей *C. islandica* дорівнював $0,567 \pm 0,014$, що буде враховано у технологічному процесі.

Результати визначення основних технологічних параметрів сланей *C. islandica* узагальнені у табл. 5.7-5.8 [35, 40].

Таблиця 5.7

Технологічні параметри сланей *C. islandica*

Технологічні параметри	Результат визначення
1	2
Об'ємна густина (d_o) г/см ³	0,275 ± 0,007
Насипна густина (d_n), г/см ³	0,266 ± 0,007
Питома маса, (d_n), г/см ³	0,615 ± 0,016
Пористість (P_c)	0,552 ± 0,014
Нарізність ($P_{ш}$)	0,035 ± 0,001
Вільний об'єм шару (V)	0,567 ± 0,014
Коефіцієнт поглинання екстрагенту, мл/г	
- Вода очищена	2,796 ± 0,035
- 10 % етанол	2,498 ± 0,040
- 20 % етанол	2,401 ± 0,032
- 30 % етанол	2,900 ± 0,033
- 40 % етанол	2,149 ± 0,029
- 50 % етанол	2,351 ± 0,036
- 60 % етанол	2,249 ± 0,030
- 70 % етанол	2,100 ± 0,023
- 80 % етанол	2,349 ± 0,025
- 90 % етанол	2,298 ± 0,024
- 96 % етанол	2,200 ± 0,029

Визначення показника набухання сланей *C. islandica* проводили для 7 серій сировини за методикою, наведеною в ДФУ 2.0 [9]. Результати випробування наведені в табл. 5.8.

**Результати визначення показника набухання досліджуваних серій
сланей *C. islandica* (n=3)**

№ серії	Показник набухання (K_n), мл	Результати статистичної обробки
1	7,2	7,1 ± 0,3
	7,3	
	6,9	
2	6,7	6,7 ± 0,2
	6,6	
	6,8	
3	6,8	6,8 ± 0,2
	6,7	
	6,9	
4	7,0	7,1 ± 0,2
	7,1	
	7,3	
5	7,2	7,0 ± 0,3
	6,8	
	7,0	
6	7,4	7,3 ± 0,2
	7,2	
	7,2	
7	6,9	7,0 ± 0,3
	6,8	
	7,2	

Результати визначення втрати в масі при висушуванні у досліджуваних серій сланей *C. islandica* наведені в табл. 5.9. Втрата в масі при висушуванні не перевищувала 11,5 % (серія 4).

Визначення втрати в масі при висушуванні у досліджуваних серіях сланей *C. islandica*, (n=5, %, у перерахунку на абсолютно суху речовину)

№ серії	Результат визначення
1	$10,4 \pm 0,2$
2	$11,0 \pm 0,4$
3	$10,5 \pm 0,2$
4	$11,6 \pm 0,2$
5	$9,8 \pm 0,2$
6	$11,2 \pm 0,4$
7	$10,7 \pm 0,2$

5.2 Визначення динаміки вилучення екстрактивних речовин зі сланей *C. islandica* в залежності від екстрагенту

Визначені оптимальні екстрагенти для вилучення екстрактивних речовин та суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол (табл. 5.10). Екстракти отримували методом дробової мацерації (двократне настоювання з тривалістю операції 12 год) при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10. Як екстрагент використовували воду очищену, водно-етанольні суміші (10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % етанол) та 96 % етанол [37, 159].

Визначення вмісту екстрактивних речовин проводили гравіметричним методом у перерахунку на абсолютно суху сировину. Вміст екстрактивних речовин у водних і водно-етанольних екстрактах коливався від $14,32 \pm 0,36$ % (при використанні 96 % етанолу) до $33,77 \pm 0,91$ % (при використанні води очищеної).

Результати визначення вмісту екстрактивних речовин наведені в табл. 5.10. Як оптимальний екстрагент для вилучення екстрактивних речовин було визначено воду очищену.

**Динаміка вилучення екстрактивних речовин та суми поліфенолів у
перерахунку на пірогалол зі сланей *C. islandica* різними екстрагентами
(n=5, %, у перерахунку на суху сировину)**

Екстрагент	Кількісний вміст			
	екстрактивних речовин		суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол	
	1 витяжка	2 витяжка	1 витяжка	2 витяжка
1	2	3	4	5
Вода	26,69 ± 0,66	7,08 ± 0,25	0,98 ± 0,03	0,49 ± 0,02
10 % етанол	24,64 ± 0,66	6,71 ± 0,23	1,08 ± 0,04	0,47 ± 0,02
20 % етанол	23,80 ± 0,57	5,88 ± 0,19	1,74 ± 0,06	0,65 ± 0,03
30 % етанол	23,25 ± 0,55	5,60 ± 0,19	1,91 ± 0,08	1,53 ± 0,05
40 % етанол	22,81 ± 0,51	5,46 ± 0,20	2,46 ± 0,09	0,75 ± 0,03
50 % етанол	21,89 ± 0,55	5,24 ± 0,15	1,94 ± 0,07	0,84 ± 0,03
60 % етанол	22,17 ± 0,47	5,06 ± 0,19	2,05 ± 0,08	0,79 ± 0,03
70 % етанол	20,22 ± 0,54	5,14 ± 0,17	3,67 ± 0,14	1,41 ± 0,04
80 % етанол	16,69 ± 0,46	4,97 ± 0,17	2,58 ± 0,09	2,31 ± 0,07
90 % етанол	11,25 ± 0,27	4,02 ± 0,14	2,53 ± 0,10	1,09 ± 0,04
96 % етанол	10,77 ± 0,25	3,55 ± 0,11	2,12 ± 0,08	0,91 ± 0,04

Згідно з даними табл. 5.10, кількісний вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у першій витяжці є вищим незалежно від використаного екстрагенту. У рядах перших та других витяжок спостерігалось збільшення кількісного вмісту суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол зі збільшенням концентрації етанолу до 80 %. При подальшому збільшенні концентрації до 90 % і вище кількісний вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол зменшується. Оптимальним екстрагентом, що вилучав найбільшу

кількість екстрактивних речовин і суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол, був 70 % етанол [37, 159].

5.3 Визначення оптимального співвідношення сировина – екстрагент

Співвідношення сировина – екстрагент обирали експериментальним шляхом. Брили наважки сировини (100,00 г) з точністю до 0,01 г, подрібненої до 2-3 мм та використовували метод дробової мацерації (2 зливи, екстрагування при температурі 20 ± 2 °С, кожна екстракція протягом 12 год). Як екстрагент для сланей *C. islandica* використовували водно-етанольну суміш у концентрації 70 %.

Отримані витяжки об'єднували, відстоювали протягом 24 год, відфільтровували від осаду баластних речовин. Вміст екстрактивних речовин та суми поліфенолів у витяжках, отриманих при різному співвідношенні сировини до екстрагенту, наведено в табл. 5.11.

Таблиця 5.11

Вихід екстрактивних речовин та суми поліфенолів в залежності від співвідношення сировина – екстрагент для сланей *C. islandica* (n=5, у %, у перерахунку на абсолютно суху сировину)

№ з/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Вміст у готовому продукті, %	
		екстрактивних речовин	суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол
1	1:5	23,34 $\pm$ 0,14	2,87 $\pm$ 0,04
2	1:10	26,56 $\pm$ 0,04	5,12 $\pm$ 0,04
3	1:15	27,12 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,05

Дані таблиці 5.11 свідчать, що спостерігається прямо пропорційна залежність: у процесі збільшення співвідношення сировина – екстрагент

збільшувався вихід екстрактивних речовин та суми поліфенолів. Не зважаючи на таку закономірність, співвідношення 1:5 приводило до досить низького виходу як екстрактивних речовин, так і суми поліфенолів у витяжках, а можливе збільшення співвідношення до 1:15 та вище є економічно недоцільним внаслідок незначного збільшення виходу екстрактивних речовин.

Таким чином, для сланей *C. islandica* оптимальним співвідношенням сировини – екстрагент слід вважати 1:10. При такому співвідношенні вихід суми поліфенолів становив близько 1/5 від екстрактивних речовин сировини.

5.4 Визначення оптимального часового терміну екстрагування

Оптимальний часовий термін настоювання визначали шляхом мацерації сировини при температурі 20 ± 2 °C протягом різних часових термінів: 6 год, 12 год, 18 год, 24 год та 30 год. Результати визначення виходу екстрактивних речовин та суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол наведено в табл. 5.12.

Таблиця 5.12

Динаміка виходу екстрактивних речовин та суми поліфенолів зі сланей *C. islandica* в залежності від часового терміну екстракції (n=5, у %, у перерахунку на абсолютно суху сировину)

Часовий термін екстракції, год	Вихід	
	екстрактивних речовин	суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол
1	2	3
6	12,45 ± 0,53	4,17 ± 0,04
12	25,34 ± 0,68	4,85 ± 0,04

1	2	3
18	$27,18 \pm 0,62$	$5,39 \pm 0,05$
24	$28,89 \pm 0,74$	$5,62 \pm 0,05$
30	$29,38 \pm 0,91$	$5,78 \pm 0,04$

Дані, що наведені в табл. 5.12 свідчать про те, що для отримання екстрактів зі сланей *C. islandica* оптимальним є час настоювання сировини протягом 12 год.

5.5 Відпрацювання технологічних параметрів отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого

В ході випробувань як екстрагент обрали 70 % етанол, оскільки етанол в такій концентрації вилучав оптимальну кількість екстрактивних речовин та суми поліфенолів (див. розділ 5.2), а також враховували спрямованість терапевтичної дії досліджуваного екстракту густого, що розроблявся, спосіб і тривалість його застосування.

Для отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого нами було запропоновано використати співвідношення сировина – екстрагент 1:10.

Додатково визначали ступінь вилучення діючих речовин водно-етанольною сумішшю у концентрації 65 % і 75 %, які є граничними при отриманні досліджуваної концентрації екстрагенту.

У ході випробувань проводили напрацювання 5 серій для цетрарії ісландської сланей екстракту густого у відповідності до вимог ДФУ 2.0 [9]. Результати випробувань представлені в табл. 5.13.

