

НАО «Казахский национальный медицинский университет  
имени С. Д. Асфендиярова»

УДК: 615.2:582.29

на правах рукописи

**МАНАСОВ НУРЛЕН ҚЫДЫРБАЙҰЛЫ**

**Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе  
лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica***

8D10102 - «Фармация»

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научный консультант:  
д. фарм. н., профессор  
Датхаев У.М.

Зарубежные научные консультанты:  
PhD, профессор фармакогнозии  
Samir A. Ross  
д. фарм. н., доцент  
Кисличенко А.А.

Республика Казахстан

Алматы, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1 ЛИШАЙНИКИ КАЗАХСТАНА КАК ИСТОЧНИК<br/>БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. ПЕРСПЕКТИВЫ<br/>ИССЛЕДОВАНИЯ <i>CETRARIA ISLANDICA</i> (L.) ACH.....</b>         | <b>14</b> |
| 1.1 Общая характеристика представителей рода <i>Cetraria</i> .....   | 14        |
| 1.2 Ботаническое описание и ареал распространения <i>Cetraria islandica</i><br>(L.) Ach.....   | 15        |
| 1.3 Химический состав, фармакологическая активность и применение<br><i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach. в традиционной и научной медицине.....             | 24        |
| 1.4 Современные подходы к разработке растительных лекарственных<br>средств: стандарты качества и нормативные требования.....                               | 31        |
| Выводы по первому разделу  | 34        |
| <b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>  | <b>36</b> |
| 2.1 Материалы исследования.....  | 36        |
| 2.2 Методы исследования.....   | 39        |
| <b>3 КОМПЛЕКСНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ<br/>ИССЛЕДОВАНИЕ СЛОЕВИЩ <i>CETRARIA ISLANDICA</i> (L.)<br/>ACH. ....</b>   | <b>53</b> |
| 3.1 Разработка технологии сбора и заготовки <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.<br>в соответствии с требованиями ГАСР.....                                 | 53        |
| 3.2 Морфолого-анатомическое изучение сырья <i>Cetraria islandica</i> (L.)<br>Ach.....  | 55        |
| 3.2.1 Морфологические особенности.....   | 55        |
| 3.2.2 Анатомио-диагностические признаки.....   | 57        |
| 3.3 Фитохимическое профилирование и качественно-количественная<br>характеристика биологически активных веществ <i>Cetraria islandica</i><br>(L.) Ach.....  | 59        |
| 3.4 Анализ макро- и микроэлементного состава <i>Cetraria islandica</i> (L.)<br>Ach. методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии<br>(EDS) ..... | 61        |
| 3.5 Анализ летучих и липофильных соединений <i>Cetraria islandica</i> (L.)<br>Ach. методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (GC-<br>MS).....    | 63        |
| 3.6 Анализ жирнокислотного состава <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.....   | 65        |
| 3.7 Анализ качества и разработка спецификации сырья <i>Cetraria</i><br><i>islandica</i> (L.) Ach. в контексте фармакопейных требований.....                | 67        |
| 3.8 Оценка фармацевтико-технологических характеристик<br>растительного сырья.....  | 74        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.9      | Исследование стабильности и установление срока годности сырья <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach. ....                      | 76         |
|          | Выводы по третьему разделу.....   | 77         |
| <b>4</b> | <b>РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА <i>CETRARIA ISLANDICA</i> .....</b>              | <b>79</b>  |
| 4.1      | Выбор оптимальной технологии экстрагирования <i>Cetraria islandica</i> .  | 79         |
| 4.2      | Разработка технологии получения экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....   | 86         |
| 4.3      | Валидация технологического процесса производства экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....                                  | 89         |
| 4.4      | Изучение химического состава экстракта <i>Cetraria islandica</i> современными физико-химическими методами исследований..... | 101        |
| 4.5      | Выделение индивидуальных веществ из экстракта <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.....                                       | 114        |
| 4.6      | Стандартизация экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....  | 118        |
| 4.7      | Изучение стабильности и определение сроков хранения экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....                               | 120        |
|          | Выводы по четвертому разделу.....   | 121        |
| <b>5</b> | <b>НЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСТРАКТА <i>CETRARIA ISLANDICA</i>: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ.....</b>         | <b>123</b> |
|          | Изучение противовоспалительной активности экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....   | 123        |
| 5.1      | Изучение антимикробной, противогрибковой и антималярийной активности экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....              | 125        |
| 5.2      | Оценка токсичности экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....  | 129        |
| 5.3      | Оценка аллергизирующего действия экстракта <i>Cetraria islandica</i> .....  | 138        |
| 5.4      | Выводы по пятому разделу.....   | 139        |
| <b>6</b> | <b>РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И СТАБИЛЬНОСТИ СПРЕЯ С ЭКСТРАКТОМ <i>CETRARIA ISLANDICA</i> .....</b>                | <b>141</b> |
| 6.1      | Разработка, оценка качества и исследование стабильности спрея с экстрактом <i>Cetraria islandica</i> .....                  | 141        |
| 6.2      | Обзор фармацевтического рынка ингаляторов и препаратов для рассасывания в Казахстане.....                                   | 146        |
| 6.3      | Технико-экономическое обоснование производства спрея с экстрактом <i>Cetraria islandica</i> .....                           | 157        |
|          | Выводы по шестому разделу.....  | 161        |
|          | <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>  | <b>163</b> |
|          | <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>   | <b>165</b> |
|          | <b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>  | <b>177</b> |

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В диссертационной работе были использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Кодекс Республики Казахстан от 7 июля 2020 года № 360-VI «О здоровье народа и системе здравоохранения» (с изменениями и дополнениями по состоянию на 11.02.2024 г.).

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 27 января 2021 года № ҚР ДСМ-11 «Об утверждении правил маркировки лекарственных средств и медицинских изделий».

Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик».

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-19 «Об утверждении правил хранения и транспортировки лекарственных средств и медицинских изделий».

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств».

Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 54 от 29 ноября 2017 года "О внесении изменений в решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 110 "О техническом регламенте Таможенного союза по безопасности лекарственных средств"

Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 108 от 5 октября 2020 года "О правилах оценки качества и безопасности лекарственных средств на едином рынке ЕАЭС"

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 года № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств»

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 12 февраля 2019 года № 6. «О Руководстве по выбору тестов и критериев приемлемости для составления спецификаций на лекарственное растительное сырье, растительные фармацевтические субстанции (препараты на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственные растительные препараты»

Руководство ВОЗ по разработке и производству лекарственных средств. Доступно на официальном сайте ВОЗ.

Руководство ВОЗ по качеству и безопасности лекарственных средств. Доступно на официальном сайте ВОЗ.

ГОСТ 7.32–2017. Межгосударственный стандарт. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1–2003. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 2226–2013. Мешки из бумаги и комбинированных материалов.

МВИ № KZ 07.00.00303–2019 от 04.05.2019 г. Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного бета-спектрометра с программным обеспечением Прогресс. – это методика для измерения радионуклидов, которая может быть использована для контроля радиационной безопасности сырья или экстракта, если это необходимо в рамках регламентов качества.

МВИ № KZ 07.00.00304–2019 от 04.05.2019 г. Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением Прогресс. – аналогичная предыдущему пункту методика для измерения радионуклидов.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Альтернатива – замена какого-либо компонента, вещества или метода на более подходящий или эффективный.

Антимикробная активность – способность вещества подавлять или уничтожать микроорганизмы (бактерии, вирусы, грибы).

Экстракция – процесс извлечения активных компонентов из растительного сырья с помощью растворителей.

Лекарственная форма – форма выпуска лекарственного средства, в которой оно принимает определенную форму для применения (например, спрей, таблетки, мазь).

Лекарственные формы – формы выпуска лекарственных средств, включая спреи, таблетки, порошки и другие дозированные формы.

Лекарственное средство – препарат, созданный для использования в медицинских целях.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) – растительные материалы, используемые для получения лекарственных средств.

Острая токсичность – способность вещества вызывать летальный исход при однократном введении или в течение короткого промежутка времени.

Подострая (хроническая) токсичность – повреждающее действие вещества при длительном применении, которое может быть обратимым или необратимым.

Противовоспалительная активность – способность вещества снижать воспаление в организме.

Фармакогнозия – наука о лекарственных растениях, их свойствах и применении в медицине.

Фармакологическая активность – способность вещества вызывать специфические физиологические изменения в организме.

«Spot test» для определения лишайников – это метод, используемый для визуальной диагностики и идентификации лишайников.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

|                                  |   |   |
|----------------------------------|---|---|
| CDCl <sub>3</sub>                | - | Дейтерированный хлороформ   |
| C <sub>p</sub> , C <sub>pk</sub> | - | Индексы способности процесса  |
| DMSO-d <sub>6</sub>              | - | Дейтерированный диметилсульфоксид   |
| EMA                              | - | Европейское агентство по лекарственным средствам  |
| GACP                             | - | Good Agricultural and Collection Practice (Надлежащая практика культивирования и сбора)           |
| GC-MS                            | - | Газовая хроматография с масс-спектрометрией   |
| GMP                              | - | Good Manufacturing Practice (Надлежащая производственная практика)                                |
| HP-921                           | - | Гексакис(1Н,1Н,3Н-тетрафторпропокси) фосфазин   |
| ICH                              | - | International Council for Harmonisation –<br>Международный совет по гармонизации                  |
| ICH Q8                           | - | Руководство по Quality by Design (QbD)  |
| IC <sub>50</sub>                 | - | Полумаксимальная ингибирующая концентрация  |
| LC-DAD-<br>QToF                  | - | Жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором и квадрупольно-временным масс-анализатором |
| LD <sub>50</sub>                 | - | Летальная доза, вызывающая гибель 50% животных  |
| MAT                              | - | Скользкий годовой итог  |
| MS/MS                            | - | Тандемная масс-спектрометрия  |
| Ph. Eur.                         | - | Pharmacopoeia Europaea – Европейская фармакопея   |
| QToF                             | - | Quadrupole Time-of-Flight – квадрупольно-временной анализатор                                     |
| QbD                              | - | Quality by Design (Качество по замыслу)   |
| RSD                              | - | Relative Standard Deviation – относительное стандартное отклонение                                |
| RU                               | - | Регистрационный номер патента Российской Федерации  |
| Rf                               | - | Retention factor – фактор удерживания в хроматографии   |
| ТСХ                              | - | Тонкослойная хроматография  |
| USP                              | - | United States Pharmacopoeia – Фармакопея США  |
| АТХ                              | - | Анатомо-терапевтическо-химическая классификация   |
| АФИ                              | - | Активный фармацевтический ингредиент  |
| БАД                              | - | Биологически активная добавка   |
| ВОЗ                              | - | Всемирная организация здравоохранения   |
| ВЭЖХ                             | - | Высокоэффективная жидкостная хроматография  |
| ГАМК                             | - | Гамма-аминомасляная кислота   |
| ГФ                               | - | Государственная фармакопея  |
| ГФ РК                            | - | Государственная фармакопея Республики Казахстан   |
| ДМСО                             | - | Диметилсульфоксид   |
| ИФА                              | - | Иммуноферментный анализ   |

|       |   |  |
|-------|---|--|
| ЛД50  | - | Летальная доза 50%   |
| ЛП    | - | Лекарственный препарат   |
| ЛР    | - | Лекарственное растение   |
| ЛРС   | - | Лекарственное растительное сырье   |
| ЛС    | - | Лекарственное средство   |
| МВИ   | - | Методика выполнения измерений  |
| МКЦ   | - | Микрокристаллическая целлюлоза   |
| МНВО  | - | Министерство науки и высшего образования   |
| НД    | - | Нормативный документ   |
| НИОКР | - | Научно-исследовательские, опытно-конструкторские и технологические работы  |
| ПВП   | - | Поливинилпирролидон  |
| ПЭ    | - | Параметры экстракции   |
| СНЭ   | - | Система научной экспертизы   |
| СО    | - | Стандартный образец  |
| ТОО   | - | Товарищество с ограниченной ответственностью   |
| ТСХ   | - | Тонкослойная хроматография   |
| ТЭО   | - | Технико-экономическое обоснование  |
| УФ    | - | Ультрафиолет   |
| ЭДР   | - | Электронная документация расчета   |
| ЭДС   | - | Энергодисперсионная спектроскопия  |
| ЭМК   | - | Электронный микроскопический контроль  |
| ОТС   | - | Over-The-Counter. Лекарственные средства, отпускаемые без рецепта врача.   |
| МАТ   | - | Moving Annual Total. Аналитический период, представляющий собой скользящий интервал в 12 месяцев, который используется для оценки динамики продаж, потребления или других рыночных показателей |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В современных условиях одним из приоритетных направлений государственной политики в области здравоохранения и фармацевтической промышленности Республики Казахстан является развитие отечественного производства лекарственных средств, снижение зависимости от импортных препаратов и внедрение инновационных технологий при создании эффективных и безопасных лекарственных средств. В соответствии с Национальным планом развития Республики Казахстан до 2029 года, одним из ключевых приоритетов в реализации стратегических направлений является профилактика неинфекционных заболеваний и развитие отечественного фармацевтического производства. Полное и рациональное использование уникальных представителей отечественной флоры, организация конкурентоспособного и высокоэффективного производства фитопрепаратов, сокращение зависимости от импорта лекарственных средств, а также наращивание мощностей отечественного фармацевтического производства, сырьевого и научно-технического потенциала являются важными направлениями реализации задач по модернизации экономики и улучшению качества жизни населения. В настоящее время доля отечественных лекарственных средств на фармацевтическом рынке составляет лишь 14,4 %, что свидетельствует о высокой степени импортозависимости (86,6 % в денежном и 73,8 % в натуральном выражении). Сложившаяся ситуация обуславливает необходимость активной разработки и внедрения отечественных препаратов, в том числе на основе лекарственного растительного сырья [1-3].

В этом контексте особую актуальность приобретает изучение лекарственного потенциала природных ресурсов Казахстана. Одним из перспективных объектов является *Cetraria islandica* (L.) Ach. - представитель семейства Parmeliaceae, широко распространённый в горных и предгорных районах республики и обладающий выраженной фармакологической активностью. Согласно данным научной литературы, лишайниковые кислоты, входящие в состав *Cetraria islandica* (L.) Ach., демонстрируют антисептические, противовоспалительные, иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства, что подтверждает целесообразность использования данного вида при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей и ряде других патологий [4].

Мировая и отечественная практика разработки растительных лекарственных средств свидетельствует о стабильно высоком интересе к созданию стандартизованных экстрактов и инновационных лекарственных форм на их основе. В условиях необходимости импортозамещения и обеспечения лекарственной безопасности страны особую актуальность приобретает разработка эффективного и безопасного лекарственного средства на основе *Cetraria islandica* (L.) Ach., соответствующего требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан, нормативам Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и международным стандартам качества [5].

Актуальность диссертационного исследования обусловлена необходимостью комплексного фармакогностического изучения слоевищ *Cetraria islandica* (L.) Ach., разработки оптимальной технологии получения экстракта, стандартизации биологически активных веществ, а также оценки фармакологической активности и токсикологической безопасности. Дополнительно, разработка лекарственной формы в виде спрея представляет собой современное фармацевтическое решение, обеспечивающее локальное терапевтическое действие, высокую биодоступность и удобство применения, что соответствует актуальным мировым тенденциям в создании препаратов для лечения заболеваний органов дыхания.

Таким образом, фармацевтическая разработка лекарственного средства на основе экстракта *Cetraria islandica* соответствует приоритетным направлениям государственной стратегии в сфере здравоохранения, способствует рациональному использованию природных ресурсов, развитию отечественной фармацевтической науки и промышленности, а также открывает перспективы интеграции казахстанских разработок в международное фармацевтическое пространство.

**Цель исследования.** Целью диссертационного исследования является научное обоснование и разработка подходов к созданию лекарственного средства на основе стандартизированного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach.

**Задачи исследования:**

1. Провести заготовку сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. в соответствии с требованиями ГАСР, разработать технологию сбора и осуществить комплексное фармакогностическое исследование слоевищ, включающее макро- и микроскопический анализ, фитохимическое исследование, а также определение фармакогностических показателей.

2. Разработать оптимальную технологию получения экстракта *Cetraria islandica*, обосновать выбор метода экстракции, провести стандартизацию экстракта и оценку его стабильности.

3. Изучить токсикологическую безопасность и биологическую активность экстракта *Cetraria islandica* в рамках доклинических исследований.

4. Разработать технологию производства лекарственной формы в виде спрея на основе экстракта *Cetraria islandica*, провести контроль качества и исследование стабильности готовой лекарственной формы.

5. Осуществить технико-экономическое обоснование производства и перспектив внедрения разработанного лекарственного средства на фармацевтический рынок Республики Казахстан.

**Объекты исследования:** являются лекарственное растительное сырье *Cetraria islandica* (L.) Ach., экстракты, полученные из данного сырья, а также разработанное на их основе лекарственное средство - спрей для местного применения.

**Предмет исследования:** являются фармакогностическое изучение растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach., разработка технологии

получения экстракта и лекарственной формы в виде спрея, их стандартизация, исследование токсикологической безопасности, биологической активности, качества и стабильности, а также технико-экономическое обоснование производства спрея с экстрактом *Cetraria islandica*.

**Методы исследования:** фармакопейные и нефармакопейные методы: физические, физико-химические, фармацевтико-технологические, биологические и статистические.

**Научная новизна:**

Впервые:

- проведено комплексное фармакогностическое исследование слоевищ *Cetraria islandica* (L.) Ach., включающее морфолого-анатомический анализ с применением флуоресцентной, световой и сканирующей электронной микроскопии, а также фитохимический анализ и определение фармакогностических показателей;

- разработана и оптимизирована технология получения экстракта *Cetraria islandica*, включающая научное обоснование метода экстракции, его стандартизацию и оценку стабильности;

- проведено комплексное исследование показателей безопасности и биологической активности экстракта *Cetraria islandica* в рамках доклинических испытаний, включающее антимикробную и противовоспалительную активность, а также токсикологическую и аллергенную свойства (Приложение А);

- разработана и научно обоснована технология производства лекарственной формы - спрея с экстрактом *Cetraria islandica*, включая оптимизацию состава, методику получения, исследование стабильности и качества, а также технико-экономическое обоснование производства.

**Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:**

- результаты комплексного фармакогностического исследования слоевищ *Cetraria islandica* (L.) Ach., включающее морфолого-анатомический анализ с применением световой, флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, фитохимический анализ и фармакогностические показатели;

- научно обоснованные результаты разработки и оптимизации технологии получения экстракта *Cetraria islandica* демонстрирующие эффективность и воспроизводимость процесса (Приложение Б);

- комплексные данные о токсикологической безопасности и биологической активности экстракта *Cetraria islandica*, подтверждающие его перспективность для использования в медицинской практике;

- результаты фармацевтической разработки лекарственной формы - спрея на основе экстракта *Cetraria islandica*, включающие обоснование выбора лекарственной формы и её характеристик.

**Практическая значимость исследования:**

- рекомендована технология сбора и заготовки лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. Идентификация подтверждена

РГП на ПХВ «Институтом ботаники и фитоиндустрии», Алматы, РК. Номер справки: № 01–05/252 (Приложение В);

- проведена фитосанитарная экспертиза лекарственного растительного сырья на наличие вредных карантинных организмов в государственном учреждении «Территориальная инспекция Комитета государственной инспекции в агропромышленном комплексе по городу Алматы Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан» Номер фитосанитарного сертификата O702/202109151456744 (Приложение Г);

- разработана спецификация качества на «ЛРС *Cetraria islandica* (L.) Ach.»;

- разработан способ получения густого экстракта *Cetraria islandica* методом мацерации с применением ультразвукового воздействия. Составлена спецификация качества на «Экстракт *Cetraria islandica*, густой», которая внедрена в учебный процесс на кафедре фармацевтической технологии НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова» (Приложения Д, Е, Ж).

- технология получения и спецификация качества спрея, на основе экстракта густого из ЛРС *Cetraria islandica* успешно апробированы в Производство фармацевтических препаратов ООО «ИМП», г. Санкт-Петербург, РФ (Приложение И);

- результаты диссертационной работы внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс кафедру промышленной технологии лекарств ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ РК (Приложение К);

- Образцу *Cetraria islandica* (L.) Ach., собранному в Карагандинской области Республики Казахстан, на территории Каркаралинского национального парка, был присвоен номер NCNPR #24269, и он включён в Ботанический репозиторий Национального центра исследований натуральных продуктов при Университете Миссисипи (США) (Приложение Л);

Образец *Cetraria islandica* (L.) Ach. был идентифицирован профессором Брюсом МакКьюном, заслуженным профессором Ассоциации выпускников кафедры ботаники и фитопатологии Университета штата Орегон (Корваллис, штат Орегон, США) – и внесён в Гербарий Орегонского университета (США) под кодом OSC-M-050921 (Приложение М, Приложение Н).

#### **Личный вклад докторанта:**

- в ходе исследования был проведён самостоятельный анализ и обширный обзор отечественных и зарубежных научных источников по теме диссертации, что позволило сформировать теоретическую базу исследования и обозначить перспективные направления для дальнейших научных и прикладных разработок. Все экспериментальные работы выполнены с использованием современного оборудования и материалов фармакопейного качества, что обеспечивает достоверность полученных результатов, подтверждённых данными, полученными как в лабораторных, так и в производственных условиях.

- достоверность и обоснованность результатов обеспечиваются актуальностью исследуемой проблемы, соблюдением научной методологии, а

также проведением всех этапов работы на базе современного исследовательского центра. В рамках диссертационного исследования была разработана нормативная документация на экстракт *Cetraria islandica* и лекарственное средство в виде спрея, что подтверждает практическую значимость полученных данных и их применимость в условиях реального фармацевтического производства.

#### **Апробация результатов диссертации:**

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на международных научных форумах и опубликованы в ряде научных изданий:

- Конгресс Международного совета по малому бизнесу ICSB «International Council for Small Business», Oxford, Mississippi State, USA, март 2022 года.

- Постерный доклад: Ultrastructural and Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach., Oxford, Mississippi State, USA, апрель 2022 года (Приложение П).

- Постерный доклад: Chemical profiling of *Cetraria islandica* lichen using LC-DAD-QToF, Oxford, Mississippi State, USA, апрель 2022 года (Приложение Р).

#### **Публикации:**

Результаты диссертационного исследования были опубликованы в 4 научных работах, в том числе 1 статья в международном журнале, индексируемом в базе данных Scopus; 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан; 1 патент на полезную модель РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности».

#### **Объем и структура диссертации:**

Диссертационная работа включает 176 страниц машинописного текста, 42 таблиц, 55 рисунка, 143 источников отечественной и зарубежной литературы, а также приложения. Работа состоит из введения, литературного обзора, раздела материалов и методов, четырех разделов экспериментальной части, выводов по каждому разделу и заключения.

# 1 ЛИШАЙНИКИ КАЗАХСТАНА КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ *CETRARIA ISLANDICA* (L.) ACH.

## 1.1 Общая характеристика представителей рода *Cetraria* Ach.

Род *Cetraria* (семейство *Parmeliaceae*) включает около 15 видов лишайников, распространённых преимущественно в арктических, субарктических и альпийских регионах северного полушария. Эти лишайники обладают высокой устойчивостью к экстремальным климатическим условиям и способны накапливать биологически активные вещества (БАВ), что делает их перспективными объектами для фармакологических исследований.

Представители рода *Cetraria* отличаются вертикально растущим кустистым или субфолиозным талломом с дорсивентральной структурой и лопастями, имеющими форму продольных каналов, что позволяет отличить их от других видов лишайников. Талломы могут быть коричневыми или жёлтыми, а эпикортекс у них непористый. Псевдоцифеллы, если присутствуют, располагаются на нижней поверхности таллома. Репродуктивные органы включают апотеции и пикнидии, а аскоспоры имеют размеры 6–10 × 3–5 мкм. Разнообразие форм талломов представителей рода *Cetraria* варьирует от листоватых до кустистых, достигая высоты до 12 см. Лопасты могут быть плоскими или трубчатыми, часто с ресничками по краям. Окраска таллома варьирует от беловато-зелёной до коричневой. Апотеции обычно располагаются на концах лопастей. Репродукция происходит как половым путём, так и вегетативно, с помощью соредий и изидий [6].

Виды *Cetraria* обитают в различных экосистемах, включая тундру, лесотундру, сосновые и другие леса. Эти лишайники растут на почве, скалах, камнях, а также на стволах и ветвях деревьев. Некоторые виды являются индикаторами чистоты окружающей среды и находят применение в биомониторинге [7, 8].

Фитохимический анализ представителей рода показал наличие различных вторичных метаболитов, таких как производные дибензофура (усниновая кислота), депсидоны (фумарпротоцетраровая, протолихестериновая, протоцетраровая норстиктовая кислоты) и жирные кислоты (лихестериновая и протолихестериновая кислоты). Эти соединения встречаются в роде *Cetraria*, таких как *C. nigricans*, *C. odontella*, *C. obtusata* и *C. Steppae* и обладают антибактериальной, противогрибковой и антиоксидантной активностью, что делает их ценными для фармакологии и медицины [9, 10].

Род *Cetraria*, представленный различными видами лишайников, является богатым источником биологически активных соединений с широким спектром фармакологической активности. Среди них особое внимание заслуживает *Cetraria islandica* (исландский мох), который традиционно использовался в народной медицине для лечения заболеваний дыхательной и пищеварительной систем. Современные исследования подтверждают его терапевтическую эффективность, а также выявляют дополнительные свойства, включая

антиоксидантную, иммуномодулирующую и цитотоксическую активность. Другим интересным видом является *Cetraria aculeata*, экстракты которого демонстрируют выраженную антибактериальную активность. Они эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, благодаря содержанию протолухестериновой кислоты. Кроме того, метанольные экстракты *C. aculeata* обладают антимуtagenными и антиоксидантными свойствами. В частности, они снижают частоту хроматидных обменов в лимфоцитах человека и восстанавливают активность антиоксидантных ферментов, уменьшая уровень малондиальдегида [11-13].

*Cetraria pinastri* также заслуживает внимания благодаря высокой антиоксидантной активности, что связано с высоким содержанием фенольных соединений (до 32,9 мг/г сухого экстракта). Помимо этого, экстракты *C. pinastri* проявляют антимикробную активность против широкого спектра патогенов, включая *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Aspergillus spp.* [14, 15.]

Таким образом, представители рода *Cetraria* обладают значительным фармакологическим и экологическим потенциалом. Эти виды лишайников представляют собой перспективные объекты для дальнейших исследований в области биомедицины и фармацевтики. Наиболее изученным представителем рода является *Cetraria islandica* (L.) Ach., известная как исландский мох. Этот вид продолжает оставаться важным источником природных лекарственных средств, что обусловлено его уникальным химическим составом и широким спектром биологической активности.

## **1.2 Ботаническое описание и ареал распространения *Cetraria islandica* (L.) Ach.**

Лишайники, представляющие собой уникальные симбиотические организмы, возникают в результате ассоциации микобионта гриба и фотобионта – водорослей или цианобактерий. Эти организмы обладают способностью к фотосинтезу и могут выживать в экстремальных климатических условиях, включая низкие температуры, засухи и резкие колебания влажности. Лишайники широко распространены по всему миру, начиная от арктических пустошей и заканчивая тропическими лесами. Их морфология разнообразна и зависит от экологической среды, структуры таллома и вида фотобионта. Они могут иметь кустистую, листоватую или корковую форму, с окраской, варьирующей от зелёной до красной или серой. Лишайники играют важную роль в экосистемах, выполняя функции биомониторинга, стабилизации почвы и участия в круговороте углерода. Процесс симбиоза между микобионтом и фотобионтами является взаимовыгодным: фотобионты обеспечивают гриб сахарами и органическим азотом, необходимыми для фотосинтеза, что способствует их совместному выживанию в экстремальных условиях. В свою очередь, гриб защищает фотобионта от неблагоприятных факторов окружающей среды и механических повреждений, а также участвует в обмене питательными

веществами. *Cetraria islandica*, известный как исландский мох, представляет собой кустистый наземный лишайник из семейства Parmeliaceae. Он формирует вертикальные или прижатые к субстрату талломы высотой 10–15 см. Таллом дихотомически разветвлён, с лопастями шириной 2–8 мм, верхняя поверхность окрашена в коричнево-оливковые или зелёно-бурые тона, а нижняя сторона имеет более светлый оттенок (беловатый или серый). Поверхность может быть блестящей или матовой, иногда с белыми пятнами – псевдоцифеллами, преимущественно на нижней стороне лопастей [16].

В последние годы было установлено, что симбиоз лишайников включает не только взаимодействие гриба и фотобионта, но и ассоциации с различными бактериальными сообществами. Для *Cetraria aculeata* были идентифицированы альфапротеобактериальные сообщества, а для *Cetraria islandica* обнаружены бактерии из родов *Acetobacteraceae* и *Acidobacteriaceae*. Эти бактериальные ассоциаты играют важную роль в биогеохимических циклах, улучшая устойчивость и адаптивность лишайников к изменениям внешней среды [17].

В мире насчитывается около 20 000 видов лишайников, и семейство Parmeliaceae является одним из самых многочисленных, включая более 2700 видов, относящихся к примерно 70 родам. Этимология термина "*Cetraria*" происходит от латинского слова "*cetra*" (уменьшительное от "*cetrum*"), обозначающего небольшой кожанный щит, что отсылает к морфологической особенности сосочков, характерных для этих лишайников. *Cetraria islandica* является одним из наиболее изученных видов с фармакологической точки зрения и привлекает внимание в экологических и терапевтических исследованиях. Первое научное описание рода *Cetraria* было опубликовано в 1803 году шведским ботаником Эриком Ахариусом, основателем лихенологии, в его труде "*Methodus qua omnes detectos lichenes ad Genera Redigere Tentavit*". В нем он описал лишайники рода *Cetraria* как растения с листовидным, перепончатым, хрящеватым слоевищем с неровными и закрученными лопастями. С развитием науки морфологическая классификация видов этого рода претерпела изменения, что привело к пересмотру состава рода [6, с.3].

Современная таксономия рода *Cetraria* продолжает развиваться, и основные морфологические признаки, используемые для идентификации видов, остаются предметом научных обсуждений. К ним относятся форма и окраска слоевища, наличие или отсутствие определённых структур, таких как пикниды, изидии, соредии и реснички. Важным отличительным признаком является наличие псевдоцифелл на верхней или нижней поверхности слоевища. Репродуктивные органы, такие как апотеции и конидии, имеют значительное разнообразие и являются ключевыми для точной идентификации видов в рамках цеттариоидной клады [18-21].

Типичная морфология рода *Cetraria* включает дорсивентральную организацию, канальчатые лопасти и пигментацию, варьирующую от коричнево-желтых до ярких зелёных тонов, как это наблюдается у *Cetraria aculeata* и *Cetraria crispaе*. Наличие специфического эпикортекса без пор и отсутствие ризин подчеркивают адаптацию этих лишайников к экстремальным условиям

среды обитания, включая низкие температуры и засушливый климат. Эти особенности способствуют их устойчивости к внешним воздействиям и играют ключевую роль в способности удерживать воду и питательные вещества. Репродуктивные структуры варьируют в зависимости от вида. Краевые и пластинчатые апотеции с восемью субсферическими аскоспорами (6–10×3–5 мкм) характерны для большинства видов рода *Cetraria*. Однако встречаются и другие формы репродуктивных органов, такие как терминальные пикниды и различные типы конидий, что указывает на разнообразие репродуктивных стратегий в пределах рода. Виды, такие как *Cetraria aculeata* и *Cetraria crispae*, отличаются наличием псевдоцифелл на нижней поверхности таллома, что также влияет на их таксономическое положение и экологическое значение [22-24].

В зависимости от вида наблюдаются различия в форме таллома и окраске. Например, у *Cetraria aculeata*, *Cetraria australis*, *Cetraria crispae*, *Cetraria ericetorum*, *Cetraria muricata* и *Cetraria steppae* талломы имеют темно-коричневый цвет, в то время как у *Cetraria annae* он желто-зеленый. Эти различия служат важными таксономическими индикаторами. У некоторых видов, таких как *Cetraria sepincola* или *Cetraria kamtschatica*, псевдоцифеллы на нижней стороне таллома либо полностью отсутствуют, либо слабо выражены. Это разнообразие в морфологических характеристиках требует внимательного подхода к их систематике и классификации. Репродуктивные структуры и вторичные метаболиты, такие как соредии, изидии и пикниды, играют ключевую роль в понимании экологической значимости различных видов рода *Cetraria*. Например, *Cetraria nigricans* характеризуется наличием апотеции на краях, в то время как *Cetraria peruviana* их полностью не имеет. Это свидетельствует о том, что морфологические и репродуктивные особенности служат важными индикаторами для дальнейших исследований, направленных на понимание экологических функций этих организмов [25-32].

Таким образом, морфологические и репродуктивные характеристики представителей рода *Cetraria* являются важными маркерами для их идентификации и классификации, а также играют значительную роль в адаптации к специфическим условиям существования. Эти признаки позволяют точно определить виды и отражают их экологическую роль, а также могут быть использованы в дальнейших исследованиях, посвященных биоценозам и мониторингу окружающей среды.

Дальнейшее исследование распространения и экологии рода *Cetraria* подтверждает их адаптивную способность к разнообразным условиям среды. Род имеет широкий ареал, что подчеркивает его космополитичный характер. Однако наибольшее разнообразие видов сосредоточено в северных регионах, таких как Северная Америка, Евразия, а также в арктических и альпийских зонах. Это свидетельствует о высоком уровне эколого-физиологической гибкости, позволяющей растениям рода *Cetraria* выживать в условиях холодных и высокогорных территорий [33].

Представители рода *Cetraria* могут занимать различные экологические ниши в зависимости от типа субстрата. Наиболее часто встречаются

террикольные и кортикольные виды, такие как *Cetraria aculeata* и *Cetraria muricata*, которые обитают на почве и деревьях. Однако ряд видов, таких как *Cetraria odontella* и *Cetraria ericetorum*, способны расти на камнях или моховых субстратах, что подтверждает их разнообразие в отношении среды обитания. Особое внимание следует уделить видам с ограниченным ареалом. Например, *Cetraria peruviana* встречается только в центральной части Южной Америки, а *Cetraria australis* ограничена регионами Австралии. Эти виды демонстрируют более узкую экологическую специализацию, возможно, обусловленную локальными климатическими и экологическими условиями. В то же время виды с более широким распространением, такие как *Cetraria nigricans*, обитающие в арктических и альпийских областях, подтверждают способность рода к адаптации в условиях экстремальных температур. Эндемичные виды, такие как *Cetraria steppae*, характерны для полуаридных степей от Казахстана до Ирана и Украины, а *Cetraria rassadinae* встречается в Прибайкалье, подчеркивая специфику ареалов рода в отдельных географических зонах. Это свидетельствует о важности изучения экосистем и факторов, влияющих на распространение этих лишайников. Также стоит отметить наличие подвидов, таких как у *Cetraria ericetorum*, который разделен на географически изолированные формы, встречающиеся в Евразии, Северной и Южной Америке. Это открывает интересные вопросы для дальнейших исследований, касающихся эволюции и эколого-географической дифференциации рода [34-38].

В целом, видовое и географическое разнообразие рода *Cetraria* открывает широкие перспективы для дальнейших научных изысканий. Эти исследования могут пролить свет на биологические и экологические особенности лишайников, а также на их потенциальное применение в таких областях, как экология, фармакология и мониторинг качества окружающей среды (таблица 1).

По результатам данных, представленных в таблице 1, можно выделить как аналогии, так и различия в морфологических характеристиках видов рода *Cetraria*. Все виды рода *Cetraria*, такие как *Cetraria aculeata*, *Cetraria islandica* и *Cetraria muricata*, обладают лобариевидным или листовидным талломом. Это характерное строение таллома, состоящего из нескольких разделенных долей, позволяет им адаптироваться к разнообразным условиям среды.

Почти все виды рода *Cetraria* характеризуются наличием псевдоцифелл, которые могут варьироваться от обильных до едва заметных в зависимости от вида. Это важный морфологический признак, связанный с вегетативным размножением и распространением лишайников. Вместо изидий и соредий, которые отсутствуют у многих видов, таких как *Cetraria kamczatica*, *Cetraria laevigata* и *Cetraria obtusata*, большинство видов активно используют псевдоцифеллы для размножения. Некоторые виды, например, *Cetraria islandica* и *Cetraria muricata*, имеют пикнидии, расположенные на краях таллома, что также способствует вегетативному размножению.

Таблица 1 – Морфологические характеристики лишайников различных типов таллома

| Тип таллома   | Цвет  | Структура  | Субстрат  | Ссылки  |
|---|---|--|---|---------|
| 1   | 2   | 3  | 4   | 5       |
| <i>Cetraria aculeata</i> (Schreb.) Fr.                | Фрутикозный: таллом коричневый до черного<br>  | Псевдоцифеллы обильны. Изидии и соредии отсутствуют  | Террикольный                                      | [39,40] |
| <i>Cetraria annae</i> Oхner                           | Фолиозный: таллом светло-желтый, медулла белая<br>   | Соредии белые, гранулированные. Апотеции не наблюдались. Краевые черные пицинидии. Конидии отсутствуют | Террикольный                                      | [41]    |
| <i>Cetraria australiensis</i> W.A. Weber ex Kärnefelt | Фолиозный: таллом верхняя поверхность темная Нижняя поверхность желтовато-коричневая до темно-коричневой<br> | Краевые псевдоцифеллы с терминальными пицинидиями. Апотеции неизвестны                                 | Террикольный<br>Кортикольный                      | [42,43] |
| <i>Cetraria crespoae</i>                              | Фрутикозный таллом оливковый или коричневый (до почти черного)<br>   | Соредии отсутствуют, обильные псевдоцифеллы  | Кортикольный                                      | [44]    |
| <i>Cetraria ericetorum</i> Opiz                       | Фрутикозный таллом от темное коричневого до бледно коричневого<br>Медулла: белая<br>                         | Псевдоцифеллы обильные на полях. Апотеции частые. Соредия отсутствует. Пикниды пластинчатые/краевые    | Террикольный<br>,<br>кортикольный<br>саксикольный | [45]    |

Продолжение таблицы 1

| 1  | 2  | 3   | 4            | 5          |
|--|--|---|--------------|------------|
| <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.      | <p>Фолиозный:</p> <p>Таллом: верхняя поверхность зеленоватый или зеленовато-коричневый, нижний поверхность серовато-белая или светло-коричневатый.</p>  | <p>Ламинальные псевдоцифеллы присутствуют, но иногда плохо видны.</p> <p>Редко дискоидные апотеции на терминальные доли.</p> <p>Пикнидия присутствует</p> | Террикольный | [46,47]    |
| <i>Cetraria kamczatica</i> Savicz        | <p>Фрутикозный: таллом темнокоричневый, медулла белая</p>    | <p>Нет псевдоцифелл или с несколькими мелкими псевдоцифеллами на нижних краях</p>   | Мушцикольный | [48]       |
| <i>Cetraria laevigata</i> Rass.          | <p>Фрутикозный: верхняя сторона таллома светло-коричневая, нижняя сторона палер</p>   | <p>Апотеции не видны, маргинальные псевдоцифеллы</p>  | Террикольный | [43, с.28] |
| <i>Cetraria muricata</i> (Ach.) Eckfeldt | <p>Фрутикозный: таллом коричневый до черного</p>    | <p>Псевдоцифеллы разбросаны, хорошо видимые, изидии и соредии отсутствуют</p>   | Террикольный | [49]       |

Продолжение таблицы 1

| 1  | 2   | 3  | 4                          | 5                                 |
|--|---|--|----------------------------|-----------------------------------|
| <i>Cetraria nepalensis</i><br>D.D.<br>Awasthi                  | Фрутикозный: таллом коричневый до черного<br>  | Апотеции неизвестны  | Террикольный               | [41, с.238]                       |
| <i>Cetraria nigrans</i><br>Nyl.                                | Фолиозный: верхняя сторона таллома темнокоричневая или оливково-коричневая, нижняя сторона светло-коричневая<br> | Апотеции присутствуют, псевдоцифеллы видимы или плохо видимы, маргинальные проекции и многочисленные цилии | Террикольный               | [37, с. 207; 44, с. 289]          |
| <i>Cetraria odontella</i><br>(Ach. ) Ach.                      | Фрутикозный: таллом оливковый или коричневый (до почти черного)<br>  | Псевдоцифеллы исключительно на нижней стороне  | Эпилитический              | [50]                              |
| <i>Cetraria obtusata</i><br>(Schaer.)<br>Van den Boom и Sipman | Фрутикозный: таллом темнокоричневый, медулла светло-желтая<br>   | Псевдоцифеллы присутствуют, апотеции неизвестны, пициниды темные, конидии клаватные                        | Террикольный               | [31, с 287, 37 с. 205; 45, с 493] |
| <i>Cetraria peruviana</i><br>Kärnefelt и Thell                 | Фрутикозный: таллом красновато-коричневый до темно-коричневого или почти черного  | Апотеции обычно отсутствуют, маргинальные цилии  | Террикольный, саксикольный | [44, с 288]                       |
| <i>Cetraria rassadinae</i><br>Makryi                           | Фрутикозный: таллом коричневаточерный   | Пициниды присутствуют, конидии облонговидные   | Террикольный               | [51]                              |

Продолжение таблицы 1

| 1  | 2   | 3   | 4                          | 5                       |
|--|---|---|----------------------------|-------------------------|
| <i>Cetraria sepincola</i> (Hoffm.) Ach.    | Фрутикозный: таллом коричневый до почти черного<br>                              | Маргинальные псевдоцифеллы отсутствуют, апотеции и изидии отсутствуют       | Кортикольный, лигникольный | [45, с. 491]            |
| <i>Cetraria steppae</i> (Savicz) Kärnefelt | Фрутикозный: таллом черный, коричневый до светло-коричневого, медулла: белая<br> | Псевдоцифеллы угнетенные или плохо видимые, изидиевые. Проекции отсутствуют | Террикольный               | [28, с. 79; 45, с. 492] |

Представители рода *Cetraria* могут быть террикольными, кортикольными или саксикольными лишайниками, что указывает на их обитание на почве, деревьях или камнях. Например, *Cetraria islandica* и *Cetraria muricata* являются террикольными видами, что подтверждает их широкий ареал распространения и способность к выживанию в различных экологических условиях.

Виды рода *Cetraria* характеризуются разнообразием морфологических и экологических признаков. В частности, у таких представителей, как *Cetraria aculeata* и *Cetraria muricata*, апотеции могут встречаться как редко, так и часто, тогда как у видов *Cetraria odontella* и *Cetraria peruviana* они практически не развиваются. Псевдоцифеллы демонстрируют значительное видовое разнообразие: например, у *C. aculeata* они многочисленны и хорошо выражены, в то время как у *C. kamczatica* они практически незаметны, что, вероятно, связано с адаптацией к экстремальным экологическим условиям.

У ряда видов, таких как *C. islandica* и *C. muricata*, выражены маргинальные псевдоцифеллы, в то время как у *C. nigrans* они отсутствуют. Различия наблюдаются также в структуре репродуктивных органов: пикнидии присутствуют у *C. aculeata* и *C. laevigata*, но нехарактерны для *C. obtusata* и *C. steppae*. Кроме того, предпочтения по типу субстрата варьируются: *C. steppae* и *C. nigrans* склонны развиваться на мхах или каменистых поверхностях, в то время как такие виды, как *C. islandica* и *C. muricata*, преимущественно встречаются на почве, проявляя террикольную стратегию обитания.

Таким образом, несмотря на явные аналогии в морфологических характеристиках, такие как структура таллома, наличие псевдоцифелл и общие типы субстратов, род *Cetraria* демонстрирует значительное разнообразие,

Таблица 2 - Ареал распространения видов лишайников рода цетрария

| Виды лишайников   | Статус   | Ареал распространения  | Ссылки                   |
|---|--|--|--------------------------|
| <i>Cetraria aculeta</i> (Schreb.) Fr.                     | Космополитный                                    | На всех континентах и на многих океанических островах                  | [52]                     |
| <i>Cetraria arenaria</i> Oer.                             | Эндемик  | Байкальский регион, Россия   | [53]                     |
| <i>Cetraria australiensis</i> W.A. Weber ex Kärnefelt.    | Эндемик  | Юго-восточная Австралия  | [54]                     |
| <i>Cetraria chlorophylla</i> (Wild) Vain ex Kärnefelt.    | Эндемик  | Восточная Исландия   | [44, с. 286]             |
| <i>Cetraria crawfordii</i> (Barnetto, Vazquez) Kärnefelt. | Эндемик  | Западные части Иберийского полуострова                                 | [49, с. 399]             |
| <i>Cetraria ericetorum</i> Opiz.                          | Эндемик (каждый подвид географически изолирован) | Европа и Азия  | [48, с. 37; 50]          |
| <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.                       | Биполярный                                       | Высокие широты в северном и южном полушариях                           | [44, с. 288; 50, с. 221] |
| <i>Cetraria kamtschatica</i> Savicz.                      | Амфи-Берингийский                                | Восточная Сибирь и Аляска  | [51]                     |
| <i>Cetraria laevigata</i> Rass.                           | Амфи-Берингийский                                | Северная Америка (от Аляски до северной части Канады)                  | [37, с. 208; 42, с. 368] |
| <i>Cetraria muricata</i> Ach. Eckfeldt.                   | Космополитный                                    | На четырёх континентах и многих океанических островах                  | [44, с. 288]             |
| <i>Cetraria nepalensis</i> D.D. Awasthi.                  | Эндемик  | Изолированные высокогорные локации в Гималаях                          | [50, с. 288]             |
| <i>Cetraria nivalis</i> Nyl.                              | Циркумполярный                                   | Арктические регионы (Аляска, Канада) и альпийские зоны в южных широтах | [37 с. 208, 44 с. 289]   |
| <i>Cetraria obtusata</i> (Schaer.) Van den Boom & Sipman. | Эндемик  | Районы Альп – Австрия, Италия, Швейцария                               | [45 с. 491]              |
| <i>Cetraria peruviana</i> Kärnefelt & Thell.              | Эндемик  | Центральная часть Южной Америки  | [44 с. 287]              |
| <i>Cetraria rassadinae</i> Makyi.                         | Эндемик  | Северный Байкальский регион центральной Сибири                         | [50 с. 221]              |
| <i>Cetraria Sepincola</i> (Hoffm.) Ach.                   | Околополярный                                    | Бореальный лес и тундры Арктики  | [44, с. 289; 52]         |
| <i>289Cetraria stappae</i> (Savicz) Kärnefelt.            | Эндемик  | Полупустынные степные биомы Евразии от Казахстана до Ирана и Украины   | [28 с. 79, 50 с. 220]    |

выражающееся в различиях в размерах, формах и расположении морфологических структур, а также в особенностях размножения и предпочтениях субстрата. Эти различия и аналогии отражают эволюционную

гибкость и адаптационные стратегии представителей рода, позволяя им успешно существовать в разнообразных экологических нишах (таблица 2).

Приведённые в таблице 2 данные об ареалах видов рода *Cetraria* служат основой для более детального анализа филогеографических и морфологических особенностей отдельных представителей, таких как *Cetraria aculeata* и *Cetraria islandica*.