**Ступінь вилучення БАР із сировини в залежності від концентрації
водно-етанольної суміші та часу настоювання (n=5)**

Екстрагент	Термін екстракції, год,	Вихід суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол у витяжці, у %, у розрахунку на 100 мл екстракту		
		Ступінь подрібнення сировини		
		3 мм	5 мм	7 мм
65 % етанол	6	3,77 ± 0,16	3,62 ± 0,15	3,38 ± 0,15
	12	4,94 ± 0,17	4,56 ± 0,15	4,54 ± 0,16
	24	5,09 ± 0,17	4,90 ± 0,16	4,87 ± 0,16
	36	5,16 ± 0,17	5,07 ± 0,16	4,92 ± 0,16
70 % етанол	6	3,85 ± 0,15	3,68 ± 0,16	3,40 ± 0,15
	12	4,86 ± 0,16	4,63 ± 0,16	4,52 ± 0,16
	24	4,11 ± 0,17	4,95 ± 0,17	4,73 ± 0,16
	36	5,23 ± 0,17	5,14 ± 0,16	5,08 ± 0,17
75 % етанол	6	3,82 ± 0,16	3,64 ± 0,16	3,41 ± 0,16
	12	4,90 ± 0,15	4,67 ± 0,16	4,48 ± 0,14
	24	5,07 ± 0,16	4,93 ± 0,17	4,85 ± 0,16
	36	5,19 ± 0,16	5,10 ± 0,16	4,96 ± 0,17

Для виконання поставленого завдання нами було вивчено ступінь вилучення БАР із досліджуваної сировини в залежності від концентрації водно-етанольної суміші, часу настоювання та ступеню подрібнення сировини (табл 5.11-5.13).

Параметри отримання субстанції такі:

- насипна густина: $0,266 \pm 0,007$ г/см³;
- екстрагент готували відповідно до вимог ДФУ 2.0;
- співвідношення сировина – екстрагент – 1:10;

- спосіб екстракції: дробова мацерація (2 рази по 12 год);
- температура: 20 ± 2 °C;
- фільтрація самотплином крізь фільтрувальний папір.

Аналізуючи отримані дані можна зробити висновок про те, що оптимальним часом однієї операції екстракції було 12 год, ступінь подрібнення сировини 3-5 мм. Зміна концентрації водно-етанольної суміші в межах від 65 до 75 % істотно не впливала на вихід екстрактивних речовин.

Таким чином, нами були обрані оптимальні параметри для отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого. Оптимальний екстрагент – водно-етанольна суміш у концентрації 70 %, загальне співвідношення сировина – екстрагент – 1:10, кратність зливів – 2, час однієї операції – 12 год, температура проведення процесу екстракції – 20 ± 2 °C. Критеріями оцінки було обрано вихід екстрактивних речовин та суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол. На основі проведених випробувань нами було розроблено технологію отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого.

5.6 Визначення основних показників якості цетрарії ісландської сланей екстракту густого

Для стандартизації було визначено ряд показників якості 5 серій цетрарії ісландської сланей екстракту густого, напрацьованих у лабораторних умовах із сировини, заготовленої у 2019 році.

Проект методик контролю якості цетрарії ісландської сланей екстракту густого включає такі показники:

Виробництво. Екстракт виробляють з лікарської сировини методом дробової мацерації при кімнатній температурі та згущують витяжку під зниженим тиском, або підходящим методом, використовуючи *етанол 70 % (об/об) Р*.

2. Опис. Густа, в'язка маса коричневого кольору зі специфічним запахом.

3. Розчинність. Нерозчинний у воді, розчинний у етанолі (70 %, об/об) *P*, нерозчинний у етанолі (96 %, об/об) *P*, практично нерозчинний у гліцерині, оліях рослинних та мінеральних.

4. Випробування.

Втрата в масі при висушуванні (ДФУ 2.0, т. 3, п. 2.8.17). 5,0 г екстракту густого висушують за температури 105 °С протягом 2 год. Втрата в масі при висушуванні має бути не більше 12,0 %.

Загальна зола. Визначають за методикою ДФУ 2.1, п. 2.4.16. Загальна зола має становити не більше 3 %.

Важкі метали. Визначають за методикою ДФУ 2.1, п. 2.4.8. 5,0 г цетрарії ісландської сланей екстракту густого висушують до отримання сухого залишку. Додають 1 мл *кислоти сірчаної P*, обережно спалюють в тиглі та прожарюють на піщаному нагрівнику. До отриманого залишку при нагріванні додають 5 мл розчину 615 г/л *амонію ацетату P*, фільтрують крізь беззольний фільтр, промивають 5 мл води очищеної та доводять об'єм фільтрату *водою P* до 100 мл.

До 12 мл отриманого розчину додають 2 мл буферного розчину рН 3,5 та ретельно перемішують. Отриману суміш додають до 1,2 мл реактиву тіоацетаміду і перемішують. Паралельно за тих самих умов готують еталонний розчин, використовуючи замість 12 мл випробуваного розчину суміш 10 мл еталонного розчину *плюмбуму (1 ppm або 2 ppm Pb)* та 2 мл випробуваного розчину.

Готують контрольний розчин, використовуючи суміш 10 мл води очищеної та 2 мл випробуваного розчину. Порівняно з контрольним розчином еталон мав світло-коричневе забарвлення, яке протягом 2 хв зменшувало інтенсивність розчину у порівнянні із забарвленням еталоном.

Вміст важких металів у досліджуваному зразку має бути не більше 0,001 % (100 ppm).

Об'єм вмісту пакування. Випробування проводять з 10 банок скляних з використанням мірного циліндру ємністю 100,0.

Об'єм вмісту пакування має бути від 47,0 до 53,0 г.

Мікробіологічна чистота. Методика випробування відповідає вимогам ДФУ 2.1. (п. 2.6.12, п. 2.6.13, N).

Відсутність *Salmonella* в 25,0 г (ДФУ 2.1 п. 2.6.31, п. 5.1.8).

Відсутність *E. coli* в 1,0 г (ДФУ 2.1 п. 2.6.31, п. 5.1.8).

5. Кількісне визначення

Сума поліфенолів. Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів проводять методом СФ-метрії відповідно до методики, викладеної в монографії «Деревію трава^N» (ДФУ 2.3).

Вихідний розчин. Для проведення аналізу наважку 0,1 г *C. islandica* сланей екстракту густого розчиняють у 10 мл *етанолу* (70 %, об/об) *P*, доводять об'єм до мітки цим же розчинником до 250,0 мл.

Суміш фільтрують крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм. Відкидають перші 50 мл фільтрату. 5.0 мл фільтрату доводять *водою P* до об'єму 25.0 мл.

Випробовуваний розчин. Суміш 2.0 мл отриманого розчину, 1.0 мл *фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву P* і 10.0 мл *води P* доводять розчином 290 г/л *натрію карбонату P* до об'єму 25.0 мл.

Стандартний розчин. Безпосередньо перед випробуванням 50.0 мг *пірогалолу P* розчиняють у *воді P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл отриманого розчину доводять *водою P* до об'єму 100.0 мл.

Компенсаційний розчин. Вода P.

Оптичну густину (2.2.25) розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 760 нм. Вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{62.5 \times A_1 \times m_2 \times P}{A_0 \times m_1 \times 100}, \quad (5.1)$$

де A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_1 – маса наважки екстракту, мг;

m_2 – маса наважки ФСЗДФУ пірогалолу, мг;

P – вміст пірогалолу у ФСЗДФУ пірогалолу, %;

Вміст суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол має бути не менше 4,0 %.

Упаковка. По 50,0 г у банки скляні типу БВ 100-ВГС за ТУ У00333888,003-98, закупорені кришками закупорювально-нагвинчуваними з контролем першого розкриття типу 1.4В-27 за ТУ У1904660-01-97 або кришками алюмінієвими з перфорацією типу К-4-28 за ТУ У14257180.001-96.

На банки скляні наклеюють етикетки з клеючим шаром за ТУ У13399860.002-99. Кожну банку разом з інструкцією з медичного застосування або листком-вкладишем вкладають в пачку з картону для споживчої тари підгрупи хром-ерзац за ГОСТ 7933-89 або картону хром-ерзац за ТУ 13-0281020-97-90. Допускається текст інструкції з медичного застосування або листка-вкладиша наносити на пачку.

Групова і транспортна упаковка у відповідності з ГОСТ 17768-90.

Маркування. На етикетці та пачці українською мовою зазначають: «Україна», установу, її товарний знак та адресу, «Розробка ...», назву препарату латинською і українською мовами, назву сировини, що використовують для його виготовлення, її кількість за прописом виготовлення препарату. «Засіб, що застосовується при ...», вагу препарату у грамах, умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штриховий код.

На пачці додатково вказують спосіб застосування та дози. На етикетці банки допускається не вказувати адресу підприємства, назва рослини, що використовують для виготовлення препарату, та штриховий код. На пачці має бути товарний знак із написом «Гарантія якості» та стікер, які є елементами захисту.

На етикетці флакона українською мовою вказують «Україна», «Розробка НФаУ, м. Харків», його товарний знак і адресу, назву екстракту латинською та українською мовами, масу екстракту, умови зберігання, номер партії, термін

придатності. Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-77.

Транспортування. Відповідно до ГОСТ 17768-90.

Зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 20 ± 2 °C у сухому, захищеному від світла місці.

Термін придатності. 2 роки.

Антимікробний, протизапальний засіб.

Опис технологічного процесу отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого

Екстракт густий зі сланей *C. islandica* одержували в лабораторних умовах методом двократної дробової мацерації за температури 20 ± 2 °C при загальному співвідношенні сировина : екстрагент – 1:10 порціями 1:5, з урахуванням коефіцієнта поглинання екстрагента. До підготовленої рослинної сировини додавали екстрагент – водно-етанольну суміш із концентрацією етанолу 70 % та настоювали впродовж 12 год за температури 20 ± 2 °C. Отриману витяжку відфільтровували і за аналогічних умов повторно проводили екстракцію. Витяжки об'єднували та відстоювали протягом 24 год, фільтрували, після чого упарювали під вакуумом.

За результатами проведених випробувань нами було встановлено контрольні технологічні параметри на кожній стадії проведення технологічного процесу отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого, які наведені в табл. 5.14.

З урахуванням встановлених нами критичних параметрів проведення технологічного процесу отримання цетрарії ісландської сланей екстракту густого розроблено та запропоновано для апробації в умовах промислового виробництва вітчизняних фармацевтичних підприємств блок-схему виробництва екстракту густого (рис. 5.1.).

Технологічний процес промислового виробництва цетрарії ісландської сланей екстракту густого проводиться у відповідності з дотримання санітарних вимог. Підготовка виробництва (підготовка повітря

вентиляційного, санітарна обробка приміщень, інвентарю, обладнання, апаратури та комунікацій, приготування дезінфікуючих розчинів, підготовка технологічного одягу та персоналу до роботи), контроль мікробної контамінації має проводитись відповідно до вимог розробленої нормативної документації. Зазвичай виробництво екстракту густого відноситься до нестерильної продукції, тому цей процес проводиться у виробничих приміщеннях класу чистоти D.

Таблиця 5.14

**Критичні параметри технологічного процесу виробництва цетрарії
ісландської сланей екстракту густого**

Стадія технологічного процесу	Критичний параметр
1	2
Зважування сировини	– маса сировини
Подрібнення сировини	– розмір отворів вібросита ($2,0 \pm 0,5$) мм; – ступінь подрібнення; – маса сировини
Просіювання сировини	– діаметр отворів сита; – однорідність та кількість просіяної сировини
Приготування екстрагенту	– об'єм; – концентрація етанолу, %; – температура (20 ± 2 °C)
Отримання витяжки	– тривалість процесу (12 год); – температура (20 ± 2 °C); – кратність екстрагування (2 рази)
Відстоювання витяжки	– тривалість процесу (24 год); – температура ((4–5) °C)

Фільтрування витяжки	– режим вакуумування (глибина вакууму 0,06–0,08 МПа); – зовнішній вигляд
Концентрування витяжка (Отримання густого екстракту)	– режим вакуумування (глибина вакууму 0,06–0,08 МПа); – кількість отриманого відгону; – якість готового продукту на відповідність вимогам МКЯ (опис, вміст вологи, кількісний вміст)

При вхідному контролі рослинної сировини перевіряють наявність аналітичного паспорту, що підтверджує відповідність якості сировини сланей *C. islandica* вимогам нормативної документації. Сировина та допоміжні матеріали допускаються до виробництва після лабораторних досліджень, які також проводять відповідно до вимог чинної нормативної документації.

Сировину передають на виробництво за необхідністю використання. За допомогою візків та автотранспорту сировину транспортують зі складу. Для запобігання утворення мікробної контамінації кінцевого продукту, звільнення сировини від тари та її пакування проводять у окремому приміщенні. Транспортування сировини та допоміжних матеріалів, звільнених від пакування, як правило проводять у закритих ємностях, на яких мають бути етикетки із зазначенням назви сировини, маси та дати надходження.



Рис. 5.1 Технологічна блок-схема виробництва цетрарії ісландської сланей екстракту густого у промислових умовах

5.7 Дослідження біологічної активності субстанцій сланей *C. islandica*

5.7.1 Дослідження спектру антимікробної активності цетрарії ісландської сланей екстракту густого

Зважаючи на значний вміст у сировині та отриманому екстракті густому фенольних сполук, здатних проявляти антимікробну, протизапальну, антиоксидантну та інші види активності, нами були проведенні біологічні випробування отриманого цетрарії ісландської сланей екстракту густого (методику див. розд. 2., п. 2.20).

При проведенні випробування антимікробної активності нами було встановлено, що досліджуваний екстракт густий проявляє активність у дозі 0,5 мл по відношенню до штамів мікроорганізмів роду *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. pyogenes* Dick-1 (табл. 5.15).

Таким чином, методом дифузії в агар було встановлено антимікробну активність екстракту густого зі сланей *C. islandica* у концентрації 1 %, 5 % та 10 % (розчинник 70 % етанол). Як референс-препарат було використано обраний для отримання екстракту густого екстрагент – 70 % етанол. Отриманий екстракт густий у розчинах з концентрацією 10 % та 5 % здатний пригнічувати ріст практично усіх використаних в експерименті штамів мікроорганізмів (крім *P. vulgaris*). Отримана субстанція є ефективною у концентрації розчину 1 % лише по відношенню до мікроорганізмів *S. aureus*, *B. subtilis* та *C. albicans*.

Найбільш прийнятну затримку зон росту досліджуваних штамів було відзначено при використанні 10 % розчину екстракту густого сланей *C. islandica*. Найбільш вразливими до дії досліджуваного екстракту густого у даній концентрації є штами *S. aureus*, *S. pyogenes* та *P. aeruginosa*, зона затримки росту яких становила понад 22,0 мм.

Таблиця 5.15

Спектр антимікробної активності густого екстракту сланей *C. islandica*

№ з/п	Об'єкти дослідження	Діаметри зон затримки росту тест-штамів мікроорганізмів, мм								
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aerugi- nosa</i> ATCC 27853	<i>P. aerugi- nosa</i> ATCC 9027	<i>C. albi- cans</i> ATCC 855/653	<i>S. pyogenes</i> Dick-1
1	Екстракт густий сланей <i>C. islandica</i> (1 % розчин)	12,7 ± 0,7	12,5 ± 0,6	-	-	13,0 ± 0,8	-	-	13,0 ± 0,8	
2	Екстракт густий сланей <i>C. islandica</i> (5 % розчин)	20,4 ± 1,3	21,8 ± 0,8	12,7 ± 0,5	-	18,7 ± 0,9	13,7 ± 0,6	12,7 ± 0,5	16,2 ± 0,8	19,3 ± 0,5
3	Екстракт густий сланей <i>C. islandica</i> (10 % розчин)	22,1 ± 0,8	23,5 ± 0,5	22,7 ± 1,1	-	22,6 ± 1,2	19,6 ± 0,6	16,5 ± 0,3	18,4 ± 0,5	22,5 ± 1,2

Примітка*: - відсутня зона затримки росту мікроорганізмів

В цілому спостерігається послідовна закономірність з прямо пропорційною кореляцією до досліджуваних концентрацій розчину екстракту густого зі сланей *C. islandica* з відповідними розмірами зони затримки росту штамів мікроорганізмів.

5.7.2 Дослідження антирадикальної активності різних витяжок сланей *C. islandica* та цетрарії ісландської сланей екстракту густого

Дослідження АРА проводили за допомогою стабільного йону DPPH за метоликою, наведеною у розд.2, п.2.21.

Результати вивчення антирадикальної активності витяжок сланей *C. islandica*, отриманих з використанням водно-етанольних сумішей різних концентрацій та розчинів цетрарії ісландської сланей екстракту густого, представлені в табл. 5.16.

Таблиця 5.16

**Дослідження АРА витяжок сланей *C. islandica* та розчинів цетрарії
ісландської сланей екстракту густого**

Екстрагенти, використані для отримання витяжок	Антирадикальна активність, I %
Вода	$23,09 \pm 0,60$
10 % етанол	$40,96 \pm 1,26$
20 % етанол	$27,91 \pm 0,82$
30 % етанол	$2,81 \pm 0,09$
40 % етанол	$0,80 \pm 0,02$
50 % етанол	$18,08 \pm 0,66$
60 % етанол	$43,71 \pm 1,50$
70 % етанол	$58,63 \pm 1,57$
80 % етанол	$57,23 \pm 1,47$
90 % етанол	$60,29 \pm 1,85$
96 % етанол	$61,82 \pm 1,25$
Розчини цетрарії ісландської сланей екстракту густого	
1 %	$69,17 \pm 1,61$
5 %	$74,15 \pm 1,73$
10 %	$76,31 \pm 1,90$

АРА водних витяжок сланей *C. islandica* становила $23,09 \pm 0,60$ %. Значне підвищення антирадикальної активності спостерігалось при використанні у якості екстрагентів 60 %, 70 %, 80 %, 90 % та 96 % етанолу. Найвище значення

АРА проявляють екстракти, отримані при використанні 96 % етанолу – $61,82 \pm 1,25 \%$ [33].

Для розчинів цетрарії ісландської сланей екстракту густого спотсерігалася прямо пропорційна залежність між концентрацією розчину та АРА.

Висновки до розділу 5

1. Встановлено технологічні параметри (впитома, об'ємна, насипна маси, пористість сировини, нарізність шару, вільний об'єм, питома поверхня часток, коефіцієнти поглинання води та водно-етанольних сумішей різних концентрацій, коефіцієнт набухання, втрата в масі при висушуванні) серій сланей *C. islandica*.

2. Визначено динаміку вилучення екстрактивних речовин та поліфенолів у перерахунку на пірогалол в залежності від використаного екстрагенту, час екстрагування, співвідношення сировина-екстрагент.

3. Визначено оптимальні параметри технологічного процесу отримання екстракту густого зі сланей *C. islandica*, розроблено та запропоновано для апробації вітчизняних фармацевтичних підприємств його технологію, яка полягає в наступному: оптимальний екстрагент – 70 % етанол, загальне співвідношення сировина-екстрагент 1:10, кратність зливів – 2, час однієї операції – 12 год, температура процесу – 20 ± 2 °C. Критеріями оцінки обрано – вихід екстрактивних речовин та вихід суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол – не менше 4,0 %.

4. Встановлено антимікробну та антирадикальну дію екстракту густого сланей *C. islandica*, результати яких увійшли до заявок на патент України на винахід та патент України на корисну модель.

5. На підставі проведених досліджень обрано ряд критеріїв стандартизації, результати яких використано для розробки проєкту МКЯ «Цетрарії ісландської сланей екстракт густий».

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:

1. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення технологічних параметрів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Хімія*

природних сполук : мат. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р. Тернопіль. 2022. С. 168–169.

2. Шпичак А. О., Хворост О. П. Вивчення антирадикальної активності отриманих за допомогою різних екстрагентів екстрактів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : мат. V Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14 квітня 2023 р. Харків. 2023. С. 178.

3. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The dynamics of extraction of total polyphenols by different extractants from *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity* : Abstract book of the 1st International Conference, Kaunas, 21st of April 2023. Kaunas, Pharmacognosy Club, Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences. 2023. P. 37.

4. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : мат. XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.

5. Шпичак А. О., Хворост О. П. Динаміка вилучення екстрактивних речовин з сировини *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовленої в Україні, при використанні різних екстрагентів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : мат. X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10-11 травня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 188.

ВИСНОВКИ

У дисертації узагальнено експериментальні дослідження з вирішення наукового завдання, спрямованого на системний фармакогностичний аналіз серій сировини вітчизняних представників роду Цетрарія, зокрема серій сланей *C. islandica*, розробці технології отримання та стандартизації екстракту густого з цього виду сировини.

1. Проведено порівняльне дослідження морфологічної та анатомічної будову сланей *C. islandica* та *C. aculeata* з виділенням діагностичних рис. Встановлено морфометричні параметри серій сланей *C. islandica*, фракційний склад та вперше диференційовано частку мінеральних та органічних домішок.

2. Вперше встановлені морфологічні особливості будови сланей *C. islandica* (зростання лопатей за допомогою перетинок і розгалуженість війок по краю лопатей), можуть бути включено до відповідного розділу національної частини монографії ДФУ 2.0 «Цетрарія ісландська».