Изучение моделей распространения *Cetraria aculeata* с применением филогенетических методов показало, что биполярное распространение этого вида, вероятно, берёт начало в Северном полушарии. Предполагается, что в период плейстоцена произошло его вторичное расселение в Антарктиду и Южную Америку. Дополнительно были выявлены фенотипические различия у популяций *C. aculeata*, обитающих в степных районах Испании [55].

Среди представителей рода *Cetraria* особое значение имеет *Cetraria islandica* (L.) Ach., особенно в фармакологическом контексте. Этот вид характеризуется листовидным, дихотомически разветвлённым талломом длиной до 15 см, с верхней стороной зеленовато-коричневого цвета и серовато-белой либо коричневатой нижней поверхностью. На талломе располагаются пластинчатые псевдоцифеллы и краевые пикниды; коричневые дискоидные апотеции встречаются редко и обычно локализируются на концевых долях [56].

*C. islandica* относится к террикольным видам и обладает широким ареалом распространения. Подвид *islandica* преимущественно встречается в высоких широтах Северного и Южного полушарий, тогда как подвид *stispa* распространён в регионах Северной и Восточной Европы, Сибири, Северной Америки, а также в отдельных областях Южного полушария [57].

### **1.3 Химический состав, фармакологическая активность и применение *Cetraria islandica* (L.) Ach. в традиционной и научной медицине**

*Cetraria islandica*, известный как исландский мох, представляет собой объект многочисленных исследований, направленных на изучение его фитохимических компонентов. Эти исследования выявили разнообразие соединений, включая углеводы, жирные кислоты, лишайниковые кислоты и другие биоактивные вещества. В данном разделе представлены ключевые исследования, посвящённые химическому составу *C. islandica*.

В 1986 году Y. Solberg в ходе химического анализа хлороформно-метанольного экстракта лишайника *Cetraria islandica* выделил широкий спектр органических соединений. Исследование позволило идентифицировать такие группы веществ, как углеводороды, жирные спирты, различные типы жирных кислот (включая кето- и дикарбоновые), а также стеролы и тритерпеноидные соединения, включая моно-, сескви- и дитерпены. Среди доминирующих компонентов были обнаружены линолевая и линоленовая кислоты, кетостеариновая кислота и протолихестериновая кислота, а также другие жирные кислоты, структурно сходные с протолихестериновыми. Эти данные свидетельствуют о многообразии липофильных компонентов *C. islandica*, представляющих интерес для фармакологической оценки.

В 2023 году González и коллеги сосредоточились на разработке двухступенчатой процедуры выделения двух основных параконовых кислот, присутствующих в *C. islandica*: протолихестериновая и лихестериновая кислоты. Эти соединения были очищены с использованием хроматографии по размеру и центрифугирования с противотоком (CPC), что позволило достичь чистоты выше 95% и выходов выше 50%. Кроме того, были разработаны аналитические методы для обнаружения этих соединений с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией или детектором испарительного рассеяния света (LC-ELSD) [58].

В том же году было проведено комплексное исследование, в котором с использованием методов световой, флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и высокоразрешационной масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией (LC-DAD-QToF) были идентифицированы 37 соединений в *C. islandica*. Среди них были обнаружены депсидоны (фумаропротоцеттаровая кислота, протолихестериновая кислота), дибензофураны (усниновая кислота), алифатические кислоты (протолихестериновая и лихестериновая кислоты), простые органические кислоты (фумаровая, лимонная), полисахариды (лихенин и изолихенин), стеролы и сахара (эргостеролпероксид, сахароза, арабинитол) [59].

В дополнение к исследованиям химического состава, важным аспектом является анализ содержания элементов и радионуклидов в фармацевтических и пищевых добавках на основе *Cetraria islandica*. В 2017 году был проведён анализ образцов, приобретённых в Италии, с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии и альфа-спектрометрии. В результате были выявлены основные элементы, такие как калий, кальций, фосфор, сера, хлор, марганец, железо, медь, цинк, никель, бром и йод, а также токсичные элементы, включая алюминий, титан, кремний, рубидий, стронций, мышьяк, кадмий, олово и свинец. Кроме того, в образцах были обнаружены радионуклиды, такие как  $^{238}\text{U}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{232}\text{Th}$  и  $^{228}\text{Th}$ . Эти результаты подчеркивают, что *C. islandica* может служить источником основных элементов, однако концентрации некоторых токсичных элементов требуют постоянного мониторинга для обеспечения безопасности потребителей [60].

В 1994 году был выделен новый щелочерастворимый полисахарид из *Cetraria islandica* с использованием методов этанольного фракционирования, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Структурный анализ показал, что данный полисахарид представляет собой разветвлённый галактоманнан с основной цепью, состоящей из (1→6)-связанных  $\alpha$ -D-маннопиранозильных и  $\alpha$ -D-галактопиранозильных единиц. Этот полисахарид продемонстрировал выраженную иммуностимулирующую активность как в *in vitro* фагоцитарном тесте, так и в *in vivo* тесте на выведение углерода.

Российские учёные внесли значительный вклад в исследование фитохимического состава *Cetraria islandica*, сосредоточив внимание на

различных группах биологически активных веществ. В 2020 году А.Е. Рассабина, О.П. Гурьянов и Ф.В. Минибаева из Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН совместно с учёными из ЮАР изучили меланины, выделенные из *C. islandica*, и установили их принадлежность к алломеланинам с фотозащитной и антиоксидантной активностью [61]. Учёные Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета – В.В. Фролова, Н.А. Криштянова, Е.А. Климкина и О.М. Тихомирова – разработали гель на основе экстрактов *C. islandica*, содержащий водорастворимые полисахариды и лишайниковые кислоты, активные против ряда патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) [62]. Кроме того, В.И. Георгиянц и И. Н. Владимирова (2013) изучили жирнокислотный состав образцов, собранных на территории Украины, выявив как распространённые кислоты (пальмитиновая, линолевая), так и редкие, такие как бегеновая и эйкозадиеновая. Эти данные подтверждают ценность *C. islandica* как источника фармакологически значимых соединений [63].

В рамках исследования, выполненного украинскими специалистами А. О. Шпичак и О. П. Хворост, был проведён анализ летучих соединений, полученных методом паровой дистилляции из слоевищ *Cetraria islandica*, собранных на территории Украины. С использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (GC-MS) было выявлено 24 различных соединения. Наибольшую долю среди них составляли жирные кислоты и их производные – 57,86 %, включая линолевую (20,08 %) и пальмитиновую (19,21 %) кислоты. Также были определены терпеноиды (23,57 %) и ациклические насыщенные углеводороды (10,99 %). Впервые в составе *C. islandica* из украинских популяций были обнаружены четыре монотерпеноидных и шесть сесквитерпеноидных соединений, что расширяет представления о химическом разнообразии этого вида [64].

Это исследование подчёркивает богатство химического состава *C. islandica* и его потенциальную ценность в фармакологии и медицине. Идентификация и характеристика таких разнообразных соединений открывают новые перспективы для использования этого лишайника в качестве источника биоактивных веществ.

В 2023 году исследователи из Казахского национального медицинского университета имени С. Д. Асфендиярова совместно с учёными Национального центра исследований природных продуктов Университета Миссисипи (США) провели комплексное исследование химического состава лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach., собранного в Национальном парке Каркаралы, Карагандинская область, Казахстан. В ходе работы были выделены девять соединений, включая два депсидона (цетраровая кислота и 9'-(О-метил) протоцетраровая кислота), один бензофуран (усниновая кислота), три жирные кислоты (олеиновая, пальмитиновая и стеариновая), один стерол (эргостеролпероксид) и два сахара (сахароза и арабинитол). Метаболический профиль, полученный с использованием метода LC-DAD-QToF, позволил

идентифицировать 37 соединений, среди которых преобладали депсидоны, а также алифатические кислоты и липиды. Дополнительно, с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии в образцах были обнаружены такие элементы, как кальций, натрий, железо и бром, что свидетельствует о способности лишайника аккумулировать минеральные вещества из окружающей среды [65].

Род *Cetraria* характеризуется относительным химическим однообразием по сравнению с другими лишайниковыми родами, такими как *Parmotrema* или *Usnea*, где наблюдается значительное межвидовое разнообразие вторичных метаболитов. Например, в *Parmotrema perlatum* обнаружен атранорин, в *P. andinum* – леканоровая кислота, а в *P. nilgherrense* – комбинация алекроновой кислоты и атранорина. В отличие от этого, в роде *Cetraria* депсиды, такие как атранорин и скваматовая кислота, встречаются лишь как второстепенные соединения, например, в *Cetraria annae*. Наличие норстиховой кислоты в *Cetraria steppae* стало ключевым фактором для дифференциации этого эндемического вида от более распространённого *Cetraria aculeata*. Использование методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволило обнаружить следы норстиховой кислоты и в *C. aculeata*. Однако исследования показали, что присутствие этого соединения не связано с филогенетическими различиями, а скорее обусловлено экологическими факторами, такими как климат и тип почвы, особенно в средиземноморских и центральноазиатских регионах. Помимо широко распространённых протолихестериновой и лихестериновой кислот, в некоторых видах рода *Cetraria* были идентифицированы менее известные жирные кислоты. Например, в *C. nigricans* и *C. odontella* обнаружены рангиформные кислоты, а в *C. obtusata* – секалоновая кислота. Эти находки подчёркивают химическое разнообразие внутри рода и указывают на потенциальную фармакологическую ценность этих соединений. *Cetraria islandica* (L.) Ach. является одним из наиболее изученных видов рода *Cetraria*, особенно в отношении его химического состава и адаптационных механизмов [66].

Первичные метаболиты и полисахариды. Основными полисахаридами *C. islandica* являются глюканы: лихенан ( $\beta$ -1,3/1,4-D-глюкан) и изолихенан ( $\alpha$ -1,3/1,4-глюкан). Их содержание зависит от условий pH и температуры. Примечательно, что соотношение  $\beta$ -1,3/1,4-D-глюканов в клеточных стенках микобионтов *C. islandica* превышает таковое в ячмене и овсе. Кроме того, из этого вида были выделены другие полисахариды, включая растворимый в щелочи галактоманнан и несколько других растворимых полисахаридов [67].

Вторичные метаболиты и экологическая адаптация. Вторичные метаболиты *C. islandica*, такие как фумарпротоцетраровая кислота, играют ключевую роль в адаптации лишайника к неблагоприятным условиям окружающей среды. Фумарпротоцетраровая кислота способствует устойчивости к тяжёлым металлам, снижая поглощение металлических ионов апопластом, а также обеспечивает защиту от загрязнения сернистым газом [68].

Химический состав представителей рода *Cetraria* обобщён в таблице 3, что позволяет наглядно сравнить основные выявленные соединения.

Таблица 3 – Обобщённые данные по химическому составу различных видов рода *Cetraria*

| Таксон  | Выявленные химические соединения   | Источник     |
|---|--|--------------|
| <i>Cetraria aculeta</i> (Schreb.) Fr.                     | Основными метаболитами являются усниновая и протолихестериновая кислоты  | [27, с. 93]  |
| <i>Cetraria annae</i> Охнер.                              | Преобладают усниновая и изопруностериновая кислоты; в малых количествах установлено присутствие протолихестериновой, атранорина и скваматовой кислот | [39, с. 364] |
| <i>Cetraria australiensis</i> W.A. Weber ex Kärnefelt.    | Обнаружены усниновая и протолихестериновая кислоты   | [39, с. 370] |
| <i>Cetraria ericetorum</i> Opiz.                          | Основу химического состава составляют лихестериновая и протолихестериновая кислоты   | [26, с. 493] |
| <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.                       | Характеризуется наличием фумарпротоцетрариновой, протоцетрариновой и протолихестериновой кислот  | [42, с. 364] |
| <i>Cetraria kamtschatica</i> Savicz.                      | Выделены протолихестериновая и рангиферовая кислоты  | [37, с. 204] |
| <i>Cetraria laevigata</i> Rass.                           | Основным соединением является фумарпротоцетрариновая кислота   | [37, с. 205] |
| <i>Cetraria muricata</i> (Ach.) Echfeldt                  | Идентифицированы усниновая и протолихестериновая кислоты   | [39, с. 364] |
| <i>Cetraria nivalis</i> Hyl.                              | Установлены протолихестериновая, рангиферовая и скалоновая кислоты   | [45, с. 493] |
| <i>Cetraria obtusata</i> (Schaer.) Van den Boom & Sipman. | Основу химического профиля составляют усниновая, протолихестериновая и скалоновая кислоты  | [45, с. 495] |
| <i>Cetraria sepincola</i> (Hoffm.) Ach.                   | Преобладают усниновая и протолихестериновая кислоты  | [45, с. 496] |
| <i>Cetraria steppae</i> (Savicz) Kärnefelt.               | Идентифицированы усниновая, лихестериновая, протолихестериновая и норстиховая кислоты  | [28, с. 79]  |

Меланины и защита от ультрафиолетового излучения. Меланины, особенно алломеланины, выделенные из *C. islandica*, выполняют важную функцию в защите от ультрафиолетового излучения. Исследования показали, что эти пигменты эффективно поглощают как ультрафиолетовое, так и фотосинтетически активное излучение, способствуя выживанию лишайника в экстремальных условиях [69].

Таким образом, *C. islandica* демонстрирует сложную систему адаптации, основанную на синтезе специфических первичных и вторичных метаболитов, обеспечивая его выживание и распространение в различных экологических нишах.

*Cetraria islandica* (L.) Ach., известная как исландский мох, традиционно использовалась в народной медицине для лечения различных заболеваний пищеварительной и дыхательной систем, включая кашель, простуду, запоры,

гастрит и язвенную болезнь. В Исландии и Финляндии её применяли для облегчения симптомов простуды и желудочно-кишечных расстройств, а в Швеции и Турции – при нефрите, диабете и геморрое. Эти лечебные свойства связывают с содержанием лихеновых кислот, таких как фумарпротоцетраровая, протоцетраровая, протолихестериновая и усниновая кислоты [70].

Современные исследования подтверждают широкий спектр биологической активности экстрактов *C. islandica*. Метанольный экстракт этого лишайника проявил умеренную антиоксидантную активность ( $IC_{50} = 678,38$  мкг/мл) и значительную противораковую активность в отношении клеточных линий меланомы и колоректального рака ( $IC_{50} = 22,68$  и  $33,74$  мкг/мл соответственно). Также была выявлена антимикробная активность против различных бактериальных и грибковых штаммов.

Фармакологический потенциал *C. islandica* подтверждается рядом патентов. Например, патент RU2321419C1 описывает использование сухого экстракта этого лишайника в таблетированной форме для лечения язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Кроме того, патент FR2756182 охватывает применение экстракта *C. islandica* и его компонентов, таких как протолихестериновая кислота и полисахарид KI-M-7, для профилактики и лечения бронхиальной астмы [71,72].

В 2020 году в журнале *Biochemistry* (Moscow) было опубликовано исследование, посвящённое меланину, выделенному из лишайника *Cetraria islandica*. Учёные Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН – А.Е. Рассабина, О.П. Гурьянов и Ф.В. Минибаева – в сотрудничестве с Р.П. Беккетом из Университета Квазулу-Натал (ЮАР) проанализировали элементный состав, функциональные группы и физико-химические свойства этого пигмента. На основании соотношения углерода и азота (C/N) было установлено, что меланин относится к классу алломеланинов. Идентифицированные функциональные группы обеспечивают фотозащитные и антиоксидантные свойства меланина, что подчёркивает его потенциальную биологическую активность и роль в адаптации лишайников к экстремальным условиям окружающей среды [73].

Обзор современных исследований демонстрирует значительный фармакологический потенциал лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach., обусловленный его богатым химическим составом, включающим полисахариды, лишайниковые кислоты и пигменты.

Традиционно *C. islandica* использовалась в народной медицине для лечения респираторных и желудочно-кишечных заболеваний. Современные исследования подтверждают эти применения и выявляют дополнительные фармакологические свойства. Так, метанольный экстракт *C. islandica* продемонстрировал антиоксидантную активность, проявляя способность к улавливанию свободных радикалов и супероксидных анионов. Также были отмечены антимикробные свойства против различных бактериальных и грибковых штаммов, а также цитотоксическая активность в отношении клеточных линий меланомы и колоректального рака [74].

В другом исследовании экстракт *C. islandica* показал способность снижать уровень малондиальдегида и активность каталазы и глутатионпероксидазы, одновременно увеличивая уровень глутатиона у крыс, что свидетельствует о его антиоксидантных и адаптогенных свойствах [75].

Кроме того, соединения, выделенные из *C. islandica*, такие как протолихестериновая и лихестериновая кислоты, проявили значительную активность против *Trypanosoma brucei brucei*, что указывает на их потенциал в разработке новых противопротозойных средств

В 2014 году исследователи Дж. О. Игол и соавторы выделили из *C. islandica* четыре соединения: протолихестериновую, лихестериновую, протоцетрариновую и фумарпротоцетрариновую кислоты. Протолихестериновая и лихестериновая кислоты проявили значительную антипротозойную активность против *Trypanosoma brucei* с минимальными ингибирующими концентрациями (MIC) 6,30 и 12,5 мкМ соответственно. Молекулярный докинг показал их высокое сродство к ключевым ферментам паразита, таким как рибофлавинкиназа и стерол-14 $\alpha$ -деметилаза (CYP51) [76].

В 2014 году было проведено исследование, в котором метанольный экстракт *C. islandica* продемонстрировал умеренную антиоксидантную активность (IC<sub>50</sub> = 678,38 мкг/мл), а также антимицробную активность против различных бактерий и грибов с MIC в диапазоне от 0,312 до 5 мг/мл. Кроме того, экстракт проявил цитотоксическую активность в отношении клеточных линий меланомы (FemX) и колоректального рака (LS174) с IC<sub>50</sub> 22,68 и 33,74 мкг/мл соответственно [74, с. 83].

В 2015 году исследователи изучили нейропротекторные свойства метанольного экстракта *C. islandica* и его основного компонента – фумарпротоцетрариновой кислоты. В модели окислительного стресса на астроцитах и нейробластомных клетках экстракт и изолированное соединение снижали уровень внутриклеточных активных форм кислорода (ROS), повышали соотношение восстановленного и окисленного глутатиона (GSH/GSSG) и предотвращали митохондриальную дисфункцию. Эти эффекты связываются с активацией пути Nrf2, регулирующего антиоксидантные ферменты [77].

В 2023 году было проведено исследование, в котором водные и этанольные экстракты *C. islandica* продемонстрировали противовирусную активность против вирусов гриппа A/H3N2 и A/H5N1. Этанольный экстракт при концентрации 50 мкг/мл подавлял репликацию вирусов на 3,5 и 4 лог<sub>10</sub> соответственно, в то время как водный экстракт при концентрации 500 мкг/мл снижал репликацию на 2 и 6 лог<sub>10</sub> соответственно [78].

Обобщая данные исследований химического состава и фармакологических свойств *Cetraria islandica* (L.) Ach., можно заключить, что этот лишайник является ценным источником разнообразных биоактивных соединений, включая полисахариды (лихенин, изолихенин) [79], лишайниковые кислоты (протолихестериновая, лихестериновая, фумарпротоцетрариновая, протоцетрариновая), меланины и жирные кислоты. Эти компоненты обуславливают широкий спектр фармакологических активностей, таких как

антиоксидантная, антимикробная, противовирусная, цитотоксическая, нейропротекторная и иммуномодулирующая. Например, протолихестериновая и лихестериновая кислоты проявляют значительную антипротозойную активность против *Trypanosoma brucei*, а фумарпротоцетрариновая кислота демонстрирует нейропротекторные свойства в моделях окислительного стресса [80]. Экстракты *C. islandica* также показали противовирусную активность против вирусов гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1 [81]. Традиционное использование этого лишайника в народной медицине для лечения респираторных и пищеварительных заболеваний находит подтверждение в современных фармакологических исследованиях, что подчеркивает его потенциал в разработке новых терапевтических средств [82,83]. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для более глубокого понимания механизмов действия этих соединений, оценки их безопасности и эффективности, а также разработки стандартизированных лекарственных форм.

#### **1.4 Современные подходы к разработке растительных лекарственных средств: стандарты качества и нормативные требования**

На современном этапе развития медицины наблюдается устойчивый рост интереса к использованию растительных лекарственных средств (РЛС) как со стороны медицинского сообщества, так и среди пациентов. Ключевые факторы этого тренда включают стремление к более мягкому, физиологичному воздействию на организм с минимальным количеством побочных эффектов, расширение научных исследований, подтверждающих эффективность и безопасность ряда растительных соединений, а также экологичность и биодоступность растительного сырья, используемого в производстве фитопрепаратов.

РЛС играют важную роль в фармакотерапии как дополнение к синтетическим препаратам или в качестве самостоятельных терапевтических агентов [84]. Они особенно востребованы в лечении хронических заболеваний, требующих длительного применения медикаментов, в реабилитации, педиатрии, геронтологии, а также в профилактике и комплексной терапии. Использование РЛС позволяет снижать лекарственную нагрузку на организм и минимизировать риск развития лекарственной устойчивости, особенно в случае антибактериальных и противовоспалительных препаратов [85].

Согласно статистическим данным, рынок растительных препаратов демонстрирует устойчивую положительную динамику. В странах Европейского Союза, США, Китае, Индии, а также в государствах СНГ доля РЛС в общем фармацевтическом сегменте постоянно увеличивается. Казахстан, как часть Евразийского экономического союза (ЕАЭС), также движется в направлении расширения ассортимента отечественных фитопрепаратов и совершенствования нормативной базы для их регистрации и контроля качества [86].

В этой связи особое значение приобретает стандартизация всех этапов разработки и производства РЛС. Обеспечение качества, безопасности и эффективности РЛС возможно только при наличии четкой регламентации,

соответствующей современным научным требованиям и международным стандартам. Таким образом, исследование современных подходов к стандартизации и нормативному регулированию РЛС является актуальным и своевременным направлением научного поиска, особенно в условиях стремительного роста интереса к фитотерапии и интеграции в глобальные фармацевтические процессы [87].

В Республике Казахстан контроль качества, безопасности и терапевтической эффективности РЛС осуществляется в соответствии с национальными нормативно-правовыми актами, включая государственные стандарты и официальные документы Министерства здравоохранения. основополагающим нормативом является Приказ Министра здравоохранения РК от 27 декабря 2021 года № ҚР ДСМ-128, в котором изложены Правила проведения экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий. В документе детально регламентируются этапы и критерии оценки качества и безопасности РЛС, включая механизмы проведения ускоренной экспертизы при чрезвычайных обстоятельствах, таких как вспышки инфекционных заболеваний или иные угрозы общественному здоровью [88].

Кроме того, в Казахстане используется система государственных фармакопей и стандартов, обеспечивающих надлежащее качество растительного сырья и фитопрепаратов. Эти нормативные документы содержат чёткие требования к идентификации, микробиологической чистоте, уровню действующих веществ и другим показателям, определяющим фармацевтическую надёжность препаратов.

На уровне ЕАЭС регулирование обращения лекарственных средств, включая РЛС, осуществляется в соответствии с Техническим регламентом ТР ЕАЭС 030/2017 «О безопасности лекарственных средств для медицинского применения». Этот регламент устанавливает единые требования к безопасности, эффективности и качеству лекарственных средств, а также к их маркировке и инструкции по применению [89].

В рамках ЕАЭС также разработаны и применяются общие фармакопейные статьи и руководства, касающиеся контроля качества растительного сырья, стандартизации методов анализа и оценки безопасности РЛС. Эти документы способствуют гармонизации требований и процедур регистрации лекарственных средств на территории государств-членов союза.

На международном уровне разработка и регистрация РЛС регулируются рекомендациями и стандартами таких организаций, как Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH), Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA), Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), а также фармакопеями США (USP) и Европейского союза (Ph. Eur.). Критерии качества растительных лекарственных средств (РЛС) играют ключевую роль в обеспечении их безопасности и терапевтической эффективности. Начальным этапом является строгий отбор и проверка сырья, которые включают идентификацию ботанического вида, подтверждение подлинности и оценку чистоты. Важно

определить предельно допустимые уровни загрязнителей, таких как пестициды, тяжёлые металлы и микробная обсеменённость. В соответствии с требованиями национальных документов РК и ЕАЭС, особое внимание уделяется стандартизации по содержанию биологически активных веществ, таких как флавоноиды, полифенолы, алкалоиды и терпеноиды, которые являются ключевыми маркерами фармакологической активности фитопрепаратов [90, 91].

Контроль качества осуществляется с применением современных аналитических методов, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), газовую хроматографию (ГХ), спектрофотометрический анализ и титриметрию. Эти методы позволяют точно определить количественное содержание активных соединений и выявить возможные примеси. Оценка биологической активности РЛС основывается на фармакологическом обосновании их действия, включая *in vitro* и *in vivo* исследования, которые подтверждают заявленные терапевтические эффекты. Таким образом, стандартизация и контроль качества обеспечивают научную достоверность и стабильность действия растительных препаратов [92].

Производственные аспекты РЛС в Республике Казахстан регламентируются требованиями надлежащей производственной практики (GMP), установленными национальными нормативными документами. В соответствии с действующими санитарными и фармацевтическими нормативами РК, особое внимание уделяется соблюдению гигиенических требований, квалификации персонала, валидации производственных процессов, а также обеспечению полной прослеживаемости документации на всех этапах – от поступления сырья до выпуска готовой продукции. Важнейшим элементом является контроль качества, который включает входной анализ растительного сырья, промежуточный и итоговый контроль, а также проведение испытаний стабильности. Это позволяет обеспечить безопасность и эффективность продукции в течение всего срока хранения [93].

Особенности производства РЛС связаны с технологическими процессами, такими как экстракция, стабилизация и хранение биологически активных веществ. Методы экстракции подбираются в зависимости от природы действующих компонентов и могут включать мацерацию, перколяцию или сверхкритическую экстракцию. Далее требуется стабилизация экстракта с целью предотвращения деградации активных соединений, что достигается регулированием условий хранения, добавлением антиоксидантов и использованием соответствующих упаковок. Эти меры позволяют сохранить фармакологическую активность препаратов, обеспечивая их терапевтическую ценность [94].

Безопасность и эффективность РЛС подтверждаются посредством многоэтапной системы оценки, включающей доклинические и клинические испытания. На доклиническом этапе проводится фармакологическое скринирование, токсикологическое тестирование и исследование механизмов действия биологически активных веществ на клеточных и животных моделях. Клинические испытания, согласно требованиям национального и

международного законодательства, включают несколько фаз с целью оценки терапевтической эффективности, выявления побочных эффектов и определения оптимальных дозировок у человека [95].

После регистрации РЛС продолжается фармаконадзор – система пострегистрационного наблюдения за безопасностью лекарств. Она включает сбор и анализ информации о нежелательных реакциях, взаимодействиях с другими препаратами и риске длительного применения. Это позволяет своевременно выявлять потенциальные угрозы здоровью пациентов и принимать меры, включая корректировку инструкции по применению, ограничение или отзыв препарата с рынка. Таким образом, контроль за безопасностью и эффективностью РЛС продолжается на протяжении всего их жизненного цикла.

Среди ключевых проблем, сдерживающих развитие РЛС, выделяется нехватка унифицированных и валидированных методик контроля качества. Это затрудняет стандартизацию продукции и сопоставимость результатов между производителями и странами. Также актуальна проблема недостаточной доказательной базы клинической эффективности многих фитопрепаратов, что снижает уровень доверия со стороны врачей и потребителей. Это связано как с ограничениями в дизайне исследований, так и с трудностями воспроизводимости результатов. Перспективные направления развития включают цифровизацию аналитических процессов, внедрение технологий молекулярного профилирования и машинного обучения в оценке состава и биологической активности растительного сырья. Активно развивается создание комбинированных форм РЛС, направленных на синергизм действия компонентов, а также технологии повышения биодоступности активных веществ – например, за счёт использования липосомальных форм, микрокапсулирования или наносистем. Всё это открывает новые горизонты для расширения ассортимента и повышения терапевтической эффективности фитопрепаратов.

Таким образом, современные подходы к разработке РЛС базируются на строгом соблюдении стандартов качества, безопасности и эффективности, отражённых как в национальных нормативных актах РК, так и в международных рекомендациях, включая документы ЕАЭС. Комплексный контроль на всех этапах – от сбора сырья и стандартизации активных веществ до производства по требованиям GMP и клинических испытаний – обеспечивает создание высококачественных и безопасных растительных лекарственных средств. Актуальность темы подтверждается растущим спросом на РЛС и необходимостью гармонизации требований для успешной интеграции отечественной фармацевтики в международное сообщество [96-98].

### **Выводы по первому разделу**

Род *Cetraria* (семейство *Parmeliaceae*) включает около 15 видов, широко распространённых в арктических, субарктических и альпийских зонах северного полушария. На территории Казахстана одним из наиболее изученных и перспективных видов является *Cetraria islandica* (L.) Ach., обладающая высокой экологической адаптивностью и уникальным химическим составом. В

литературе подтверждено присутствие в её слоевище полисахаридов (лихенин, изолихенин), лишайниковых кислот (протолихестериновая, фумарпротоцетраровая, усниновая), жирных кислот, меланинов и других биологически активных веществ, обладающих широким спектром фармакологической активности – антиоксидантной, антимикробной, противовоспалительной, иммуномодулирующей и цитотоксической.

Традиционное использование *C. islandica* в народной медицине стран Европы, Скандинавии и Центральной Азии находит подтверждение в современных научных исследованиях, включая доказательства фармакологической активности её экстрактов и отдельных соединений *in vitro* и *in vivo*. Однако в отношении казахстанской флоры и популяций *Cetraria islandica* до настоящего времени не проводилось комплексное фармакогностическое, химико-аналитическое и фармакологическое изучение в рамках стандартизации и разработки растительного лекарственного препарата.

В этой связи особенно актуальными являются комплексные экспериментальные исследования, направленные на стандартизацию лекарственного растительного сырья (*слоевищ C. islandica*), определение количественного и качественного состава БАВ, разработку технологии получения густого экстракта, изучение фармакологической активности (противовоспалительной, антимикробной и др.) и последующую фармацевтическую разработку на его основе.

Таким образом, литературный обзор подтвердил целесообразность дальнейших доклинических и прикладных исследований с целью создания эффективного и безопасного лекарственного средства на основе *Cetraria islandica*, соответствующего современным требованиям ГФ РК и нормативов ЕАЭС.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Во время проведения экспериментальной части диссертационного исследования были использованы материалы и методы, соответствующие требованиям ГФ РК, Фармакопеи ЕАЭС, ГОСТов и нормативных документов, действующих на территории РК, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia и других нормативных документов.

### 2.1 Материалы исследования

Объекты исследования:

- высушенные слоевища цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach) собранные в Карагандинской области, Каркаралинском заповеднике, вблизи озеро Шайтанколь 230 км от города Караганды.

Растение идентифицировано в РГП на праве ПХВ «Институт ботаники и фитоиндустрии» Комитета лесного хозяйства и животного мира Министерства экологии и природных ресурсов РК, а также профессором Брюс Маккьюн кафедры ботаники и патологий растений Орегонского государственного университета (США). Образец *Cetraria islandica* (L.) Ach. внесен в Ботанический репозиторий Университета Миссисипи NCNPR #24269; внесен в Гербариум Орегонского университета под кодом OSC-M-050921;

- экстракт *Cetraria islandica* густой - представляет собой вязкую массу тёмно-коричневого цвета с характерным слабовыраженным запахом, напоминающим запах сухого лишайника. Вкус экстракта - горьковато-вяжущий, с длительным послевкусием. Консистенция однородная, без видимых включений, с умеренной тягучестью;

- спрей «Narcet-SK».

Вспомогательные вещества:

Вода, очищенная Р (H<sub>2</sub>O), (ГФ РК I, т. 2 с. 168). Прозрачная бесцветная жидкость без запаха и вкуса.

Этанол 96 % Р (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), (ГФ РК т.2, с. 581). Бесцветная летучая жидкость с характерным запахом.

Гексан Р (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), (ГФ РК т.1, разд. 4.1.1, с. 348) Бесцветная легко воспламеняющаяся жидкость.

Натрия гидроксид (NaOH), (ГФ РК т.2, с. 358) Белое кристаллическое вещество или гранулы, гигроскопичное, легко растворимо в воде.

Метанол Р (CH<sub>3</sub>OH) (Ph. Eur., USP) бесцветная летучая жидкость.

Дихлорметан Р (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DCM) (класс 2 по Ph. Eur.) Бесцветная летучая жидкость с характерным запахом. ( ).

Этилацетат Р (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, EtOAc) (Ph. Eur.) Прозрачная жидкость с фруктовым запахом.

Ацетонитрил (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), (Ph. Eur.), Бесцветная, слабо пахнущая жидкость, активно используется в ВЭЖХ как подвижная фаза.

Муравьиная кислота (НСООН), (Ph. Eur.), Бесцветная жидкость с резким запахом, используется для подкисления среды, буферных систем и экстракции.

Глутаральдегид (ОНС-(СН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-СНО), ТУ, лабораторный реагент, водный раствор, применяется как фиксирующий агент при электронной микроскопии и в гистологии. Токсичен, требует соблюдения мер предосторожности.

Какодилат натрия (NaCH<sub>3</sub>AsO<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Буферный раствор, используется как компонент буферных растворов при морфологических исследованиях.

Ванилин (С<sub>8</sub>Н<sub>8</sub>О<sub>3</sub>), реактив лабораторный, Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок с запахом ванили. Используется в качестве хромогенного реагента в аналитической химии.

Толуидиновый синий (С<sub>15</sub>Н<sub>15</sub>СlN<sub>4</sub>S), гистологический краситель применяется для окрашивания клеточных компонентов в микроскопии, обладает метахроматическими свойствами.

Хлороформ-d (CDCl<sub>3</sub>), Cambridge Isotope, дейтерированный хлороформ для ЯМР-спектроскопии, высокочистый растворитель без примесей воды и протонных соединений.

Метанол-d<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD), Cambridge Isotope, дейтерированный метанол, широко используется в ЯМР-аналитике как растворитель.

Пиридин-d<sub>5</sub> (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), Cambridge Isotope, дейтерированный пиридин, используется как растворитель в ЯМР-спектроскопии и для изучения кислотно-основных равновесий.

ДМСО-d<sub>6</sub> ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), Cambridge Isotope, дейтерированный диметилсульфоксид, один из наиболее популярных растворителей для ЯМР-спектроскопии. свойствами.

Декспантенол (Dextranthenol) (USP), Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость, без запаха. Легко растворим в воде и этаноле. Гигроскопичен.

Экстракт алоэ вера (Aloe vera extract) (Ph. Eur.), Вязкий гель светло-зелёного цвета, с характерным травяным запахом. Растворим в воде. Содержит полисахариды и органические кислоты.

Гиалуронат натрия (Sodium hyaluronate) (Ph. Eur.) Белый или слегка кремовый гигроскопичный порошок без запаха. Образует вязкие растворы. Легко растворим в воде, нерастворим в этаноле и ацетоне.

Глицерин (Glycerolum) (ГФ РК, Ph. Eur.) Прозрачная, бесцветная вязкая жидкость со сладковатым вкусом, без запаха. Легко смешивается с водой и этанолом. Гигроскопичен.

Сорбитол (Sorbitolum) (Ph. Eur.) Белый кристаллический порошок или прозрачный сироп без запаха. Хорошо растворим в воде.

Натрия ПЦА (Sodium PCA) (Ph. Eur.) Белый кристаллический или аморфный порошок, без запаха, гигроскопичен. Растворим в воде. Природный увлажняющий фактор, удерживает влагу в кожных покровах.

Полисорбат 80 (Polysorbatum 80) (Ph. Eur.) Желтовато-коричневая вязкая жидкость со слабым запахом. Легко растворим в воде и спиртах. Неионогенное поверхностно-активное вещество, используется как эмульгатор.

Карбоксиметилцеллюлоза натрия (Carboxymethylcellulosum natricum)

(Ph. Eur.) Белый или сероватый гигроскопичный порошок, без запаха. Медленно растворим в воде с образованием коллоидного раствора. Не растворим в спиртах.

Феноксизтанол (Phenoxyethanolum) (Ph. Eur.) Бесцветная, маслянистая жидкость с лёгким ароматическим запахом. Смешивается с этанолом, слабо растворим в воде.

Этилгексилглицерин (Ethylhexylglycerinum) (Ph. Eur.) Маслянистая бесцветная жидкость без запаха. Совместим с водой и спиртами. Повышает эффективность консервантов, обладает кожно-протекторными свойствами.

Бензалкония хлорид (Benzalkonii chloridum) (Ph. Eur.) Белый или желтоватый порошок или вязкая жидкость, без запаха. Растворим в воде.

Цитрат натрия (Natrii citras) (Ph. Eur.) Белый кристаллический порошок без запаха. Хорошо растворим в воде, практически нерастворим в спирте. Используется в качестве буфера и стабилизатора pH.

Лимонная кислота (Acidum citricum monohydricum) (ГФ РК, Ph. Eur.)

Белый кристаллический порошок без запаха с кислым вкусом. Растворим в воде. Регулятор кислотности, буфер.

Яблочная кислота (Acidum malicum) (Ph. Eur.) Белый кристаллический порошок со слабым запахом. Хорошо растворима в воде. Регулятор pH, антиоксидант.

Натрия хлорид (Natrii chloridum) (ГФ РК, Ph. Eur.) Белый кристаллический порошок без запаха и вкуса. Хорошо растворим в воде. Применяется для осмотической корректировки и обеспечения изотоничности.

Эфирное масло мяты перечной (Menthae piperitae aetheroleum)

(Ph. Eur.) Светло-жёлтая прозрачная маслянистая жидкость с характерным ментоловым запахом. Не смешивается с водой.

Штаммы микроорганизмов

Грамположительные бактерии: *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* ATCC® 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC® ВАА-39 (устойчивый к множественным антибиотикам, MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 51625 (устойчивый к метициллину), *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228 (устойчивый к ванкомицину, VRSA), *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® ВАА-660 (мультирезистентный), *Enterococcus hirae* ATCC® 10541, *Enterococcus faecalis* ATCC® 51575 (устойчив к гентамицину, стрептомицину и ванкомицину), *Enterococcus faecium* ATCC® 700221 (устойчив к ванкомицину и тейкопланину), *Bacillus cereus* ATCC® 11778;

Грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* ATCC® 8739, *Escherichia coli* ATCC® 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Mycobacterium intracellulare*;

Дрожжеподобные и плесневые грибы: *Candida albicans* ATCC® 10231, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*.

Протозойные паразиты: *Plasmodium falciparum* (штаммы D6 – чувствительный к хлорохину, и W2 – устойчивый к хлорохину)

## 2.2 Методы исследования

Физико-химические и микроскопические методы анализа. Световой и сканирующей электронной микроскопии применяли для проведения микроскопического исследования лекарственного растительного сырья. Изучение анатомо-диагностических признаков осуществлялось посредством приготовления микроскопических срезов таллома и аском, которые размещали на предметных стёклах, обрабатывали соответствующими реагентами и исследовали под микроскопом. Применение данного метода обеспечило визуализацию микроструктурных элементов и позволило провести сравнительный анализ с нормативными показателями, приведёнными в фармакопейных источниках.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили в соответствии с положениями The United States Pharmacopeia (USP), 2013. NF 31, Volume 1, разделов General Chapters, General Tests and Assays, General Requirements for Tests and Assay, общая монография 621 CHROMATOGRAPHY – Thin-Layer Chromatography. Хроматографирование осуществляли на предварительно покрытых пластинках из силикагеля G с флуоресцентным индикатором UV<sub>(254)</sub> (Sor bent Technologies, США; размер 20 × 20 см, толщина слоя 200 мкм). Для визуализации зон использовали УФ-лампу Spectroline ENF-240C (Spectronics Corporation, Нью-Йорк, США) при длинах волн 254 и/или 365 нм. Обнаружение пятен проводили путём опрыскивания пластинок 2% раствором ванилина (Токуо Chemical Industry Co., Япония) в смеси серной кислоты и этанола с последующим нагреванием до 110 °С.

Жидкостную хроматографию с диодно-матричным детектором и квадрупольно-временным анализом пролёта ионов (*LC-DAD-QtoF*) проводили в соответствии с положениями The United States Pharmacopeia (USP), 2013. NF 31, Volume 1, разделов General Chapters, General Tests and Assays, General Requirements for Tests and Assay, общая монография 736 Mass Spectrometry – Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Метод использовали для идентификации и характеристики химического состава растительного экстракта. Анализ осуществляли на высокоэффективной жидкостной хроматографической системе, сопряжённой с диодно-матричным детектором (DAD) и масс-спектрометром с квадрупольно-временным анализатором ионов (QtoF), что обеспечивало высокую чувствительность и точность идентификации широкого спектра вторичных метаболитов. Разделение компонентов проводили на аналитической колонке C18 при градиентном элюировании с использованием смеси воды с 0,1% муравьиной кислоты (элюент А) и ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты (элюент В). Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3–0,5 мл/мин. Регистрацию УФ-поглощения осуществляли в диапазоне 200–400 нм, что позволяло обнаруживать хромофорные группы, характерные для фенольных соединений, флавоноидов и лишайниковых кислот.

Аппаратурное оформление для жидкостной хроматографии с диодным матричным детектором и масс-спектрометрией с квадрупольно-временным анализом ионов (*LC-DAD-QtoF*). Анализ экстрактов методом жидкостной

хроматографии с диодным матричным детектором и масс-спектрометрией с квадрупольно-временным анализом ионов (LC-DAD-QtoF) проводили на хроматографической системе Agilent 1290 Series с применением аналитической колонки Acquity UPLC™ HSS C18 (100 2,1 мм, размер частиц 1,8 мкм). Разделение компонентов осуществляли в градиентном режиме с использованием смеси воды с 0,1 % муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислоты (фаза В) при скорости потока 0,2 мл/мин. Программа градиентного элюирования включала плавное изменение соотношения фаз от 95:5 до 85:15 в течение первых 3 минут, далее содержание органической фазы увеличивали до 85 % за 17 минут, и в завершение доводили до 100% в течение следующих 3 минут. По окончании каждого анализа проводили промывку колонны 100 % органической фазой в течение 3 минут и уравнивание системы в течение 5 минут при начальных условиях. Объем вводимого образца составлял 2 мкл, а температура колонки поддерживалась на уровне 40 °С.

Масс-спектрометрическое детектирование выполняли на приборе QtoF-MS-MS (модель G6545B, Agilent Technologies, США), оснащённом источником электроспрейной ионизации с применением технологии Jet Stream. Работа ионизационного источника и ионно-оптической системы осуществлялась при оптимизированных параметрах, обеспечивающих высокую чувствительность и разрешающую способность. Анализ проводили в положительном режиме ионизации в диапазоне  $m/z$  от 100 до 1100 с расширенным пролётом ионов с массой до  $m/z$  1700 при частоте регистрации 2 ГГц. Для обеспечения точности измерений массы и идентификации компонентов использовали коррекцию по внутренним ионам стандартов: протонированному пурина ( $m/z$  121,0509) и гексакис(1Н,1Н,3Н-тетрафторпропокси) фосфазину (HP-921,  $m/z$  922,0098). Режим регистрации масс-спектров был установлен на all-ion MS/MS с двумя последовательными экспериментами – без энергии соударения (0 эВ) и с фиксированной энергией соударения 45 эВ, что обеспечивало формирование достоверных фрагментационных паттернов. Управление процессом анализа, сбор и первичная обработка данных осуществлялись с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Acquisition Software (версия A.10.1), а интерпретация и визуализация спектров – с использованием MassHunter Qualitative Analysis Software (версия B.10.00). Идентификацию соединений проводили путём сопоставления полученных масс-спектров с данными справочных баз NIST Mass Spectral Library и METLIN, включающих экспериментальные и теоретические спектры природных и биологически активных соединений, а также с привлечением структурной информации из открытых химических баз данных PubChem и ChemSpider.

Ядерно-магнитный резонансный (ЯМР) анализ проводили в соответствии с положениями The United States Pharmacopeia (USP), 2013. NF 31, Volume 1, разделов General Chapters, General Tests and Assays, General Requirements for Tests and Assay. ЯМР-спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали с использованием спектрометра Bruker Avance с рабочей частотой 400 МГц. В качестве растворителей применяли дейтерированные соединения: хлороформ- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ),

метанол-d<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD), диметилсульфоксид-d<sub>6</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>) и пиридин-d<sub>5</sub> (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), приобретённые у Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (США). Дополнительно проводили высокоточное масс-спектрометрическое исследование с электроспрейной ионизацией (HR-ESI-MS) на приборе Bruker BioApex-FTMS. Вспомогательные растворители (n-гексан, дихлорметан, этилацетат, метанол, этанол) были закуплены у Fisher Scientific (США). Колоночную хроматографию выполняли с использованием силикагеля 60 (Merck, Германия; размер частиц 63–200 мкм) и сефадекса LH-20 (Sorbent Technologies, США; размер частиц 0,25–0,1 мм).

Жирнокислотный состав в исследуемом материале оценивалось методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Суммарное содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Для выделения липофильных соединений проводили экстракцию гексаном с последующим метилированием полученной фракции. Образцы анализировали с применением газового хроматографа «Селмихром-1», оснащённого пламенно-ионизационным детектором. Хроматографическая колонка представляла собой стальную трубку длиной 2,5 м и диаметром 4 мм, заполненную неподвижной фазой – иннертоном-N-AW-DMCS, модифицированным 10 % диэтиленгликоль-сукцинатом (DEGS). Условия работы прибора включали следующие параметры: температура колоночного термостата – 180 °С, температура испарителя – 230 °С, детектора – 220 °С. Азот высокой степени чистоты (х.ч., Sigma-Aldrich, США) использовался в качестве газа-носителя со скоростью потока 30 см<sup>3</sup>/мин. Объём вводимой пробы составлял 2 мкл раствора метиловых эфиров жирных кислот в гексане. Идентификацию компонентов проводили путём сравнения времени удерживания пиков с аналогичными параметрами стандартных образцов. Количественный состав рассчитывали методом внутренней нормализации. В качестве эталонных веществ использовались стандарты насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот производства Sigma-Aldrich. Метилловые эфиры получали по модифицированной методике Пейскера, обеспечивающей полный переход жирных кислот в метильные производные. Для метилирования применяли смесь хлороформа, метанола и концентрированной серной кислоты в соотношении 100:100:1 (все реагенты – х.ч., Sigma-Aldrich, США). В стеклянные ампулы вносили по 30–50 мкл липофильного экстракта и добавляли 2,5 мл метилирующей смеси, после чего ампулы запаивали и выдерживали в термостате при температуре 105 °С в течение 3 часов. По окончании реакции ампулы вскрывали, содержимое переносили в центрифужные пробирки, добавляли небольшое количество порошкообразного сульфата цинка и по 2 мл дистиллированной воды и гексана. После энергичного встряхивания и последующего расслоения гексановый слой фильтровали и использовали для хроматографического анализа.