3. Методом ВЕРХ у сировині *C. islandica* визначено амінокислотний склад, однаковий для вільних та зв'язаних (7 сполук, з яких 5 замінні та 2 незамінні). Методом ГХ/МС встановлено наявність у сланях *C. islandica* не менше 2 вільних моносахаридів (з домінуванням *D*-персеїтолу – $6,99 \pm 0,29$ мкг/г) та не менше 7 зв'язаних моносахаридів (з домінуванням *D*-глюкози – $203,64 \pm 8,96$ мкг/г). Методом ГХ/МС встановлено жирнокислотний склад сировини *C. islandica*, представлений 3 насиченими та 3 ненасиченими. Кількісний вміст арахінової, пентадецилової, стеаринової, лінолевої, елаїдинової та оленової кислот, нами визначено вперше.

4. Із сполук, що переганялися з водяною парою, у сланях *C. islandica*, заготовлених в Україні, було ідентифіковано 24 сполуки, у тому числі: терпеноїди та їх похідні, ациклічні насичені та дієнові вуглеводні, ЖК, естери, тощо.

5. Методом ВЕРХ вперше для сланей *C. islandica* встановлено наявність агліконів лютеоліну, кемпферолу та кверцетину, а також біозиду рутину. Методом ВЕРХ з'ясовано компонентний склад карбонових кислот (не менше 3 сполук) сланей *C. islandica* та виділено в індивідуальному стані одну з лишайникових кислот, структуру якої було встановлено як фумаропротоцетрарова кислота.

6. Визначено кількісний вміст основних груп БАР у 7 серіях сланей *C. islandica* та сланях *C. aculeata*: аскорбінової кислоти (відповідно, не менше 15,0 мг% та 9,0 мг%), суми органічних кислот у перерахунку на яблучну кислоту (відповідно, не менше 2,8 % та 2,1 %), суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол (відповідно, не менше 1,2 % та 0,8 %), суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (відповідно, не менше 0,5 % та 0,2 %).

7. Елементний склад серій сировини *C. islandica*, визначений методом ААС, представлений 19 сполуками з домінуванням калію, вміст якого коливався в залежності від серії в межах 190-325 мг/100 г.

8. Встановлено технологічні параметри сланей *C. islandica* та розроблено технологію отримання екстракту густого з виходом не менше 19,5 % та вмістом суми поліфенолів не менше 4,0 %. Доведено антимікробну та антирадикальну дію екстракту густого сланей *C. islandica*. На підставі досліджень подано заявки до Держпатенту України на патент України на корисну модель «Спосіб одержання лікарського засобу у формі пластиру протизапальної, антимікробної, антиоксидантної дії» (№ заявки а202304172, заявл. 04.09.2023) та патент України на винахід «Фармацевтична композиція протизапальної, протиалергійної та імуномодулювальної дії» (№ заявки u202304173, заявл. 04.09.2023).

9. На підставі проведених досліджень обрано ряд критеріїв стандартизації субстанцій, що увійшло до проекту МКЯ «Цетрарії ісландської сланей екстракт густий».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адаптогенний вплив гелів з екстрактом *Cetraria islandica* L. на регенеративні властивості шкіри на моделі термічного опіку / В. Б. Ларіонов та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 4. С. 240–247.
2. Використання моху ісландського при лікуванні інфекційних захворювань дихальних шляхів та перспективи створення нових препаратів на його основі / І. В. Дякон та ін. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2017. № 868. С. 234–241.
3. Владимирова І. М., Георгіянц В. А., Котов А. Г. Фармакопейна стандартизація сировини – цетрарії ісландської слані. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2013. № 1(27). 10–13.
4. Влияние лекарственных растений на уровень йодосодержащих гормонов щитовидной железы в крови у крыс / В. Н. Кравченко и др. *Биологический журнал Армении*. 2014. № 4(66). С. 17–21.
5. Гарна С. В., Ветров П. П., Георгіянц В. А. Взаємозв'язок основних технологічних параметрів рослинної сировини. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. №1(8). С. 54–* 57.
6. Государственная фармакопея Республики Казахстан: в 3 т. / Издательский Дом «Жибек жолы». Алматы, 2014. Т. 3. 872 с.
7. Громакова А. Б. Нові місцезнаходження рідкісних видів лишайників у Харківській області. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*. Серія: біологія. 2006. Вип. 3, № 729. С. 32–36.
8. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Харків : ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2014. Т. 3. 732 с.
9. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП

«Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

10. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., 1 допов. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.

11. Компендіум. Лікарські препарати України. URL: <https://compendium.com.ua/>. (дата звернення: 13.12.2023).

12. Екологія грибів : монографія / Г. Л. Антоняк, З. І. Калинець-Мамчур, І. О. Дудка та ін. Львів : ЛНУ ім. Івана Франка, 2013. 628 с.

13. Идентификация биологически активных веществ в слоевище *Cetraria islandica* / А. А. Коберник и др. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2015. № 2(40). С. 144–148.

14. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: <http://drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument>. (дата звернення: 12.05.2023).

15. Кисличенко О. А., Пінкевич В. О. Перспективи дослідження лишайникових кислот. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2018. Вип. 4. С. 106-109.

16. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Визначення кількісного вмісту лишайникових кислот у сланях пармелії бороздчатої, пармелії перлинової та пармелії блукаючої казахського та російського походження. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 2. С. 46–51.

17. Кисличенко О. А., Процька В. В., Журавель І. О. Дослідження мінерального складу сланей пармелії перлинової. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 1. С. 117–122.

18. Колесник А. В., Сікура А. О., Сікура А. Й. Біохімічні особливості та фармацевтичний потенціал лікарських рослин різних агрокліматичних зон України. *Біологічні системи: Теорія та інновації*. 2023. Т. 14, № 3–4. С. 40-47.

19. Кравченко В. М., Щербак О. А. Дослідження впливу водних екстрактів та спиртових настоек лікарських рослин на показники обміну ліпідів у тварин з гіпотиреозом. *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 2(63). С. 44–48.
20. Марушко Ю. В., Гишак Т. В. Ефективність екстракту ісландського моху при сухому кашлі у дітей. *Современная педиатрия*. 2018. № 6(94). С. 71–77.
21. Мерцало М. В. Флористичний аналіз епігейної ліхенобіоти фітоценозів асоціації *Cladonio-Pinetum* Jurashek в умовах Західного полісся. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2018. Т. 28, № 5. С. 35–38.
22. Мінарченко В. М., Бутко А. Ю. Дослідження вітчизняного ринку лікарських засобів рослинного походження. *Фармацевтичний журнал*. 2017. № 1. С. 30–36.
23. Окснер А. М. Флора лишайників України. Т. II. Вип. 2. Київ : Наукова думка, 1993. 541с.
24. Омельченко П. С., Гладух Є. В. Визначення технологічних параметрів собачої кропиви трави, яка є основою густого та сухого екстрактів. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2014. № 23(4). С. 345–349.
25. Опрошанська Т. В., Хворост О. П. Параметри отримання настойки з підземних органів родовика лікарського та вивчення її біологічної активності. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. Т. 14, № 3(37). С. 299–305.
26. Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини / В. М. Ковальов та ін. Тернопіль: ТДМУ, «Укрмедкнига», 2014. 264 с.
27. Рудник А., Федченкова Ю., Москаленко О. Дослідження сполук, які переганяються з водяною парою, кори *Populus suaveolens* Fisch. *Фітотерапія. Часопис*. 2022. № 1. С. 72–76.
28. Сіра Л. М., Владимірова І. М. Морфолого-анатомічне вивчення талому *Cetraria islandica* (L.) Ach. *Фітотерапія. Часопис*. 2012. № 3. С. 60–62.

29. Скребцова К. С., Федченкова Ю. А., Хворост О. П. Елементний склад листя перспективних видів декоративних рослин. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12, № 1(29). С. 21–24.
30. Федосов А. І., Кисличенко В. С., Новосел О. М. Визначення кількісного вмісту суми фенольних сполук в артишоку суцвіттях, часнику листі та цибулинах. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 1. С. 100–104.
31. Ходосовцев О. Є., Надеїна О. В., Ходосовцева Ю. А. Епігейні угруповання лишайників Рівнинного Криму (Україна). *Чорноморський ботанічний журнал*. 2014. Т. 10, № 2. С. 202–223.
32. Червона книга України. URL: <https://redbook-ua.org/item/cetraria-steppae/>. (дата звернення: 27.04.2023).
33. Шпичак А. О., Хворост О. П. Вивчення антирадикальної активності отриманих за допомогою різних екстрагентів екстрактів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 178.
34. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти у серіях сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали VI міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 12 квіт. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 195.
35. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення технологічних параметрів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 жовт. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 168–169.
36. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення товарознавчих показників якості серій сланей Цетрарії ісландської. *Відкриваємо нове*

сторіччя: здобутки та перспективи : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 100-річчю Нац. фармацевт. ун-ту, м. Харків, 10 верес. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 266–267.

37. Шпичак А. О., Хворост О. П. Динаміка вилучення екстрактивних речовин з сировини *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовленої в Україні, при використанні різних екстрагентів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10-11 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 188.

38. Шпичак А. О., Хворост О. П. Дослідження хімічного складу сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* : тези доп. всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Одеса, 9-12 квіт. 2024 р. Одеса : ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 119–121.

39. Шпичак А. О., Хворост О. П. Порівняльна еколого-морфологічна характеристика *Cetraria aculeata* та *Cetraria islandica*. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали III міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 2 квіт. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 194.

40. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.

41. Шпичак А. О., Хворост О. П. *Cetraria islandica* (L.) Ach. як джерело лікарських засобів актуальної спрямованості дії. *Youth pharmacy science* : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 груд. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 53–54.

42. 3D biofilms: in search of the polysaccharides holding together lichen symbioses / T. Spribille et al. *FEMS Microbiology Letters*. 2020. Vol. 367, № 5. P. 1–17.
43. A Catalogue of the Eastern Carpathian Lichens / S. Ya. Kondratyuk et al. ; M. H. Kholodny Institute of Botany. Kyiv ; Bratislava: M. H. Kholodny Institute of Botany, 2003. 264 p.
44. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery / U. Anand et al. *Metabolites*. 2019. Vol. 9(11). P. 258.
45. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters / J. Ecker et al. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012. Vol. 897. P. 98–104.
46. A review of the lichen family *Parmeliaceae* – history, phylogeny and current taxonomy / A. Thell et al. *Nordic Journal of Botany*. 2012. Vol. 30(6). P. 641–664.
47. Airaksinen M. M., Peura P., Antere S. Toxicity of Iceland Lichen and Reindeer Lichen. *Toxic Interfaces of Neurones, Smoke and Genes* : proceedings of the European Society of Toxicology Meeting (Kuopio, June 16–19, 1985). Berlin ; Heidelberg : Springer, 1986. P. 406–409.
48. Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata* / C. Printzen et al. *FEMS Microbiology Ecology*. 2012. Vol. 82. P. 316–325.
49. Analysis of carbohydrates in *Saponaria officinalis* L. using GC/MS method / L. Slobodianiuk et al. *Pharmacia*. 2021. Vol. 68(2). P. 339–345.
50. Analysis of Macroelements Content of some Medicinal and Aromatic Plants using Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) / I. M. Imbrea et al. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016. Vol. 21, № 4. P. 11640–11649.

51. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma Atrum* by capillary gas chromatography / Y. I. Chen et al. *Phytochem Analysis*. 2009. Vol. 20(6). P. 503–510.
52. Antibacterial potencial of 12 Lichen species / A. C. Micheletti et al. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2021. Vol. 93(4). P. e20191194.
53. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites / Z. Solárová et al. *Biomolecules*. 2020. Vol. 10(1). P. 87.
54. Antitrypanosomal Activity & Docking Studies of Isolated Constituents from the Lichen *Cetraria islandica*: Possibly Multifunctional Scaffolds / J. O. Igoli et al. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 14, № 8. P. 1014–1021.
55. Assessment report on *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l., thallus / Committee on Herbal Medicinal Products. London : European Medicines Agency, 2015. 34 p.
56. Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding / M. Xu et al. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 245. P. 989–996.
57. Batiuchenko I., Fedchenkova Yu., Khvorost O. The study of the composition distilled with water vapor of common pumpkin flowers. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2019. Vol. 35(2). P. 57–59.
58. Bioactive polysaccharides from natural sources: A review on the antitumor and immunomodulating activities / I. Chakraborty et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019. Vol. 22. P. 101425.
59. Biogeography and ecology of *Cetraria aculeata*, a widely distributed lichen with a bipolar distribution / C. Printzen et al. *MycoKeys*. 2013. Vol. 6. P. 33–53.
60. Biological evaluation and phytochemical profiling of some lichen species / I. Tas et al. *Acta Alimentaria*. 2019. Vol. 48(4). P. 457–465.
61. British Pharmacopoeia / The Stationery Office. 10th ed. London, 2022. Vol. IV. 942 p.

62. *Cetraria steppae* Savicz is conspecific with *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. according to morphology, secondary chemistry and ecology / O. Nadyeina et al. *The Lichenologist*. 2013. Vol. 45(6). P. 841–856.
63. Characterization of a polysaccharide from the medicinal lichen, *Usnea longissima*, and its immunostimulating effect *in vivo* / T. Wang et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 181. P. 672–682.
64. Characterization of Bioactive Compounds from Romanian *Cetraria islandica* (L.) Ach / S. Patriche, I. O. Ghinea, G. Adam et al. *Rev.Chim.* 2019. Vol. 70, № 6. P. 2186–2191.
65. Chemical investigations of lichen biomass in *Usnea barbata*, *Cetraria islandica*, and *Xanthoria parietina* species / D. M. F. Voicu et al. *Extreme Life, Biospeology & Astrobiology*. 2019. Vol. 11, Issue 1. P. 1–8.
66. Crawford S. D. Lichens Used in Traditional Medicine. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* / ed. by B. Ranković. Cham : Springer, 2015. P. 27–80.
67. Darmostuk V. V., Khodosovtsev A. Ye. Lichenicolous fungi of Ukraine: an annotated checklist. *Studies in Fungi*. 2017. Vol. 2(1). P. 138–156.
68. Dertien B. K., De Kok L. J., Kuiper P. J. C. Lipid and Fatty Acid Composition of Tree-Growing and Terrestrial Lichens. *Physiol. Plant.* 1977. Vol. 40. P. 175–180.
69. Determination of amino acids of plants from *Angelica* L. genus by HPLC method / L. Budniak et al. *Pharmacia*. 2022. Vol. 69(2). P. 437–446.
70. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach / I. Gülçin et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. Vol. 79. P. 325–329.
71. Determination of biological activities (antibacterial, antioxidant and antiproliferative) and metabolite analysis of some lichen species from Turkey / I. Tas et al. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 4, Issue 04. P. 13–20.

72. Determination of Genotoxic, Antigenotoxic and Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in Vitro* / H. Zeytinoglu et al. *Phytotherapy Research*. 2008. Vol. 22. P. 118–123.
73. Determination of Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Effect of Plant Extracts on Late-Release Soft Lozenge / Ö. Yıldız et al. *East African Scholars Publisher Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2021. Vol. 3, Issue 6. P. 167–174.
74. Dibenzofurans from Lichens – A Pharmacological Overview / I. Ureña-Vacas et al. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2021. Vol. 21, Issue 26. P. 2397–2408.
75. *Didymocyrtis trassii* sp. nov. and other lichenicolous fungi on *Cetraria aculeata* / A. Khodosovtsev et al. *The Lichenologist*. 2018. Vol. 50(5). P. 529–540.
76. Distribution of the legally protected lichen species *Cetraria islandica* in Hungary / M. Sinigla et al. *Studia botanica hungarica*. 2015. Vol. 46(1). P. 91–100.
77. Distribution of the lichen species *Cetraria aculeata* in Hungary / M. Sinigla et al. *Studia botanica hungarica*. 2014. Vol. 45. P. 5–15.
78. Effect of extraction solvent on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Cetraria islandica* / N. Stadnytska et al. *International Journal of PharmTech Research*, 2020. Vol. 13, № 3. P. 198–205.
79. Elemental and radiological characterization of commercial *Cetraria islandica* (L.) Acharius pharmaceutical and food supplementation products / M. A. Meli et al. *Sci. Total Environ*. 2018. Vol. 613–614. P. 1566–1572.
80. Elkhateeb W. A., Elnahas M. O., Daba G. M. Lichentherapy: Highlights on the Pharmaceutical Potentials of Lichens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021. Vol. 6(1). P. 000190.
81. Enumeration of the Lichen-Forming and Lichenicolous Fungi of the Călimani mountains (Eastern Carpathians, Romania) / L. Lőkös et al. *Studia botanica hungarica*. 2018. Vol. 49(1). P. 5–40.

82. Establishing trace element concentrations for lichens and bryophytes in the ring of fire region of the Hudson Bay Lowlands, Ontario, Canada / A. M. McDonough et al. *Environ. Monit. Assess.* 2022. Vol. 194(3). P. 226.
83. Ethnolichenology—The Use of Lichens in the Himalayas and Southwestern Parts of China / M.-X. Yang et al. *Diversity.* 2021. Vol. 13. P. 330.
84. Evaluation of *in vitro* antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica* / D. Grujić et al. *Cytotechnology.* 2014. Vol. 66. P. 803–813.
85. Extreme phenotypic variation in *Cetraria aculeata* (lichenized Ascomycota): adaptation or incidental modification? / S. Pérez-Ortega et al. *Annals of Botany.* 2012. Vol. 109. P. 1133–1148.
86. Fernández-Moriano C., Gómez-Serranillos M. P., Crespo A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology.* 2016. Vol. 54(1). P. 1–17.
87. Fito I., Stadnytska N. Standartization of *Eucalyptus globulus* leaves and *Cetraria islandica* slan. *EUREKA: Health Sciences.* 2021. Vol. 2. P. 56–63.
88. Furmanek Ł., Czarnota P., Seaward M. R. D. A review of the potential of lichen substances as antifungal agents: the effects of extracts and lichen secondary metabolites on *Fusarium* fungi. *Archives of Microbiology.* 2022. Vol. 204(8). P. 523.
89. González E. V., Schwaiger S., Stuppner H. Two-step isolation of the two major paraconic acids of *Cetraria islandica*. *Journal of Separation Science.* 2023. Vol. 46(6). P. 2200805.
90. Grujic-Injac, B.; Kolarski, D.; Stefanovic, D. K. The chemical investigation of the proteins from oak (*Everni prunastri*) and the islandic (*Cetraria islandica*) lichens. *Bull. Acad. Serbe Sci. Arts.* 1976. Vol. 54(14). P. 9–12.
91. Guan J., Yang F.-Q., Li S.-P. Evaluation of carbohydrates in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecules.* 2010. Vol. 15. P. 4227–4241.
92. Gudjónsdóttir G. A., Ingólfssdóttir K. Quantitative determination of protolichesterinic- and fumarprotocetraric acids in *Cetraria islandica* by high-

performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997. Vol. 757. P. 303–306.

93. Hleb R., Loya V., Cherepanyn R. *Salix herbacea* L. (*Salicaceae*) in the Maramures massif of the Ukrainian Carpathians. *Plant Introduction*. 2020. № 85/86. P. 130–136.

94. HPLC Fingerprint Analysis with the Antioxidant and Cytotoxic Activities of Selected Lichens Combined with the Chemometric Calculations / A. Hawrył et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25. 4301.

95. Huneck S., Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Berlin ; Heidelberg : Springer, 1996. 498 p.

96. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry / N. P. Seeram et al. *Food Chemistry*. 2006. Vol. 97, Issue 1. P. 1–11.

97. Immunologically active (1→3)-(1→4)- α -D-glucan from *Cetraria islandica* / E. S. Olafsdottir et al. *Phytomedicine*. 1999. Vol. 6(1). P. 33–39.

98. Immunologically active polysaccharide from *Cetraria islandica* / K. Ingólfssdóttir et al. *Planta Med*. 1994. Vol. 60(6). P. 527–531.

99. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica* / J. Freysdottir et al. *Int Immunopharmacol*. 2008. Vol. 8(3). P. 423–430.

100. *In vitro* inhibition of 5-lipoxygenase by protolichesterinic acid from *Cetraria islandica* / K. Ingólfssdóttir et al. *Phytomedicine*. 1994. Vol. 1(3). P. 187–191.

101. In Vitro Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Protolichesterinic Acid from the Lichen *Cetraria islandica* / K. Ingólfssdóttir et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997. Vol. 41(1). P. 215–217.