Идентификация органических компонентов проведена с использованием метода газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Объём вводимой пробы составлял 0,5 мкл, температура инжектора была установлена на уровне 280 °С, с делением потока 10:1. Разделение компонентов осуществлялось на капиллярной

колонке DB-17MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм) при постоянной скорости подачи газа-носителя гелия – 1 мл/мин. Хроматографический анализ проводился при следующем температурном режиме: начальная температура – 50 °С, с градиентом нагрева 5 °С/мин до конечной температуры 300 °С, которую удерживали в течение 15 минут. Общая продолжительность анализа составила 70 минут. Детектирование производилось в режиме SCAN в диапазоне m/z 34–800. Для управления аналитическим процессом, регистрации хроматограмм и спектров, а также последующей обработки данных мы использовали программное обеспечение Agilent MSD ChemStation, версия 1701EA. Обработка результатов включала определение времён удерживания, расчёт площадей хроматографических пиков и интерпретацию масс-спектров. Расшифровка спектральных данных осуществлялась с использованием библиотек Wiley 7th edition и NIST'02, содержащих более 550 000 эталонных спектров.

#### Подготовка образцов

Подготовка образцов для световой микроскопии. Для микроскопических исследований использовали срезы, полученные как при помощи микротомы, так и вручную, из свежего и высушенного растительного материала. Поперечные срезы таллома, выполненные на микротоме, подвергали окрашиванию толуидиновым синим для проведения гистологических наблюдений. Ручные срезы использовались для анализа автофлуоресценции.

Микрофотографии получали с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX53, оснащённого камерой DP74 и программным обеспечением CellSens Standard version (Olympus Corp., Токио, Япония). Внешнюю морфологию образцов фотографировали с помощью микроскопа Nikon SMZ-U, оснащённого камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nikon Elements BR (Nikon Inc.).

Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии (SEM) и рентгеновской микроаналитики методом энергодисперсионной спектроскопии (EDS)

Образцы предварительно регидратировали в водной среде при температуре 60 °С в сушильном шкафу, после чего фиксировали в растворе 2,5% глутаральдегида в течение двух суток. Далее образцы промывали в буфере какодилата натрия и последовательно дегидратировали в водно-этанолной серии с концентрацией этанола 30 %, 50 %, 70 %, 90 % и 100 %. Высушивание проводили в критической точке с использованием прибора Leica CPD300 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия), заправленного жидким диоксидом углерода.

Подготовленные образцы закрепляли на алюминиевых держателях с помощью двустороннего углеродного клеящего скотча и покрывали платиной в установке Desk V TSC (Denton Vacuum, Морстаун, Нью-Джерси, США), работающей на аргоновой атмосфере. Полученные препараты исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа с автоэмиссией JSM-7200F (JEOL Ltd., Токио, Япония). Элементный анализ и картирование минеральных

компонентов проводили методом EDS с использованием детектора компании Oxford Instruments (Оксфорд, Великобритания), установленного на SEM.

#### Экстракция и выделение соединений

Высушенное сырьё лишайника (570 г) измельчили до 3–4 мм блендером компании Waring® Laboratory Science модель LBC15(США). Подвергли мацерации 70 % этанолом трижды при комнатной температуре. Объединённые экстракты упаривали под пониженным давлением на роторном испарителе Buchi Rotavapor R-2000, с нагревательной баней Buchi Heating bath B-490 до получения сухого остатка (27,41 г). Этанольный экстракт (18,73 г) фракционировали методом вакуумной жидкостной хроматографии (VLC) на силикагеле. Последовательное элюирование проводили с использованием следующих растворителей: дихлорметан (DCM), смеси DCM–метанол (5 % и 10 %), а затем системой растворителей EtOAc–DCM–MeOH–H<sub>2</sub>O в соотношениях 15:8:4:1, 10:6:4:1 и 6:4:4:1. В завершение колонку промывали метанолом. В результате было получено 29 фракций. Данные фракции подвергались дополнительной очистке методом колоночной хроматографии на сефадексе LH-20 с использованием метанола, а затем на силикагеле с применением градиента растворителей гексан–этилацетат (20 %, 25 %, 30 % и 35 %), далее – дихлорметан и смесь DCM–метанол (5 %). Фракции собирались с помощью коллектора фракций Spectrum Labs Fraction Collector CF-2. В результате выделены индивидуальные соединения (№1–9).

#### Подготовка образцов для анализа методом LC-DAD-QtoF

Для последующего анализа методом жидкостной хроматографии с диодным матричным детектором и масс-спектрометрией с квадрупольно-временным анализатором ионов (LC-DAD-QtoF) образцы экстрактов предварительно готовили в соответствии с требованиями к аналитической чистоте. Навески сухих экстрактов растворяли в растворителях степени чистоты HPLC (High-Performance Liquid Chromatography grade): метаноле, этаноле, 50 % этаноле (водно-спиртовая смесь 1:1) и ацетоне до получения концентрации 10 мг/мл. Растворы тщательно перемешивали на вортексе до полного растворения компонентов. Далее растворы фильтровали через неорганические мембранные фильтры (поры 0,22 мкм) для удаления взвешенных частиц и предотвращения загрязнения хроматографической системы. Отфильтрованные образцы переносили во флаконы для автосамплера (LC-vials) и плотно укупоривали крышками с тефлоновыми прокладками. Образцы хранились при температуре +4 °С и анализировались в течение 24 часов с момента приготовления для минимизации возможных изменений в составе. Такая подготовка обеспечивала стабильность исследуемых соединений, воспроизводимость сигнала и предотвращала засорение инжекционного модуля и колонки при проведении LC-DAD-QtoF анализа.

#### Контроль качества растительного сырья

Посторонние примеси определяли согласно требованиям общей фармакопейной статьи 2.8.2 ГФ РК I, т. 1. Согласно установленным нормативам, лекарственное растительное сырьё не должно содержать признаков поражения

плесневыми грибами. Присутствующие включения классифицируются как допустимые или недопустимые в зависимости от их природы и количества, что регламентируется нормативной документацией.

Анализ содержания тяжёлых металлов в образце проводили методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с общей статьи 2.4.27 ГФ РК, том 1, 1-е издание. Метод основан на измерении степени поглощения атомами исследуемого элемента электромагнитного излучения определённой длины волны, что обеспечивает высокую чувствительность и селективность при определении содержания токсичных примесей в лекарственном растительном сырье.

Определение содержания влаги в лекарственном растительном материале проводилась в соответствии со следующей методикой. Пробу растительного сырья предварительно дробили до частиц приблизительно 10 мм в диаметре, после чего тщательно перемешивали и отбирали навеску массой 1 грамм с допустимым отклонением  $\pm 0,01$  г. Навеску помещали в бюкс, прошедший предварительное высушивание и взвешивание, затем подвергали термической обработке при температуре 100–105 °С до стабилизации массы. Расчёт влагосодержания (X, %) проводился по формуле:

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m} \quad (1)$$

где,  $m$  – масса сырья до высушивания, в граммах;  $m_1$  – масса сырья после высушивания, в граммах.

Для определения золы общей примерно 2 г предварительно измельчённого растительного материала (точная навеска) переносили в фарфоровый тигель, заранее прокалённый до постоянной массы и взвешенный на аналитических весах. Образец равномерно распределяли по дну тигля, после чего начинали постепенный нагрев, обеспечивая медленное выгорание органических компонентов при минимально возможной температуре. В случае образования углистого остатка его охлаждали, смачивали насыщенным раствором нитрата аммония, упаривали на водяной бане и продолжали прокаливанию. Основной этап прокаливанию выполняли при температуре около 500 °С (режим слабого каления) до достижения постоянной массы, при этом контролировали процесс, чтобы избежать плавления золы и её стекания по стенкам тигля. После завершения прокаливанию тигель остужали в эксикаторе и снова взвешивали. Расчёт массовой доли общей золы (X, %) осуществляли по формуле:

$$X = \frac{(m - m_1)}{m_2} \quad (2)$$

где,  $m$  – масса тигля с сырьем после прокаливанию, в граммах;  $m_1$  – масса навески сырья, в граммах.

Определение коэффициента набухания проводили в соответствии с требованиями Общей фармакопейной статьи ЕАЭС 2.1.8.4 «Коэффициент

набухания». Под коэффициентом набухания понимают объём жидкости, выраженный в миллилитрах, который занимает 1,0 г исследуемого лекарственного растительного сырья (включая прилипшую слизистую массу) после выдерживания в водной среде на протяжении четырёх часов.

Оценка микробиологической чистоты проводилась в соответствии с требованиями общей статьи 5.1.4 ГФ РК, том 1, 2-е издание. Исследуемое сырьё отнесено к Категории 4, для которой установлены предельно допустимые уровни микробной контаминации. Контроль микробиологических показателей осуществлялся методами, регламентированными общими монографиями 2.6.12 и 2.6.13 ГФ РК, т. 1, 2-е издание.

Определение содержания радионуклидов проводили в соответствии с требованиями ГФ РК, т. 3, 1-е изд., с применением методики, изложенной в общей фармакопейной статье 2.2.66 «Detection and measurement of radioactivity» Европейской фармакопеи (EP 8.0, том 1).

Качественный и количественный анализ биологически активных веществ

С целью изучения качественного состава биологически активных веществ *Cetraria islandica* (L.) Ach. проводили предварительную экстракцию и фракционное разделение компонентов, содержащихся в исследуемом растительном материале. Воздушно-сухое, предварительно измельчённое сырьё подвергали последовательной мацерации с бензолом и хлороформом при комнатной температуре в течение 48 часов для удаления липофильных фракций. После удаления экстрагентов осуществляли извлечение полифенольных соединений тройным настаиванием с 70 % раствором этанола. Первый этап проводился методом мацерации на протяжении 24 часов, за которым следовала термическая экстракция при температуре 60–65 °С с использованием обратного холодильника. Полученный водно-спиртовой экстракт упаривали, а сухой остаток растворяли в небольшом объёме воды. С целью предварительной фракционированной очистки полифенольных веществ экстракт обрабатывали органическими растворителями различной полярности диэтиловым эфиром и этилацетатом. Это позволило частично разделить соединения в зависимости от их растворимости. Для установления качественного состава БАВ применяли бумажную хроматографию в сочетании со специфическими реакциями, направленными на выявление основных классов природных соединений.

Микрохимическую идентификацию лишайниковых метаболитов методом точечных реакций (Spot Test) проводили с целью предварительного выявления характерных вторичных соединений в образцах *Cetraria islandica*. Образцы подвергали действию стандартных реагентов: раствора гипохлорита натрия (С-тест), гидроксида калия (К-тест) и раствора йода (I-тест), которые наносили непосредственно на поверхность таллома. Изменения окраски регистрировали визуально в соответствии с методикой, описанной в справочнике Orange по микрохимической идентификации лишайников. Для уточнения локализации метаболитов точечные реакции проводили с использованием ручной лупы (×10) и бинокулярного микроскопа. В случае исследования медуллы предварительно удаляли участок коры острым режущим инструментом. При работе с мелкими

фрагментами слоевища каплю реактива наносили на предметное стекло и погружали в неё образец с помощью анатомического пинцета.

Количественное определение биологически активных веществ

Определение суммы экстрактивных веществ. Навеску исследуемого растительного сырья массой 1 г, предварительно измельчённого и просеянного через сито с размером ячеек 1 мм, помещали в коническую колбу. К навеске добавляли 50 мл экстрагента (30 %, 50 %, 70 % и 90 %). Колбу плотно закрывали пробкой и оставляли при комнатной температуре на 1 час. После этого колбу соединяли с обратным холодильником, доводили до кипения и продолжали экстракцию при слабом кипении в течение 2 часов.

По окончании экстракции содержимое охлаждали до комнатной температуры, снова закрывали прежней пробкой и компенсировали потерю объёма растворителя до исходного уровня тем же этанолом. Смесь тщательно перемешивали и фильтровали через сухой бумажный фильтр в сухую мерную колбу вместимостью 150–200 мл.

Для количественного определения 25 мл полученного фильтрата переносили в предварительно высушенную до постоянной массы фарфоровую чашку диаметром 7–9 см, которую затем взвешивали на аналитических весах. Выпаривание проводили на водяной бане до сухого остатка, далее сушили в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 3 часов. По окончании сушки чашку охлаждали в эксикаторе и немедленно взвешивали.

Массовая доля экстрактивных веществ в пересчёте на абсолютно сухое сырьё (X, %) рассчитывалась по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 200 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)} \quad (3)$$

где, m – масса сухого остатка, г; m<sub>1</sub> – масса навески, г; W – влажность сырья, %.

*Полисахариды* определяли спектрофотметрическим методом: взвешивали 1,00 г (точная навеска) измельчённого лекарственного растительного сырья и помещали в круглодонную колбу объёмом 100 мл со шлифом. Добавляли 50 мл очищенной воды. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр в плоскодонную мерную колбу объёмом 50 мл, доводя объём фильтрата очищенной водой до метки.

Из полученного раствора пипеткой отбирали 10 мл и переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объём до метки очищенной водой (раствор А). Из раствора А отбирали 1 мл, помещали в центрифужную пробирку, добавляли 2 мл 95 %-ного этанола, тщательно перемешивали и нагревали на водяной бане в течение 5 минут. Через 1 час пробирку центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут.

Осадок промывали 5 мл 50 %-ного этанола, затем количественно переносили в мерную колбу объёмом 100 мл с добавлением 10 мл очищенной воды, нагретой на водяной бане. Объём доводили до метки очищенной водой

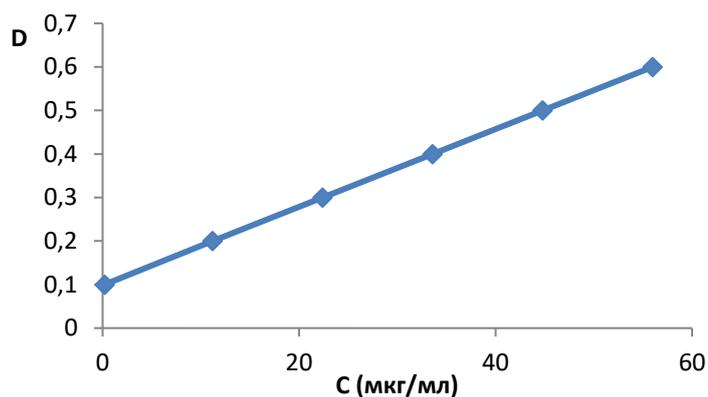
(раствор Б). К 1 мл раствора Б добавляли 0,25 мл 5 %-ного раствора фенола и 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь выдерживали в водяной бане при температуре 10–15 °С в течение 5 минут, периодически встряхивая. Далее пробирки помещали на кипящую водяную баню на 15 минут и охлаждали при температуре 10–15 °С.

Оптическую плотность окрашенного раствора определяли на спектрофотометре при длине волны 490 нм в кювете толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь, содержащую 0,25 мл очищенной воды, 0,25 мл 5 %-ного раствора фенола и 2,5 мл концентрированной серной кислоты, выдержанную в тех же условиях, что и анализируемая проба.

Содержание полисахаридов (в %) рассчитывали в пересчёте на глюкозу, используя данные калибровочного графика зависимости оптической плотности от концентрации глюкозы (мкг/мл), по формуле:

$$X = \frac{C_0 * 125000 * 100}{m * 10 * 10^6 * (100 - W)} \quad (4)$$

где  $C_0$  – концентрация глюкозы по калибровочному графику;  $m$  – масса навески сырья, в граммах;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья, в %.



Полифенольные соединения определяли в растительном сырье спектрофотометрическим методом с выражением результата в пересчете на кофейную кислоту (3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеную кислоту). Сырьё предварительно измельчали до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм. Навеску массой 2,00 г помещали в коническую колбу объёмом 200 мл, добавляли 70 мл дистиллированной воды и соединяли колбу с обратным холодильником. Экстракцию проводили на кипящей водяной бане в течение 15 минут, после чего процесс повторяли аналогичным образом. Охлаждённые извлечения фильтровали через бумажный фильтр и количественно переносили в мерную колбу на 200 мл, доводя объём дистиллированной водой до метки. Для спектрофотометрического анализа 1 мл экстракта отбирали в мерную колбу объёмом 50 мл и разбавляли 20 % раствором этилового спирта до метки. Измерение оптической плотности раствора проводили при длине волны 325 нм – максимуме поглощения для кофейной кислоты. В качестве холостого

раствора использовали 20 % этиловый спирт. Содержание суммы полифенольные соединения (X, %) в пересчёте на кофейную кислоту определяли по соответствующей расчетной формуле.

$$X = \frac{D * 200 * 50 * 100}{782 * V_2 * m * (100 - W)} \quad (5)$$

где, D – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 325 нм; V<sub>1</sub> – объем испытуемого раствора, в мл; V<sub>2</sub> – объем аликвоты испытуемого раствора, в мл; m – масса навески сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах; 782 – удельный показатель поглощения раствора СО при длине волны 325 нм для кислоты кофейной.

Сумму лишайниковых кислот в пересчете на усниновую кислоту определяли методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой области. Навеску измельченного сырья (около 10 г, точная масса) помещают в круглодонную колбу объемом 250 мл, добавляют 100 мл 96% этанола (возможна замена на хлороформ, ацетон или этилацетат) и проводят экстракцию на водяной бане при кипении в течение 2 часов. После охлаждения экстракт фильтруют в коническую колбу, прибавляют 30 мл 10% раствора карбоната кальция, затем – 10% раствор соляной кислоты до полного прекращения помутнения. Полученную смесь разделяют в делительной воронке: водный слой подкисляют дополнительным объемом 10% раствора соляной кислоты до выпадения осадка. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают очищенной водой, затем высушивают. Сухой остаток растворяют в ацетоне, хлороформе или этилацетате. Полученный раствор фильтруют через колонку, содержащую слой силикагеля марки Л 51/40 М (высотой 2–3 см), и промывают тем же растворителем. Элюат упаривают до получения сухого остатка, который доводят до постоянной массы. Затем сухой остаток растворяют в одном из используемых экстрагентов, переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят объем до метки и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 290 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Массовую долю лишайниковых кислот (X, %), пересчитанную на усниновую кислоту в абсолютно сухом веществе, определяют по формуле:

$$X = \frac{D * 50 * 100 * 100}{P * m * (100 - W)} \quad (6)$$

где, D – оптическая плотность раствора при 290 нм; m – навеска сырья, г; W – потери в массе при высушивании, %, P = 85,7 – удельный коэффициент поглощения усниновой кислоты при 290 нм.

Содержание гидролизуемых дубильных веществ определяли методом перманганатометрии. Для этого точно отвешенную навеску растительного сырья помещали в коническую колбу объемом 100 мл, добавляли 50 мл горячей очищенной воды и подвергали экстракции на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Полученное водное извлечение сливали (декантировали), к остаткам

сырья вновь добавляли 50 мл горячей воды и повторяли процедуру экстракции аналогичным образом. Объединённые вытяжки фильтровали в мерную колбу на 100 мл и доводили объём до метки очищенной водой. Для проведения анализа 10 мл экстракта переносили в коническую колбу объёмом 500 мл, добавляли 100 мл очищенной воды и 10 мл раствора индигосульфокислоты. Смесь титровали при постоянном перемешивании 0.02 М раствором перманганата калия до появления стойкой золотисто-жёлтой окраски. Одновременно проводили контрольное титрование 10 мл раствора индигосульфокислоты в 100 мл воды. Один миллилитр 0.02 М раствора перманганата калия соответствует 0.004157 г гидролизующих дубильных веществ в пересчёте на танин.

Массовую долю дубильных веществ (X, %), выраженную в процентах относительно абсолютно сухого сырья, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) * K * D * V * 100}{V_3 * m * (100 - W)} \quad (7)$$

где:  $V_1$  – объём 0.02 М раствора перманганата калия, израсходованный на титрование экстракта, мл;  $V_2$  – объём раствора, израсходованный в контрольном опыте, мл;  $V_3$  – объём экстракта, взятый для анализа, мл;  $V$  – общий объём экстракта, мл;  $m$  – масса навески, г;  $W$  – влажность сырья, %.

Приготовление раствора калия перманганата. Навеску массой 3,3 г калия перманганата растворяли в небольшом объёме дистиллированной воды в колбе вместимостью 1000 мл, после чего доводили объём раствора до метки водой. Полученный раствор кипятили в течение 10 минут, затем плотно закрывали пробкой и выдерживали в тёмном месте на протяжении двух суток для стабилизации.

Приготовление раствора индигосульфокислоты. 1 г индигокармина растворяли в 25 мл концентрированной серной кислоты, после чего объём раствора осторожно доводили очищенной водой до 1 литра при постоянном перемешивании.

Сумму иридоидов в слоевище *Cetraria islandica* (L.) Ach. количественно определили с использованием спектрофотометрического метода на основе образования окрашенного комплекса. Измельчили образец сырья до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 0,5 мм. Затем навеску массой около 0,5 г (точная масса фиксировалась для каждого анализа) поместили в коническую колбу объёмом 200 мл и добавили 40 мл смеси хлороформа и 95% этанола в соотношении 5:1. Колбу плотно закрывали и выдерживали на вибрационном аппарате в течение 45 минут. Полученный экстракт отделяли от шрота методом декантации, после чего фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объёмом 100 мл, избегая попадания частиц сырья. К остаткам шрота добавляли ещё 40 мл той же экстрагирующей смеси, повторно встряхивали в течение 30 минут и фильтровали во вторую порцию экстракта. Совокупный объём доводили до метки указанной смесью растворителей. Из полученного извлечения отбирали 20 мл, переносили в круглодонную колбу на 100 мл, добавляли 10 мл воды и упаривали при температуре 40–50 °С под

вакуумом до водного остатка. Водную фазу фильтровали через фильтр, предварительно смоченный водой, в мерную колбу на 10 мл. При необходимости раствор доводили до метки и перемешивали (данный раствор обозначали как раствор А). Далее 5 мл раствора А переносили в мерную колбу объёмом 25 мл, прибавляли 5 мл щелочного раствора гидроксилamina и выдерживали смесь в течение 20 минут. После этого вводили 10 мл 1 М раствора хлороводородной кислоты и 5 мл 1% раствора хлорида железа (III) в 0,1 М HCl, тщательно перемешивали (данный раствор обозначали как раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 512 нм в кювете толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения использовали состав, аналогичный раствору Б, но с заменой гидроксилamina равным объёмом воды. Расчёт содержания суммы иридоидов (X, %) в пересчете на гарпагид и абсолютно сухое сырьё проводили по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 56 \cdot 20 \cdot 5 \cdot (100 - W)}{25000 \cdot m \cdot 10 \cdot 25} \quad (8)$$

где, D – оптическая плотность анализируемого раствора; 764.6 – удельный коэффициент поглощения окрашенного комплекса гарпагида при 512 нм; m – масса навески сырья, г; W – потери в массе при высушивании, %.

Суммарное количество каротиноидов в растительном сырьё определяли спектрофотометрическим методом. Навеску измельчённого сырья массой 5 г помещали в коническую колбу с притёртой пробкой объёмом 100 мл, добавляли 50 мл смеси гексан–этанол (1:1 по объёму) и выдерживали в течение 2 часов при непрерывном перемешивании. После завершения экстракции раствор фильтровали. Из полученного фильтрата отбирали 15 мл и переносили в мерную колбу объёмом 25 мл, доводя объём до метки той же смесью растворителей (гексан–этанол, 1:1). Оптическую плотность исследуемого раствора измеряли при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контрольного раствора применяли смесь гексан–этанол (1:1). Дополнительно определяли оптическую плотность стандартного раствора бихромата калия (СУ), используемого в качестве фотометрического эталона. Содержание каротиноидов (X, %) в пересчете на  $\beta$ -каротин рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot 0,00208 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 15 \cdot (100 - W)} \quad (9)$$

где, D<sub>1</sub> – оптическая плотность исследуемого раствора при 450 нм; D<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора бихромата калия при той же длине волны; 0,00208 – коэффициент, соответствующий количеству  $\beta$ -каротина (в мг), аналогичному интенсивности окраски раствора бихромата калия; m – масса навески сырья, г; W – процентная потеря массы при высушивании сырья.

Приготовление стандартного раствора бихромата калия (СО). Точную навеску 0,0036 г бихромата калия, растворяли в небольшом количестве очищенной воды

в мерной колбе объёмом 1000 мл, затем доводили объём до метки той же водой и тщательно перемешивали до получения однородного раствора.

Изучение безопасности и профиля фармакологической активности. Методы неклинического исследования. В рамках неклинических исследований на базе Научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атшабарова проводилась оценка острой и субострой токсичности, а также алергизирующего действия экстракта *Cetraria islandica*. Экспериментальные процедуры, включая отбор лабораторных животных и их распределение по группам, осуществлялись в соответствии с методическими рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией А.Н.

Исследования выполнялись на беспородных белых мышах и морских свинках. Все животные были получены из вивария Казахского национального медицинского университета имени С.Д. Асфендиярова и предварительно проходили двухнедельный карантин. Содержание животных осуществлялось в специализированных клетках при стандартных контролируемых условиях вивария, с соблюдением режима естественного освещения и установленного рациона питания. Распределение по экспериментальным группам проводилось с учётом массы тела и пола животных. Маркировка осуществлялась с использованием цветowych меток.

Все манипуляции проводились в соответствии с протоколом исследования, одобренным Локальным этическим комитетом КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, а также в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для иных научных целей.

Гистологический анализ внутренних органов. В ходе нашего исследования мы провели гистологическое изучение внутренних органов белых мышей, которым вводили исследуемое вещество в дозах 500, 2000 и 5000 мг/кг при моделировании как острой, так и хронической токсичности. Дополнительно была сформирована контрольная группа животных. После изъятия мы фиксировали органы (лёгкие, печень, почки, желудок, тонкий и толстый кишечник, поджелудочную железу, селезёнку и сердце) в 10%-ном забуференном формалине на протяжении 48 часов. Далее мы проводили стандартную гистологическую обработку: обезвоживание и пропитывание тканей парафином в тканевом процессоре, заливку образцов в кассеты и формирование парафиновых блоков. Из этих блоков мы изготавливали срезы толщиной 1,5 мкм при помощи микротомы. Полученные срезы мы наносили на предметные стекла, депарафинизировали в растворе ксилола и окрашивали гематоксилином и эозином. Завершив окрашивание, мы заключали препараты в покровную среду и проводили микроскопическое исследование с использованием бинокулярного микроскопа Leica DM500.

Оценка антимикробной активности экстракта *Cetraria islandica* (L.) Ach. проводили методом серийных двухкратных разведений в питательной среде согласно требованиям ГФ РК, т.1, 2-е изд., 2.6.12 и 2.6.13. Для тестирования

использовали 48-луночные культуральные планшеты и бульоны Мюллера-Хинтона и Сабуро (HiMedia, Индия) для бактерий и грибов соответственно. В качестве растворителя применяли очищенную воду.

Антибактериальную активность определяли в отношении следующих штаммов, полученных из ATCC (USA):

– грамположительные бактерии: *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™, *Bacillus cereus* ATCC® 11778;

– грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* ATCC® 8739, *Escherichia coli* ATCC® 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027;

– дрожжеподобные грибы: *Candida albicans* ATCC® 10231.

Растворы экстракта готовили в концентрациях 500 и 250 мг/мл. Инокулюмы готовили до плотности 0,5 ед. по МакФарланду, что соответствует  $\sim 1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл для бактерий и  $\sim 1-5 \times 10^6$  КОЕ/мл для *Candida albicans*. Рабочие растворы получали разведением стоковых инокуляторов до  $\sim 1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл и  $\sim 1-5 \times 10^3$  КОЕ/мл соответственно.

После 30 и 60 минут инкубации при температуре  $(37 \pm 1)$  °С, производили высев на агар Мюллера-Хинтона и агар Сабуро. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), а также минимальную бактерицидную (МБК) и фунгицидную концентрацию (МФК) определяли визуально по отсутствию роста на чашках Петри.

### 3 КОМПЛЕКСНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛОЕВИЩ *CETRARIA ISLANDICA* (L.) ACH.

#### 3.1 Разработка технологии сбора и заготовки *Cetraria islandica* (L.) Ach. в соответствии с требованиями GACP

Заготовка дикорастущих лекарственных растений осуществлялась с соблюдением принципов устойчивого природопользования и рекомендаций надлежащей практики сбора (GACP). В рамках данного исследования были учтены все требования, направленные на рациональное использование биологических ресурсов и сохранение естественных популяций. Нормативно-правовое обеспечение этой деятельности определено Законом РК «О растительном мире» от 2 января 2023 года № 183-VII ЗРК, положения которого были полностью соблюдены в ходе заготовки растительного сырья.

Образцы *Cetraria islandica* (L.) Ach. были собраны 12–14 июля 2020 года на территории Каркаралинского государственного национального природного заповедника (Карагандинская область), в районе озера Шайтанколь, на удалении 230 км от города Караганды, географические координаты: 49°25' с. Ш., 75°25' в. Д. (рисунок 1). Таксономическая идентификация образца была проведена специалистами РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК, что подтверждено справкой №01–05/252 от 3 июля 2020 года.



а



б

Рисунок 1 – Ареал произрастания (а) и внешний вид таллома *C. islandica* (б)

Перед началом сбора производилась визуальная оценка популяции в пределах естественного ареала *Cetraria islandica*, характеризующегося стабильными экологическими условиями, высокой плотностью и здоровым состоянием слоевищ, включая наличие молодых экземпляров, что свидетельствует об устойчивости популяции и возможности проведения частичного сбора без ущерба для природного сообщества [99]. Результаты данной оценки представлены в таблице 4, где отражены основные характеристики учетного участка, включая процент покрытия, плотность и

физиологическое состояние слоевищ, а также рекомендации по допустимому уровню заготовки.

Таблица 4 – Оценка состояния популяции *Cetraria islandica* на участке заготовки

| Размер учетной площади, м <sup>2</sup> | Процент покрытия <i>C. islandica</i> , % | Плотность слоевищ, шт/м <sup>2</sup> | Состояние слоевищ | Наличие молодых слоевищ | Вывод о состоянии популяции | Рекомендации по сбору |
|--|--|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1×1                                    | 45 %                                     | 22                                   | здоровые          | да                      | Устойчивая                  | допустим сбор до 50 % |

Сбор *C. islandica* осуществлялся методом выборочной заготовки с применением ручного труда, при котором слоевища аккуратно отделялись ножом без повреждения субстрата и прикрепляющих гиф. Такой способ обеспечивал сохранность естественных местообитаний и способствовал регенерации природных популяций. Согласно литературным данным, срок восстановления популяций *C. islandica* в условиях *in situ* составляет не менее трех лет. В связи с этим при заготовке сохранялось не менее 50 % жизнеспособных талломов на месте произрастания, что соответствовало требованиям действующего законодательства и нормативных стандартов.

После заготовки сырье тщательно очищалось от посторонних включений (песок, почва, растительные остатки), затем подвергалось сушке в хорошо проветриваемых помещениях до воздушно-сухого состояния. Сушка осуществлялась тонким, равномерно распределённым слоем на стеллажах из натуральных материалов с периодическим ворошением (переворачиванием) сырья для обеспечения равномерного испарения влаги и предотвращения процессов самосогревания.

Высушенное сырье упаковывали в бумажные мешки из крафт-материала согласно требованиям ГОСТ 2226–2013. Каждая партия маркировалась с указанием наименования сырья, даты и места сбора, номера серии и массы нетто в соответствии с требованиями, установленными Приказом МЗ РК от 27 января 2021 года № ҚР ДСМ–11 «Об утверждении правил маркировки и прослеживаемости лекарственных средств и маркировки медицинских изделий».

Условия хранения соответствовали нормативам ГОСТ 13727–68 и требованиям Приказа МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-19 «Об утверждении правил хранения и транспортировки лекарственных средств и медицинских изделий». Системный подход к организации сбора и заготовки растительного сырья реализован в виде технологической схемы, представленной на рисунке 2.

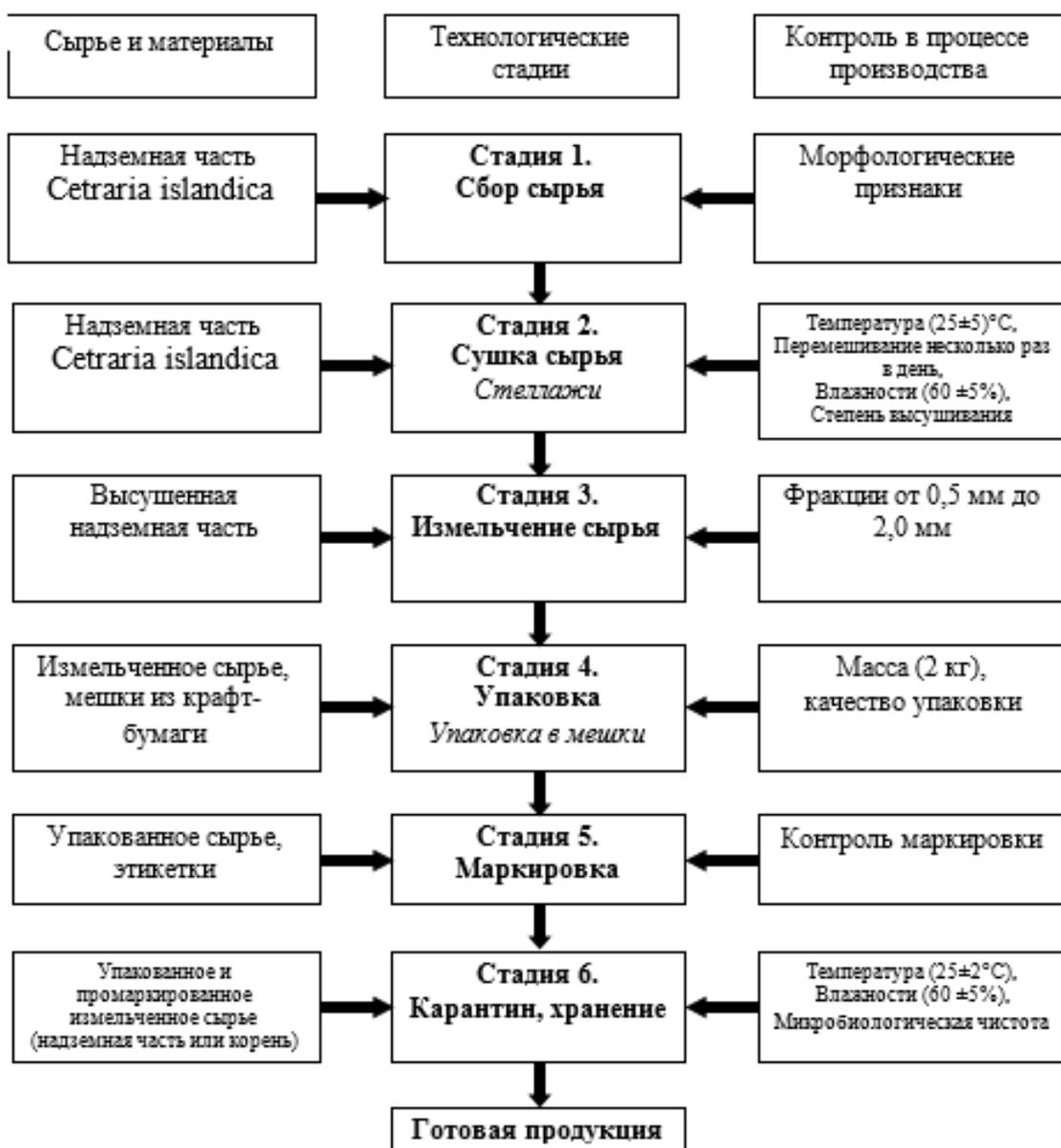


Рисунок 2 – Технологическая схема заготовки и сушки слоевищ *Cetraria islandica*

Представленная схема отражает последовательные этапы устойчивой заготовки, обеспечивающие сохранность биоценоза, фармакогностическую пригодность сырья и соответствие современным требованиям надлежащей практики сбора (GACP).

### 3.2 Морфолого-анатомическое изучение сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach.

#### 3.2.1 Морфологические особенности

*Cetraria islandica* относится к кустистым лишайникам среднего размера и характеризуется гетеромерным листоватым слоевищем, достигающим высоты 12–15 см. Слоевище имеет прямостоячую, рыхлую и неоднородную структуру, прикрепляется к субстрату посредством коротких нитевидных гиф,

формирующих нижний корковый слой (рисунок 3 а). Таллом гладкий или слабо бороздчатый, содержит характерные ломкие перетяжки на лопастях и дихотомическое ветвление. Лопасты узкие у основания, закручены в верхней части, их ширина составляет от 0,5 до 2 см, а диаметр – от 1 до 1,5 мм. Во влажном состоянии таллом мягкий и кожистый на ощупь. Верхняя поверхность обладает тёмно-зелёной окраской с блеском, нижняя – от бледно-белой до серебристой. С возрастом окраска изменяется: верхняя поверхность приобретает зеленовато-коричневый оттенок, а нижняя становится светло-серой (рисунок 3 b, 3 c). Поверхность таллома отличается складчатостью, волнистостью и наличием ямок. У основания ветвей локализуются пикниды тёмно-коричневого цвета с характерными реснитчатыми краями (рисунок 3 d).



Рисунок 3 – Морфологические особенности *Cetraria islandica*  
 а) прикрепление слоевища к субстрату; b, c) окраска верхней и нижней поверхности слоевища; d) расположение пикнид у основания ветвей

Для подтверждения наличия лишайниковых кислот в составе *C. islandica* были проведены гистохимические исследования методом точечных реакций (Spot Test). Слоевища подвергали обработке стандартными реагентами: гипохлоритом натрия (С-тест), гидроксидом калия (К-тест) и раствором Люголя (I-тест), которые наносили непосредственно на поверхность образца. В результате проведения К-теста наблюдалось устойчивое окрашивание верхней и нижней поверхности таллома в красновато-коричневый цвет, а при действии йода ткани приобретали синевато-чёрный оттенок (рисунок 4).

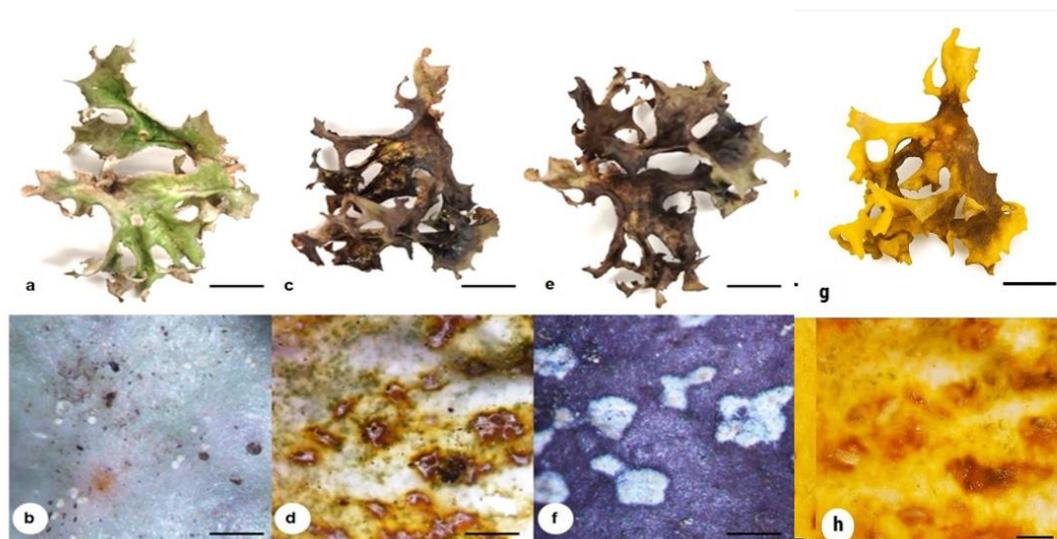


Рисунок 4 – Результаты гистохимического анализа вторичных метаболитов таллома *C. islandica*

Эти реакции свидетельствуют о наличии в слоевище фумаропротоцетраровой и протоцетраровой кислот, которые являются характерными вторичными метаболитами *C. islandica*. На рисунке 4 (a, b) зафиксировано исходное состояние слоевища до обработки. После нанесения KOH (c, d) отмечалась стойкая красновато-коричневая окраска, указывающая на присутствие фумаропротоцетрариновой кислоты. В результате I-теста (e, f) ткани окрашивались в характерный голубовато-черный цвет, что свидетельствует о наличии протоцетрариновой кислоты. К-тест (раствор гипохлорита натрия) дает более насыщенный цвет если обработать в начале 10% раствором гидроксида калия в воде – желтое окрашивание, указывает на наличие усниновой кислоты (g, h). Полученные данные подтверждают принадлежность вида к кислотной группе с содержанием депсидонов и альдегидных производных.

Таким образом, результаты макроскопического описания в сочетании с гистохимическими реакциями позволяют выделить *Cetraria islandica* как стабильный источник лишайниковых кислот, подтверждая его диагностическую ценность и перспективность для фармакогностической стандартизации.

### 3.2.2 Анатомо-диагностические признаки

Слоевище *Cetraria islandica* было детально изучено с применением световой и сканирующей электронной микроскопии, что позволило установить его анатомо-диагностические особенности. Оно характеризуется гетеромерным строением и дорсовентральной организацией. Его структура включает уплотнённые, желатинизированные гифы на обеих поверхностях, а также центральный фотобионтный слой. В верхней зоне располагается коровый слой, содержащий порообразные отверстия, через которые выходят гифы, способствующие газообмену (рисунок 5 а). Нижняя сторона неравномерна, с бороздками; в ряде участков визуализируются гифы фикобионта и мицобионта,

относящиеся как к гонидиальному, так и к корковому слоям (рисунок 5 b). В нижней части слоевища гифы проникают сквозь гидрофильную кору и формируют скопления псевдоцифелл – участков, обеспечивающих воздухообмен (рисунок 5 c). Аскомы не обнаружены.

По периферии слоевища заметны лопасти с зубчатыми краями, где расположены пикнидии – структуры бесполого размножения. В поперечном срезе эпикора представлена тонким слоем (0,5–1,5 мкм), покрытым бактериальной биоплёнкой (рисунок 5 d). Верхняя кора толщиной 30,05–50,6 мкм состоит из компактно упорядоченных коровых клеток с гифами гриба (рисунок 5 d-e). Медулла шириной 70–100 мкм образована рыхло расположенными гифами мицобионта, ориентированными горизонтально, что обеспечивает наличие межклеточных воздушных пространств для фикобионта.

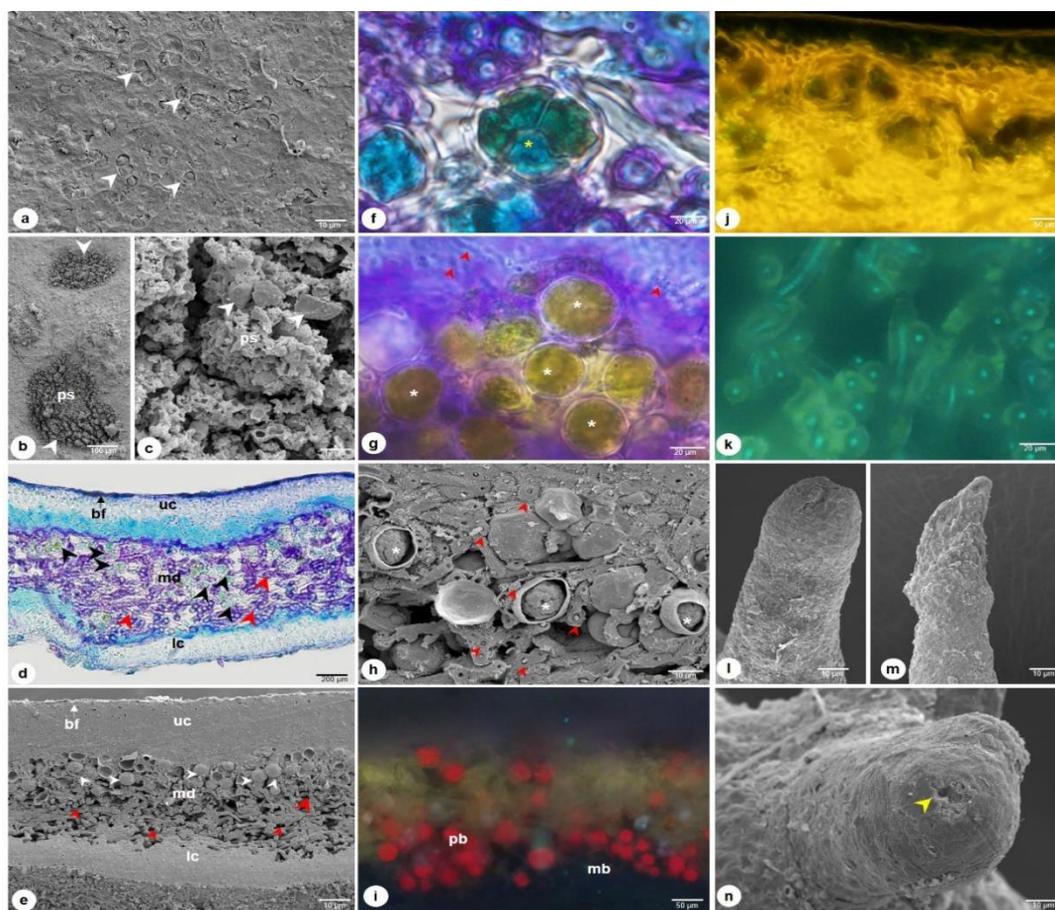


Рисунок 5 – Слоевище *Cetraria islandica*, исследованное с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии

Условные обозначения: bf – биоплёнка, lc – нижняя кора, mb – мицобионт, md – медулла, pb – фикобионт, ps – псевдоцифелла, uc – верхняя кора.

Масштабные линейки: 10 мкм – изображения a, c, e, l–n; 20 мкм – изображения f, g; 50 мкм – изображения i, j; 100 мкм – изображение b; 200 мкм – изображение d.

Фотобионт представлен зелёными водорослями диаметром 3,25–12,5 мкм, формирующими двуслойную зону, локализованную непосредственно под верхней корой. В нижней части медуллы они практически отсутствуют (рисунок

5 e). В зоне фикобионта наблюдаются признаки бинарного деления водорослевых клеток (рисунок 5 f). Внутриклеточная структура хлоропластов различима в микрофотографиях (рисунок 5 g-h), что указывает на их активную метаболическую функцию.

Гифы мицобионта толщиной 1,5–2 мкм, одноклеточные, утолщённые, образуют гидратированную сеть, создающую благоприятную водную и питательную среду для фотобионта. В непокрашенных срезах фиксируется автофлуоресценция клеток фикобионта при длине волны возбуждения 340–390 нм, что связано с наличием хлорофилла, тогда как гифы мицобионта светятся при 400–450 нм вследствие содержания хитина в клеточной стенке (рисунок 5 i-j). При флуоресцентной микроскопии чётко различимы окончания гиф с окрашенной в жёлтый цвет наружной стенкой и голубовато-зелёной цитоплазмой (рисунок 5 k).

Пикнидии выступают на поверхности лопастей, а их устья отчётливо видны при сканирующей электронной микроскопии (рисунок 5 l-n). Нижняя кора имеет толщину 25,05–33,05 мкм и состоит из плотно организованных гиф мицелия.