102. Index Fungorum. Database. URL: <http://www.indexfungorum.org/>. (Date of access: 05.06.2022).

103. Ingólfssdóttir K. Bioactive compounds from Iceland moss. *Bioactive Carbohydrate Polymers* / ed. by B. S. Paulsen. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 25–36.
104. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002. Vol. 61(7). P. 729–736.
105. Ingólfssdóttir K., Jurcic K., Wagner H. Immunomodulating polysaccharides from aqueous extracts of *Cetraria islandica* (Iceland moss). *Phytomedicine*. 1998. Vol. 5(5). P. 333–339.
106. Investigation of antibacterial and antifungal activities of the herb of *Tropaeolum majus* L. / L. Budniak et al. *Pharmacologyonline*. 2021. Vol. 3. P. 937–947.
107. Is there a risk of trace element contamination in herbal preparations? A test study on the lichen *Cetraria islandica* / P. Giordani et al. *Chemosphere*. 2017. Vol. 181. P. 778–785.
108. Ivanov D., Kiselova Y., Ivanova D. *Cetraria islandica* as a natural source of antioxidants. «*Ovidius*» *University Annals of Medical Science – Pharmacy*. 2007. Vol. 5, № 1. P. 80–83.
109. Jámboř A., Molnár-Perl I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study. *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 1216(15). P. 3064–3077.
110. Jámboř A., Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 1216(34). P. 6218–6223.
111. Justesen U., Knuthsen P., Leth T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Letters*. 1997. Vol. 114(1–2). P. 165–167.
112. Kahraman C., Arituluk Z. C., Cankaya I. I. T. The Clinical Importance of Herb-Drug Interactions and Toxicological Risks of Plants and Herbal Products.

Medical Toxicology / ed. by P. Erkekoglu, T. Ogawa. London : IntechOpen, 2021. P. 1–31.

113. Kärnefelt I., Mattsson J-E., Thell A. The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (*Parmeliaceae*) and their presumed evolutionary affinities. *The Bryologist*. 1993. Vol. 96, № 3. P. 394–404.

114. Khare C. P. *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2007. 910 p.

115. Khodosovtsev A. Y., Darmostuk V. V. Records of lichen species new for Ukraine from steppe habitats of the country. *Botanica Serbica*. 2020. Vol. 44(2). P. 243–250.

116. Kosanić M., Ranković B. Lichens as possible sources of antioxidants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011. Vol. 24, № 2. P. 165–170.

117. Kosanić M., Ranković B., Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology*. 2011. Vol. 48(5). P. 584–590.

118. Krechun A. V., Mykhailenko O. A., Kovalev V. N. Analysis of essential oils from several hybrid *Iris* varieties. *Chemistry of Natural Compounds*. 2020. Vol. 56(2). P. 361–363.

119. Lichen Extracts from Cetrarioid Clade Provide Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress / I. Ureña-Vacas et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27. 6520.

120. Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential / M. Goga et al. Co-evolution of secondary metabolites. Reference Series in Phytochemistry / ed. by J.-M. Mérillon, K. G. Ramawat. Cham : Springer, 2020. P. 175–209.

121. Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity / S. Bhattacharyya et al. *American Journal of PharmTech Research*. 2016. Vol. 6(6). P. 28–44.

122. Lichens as source of versatile bioactive compounds / T. Mitrović et al. *Biologica Nyssana*. 2011. Vol. 2(1). P. 1–6.

123. Low genetic diversity in Antarctic populations of the lichen-forming ascomycete *Cetraria aculeata* and its photobiont / S. Domaschke et al. *Polar Research*. 2012. Vol. 31. 17353.
124. Marchyshyn S., Budniak L., Slobodianiuk L. Chemical composition of the garden nasturtium essential oil and antibacterial activity of fresh juice of the herb. *Pharmacologyonline*. 2021. Vol. 3. P. 1463–1473.
125. Medicinal plants and their uses recorded in the Archives of Latvian Folklore from the 19th century / I. Sile et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019. Vol. 249. 112378.
126. Molnár K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2010. Vol. 65(3–4). P. 157–73.
127. Mukherjee P. K. Quality control and evaluation of herbal drugs: Evaluating natural products and traditional medicine. Elsevier, 2019. 784 p.
128. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001. Vol. 56(1–2). P. 9–16.
129. MycoBank Database. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. URL: <http://www.mycobank.org/>. (Date of access: 05.06.2022).
130. Mycobiont-photobiont interactions of the lichen *Cetraria aculeata* in high alpine regions of East Africa and South America / T. Lutsak et al. *Symbiosis*. 2016. Vol. 68. P. 25–37.
131. Nayaka S., Haridas B. Bioactive Secondary Metabolites from Lichens. *Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects* / ed. by S. T. Sukumaran. Singapore : Springer, 2020. P. 255–290.
132. Nayaka S., Upreti D. K., Khare R. Medicinal lichens of India. *Drugs from Plants* / ed. by P. C. Trivedi. Jaipur : Avishkar Publishers, 2010. P. 1–54.
133. NMR study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata* / B. N. Su et al. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2003. Vol. 41(5). P. 391–394.

134. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two *Parmeliaceae* lichens: Identification of active compounds / C. Fernández-Moriano et al. *Phytomedicine*. 2015. Vol. 22, Issue 9. P. 847–855.
135. Olafsdottir E. S., Ingólfssdóttir K. Polysaccharides from Lichens: Structural Characteristics and Biological Activity. *Planta Medical*. 2001. Vol. 67. P. 199–208.
136. Parizadeh H., Garampalli R. H. Physiological and chemical analysis for identification of some lichen extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017. Vol. 6(5). P. 2611–2621.
137. Paulsen B. S. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. *Current Organic Chemistry*. 2001. Vol. 5. P. 939–950.
138. Paulsen B. S., Olafsdottir E. S., Ingólfssdóttir K. Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of Chromatography A*. 2002. Vol. 967(1). P. 163–171.
139. Phylogenetic diversity of the lichenized algal genus *Trebouxia* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): a new lineage and novel insights from fungal-algal association patterns of Icelandic cetrarioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) / M. Xu et al. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2020. Vol. 194, Issue 4. P. 460–468.
140. Phylogeny of the cetrarioid core (*Parmeliaceae*) based on five genetic markers / A. Thell et al. *The Lichenologist*. 2009. Vol. 41(5). P. 489–511.
141. Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking / I. Ureña-Vacas et al. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022. Vol. 5. P. 5218248.
142. Pirogov M. V. *Clypeococcum cetrariae* (Dacampiaceae, Ascomycota) in the Ukrainian Carpathians. *Ukrainian Botanical Journal*. 2015. Vol. 72(6). P. 585–587.

143. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB₁ in human lymphocytes *in vitro* / E. Kotan et al. *Toxicology and Industrial Health*. 2011. Vol. 27(7). P. 599–605.
144. Quantification of sugars and organic acids in tomato fruits / C. Agius et al. *MethodsX*. 2018. Vol. 5. P. 537–550.
145. Randle T., Saag A. Cetrarioid lichens in Europe – an identification key for the species. *Central European lichens – diversity and threat* / ed. by A. Lackovičová. Ithaca, NY : Mycotaxon Ltd., 2006. P. 75–84.
146. Randle T., Saag A. Cetrarioid lichens in the southern hemisphere – an identification key and distribution patterns of the species. *Bibliotheca Lichenologica*. Vol. 95 / J. Cramer. Berlin, Stuttgart : Gebrüder Borntraeger Verlag, 2007. P. 489–499.
147. Ranković B., Kosanić M. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* / ed. by B. Ranković. Cham : Springer International Publishing, 2019. P. 1–29.
148. Ranković B., Rankovic D., Maric D. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology*. 2010. Vol. 79(6). P. 809–815.
149. Rapid and Sensitive HPLC Method for the Determination of Polyphenols in Various Lichen Species of Himalayan Origin / V. K. Gupta et al. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2007. Vol. 30. P. 97–111.
150. Rational approach to fractionation, isolation, and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica* / P. Krämer et al. *Arzneimittelforschung*. 1995. Vol. 45(6). P. 726–731.
151. Salama M. El-D., Amani W. N. *Cetraria Islandica* as a Pulmonary Cytoprotective and Supportive Herbal Remedy for Lung Complications Related to COVID-19. *Sch. Int. J. Tradit. Complement. Med*. 2021. Vol. 4(10). P. 168–173.

152. Sariözlü N. Y., Cankilic M. Y., Candan M. Investigation of the antifungal activity of some epiphytic and terricolous lichen extracts. *Biological Diversity and Conservation*. 2018. Vol. 11(2). P. 132–136.
153. Secondary metabolism in the lichen symbiosis / M. J. Calcott et al. *Chem. Soc. Rev.* 2018. Vol. 47(5). P. 1730–1760.
154. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential / M. Xu et al. *Phytomedicine*. 2016. Vol. 23. P. 441–459.
155. Senning A. The Etymology of Chemical Names: Tradition and Convenience Vs. Rationality in Chemical Nomenclature. Berlin : Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2019. 520 p.
156. Sharing of photobionts in sympatric populations of *Thamnolia* and *Cetraria* lichens: evidence from high-throughput sequencing / I. Onuț-Brännström et al. *Scientific reports*. 2018. Vol. 8. 4406.
157. Sharma M., Mohammad A. Lichens and Lichenology: Historical and Economic Prospects. *Lichen-Derived Products: Extraction and Applications* / ed. by M. Yusuf. Beverly, MA : Wiley-Scrivener Publishing LLC, 2020. P. 101–118.
158. Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 5(39). P. 4–15.
159. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The dynamics of extraction of total polyphenols by different extractants from *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity* : Abstract book of the 1st International Conference, Kaunas, 21st of April 2023. Kaunas, Pharmacognosy Club, Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences. 2023. P. 37.
160. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The prospects for the use of raw materials of domestic lichen species as medicinal. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 26-27 листоп. 2020 р. Харків, 2020. С. 23.

161. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57.
162. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of fatty acid composition of the raw material of *Cetraria islandica* (L.) Ach, harvested in Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2023. Vol. 2. P. 59 – 63.
163. Shpychak A. O., Khvorost, O. P. The study of the carbohydrate composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20(4). P. 21–26.
164. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of the elemental and amino acid composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli batches harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 3(20). P. 31–39.
165. Shrestha G., St. Clair L. L., O'Neill K. L. The Immunostimulating Role of Lichen Polysaccharides: A Review. *Phytotherapy Research*. 2014. Vol. 29(3). P. 317–322.
166. Solberg Y. Chemical constituents of the lichen species *Cetraria islandica*. *Journ. Hattori Bot. Lab*. 1986. № 60. P. 391–406.
167. Species delimitation in the lichenized fungal genus *Vulpicida* (*Parmeliaceae*, *Ascomycota*) using gene concatenation and coalescent-based species tree approaches / L. Saag et al. *American Journal of Botany*. 2014. Vol. 101(12). P. 2169–2182.
168. Structural characterization of a polysaccharide from *Cetraria islandica* and assessment of immunostimulatory activity / U. Surayot et al. *Process Biochemistry*. 2019. Vol. 83. P. 214–221.
169. Stübler D., Buchenauer H. Antiviral Activity of the Glucan Lichenan (Poly- β {1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4}D-anhydroglucose) 1. Biological Activity in Tobacco Plants. *J. Phytopathology*. 1996. Vol. 144. P. 37–43.
170. Studzińska-Sroka E., Galanty A., Bylka W. Atranorin – an interesting lichen secondary metabolite. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 17. P. 1633–1645.