Таким образом, анатомио-микроскопическое исследование слоевища *Cetraria islandica* позволило выявить ряд стабильных диагностических признаков, характерных для вида: гетеромерное дорсовентральное строение, выраженная дифференцировка на верхнюю кору, фотобионтный и медуллярный слои, наличие псевдоцифелл на нижней поверхности, пикнидий на краях лопастей, а также автофлуоресценция клеток фико- и мицобионта. Совокупность анатомических признаков подтверждает таксономическую принадлежность вида и может быть использована для его идентификации.

Изучение морфологических и анатомио-диагностических признаков *Cetraria islandica* с применением комплекса микроскопических и гистохимических методов позволило установить совокупность достоверных характеристик, соответствующих требованиям Государственной фармакопеи для идентификации лекарственного растительного сырья. Проведённые исследования подтвердили принадлежность исследуемого образца к виду *Cetraria islandica* (L.) Ach., что обосновывает его использование в качестве стандартизованного источника биологически активных веществ в производстве лекарственных средств.

### **3.3 Фитохимическое профилирование и качественно-количественная характеристика биологически активных веществ *Cetraria islandica* (L.) Ach.**

Фитохимическое исследование *Cetraria islandica* (L.) Ach. направлено на установление спектра биологически активных соединений, входящих в состав данного лекарственного растительного сырья. Известно, что лишайники, в том числе представители рода *Cetraria*, синтезируют широкий комплекс вторичных метаболитов, обладающих фармакологической активностью: полисахариды, фенольные соединения, лишайниковые кислоты, дубильные вещества и полиолы. Комплексный подход к анализу химического состава позволяет не

только идентифицировать ведущие группы БАВ, но и обосновать перспективность данного сырья, химический профиль которого соответствует требованиям действующей Государственной фармакопеи, где *Cetraria islandica* уже стандартизована как лекарственное растительное средство.

Качественный анализ. Для предварительной идентификации основных групп БАВ в составе *Cetraria islandica* были проведены реакции на полисахариды, фенольные соединения, дубильные вещества, лишайниковые кислоты (в том числе усниновую и фумарпротоцеттаровую), свободные сахара, а также аминокислоты и полиолы. Использование спирта и уксусной кислоты выявило осадкообразование, характерное для полисахаридов, в первую очередь лишенина и изолишенина. В реакциях с сульфатом железа наблюдалось изменение окраски на сине-зеленую, что указывает на наличие фенолокислот. Для выявления наличия лишайниковых кислот проводили точечные пробы (spot tests), применяемые для идентификации типичных метаболитов лишайников. В рамках анализа осуществляли С-тест (с раствором гипохлорита), К-тест (с раствором гидроксида калия) и I-тест (с раствором Люголя), направленные на качественное определение вторичных метаболитов, характерных для исследуемого сырья. Результаты качественного анализа представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Качественный анализ сырья *Cetraria islandica*

| Качественная реакция  | Результат реакции                              |
|---|--|
| Полисахариды (реакция с этанолом <i>P</i> )   | Образование белого осадка                      |
| Полифенольные соединения (реакция с $AlCl_3$ )  | Жёлтое окрашивание                             |
| <b>Лишайниковые кислоты (Spot Test):</b>  |  |
| Реакция с гипохлоритом натрия (С-тест) для усниновой кислоты;                                       | Желтое окрашивание;                            |
| Реакция с гидроксидом калия (К-тест) для фумарпротоцеттаровой кислоты;                              | Красновато-коричневая окраска;                 |
| Реакция с раствором Люголя (I-тест) для протоцеттаровой кислоты.                                    | Голубовато-черный цвет.                        |
| Дубильные вещества (с железоаммониевыми квасцами)   | Синее окрашивание                              |
| Иридоиды (реакция с 3,6 % раствором гидроксиламина и 1 % $FeCl_3$ ).                                | От розовато-фиолетового до темно-красного.     |
| Каротиноиды (реакция Либермана–Бурхарда, с треххлористой сурьмой ( $SbCl_3$ ) в хлороформной среде) | Интенсивную синяя или сине-фиолетовая окраска. |

Количественный анализ. Количественное определение проведено для следующих групп БАВ: полисахариды (спектрофотометрией,  $\lambda=490$  нм), полифенольные соединения (спектрофотометрией,  $\lambda=325$  нм), лишайниковые кислоты (спектрофотометрией,  $\lambda=280-290$  нм), дубильные вещества (перманганатометрически), иридоиды (спектрофотометрией,  $\lambda=500-512$  нм) и каротиноиды (спектрофотометрией,  $\lambda=430-450$  нм). Результаты количественного анализа обобщены в таблице 6.

Таблица 6 – Количественное определение основных групп соединений сырья *Cetraria islandica*

| Класс БАВ                | Содержание, % |
|--------------------------|---------------|
| Полисахариды             | 56,7± 0,17    |
| Полифенольные соединения | 2,79± 0,14    |
| Лишайниковые кислоты     | 2,98 ± 0,04   |
| Дубильные вещества       | 2,36± 0,27    |
| Иридоиды                 | 1,73±0,08     |
| Каротиноиды              | 0,09 %±0,11   |

Результаты фитохимического профилирования *Cetraria islandica* (L.) Ach. подтвердили наличие широкого спектра биологически активных соединений, включая не только атенол и кофейную кислоту, по содержанию которых сырье стандартизовано в ГФ РК I, т. 3 монографии на лекарственное растительное сырье, но и специфичные для данного вида лишайников маркерные соединения – фумарпротоцеттаровую и усниновую кислоты. Полученные данные подчёркивают высокую фармацевтическую значимость данного вида сырья и обосновывают целесообразность расширения параметров стандартизации за счёт включения дополнительных метаболитов. Такой подход позволит повысить точность и воспроизводимость контроля качества, а также обеспечить более полную характеристику его фармакологического потенциала.

### **3.4 Анализ макро- и микроэлементного состава *Cetraria islandica* (L.) Ach. методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS)**

Одним из важных аспектов изучения лекарственного растительного сырья, в том числе лишайников, является определение элементного состава, поскольку макро- и микроэлементы могут существенно влиять на фармакологические свойства, безопасность и качество получаемых препаратов. В настоящем исследовании для оценки неорганических компонентов и пространственного распределения элементов в слоевище *Cetraria islandica* (L.) Ach. был применён метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS) в сочетании со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ). Анализ проводился как на верхней, так и на нижней поверхности слоевища. Результаты микроструктурного и элементного анализа представлены на рисунке 6.

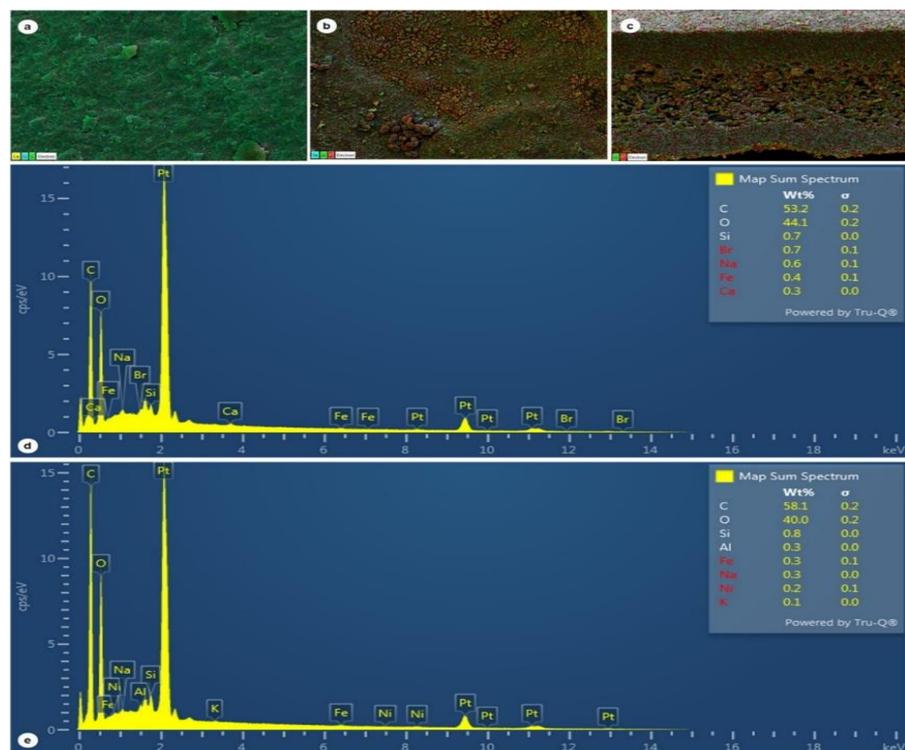


Рисунок 6 – ЭДС-спектр и элементное картирование  
 a, d – верхней поверхности, b, e – нижней поверхности, c – поперечного сечения

Результаты элементного картирования показали, что на верхней поверхности обнаружены кальций (Ca), кремнезем (Si), бром (Br), натрий (Na) и железо (Fe), локализованные преимущественно в виде равномерно распределённых наночастиц (рисунок 6 а, б d). Нижняя поверхность, в свою очередь, продемонстрировала присутствие кремнезема (Si), железа (Fe), натрия (Na), никеля (Ni), калия (K) и кальция (Ca) (рисунок 6 b, б с, бe). Примечательно, что несмотря на широкое распространение кальциевых отложений в виде кристаллов на поверхности гиф у многих лишайников, в образцах *C. islandica* такие морфологические структуры обнаружены не были, что, вероятно, обусловлено видовой спецификой или экологическими условиями местообитания.

Особый интерес вызывает обнаружение железа и натрия на обеих поверхностях слоевища. Наличие железа может быть связано как с геохимическим фоном региона сбора, так и с потенциальной способностью лишайника к накоплению металлов из окружающей среды. Подобные данные подтверждаются исследованиями Airaksinen et al. [100], в которых анализ образцов *C. islandica*, собранных на территории Финляндии, показал наличие таких токсичных элементов, как свинец (Pb), кадмий (Cd), ртуть (Hg), мышьяк (As), а также макроэлементов – кальция (Ca), магния (Mg) и железа (Fe). Это подчёркивает важность системного контроля элементного состава для оценки экологической безопасности лекарственного сырья

Кроме того, работы Giordani et al. [101] свидетельствуют о географической вариабельности аккумуляции микроэлементов в лишайниках. В частности, в

образцах *C. islandica*, собранных в Исландии, были зафиксированы максимальные концентрации кобальта (Co) и фосфора (P) и низкие уровни таких токсичных элементов, как мышьяк, кадмий и свинец, по сравнению с другими регионами. Это указывает на высокую чувствительность лишайников к экологическим условиям и их роль в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды тяжёлыми металлами.

Таким образом, данные энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии свидетельствуют о присутствии в слоевище *Cetraria islandica* (L.) Ach. преимущественно макро- и микроэлементов, относящихся к жизненно важным – таких как кальций, железо, калий, натрий и кремний. Токсичные элементы, включая свинец, кадмий, ртуть и мышьяк, в проанализированных образцах обнаружены не были, что подтверждает их экологическую чистоту и потенциальную фармацевтическую безопасность. Полученные результаты подчёркивают стабильность минерального состава исследуемого сырья и указывают на важность экологической характеристики ареала произрастания как одного из факторов, определяющих качество лекарственного растительного сырья.

### **3.5 Анализ летучих и липофильных соединений *Cetraria islandica* (L.) Ach. методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (GC-MS)**

Изучение липофильной и летучей составляющей *Cetraria islandica* (L.) Ach. было направлено на выявление химических соединений, обладающих фармакологически значимыми свойствами, в том числе антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной и мембраностабилизирующей активностью. Особое внимание было уделено компонентам, способным взаимодействовать с биомембранами, модулировать клеточные сигнальные пути и оказывать влияние на физиологические процессы. Наибольшую ценность в этом контексте представляют жирные кислоты, их эфиры, фитостеролы и терпеноиды, обладающие высокой биодоступностью и функциональной активностью.

С целью установления молекулярного состава указанных фракций применялся метод газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (GC-MS), реализованный на аналитической системе Agilent 7890A/5975C. Разделение компонентов проводилось с использованием капиллярной колонки DB-17MS в условиях градиентного повышения температуры от 50 до 300 °С. Для интерпретации полученных масс-спектров использовались библиотеки Wiley 7th edition и NIST'02, что обеспечило достоверность идентификации. Подробная информация о составе и количественном содержании выявленных соединений представлена в таблице 7.

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа показали, что растительное сырьё *Cetraria islandica* (L.) Ach. обладает разнообразным химическим составом, включающим 36 соединений, относящихся к различным

Таблица 7 – Идентифицированные соединения растительного сырья *Cetraria islandica* по данным GC-MS

| №  | Время удерживания, мин | Название соединения                           | Вероятность идентификации, % | Содержание, % |
|----|------------------------|---|------------------------------|---------------|
| 1  | 2                      | 3   | 4                            | 5             |
| 1  | 11,06                  | 2-Гептеналь, (Z)-                             | 92                           | 0,71          |
| 2  | 17,55                  | Янтарная кислота, этилметилловый эфир         | 88                           | 0,30          |
| 3  | 19,43                  | Янтарная кислота, диэтиловый эфир             | 93                           | 0,25          |
| 4  | 20,18                  | 2-Деценаль, €-                                | 82                           | 0,45          |
| 5  | 21,72                  | 2,4-Декадиеналь                               | 84                           | 0,84          |
| 6  | 22,41                  | 2,4-Декадиеналь, (E, E)-                      | 93                           | 7,56          |
| 7  | 31,79                  | Диэтилфталат                                  | 91                           | 0,63          |
| 8  | 34,44                  | Метилловый эфир пальмитиновой кислоты         | 93                           | 2,75          |
| 9  | 34,86                  | Метилловый эфир 9-гексадеценной кислоты, (Z)- | 85                           | 0,24          |
| 10 | 35,28                  | Метил 4,7,10,13-гексадекатетраеноат           | 89                           | 1,00          |
| 11 | 35,61                  | Этиловый эфир пальмитиновой кислоты           | 85                           | 6,32          |
| 12 | 35,96                  | Этиловый эфир 9-гексадеценной кислоты         | 82                           | 0,35          |
| 13 | 36,37                  | Метил 4,7,10,13-гексадекатетраеноат           | 85                           | 0,95          |
| 14 | 36,58                  | Изооктиловый эфир фталевой кислоты            | 89                           | 0,27          |
| 15 | 38,15                  | Метилловый эфир олеиновой кислоты             | 90                           | 3,19          |
| 16 | 38,46                  | Метилловый эфир линолевой кислоты (Z,Z)-      | 95                           | 5,43          |
| 17 | 38,57                  | Каур-16-ен                                    | 90                           | 0,46          |
| 18 | 38,97                  | Метилловый эфир линоленовой кислоты (Z,Z,Z)-  | 94                           | 4,73          |
| 19 | 39,18                  | Этилолеат                                     | 89                           | 3,52          |
| 20 | 39,38                  | Октадекановая кислота                         | 77                           | 9,29          |
| 21 | 39,50                  | Этиловый эфир линолевой кислоты               | 91                           | 7,89          |
| 22 | 40,00                  | Этиловый эфир линоленовой кислоты (Z,Z,Z)-    | 94                           | 6,60          |
| 23 | 40,17                  | Линоленовая кислота (Z,Z,Z)-                  | 80                           | 2,03          |
| 24 | 42,46                  | Эфир пальмитиновой кислоты и глицерина        | 72                           | 0,41          |
| 25 | 45,24                  | Глицериновый эфир линолевой кислоты (Z,Z)-    | 80                           | 0,35          |
| 26 | 45,67                  | Глицериновый эфир олеиновой кислоты (Z)-      | 76                           | 1,52          |
| 27 | 45,98                  | Бутиловый эфир линолевой кислоты (цис, транс) | 80                           | 3,39          |

Продолжение таблицы 7

| 1  | 2     | 3                                      | 4  | 5     |
|----|-------|--|----|-------|
| 28 | 46,88 | Эфир линолевой кислоты и фенолдиоксана | 66 | 0,37  |
| 29 | 47,09 | Палустровая кислота                    | 74 | 0,35  |
| 30 | 49,36 | Сквален                                | 90 | 1,43  |
| 31 | 50,91 | Тетратетракозан                        | 73 | 0,39  |
| 32 | 54,42 | Ацетат $\beta$ -ситостерола            | 65 | 0,23  |
| 33 | 55,26 | Витамин Е (токоферол)                  | 94 | 8,87  |
| 34 | 57,59 | Кампестерин                            | 63 | 1,11  |
| 35 | 57,98 | Стигмастерин                           | 76 | 1,71  |
| 36 | 58,91 | $\gamma$ -Ситостерол                   | 89 | 14,13 |

классам органических веществ. В структуре липофильной фракции преобладают производные жирных кислот, стеролы, терпеноиды, альдегиды и соединения с витаминоподобной активностью. Наибольший вклад в суммарное содержание внесли  $\gamma$ -ситостерол (14,13 %), витамин Е (8,87 %), октадекановая кислота (9,29 %), а также эфиры линолевой и линоленовой кислот. Идентификация проводилась с высокой степенью достоверности (63–95 %), что позволяет уверенно характеризовать экстракт как источник биологически активных липофильных соединений [102].

Проведённое исследование подтвердило высокую химическую сложность и биофармацевтический потенциал растительного сырья *Cetraria islandica*, обусловленный присутствием структурно разнородных липофильных компонентов с потенциальной антиоксидантной, противовоспалительной и мембраностабилизирующей активностью. Обнаруженные соединения представляют интерес для дальнейшего фармакологического тестирования и создания новых фитопрепаратов.

### 3.6 Анализ жирнокислотного состава *Cetraria islandica* (L.) Ach.

С целью углублённого химического анализа и комплексной оценки биологического потенциала *Cetraria islandica* (L.) Ach. было проведено отдельное исследование жирнокислотного состава непосредственно в исходном лишайниковом сырье. Такой подход позволил расширить представление о составе липофильной фракции, ранее охарактеризованной в экстрактах, и получить более полные данные о метаболической специфике данного вида.

Определение профиля жирных кислот является важным аспектом при изучении физиолого-биохимических свойств растительного сырья. Особое значение имеют насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, обладающие выраженной биологической активностью, включая антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства. Полученные результаты имеют практическую ценность для стандартизации, оценки качества и дальнейшего фармакологического применения сырья. Кроме того, анализ жирнокислотного профиля в нативной матрице позволяет выявить влияние экологических условий

на химический состав лишайников и определить перспективные районы заготовки с точки зрения накопления целевых метаболитов.

Идентификацию жирных кислот проводили по времени удерживания, используя стандарты метиловых эфиров (производства Sigma-Aldrich). Количественная оценка содержания отдельных соединений осуществлялась методом внутренней нормализации.

В результате анализа в образце *Cetraria islandica* (L.) Ach. было идентифицировано десять жирных кислот, из которых пять относятся к ненасыщенным. Хроматограмма, отражающая жирнокислотный профиль, приведена на рисунке 7.

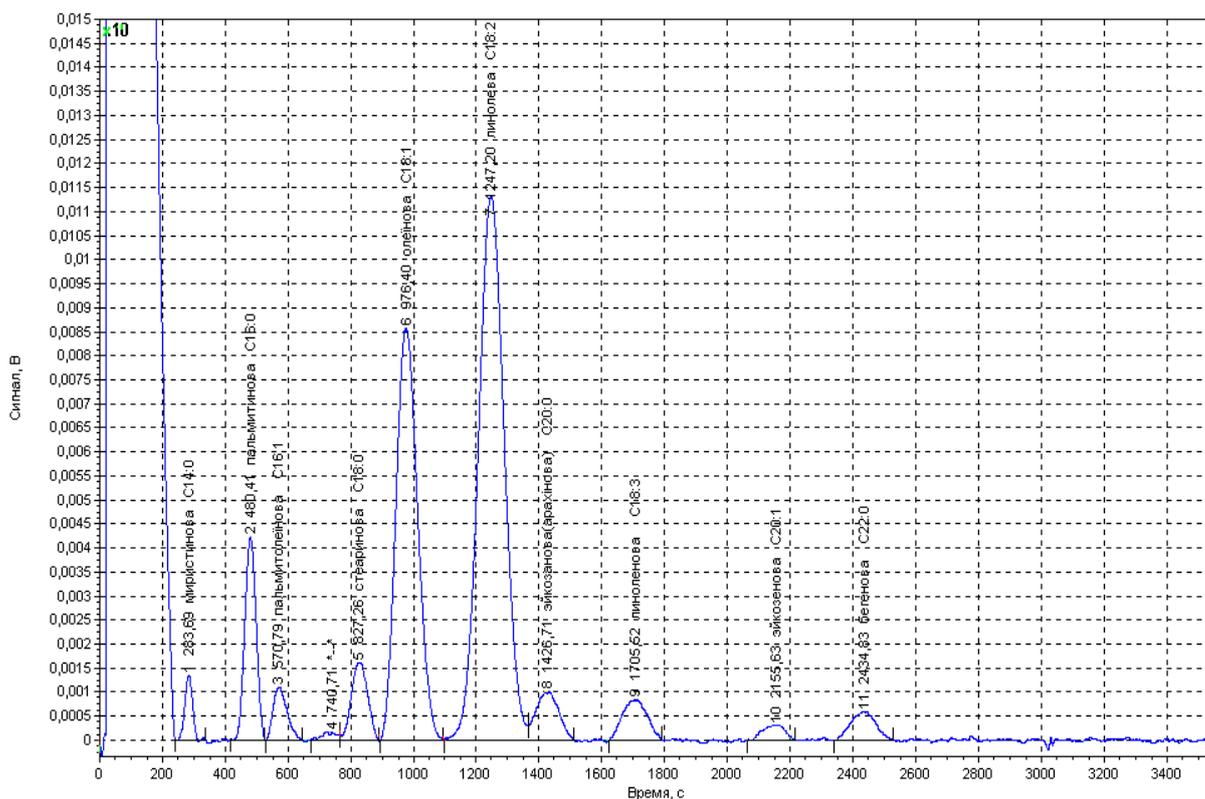


Рисунок 7 - Газовая хроматограмма жирных кислот *Cetraria islandica*

Количественные характеристики жирнокислотного состава, полученные на основе хроматографического анализа, приведены в таблице 8.

Проведённое исследование позволило охарактеризовать жирнокислотный состав *Cetraria islandica* (L.) Ach., выявив преобладание биологически активных ненасыщенных кислот, в частности линолевой (44,33 %) и олеиновой (28,64 %), а также присутствие линоленовой, пальмитиновой, стеариновой и других жирных кислот. Установленный профиль подтверждает наличие в лишайниковом сырье комплекса соединений, обладающих потенциалом антиоксидантного, противовоспалительного и мембраностабилизирующего действия.

Таблица 8 – Количественное содержание жирных кислот в лишайниковом сырье *Cetraria islandica*

| №  | Наименование жирных кислот       | Число двойных связей | Содержание, % |
|----|----------------------------------|----------------------|---------------|
| 1  | Миристиновая (тетрадекановая)    | C 14:0               | 1.61          |
| 2  | Пальмитиновая (гексадекановая)   | C 16:0               | 7.60          |
| 3  | Пальмитолеиновая (гексадеценная) | C 16:1               | 2.40          |
| 4  | Стеариновая (октадекановая)      | C 18:0               | 4.20          |
| 5  | Олеиновая (октадеценная)         | C 18:1               | 28.64         |
| 6  | Линолевая (октадекадиеновая)     | C 18:2               | 44.33         |
| 7  | Линоленовая (октадекатриеновая)  | C 18:3               | 3.45          |
| 8  | Арахидиновая (эйкозеновая)       | C 20:0               | 3.70          |
| 9  | Гондоиновая (эйкозеновая)        | C 20:1               | 1.24          |
| 10 | Бегеновая (докозеновая)          | C 22:0               | 2.39          |

Полученные данные дополняют сведения о липофильных компонентах вида и позволяют глубже понять его метаболическую специфику. Кроме того, анализ жирных кислот может использоваться как вспомогательный инструмент при сравнительной оценке образцов, собранных в различных экологических условиях, с целью определения факторов, влияющих на вариабельность химического состава.

### 3.7 Анализ качества и разработка спецификации качества сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. в контексте фармакопейных требований

Согласно положениям ГФ РК, контроль качества лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. осуществляется по следующим показателям: содержание посторонних примесей, уровень свинца, потеря в массе при высушивании, содержание общей золы, коэффициент набухания, микробиологическая чистота, а также содержание радионуклидов - в соответствии с требованиями, установленными уполномоченным государственным органом. Результаты определения ряда физико-химических показателей качества исследуемого сырья представлены в таблице 9. Установлено, что значения таких параметров, как содержание посторонних примесей, потеря в массе при высушивании, общая зольность и коэффициент набухания, соответствуют требованиям, установленным нормативной документацией.

В частной фармакопейной статье «Исландский мох (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)» из показателей токсикологической безопасности регламентировано только определение содержания свинца в сырье. Однако результаты ряда научных исследований указывают на необходимость более комплексного подхода к контролю элементного состава. В частности, в исследовании Airaksinen и соавт. [100, с.407], посвящённом анализу образцов *C. islandica*, собранных на территории Финляндии, наряду со свинцом были выявлены такие токсичные элементы, как кадмий, ртуть и мышьяк. Авторы подчёркивают

высокую способность лишайников к накоплению тяжёлых металлов, что связано с особенностями их морфофизиологии, в том числе отсутствием корневой системы и способностью к поглощению элементов из атмосферных осадков.

Таблица 9 – Результаты испытаний физико-химических показателей качества

| Показатель                     | Обозначение НД на методы испытания | Требования НД  | Фактические результаты |
|--------------------------------|------------------------------------|----------------|------------------------|
| Посторонние примеси            | ГФ РК I, т. 1, 2.8.2               | не более 5 %   | 3,5 %                  |
| Потеря в массе при высушивании | ГФ РК I, т. 1, 2.8.32              | не более 12 %  | 11,3 %                 |
| Общая зола                     | ГФ РК I, т. 1, 2.4.16              | не более 3,0 % | 1.58 %                 |
| Коэффициент набухания          | ГФ РК I, т. 1, 2.8.4               | не более 4,5   | 3.7                    |

Аналогичные выводы представлены в работе Giordani и соавт. [101, с.182], где показано, что географическое происхождение образцов оказывает существенное влияние на их элементный профиль. Так, образцы, собранные в Исландии, характеризовались высоким содержанием кобальта (Co) и фосфора (P) при низких концентрациях мышьяка (As), кадмия (Cd) и свинца (Pb). Эти данные подчёркивают актуальность проведения комплексного геохимического анализа при фармакогностической стандартизации сырья.

В связи с этим в рамках настоящей работы была проведена дополнительная оценка содержания тяжёлых металлов в образцах *Cetraria islandica*. Результаты представлены в таблице 10 и свидетельствуют об отсутствии в исследуемом сырье контролируемых количеств кадмия, ртути, свинца и мышьяка, что указывает на его экологическую чистоту и соответствие современным требованиям безопасности.

Таблица 10 – Результаты испытания на тяжелые металлы

| Показатель | Обозначение НД на методы испытания | Требования НД      | Фактические результаты |
|------------|------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Кадмий     | ГФ РК I, т. 1, 2.4.27              | не более 1,0 мг/кг | Не обнаружено          |
| Свинец     | ГФ РК I, т. 1, 2.4.27              | не более 6,0 мг/кг | Не обнаружено          |
| Ртуть      | ГФ РК I, т. 1, 2.4.27              | не более 0,1 мг/кг | Не обнаружено          |
| Мышьяк     | ГФ РК I, т. 1, 2.4.27              | не более 0,5 мг/кг | Не обнаружено          |

В рамках комплексной оценки токсикологической безопасности лекарственного растительного сырья было проведено определение содержания радионуклидов в образцах *Cetraria islandica* (L.) Ach. Исследование осуществлялось в соответствии с санитарно-гигиеническими нормативами, установленными Приказом МЗ РК от 2 августа 2022 года № ҚР ДСМ-71 «Об утверждении гигиенических нормативов к обеспечению радиационной безопасности». Согласно данному нормативному документу, предельно допустимые уровни радионуклидов в лекарственных растениях (травах, коре, корневищах, плодах) составляют: для цезия-137 - не более 400 Бк/кг, для стронция-90 - не более 200 Бк/кг. По результатам проведённого анализа в

исследуемых образцах цезий-137 и стронций-90 не были выявлены, что свидетельствует об их радиационной безопасности и соответствии требованиям действующего законодательства. Результаты испытания на содержание радионуклидов представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты испытания на радионуклиды

| Показатель  | Обозначение НД на методы испытания | Требования НД      | Фактические результаты |
|-------------|------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Цезий-137   | ГФ РК I, т. 1, 2.8.2               | не более 400 Бк/кг | Не обнаружено          |
| Стронций-90 | ГФ РК I, т. 1, 2.8.32              | не более 200 Бк/кг | Не обнаружено          |

Как известно, нестерильные лекарственные средства, включая лекарственное растительное сырьё, могут подвергаться микробной контаминации [103-105]. При этом допускается наличие ограниченного количества микроорганизмов при обязательном отсутствии специфических патогенов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. В соответствии с требованиями ГФ РК I, том 1, 5.1.4 лекарственные растительные препараты и сырьё подлежат оценке микробиологической чистоты по Категории 4. Установленные предельные значения составляют: общее количество аэробных мезофильных микроорганизмов - не более  $10^7$  КОЕ/г, общее количество дрожжевых и плесневых грибов - не более  $10^5$  КОЕ/г, *Escherichia coli* - не более  $10^2$  КОЕ/г. Результаты проведённых испытаний на микробиологическую чистоту приведены в таблице 12 и демонстрируют соответствие исследуемого сырья нормативным требованиям, превышений установленных пределов не зафиксировано.

Таблица 12 – Микробиологическая чистота растительного сырья *Cetraria islandica*

| Наименование показателей                                   | Обозначение НД на методы испытания | Требования НД   | Фактические результаты |
|--|------------------------------------|-----------------|------------------------|
| Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов, КОЕ/г | ГФ РК I, т. 1, стр 176             | не более $10^7$ | $5,6 \cdot 10^4$       |
| Грибы, КОЕ/г   | ГФ РК I, т. I, стр,176             | не более $10^5$ | $6 \cdot 10^3$         |
| <i>E. coli</i> в 1,0 г                                     | ГФ РК I, т. I, стр,181             | не более $10^2$ | менее 10               |

Как указывается в частной фармакопейной статье «Исландский мох (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)», количественное определение биологически активных веществ (БАВ) в данном сырье не регламентировано, однако в качестве идентификационных маркеров рекомендуется учитывать наличие анетола и кофейной кислоты. Вместе с тем результаты литературного анализа показывают,

что химический состав *C. islandica*, помимо типичных для высших растений соединений, включает специфичные для лишайников вторичные метаболиты - так называемые лишайниковые кислоты (усниновая, фумарпротоцетраровая, протолихестериновая, лихестериновая и др.). Эти соединения придают растительному сырью характерную горечь, а также обуславливают его антисептические и тонизирующие свойства.

Наибольшую фармакологическую значимость среди них представляет натриевая соль усниновой кислоты, обладающая выраженным антибактериальным действием. Данное соединение входит в состав ряда лекарственных форм на основе цетрарии. Кроме того, лихестериновая и протолихестериновая кислоты проявляют высокую активность в отношении таких патогенов, как *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и других устойчивых к терапии микроорганизмов. Уснинат натрия эффективно применяется наружно при лечении трофических язв, инфицированных ран и ожогов. Благодаря содержанию комплекса уникальных вторичных метаболитов *Cetraria islandica* рассматривается как перспективный источник природных антимикробных агентов, обладающих действием, сопоставимым или превосходящим активность ряда синтетических антибиотиков. Наиболее выраженным эффектом при этом характеризуются именно лишайниковые кислоты, в первую очередь – усниновая [106-109].

С учётом фармакологической ценности этих соединений, в рамках настоящего исследования было проведено количественное определение суммы лишайниковых кислот в пересчёте на усниновую кислоту. Методика анализа подробно описана в разделе 2 «Материалы и методы» данной диссертационной работы. Согласно полученным результатам, содержание усниновой кислоты в сырье составило 2,98 % в пересчёте на абсолютно сухое вещество.

Таким образом, проведённые исследования обосновывают целесообразность включения дополнительных показателей в нормативную документацию на лекарственное растительное сырьё *Cetraria islandica* (L.) Ach., в частности по критериям «Содержание тяжёлых металлов» и «Количественное определение лишайниковых кислот». Внесение указанных параметров позволит усилить контроль качества сырья и обеспечить его более полную стандартизацию в соответствии с современными требованиями безопасности и эффективности.

Учитывая полученные экспериментальные данные, а также в соответствии с положениями РК и Приказом МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств», была разработана спецификация качества на ЛРС *Cetraria islandica* (L.) Ach., дополненная новыми нормативными показателями. Спецификация качества представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Спецификация качества сырья *Cetraria islandica (L.) Ach.*

| Показатели качества             | Нормы отклонений   | Методы испытаний                                 |
|---------------------------------|--|--|
| Описание                        | Цельное или измельчённое высушенное слоевище. Верхняя поверхность - зеленовато-бурая или оливковая, нижняя – светло-серая. Запах слабый, своеобразный. Вкус горький, с ощущением слизистости.  | ГФ РК, т. 3, Частная монография «Мох исландский» |
| Идентификация<br>А) Макроскопия | Слоевище достигает длины до 15 см, характеризуется нерегулярным дихотомическим ветвлением и состоит из жёстких, ломких, гладких или почти плоских долей, имеющих желобоватую форму. Ширина долей варьирует от 0,3 до 1,5 см, толщина составляет приблизительно 0,5 мм. В отдельных случаях края долей могут быть зубчатыми и покрыты мелкими волосками (пикнидиями). Верхняя сторона слоевища имеет зеленоватый либо зеленовато-коричневый оттенок, тогда как нижняя – серовато-белая или светло-коричневая, с характерными углублёнными беловатыми пятнами, известными как псевдоцифеллы. На концах разветвлённых долей апотеции дисковидной формы бурого цвета встречаются крайне редко. | ГФ РК, т. 3, Частная монография «Мох исландский» |
| В) Микроскопия                  | Сырьё предварительно измельчают до состояния порошка, соответствующего размеру частиц 355 (согласно 2.9.12). Полученный порошок имеет серовато-  | ГФ РК, т. 3, Частная монография «Мох исландский» |

Продолжение таблицы 13

| 1  | 2   | 3                              |
|--|---|--------------------------------|
|  | <p>коричневую окраску. При микроскопическом анализе в препарате, подготовленном с использованием раствора хлоралгидрата Р, выявляются характерные микроскопические признаки: многочисленные участки псевдопаренхиматозной ткани, сформированные толстыми гифами с узким просветом, принадлежащими корковому слою, а также гифами с широким просветом из прилегающего слоя, где гифы располагаются рыхло и беспорядочно. В центральной части этого слоя обнаруживаются клетки водорослей зелёного или буроватого цвета диаметром до 15 мкм. В отдельных полях зрения встречаются фрагменты краевых зон таллома с трубчатыми или цилиндрическими спермогониями, размеры которых могут достигать до 160 мкм в ширину и до 400 мкм в длину.</p> |                                |
| <p>В) Качественные реакции:<br/>- усниновая кислота (реакция с гипохлоритом натрия)<br/>- полисахариды (реакция с этанолом Р).</p>                   | <p>Желтое окрашивание<br/><br/>Белый осадок</p>   | <p>ГФ РК, т.1, 2.2.27</p>      |
| <p>Д) Тонкослойная хроматография<br/>На хроматограмме испытуемого раствора появляются окрашенные зоны характерные для:</p> <p>- кофейная кислота</p> | <p>Серовато-фиолетовые зоны</p>   | <p>ТСХ, ГФ РК, т.1, 2.2.27</p> |
| <p>Посторонние примеси</p>   | <p>не более 5 %</p>   | <p>ГФ РК I, т. 1, 2.8.2</p>    |
| <p>Потеря в массе при высушивании</p>  | <p>не более 12 %</p>  | <p>ГФ РК I, т.1, 2.2.32</p>    |
| <p>Общая зола</p>  | <p>не более 3,0 %</p>   | <p>ГФ РК I, т. 1, 2.4.16</p>   |
| <p>Коэффициент набухания</p>   | <p>не более 4,5</p>   | <p>ГФ РК I, т. 1, 2.8.4</p>    |

Продолжение таблицы 13

| 1   | 2   | 3  |
|---|---|--|
| Микробиологическая чистота  | Категория 4А ( $\leq 10^7$ бактерий, $\leq 10^5$ грибов, $\leq 10^2$ E. coli) | ГФ РК I, т.1, 2.6.12; 2.6.13.  |
| Тяжелые металлы   | В соответствии с требованиями государственного органа                         | ГФ РК I, т. 1, 2.4.27  |
| Радионуклиды  | В соответствии с требованиями государственного органа                         | Приказ МЗ РК от 2 августа 2022 года № ҚР ДСМ-71 «Об утверждении гигиенических нормативов к обеспечению радиационной безопасности». |
| Количественное определение:<br>- сумма лишайниковых кислот (в пересчете на усниновую кислоту)<br>- сумма полисахаридов (в пересчете на глюкозу)<br>- полифенольные соединения (в пересчете на кофейную кислоту) | Не менее 2,0 %<br><br>Не менее 40 %<br><br>Не менее 2,0 %                     | ГФ РК I, т. 1, 2.8.2<br>Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области                                       |
| Упаковка  | Мешки 5 кг (резаное сырье)  | Приказ МЗ РК от 27 января 2021 года № ҚР ДСМ-11  |
| Маркировка  | В соответствии с НД   | Приказ МЗ РК от 27 января 2021 года № ҚР ДСМ-11  |
| Транспортировка   | В соответствии с правилами транспортировки ЛРС                                | Приказ МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-19   |
| Хранение  | В сухом, защищённом от света месте  | ГОСТ 13727–68  |
| Срок хранения   | 2 года  | На основании испытаний на стабильность   |
| Фармакологическое действие  | Противовоспалительное, противомикробное                                       | НД   |

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что растительное сырьё *Cetraria islandica* (L.) Ach. продемонстрировало соответствие всем требованиям, установленным нормативными документами, включая показатели микробиологической чистоты, радиационной и токсикологической безопасности, а также содержательное количественное определение лишайниковых кислот. Это подтверждает высокий уровень качества сырья и обосновывает его статус как стандартизированной фармацевтической субстанции. Проведённая научная оценка не только расширяет представление о

фармакогностических характеристиках *C. islandica*, но и позволяет повысить надёжность контроля на этапе нормативной регламентации, что особенно актуально в контексте разработки и внедрения современных фитопрепаратов [110-116].

### 3.8 Оценка фармацевтико-технологических характеристик растительного сырья

Результаты проведённой оценки качества лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach., охватывающие физико-химические, микробиологические и токсикологические показатели, а также подтверждённая идентификация биологически активных соединений, позволяют обоснованно рассматривать данное сырьё как перспективный и безопасный источник фитосубстанции. На основании полученных данных, подтверждающих соответствие требованиям фармакопейных стандартов, следующим этапом исследования стала оценка его фармацевтико-технологических характеристик, направленная на оптимизацию условий извлечения целевых компонентов. В частности, изучалось влияние степени измельчённости, коэффициента поглощения и выбора экстрагента на выход экстрактивных веществ, что позволило определить наиболее рациональное соотношение сырья: экстрагент для дальнейшего применения в технологии производства фитопрепаратов. Для всесторонней характеристики сырья в рамках данного этапа дополнительно оценивались такие показатели, как удельная, объёмная и насыпная масса, пористость, порозность и коэффициент поглощения экстрагента. Перечисленные параметры являются ключевыми для понимания поведения растительного сырья в процессе экстракции и его способности взаимодействовать с экстрагентами. Результаты экспериментальных исследований приведены в таблице 14, при этом все анализы проводились в соответствии с методиками, изложенными в главе 2.

Таблица 14 – Технологические параметры *Cetraria islandica* с различным размером частиц

| Параметр                               | Фракции сырья, мм |               |               |
|--|-------------------|---------------|---------------|
|  | от 1,0 до 2,0     | от 2,0 до 3,0 | от 3,0 до 5,0 |
| Насыпная масса (дн), г/см <sup>3</sup> | 0,49 ± 0,01       | 0,42 ± 0,12   | 0,40 ± 0,01   |
| Пористость (Пс)                        | 0,58 ± 0,02       | 0,62 ± 0,15   | 0,64 ± 0,21   |
| Порозность (Пж)                        | 0,50 ± 0,11       | 0,56 ± 0,09   | 0,62 ± 0,13   |
| Сыпучесть, г/с                         | 1,49 ± 0,12       | 1,47 ± 0,03   | 1,33 ± 0,08   |
| Угол естественного откоса, °           | 30°               | 32°           | 32°           |

Таким образом, таблица демонстрирует технологические параметры исландского мха в зависимости от фракции сырья, что позволяет оценить их влияние на экстракционные процессы и эффективность получения активных веществ.

Таблица 15 - Коэффициент поглощения экстрагента и выход экстрактивных веществ из *Cetraria islandica*

| Растворитель   | Коэффициент поглощения экстрагента | Экстрактивные вещества, % |
|----------------|------------------------------------|---------------------------|
| Вода очищенная | 3.182 ± 0.069                      | 20,02                     |
| 30% этанол     | 4.246 ± 0.048                      | 20,50                     |
| 50% этанол     | 4.798 ± 0.080                      | 22,40                     |
| 70% этанол     | 3.614 ± 0.130                      | 22,42                     |
| 96% этанол     | 3.182 ± 0.069                      | 21,46                     |

Таблица 16 – Выход экстрактивных веществ с использованием различных экстрагентов

| Экстрагент  | Выход экстрактивных веществ, % |               |               |
|-------------|--------------------------------|---------------|---------------|
|             | Размер измельчения сырья, мм   |               |               |
|             | от 1,0 до 2,0                  | от 2,0 до 3,0 | от 3,0 до 5,0 |
| Вода        | 18,00 ± 1,00                   | 18,50 ± 1,00  | 20,00         |
| 40 % этанол | 18,72 ± 0,50                   | 19,00 ± 0,50  | 20,02         |
| 50 % этанол | 19,50 ± 0,50                   | 19,20 ± 0,50  | 20,50         |
| 70 % этанол | 20,05 ± 0,50                   | 20,00 ± 0,50  | 22,40         |
| 90 % этанол | 20,42 ± 0,50                   | 20,80 ± 0,50  | 22,42         |
| 95 % этанол | 20,46 ± 0,50                   | 20,30 ± 0,50  | 21,46         |

Результаты, представленные в таблицах 15 и 16, демонстрируют эффективность различных экстрагентов для извлечения биологически активных веществ из *Cetraria islandica* (L.) Ach.

В таблице 15 видно, что 50% этанол и 70% этанол обеспечивают наивысший выход экстрактивных веществ (22,40% и 22,42% соответственно), что указывает на их высокую эффективность в извлечении активных компонентов. В то же время, очищенная вода показала меньший выход экстрактивных веществ (20,02%), что свидетельствует о том, что для оптимального извлечения полезных веществ предпочтительнее использовать спиртовые экстрагенты.

Таблица 16 показывает, что выход экстрактивных веществ также зависит от степени измельчения сырья. Для фракций от 1,0 до 2,0 мм и от 2,0 до 3,0 мм выход составляет 20,50%, в то время как для фракции от 3,0 до 5,0 мм до 22,40%. Это свидетельствует о том, что более высокая степень измельчения способствует более эффективному экстрагированию активных веществ.

Таким образом, полученные данные подчеркивают важность выбора экстрагента и степени измельчения сырья для максимизации выхода биологически активных веществ из *Cetraria islandica*, что может быть полезно для дальнейшего развития фитопрепаратов и улучшения их фармакологических свойств.

### 3.9 Исследование стабильности и установление срока годности сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach.

С целью подтверждения установленного срока хранения были проведены долгосрочные исследования стабильности сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. в течение 24 месяцев. Испытания выполнялись в соответствии с требованиями, определёнными Приказом МЗ РК от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

Условия хранения в ходе эксперимента соответствовали следующим параметрам: температура  $25 \pm 2$  °С и относительная влажность  $60 \pm 5$  %. Объектом исследования стали три производственные серии сырья, упакованные в трёхслойные мешки из крафт-бумаги, соответствующие требованиям ГОСТ 2226–2013. В ходе исследования содержание усниновой кислоты в пересчёте на сухое вещество сохраняло стабильные значения на протяжении всего периода наблюдения; соответствующие результаты представлены на рисунке 8.

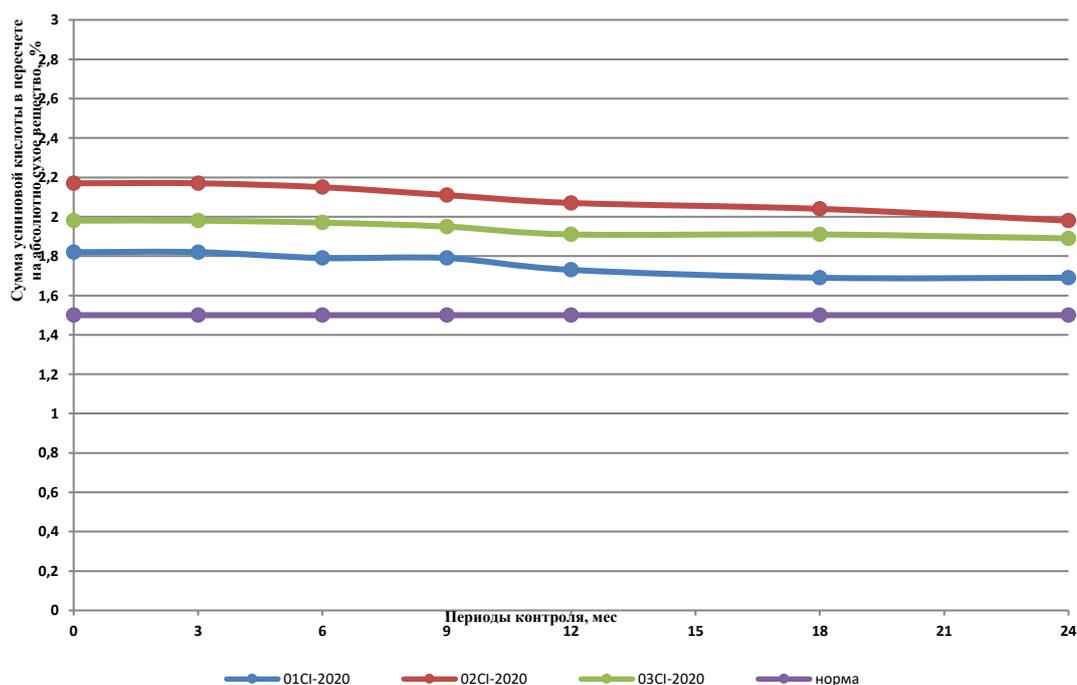


Рисунок 8 - Определения количественного содержания усниновой кислоты в течение периода исследования стабильности

В результате исследований стабильности трёх серий лекарственного растительного сырья - слоевищ *Cetraria islandica* (L.) Ach., проведённых в течение 24 месяцев при температуре  $(25 \pm 2)$  °С и относительной влажности  $60 \pm 5$  %, установлено, что все показатели качества соответствуют требованиям спецификации на протяжении всего срока наблюдения. Органолептические

характеристики и идентификационные признаки на всех этапах контроля остались неизменными и соответствовали нормативной документации, что свидетельствует о стабильности внешнего вида и подлинности сырья. Количество посторонних примесей варьировалось в пределах 3,08–3,54 %, что не превышает установленного предела в 5 %. Потеря в массе при высушивании находилась в диапазоне от 10,29 до 11,32 %, что также укладывается в допустимое значение не более 12 %. Показатель общей зольности был стабилен и существенно ниже допустимого уровня (не более 3 %), с колебаниями от 1,48 до 1,87 %. Микробиологическая чистота во всех точках контроля соответствовала категории 4А, что свидетельствует об отсутствии критического микробиологического загрязнения. Количественное содержание основных биологически активных веществ оставалось на удовлетворительном уровне: лишайниковые кислоты в пересчёте на усниновую кислоту постепенно снижались с 2,98 % до 2,81 %, но при этом оставались выше минимально допустимого уровня (2,0 %), а содержание полисахаридов в пересчёте на глюкозу снизилось с 56,7 % до 54,5 %, что значительно превышает нормативное значение (не менее 40 %). Таким образом, проведённые испытания подтвердили стабильность физико-химических, микробиологических и фармакогностических показателей сырья при соблюдении условий хранения, что позволяет рекомендовать срок годности не менее 2 лет. Данные по исследованию стабильности и установлению сроков годности трех серий изучаемого ЛРС представлены в приложении С.