171. Studzińska-Sroka E., Zarabska-Bożejewicz D. Therapeutic properties of epigaeic lichens from Sowie Góra. *ECOL. CHEM. ENG. A*. 2013. Vol. 20(6). P. 675–680.
172. Svihus B., Holand Ø. Lichen polysaccharides and their relation to reindeer/caribou nutrition. *Journal of Range Management*. 2000. Vol. 53. P. 642–648.
173. Temporal trends (1981–2007) of trace and rare earth elements in the lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. from Italian herbaria / V. Minganti et al. *Chemosphere*. 2014. Vol. 99. P. 180–185.
174. Testing the correlation between norstictic acid content and species evolution in the *Cetraria aculeata* group in Europe / T. Lutsak et al. *The Lichenologist*. 2017. Vol. 49(1). P. 39–56.
175. The Antarctic lichen *Cetraria subscutata* is a synonym of *Nephromopsis chlorophylla* / A. Passo et al. *The Lichenologist*. 2018. Vol. 50(2). P. 239–245.
176. The Anticancer Activity of *Cetraria Islandica* (L.) Ach in Breast Cancer Cells Through Crosstalk of Ampk- α 1 and Erk1/2 Signalling / C. Güven et al. *Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology*. 2018. Vol. 6(6). P. 783–791.
177. The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cetraria aculeata* and Its Protolichesteric Acid Constituent / A. Ö. Türk et al. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2003. Vol. 58(11–12). P. 850–854.
178. The application of amino acid ionic liquids as additives in the ultrasound-assisted extraction of plant material / B. Roman et al. *RSC Advances*. 2021. Vol. 11. P. 25983–25994.
179. The European Pharmacopoeia. Maintaining high quality standards in a dynamic global environment. 9th ed. / European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. Strasbourg, 2018. 2202 p.

180. The Genus *Cetraria* s. str.—A Review of Its Botany, Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacology / M. Sánchez et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27. 4990.
181. The historical development of pharmacopoeias and the inclusion of exotic herbal drugs with a focus on Europe and Brazil / D. Tabajara de Oliveira Martins et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019. Vol. 240. 111891.
182. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats / L. Nybakken et al. *Oecologia*. 2004. Vol. 140. P. 211–216.
183. The Protecting Activity of RIPACUT®: A New Therapeutic Approach Preserving Epithelial Health Based on the Combination of Iceland Lichen Extract, Silver Salt, and Sodium Hyaluronate / R. Belvedere et al. *Life*. 2023. Vol. 13(5). 1088.
184. Third world list of cetrarioid lichens: A databased tool for documentation of nomenclatural data—lessons learned / A. Saag et al. *Taxon*. 2013. Vol. 62(3). P. 591–603.
185. Thorsteinsdottir U. A., Thorsteinsdottir M., Lambert I. H. Protolichesterinic Acid, Isolated from the Lichen *Cetraria islandica*, Reduces LRRC8A Expression and Volume-Sensitive Release of Organic Osmolytes in Human Lung Epithelial Cancer Cells. *Phytotherapy Research*. 2016. Vol. 30. P. 97–104.
186. Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach. / N. Manassov et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28(11). 4493.
187. Using a temporal phylogenetic method to harmonize family- and genus-level classification in the largest clade of lichen-forming fungi / P. K. Divakar et al. *Fungal Diversity*. 2017. Vol. 84. P. 101–117.
188. Using target enrichment sequencing to study the higher-level phylogeny of the largest lichen-forming fungi family: *Parmeliaceae* (Ascomycota) / F. Grewe et al. *IMA Fungus*. 2020. Vol. 11. P. 27.

189. Vladimirova I. M., Georgiyants V. A. Extracted compounds from *Cetraria islandica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013. Vol. 49, № 2. P. 347–348.
190. Vladymyrova I., Georgiyants V., Savelieva E. Pharmacotherapeutic action analysys of mineral substances of medicinal plants, which are used in thyroid gland diseases. *Bulletin of National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan*. 2019. Vol. 1, № 377. P. 6–13.
191. Zambare V. P., Christopher L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*. 2012. Vol. 50(6). P. 778–798.
192. Zhao Y., Wang M., Xu B. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *Journal of Functional Foods*. 2021. Vol. 80. 104283.
193. β -1, 3/1, 4-Glucan Lichenan from *Cetraria islandica* (L.) Ach. induces cellular differentiation of human keratinocytes / D. M. Zacharski et al. *Fitoterapia*. 2018. Vol. 129. P. 226–236.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of the elemental and amino acid composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli batches harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 3(20). P. 31-39. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.262369> (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних джерел, участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).
2. Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 5(39). P. 4-15. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.265019> (Особистий внесок здобувача – заготовлено сировину, проведено інформаційний пошук, участь у плануванні та проведенні експерименту, в обговоренні, узагальненні результатів дослідження та підготовці статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога у плануванні експерименту, узагальненні результатів досліджень, формулюванні висновків).
3. Shpychak A. O., Khvorost, O. P. The study of the carbohydrate composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20(4). P. 21-26. <https://doi.org/10.24959/ophcj.22.267653%20> (Особистий внесок здобувача – проведено інформаційний пошук, пробопідготовку, участь у аналізі та узагальненні результатів дослідження та підготовці статті до друку; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).
4. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of fatty acid composition of the raw material of *Cetraria islandica* (L.) Ach, harvested in Ukraine. *Annals of Mechnikov Institute*. 2023. Vol. 2. P. 59 – 63.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8046195> (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, пробопідготовку, брала участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

5. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57. <https://doi.org/10.24959/ophcj.23.299297> (Особистий внесок здобувача – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Хворост О. П. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в узагальненні результатів дослідження, формулюванні висновків).

6. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The prospects for the use of raw materials of domestic lichen species as medicinal. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали IV міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 26-27 листопада 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 23.

7. Шпичак А. О., Хворост О. П. Порівняльна еколого-морфологічна характеристика *Cetraria aculeata* та *Cetraria islandica*. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали III міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 2 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 194.

8. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення товарознавчих показників якості серій сланей Цетрарії ісландської. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вересня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 266–267.

9. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення технологічних параметрів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Хімія*

природних сполук : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 168–169.

10. Шпичак А. О., Хворост О. П. *Cetraria islandica* (L.) Ach. як джерело лікарських засобів актуальної спрямованості дії. *Youth pharmacy science* : матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 грудня 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 53 – 54.

11. Шпичак А. О., Хворост О. П. Вивчення антирадикальної активності отриманих за допомогою різних екстрагентів екстрактів сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали V міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 178.

12. Shpychak A. O., Khvorost O. P. The dynamics of extraction of total polyphenols by different extractants from *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity* : abstract book of the 1st International Conference, Kaunas, 21st of April 2023. Kaunas, Pharmacognosy Club, Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences. 2023. P. 37.

13. Шпичак А. О., Хворост О. П. Системний підхід до фармакогностичного дослідження серій сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXIX міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квітня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 66-67.

14. Шпичак А. О., Хворост О. П. Динаміка вилучення екстрактивних речовин з сировини *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовленої в Україні, при використанні різних екстрагентів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фарм. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10-11 травня 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 188.

15. Шпичак А. О., Хворост О. П. Дослідження хімічного складу сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* : тези доповідей всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р. Одеса : ОНУ ім. І. Мечникова, 2024. С. 119 – 121.

16. Шпичак А. О., Хворост О. П. Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти у серіях сланей *Cetraria islandica* (L.) Ach., заготовлених в Україні. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали VI міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 12 квітня 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 195.

Апробація результатів дисертації

1. IV Міжнародна науково-практична internet-конференція «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (м. Харків, 26-27 листопада 2020 р., форма участі – публікація тез);

2. III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (м. Харків, 2 квітня 2021 р., форма участі – публікація тез);

3. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи» (м. Харків, 10 вересня 2021 р., форма участі – публікація тез);

4. VI Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р., форма участі – публікація тез);

5. III Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth pharmacy science» (м. Харків, 7-8 грудня 2022 р., форма участі – усна доповідь та публікація тез);

6. V Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (м. Харків, 14 квітня 2023 р., форма участі – публікація тез);
7. The 1st International Conference «*Plant Research: from Phytochemistry to Phytoactivity*» (Kaunas, Lithuania, 21st of April 2023, форма участі – усна доповідь та публікація тез);
8. XXIX Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «*Актуальні питання створення нових лікарських засобів*» (м. Харків, 19-21 квітня 2023 р., форма участі – усна доповідь та публікація тез);
9. X Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 60-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора Гладуха Євгенія Володимировича «*Сучасні досягнення фармацевтичної технології*» (м. Харків, 10-11 травня 2023 р., форма участі – публікація тез);
10. The XI Seminars in Pharmaceutical Sciences (University of Tartu, Tartu, Estonia, 23rd of November 2023, форма участі – усна доповідь);
11. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку*» (м. Одеса, 9-12 квітня 2024 р., форма участі – публікація тез);
12. VI Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (м. Харків, 12 квітня 2024 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б

Форма В4



МІНЕКОНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
«УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ»
(УКРНОІВІ)

вул. Дмитра Голісенка, 1, м. Київ, 01601, тел.: +380 44 209-27-06, +380 67 501-05-95
e-mail: office@upro.gov.ua, http://www.upro.gov.ua, код згідно з ЄДРПОУ 44673629



22010000020230417200882703060923

06.09.2023 № 15045/3A/23

Стосується заявки № а 2023 04172
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Шпичак Олег Сергійович, вул.
Котляревського, 35, кв. 2, м. Харків, 61004

Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)

(21) Реєстраційний номер заявки а 2023 04172

(71) Заявник(и)
ШПИЧАК ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ

(54) Назва винаходу
ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ, ПРОТИАЛЕРГІЙНОЇ, ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНОЇ ДІЇ

Матеріали заявки відповідають вимогам статті 13 Закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі» (далі – Закон) щодо встановлення дати подання заявки на дату одержання Державною організацією «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»:

- матеріалів заявки

Дата подання заявки **04.09.2023**

Начальник сектору встановлення дати подання заявок  **Любов ЛУЦЕНКО**

Телефон 494-05-98

Провідний експерт  **Тетяна ІГНАТЬЄВА**

Телефон 494-05-98

Продовж. дод. Б

Стан діловодства за заявкою на винахід (корисну модель) № а202304172

ПереглядДрук

СТАН ДІЛОВОДСТВА ЗА ЗАЯВКОЮ НА ВИНАХІД (КОРИСНУ МОДЕЛЬ) № а202304172

ПОЗНАЧЕННЯ

Успішно пройдена стадія

Поточна стадія

Стадія, що не використовується у діловодстві за заявкою

Патент зареєстровано

Підготовка до державної реєстрації та публікації

Очікування документа про сплату державного мита

Кваліфікаційна експертиза

Очікування клопотання про проведення кваліфікаційної експертизи

Формальна експертиза

Встановлення дати подання

Реєстрація первинних документів, попередня експертиза та введення відомостей до бази даних