### **Выводы по третьему разделу**

В данном разделе была подробно описана технология сбора и заготовки *Cetraria islandica* (L.) Ach., основанная на принципах устойчивого природопользования и рекомендациях надлежащей практики сбора (GACP). Заготовка осуществлялась в строгом соответствии с Законом РК «О растительном мире» что обеспечивает правовую основу для рационального использования биологических ресурсов. Образцы были собраны в стабильных экологических условиях, что подтверждает здоровье популяции и возможность частичного сбора без ущерба для экосистемы. Использование ручного труда и выборочная заготовка способствовали сохранению субстрата и регенерации популяции. После сбора сырьё тщательно очищалось от посторонних включений и сушилось в соответствии с установленными стандартами, что гарантирует его высокое качество и безопасность для дальнейшего использования.

Морфолого-анатомическое изучение сырья *Cetraria islandica* выявило, что этот кустистый лишайник характеризуется гетеромерным листоватым слоевищем высотой 12–15 см с гладкой или слабо бороздчатой поверхностью, на которой располагаются ломкие перетяжки и дихотомические ветви. Анатомическое исследование, проведенное с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии, показало наличие коркового слоя, фотобионтного слоя и рыхло расположенных гиф мицобионта. Гистохимические реакции подтвердили присутствие характерных лишайниковых кислот, таких

как усниновая и фумарпротоцетраровая, что подчеркивает диагностическую ценность и фармакогностическую значимость данного сырья.

Фитохимическое исследование *Cetraria islandica* подтвердило наличие широкого спектра биологически активных соединений, включая полисахариды, фенольные соединения и лишайниковые кислоты. Количественное определение показало, что содержание усниновой кислоты составило 2,98% на сухое вещество, что подчеркивает фармакологическую ценность этого сырья. Результаты контроля качества сырья, включая физико-химические, микробиологические и токсикологические показатели, подтвердили соответствие нормативным требованиям, что позволяет рассматривать *Cetraria islandica* как стандартизованную фармацевтическую субстанцию.

Анализ летучих и липофильных соединений экстракта *Cetraria islandica* с использованием метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (GC-MS) выявил 36 различных соединений, включая производные жирных кислот, фитостеролы и терпеноиды. Наибольшее содержание составили  $\gamma$ -ситостерол (14,13 %), витамин E (8,87 %) и эфиры линолевой и линоленовой кислот. Результаты исследования подтвердили стабильность показателей качества в пределах, установленных нормативной документацией по контролю качества и безопасности ЛРС, в течение 24 месяцев при соблюдении рекомендуемых условий хранения. Полученные результаты позволяют обоснованно установить срок годности ЛРС 2 года.

Таким образом, *Cetraria islandica* представляет собой высококачественное и безопасное лекарственное растительное сырьё, соответствующее современным требованиям фармакопейных стандартов и открывающее перспективы для дальнейшего использования в разработке новых фитопрепаратов [117-122].

## 4 РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА *CETRARIA ISLANDICA*

### 4.1 Выбор оптимальной технологии экстрагирования *Cetraria islandica*

*Cetraria islandica*, известная также как исландский мох, представляет собой источник биологически активных соединений, в числе которых полисахариды (лихенин и изолихенин), фенольные компоненты и лишайниковые кислоты. Указанные вещества характеризуются выраженными противовоспалительными, антиоксидантными и антимикробными свойствами, что определяет фармацевтическую ценность экстракта [123]. Однако эффективность их извлечения напрямую зависит от выбора метода экстракции, а также от концентрации используемого экстрагента.

Экспериментальная часть исследования была реализована в ряде специализированных лабораторий, включая Центр практических навыков Казахского национального медицинского университета имени С.Д. Асфендиярова, научно-исследовательскую лабораторию лекарственных растений Казахского национального университета имени аль-Фараби, а также Научный центр природных продуктов Университета Миссисипи (National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, Oxford, США). Проведение исследований в данных учреждениях позволило обеспечить воспроизводимость результатов, межлабораторную сопоставимость данных и достоверность сравнительной оценки различных методов экстрагирования.

Подготовка растительного сырья к экстрагированию – включая взвешивание, механическое измельчение и просеивание – осуществлялась в соответствии с действующими нормативными документами РК, регламентирующими требования к качеству и безопасности лекарственного растительного сырья. Эти этапы технологического процесса направлены на достижение однородности материала, повышение площади поверхности контакта сырья с экстрагентом и обеспечение воспроизводимости получения экстракта с заданными физико-химическими характеристиками [124].

Взвешивание растительного сырья. Процесс взвешивания сырья осуществлялся с использованием высокоточных платформенных весов, соответствующих требованиям нормативных документов РК, регламентирующих точность измерений в фармацевтической практике. Точное дозирование массы сырья обеспечивало соблюдение необходимого соотношения между сырьём и экстрагентом, что критично для эффективности последующей экстракции биологически активных веществ.

Основные этапы взвешивания:

1. Подготовка рабочей зоны: рабочая поверхность тщательно очищалась и стерилизовалась в соответствии с санитарными нормами, обеспечивая стерильные условия для проведения взвешивания.

2. Использование весов: применялись платформенные весы, прошедшие метрологическую поверку и соответствующие стандартам НД РК, обеспечивая необходимую точность измерений для фармацевтического производства.

3. Документирование: Все данные о массе сырья фиксировались в журнале учёта с указанием номера партии, даты и времени взвешивания, что обеспечивало прослеживаемость и контроль качества сырья на всех этапах производства.

Измельчение растительного сырья. Измельчение сырья проводилось с использованием оборудования, соответствующего требованиям НД РК для фармацевтического производства. Этот процесс способствовал увеличению площади контакта сырья с экстрагентом, что повышало эффективность извлечения активных компонентов.

Основные этапы измельчения:

1. Предварительная подготовка: сырьё очищалось от посторонних включений, таких как загрязнения и нежелательные растительные элементы, обеспечивая чистоту исходного материала.

2. Процесс измельчения: использовались современные лабораторные измельчители, соответствующие стандартам качества и безопасности, позволяя достичь необходимой степени измельчения.

3. Контроль размера частиц: полученный материал подвергался контролю размера частиц, обеспечивая диапазон от 1 до 5 мм, что является оптимальным для эффективной экстракции.

4. Документирование: результаты измельчения фиксировались в журнале, включая информацию о размере частиц и времени обработки, что обеспечивало контроль и воспроизводимость процесса.

Просеивание растительного сырья. С целью обеспечения однородности измельчённого сырья и получения фракции, оптимальной по размеру для экстракции, был проведён этап просеивания. Правильный подбор гранулометрического состава сырья способствует равномерному взаимодействию с экстрагентом и повышает эффективность извлечения биологически активных веществ.

Основные этапы просеивания:

1. Выбор сит с регламентированными характеристиками:

Для фракционирования использовались сита с размером ячеек, соответствующим нормативным требованиям, установленным в документах НД РК для растительного сырья, предназначенного для экстракции. Размер ячеек подбирался с учётом необходимого диапазона частиц (1–5 мм), рекомендованного для получения стандартизированных экстрактов.

2. Контроль фракционного состава:

После просеивания проводилась визуальная и инструментальная проверка частиц на соответствие заданному размеру. Исключались как слишком крупные, так и пылевидные фракции, которые могли бы негативно повлиять на равномерность экстрагирования и качество полученного экстракта.

3. Фиксация результатов:

Все параметры, включая тип использованных сит, процентное распределение фракций и итоговую массу прошедшего просеивание сырья,

вносились в технологический журнал. Это обеспечивало прослеживаемость операций и соответствие нормативной документации.

Подготовка экстрагента. После завершения всех предварительных этапов, таких как взвешивание, измельчение и просеивание сырья, следующим ключевым этапом является подготовка экстрагента. На данном этапе были использованы водно-спиртовые растворы этилового спирта различных концентраций: 40%, 50%, 70%, 90% и 95%. Выбор диапазона концентраций обоснован необходимостью сравнительной оценки эффективности извлечения биологически активных веществ из растительного сырья при различных полярностях растворителя. Этанол был выбран в качестве основного растворителя в связи с его широким применением в фармацевтической практике, хорошей экстрагирующей способностью, безопасностью и совместимостью с различными активными компонентами.

Процесс приготовления экстрагентов включал следующие этапы:

1. Отбор компонентов:

Для приготовления водно-спиртовых растворов использовали этиловый спирт ректифицированный, фармакопейного качества (соответствующий требованиям НД РК, в том числе ГФ РК), а также очищенную воду, подготовленную в соответствии с требованиями GMP.

2. Приготовление растворов:

Необходимые объёмы этанола и воды отмерялись с использованием калиброванных мерных сосудов с точностью до 1 мл. Компоненты тщательно смешивались до получения однородного раствора требуемой концентрации. При необходимости растворы фильтровались мембранный фильтр (0,45 мкм) для удаления возможных механических примесей.

3. Контроль параметров:

Приготовленные экстрагенты проверялись на соответствие нормативным параметрам (плотность, прозрачность, отсутствие механических включений). Все данные заносились в лабораторный журнал, включая дату приготовления, серию, концентрацию и используемые объёмы компонентов.

4. Условия хранения:

Растворы хранились в герметично закрытых стеклянных ёмкостях из тёмного стекла при температуре от +8 до +15 °С в условиях, исключающих воздействие прямого солнечного света, во избежание испарения спирта и снижения концентрации раствора.

Данный подход обеспечил стандартизированную подготовку экстрагента, необходимую для воспроизводимости результатов и сопоставимости данных при проведении экстракции по различным методикам.

Получение экстракта. Получение экстракта *Cetraria islandica* осуществлялось с применением различных методов экстракции, включая дробную мацерацию, мацерацию с ультразвуковым воздействием и перколяцию. Выбор данных методик был обусловлен необходимостью сравнительной оценки их эффективности для последующего выбора оптимального способа получения

экстракта, обладающего максимальной концентрацией биологически активных веществ (БАВ) при сохранении их фармакологической активности.

Метод дробная мацерация.

В ходе исследования был проведён сравнительный анализ эффективности экстракции биологически активных веществ (БАВ) из *Cetraria islandica* (L.) Ach. методом дробной мацерации с использованием этилового спирта различной концентрации (40%, 50%, 70%, 90% и 95%). Целью эксперимента было определение оптимальных условий для извлечения ключевых лишайниковых кислот, таких как усниновая, протоцетрариновая, фумарпротоцетрариновая, метилпротоцетрариновая и цетрариновая кислоты.

Результаты экстракции представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Влияние концентрации этанола при дробной мацерации на выход экстрактивных веществ и содержание БАВ

| Концентрация этанола (%) | Выход экстрактивных веществ, (%) | Содержание полисахаридов в перечете на глюкозу, % | Содержание полифенольных соединений в перечете на кофейную кислоту, % | Содержание лишайниковых кислот в перечете на усниновую кислоту, % |
|--------------------------|----------------------------------|---|---|---|
| 40                       | 20,02                            | 59  | 1,05  | 1,44  |
| 50                       | 20,50                            | 56  | 1,27  | 1,82  |
| 70                       | 22,40                            | 56  | 1,52  | 2,18  |
| 90                       | 22,42                            | 22  | 1,56  | 2,18  |
| 95                       | 21,46                            | 16  | 1,55  | 2,20  |

Анализ результатов экстракции методом дробной мацерации с использованием этанола различной концентрации (от 40% до 95%) демонстрирует зависимость выхода экстрактивных веществ и содержания суммы лишайниковых кислот от полярности растворителя.

При использовании 40% и 50% этанола наблюдается умеренный выход экстрактивных веществ (20,02% и 20,50% соответственно), с увеличением содержания лишайниковых кислот до 2,17% при 50% этаноле. Это указывает на улучшение растворимости компонентов по мере снижения полярности среды.

Максимальные значения как выхода экстрактивных веществ (22,40%), так и содержания суммы лишайниковых кислот (2,98%) зафиксированы при 70% этаноле. Это свидетельствует о наибольшей эффективности экстракционного процесса при данной концентрации спирта, обусловленной оптимальным соотношением полярной и неполярной фазы, способствующим извлечению широкого спектра соединений, включая усниновую кислоту.

При повышении концентрации этанола до 90% и 95% наблюдается аналогичный выход экстрактивных веществ, составляющий 22,00% и 24,80% соответственно. Также фиксируется содержание лишайниковых кислот на уровне 2,23% и 2,51%. Данное явление, вероятно, связано с уменьшением растворимости полярных компонентов в менее полярной среде, что

ограничивает эффективность экстракции биологически активных веществ. Таким образом, несмотря на увеличение концентрации этанола, результаты показывают, что более высокие концентрации не приводят к значительному увеличению выхода активных компонентов, что подчеркивает важность выбора оптимального экстрагента для достижения максимальной эффективности экстракции. С увеличением крепости этилового спирта содержание полисахаридов в экстракте уменьшается из-за их лучшей растворимости в воде.

Таким образом, использование 70% этанола для экстракции биологически активных веществ из *Cetraria islandica* не только демонстрирует сопоставимый выход экстрактивных веществ по сравнению с более высокими концентрациями, но также представляет собой экономически выгодное решение. Это делает 70% этанол предпочтительным выбором для дальнейших исследований и практического применения в фармацевтической и косметической отраслях.

Мацерация с ультразвуковым воздействием

Для повышения эффективности экстрагирования биологически активных веществ из сырья *Cetraria islandica* была реализована методика мацерации с применением ультразвукового воздействия. Данный подход направлен на интенсификацию массопереноса за счёт кавитационного эффекта, возникающего в результате действия ультразвуковых волн на экстракционную среду.

Настройка оборудования и условия экстракции:

Ультразвуковая экстракция проводилась в ультразвуковой ванне Vilitек VBS-DS и VBS-DP, частота: 40/68 кГц (регулируемая), объем: 3 литра, российская компания ООО «Вилитек». В ходе эксперимента были протестированы четыре диапазона частот: 20–40 кГц, 40–60 кГц с целью установления оптимального диапазона для извлечения целевых соединений. В качестве экстрагента использовался 70% этанол, объёмной пропорции сырьё: экстрагент = 1:10. Температура экстрагирования поддерживалась на уровне  $40 \pm 2$  °С [125].

Для каждой частоты были отобраны три временных режима экстракции — 15, 30 и 45 минут, что позволило оценить влияние продолжительности ультразвукового воздействия на эффективность извлечения.

Навеска высушенного и предварительно измельчённого растительного сырья (10 г), стандартизированного по размеру частиц (1–5 мм), помещалась в стеклянную колбу с 100 мл 70% этанола. Колба плотно закупоривалась и размещалась в ультразвуковую ванну с терморегуляцией. Ультразвуковое воздействие осуществлялось в диапазоне частот 20–60 кГц при температуре  $40 \pm 2$  °С. Время экстракции составляло 15, 30 и 45 минут в зависимости от серии.

По завершении экстракции смесь фильтровали через беззольную фильтровальную бумагу (например, Whatman №1). Полученный фильтрат использовали для последующего анализа. Выход экстрактивных веществ (г/100 г абсолютно сухого сырья) определяли гравиметрическим методом. Количественное содержание полисахаридов и полифенольных соединений устанавливали с использованием спектрофотометрического анализа, а

качественно-количественное определение лишайниковых кислот осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Таблица 18 – Результаты ультразвуковой экстракции с различными частотами ультразвука

| Частота ультразвука (кГц) | Время экстракции (мин) | Выход экстрактивных веществ, % | Содержание полисахаридов в пересчёте на глюкозу, % | Содержание полифенольных соединений в пересчёте на кофейную кислоту, % | Содержание лишайниковых кислот в пересчёте на усниновую кислоту, % |
|---------------------------|------------------------|--------------------------------|--|--|--|
| 20–40                     | 15                     | 23,02                          | 54   | 1,20   | 1,80   |
|                           | 30                     | 24,40                          | 55   | 1,50   | 2,10   |
|                           | 45                     | 24,50                          | 57   | 1,60   | 2,30   |
| 40–60                     | 15                     | 24,00                          | 58   | 1,70   | 2,50   |
|                           | 30                     | 26,02                          | 60   | 1,90   | 2,98   |
|                           | 45                     | 26,80                          | 58   | 1,80   | 2,70   |

Таблица 18 представляет результаты исследования ультразвуковой экстракции с использованием различных частот ультразвука и времени экстракции, что позволяет оценить эффективность извлечения экстрактивных веществ и содержания биологически активных компонентов из растительного сырья.

Для определения оптимальных условий ультразвуковой экстракции экстрактивных веществ из слоевищ *Cetraria islandica* была проведена серия экспериментов с использованием различной частоты ультразвука (20, 30, 40, 50, 60 кГц) и продолжительности воздействия (15, 30, 45 мин). Частота задавалась вручную на ультразвуковом экстракторе с регулируемым режимом и контролем точности  $\pm 1$  кГц. Все экстракции проводились при температуре  $(40 \pm 2)$  °С, с использованием 70 % этанола в качестве экстрагента, при соотношении сырья к экстрагенту 1:7 [126-127].

Полученные данные представлены в таблице 18. Результаты показали, что увеличение частоты ультразвукового излучения и времени экстракции оказывает положительное влияние на выход экстрактивных веществ, а также содержание полисахаридов, полифенолов и лишайниковых кислот. Максимальные значения были достигнуты при частоте 40 кГц и времени экстракции 30 минут: выход экстрактивных веществ – 26,02 %, содержание полисахаридов в пересчёте на глюкозу – 60 %, полифенольных соединений в пересчёте на кофейную кислоту – 1,90 %, лишайниковых кислот в пересчёте на усниновую кислоту – 2,98 %.

На основании анализа результатов, в дальнейшем в качестве постоянного технологического параметра была выбрана частота ультразвукового воздействия 40 кГц, как наиболее эффективная для получения экстракта с высоким содержанием биологически активных веществ.

Кратность экстракции. С целью более полного извлечения биологически активных соединений проводилась трёхкратная экстракция одной порции

растительного сырья. Каждое экстрагирование осуществлялось свежей порцией 70 % этанола в том же объёме, при одинаковых условиях (температура 40 °С, частота 40 кГц, продолжительность 30 мин). Объединённые экстракты консолидировались перед стадией концентрирования. Анализ остаточного содержания БАВ в жмыхе показал, что после третьего этапа содержание усниновой кислоты и полисахаридов становилось минимальным (<5 % от исходного), что подтверждает целесообразность использования трёхкратного экстрагирования в данной технологии.

Метод перколяции. Перколяционный метод был выбран в качестве одного из ключевых подходов для извлечения биологически активных веществ из *Cetraria islandica* благодаря своей высокой эффективности. Преимуществом данного метода является постепенное прохождение экстрагента сквозь толщу растительного сырья, что способствует более полному извлечению целевых соединений. Такая технология обеспечивает продолжительный контакт растворителя с субстратом, благодаря чему удаётся получить экстракт с высокой концентрацией активных компонентов.

С целью получения экстракта *Cetraria islandica* с максимальным содержанием биологически активных веществ был проведён эксперимент по экстрагированию методом перколяции с использованием 70% этилового спирта. Данный раствор был выбран как экстрагент средней полярности, способный эффективно извлекать как полисахариды, так и фенольные соединения, а также лишайниковые кислоты.

Навеска сухого, измельчённого и просеянного сырья массой 50 г помещалась в лабораторный перколятор цилиндрической формы. Предварительно сырьё увлажняли небольшим количеством 70% этанола и выдерживали в течение 12 часов для равномерного набухания и лучшего смачивания частиц. После этого добавляли экстрагент до полного покрытия сырья и запускали процесс перколяции при комнатной температуре, поддерживая постоянную скорость фильтрации 1 мл/мин.

Собранный перколят оценивался по объёму, окраске и прозрачности. После завершения перколяции полученный экстракт фильтровался, упаривался при температуре не выше 40 °С до получения густого экстракта, и анализировался на содержание экстрактивных веществ, полисахаридов, фенольных соединений и лишайниковых кислот. Все анализы проводились в соответствии с фармакопейными методиками и требованиями НД РК.

Результаты экстракции методом перколяции с использованием 70% этанола в таблице 19.

Сравнительный анализ трёх методов экстракции *Cetraria islandica* – мацерации с ультразвуковым воздействием, дробной мацерации и перколяции –

Таблица №19 – Результаты экстракции методом перколяции (70% этанол)

| Показатель                             | Результат | Метод анализа                       |
|--|-----------|-------------------------------------|
| Выход экстрактивных веществ, %         | 20–21     | Гравиметрический                    |
| Содержание полисахаридов, %            | 52        | Фенольно-серная реакция             |
| Содержание полифенольных соединений, % | 1,54      | Реакция с реактивом Фолина-Чокалтеу |
| Содержание лишайниковых кислот, %      | 2,06      | Spot test                           |

позволил выявить наиболее эффективную технологию извлечения биологически активных веществ. Наиболее высокий выход экстрактивных веществ, включая полисахариды, фенольные соединения и лишайниковые кислоты, был зафиксирован при использовании мацерации с ультразвуковым воздействием на частоте 40–60 кГц с применением 70% этанола в качестве экстрагента.

Дробная мацерация продемонстрировала хорошую полноту извлечения при поэтапном замещении экстрагента, однако уступала ультразвуковой технологии по интенсивности и скорости экстракции. Перколяция обеспечила стабильные результаты и технологическую воспроизводимость, особенно при использовании 70% этанола, однако характеризовалась более длительным временем проведения процесса.

Учитывая комплексную оценку – эффективность извлечения, сохранность термолабильных компонентов и технологическую целесообразность – наиболее предпочтительным методом получения стандартизованного экстракта *Cetraria islandica* признана мацерация с ультразвуковым воздействием.

Согласно требованиям GMP была разработана технология производства экстракта, полученного методом ультразвуковой мацерации. В рамках данной технологии был разработан опытно-промышленный регламент (ОПР), и успешно получены три серии густого экстракта *Cetraria islandica*.

#### 4.2 Разработка технологии получения экстракта *Cetraria islandica*

Согласно требованиям GMP была разработана технология производства экстракта (рисунок 9), полученного методом ультразвуковой мацерации. В рамках данной технологии был разработан опытно-промышленный регламент (ОПР), и успешно получены три серии густого экстракта *Cetraria islandica*.

Процесс получения густого экстракта *Cetraria islandica* осуществляется по стадийному принципу с соблюдением контроля качества на каждом этапе, в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики (GMP) и Государственной фармакопеи Республики Казахстан.

##### Стадия ВР 1: Подготовка растительного сырья

Измельчённое до фракции 2–3 мм сырьё лишайника *Cetraria islandica* подвергается сортировке и очистке от посторонних примесей. Влажность сырья контролируется и доводится до значения не более 10%. Размер частиц стандартизируется, чтобы не более 15% массы составляли частицы менее 0.5 мм. Нужное количество сырья для серии взвешивается на весах.

## Стадия ВР 2: Приготовление экстрагирующего растворителя

В качестве экстрагента используется 70% этанол, приготовленный и отфильтрованный при необходимости. Растворитель дозируется в соответствии с соотношением масса/объем сырья: растворитель (1:7), обеспечивая эффективность экстракции.

## Стадия ТП 1: Ультразвуковая мацерация

Смесь измельченного сырья и экстрагента загружается в ультразвуковую ванну или реактор. Обработка проводится при частоте ультразвука 40 кГц в течение 30 минут, при температуре 40 °С. Цель стадии — интенсификация процесса извлечения биологически активных веществ.

## Стадия ТП 2: Отстаивание и фильтрация экстракта

После завершения экстракции полученное извлечение подвергается отстаиванию в специальных отстойниках при температуре 2–10 °С в течение 12–24 часов. Отстоявшийся экстракт фильтруется через вакуумные или напорные фильтры, обеспечивая прозрачность раствора и отсутствие механических примесей.

## Стадия ТП 3: Концентрирование (упаривание)

После фильтрации очищенной вытяжки её направляют на вакуумное выпаривание до получения густой консистенции при температуре не выше 50 °С и разрежении 600–650 мм рт. ст., обеспечивая остаточное содержание спирта не более 5% и массовую долю сухих веществ не менее 50%. Готовый экстракт охлаждается до температуры 20–25 °С.

Стадия УМО: упаковка, маркировка и отпуск готового продукта (густой экстракт)

### УМО-1: Упаковка.

Готовый густой экстракт фасуется в пластиковые или стеклянные контейнеры объемом 1 кг, обеспечивающие герметичность и защиту от внешних факторов. Контейнеры должны быть устойчивыми к агрессивным компонентам экстракта. На каждый контейнер наклеивается самоклеящаяся этикетка, содержащая следующую информацию: название продукта, состав, объем (1 кг), срок годности, номер серии, условия хранения.

### УМО-2: Групповая упаковка.

Контейнеры с густым экстрактом помещаются в групповую упаковку, которая обеспечивает защиту от механических повреждений и загрязнений. Групповая упаковка должна быть прочной и соответствовать требованиям транспортировки и хранения. Каждый пакет должен иметь маркировку с указанием количества контейнеров, даты упаковки и информации о производителе.

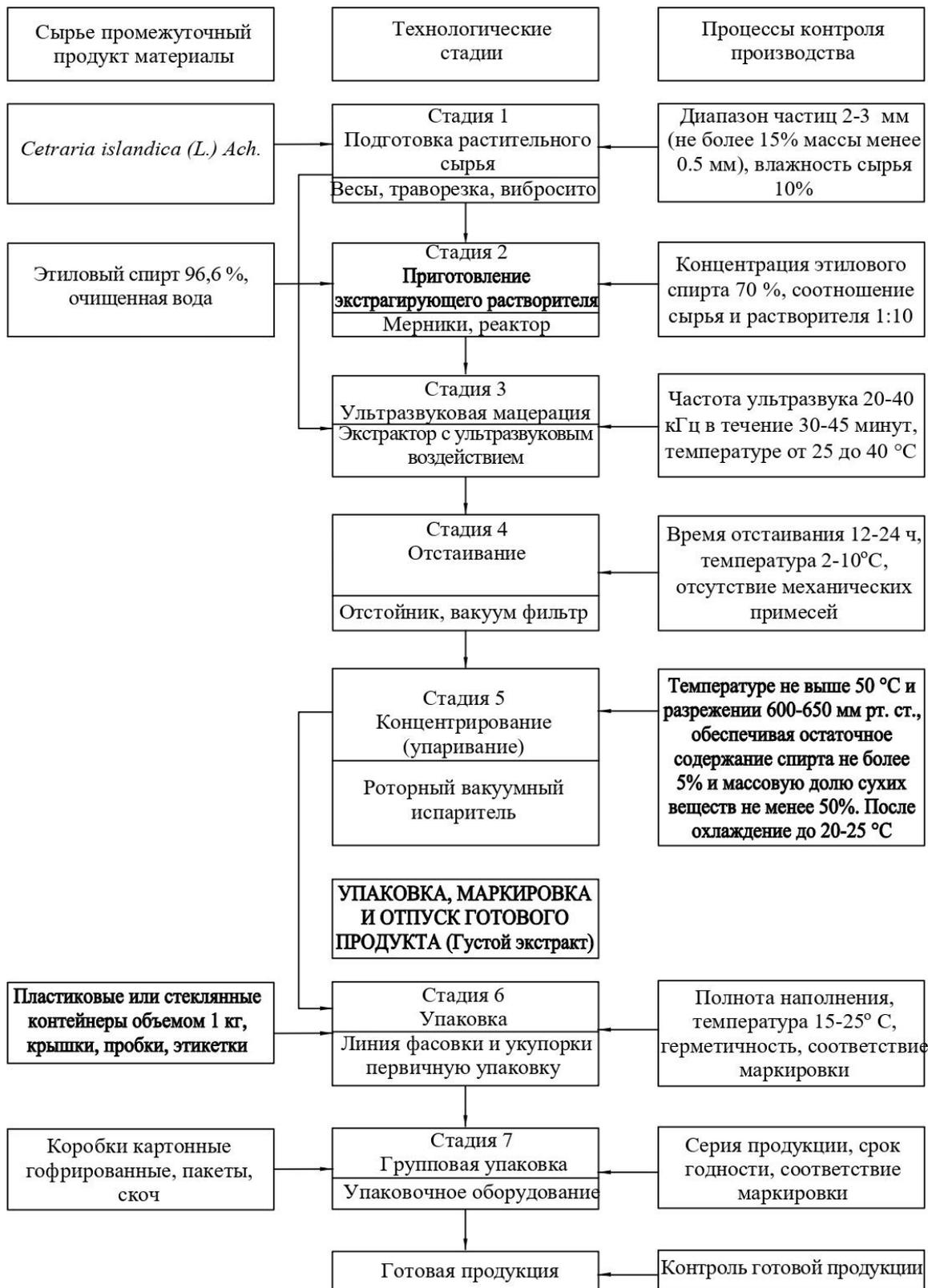


Рисунок 9 - Технологическая схема производства экстракта густого *Cetraria islandica*

Контроль качества экстракта *Cetraria islandica* густого осуществляется на всех стадиях технологического процесса, начиная с подготовки растительного сырья, где проверяется влажность ( $\leq 10\%$ ) и фракция частиц (не более  $15\% < 0.5$  мм), с использованием измельчителя и сита. На стадии приготовления экстрагирующего растворителя контролируется концентрация спирта (70%) и объем в соответствии с расчетным соотношением (1:7 м/об). Ультразвуковая мацерация требует контроля за временем (30–60 мин), температурой (25–40 °С) и частотой ультразвука (20–40 кГц), а также соотношением сырья и растворителя и температурой в емкости. После отстаивания (2–10 °С, 12–24 часа) проверяется отсутствие механических включений. Фильтрация осуществляется с контролем прозрачности фильтрата и отсутствия механических частиц, используя вакуум-фильтр или фильтр-пресс. На стадии упаривания контролируются температура (не выше 50 °С), остаточное содержание спирта ( $\leq 5\%$ ) и вязкость готового продукта, чтобы обеспечить массу с содержанием сухих веществ  $\geq 50\%$ . Наконец, на стадии охлаждения и фасовки проверяется температура перед фасовкой, чистота и герметичность тары. Все этапы производятся в соответствии с требованиями GMP и ГФ РК, что гарантирует безопасность, эффективность и высокое качество конечного продукта.

#### **4.3 Валидация технологического процесса производства экстракта *Cetraria islandica***

В рамках диссертационного исследования на ТОО «ПЛП Жанафарм» была проведена валидация технологического процесса масштабирования лабораторной технологии получения густого экстракта *Cetraria islandica* до опытно-промышленного уровня. Целью валидации являлось документальное подтверждение того, что производственный процесс, выполняемый в пределах установленных параметров, эффективно и воспроизводимо обеспечивает получение экстракта, соответствующего заранее установленным спецификациям и показателям качества.

Объём валидируемых серий составил 1,0 кг каждая. Все используемое оборудование, включая технологическое и лабораторное, а также инженерные системы, прошло квалификацию и поверку в соответствии с требованиями GMP. Применяемые методики были верифицированы, что обеспечивает надёжность и точность получаемых результатов.

Критическими параметрами процесса (Critical Process Parameters, CPP) были определены: качество исходного сырья (идентификация, влажность, наличие посторонних примесей), параметры экстракции (тип и концентрация растворителя, температура, время и кратность экстракции), условия фильтрации (скорость, степень очистки), параметры концентрации (температура упаривания, давление, время), показатели стабильности экстракта (содержание действующего вещества – усниновой кислоты), а также условия упаковки (тип материала, герметичность, защита от влаги и света). Эти параметры подлежат

Таблица 20 – План валидации технологического процесса производства густого экстракта *Cetraria islandica*

| Стадии процесса   | Параметры                    | Регламентируемые нормы  | Количество отбора проб в одной |
|---|------------------------------|---|--------------------------------|
| Стадия 1:<br>Подготовка растительного сырья             | Качество сырья               | Соответствие техническим регламентам (НД)                                       | 1                              |
|   | Масса сырья                  | Точность $\pm 0,1$ кг   | 1                              |
|   | Размер частиц (2-3 мм)       | Не более 15% частиц $< 0,5$ мм  | 9                              |
| Стадия 2:<br>Приготовление экстрагирующего растворителя | Масса (объем) спирта         | $\pm 1,0$ кг  | 1                              |
|   | Время смешивания             | 30 минут  | 1                              |
|   | Скорость смешивания          | 15 об/мин   | Каждые 2 мин                   |
|   | Концентрация этанола         | $70\% \pm 2\%$  | 15                             |
| Стадия 3:<br>Ультразвуковая мацерация                   | Температура экстракции       | $25-40$ °С  | Каждые 1 час                   |
|   | Частота ультразвука          | $40-60$ кГц   | Каждые 2 мин                   |
|   | Время воздействия            | $30-45$ минут   | 1                              |
| Стадия 4:<br>Отстаивание                                | Температура отстаивания      | $2-10$ °С   | Каждые 1 час                   |
|   | Время отстаивания            | $12-24$ часа  | 1                              |
| Стадия 5:<br>Фильтрация                                 | Качество фильтрата           | Соответствие стандартам производителя   | 9 точек                        |
|   | Прозрачность                 | Отсутствие механических частиц (размеры $1,0$ мкм, $0,5$ мкм и $0,65/0,45$ мкм) | 1                              |
| Стадия 6:<br>Упаривание (концентрирование)              | Температура                  | Не выше $50$ °С   | Каждые 1 час                   |
|   | Давление                     | $600-650$ мм рт. ст.  | Каждые 1 час                   |
|   | Остаточное содержание спирта | $\leq 5\%$  | 1                              |
| Стадия 7:<br>Упаковка и групповая упаковка              | Объем упаковки               | $1$ кг $\pm 5\%$  | В начале, в середине, в конце  |
|   | Комплектность                | Соответствие стандартам производителя   | В начале, в середине, в конце  |
|   | Качество маркировки          | Соответствие стандартам производителя   | В начале, в середине, в конце  |
|   | Целостность упаковки         | Соответствие стандартам производителя   | 9                              |
|   | Условия хранения             | Соответствие нормативным техническим документам                                 | 9                              |

обязательному контролю, поскольку они определяют эффективность и воспроизводимость процесса, а также соответствие качества продукта установленным требованиям (таблица 20).

Проведённая валидация технологического процесса производства густого экстракта *Cetraria islandica* обеспечивает высокое качество и стабильность получаемого экстракта, что является необходимым условием для его дальнейшего применения в медицинской практике и фармацевтической промышленности.

В рамках валидации технологического процесса производства густого экстракта *Cetraria islandica* на стадии приготовления экстрагента был проведён контроль смешивания 70% (об/об) этанола, полученного путём разбавления 96% этанола водой фармакопейного качества. Смешивание осуществлялось в смесителе при скорости 15 об/мин в течение 30 минут. Контроль параметров проводился каждые 2 минуты, что обеспечивало мониторинг процесса в реальном времени.

Результаты измерений показали, что значения концентрации этанола находились в пределах 6 стандартных отклонений ( $6\sigma$ ), а относительное стандартное отклонение (RSD) составляло менее 2%, что свидетельствует о высокой однородности и стабильности полученного экстрагента. Статистический анализ процесса смешивания по параметру скорости вращения смесителя (рисунки 10-12) продемонстрировал его управляемость: для первой серии коэффициенты способности процесса составили: для первой серии:  $\bar{c}_p = 1,20 \geq \text{срк} = 1,15 \geq 1,0$ , для второй серии:  $\bar{c}_p = 1,38 \geq \text{срк} = 1,32 \geq 1,0$ , для третьей серии:  $\bar{C}_p = 1,52 \geq \text{Срк} = 1,47 \geq 1,0$

Процесс смешивания статистически управляем по параметру скорости вращения смесителя, так как рассчитанные индексы способности процесса для 70 % этанола находятся в пределах нормы.

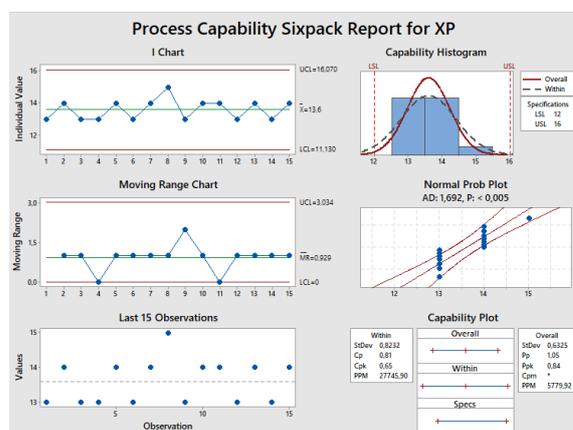


Рисунок 10 – Контрольная карта Шухарта по параметру «скорость вращения смесителя» при приготовлении 70 % этанола (серия 1)

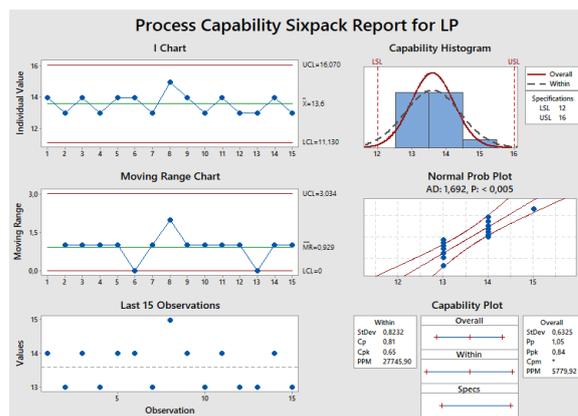


Рисунок 11 – Контрольная карта Шухарта по параметру «скорость вращения смесителя» при приготовлении 70 % этанола (серия 2)

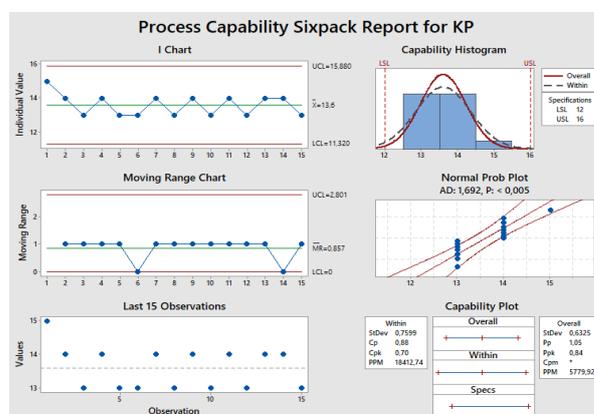


Рисунок 12 – Контрольная карта Шухарта по параметру «скорость вращения смесителя» при приготовлении 70 % этанола (серия 3)

В ходе валидации технологического процесса производства густого экстракта *Cetraria islandica* был проведён отбор проб экстрагента на 15 точках (сверху, снизу и в середине) из трёх серий с последующим анализом содержания этанола, которое составило  $70\% \pm 2\%$ . Результаты анализа продемонстрировали высокую воспроизводимость процесса, так как коэффициент вариации (RSD) не превышал 1%, что свидетельствует о стабильности экстракта. Контрольные карты Шухарта показали, что все отклонения находились в пределах допустимых значений, что подтверждает управляемость процесса. Индексы возможности процесса ( $C_p$  и  $C_{pk}$ ) также подтвердили его стабильность: для первой серии  $C_p (2.70) \geq C_{pk} (2.29) \geq 1$ , для второй серии  $C_p (2.34) \geq C_{pk} (2.18) \geq 1$ , а для третьей серии  $C_p (1.91) \geq C_{pk} (1.67) \geq 1$ . Эти показатели свидетельствуют о соответствии процесса международным стандартам GMP и высоком качестве экстракта (рисунки 13-15)

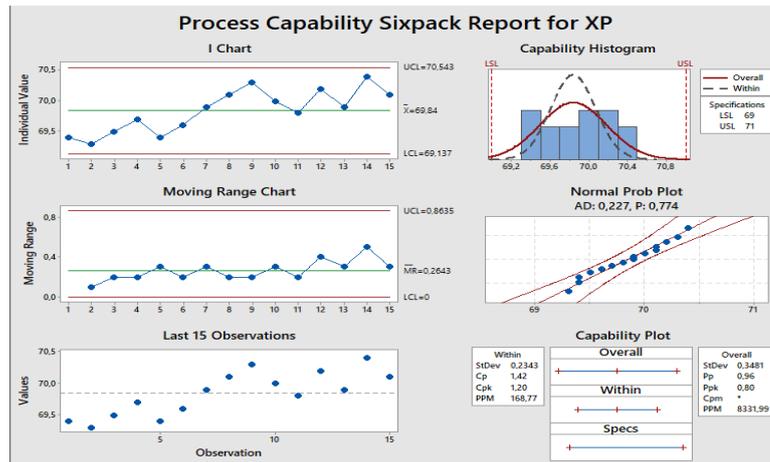


Рисунок 13 – Контрольная карта Шухарта параметра концентрации этилового спирта (серия 1)

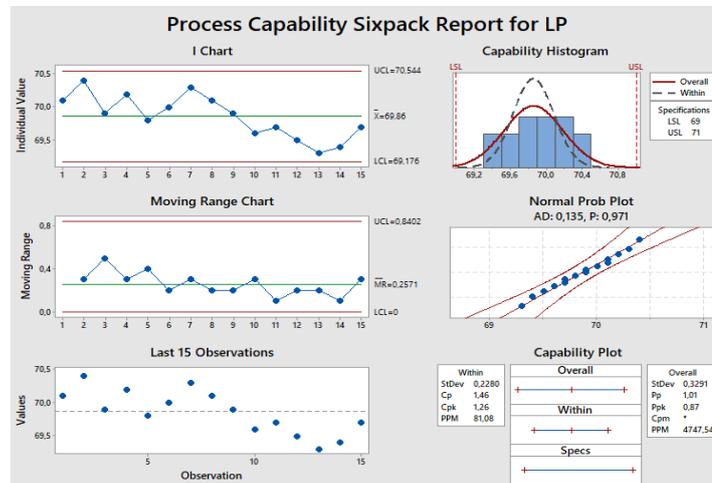


Рисунок 14 – Контрольная карта Шухарта параметра концентрации этилового спирта (серия 2)

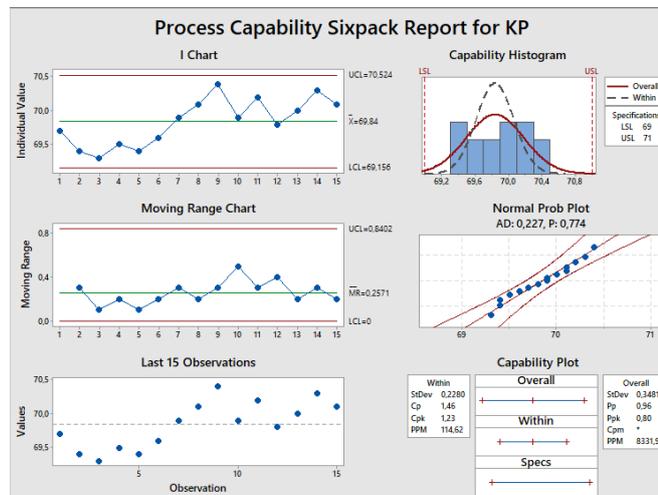


Рисунок 15 – Контрольная карта Шухарта параметра концентрации этилового спирта (серия 3)

В процессе исследования был осуществлён контроль над основными фармацевтико-технологическими параметрами, такими как продолжительность и температура экстракции в реакторе, частота ультразвука, а также важнейшими показателями качества, включая визуальное описание экстракта, его физико-химические свойства и содержание активных веществ. При каждой экстракции строго контролировалась температура в реакторе. Результаты контроля подтверждают стабильность процесса: контрольные карты Шухарта для всех трех серий соответствуют установленным пределам, а значение относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 2,0 %. В ходе исследования отклонений в технологическом процессе не было выявлено, что подтверждает его стабильность и соответствие установленным стандартам. Индексы возможности процесса для параметра "Температура в реакторе при экстракции" по сериям составили: для первой серии  $C_p (1.54) \geq C_{pk} (1.53) \geq 1$ , для второй серии  $C_p (1.39) \geq C_{pk} (1.36) \geq 1$ , для третьей серии  $C_p (1.51) \geq C_{pk} (1.49) \geq 1$  (см. рисунки 16-18). Эти результаты подтверждают высокое качество экстракта.

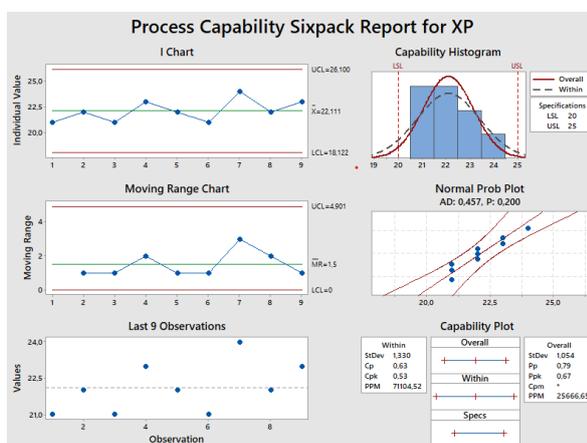


Рисунок 16 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 1)

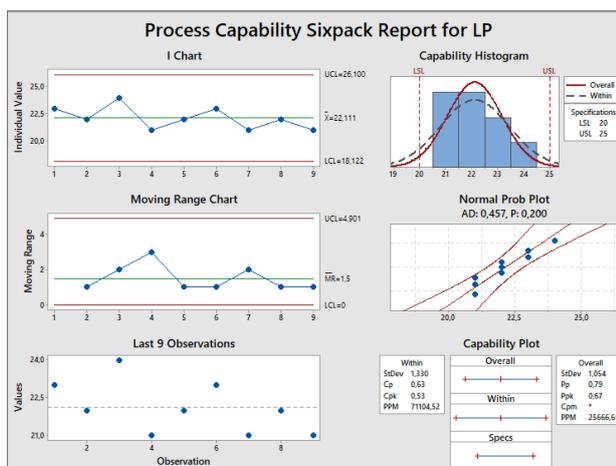


Рисунок 17 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 2)

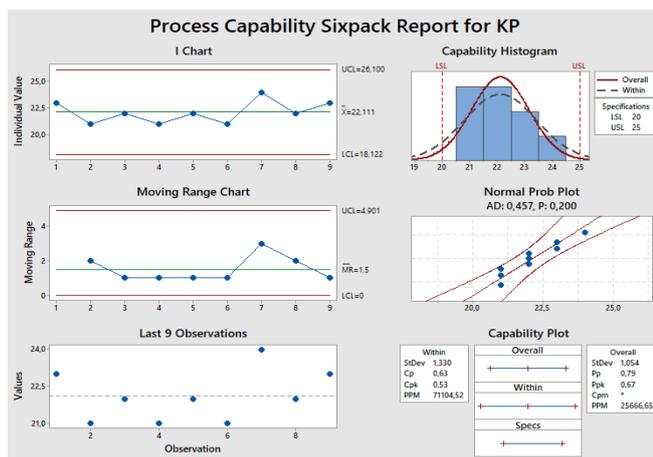


Рисунок 18 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 3)

Частота ультразвука при экстракции была установлена в диапазоне от 40 до 60 кГц на протяжении 30 минут, с контролем параметров процесса каждые 2 минуты. Полученные результаты подтвердили высокую воспроизводимость процесса, поскольку уровень относительного стандартного отклонения (RSD) не превышал 1%. Анализ с использованием контрольных карт Шухарта не выявил отклонений в процессе (рисунки 19-21). Индексы способности процесса для параметра «частота ультразвука» составили: для первой серии  $C_p (1.54) \geq C_{pk} (1.53) \geq 1$ , для второй серии  $C_p (1.39) \geq C_{pk} (1.36) \geq 1$ , для третьей серии  $C_p (1.51) \geq C_{pk} (1.49) \geq 1$ . Эти данные подтверждают стабильность экстракционного процесса и его соответствие установленным стандартам, что также свидетельствует о высоком качестве получаемого экстракта.

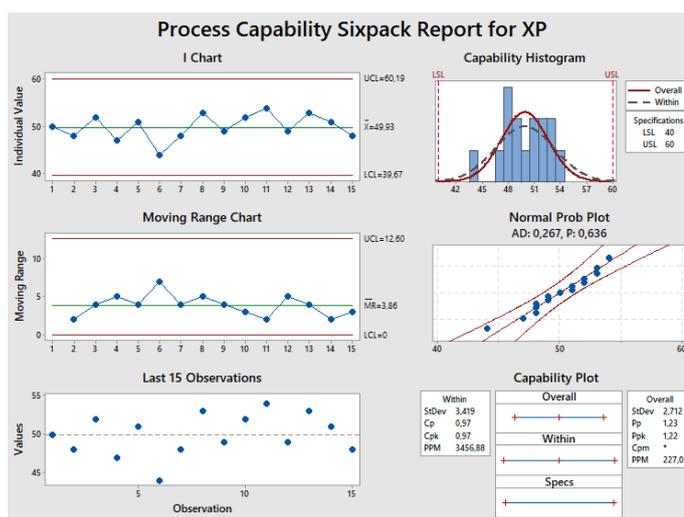


Рисунок 19 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 1)

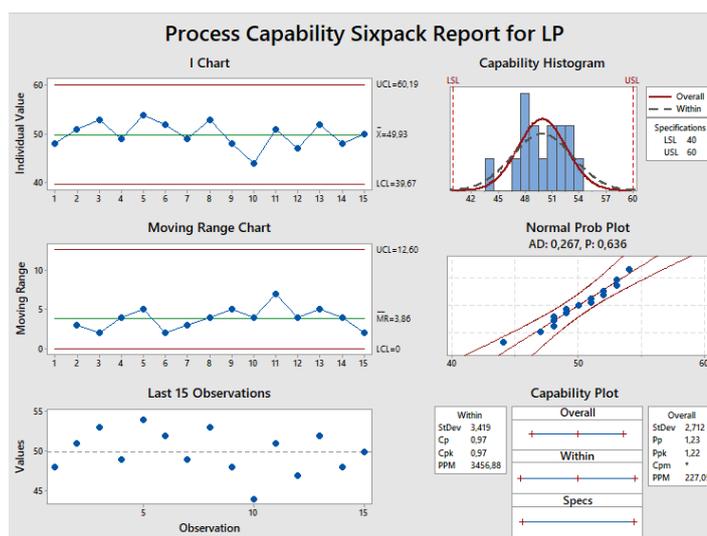


Рисунок 20 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 2)

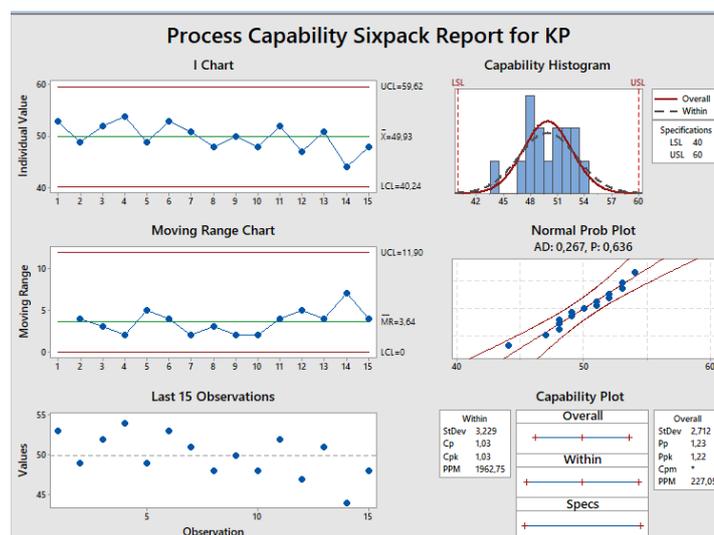


Рисунок 21 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 3)

Процесс отстаивания экстракта проводился при температуре 2-10 °C в течение 12-24 часов с ежечасной регистрацией температуры. Полученные результаты подтвердили высокую воспроизводимость процесса, так как относительное стандартное отклонение (RSD) не превышало 1%. Контрольные карты Шухарта показали, что отклонения в процессе отсутствуют (рисунки 22-24). Индексы способности процесса для параметра "температура отстаивания" составили для первой серии:  $C_p (1.55) \geq C_{pk} (1.40) \geq 1$ , для второй серии:  $C_p (1.52) \geq C_{pk} (1.35) \geq 1$ , для третьей серии:  $C_p (1.50) \geq C_{pk} (1.30) \geq 1$ . Эти показатели подтверждают стабильность процесса и его соответствие установленным стандартам, что, в свою очередь, гарантирует высокое качество получаемого экстракта.

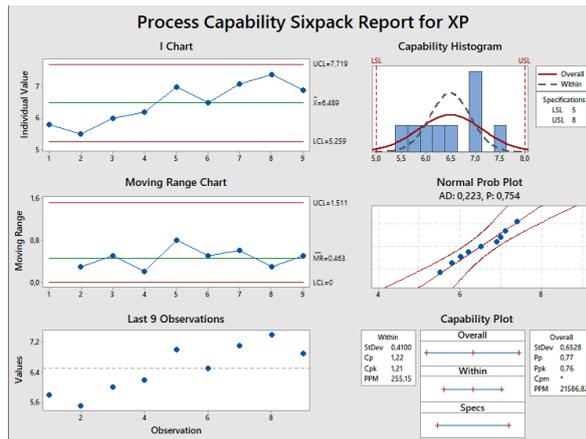


Рисунок 22 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании экстракта (серия 1)

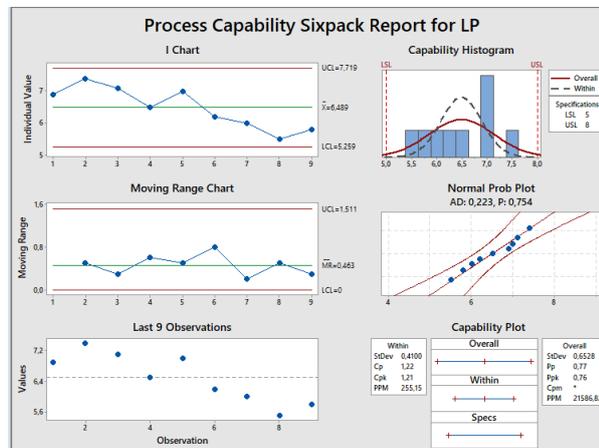


Рисунок 23 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании экстракта (серия 2)

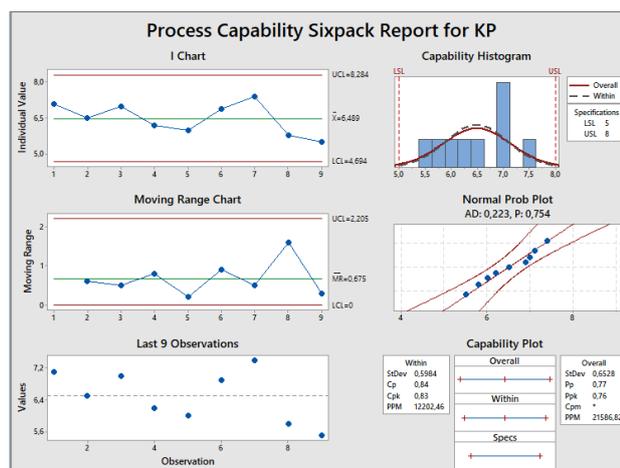


Рисунок 24 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании экстракта (серия 3)

На стадии упаривания (концентрирования) экстракта *Cetraria islandica* контроль ключевых параметров, таких как температура, давление и остаточное содержание спирта, проводился с целью подтверждения стабильности процесса. Температура не превышала 50 °С, с индексами возможности процесса  $C_p$  (1.60)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.55) для первой серии,  $C_p$  (1.45)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.40) для второй и  $C_p$  (1.50)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.48) для третьей серии. Давление в диапазоне 600-650 мм рт. ст. также показало стабильность с индексами  $C_p$  (1.70)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.65) для первой серии,  $C_p$  (1.55)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.50) для второй и  $C_p$  (1.60)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.58) для третьей серии. Остаточное содержание спирта не превышало 5%, при этом индексы  $C_p$  (2.00)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.95) для первой серии,  $C_p$  (1.85)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.80) для второй и  $C_p$  (1.90)  $\geq$   $C_{pk}$  (1.88) для третьей серии подтверждают высокую управляемость процесса. Эти результаты свидетельствуют о соответствии регламентируемым нормам и стабильности технологического процесса (25-27).

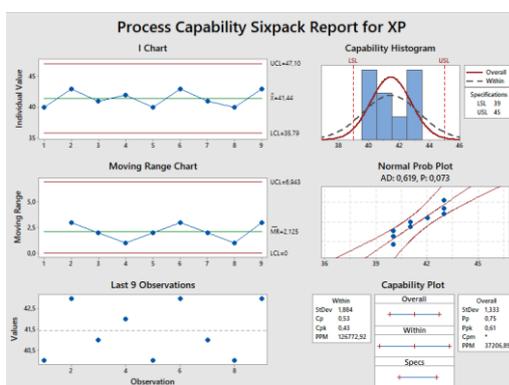


Рисунок 25 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при удалении экстрагента из экстракта *Cetraria islandica* (серия 1)

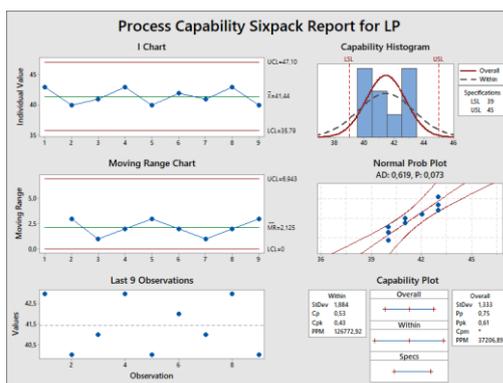


Рисунок 26 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при удалении экстрагента из экстракта *Cetraria islandica* (серия 2)

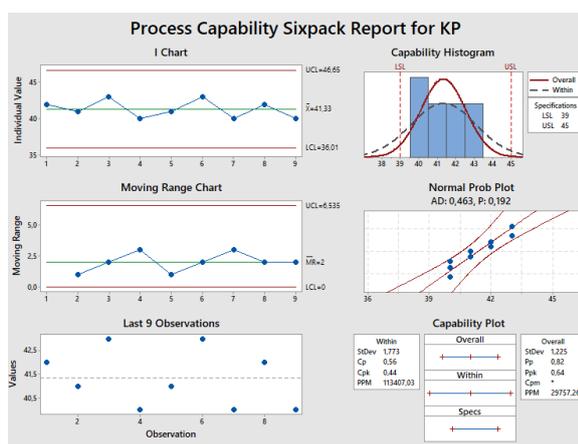


Рисунок 27 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при удалении экстрагента из экстракта *Cetraria islandica* (серия 3)

На стадии упаковки и групповой упаковки экстракта *Cetraria islandica* проводился контроль ключевых параметров, чтобы гарантировать соответствие требованиям качества. Объем заполнения упаковки проверялся на уровне  $1 \text{ кг} \pm 5\%$ , с индексами возможности процесса  $C_p (1.60) \geq C_{pk} (1.55)$  для первой серии,  $C_p (1.50) \geq C_{pk} (1.45)$  для второй и  $C_p (1.55) \geq C_{pk} (1.52)$  для третьей серии. Комплектность упаковки соответствовала стандартам предприятия (СП), что подтверждено проверками в начале, середине и конце упаковочного процесса. Качество маркировки также контролировалось в соответствии с СП, с аналогичными результатами в разные моменты времени. Целостность упаковки проверялась на 9 точках, обеспечивая защиту продукта от повреждений. Условия хранения соответствовали нормативно-технической документации (НТД), с контрольными точками, обеспечивающими соблюдение всех требований [128]. Результаты контроля подтвердили стабильность процесса упаковки, что свидетельствует о высоком качестве готового продукта (28-30).

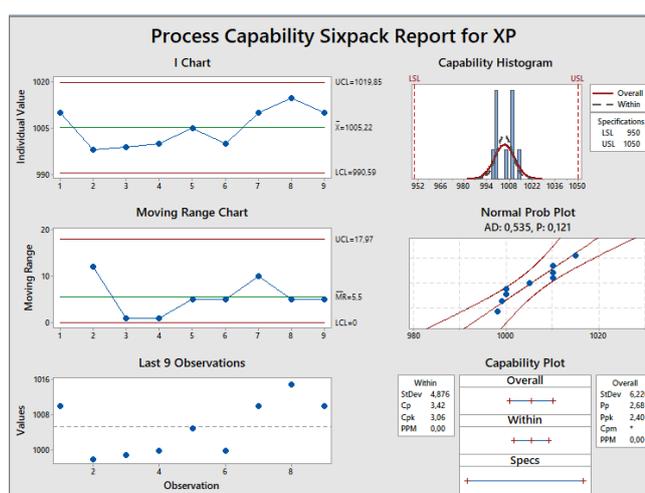


Рисунок 28 – Контрольная карта Шухарта по параметрам упаковки и групповой упаковки экстракта *Cetraria islandica*

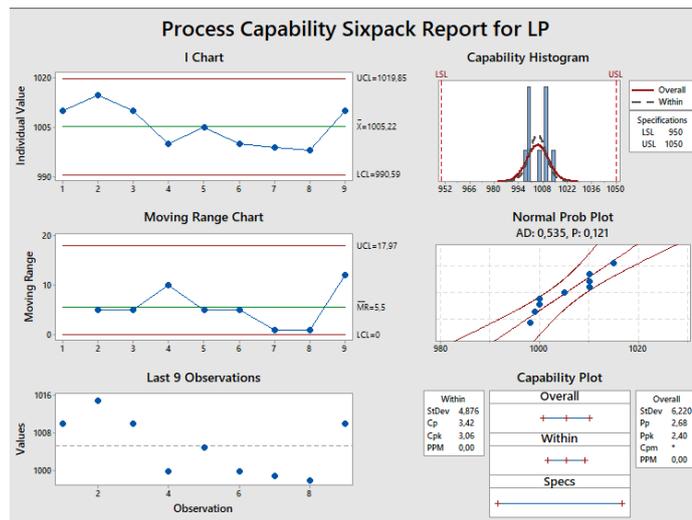


Рисунок 29 – Контрольная карта Шухарта по параметрам упаковки и групповой упаковки экстракта *Cetraria islandica*

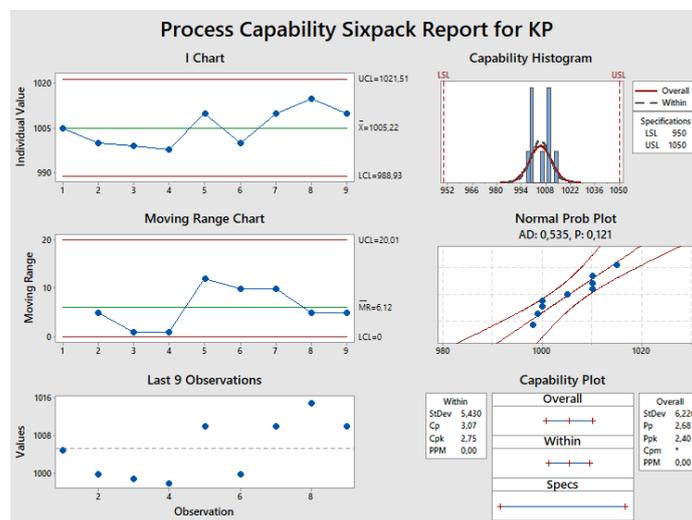


Рисунок 30 – Контрольная карта Шухарта по параметрам упаковки и групповой упаковки экстракта *Cetraria islandica*

Проведённые валидационные мероприятия подтвердили воспроизводимость и стабильность ключевых параметров технологического процесса получения густого экстракта *Cetraria islandica* на предприятии ТОО «ПЛП Жанафарм». Контроль на всех критических стадиях – от подготовки экстрагента до удаления растворителя и упаковки готового продукта – показал соответствие регламентируемым требованиям. Размер частиц порошка находился в пределах 30–60 мкм, варьирование массы при расфасовке не превышало 2%, а комплектность и маркировка соответствовали утверждённой нормативной документации. Индексы способности процесса по ключевым параметрам, включая температуру, скорость и качество экстракции, находились в пределах нормы, что подтверждает управляемость и стабильность процесса.

На основе проведённой валидации был подготовлен отчёт, в котором указаны результаты контроля и расчетные значения индексов способности

процесса. Все полученные показатели подтверждают валидность утверждённого опытно-промышленного регламента для производства экстракта *Cetraria islandica* и свидетельствуют о успешной адаптации процесса с лабораторного уровня к опытно-промышленному масштабу.

#### 4.4 Изучение химического состава экстракта *Cetraria islandica* современными физико-химическими методами исследований

Химический состав экстракта лишайника *Cetraria islandica* был комплексно охарактеризован с использованием современных аналитических подходов, включающих газовую хроматографию с масс-спектрометрией (GC-MS), высокоразрешающую масс-спектрометрию с электроспрейной ионизацией (HR-ESI-MS), а также ВЭЖХ в сочетании с диодно-матричным детектором (LC-DAD) и масс-спектрометрию высокого разрешения (LC-ESI-QToF-MS). В качестве объектов анализа рассматривались экстракты, полученные с использованием различных экстрагентов: водно-этанольного, этанольного, метанольного и ацетонового растворов.

В результате исследований методом GC-MS и HR-ESI-MS было выделено и идентифицировано девять основных соединений, включая цетраровую кислоту (1), метилпротоцетраровую кислоту (2), усниновую кислоту (3), эргостеролпероксид (4), а также жирные кислоты — олеиновую (5), пальмитиновую (6) и стеариновую (7), наряду с углеводами — сахарозой (8) и D-арабитолом (9). Структурные формулы указанных соединений представлены на рисунке 31. Идентификация и установление их строения проводились с применением методов одно- и двухмерной ядерно-магнитной спектроскопии (1D и 2D NMR), спектральные данные которой приведены в приложении Т.

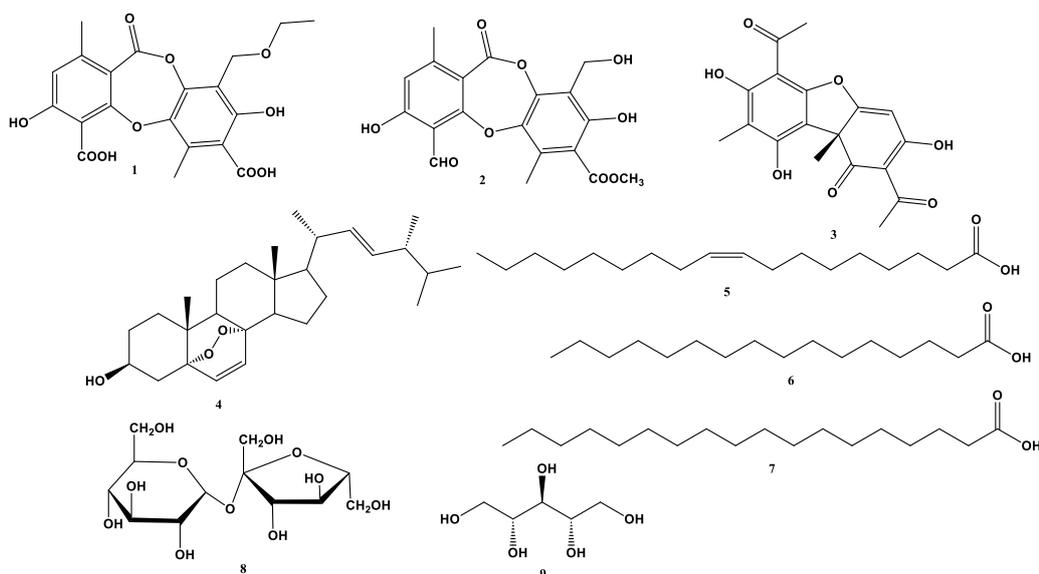


Рисунок 31 – Структурные формулы соединений, выделенных из экстракта *C. islandica* методом GC-MS и идентифицированных с применением HR-ESI-MS

С целью комплексного изучения химического состава экстрактов *Cetraria islandica*, полученных с использованием водно-этанольного, этанольного, метанольного и ацетонового растворителей, был применён метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с градиентным элюированием в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения с электроспрейной ионизацией (LC-QToF-ESI-MS). Проведённый анализ позволил охарактеризовать ключевые группы вторичных метаболитов, включая депсидоны (соединения 1–15), депсиды (16), дибензофураны (17), алифатические кислоты и липиды (18–32), а также различные органические кислоты (33–37).

Для повышения точности идентификации соединений масс-спектрометрический анализ проводился как в положительном, так и в отрицательном режимах ионизации, при этом наибольшую информативность продемонстрировал отрицательный режим. В общей сложности было обнаружено 61 соединение, из которых 37 были предположительно идентифицированы на основании точных значений молекулярных масс и характерных фрагментных ионов, тогда как 24 соединения остались неидентифицированными.

Результаты по охарактеризованным метаболитам обобщены в таблице 21, включающей времена удерживания, молекулярные формулы, значения  $m/z$  и основные фрагментные ионы. Спектральные характеристики экстрактов представлены на рисунках 4–8: хроматограммы, полученные с помощью детектора диодно-матричного типа (DAD) при длинах волн 210, 254 и 280 нм, показаны на рисунке 32; суммарные ионные хроматограммы (TIC) в положительном и отрицательном режимах ионизации – на рисунке 33. Дополнительно была проведена сравнительная оценка распределения вторичных метаболитов между экстрактами, и для большинства соединений были предположительно установлены химические структуры.

*Депсидоны.* В ходе анализа химического состава экстрактов *Cetraria islandica* было выявлено 12 соединений, отнесённых к классу депсидонов, соответствующих пикам 1–15. Согласно литературным данным (Gudjonsdottir и Ingolfssdottir [129]), основным представителем данного класса является фумаропротоцетрариновая кислота. Среди компонентов, идентифицированных в различных экстрактах *C. islandica*, ключевую роль играют производные протоцетрариновой кислоты.

Протоцетрариновая кислота (соединение 7) с молекулярной формулой  $C_{18}H_{13}O_9$  и значением  $m/z$  373.0560 ранее была описана как типичный компонент лишайников рода *Ramalina* [130], однако в данном исследовании она также обнаружена в образцах *C. islandica*. Проведённый масс-спектрометрический анализ в отрицательном режиме ионизации позволил зафиксировать следующие ионы-продукты:  $m/z$  329.0666  $[M-H-CO_2]^-$ , 311.0561  $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ , 285.0765  $[M-H-2CO_2]^-$  и 255.0665  $[M-H-2CO_2-OSCH_2]^-$ . Такая последовательность потерь типична для данной группы соединений и подтверждает наличие протоцетрариновой кислоты с ионом-предшественником  $m/z$  373.0570  $[M-H]^-$ .

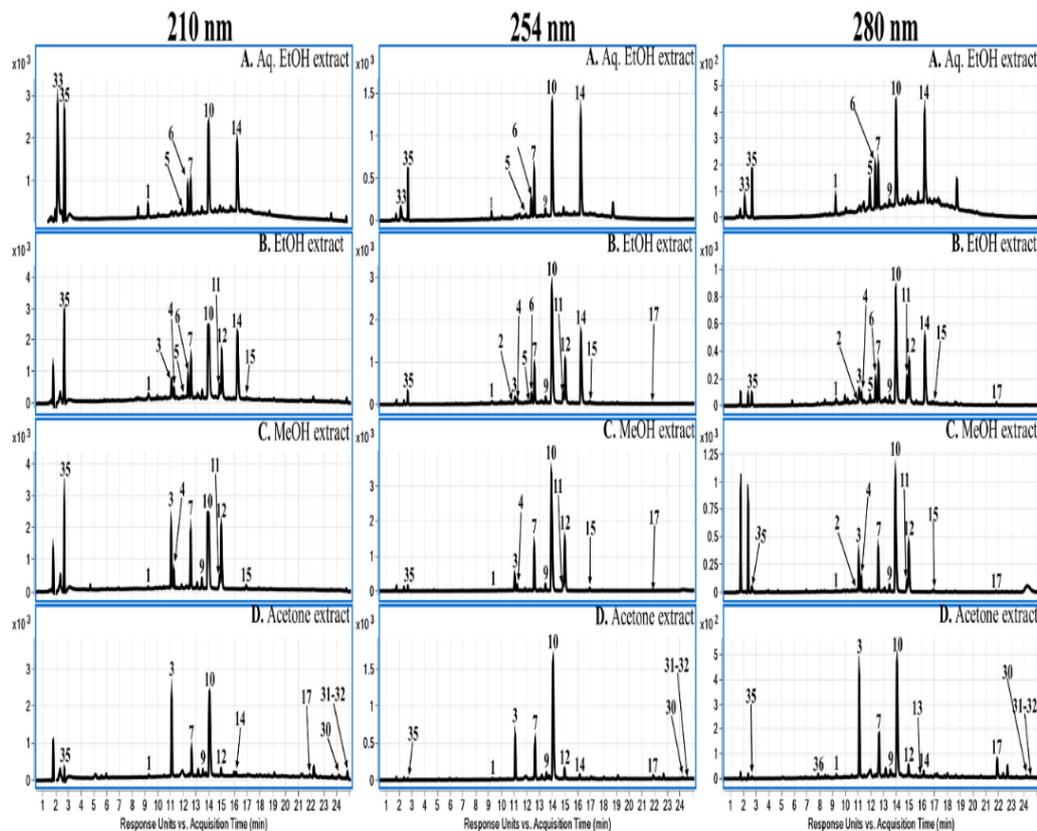


Рисунок 32 - Хроматограммы LC-DAD для экстрактов *C. islandica* при разных длинах волн

(А) водно-этанольный; (В) этанольный (С) метанольный; (D) ацетоновый

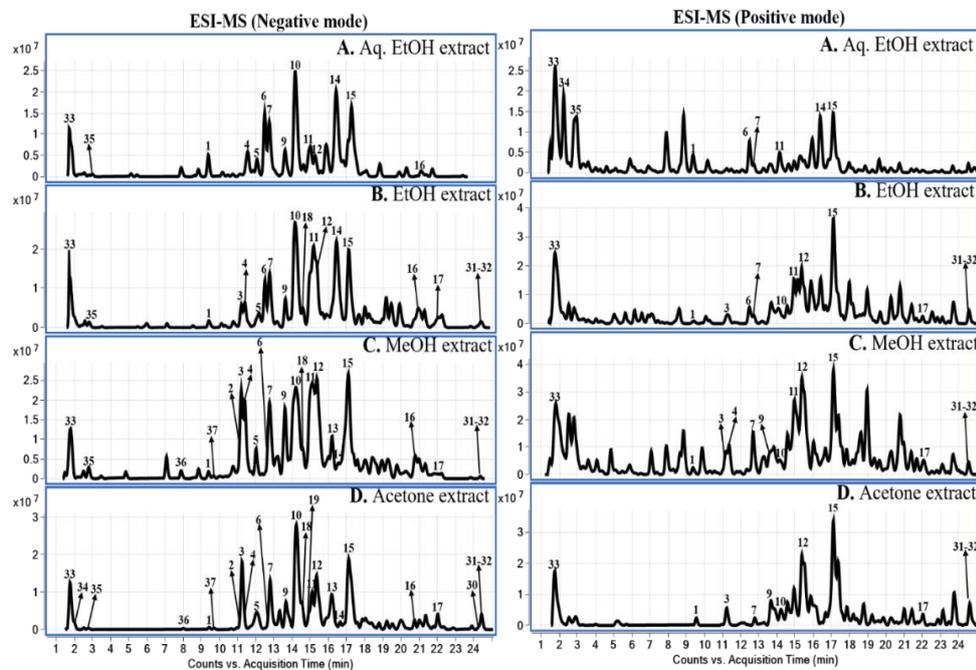


Рисунок 33 - Хроматограммы TIC (LC-QToF-ESI-MS) для экстрактов *C. islandica*:

(А) водно-этанольный; (В) этанольный (С) метанольный; (D) ацетоновый

Отрицательный режим ионизации оказался более предпочтительным для регистрации данных соединений, что связано с их кислотной природой. Среди охарактеризованных веществ особое внимание было уделено фумаропротоцетрариновой кислоте (соединение 10; время удерживания 14,2 мин) и цетрариновой кислоте (соединение 14; 16,5 мин), определённых как основные представители депсидонов в исследуемом образце. Предложенные структуры соединений 10 и 14 представлены на рисунке 34 [131].

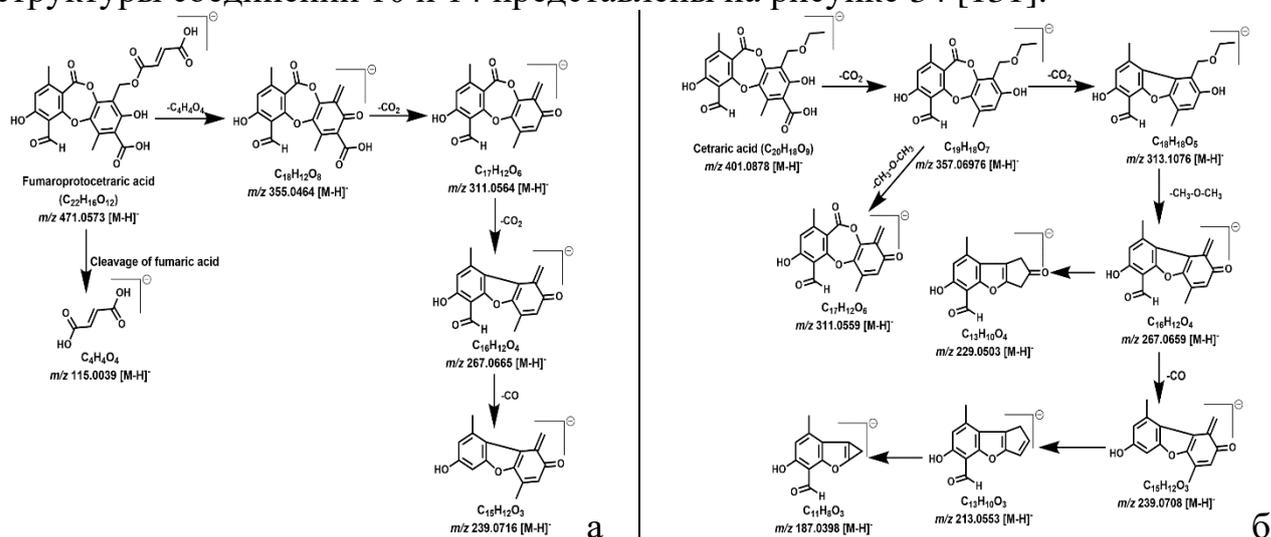


Рисунок 34 - Механизмы MS/MS фрагментации фумаропротоцетрариновой (а) и цетрариновой кислоты (б)

**Депсиды.** К депсидам относятся ароматические соединения, синтезируемые лишайниками в результате этерификации орцинольных производных [132]. Их характерная особенность заключается в склонности к фрагментации по сложноэфирной связи, что проявляется в формировании специфических ионов-продуктов. В исследуемом образце *Cetraria islandica* соединение 16, идентифицированное как диварикатовая кислота, имело псевдомолекулярный ион с  $m/z$  387,1449 ([M-H]<sup>-</sup>). В процессе масс-спектрометрии для него были зарегистрированы характерные ионы при  $m/z$  209,0822, 195,0662, 177,0556 и 151,0765, соответствующие последовательным потерям фрагментов  $C_{11}H_{12}O_3$ , воды и  $CO_2$ . Разрыв сложноэфирной связи с образованием ионов  $m/z$  209 и 195 подтверждает типичный путь распада для соединений данного класса.

**Дибензофураны.** К соединениям типа дибензофуранов в рамках проведённого анализа была отнесена только усниновая кислота, идентифицированная как соединение 17. В отрицательном режиме ионизации для неё был зарегистрирован ион-предшественник с  $m/z$  343,0823 ([M-H]<sup>-</sup>). Достоверность идентификации подтверждена наличием характерных ионов-продуктов:  $m/z$  328,0586, образующегося в результате отщепления метильной группы, и  $m/z$  259,0606, формирующегося в результате ретро-Diels-Alder фрагментации с участием связей C1-C12 и C2-C3. Потеря фрагмента  $m/z$  84, сопровождаемая последующим отсечением CO, ведёт к образованию указанного

стабильного иона. Дополнительное подтверждение структуры обеспечивается фрагментом с  $m/z$  231,0660 [133].

*Алифатические кислоты и липидные соединения*, идентифицированные в составе соединений 18–32, представлены в экстрактах *Cetraria islandica* в виде разнообразных полигидроксилированных производных, характерных для лишайникового сырья. Их наличие подтверждено результатами хромато-масс-спектрометрического анализа, а также данными литературы, включая исследования Gudjonsdottir и Xu с соавт. [134-135], где отмечается высокая распространённость данной группы метаболитов в лишайниках. В исследуемых образцах были выявлены соединения, ранее описанные как компоненты других видов лишайников. На основании точных значений молекулярной массы и характерных ионов фрагментации для соединений с  $m/z$  403,3069; 417,3233; 431,3384; 459,3696; 251,1020 и 385,2595 были предложены структуры, включающие производные как насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, так и соединения со сложным полиоловым остовом (таблица 21).

Таблица 21 – Идентифицированные соединения экстракта *Cetraria islandica* по данным LC-QToF-MS.

| №         | RT (min) | Название соединения   | Мол. формула                                      | Точная масса [M] | [M+H] <sup>+</sup>            | Фрагментированные ионы (+ve mode) | [M-H] <sup>-</sup>            | Фрагментированные ионы (-ve mode)  | Экстракционный растворитель |      |       |         |
|-----------|----------|---|---|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------|------|-------|---------|
|           |          |   |   |                  |                               |                                   |                               |  | Aq. EtOH                    | EtOH | MeO H | Acetone |
| Депсидоны |          |   |   |                  |                               |                                   |                               |  |                             |      |       |         |
| 1         | 9.4      | <u>Дигидропротоцетрариновая кислота</u>   | <u>C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub></u>  | <u>376.0794</u>  | <u>377.0868</u><br>(377.0867) | -                                 | <u>375.0724</u><br>(375.0722) | <u>357.0622 [M-H-H<sub>2</sub>O]</u> ; <u>313.0721 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>295.0612 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>239.0716 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-2CO]</u> ; <u>213.0557 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-2CO-CH<sub>2</sub>]</u> ;   | ±                           | ±    | ±     | ±       |
| 2         | 11.1     | <u>Дигидросубсораминовая кислота</u>  | <u>C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub></u>  | <u>346.0689</u>  | <u>347.0761</u><br>(347.0761) | -                                 | <u>345.0616</u><br>(345.0616) | <u>327.0508 [M-H-H<sub>2</sub>O]</u> ; <u>283.0612 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>239.0711 [M-H-H<sub>2</sub>O-2CO<sub>2</sub>]</u> ;  | ±                           | ±    | ±     | ±       |
| 3         | 11.2     | <u>Дигидрофумаропротоцетрариновая кислота</u>   | <u>C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub></u> | <u>474.0798</u>  | <u>475.0873</u><br>(475.0871) | -                                 | <u>473.0728</u><br>(473.0725) | <u>357.0620 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]</u> ; <u>313.0722 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>115.0040 [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-H]</u> ;   | ±                           | ±    | ±     | ±       |
| 4         | 11.4     | <u>3,9-Дигидрокси-10-(гидроксиметил)-4-(метоксиметил)-1,7-диметил-6-оксобензо[b][1,4]бензодиазепин-2-карбоновая кислота</u>                         | <u>C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub></u>  | <u>390.0951</u>  | <u>391.1027</u><br>(391.1024) | <u>359.0764</u>                   | <u>389.0878</u><br>(389.0878) | <u>371.0774 [M-H-H<sub>2</sub>O]</u> ; <u>357.0617 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>]</u> ; <u>327.0873 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>313.0717 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>295.0615 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>]</u> ; <u>251.0714 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-2CO<sub>2</sub>]</u> ; | ND                          | ±    | ±     | ±       |
| 5         | 12.0     | <u>Метильное производное - 3,9-Дигидрокси-10-(гидроксиметил)-4-(метоксиметил)-1,7-диметил-6-оксобензо[b][1,4]бензодиазепин-2-карбоновая кислота</u> | <u>C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub></u>  | <u>404.1107</u>  | <u>405.1184</u><br>(405.1180) | -                                 | <u>403.1039</u><br>(403.1035) | <u>385.0931 [M-H-H<sub>2</sub>O]</u> ; <u>357.0618 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>]</u> ; <u>313.0722 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>]</u> ;  | ±                           | ±    | ND    | ND      |
| 6         | 12.5     | <u>Метильное производное - 3,9-Дигидрокси-10-(гидроксиметил)-4-(метоксиметил)-1,7-диметил-6-оксобензо[b][1,4]бензодиазепин-2-карбоновая кислота</u> | <u>C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub></u>  | <u>404.1107</u>  | <u>405.1184</u><br>(405.1180) | -                                 | <u>403.1039</u><br>(403.1035) | <u>385.0931 [M-H-H<sub>2</sub>O]</u> ; <u>357.0618 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>]</u> ; <u>313.0722 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>]</u> ;  | ±                           | ±    | ND    | ND      |

Продолжение таблицы 21

| 1  | 2           | 3                                      | 4                    | 5               | 6                                      | 7 | 8                                      | 9   | 10        | 11        | 12        | 13        |
|----|-------------|--|----------------------|-----------------|--|---|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 7  | <u>12.8</u> | <u>Протоцетрариновая кислота</u>       | $C_{18}H_{14}O_9$    | <u>374.0638</u> | <u>375.0713</u><br>( <u>375.0711</u> ) | - | <u>373.0570</u><br>( <u>373.0565</u> ) | <u>355.0464 [M-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>; 329.0666 [M-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>; 311.0561 [M-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>; 267.0664 [M-H<sub>2</sub>O-2CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup></u>  | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 8  | <u>13.0</u> | <u>Фисодаловая кислота</u>             | $C_{20}H_{16}O_{10}$ | <u>416.0743</u> | -                                      | - | <u>415.0672</u><br>( <u>415.0671</u> ) | <u>373.0567 [M-H-CH<sub>2</sub>-CO]<sup>-</sup></u>   | ±         | ±         | <u>ND</u> | <u>ND</u> |
| 9  | <u>13.6</u> | <u>Сукцинпротоцетрариновая кислота</u> | $C_{22}H_{18}O_{11}$ | <u>474.0798</u> | -                                      | - | <u>473.0727</u><br>( <u>473.0725</u> ) | <u>355.0461 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>; 311.0564 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 239.0711 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-2CO<sub>2</sub>-CO]<sup>-</sup>; 117.0197 [C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>-H]<sup>-</sup></u>   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 10 | <u>14.2</u> | <u>Фумарпротоцетрариновая кислота</u>  | $C_{22}H_{16}O_{11}$ | <u>472.0642</u> | -                                      | - | <u>471.0573</u><br>( <u>471.0569</u> ) | <u>355.0464 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>; 311.0565 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 267.0665 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-2CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 239.0708 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-2CO<sub>2</sub>-CO]<sup>-</sup>; 115.0039 [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-H]<sup>-</sup></u> | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 11 | <u>15.1</u> | <u>Субсоромовая кислота</u>            | $C_{17}H_{12}O_8$    | <u>344.0532</u> | <u>345.0604</u><br>( <u>345.0605</u> ) | - | <u>343.0465</u><br>( <u>343.0459</u> ) | <u>299.0566 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 255.0667 [M-H-2CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 229.0512 [M-H-2CO<sub>2</sub>-2CO]<sup>-</sup>; 213.0563 [M-H-C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup>; 201.0563 [M-H-C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>O<sub>5</sub>]<sup>-</sup></u>  | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 12 | <u>15.3</u> | <u>Метилпротоцетрариновая кислота</u>  | $C_{19}H_{16}O_9$    | <u>388.0794</u> | -                                      | - | <u>387.0723</u><br>( <u>387.0722</u> ) | <u>343.0823 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 311.0562 [M-H-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 267.0664 [M-H-2CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; 255.0663 [M-H-2CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-O]<sup>-</sup>; 239.0712 [M-H-2CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-2O]<sup>-</sup></u>  | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 13 | <u>16.3</u> | <u>Везувиановая кислота</u>            | $C_{21}H_{18}O_9$    | <u>414.0951</u> | -                                      | - | <u>413.0877</u><br>( <u>413.0878</u> ) | <u>355.0456 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>-</sup>; 311.0560 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup></u>  | <u>ND</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |

Продолжение таблицы 21

| 1                             | 2    | 3                     | 4                 | 5        | 6                      | 7 | 8                      | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 |
|-------------------------------|------|-----------------------|-------------------|----------|------------------------|---|------------------------|--|----|----|----|----|
| 14                            | 16.5 | Цетрариновая кислота  | $C_{20}H_{18}O_9$ | 402.0951 | -                      | - | 401.0883<br>(401.0878) | 357.0976 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 313.1076 [M-H-2CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 311.0561 [M-H-CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ; 267.0663 [M-H-2CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ; 239.0712 [M-H-2CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup> ; 229.0508 [M-H-2CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 213.0558 [M-H-2CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> -CO-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 187.0400 [M-H-2CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub> -CO-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 15                            | 17.1 | Виренсовая кислота    | $C_{18}H_{14}O_8$ | 358.0689 | -                      | - | 357.0621<br>(357.0616) | 313.0718 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 269.0820 [M-H-2CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;   | ±  | ±  | ±  | ±  |
| Депсиды                       |      |                       |                   |          |                        |   |                        |  |    |    |    |    |
| 16                            | 20.7 | Диварикатовая кислота | $C_{21}H_{24}O_7$ | 388.1522 | -                      | - | 387.1449<br>(387.1449) | 209.0822 [M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ; 195.0662 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ; 177.0556 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> ; 151.0765 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 133.0657 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| Дибензофуран/ы                |      |                       |                   |          |                        |   |                        |  |    |    |    |    |
| 17                            | 22.0 | Усниновая кислота     | $C_{18}H_{16}O_7$ | 344.0896 | 345.0974<br>(345.0969) | - | 343.0823<br>(343.0823) | 328.0586 [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ; 259.0608 [M-H-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 231.0660 [M-H-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> -CO] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| Алифатические кислоты /Липиды |      |                       |                   |          |                        |   |                        |  |    |    |    |    |
| 18                            | 14.6 | Вентозовая кислота    | $C_{22}H_{44}O_6$ | 404.3138 | -                      | - | 403.3069<br>(403.3065) | 215.1288 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 185.1183 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -OCH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 169.1232 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -O-OCH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 157.1233 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -C-O-OCH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |

Продолжение таблицы 21

| 1  | 2            | 3   | 4  | 5               | 6                                    | 7                                  | 8                                    | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----|--------------|---|--|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|----|----|----|----|
| 19 | <u>14.89</u> | <u>Несообщаемое<br/>соединение</u>  | <u>C<sub>26</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub></u> | <u>490.3506</u> | <u>491.3580</u><br><u>(491.3578)</u> | <u>453.3164</u><br><u>195.1160</u> | <u>489.3440</u><br><u>(489.3433)</u> | 429.3224 [M-H-AcOH] <sup>+</sup> ;<br>197.1548 [M-H-AcOH-<br>C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> ; 167.1440 [M-H-<br>AcOH-C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;<br>157.1235 [M-H-AcOH-<br>C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> -3CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 127.1127 [M-<br>H-AcOH-C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> -3CH <sub>2</sub> -<br>CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;   | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 20 | <u>15.4</u>  | <u>Тетрагидрокситрикоза<br/>новая кислота</u>                                 | <u>C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub></u> | <u>418.3294</u> | <u>419.3369</u><br><u>(419.3367)</u> | -                                  | <u>417.3233</u><br><u>(417.3222)</u> | 229.1448 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;<br>199.1341 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -<br>CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 183.1391 [M-H-<br>C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 157.1235<br>[M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;<br>127.1131 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -<br>2CH <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 21 | <u>16.0</u>  | <u>Несообщаемое<br/>соединение</u>  | <u>C<sub>27</sub>H<sub>52</sub>O<sub>8</sub></u> | <u>504.3662</u> | <u>505.3739</u><br><u>(505.3735)</u> | -                                  | <u>503.3591</u><br><u>(503.3589)</u> | 443.3380 [M-H-AcOH] <sup>+</sup> ;   | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 22 | <u>16.6</u>  |   |  |                 |                                      |                                    |                                      | 293.1790 [M-H-AcOH-<br>C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 265.1478 [M-H-<br>AcOH-C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> -2CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 23 | <u>17.4</u>  |   |  |                 |                                      |                                    |                                      |  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 24 | <u>17.8</u>  |   |  |                 |                                      |                                    |                                      |  | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 25 | <u>16.2</u>  | <u>6-Этил-6-п-<br/>пентилпентадекан-<br/>4,5,7,8,15-пентол-15-<br/>ацетат</u> | <u>C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub></u> | <u>432.3451</u> | -                                    | -                                  | <u>431.3384</u><br><u>(431.3378)</u> | 243.1602 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;<br>213.1498 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -<br>CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 197.1545 [M-H-<br>C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 167.1440<br>[M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -O-2CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;<br>157.1234 [M-H-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -<br>CH <sub>2</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>+</sup> ; 127.1130 [M-H-<br>C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> -2CH <sub>2</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O] <sup>+</sup> ; | ±  | ±  | ±  | ±  |
| 26 | <u>17.1</u>  | <u>Несообщаемое<br/>соединение</u>  | <u>C<sub>28</sub>H<sub>54</sub>O<sub>8</sub></u> | <u>518.3819</u> | <u>519.3906</u><br><u>(519.3891)</u> | -                                  | <u>517.3749</u><br><u>(517.3746)</u> | 457.3537 [M-H-AcOH] <sup>+</sup> ;<br>241.1445 [M-H-AcOH-<br>C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 197.1528 [M-H-<br>AcOH-C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;<br>185.1547 [M-H-AcOH-<br>C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> -C-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 167.1441 [M-<br>H-AcOH-C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> -C-CO <sub>2</sub> -<br>H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ; 155.1442 [M-H-AcOH-<br>C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> -C-C-CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ;  | ±  | ±  | ±  | ±  |