ДОКУМЕНТИ ЗАЯВНИКА

Дата реєстрації	Дата відправки	Дата отримання	Назва документа	Реєстр-ний №
04.09.2023			Платіжне доручення	23/3А/ Вх№13378
04.09.2023			Опис винаходу (КМ)	23/3А/ Вх№13374
04.09.2023			Платіжне доручення	23/3А/ Вх№13377
04.09.2023			Формула винаходу (КМ)	23/3А/ Вх№13375
04.09.2023			Заява на видачу патенту на винахід (КМ)	23/3А/ Вх№13373
04.09.2023			Реферат	23/3А/ Вх№13376

ДОКУМЕНТИ УСТАНОВИ

Для завантаження оригіналу документу та ЕЦП, використовуйте в якості коду 10 останніх цифр штрихкоду на документі

Дата реєстрації	Дата відправки	Дата отримання	Назва документа	Реєстр-ний №	⬇
29.01.2024	31.01.2024		Повідомлення про завершення формальної експертизи за заявкою на винахід	2404/ 3А/24	
06.09.2023	15.09.2023	19.09.2023	Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)	15045/ 3А/23	

ЗБОРИ

Код збору	Початок очікування	Планова дата отримання	Фактична дата отримання	Назва документа
10100	06.09.2023	06.11.2023	29.08.2023	За подання заявки (міжнародної заявки) на винахід (корисну модель), формула якого містить не більш як 3 пункти
	UAH 160.00/160.00	160.00 UAH	№ @2PL453902 від 29.08.2023	Електронний платіжний документ
11400	24.01.2024	24.01.2024	29.08.2023	За подання клопотання про публікацію відомостей про заявку на видачу патенту на винахід раніше 18 місяців від дати подання цієї заявки
	UAH 20.00/20.00	20.00 UAH	№ @2PL455322 від 29.08.2023	Платіжне доручення

ДЕРЖАВНЕ МИТО

Код збору	Фактична дата отримання	Назва документа
-----------	-------------------------	-----------------

Документів немає

Продовж. дод. Б

Форма В1



МІНЕКОНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
«УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ»
(УКРНОІВІ)

вул. Дмитра Гудзенка, 1, м. Київ, 01601, тел.: +380 44 209-27-06, +380 67 501-05-95
e-mail: office@uipo.gov.ua, http://www.uipo.gov.ua, код згідно з ЄДРПОУ 44673629

11.09.2023 № 9041/ЗУ/23

Стосується заявки № u 2023 04173
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Шпичак Олег Сергійович, вул.
Котляревського, 35, кв. 2, м. Харків, 61004

Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)

(21) Реєстраційний номер заявки - u 2023 04173

(71) Заявник(и)
ШПИЧАК ОЛЕГ СЕРГІЙОВИЧ

(54) Назва винаходу
ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ, ПРОТИАЛЕРГІЙНОЇ,
ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНОЇ ДІЇ

Матеріали заявки відповідають вимогам статті 13 Закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі» (далі – Закон) щодо встановлення дати подання заявки на дату одержання Державною організацією «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»:

- матеріалів заявки
- Дата подання заявки 04.09.2023

Начальник сектору встановлення дати подання заявок

Любов ЛУЦЕНКО

Телефон 494-05-98

Провідний експерт

Тетяна ГНАТЬЄВА

Телефон 494-05-98

Продовж. дод. Б

Стан діловодства за заявою на винахід (корисну модель) № u202304173

Перегляд Друк

Стан діловодства за заявою на винахід (корисну модель) № u202304173

Позначення

- Успішно пройдена стадія
- Поточна стадія
- Стадія, що не використовується у діловодстві за заявою



Патент зареєстровано

Підготовка до державної реєстрації та публікації

Очікування документа про сплату державного мита

Кваліфікаційна експертиза

Очікування клопотання про проведення кваліфікаційної експертизи

Формальна експертиза

Встановлення дати подання

Реєстрація первинних документів, попередня експертиза та введення відомостей до бази даних

Документи заявника

Дата реєстрації	Дата відправки	Дата отримання	Назва документа	Реєстр-ний №
04.09.2023			Заява на видачу патенту на винахід (КМ)	23/ЗУ/ Вх№18028
04.09.2023			Формула винаходу (КМ)	23/ЗУ/ Вх№18030
04.09.2023			Опис винаходу (КМ)	23/ЗУ/ Вх№18029
04.09.2023			Платіжне доручення	23/ЗУ/ Вх№18032
04.09.2023			Реферат	23/ЗУ/ Вх№18031

Документи установи

Для завантаження оригіналу документу та ЕЦП, використовуйте в якості коду 10 останніх цифр штрихкоду на документі

Дата реєстрації	Дата відправки	Дата отримання	Назва документа	Реєстр-ний №	
11.09.2023	15.09.2023	19.09.2023	Повідомлення щодо встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)	9041/ ЗУ/23	

Збори

Код збору	Початок очікування	Планова дата отримання	Фактична дата отримання	Назва документа
10100	04.09.2023	06.11.2023		За подання заявки (міжнародної заявки) на винахід (корисну модель), формула якого містить не більш як 3 пункти

UAH 240.00/480.00

240.00 UAH

№ @2PL456056 від 29.08.2023

Електронний платіжний документ

Державне мито

Код збору	Фактична дата отримання	Назва документа
Документів немає		

Додаток В

ПРОЄКТ



Проректор з науково-педагогічної
роботи Національного
фармацевтичного
університету, професор
Інна ВЛАДИМИРОВА
« квітня » 2024 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет, Україна

Виробник, країна: Україна

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Cetrariae islandicae thallorum extractum spissum

Цетрарії ісландської сланей екстракт густий

Продовж. дод. В

P – вміст пірогалолу у ФСЗ ДФУ пірогалолу, %;

Вміст поліфенольних сполук має бути не менше 4,0 %.

УПАКОВКА

Густий екстракт упаковують у скляні флакони не більше 50 г нетто.

МАРКУВАННЯ

На етикетці флакона українською мовою вказують «Україна», «Розробка НФаУ, м. Харків», його товарний знак і адресу, назву екстракту латинською та українською мовами, масу екстракту, умови зберігання, номер партії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

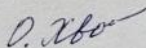
Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С у сухому, захищеному від світла місці.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Антимікробний, протизапальний засіб.

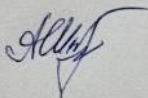
Професорка ЗВО кафедри фармакогнозії
та нутриціології,
докторка фармацевтичних наук,
професорка



Ольга ХВОРОСТ

« 23 » квітня 2024 р.

Аспірантка кафедри фармакогнозії
та нутриціології



Аліна ШПИЧАК

« 23 » квітня 2024 р.

Додаток Г



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати дослідження хімічного складу сланей цетрарії ісландської.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології, аспірантка Шпичак А. О.
Джерела інформації: Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of the carbohydrate composition of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli harvested in Ukraine. Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. 2022. Vol. 20(4). P. 21-26.
3. **Впроваджено:** кафедра хімії та фармації Ніжинського державного університету ім. Миколи Гоголя.
4. **Форма впровадження:** в науково-дослідницьку роботу.
5. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань стосовно аналізу лікарської рослинної сировини.
6. **Терміни впровадження:** 2022-2023 н. р.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 13 від 31 березня 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри хімії та фармації
Ніжинського державного університету
імені Миколи Гоголя
д.фарм.н., професор

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Ю. А. Федченкова".

Ю. А. Федченкова

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України
проф. І. М. Кліш
«16» травня 2023 р.

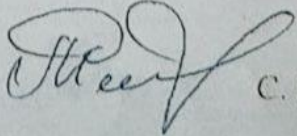
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Результати фармакогностичного дослідження сланей цетрарії ісландської.
2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології, аспірантка Шпичак А. О.
3. Джерела інформації: Shpychak A. O., Khvorost O. P. Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022. Vol. 5(39). P. 4-15.
4. Впроваджено: кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
5. Форма впровадження: в навчальний процес при вивченні теми «Вуглеводи» та в науково-дослідницьку роботу.
6. Ефект від впровадження: поглиблення знань здобувачів вищої освіти з аналізу лікарської рослинної сировини.
7. Терміни впровадження: 2022-2023 навчальний рік.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 6 від 16 травня 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакогнозії
з медичною ботанікою Тернопільського
національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
д. фарм. наук, професор

 С. М. Марчишин

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботи та інновацій

Національного медичного

університету

імені О. О. Богомольця

проф. С. В. Земсков

«03» 06 2024 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення компонентного складу сполук, що переганяються з водяною парою, сланей *C. islandica*, заготовлених в Україні.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди (вул. Пушкінська), 53, кафедра фармакогнозії та нутриціології, аспірантка Шпичак А. О.
3. **Джерело інформації:** Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57.
4. **Впроваджено:** кафедра фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.
5. **Форма впровадження:** у науково-дослідницьку роботу.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань щодо хімічного складу лікарської сировини *C. islandica*.
7. **Термін впровадження:** 2023-2024 навч. рік.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 21 від 29 травня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри
фармакогнозії та ботаніки
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця
д.біол.н., професор

В. М. Мінарченко

Підпис
ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР УНІВЕРСИТЕТУ
«03» 06 2024

Продовж. дод. Г



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор закладу вищої освіти
нарко-педагогічної роботи
Запорізького державного
медико-фармацевтичного
університету

доктор медичних наук, професор

В. А. Візір

«22» травня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Результати вивчення компонентного складу сполук, що переганяються з водяною парою, сланей *C. islandica*, заготовлених в Україні.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди (вул. Пушкінська), 53, кафедра фармакогнозії та нутриціології, аспірантка Шпичак А. О.

3. Джерела інформації: Shpychak A. O., Khvorost O. P. The study of compounds distilled with water vapor in *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli, harvested in Ukraine. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2023. Vol. 21(4). P. 51-57.

4. Впроваджено: в навчальний процес на кафедра фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

5. Форма впровадження: навчова та науково-дослідна робота.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань хімічного складу лікарської сировини *C. islandica*.

7. Термін впровадження: 2023-2024 навч. рік.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 17 від 22. 05.2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки
Запорізького державного медико-фармацевтичного університету,
д.біол.н., професор

С. Д. Тржецинський