Продолжение таблицы 21

| 1                             | 2           | 3  | 4                           | 5               | 6                                      | 7  | 8                                      | 9   | 10        | 11 | 12        | 13        |
|-------------------------------|-------------|--|-----------------------------|-----------------|--|--|--|---|-----------|----|-----------|-----------|
| 27                            | <u>18.4</u> | <u>Тетрагидроксигексакозановая кислота</u> | $C_{26}H_{52}O_6$           | <u>460.3764</u> | <u>461.3840</u><br>( <u>461.3837</u> ) | –  | <u>459.3696</u><br>( <u>459.3691</u> ) | <u>441.3579 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; 351.2172 [M-H-H<sub>2</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>]<sup>+</sup></u>   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 28                            | <u>22.5</u> | <u>Гексадекадиеновая кислота</u>           | $C_{16}H_{28}O_2$           | <u>252.2089</u> | –                                      | –  | <u>251.2020</u><br>( <u>251.2017</u> ) |   | <u>ND</u> | ±  | ±         | ±         |
| 29                            | <u>23.8</u> | <u>Рангимуравьиновая кислота</u>           | $C_{21}H_{38}O_6$           | <u>386.2668</u> | –                                      | –  | <u>385.2595</u><br>( <u>385.2596</u> ) | <u>353.2330 [M-H-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>; 309.2499 [M-H-CH<sub>3</sub>OH-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; 265.2536 [M-H-CH<sub>3</sub>OH-2CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup></u> | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 30                            | <u>24.2</u> | <u>Роцелляровая кислота</u>                | $C_{19}H_{34}O_4$           | <u>326.2457</u> | –                                      | –  | <u>325.2386</u><br>( <u>325.2384</u> ) | <u>281.2483 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup></u>  | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 31                            | <u>24.3</u> | <u>Лихестериновая /Протолихестериновая</u> | $C_{19}H_{32}O_4$           | <u>324.2301</u> | –                                      | –  | <u>323.2227</u><br>( <u>323.2228</u> ) | <u>279.2326 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup></u>  | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 32                            | <u>24.5</u> | <u>кислоты</u>                             |                             |                 |  |  |  |   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| <u>Другие</u>                 |             |  |                             |                 |  |  |  |   |           |    |           |           |
| 33                            | <u>2.0</u>  | <u>Лимонная кислота</u>                    | $C_6H_8O_7$                 | <u>192.0270</u> | –                                      | –  | <u>191.0201</u><br>( <u>191.0197</u> ) | <u>111.0091 [M-CO<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup></u>  | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 34                            | <u>2.2</u>  | <u>Пироглутаминовая кислота</u>            | $C_5H_7NO_3$                | <u>129.0426</u> | <u>130.0503</u><br>( <u>130.0499</u> ) | <u>110.0239</u> ,<br><u>106.0291</u>   | <u>128.0356</u><br>( <u>128.0353</u> ) | –   | <u>ND</u> | ±  | ±         | ±         |
| 35                            | <u>2.8</u>  | <u>Фумаровая кислота</u>                   | $C_4H_4O_4$                 | <u>116.0110</u> | –                                      | –  | <u>115.0037</u><br>( <u>115.0037</u> ) | –   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 36                            | <u>7.9</u>  | <u>Бензойная кислота</u>                   | $C_7H_6O_2$                 | <u>122.0368</u> | <u>123.0440</u><br>( <u>123.0441</u> ) | <u>105.0699</u>  | <u>121.0295</u><br>( <u>121.0295</u> ) | –   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 37                            | <u>9.7</u>  | <u>Диэтилметилсукцинат</u>                 | $C_9H_{16}O_4$              | <u>188.1049</u> | –                                      | –  | <u>187.0977</u><br>( <u>187.0976</u> ) | –   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| 38                            | <u>3.5</u>  | <u>Кофейная кислота</u>                    | $C_7H_{14}O_7$              | <u>180.0841</u> | <u>181.0720</u>                        | –  | <u>177.0770</u><br>( <u>177.0768</u> ) | –   | ±         | ±  | ±         | ±         |
| <u>Неизвестные соединения</u> |             |  |                             |                 |  |  |  |   |           |    |           |           |
| 39                            | <u>5.8</u>  |  | $C_{16}H_{18}O_9$           | <u>354.0951</u> | <u>355.1025</u><br>( <u>355.1024</u> ) | –  | <u>353.0878</u><br>( <u>353.0878</u> ) | <u>233.0456, 205.0508</u>   | <u>ND</u> | ±  | <u>ND</u> | <u>ND</u> |
| 40                            | <u>6.0</u>  |  | $C_{22}H_{32}O_1$           | <u>520.1792</u> | <u>521.1865</u><br>( <u>521.1865</u> ) | <u>359.1337</u> ,<br><u>221.0506</u> ,<br><u>203.0699</u> ,<br><u>175.0752</u> | <u>519.1721</u><br>( <u>519.1719</u> ) | <u>399.1298, 267.0876, 237.0772</u> ,<br><u>195.0665</u>  | <u>ND</u> | ±  | <u>ND</u> | <u>ND</u> |
| 41                            | <u>8.5</u>  |  | $C_{23}H_{23}N$<br>$O_{11}$ | <u>489.1271</u> | <u>490.1349</u><br>( <u>490.1344</u> ) | <u>282.0972</u>  | <u>488.1203</u><br>( <u>488.1201</u> ) | <u>310.0725, 239.0712, 135.0453</u>   | ±         | ±  | ±         | ±         |

Продолжение таблицы 21

| 1  | 2           | 3 | 4   | 5               | 6                             | 7                                  | 8                             | 9   | 10        | 11        | 12        | 13        |
|----|-------------|---|---|-----------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 42 | <u>10.1</u> |   | <u>C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N</u><br><u>O<sub>14</sub></u> | <u>587.1275</u> | <u>588.1344</u><br>(588.1348) | <u>400.1036</u><br><u>285.0401</u> | <u>586.1204</u><br>(586.1202) | <u>470.1093, 426.1196, 352.1190,</u><br><u>310.0722, 195.0298, 135.0540</u>   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 43 | <u>10.3</u> |   | <u>C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N</u><br><u>O<sub>11</sub></u> | <u>503.1428</u> | <u>504.1504</u><br>(504.1500) | <u>400.1033</u><br><u>285.0402</u> | <u>502.1358</u><br>(502.1355) | <u>426.1193, 310.0720, 239.0710,</u><br><u>195.0299, 177.0191, 151.0401,</u><br><u>135.0451, 123.0452</u>   | <u>ND</u> | ±         | ±         | <u>ND</u> |
| 44 | <u>10.6</u> |   | <u>C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>0</u>  | <u>432.1056</u> | -                             | -                                  | <u>431.0986</u><br>(431.0984) | <u>373.0568 [M-H-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>;</u><br><u>357.0617 [M-H-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>;</u><br><u>313.0716 [M-H-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-</u><br><u>CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; 297.0760 [M-H-O-O-</u><br><u>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; 239.0713 [M-H-</u><br><u>O-O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>;</u><br><u>135.0454</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |
| 45 | <u>10.7</u> |   | <u>C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>3</u>  | <u>508.1217</u> | -                             | -                                  | <u>507.1150</u><br>(507.1149) | <u>311.0564, 239.0711, 149.0244</u>   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 46 | <u>10.9</u> |   | <u>C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub></u>              | <u>352.2250</u> | -                             | -                                  | <u>351.2179</u><br>(351.2179) | <u>275.1652</u>   | <u>ND</u> | ±         | <u>ND</u> | ±         |
| 47 | <u>12.0</u> |   | <u>C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>3</u>  | <u>530.1060</u> | -                             | -                                  | <u>529.0992</u><br>(529.0988) | <u>413.0879, 395.0774, 377.0667,</u><br><u>369.0983, 351.0875, 311.0563</u>   | <u>ND</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |
| 48 | <u>13.1</u> |   | <u>C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>0</u>  | <u>406.0900</u> | -                             | -                                  | <u>405.0832</u><br>(405.0827) | <u>373.0567 [M-H-H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>;</u><br><u>311.0565 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>-</u><br><u>CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; 239.0711, 195.0302,</u><br><u>151.0399</u>  | <u>ND</u> | ±         | ±         | <u>ND</u> |
| 49 | <u>13.3</u> |   | <u>C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>2</u>  | <u>488.0955</u> | -                             | -                                  | <u>487.0881</u><br>(487.0882) | <u>457.0777, 355.0455, 341.0666,</u><br><u>311.0559, 297.0766, 283.0607,</u><br><u>267.0653, 253.0868, 239.0710,</u><br><u>211.0758, 189.0556, 149.0243,</u><br><u>135.0451, 113.0245</u>   | <u>ND</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |
| 50 | <u>14.9</u> |   | <u>C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>0</u>  | <u>420.1056</u> | -                             | -                                  | <u>419.0986</u><br>(419.0984) | <u>387.0721, 311.0560, 239.0710,</u><br><u>195.0298, 151.0398</u>   | <u>ND</u> | ±         | ±         | <u>ND</u> |
| 51 | <u>15.3</u> |   | <u>C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub></u>              | <u>476.3349</u> | -                             | -                                  | <u>475.3280</u><br>(475.3276) | <u>265.1473, 249.1444, 211.1338,</u><br><u>199.1339, 183.1392, 167.1441,</u><br><u>157.1234, 121.1127</u>   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 52 | <u>15.5</u> |   |   |                 |                               |                                    |                               |   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 53 | <u>15.7</u> |   | <u>C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>0</u>  | <u>434.1213</u> | -                             | -                                  | <u>433.1139</u><br>(433.1140) | <u>401.0880, 311.0561, 267.0665,</u><br><u>239.0714, 195.0301, 149.0246,</u><br><u>105.0349</u>   | <u>ND</u> | ±         | <u>ND</u> | <u>ND</u> |

Продолжение таблицы 21

| 1  | 2            | 3  | 4  | 5               | 6                                      | 7               | 8                                      | 9   | 10  | 11        | 12        | 13        |           |
|----|--------------|--|--|-----------------|--|-----------------|--|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 54 | <u>15.8</u>  |  | <u>C<sub>29</sub>H<sub>57</sub>N</u><br><u>O<sub>9</sub></u> | <u>563.4033</u> | -                                      | -               | <u>562.3963</u><br>( <u>562.3961</u> ) | <u>333.2069, 265.1475</u>                               | ±   | ±         | ±         | ±         |           |
| 55 | <u>15.9</u>  |  | <u>C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>O<sub>1</sub></u>             | <u>468.1056</u> | -                                      | -               | <u>467.0988</u><br>( <u>467.0984</u> ) | <u>311.0560, 203.0714, 151.0401,</u><br><u>123.0454</u> | <u>ND</u>   | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |           |
| 56 | <u>16.6</u>  |  | <u>0</u>   |                 |  |                 |  |   | <u>ND</u>   | <u>ND</u> | <u>ND</u> | ±         |           |
| 57 | <u>17.6</u>  |  | <u>C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub></u>             | <u>446.3607</u> | <u>447.3681</u><br>( <u>447.3680</u> ) | -               |  | <u>445.3535</u><br>( <u>445.3535</u> )                  | <u>297.1528, 279.2326, 229.1446,</u><br><u>199.1337, 155.1440</u> | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 58 | <u>18.8</u>  |  | <u>C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub></u>             | <u>316.2038</u> | <u>317.2113</u><br>( <u>317.2111</u> ) | <u>299.2007</u> |  | <u>315.1964</u><br>( <u>315.1966</u> )                  | -   | <u>ND</u> | ±         | ±         | ±         |
| 59 | <u>18.83</u> |  | <u>C<sub>23</sub>H<sub>48</sub>O<sub>1</sub></u><br><u>6</u> | <u>580.2942</u> | -                                      | -               |  | <u>579.2846</u><br>( <u>579.2870</u> )                  | -   | ±         | <u>ND</u> | <u>ND</u> | <u>ND</u> |
| 60 | <u>22.9</u>  |  | <u>C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub></u>             | <u>342.277</u>  | -                                      | -               |  | <u>341.2698</u><br>( <u>341.2697</u> )                  | -   | ±         | ±         | ±         | ±         |
| 61 |              | <u>C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub></u> | <u>386.2457</u>  | -               | -                                      |                 | <u>385.2385</u><br>( <u>385.2384</u> ) | -   | ±   | ±         | ±         | ±         |           |

Некоторые из этих молекул, такие как предполагаемые вентозиновая кислота и рангимуравьиная кислота, содержат длинноцепочечные углеродные фрагменты, нередко функционализированные электроноакцепторными группами, включая карбоксильные и кетонные. Соединения под номерами 30–32, по-видимому, представляют собой производные, содержащие фурановое кольцо и полярные функциональные группы, и были интерпретированы как рокцелларовая кислота, а также лихестериновая и протолихестериновая кислоты. Общей чертой фрагментации этой группы соединений является последовательная потеря молекулы CO<sub>2</sub> и расщепление углеродной цепи, что характерно для алифатических кислот с различной степенью насыщенности.

*Прочие соединения*, представленные под номерами 33–37, были выявлены в составе экстрактов *C. islandica*. К данной группе относятся низкомолекулярные органические кислоты, такие как лимонная, пироглутаминовая, фумаровая и бензойная, которые не входят в основные классы идентифицированных веществ — депсидоны, депсиды, дибензофураны и алифатические кислоты. Их идентификация основана на данных о точной молекулярной массе и характерных фрагментных ионах, зафиксированных методом высокоразрешающей масс-спектрометрии.

*Неидентифицированные соединения*, обозначенные под номерами 38–61, были выявлены на основании молекулярной массы и предполагаемой формулы. Для всех зафиксированных неизвестных пиков были определены предполагаемые значения  $m/z$  и фрагментные ионы. Однако структурная идентификация этих соединений не представилась возможной в связи с отсутствием соответствующих данных в существующих спектральных библиотеках. Для окончательной верификации их структуры необходимы дополнительные инструментальные исследования, прежде всего с применением ядерного магнитного резонанса (ЯМР), а также других спектроскопических методов.

Таким образом, в результате комплексного исследования химического состава экстракта *Cetraria islandica*, проведенного с использованием современных физико-химических методов анализа (GC-MS, LC-DAD, LC-QToF-MS и HR-ESI-MS), удалось идентифицировать широкий спектр вторичных метаболитов. Всего было обнаружено 61 соединение, из которых 37 были охарактеризованы с высокой степенью достоверности. Основную часть идентифицированных веществ составили депсидоны, а также алифатические кислоты и липиды, среди которых встречались уникальные полигидроксилированные структуры. Дополнительно были выделены и подтверждены низкомолекулярные органические кислоты и углеводы, а также соединения, ранее не описанные для данного вида. Существенная доля (24 соединения) осталась неидентифицированной из-за ограниченности спектральных библиотек, что подчёркивает необходимость дальнейшего применения ЯМР-спектроскопии и других уточняющих методов для их структурной верификации. Полученные результаты демонстрируют высокую метаболическую сложность экстракта *C. islandica* и подтверждают

перспективность данного вида в качестве источника биологически активных соединений.

#### 4.5 Выделение индивидуальных веществ из экстракта *Cetraria islandica*

Для выделения индивидуальных веществ и разделения густого экстракта *Cetraria islandica* на основные фракции был использован метод вакуумной жидкостной хроматографии (VLC). Подготовка к хроматографии включала смешивание 18,73 г густого экстракта с 45 г силикагеля и 40 мл метанола с последующим испарением растворителя под вытяжкой до получения порошкообразной массы. Хроматографическая колонка длиной 61 см и диаметром 8,5 см заполнялась силикагелем до высоты 31 см и устанавливалась вертикально на штатив под вытяжным шкафом. После загрузки сухого экстракта в колонку и прикрытия его ватным слоем подключался вакуум для трамбовки сорбента. В качестве подвижной фазы использовались растворители, начиная с дихлорметана (DCM), смеси DCM–метанол (5 % и 10 %), а затем системой растворителей EtOAc–DCM–MeOH–H<sub>2</sub>O в соотношениях 15:8:4:1, 10:6:4:1 и 6:4:4:1. В завершение колонку промывали метанол (рисунок 35).

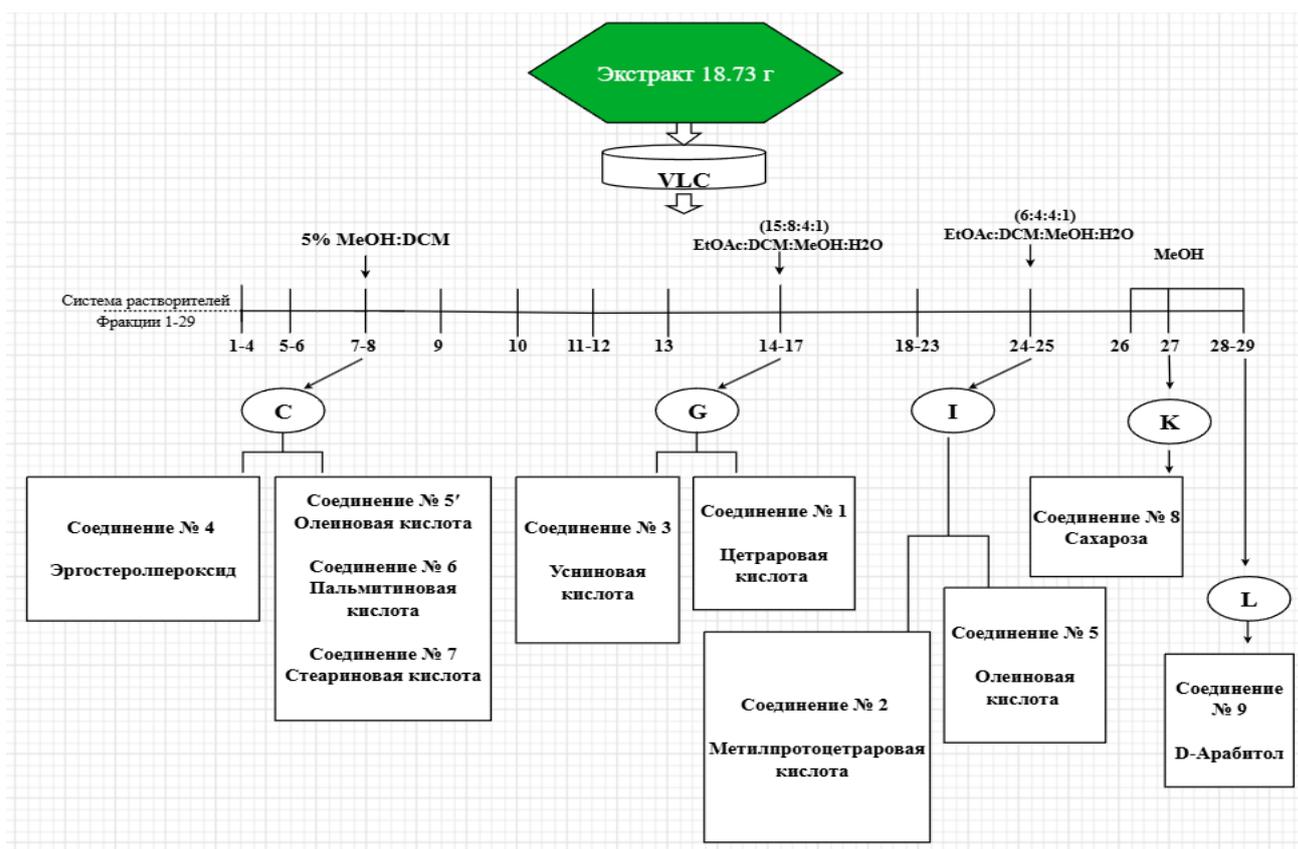


Рисунок 35 – Схема выделения индивидуальных соединений из экстракта *Cetraria islandica*

Фракции 14–17 были объединены в группу G (общая масса — 1,2 г) и подвергнуты дальнейшему хроматографическому разделению. Всего было получено 428 подфракций. Из них подфракции 82–88, элюированные системой EtOAc:DCM:MeOH:H<sub>2</sub>O (15:8:4:1), были идентифицированы как соединение № 1 — Цетрариновая кислота, что подтверждено методом тонкослойной хроматографии (рисунок 36).

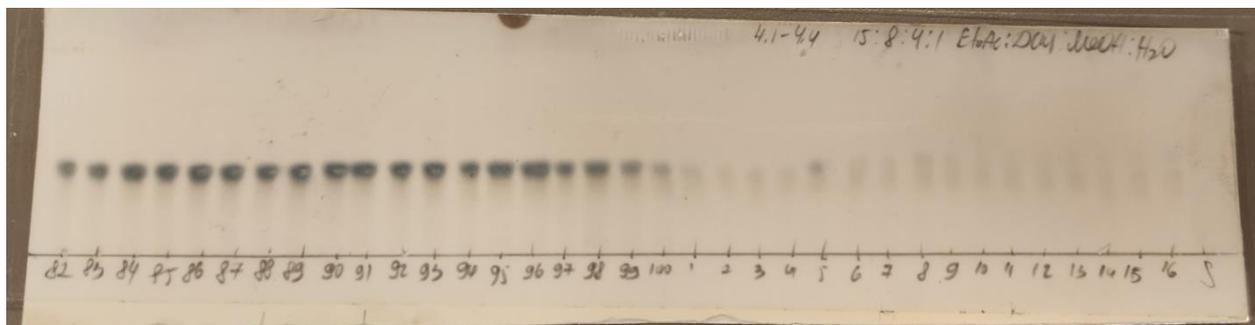


Рисунок 36 – ТСХ подфракции, полученные из фракции G - Цетрариновая кислота

Подфракции 150–170, полученные с использованием той же элюентной системы, оказались соединением № 3 - Усиновая кислота (рисунок 37).

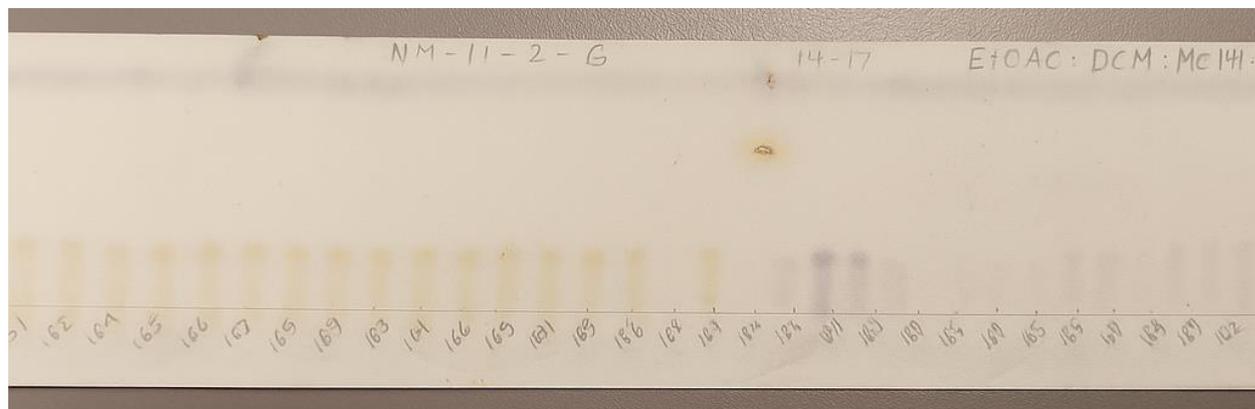


Рисунок 37 – ТСХ подфракции, полученные из фракции G – Усиновая кислота

Фракции 24–25 были объединены в группу I (общая масса — 2,38 г). Всего было получено 306 подфракций. Подфракция 58, элюированная системой EtOAc:DCM:MeOH:H<sub>2</sub>O (15:8:4:1), была идентифицирована как соединение № 5 — Олеиновая кислота (рисунок 38). Подфракции 175–200, полученные с использованием той же элюентной системы, содержали соединение № 2 — Метилпротоцетраровая кислота (рисунок 39).

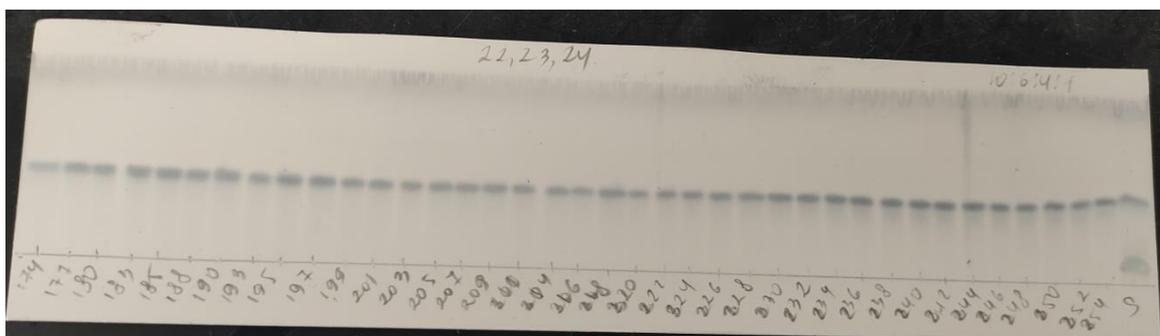


Рисунок 38 – ТСХ подфракции, полученные из фракции I – Метилпротоцетраровая кислота

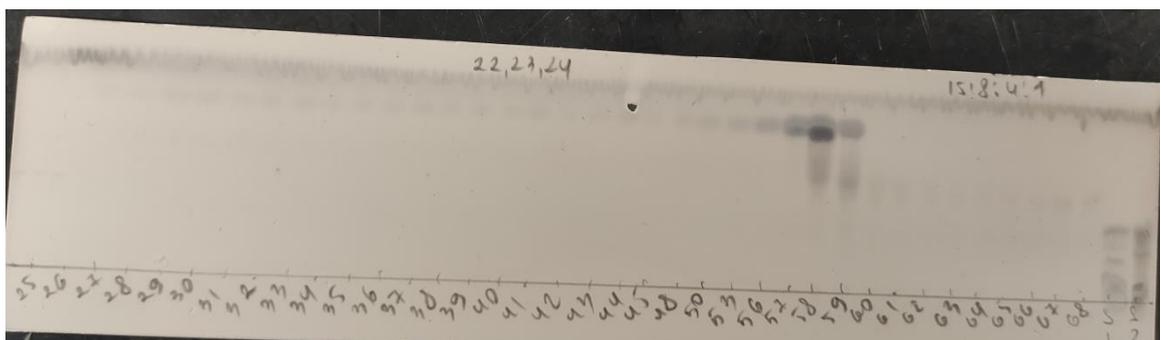


Рисунок 39 – ТСХ подфракции, полученные из фракции I – Олеиновая кислота

Фракции 7–8 были объединены в группу С (общая масса — 0,98 г) и подвергнуты хроматографическому разделению на сефадексе SorbaDex 20-LH с использованием метанола. Всего было получено 89 подфракций (рисунок 40).

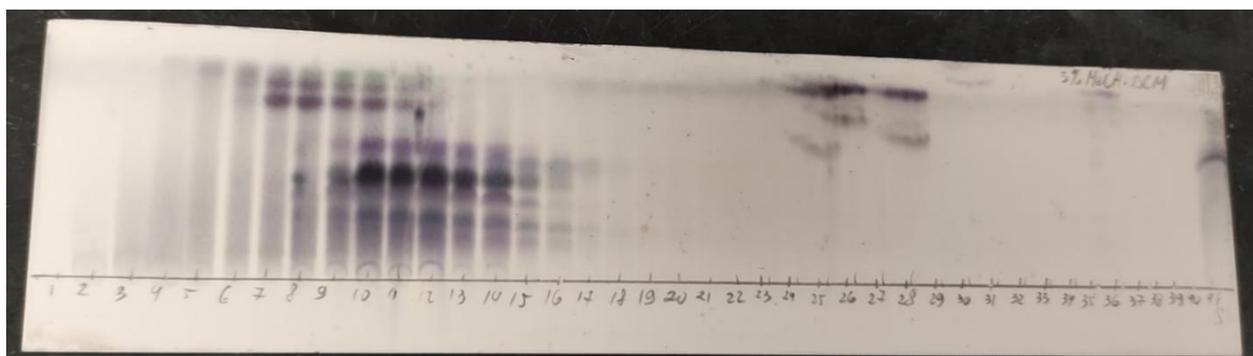


Рисунок 40 – ТСХ подфракции 6-15, полученные из фракции С

Подфракции 6–15 (масса — 0,86 г) были выделены для дальнейшего анализа и подвергнуты повторной колоночной хроматографии. Всего было получено 424 подфракции. Подфракция 116–126 кристаллическое соединение элюированная системой EtOAc:Hex (2:8), была идентифицирована как соединение № 4 — Эргостерол пероксид(рисунок 41). Подфракция 78–80, полученная при использовании того же элюента, содержала смесь жирных кислот:

Пальмитиновую, Стеариновую и Олеиновую (соединения № 5', 6 и 7) (рисунок 42).

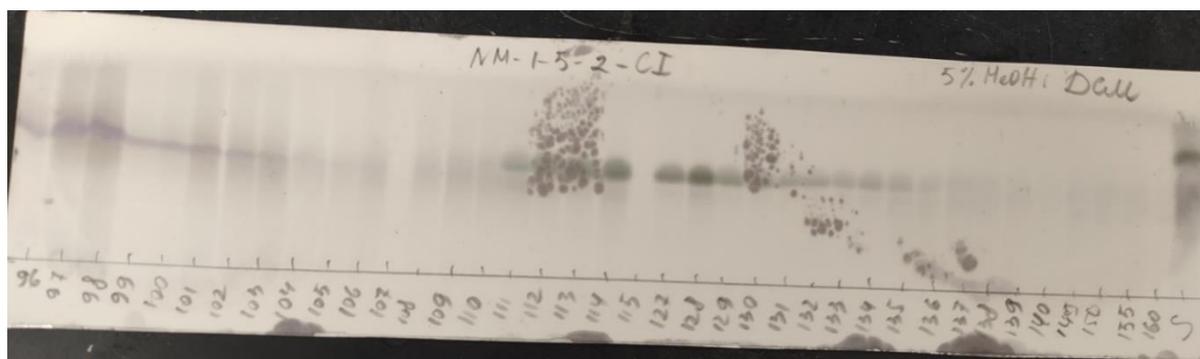


Рисунок 41 – ТСХ подфракции, полученные из фракции С – Эргостерол пероксид

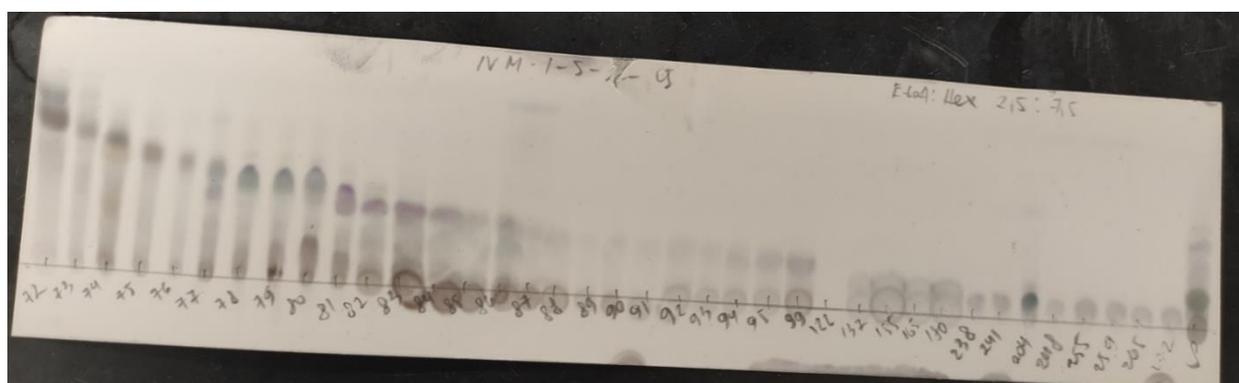


Рисунок 42 – ТСХ подфракции, полученные из фракции С – смесь жирных кислот: Пальмитиновая, Стеариновая и Олеиновая

Фракции К и L были идентифицированы как соединения № 8 — сахароза и № 9 — D-арабитол соответственно (рисунок 43).

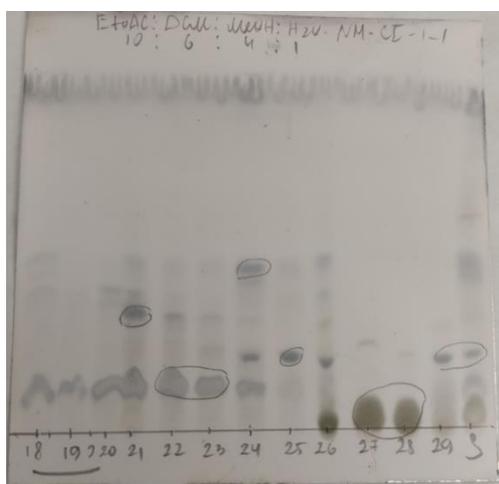


Рисунок 43 – ТСХ фракции № 27 и 29 – сахароза и D-арабитол

В результате хроматографического разделения густого экстракта *Cetraria islandica* методом вакуумной жидкостной хроматографии были успешно выделены и идентифицированы девять индивидуальных соединений: цетрариновая кислота, усниновая кислота, метилпротоцетраровая кислота, олеиновая кислота, эргостерол пероксид, смесь жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая и олеиновая), сахароза и D-арабитол. Использование различных элюентных систем и сорбентов (силикагель, сефадекс SorbaDex 20-LH) позволило получить высокую степень разделения фракций и провести качественную идентификацию соединений методом ТСХ, что подтверждает эффективность выбранной методологии и открывает перспективы для дальнейшей стандартизации и фармакологической оценки полученных веществ.

#### 4.6 Стандартизация экстракта *Cetraria islandica*

Стандартизация экстракта, полученного из растительного сырья *Cetraria islandica*, была проведена в соответствии с требованиями нормативных документов, включая Приказ МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «О правилах разработки производителем лекарственных средств и согласования государственного экспертного заключения по качеству лекарственных средств» (таблица 22).

Таблица 22 – Спецификация качества экстракта *Cetraria islandica*

| Показатели качества  | Нормы отклонений   | Методы испытаний  |
|--|--|---|
| Описание   | Тёмно-коричневая вязкая масса с характерным запахом и горьким вкусом. Консистенция тягучая, не растекающаяся при комнатной температуре. При хранении может наблюдаться образование небольшого осадка, допускаемого в рамках нормативной документации | Визуально<br>ГФ РК I, т. 2, <i>общая статья «Экстракты»</i> |
| Идентификация<br>- лишайниковые кислоты (усниновая кислота<br>-полифенольные соединения (кофейная кислота) | Время удерживания<br>22 мин<br>3.5 мин   | ВЭЖХ, ГФ РК I, т.1.2.2.29                                   |
| Сухой остаток  | Не менее 70 %  | ГФ РК I, т. 1, 2.8.16                                       |
| Тяжелые металлы:<br>Кадмий<br>Свинец   | не более 1,0 мг/кг<br>не более 6,0 мг/кг   | ГФ РК I, т. 1, 2.4.8<br><i>метод А</i>                      |

## Продолжение таблицы 22

| 1   | 2   | 3  |
|---|---|--|
| Ртуть<br>Мышьяк   | не более 0,1 мг/кг<br>не более 0,5 мг/кг  |  |
| Микробиологическая чистота  | Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4 категория 4В. В 1 г (мл) препарата допускается наличие не более $10^5$ жизнеспособных аэробных микроорганизмов, не более $10^4$ грибов, не более $10^3$ энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий<br>Не допускается наличие бактерий <i>Salmonella</i> в 10 г, <i>Escherichia coli</i> в 1 г. | ГФ РК I, т. 1, 2.6.12. и 2.6.13          |
| Количественное определение:<br>- сумма лишайниковых кислот (в пересчете на усниновую кислоту)<br>- полифенольные соединения (в пересчете на кофейную кислоту) | Не менее 2,0 %<br><br>Не менее 2 %  | ВЭЖХ, ГФ РК I, т.1.2.2.29                |
| Упаковка  | По 1 кг в тару потребительскую из полимерных материалов по ТУ 2293-003-54011141-06.   | В соответствии со спецификацией качества |
| Маркировка  | См. утвержденный макет упаковки.  | В соответствии со спецификацией качества |
| Транспортирование   | В соответствии с ГОСТ 17768-90  | ГОСТ 17768-90                            |
| Хранение  | Хранить в защищенном от света месте, при комнатной температуре  | В соответствии со спецификацией качества |
| Срок хранения   | 2 года  | В соответствии со спецификацией качества |
| Основное фармакологическое действие   | Противовоспалительное, противомикробное, антималярийное   |  |

Проведённая стандартизация густого экстракта *Cetraria islandica* показала, что все исследуемые показатели качества соответствуют установленным нормативным требованиям ГФ РК. Экстракт обладает стабильными физико-химическими свойствами, имеет подтверждённую идентичность по ключевым маркерам – усниновой и кофейной кислотам, соответствует требованиям по микробиологической чистоте и содержанию

тяжёлых металлов, обладает высоким содержанием сухого остатка ( $\geq 70\%$ ), что свидетельствует о его концентрированности и фармакологической ценности.

Данные параметры обеспечивают качество, безопасность и воспроизводимость экстракта и позволяют использовать его как стандартизованное действующее вещество при разработке лекарственных средств растительного происхождения с противовоспалительным, противомикробным и антималярийным действием.

#### 4.7 Изучение стабильности и определение сроков хранения экстракта *Cetraria islandica*

Стабильность экстракта *Cetraria islandica* является важным показателем его качества и эффективности, что необходимо для применения в медицинской практике и фармацевтической промышленности.

Эксперимент проводился при температуре  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $(60 \pm 5)\%$ . Для оценки стабильности были использованы три опытно-промышленные серии экстракта. В ходе исследования были изучены следующие показатели качества: описание, идентификация маркерных компонентов (в частности, усниновой кислоты), количественное содержание усниновой кислоты и микробиологическая чистота. Контроль качества образцов проводился на различных этапах с периодичностью 0, 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяца, в то время как для показателя микробиологической чистоты контроль осуществлялся на 0, 12 и 24 месяцах. Эта схема позволила достоверно подтвердить устойчивость активных компонентов экстракта на протяжении времени.

Для определения сроков хранения были проведены долгосрочные исследования стабильности, которые проводились на опытно-промышленных сериях (таблица 23), произведённых на базе ТОО «ПЛП Жанафарм». Экстракт был упакован по 1 кг в потребительскую тару из полимерных материалов с навинчивающимися полипропиленовыми крышками, обеспечивающими контроль за первым вскрытием упаковки.

Таблица 23 – Дизайн проведения долгосрочных испытаний стабильности экстракта *Cetraria islandica*

| Серийный номер | Название продукта                         | Дата выпуска | Количество образцов | График контроля стабильности (мес.). |
|----------------|---|--------------|---------------------|--------------------------------------|
| 01ЦИЭ/ОП-2021  | Густой экстракт <i>Cetraria islandica</i> | Март 2021    | 1 единица           | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24               |
| 02ЦИЭ/ОП-2021  | Густой экстракт <i>Cetraria islandica</i> | Март 2021    | 1 единица           | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24               |
| 03ЦИЭ/ОП-2021  | Густой экстракт <i>Cetraria islandica</i> | Март 2021    | 1 единица           | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24               |

Для проведения исследований стабильности экстракта *Cetraria islandica* в соответствии с законодательными требованиями был использован приказ МЗ РК от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020, который регламентирует порядок проведения исследований стабильности и определения срока годности

лекарственных средств. В ходе экспертизы качества экстракта применялись валидированные фармакопейные методики, что обеспечило высокую точность и достоверность полученных результатов.

В приложении У представлены данные, полученные в ходе исследований стабильности экстракта *Cetraria islandica*, проведённых в рамках оценки качества. Эти данные включают результаты физико-химических и микробиологических испытаний в соответствии с установленными спецификациями.

Согласно результатам долгосрочных испытаний стабильности предполагаемый срок хранения экстракта *Cetraria islandica* составляет 2 года (Приложение У).

### **Выводы по четвертому разделу**

В рамках разработки технологии получения и стандартизации экстракта *Cetraria islandica* особое внимание уделено заготовке и подготовке сырья, включающей взвешивание, измельчение и просеивание в соответствии с нормативами МЗ РК, что обеспечило однородность материала и эффективность извлечения биологически активных веществ. Процесс экстракции реализован с использованием различных методов экстракции, включая дробную мацерацию, ультразвуковую мацерацию и перколяцию. По результатам экспериментальных исследований установлено, что наиболее оптимальным экстрагентом является 70 % этанол, обеспечивающий максимальный выход экстрактивных веществ и высокий уровень извлечения ключевых компонентов, в частности усниновой кислоты. Применение ультразвуковой мацерации с частотой 40 кГц продемонстрировало значительное увеличение выхода действующих веществ по сравнению с традиционными методами, что свидетельствует о её высокой эффективности.

Валидация технологического процесса была проведена на производственной площадке ТОО «ПЛП Жанафарм». Контроль осуществлялся на всех критически значимых этапах: от оценки качества экстрагента до параметров экстракции и упаковки. Контроль технологического процесса на всех критически значимых этапах – от оценки качества экстрагента до упаковки – показал стабильность и воспроизводимость параметров, что обеспечивает надёжность и высокое качество получаемого экстракта. Это, в свою очередь, является необходимым условием обеспечения высокого и стабильного качества получаемого экстракта.

Фитохимическое исследование экстракта *Cetraria islandica* позволило выявить основные группы биологически активных соединений, характерные для данного вида лишайников. С использованием спектрофотометрических и хроматографических методов подтверждено присутствие усниновой кислоты, фенольных соединений, флавоноидов и полисахаридов. Количественное определение показало, что содержание усниновой кислоты в пересчёте на сухое вещество составляет не менее 2,0 %, содержание полифенольных соединений в пересчёте на кофейную кислоту – 1,5 %, а сумма полисахаридов в пересчёте на

на глюкозу – не менее 40 %. Такие значения свидетельствуют о насыщенности экстракта фармакологически активными компонентами и подтверждают его потенциал в качестве эффективного противомикробного, противовоспалительного и антималярийного средства. Выявленные соединения могут служить маркерами при стандартизации и контроле качества экстракта на стадии промышленного производства.

Стандартизация готового экстракта осуществлялась в соответствии с требованиями ГФ РК. Оценивались показатели микробиологической чистоты, содержания посторонних примесей, уровня тяжёлых металлов и количественного содержания активных фармацевтических субстанций. Все исследованные параметры соответствовали установленным нормативам, что свидетельствует о высоком качестве экстракта и его соответствии критериям фармакопейной субстанции.

Долгосрочные испытания стабильности экстракта *Cetraria islandica* проводились в условиях, отвечающих актуальным требованиям к хранению растительных субстанций. В течение 24 месяцев при температуре  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $(60 \pm 5)\%$  экстракт сохранял физико-химические и микробиологические характеристики. Количественное содержание усниновой кислоты оставалось стабильным на всём протяжении наблюдения, что подтверждает его однородность и устойчивость к хранению.

Таким образом, проведённые исследования позволяют заключить, что 70 % спиртовый экстракт *Cetraria islandica* представляет собой стандартизованную активную фармацевтическую субстанцию растительного происхождения, соответствующую современным требованиям фармакопейных стандартов. Полученные данные подтверждают её фармакологическую активность и обосновывают целесообразность дальнейшего применения в составе лекарственных средств растительного происхождения.

## 5 НЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСТРАКТА *CETRARIA ISLANDICA*: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ

### 5.1 Изучение противовоспалительной активности экстракта *Cetraria islandica*

Экспериментальные исследования проводились на базе Научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атчабарова. Все процедуры выполнялись в соответствии с методическими рекомендациями, утверждёнными фармакологическим комитетом РК, с соблюдением международных принципов гуманного обращения с лабораторными животными [137].

В исследовании использовались белые беспородные крысы-самцы массой 130–180 г, разделённые на 5 групп по 6 животных в каждой. До начала эксперимента животные содержались в условиях вивария при температуре  $22 \pm 2$  °С, относительной влажности 50–60% и 12-часовом световом режиме, с доступом к стандартному гранулированному корму и воде.

Противовоспалительная активность экстракта *Cetraria islandica* оценивалась в модели острого экссудативного воспаления, индуцированного субплантарным введением 0,1 мл 2% раствора формалина в заднюю лапу крысы.

Животным вводили препараты следующим образом:

- Экспериментальные группы получали экстракт *Cetraria islandica* перорально через зонд в дозах 500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг за 1 час до индукции воспаления.

- Контрольная группа получала только 0,1 мл 2% раствора формалина.

- Сравнительная группа получала ибупрофен в виде суспензии в дозировке 100 мг/5 мл.

В ходе эксперимента было установлено, что при введении 0,1 мл 2% раствора формалина в контрольной группе наблюдается выраженный отёк (83,67%), что свидетельствует о воспалении.

Оценка объёма отёка проводилась с использованием плетизмометра до введения формалина и через 1, 2, 3 и 4 часа после индукции воспаления. Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента для определения статистической значимости различий между группами (таблица 24).

Таблица 24 – Влияние экстракта *Cetraria islandica* на объём формалинового отёка у белых крыс

| № | Группа                       | Кол-во животных | Доза, мг/кг | мл (фон)   Объём лапки крысы, мл (через 3 часа) | Объём лапки крысы, мл (через 3 часа) | Уменьшение отёка, % | Статистическая значимость |
|---|------------------------------|-----------------|-------------|---|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1 | Экстракт <i>C. islandica</i> | 6               | 500         | 1,03  | 1,75                                 | 69,90               | p < 0,05                  |
| 2 | Экстракт <i>C. islandica</i> | 6               | 2000        | 0,97  | 1,59                                 | 63,92               | p < 0,05                  |
| 3 | Экстракт <i>C. islandica</i> | 6               | 5000        | 1,06  | 1,56                                 | 47,17               | p < 0,01                  |
| 4 | Ибупрофен (сравнение)        | 6               | 100 мг/5 мл | 0,98  | 1,27                                 | 29,59               | p < 0,01                  |
| 5 | Контрольная                  | 6               | 0           | 0,98  | 1,80                                 | 83,67               | -                         |

Экстракт *Cetraria islandica* продемонстрировал дозозависимую противовоспалительную активность. Уменьшение отёка наблюдалось в следующих пропорциях:

1. Экстракт *Cetraria islandica* (500 мг/кг): снижение отёка на 14% (69,90%).
2. Экстракт *Cetraria islandica* (2000 мг/кг): снижение отёка на 20% (63,92%).
3. Экстракт *Cetraria islandica* (5000 мг/кг): наибольшее снижение отёка на 37% (47,17%).

Сравнительная группа, получавшая ибупрофен, продемонстрировала снижение отёка на 70% по сравнению с контролем (p < 0,01), что сопоставимо с эффектом экстракта в дозе 5000 мг/кг.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований. Так, в исследовании, опубликованном в PubMed, сообщается, что водный экстракт *Cetraria islandica* обладает противовоспалительным эффектом, снижая проявления артрита у крыс. Механизм действия связан с модуляцией секреции цитокинов: увеличение уровня IL-10 и снижение IL-12p40, что указывает на иммуносупрессивное и противовоспалительное действие экстракта.

Кроме того, исследования показывают, что экстракты *Cetraria islandica* обладают антиоксидантной активностью, что может способствовать снижению воспалительных процессов.

Таким образом, экстракт *Cetraria islandica* демонстрирует противовоспалительную активность. Механизм действия, вероятно, связан с модуляцией иммунного ответа и антиоксидантными свойствами экстракта. Дальнейшие исследования необходимы для более детального понимания механизмов действия и потенциального клинического применения экстракта *Cetraria islandica* в качестве противовоспалительного средства.

На основании данных, представленных в таблице 27, был построен график, демонстрирующий изменения объёма формалинового отёка лап крыс после введения экстракта *Cetraria islandica* в различных дозах, а также ибупрофена и контрольной группы. График отображает сравнительный анализ объёма отёка до введения формалина (серые столбики) и через 3 часа после индукции воспаления (рисунок 44).

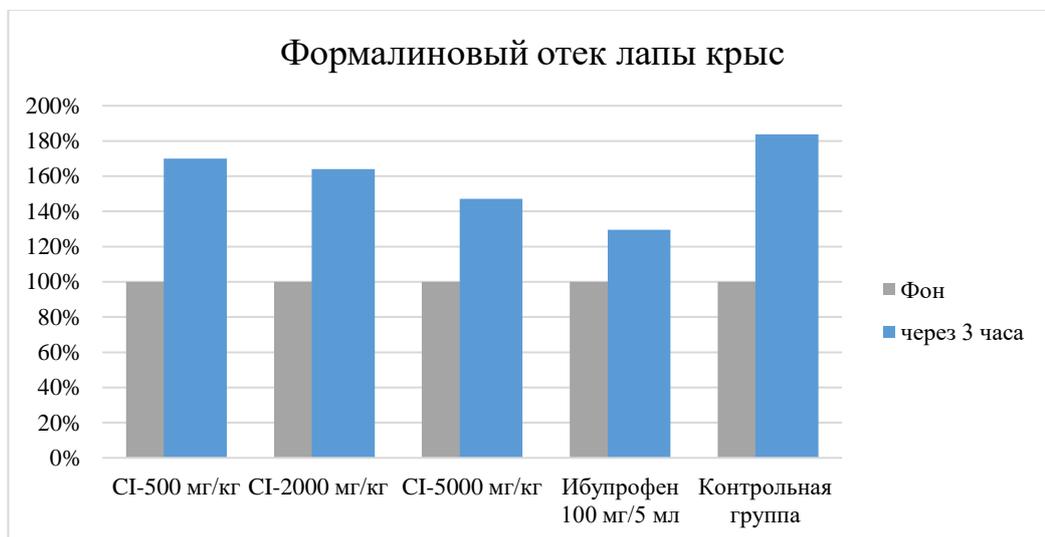


Рисунок 44 – Сравнительные результаты эксперимента по определению противовоспалительного эффекта экстракта *Cetraria islandica* у белых крыс

График иллюстрирует динамику формалинового отёка лап крыс через 3 часа после введения экстракта *Cetraria islandica* в разных дозах, а также ибупрофена и контрольной группы. Серый столбик показывает объём отёка до введения формалина (фон), а синий – после 3 часов. Данные демонстрируют, что экстракт *Cetraria islandica* в дозах 500, 2000 и 5000 мг/кг снижает объём отёка, особенно в высокой дозировке 5000 мг/кг, что свидетельствует о его противовоспалительной активности по сравнению с контрольной группой.

## 5.2 Изучение антимикробной, противогрибковой и антималярийной активности экстракта *Cetraria islandica*

Изучение антимикробной, антимикотической и антималярийной активности экстрактов *Cetraria islandica* проводилось на базе Национального центра по исследованию природных продуктов (The National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, США). Для оценки биологической активности были исследованы три экстракта, полученные методом мацерации: ацетоновый экстракт, этанольный экстракт на 95% спирте и этанольный экстракт на 70% спирте. Все экстракты были стандартизированы по содержанию сухого остатка и протестированы в идентичных условиях.

*Антималярийная активность.* Оценка антималярийного действия проводилась в отношении двух лабораторных штаммов *Plasmodium falciparum*: D6 (чувствительный к хлорохину) и W2 (устойчивый к хлорохину). Значения IC<sub>50</sub>

определялись спектрофотометрически и выражались как в нг/мл, так и в пересчёте на мкг/мл (таблица 25).

Таблица 25 – Результаты антималярийного скрининга экстрактов *Cetraria islandica*

| Фракция                   | Штамм | IC <sub>50</sub> (нг/мл) | IC <sub>50</sub> (мкг/мл) | Примечания                 |
|---------------------------|-------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Ацетоновый экстракт       | D6    | 45 626,3                 | 45,626                    | Чувствительный к хлорохину |
|                           | W2    | 16 231,4                 | 16,231                    | Устойчивый к хлорохину     |
| Этанольный экстракт (70%) | D6    | 21 034,7                 | 21,035                    | Чувствительный к хлорохину |
|                           | W2    | 12 004,9                 | 12,005                    | Устойчивый к хлорохину     |
| Этанольный экстракт (95%) | D6    | 22 040,2                 | 22,040                    | Чувствительный к хлорохину |
|                           | W2    | 12 880,3                 | 12,880                    | Устойчивый к хлорохину     |

Наиболее выраженную антималярийную активность продемонстрировал ацетоновый экстракт, особенно в отношении устойчивого штамма W2. Однако, согласно требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан, ацетон не допускается в качестве растворителя при получении активных фармацевтических субстанций, что исключает его практическое применение.

Среди спиртовых экстрактов 70% этанольный экстракт проявил активность, сопоставимую с 95% спиртовым экстрактом, с незначительным снижением показателей IC<sub>50</sub>. При этом 70% этанол обеспечивает оптимальный профиль извлечения как полярных, так и частично неполярных соединений, и соответствует требованиям ГФ РК. Это делает 70% спиртовой экстракт обоснованным выбором в качестве активной фармацевтической субстанции (АФС), принимая во внимание фармакопейные, токсикологические и технологические аспекты.

#### *Изучение антимикробной и противогрибковой активности экстракта Cetraria islandica*

В рамках третичного этапа антимикробного скрининга (OI) чистые соединения, выделенные из экстракта *Cetraria islandica*, были подвергнуты оценке их активности в отношении десяти клинически значимых микроорганизмов, включая пять бактериальных и пять грибковых штаммов. Испытания проводились при концентрациях от 20 до 0,02 мкг/мл. В ходе анализа определялись значения IC<sub>50</sub>, минимальной ингибирующей концентрации (MIC), а также минимальной бактерицидной (MBC) или фунгицидной (MFC) концентрации для каждого тестируемого микроорганизма.

Значение MIC отражает наименьшую концентрацию соединения, необходимую для полного подавления видимого роста микроорганизма после инкубации. Однако наличие MIC не всегда свидетельствует о гибели клеток; микроорганизмы могут оставаться жизнеспособными, хотя и не размножающимися. Поэтому дополнительно определяются значения MBC или MFC, которые представляют собой наименьшие концентрации, обеспечивающие 99,9% снижение жизнеспособности исходной популяции микроорганизмов, что

указывает на их бактерицидную или фунгицидную активность. Все значения IC<sub>50</sub> рассчитывались с использованием программного обеспечения XLFit, обеспечивающего точную обработку дозозависимых кривых и надежную интерпретацию полученных данных.

Антимикробный и противогрибковый скрининг (OI) представляет собой важный этап в оценке биологической активности природных соединений и экстрактов. В рамках данного исследования были протестированы образцы на их способность ингибировать рост ряда патогенных микроорганизмов, включая бактерии и грибы, значимые для клинической практики.

Тестируемые микроорганизмы:

Бактерии: *Staphylococcus aureus* (включая метициллин-резистентный штамм MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium intracellulare*.

Грибы: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*.

Для оценки антимикробной активности использовались методы определения минимальной ингибирующей концентрации (MIC) и минимальной бактерицидной/фунгицидной концентрации (MBC/MFC). MIC определяется как наименьшая концентрация вещества, предотвращающая видимый рост микроорганизмов, тогда как MBC/MFC - минимальная концентрация, вызывающая гибель микроорганизмов. Эти параметры позволяют количественно оценить эффективность исследуемых соединений и их потенциал в качестве антимикробных агентов.

Этот процесс включает несколько этапов:

Первичный скрининг: образцы тестируются на ингибирование роста микробов при концентрации 50 мкг/мл, и если ингибирование составляет  $\geq 50\%$ , то экстракты переходят к более глубокому анализу.

Вторичный анализ: дальнейшее тестирование образцов при более низких концентрациях, с расчетом IC<sub>50</sub> для всех 10 микробных штаммов, и подробной информацией о минимальной ингибирующей концентрации (MIC) и минимальной бактерицидной или фунгицидной концентрации (MBC или MFC).

Третичный анализ: более тщательное тестирование чистых соединений на 10 микробных штаммов с определением IC<sub>50</sub>, MIC и MFC/MBC на разных концентрациях.

Этот скрининг используется для оценки активности экстрактов и соединений против различных бактерий и грибов, в том числе таких патогенов, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и другие. Это исследование является частью разработки антибактериальных и противогрибковых средств (таблицы 26, 27).

Полученные результаты демонстрируют, что все три исследуемых экстракта *Cetraria islandica* (ацетоновый, этанольный 70% и 95%) обладают выраженной антимикробной и антимикотической активностью, однако выраженность действия варьирует в зависимости от штамма и природы растворителя.

Таблица 26 – Антимикробная активность экстракта *Cetraria islandica*

| Фракция                   | Микроорганизмы                      | МИС, мкг/мл | МВС, мкг/мл | Примечания                                   |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--|
| Ацетоновый экстракт       | <i>Staphylococcus aureus</i>        | 50          | 100         | Эффективен против грамположительных бактерий |
|                           | <i>Escherichia coli</i>             | 40          | 80          | Показал умеренную активность                 |
|                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 60          | 120         | Высокая резистентность                       |
|                           | <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 70          | 140         | Слабая активность                            |
| Этанольный экстракт (70%) | <i>Staphylococcus aureus</i>        | 28          | 56          | Высокая эффективность                        |
|                           | <i>Escherichia coli</i>             | 23          | 46          | Активен против грамотрицательных             |
|                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 50          | 100         | Сравнимая активность с 70%                   |
|                           | <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 60          | 120         | Умеренная активность                         |
| Этанольный экстракт (95%) | <i>Staphylococcus aureus</i>        | 30          | 60          | Высокая эффективность                        |
|                           | <i>Escherichia coli</i>             | 25          | 50          | Наиболее активен среди тестируемых бактерий  |
|                           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | 55          | 110         | Резистентность на уровне                     |
|                           | <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 65          | 130         | Умеренная активность                         |

Таблица 27 – Антимикотическая активность экстракта *Cetraria islandica*

| Фракция                   | Микроорганизм                  | МИС, мкг/мл | МФС, мкг/мл | Примечания                                 |
|---------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|--|
| Ацетоновый экстракт       | <i>Candida albicans</i>        | 50          | 100         | Эффективен против грибка                   |
|                           | <i>Candida glabrata</i>        | 40          | 80          | Показал умеренную активность               |
|                           | <i>Candida krusei</i>          | 60          | 120         | Высокая резистентность                     |
|                           | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 70          | 140         | Слабая активность                          |
|                           | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 55          | 110         | Умеренная активность                       |
| Этанольный экстракт (70%) | <i>Candida albicans</i>        | 28          | 55          | Высокая эффективность                      |
|                           | <i>Candida glabrata</i>        | 23          | 43          | Наиболее активен среди тестируемых грибков |
|                           | <i>Candida krusei</i>          | 32          | 64          | Умеренная активность                       |

Продолжение таблицы 27

| 1                         | 2                              | 3  | 4  | 5  |
|---------------------------|--------------------------------|----|----|--|
|                           | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 42 | 86 | Эффективен, но требует повышения дозировки |
|                           | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 38 | 74 | Показал высокую резистентность             |
| Этанольный экстракт (95%) | <i>Candida albicans</i>        | 30 | 60 | Высокая эффективность                      |
|                           | <i>Candida glabrata</i>        | 25 | 50 | Наиболее активен среди тестируемых грибов  |
|                           | <i>Candida krusei</i>          | 35 | 70 | Умеренная активность                       |
|                           | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 45 | 90 | Эффективен, но требует повышения дозировки |
|                           | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 40 | 80 | Показал высокую резистентность             |

Ацетоновый экстракт продемонстрировал удовлетворительную антимикробную и антимикотическую активность, особенно в отношении грамположительных бактерий и грибов рода *Candida*. Однако его использование ограничено требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан, запрещающими использование ацетона при получении активных фармацевтических субстанций (АФС).

Сравнительный анализ спиртовых экстрактов показал, что 95% этанольный экстракт, как и ожидалось, проявил высокую активность, особенно против *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Candida glabrata*. Однако 70% спиртовой экстракт продемонстрировал лишь незначительно уступающие показатели MIC и MBC/MFC, что позволяет рассматривать его как сопоставимо эффективный.

Таким образом, учитывая фармакопейные нормы, технологические аспекты производства и полученные данные по биологической активности, 70% спиртовой экстракт *Cetraria islandica* может быть рекомендован в качестве активной фармацевтической субстанции природного происхождения для разработки антимикробных и противогрибковых препаратов.

### 5.3 Оценка токсичности экстракта *Cetraria islandica*

Исследования острой и подострой токсичности, а также аллергизирующего потенциала и противовоспалительной активности экстракта *Cetraria islandica* проводились на базе научного учреждения (НИИ фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атчабарова) с соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики (GLP), что обеспечило надёжность и воспроизводимость результатов.

В качестве экспериментальных животных использовали белых мышей (нелинейных), однородных по массе (21–36 г), возрасту и полу. Всего в исследование было включено 24 особи. Эксперименты проводились в соответствии с методическими указаниями Мироновой А.Н., что обеспечивало стандартные условия для всех тестов и соблюдение этических принципов работы с животными. Тесты проводились в условиях, соответствующих требованиям стандартов надлежащей лабораторной практики (GLP), что гарантировало высокое качество и достоверность полученных данных (рисунок 45).



Рисунок 45 – Контейнеры с лабораторными животными, разделёнными по дозам экстракта *Cetraria islandica* (L.) Ach. (500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг)

Животные были разделены на три группы по 24 особи, каждая группа получала разные дозы экстракта *Cetraria islandica*: 500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг для изучения острой и подострой токсичности. В каждой дозировочной группе мыши дополнительно делились на подгруппы: по три особи для определения токсичности и две для контрольной группы, которой вводилось индифферентное вещество (очищенная вода).

Перед началом эксперимента все животные прошли двухнедельный карантин и содержались в условиях вивария с доступом к стандартному рациону питания и воде. Для облегчения идентификации в процессе исследования мыши были индивидуально помечены на различных участках тела, что позволило отслеживать реакцию на вводимый экстракт.

С целью оценки острой токсичности экстракт *Cetraria islandica* вводили один раз внутрь через зонд в виде водной суспензии в дозировках 500, 2000 и 5000 мг/кг. Подострую токсичность изучали при ежедневном введении экстракта тем же способом в течение 28 суток.

На протяжении всего периода наблюдения ежедневно отслеживали общее состояние животных: потребление пищи и воды, поведение, дыхание, двигательную активность, внешний вид шерстного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек. Также фиксировались физиологические показатели — частота мочеиспускания, консистенция и объем фекалий, цвет мочи. Оценка токсичности базировалась на изменениях клинического состояния, летальности и колебаниях массы тела.

В первый день животные находились под непрерывным наблюдением, а в последующие дни оценка их состояния проводилась ежедневно в одно и то же время — в конце рабочего дня.

Для оценки состояния использовались методы «вертикальной двигательной активности в ограниченном пространстве» и «открытой площадки». Регулярно фиксировались интенсивность и характер двигательной активности, наличие замедленных реакций, а также координация движений. В дополнение отслеживались признаки вегетативной активности, такие как дефекация, мочеиспускание, почесывание и умывание, с количественной регистрацией каждого из этих параметров.

Оценка состояния животных проводилась с использованием методов «вертикальной двигательной активности в ограниченном пространстве» и «открытой площадки». Регулярно отмечались интенсивность и характер двигательной активности, наличие заторможенности реакций, координация движений. Параллельно фиксировались проявления вегетативной деятельности (дефекация, мочеиспускание, почесывание, умывание и др.) с количественным учетом каждого параметра.

Чувствительность животных к внешним раздражителям оценивалась с помощью реакций на тактильные, болевые, звуковые и световые стимулы. Реакция на звуковой раздражитель (резкое постукивание по клетке) проявлялась в виде вздрагивания, мигания или других видов двигательной активности. Для определения световой чувствительности использовался карманный фонарик, направленный на глаза животных; в ответ наблюдалось смыкание век и сокращение круговой мышцы глаза (зажмуривание). При воздействии тактильных и болевых стимулов (сжатие прикорневой части хвоста, раздражение острым стилетом) оценивалась сохранность болевой чувствительности.

*Острая токсичность экстракта.* После однократного внутрижелудочного введения экстракта *Cetraria islandica* в различных дозировках (500, 2000 и 5000 мг/кг) проводилась оценка состояния животных на предмет проявлений заторможенности, признаков интоксикации, таких как снижение аппетита, вялость, учащённое дыхание и гиподинамия. При наличии изменений фиксировались сроки их обратимости.

В течение эксперимента не наблюдалось каких-либо изменений со стороны внешнего вида, поведения и активности животных. Все подопытные животные вели себя аналогично контрольной группе, которой вводили очищенную воду в эквивалентном объёме. Результаты исследования острой токсичности представлены в таблице 28.

Во время всего периода наблюдения животные оставались активными, демонстрировали стабильный аппетит и адекватную реакцию на звуковые и световые раздражители. Физиологические процессы мочеиспускания и дефекации происходили без отклонений. Не отмечалось появления судорог, нарушений дыхания или других признаков токсического воздействия.

Таблица 28 – Показатели выживаемости животных при изучении острой токсичности экстракта *Cetraria islandica*

| № группы | Кол-во животных | Исследуемое вещество                | Доза, мг/кг | Летальность |
|----------|-----------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| I        | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 500         | 0/3         |
| II       | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 2000        | 0/3         |
| III      | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 5000        | 0/3         |
| IV       | 2               | Вода очищенная (контрольная группа) | -           | 0/2         |

*Подострая токсичность экстракта.* При исследовании подострой токсичности экстракт *Cetraria islandica* в разных дозировках вводился перорально ежедневно в течение 28 дней. Оценка состояния животных проводилась на протяжении всего эксперимента. Установлено, что в группе III, получавшей максимальную дозу (5000 мг/кг), наблюдалась временная повышенная двигательная активность в течение 60 минут после введения препарата. В остальном все физиологические показатели у животных всех экспериментальных групп оставались в пределах нормы (таблица 29).

Таблица 29 – Показатели выживаемости животных при изучении подострой токсичности экстракта *Cetraria islandica*

| № группы | Кол-во животных | Исследуемое вещество                | Доза, мг/кг | Летальность |
|----------|-----------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| I        | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 500         | 0/3         |
| II       | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 2000        | 0/3         |
| III      | 3               | Экстракт <i>Cetraria islandica</i>  | 5000        | 0/3         |
| IV       | 2               | Вода очищенная (контрольная группа) | -           | 0/2         |

Масса тела животных является ключевым интегральным показателем, позволяющим оценить общее состояние организма. В ходе проведенного эксперимента не было зафиксировано изменений массы тела, которые могли бы указывать на токсическое воздействие экстракта.

При оценке острой токсичности снижение массы тела у животных могло бы свидетельствовать о наличии системного токсического эффекта. Однако полученные результаты эксперимента показали, что в течение всего периода наблюдения масса тела в опытных группах не отличалась от массы тела животных контрольной группы. Все животные, включая мышей из опытных групп, продемонстрировали прирост массы тела, что подтверждается данными, представленными в таблицах 30 и 31.

Результаты эксперимента показывают отсутствие выраженных патологических изменений в организме животных, что свидетельствует о низкой токсичности исследуемого экстракта *Cetraria islandica* как в остром, так и в подостром моделировании токсичности. Во всех группах, независимо от

Таблица 30 – Динамика массы тела животных при изучении острой токсичности

| № группы         | Динамика массы, сутки после начала опыта |               |              |               | Прирост массы тела, г |
|------------------|--|---------------|--------------|---------------|-----------------------|
|                  | Фон                                      | Через 24 часа | Через 7 дней | Через 14 дней |                       |
| I                | 27,7±0,5                                 | 28±0,7        | 28,8±0,4     | 29,0±0,6      | +1,3                  |
| II               | 27,3±0,6                                 | 27,8±0,5      | 28,5±0,2     | 28,8±0,3      | +1,5                  |
| III              | 29,3±0,1                                 | 29,9±0,3      | 31±0,4       | 31,2±0,1      | +1,9                  |
| IV<br>(контроль) | 32,3                                     | 33,4          | 33,8         | 34,0          | +1,7                  |

Таблица 31 – Динамика массы тела животных при изучении подострой токсичности

| № группы         | Динамика массы, сутки после начала опыта |               |              |               |               | Прирост массы тела, г |
|------------------|--|---------------|--------------|---------------|---------------|-----------------------|
|                  | Фон                                      | Через 24 часа | Через 7 дней | Через 14 дней | Через 28 дней |                       |
| I                | 32,3±0,2                                 | 33±0,4        | 33,6±0,2     | 34,2±0,5      | 36,5±0,3      | +4,2                  |
| II               | 30,3±0,3                                 | 30,7±0,1      | 31,5±0,4     | 32,2±0,7      | 36,2±0,1      | +5,9                  |
| III              | 24,6±0,4                                 | 24,8±0,2      | 25,4±0,4     | 26,1±0,1      | 30,3±0,5      | +5,7                  |
| IV<br>(контроль) | 31,3                                     | 31,8          | 32,9         | 34,4          | 37,4          | +6,1                  |

дозировки, животные оставались активными, без признаков интоксикации или нарушений со стороны жизненно важных систем, таких как дыхательная, сердечно-сосудистая и центральная нервная система. Также не были выявлены изменения состояния волосяного покрова и слизистых оболочек, что указывает на отсутствие выраженного воздействия на кожные и слизистые ткани.

Уровень потребления корма и воды оставался стабильным, что также является индикатором отсутствия нарушений в общем состоянии животных, так как токсические воздействия часто сопровождаются снижением аппетита или обезвоживанием.

Динамика массы тела в ходе эксперимента свидетельствует о том, что животные не испытывали значительных стрессовых воздействий. Среднее увеличение массы тела на 1,57 г в группе, исследующей острую токсичность (за 14 дней), и на 5,27 г в группе подострой токсичности (за 28 дней) демонстрирует нормальный рост и развитие животных, без признаков истощения или ухудшения состояния.

Кроме того, отсутствие летальности у животных в обеих группах (и в контрольной, и в экспериментальной) подтверждает, что экстракт *Cetraria islandica* в исследуемых дозах не является смертельно опасным и не оказывает значительного токсического воздействия на организм животных в условиях данного эксперимента.

Таким образом, можно заключить, что экстракт *Cetraria islandica* (L.) Ach. проявляет низкую токсичность при введении в исследуемых дозах, как в краткосрочной, так и в длительной перспективе.

*Патоморфологическая оценка токсичности.* Патоморфологическая оценка токсичности экстракта *Cetraria islandica* проводилась в соответствии с

требованиями GLP. Оценка включала макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов лабораторных животных.

*Макроскопическое исследование.* После завершения 28-дневного экспериментального периода животные были подвергнуты эвтаназии с использованием ингаляционного наркоза. Далее производилось вскрытие грудной и брюшной полостей с целью извлечения внутренних органов. Процедура проводилась в соответствии с Рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Извлечённые органы фиксировали в 10%-м забуференном формалине в течение 48 часов для последующего гистологического анализа.

При макроскопическом осмотре внутренних органов животных, получавших экстракт *Cetraria islandica*, патологических изменений выявлено не было. Органы сохраняли характерную окраску, консистенцию и топографическое расположение. Сердце имело нормальные размеры и форму, его мышечная ткань была плотной и коричневатой. Лёгкие - бледно-розовые, спадались при вскрытии грудной клетки; на разрезе - однородные и без признаков патологий. Слизистая оболочка бронхов и желудка была гладкой, блестящей, без признаков кровоизлияний и изъязвлений. Аналогичное состояние наблюдалось в слизистой тонкой и толстой кишки. Печень - нормальной формы и размера, ткань упругая, красно-коричневого цвета. Почки также не имели отклонений: капсула снималась легко, на разрезе чётко прослеживались корковое и мозговое вещества. Селезёнка имела тёмно-вишнёвую окраску, гладкую поверхность и плотную консистенцию.

Таким образом, макроскопическое исследование не выявило признаков токсического воздействия экстракта *Cetraria islandica* на внутренние органы лабораторных животных, что свидетельствует о его потенциальной безопасности при исследуемых дозировках.

*Гистологическое исследование.* В рамках гистологического этапа исследования, направленного на оценку морфологических изменений внутренних органов под воздействием экстракта *Cetraria islandica*, были проведены систематические эксперименты с животными, получавшими вещество в дозах 500, 2000 и 5000 мг/кг. По завершении исследований по острой и подострой токсичности животных подвергали эвтаназии методом ингаляционного наркоза с последующим вскрытием. Извлекались внутренние органы (печень, почки, лёгкие, сердце, желудок, кишечник, селезёнка и поджелудочная железа), которые макроскопически оценивались и помещались в 10%-й нейтрально-забуференный формалин на 48 часов для фиксации.

Далее биоматериал подвергался стандартной гистологической обработке: обезвоживание, уплотнение, заливка в парафин и формирование парафиновых блоков. Из блоков с помощью микротомы получали срезы толщиной 1,5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, после чего заключали в покрывную среду. Анализ препаратов проводился с использованием светового

микроскопа Leica DM500 при увеличении  $\times 100$ – $\times 200$ . Полученные гистологические препараты использовались для сравнительной морфологической оценки тканей между опытными и контрольной группами животных (рисунок 46).



Рисунок 46 – Гистологические блоки и стеклопрепараты из образцов внутренних органов (легкие, печень, почки, желудок, тонкий и толстый кишечник, поджелудочная железа)

В ходе исследования внутренних органов мышей, получавших экстракт *Cetraria islandica* (L.) Ach. в различных дозах при моделях острой и подострой токсичности, были выявлены следующие морфологические особенности:

*Лёгкие:* Структура лёгочной ткани сохранена. Альвеолы воздушны, с незначительным утолщением стенок, обусловленным умеренным полнокровием сосудов микроциркуляторного русла. В стенках бронхов и бронхиол наблюдаются мелкоочаговые лимфоидные инфильтраты, слизистая оболочка без патологических изменений (рисунок 47).

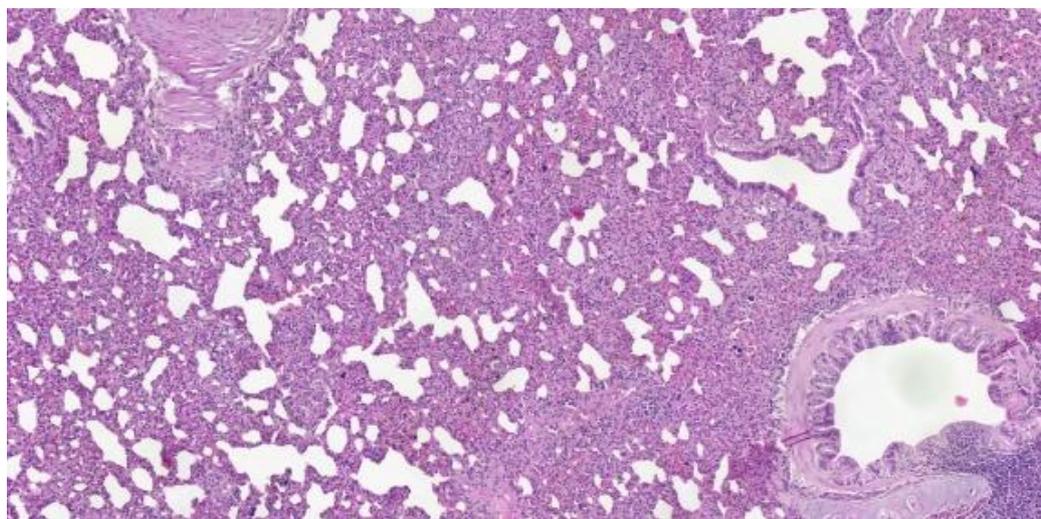


Рисунок 47 – Лёгкое мыши. Выраженные участки дис- и ателектаза альвеол, наличие перибронхиальной мелкоочаговой лимфоидной инфильтрации

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ .

*Печень:* Дольковая структура печени сохранена. Печёночные балки представлены одним рядом гепатоцитов с эозинофильной цитоплазмой. В области портальных трактов отмечается слабовыраженная лимфоцитарная инфильтрация и неравномерное полнокровие центральных вен (рисунок 48).

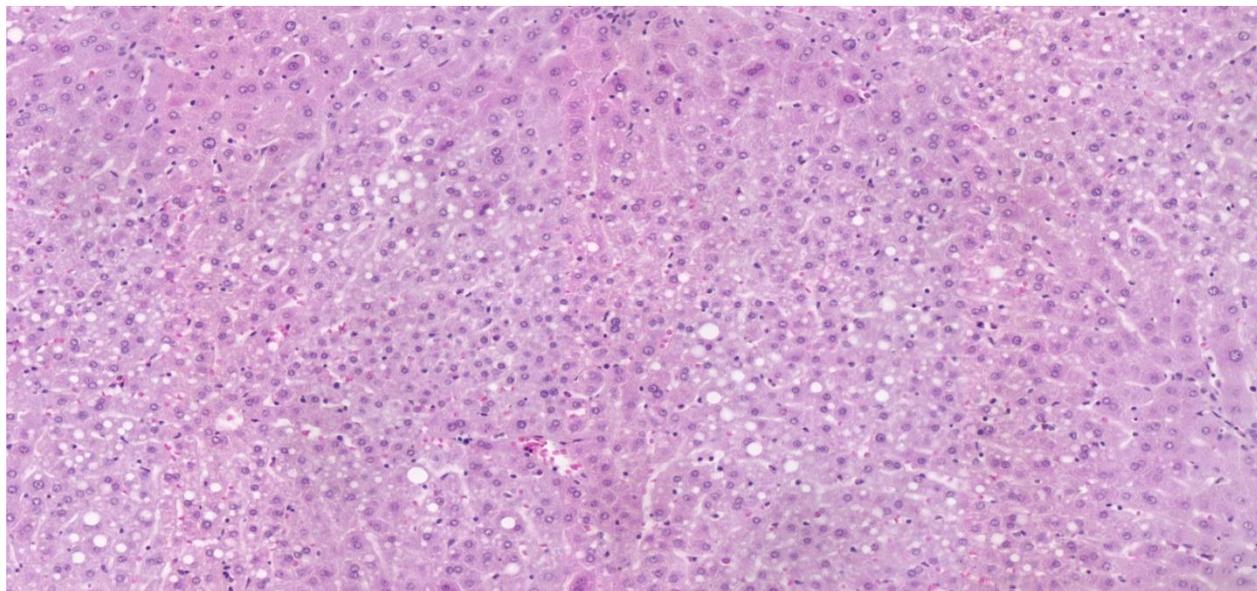


Рисунок 48 – Печень мыши. Признаки жировой дистрофии гепатоцитов  
Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

*Почки:* Структура почек сохранена. Кортикальное вещество содержит клубочки нормального строения. В мозговом веществе наблюдается умеренная гомогенизация цитоплазмы эпителия извитых канальцев. Интерстиций содержит мелкие скопления лимфоцитов и умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (рисунок 49).

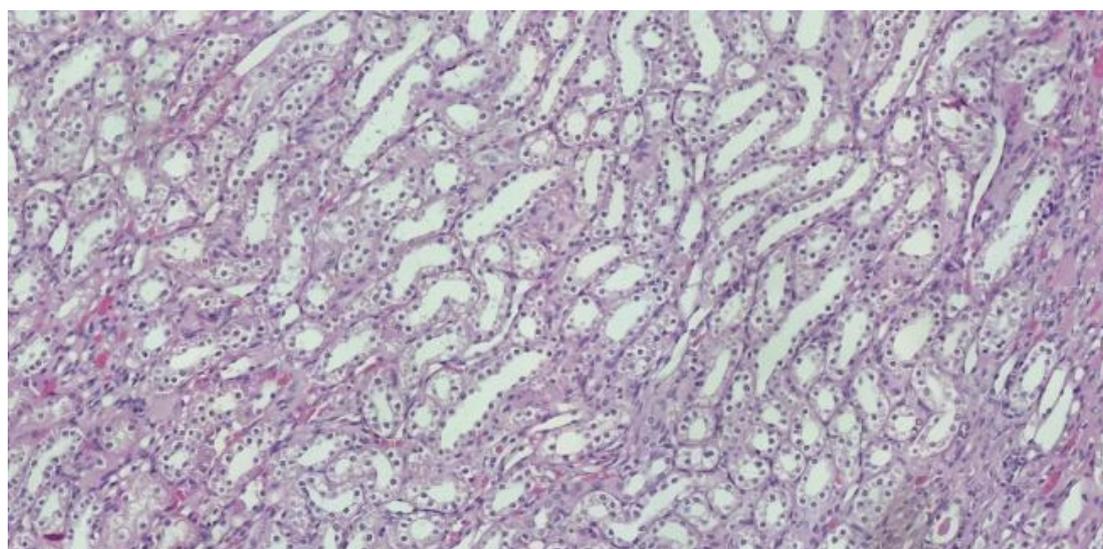


Рисунок 49 – Почка мыши. Сохранённая структура клубочков и канальцев, умеренная гомогенизация цитоплазмы эпителия извитых канальцев, единичные лимфоидные инфильтраты  
Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

*Желудок, кишечник, поджелудочная железа, селезёнка и сердце:*  
Структура и морфология указанных органов соответствуют норме, патологических изменений не выявлено (рисунки 50 и 51).

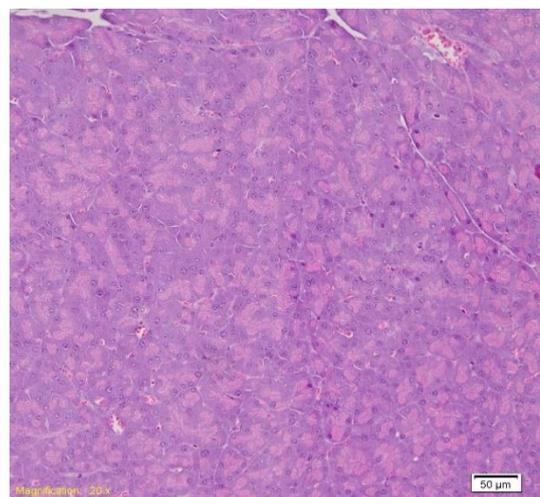
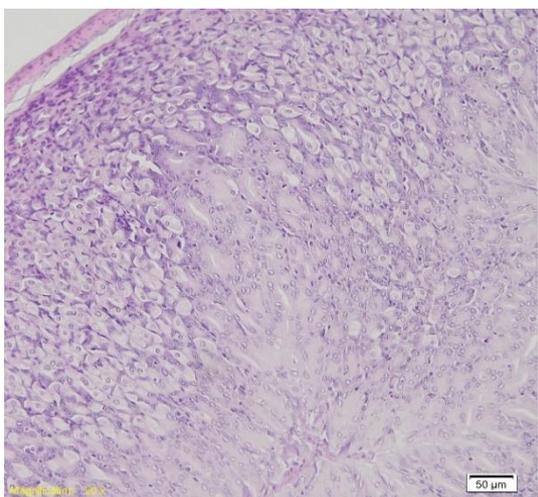


Рисунок 50 – Морфологическая структура тканей без патологических изменений: а – желудок, б – поджелудочная железа  
Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

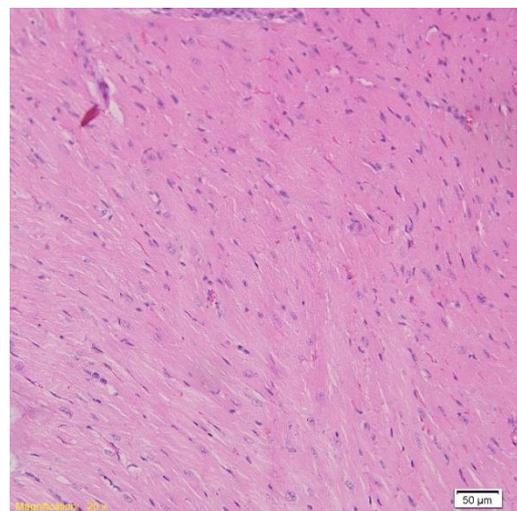
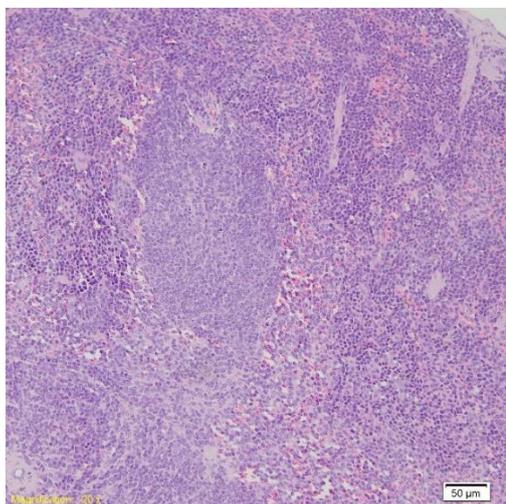


Рисунок 51 – Морфологическая структура внутренних органов мыши:  
а - селезёнка, б - сердце  
Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

Результаты гистологического анализа внутренних органов мышей, получавших экстракт *Cetraria islandica*, не показали значительных патологических изменений по сравнению с контрольной группой. Наблюдаемые

минимальные морфологические изменения, такие как умеренное полнокровие и лимфоидные инфильтраты, могут быть интерпретированы как адаптационные реакции организма на введение экстракта. Отсутствие выраженных деструктивных изменений подтверждает хорошую переносимость и безопасность экстракта при применении в исследуемых дозах.

По результатам исследования острой и подострой токсичности экстракт *Cetraria islandica* не проявил токсических эффектов, не вызвав летальности и других неблагоприятных изменений, что позволяет отнести его к веществам 5-го класса токсичности (мало токсичен). Экстракт продемонстрировал низкую токсичность и высокую безопасность при применении в терапевтических дозах.

#### **5.4 Оценка аллергизирующего действия экстракта *Cetraria islandica***

Для оценки аллергизирующего действия экстракта *Cetraria islandica* был проведен эксперимент с морскими свинками массой тела 260–300 г, предоставленными виварием НИИ им. Б. Атчабарова. Все животные прошли карантинный период продолжительностью 14 суток и получали стандартное кормление – комбикорма и натуральные корма. В целях стандартизации перед проведением исследования животных не кормили в течение суток.

Животные были разделены на две группы по 10 особей в каждой. Экстракт *Cetraria islandica* вводился в дозе 5000 мг/кг для оценки аллергизирующего действия методом конъюнктивальной пробы. Для проведения этой пробы животные находились в положении лежа, головой вниз. Одному глазу вводили 1 каплю водного раствора экстракта *Cetraria islandica* с помощью глазной пипетки, в другой глаз – 1 каплю очищенной воды (контрольная проба).

Аллергизирующее действие экстракта оценивалось через 15 минут (быстрая реакция) и через 24–48 часов (гиперчувствительность замедленного действия) после введения препарата. Оценка реакции проводилась по следующей шкале:

- 1 балл – легкое покраснение слезного протока;
- 2 балла – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
- 3 балла – покраснение всей конъюнктивы и склеры, сопровождающееся зудом, возможным развитием гнойного офтальмита при расчесывании лапками.

Через 15 минут после введения экстракта в дозировке 5000 мг/кг была зафиксирована реакция 2 балла – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице. Другие реакции, такие как отечность, покраснение конъюнктивы или признаки воспаления, не наблюдались. В течение последующих 24–48 часов не было зафиксировано изменений, свидетельствующих о наличии аллергической реакции замедленного типа. Данные об оценке аллергической реакции на экстракт *Cetraria islandica* приведены в таблице 32.

Таблица 32 – Оценка аллергической реакции на экстракт *Cetraria islandica*

| Время наблюдения | Группа   | Доза (мг/кг) | Оценка реакции | Описание реакции  |
|------------------|----------|--------------|----------------|---|
| 15 минут         | Экстракт | 5000         | 2              | Покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице                                |
| 24-48 часов      | Экстракт | 5000         | 0              | Не наблюдалось изменений, свидетельствующих о наличии аллергической реакции замедленного типа |
| 15 минут         | Контроль | -            | 0              | Отсутствие реакции  |
| 24-48 часов      | Контроль | -            | 0              | Отсутствие реакции  |

Результаты исследования аллергизирующего действия показали, что экстракт *Cetraria islandica* может вызывать умеренную аллергическую реакцию (покраснение слезного протока и склеры) при дозировке 5000 мг/кг. Это подтверждает возможные аллергизирующие свойства препарата при высоких дозах.

#### **Выводы по пятому разделу**

В рамках исследования противовоспалительной активности экстракта *Cetraria islandica* использовалась модель острого экссудативного воспаления, индуцированного введением формалина. Экспериментальные группы крыс получали экстракт в дозах 500, 2000 и 5000 мг/кг, что позволило оценить дозозависимый эффект. Результаты показали, что экстракт *Cetraria islandica* значительно снижал объем отека, достигая максимального эффекта при дозе 500 мг/кг, где снижение составило 69,90%. Это свидетельствует о выраженной противовоспалительной активности экстракта, сопоставимой с действием стандартного нестероидного противовоспалительного препарата – ибупрофена.

Исследование антимикробной и противогрибковой активности экстракта проводилось на базе Национального центра исследований натуральных продуктов. Экстракты были протестированы на десяти клинически значимых микроорганизмах, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также дрожжевые грибы. Результаты показали, что экстракт *Cetraria islandica* проявляет выраженную антимикробную активность, особенно против грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*. При этом экстракт также продемонстрировал антималярийную активность, особенно ацетоновый и этанольный экстракты, которые проявили значительное действие против *Plasmodium falciparum* с  $IC_{50}$  45 626,3 нг/мл для чувствительного штамма и 16 231,4 нг/мл для устойчивого.

Оценка токсичности экстракта *Cetraria islandica* была проведена на белых мышах, где не было зафиксировано никаких токсических эффектов, что позволяет отнести экстракт к веществам 5-го класса токсичности (мало токсичен). Также была проведена оценка аллергизирующего действия, которая

показала, что экстракт может вызывать умеренные аллергические реакции при высоких дозах, однако не наблюдалось длительных эффектов.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что экстракт *Cetraria islandica* обладает выраженной противовоспалительной, антимикробной и антималярийной активностью, что делает его перспективным кандидатом для разработки новых терапевтических средств. Высокая безопасность экстракта в экспериментальных условиях, а также его способность модулировать воспалительные процессы и оказывать антимикробное действие, подчеркивают его потенциал в клиническом применении. Однако для более глубокого понимания механизмов действия и оценки долгосрочной безопасности необходимы дальнейшие исследования.

## **6 РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И СТАБИЛЬНОСТИ СПРЕЯ С ЭКСТРАКТОМ *CETRARIA ISLANDICA*.**

### **6.1 Разработка, оценка качества и исследование стабильности спрея с экстрактом *Cetraria islandica*.**

Целью экспериментального этапа настоящего исследования явилась разработка и оптимизация состава спрея для горла на основе густого экстракта *Cetraria islandica*, обладающего подтверждёнными антимикробными и противовоспалительными свойствами. Исследование было направлено на создание стабильной, технологичной и эффективной лекарственной формы, обеспечивающей локальное действие в области ротоглотки и удобство применения.

В рамках работы был проведён отбор вспомогательных веществ, функционально обоснованных с точки зрения увлажнения, стабилизации структуры, сохранения микробиологической чистоты и поддержания физиологического уровня pH. Концентрации ингредиентов подбирались на основании литературных источников и рекомендаций по применению в лекарственных формах для местного применения в полости рта. Сформированные модельные композиции подвергались комплексной фармацевтико-технологической оценке по ключевым параметрам с целью определения наиболее подходящего варианта для дальнейшей разработки и последующих этапов клинической оценки. Подбор вспомогательных веществ для разработки спрея

Для создания стабильной и эффективной лекарственной формы спрея для горла были выбраны следующие вспомогательные вещества, учитывая их функциональные свойства и способность поддерживать физико-химическую стабильность препарата:

1. Полисорбат-80 (Polysorbate 80) – эмульгатор, улучшающий растворение активных ингредиентов и стабилизирующий систему.

2. Карбоксиметилцеллюлоза натрия (Sodium Carboxymethylcellulose) – загуститель, стабилизатор, способствует равномерному распределению активных веществ на слизистой оболочке горла.

3. Глицерин – увлажнитель, стабилизатор вязкости, предотвращает пересыхание слизистой оболочки.

4. Пантенол (Dexpanthenol) – способствует регенерации тканей, уменьшает воспаление, обладает увлажняющим эффектом.

5. Гиалуроновая кислота – улучшает увлажнение и восстанавливает водный баланс слизистой оболочки.

6. Сорбитол – увлажнитель, удерживающий влагу на поверхности слизистой.

7. Натрия ПЦА (Sodium PCA) – смягчает и увлажняет ткани, поддерживает водный баланс.

8. Экстракт алоэ вера – обладает противовоспалительным и заживляющим эффектом.

9. Феноксизтанол + этилгексилглицерин – консерванты мягкого действия, защищают от микроорганизмов, не раздражая слизистую оболочку.

10. Бензалкония хлорид – эффективен против широкого спектра микробов, используется в низких концентрациях.

11. Цитрат натрия / лимонная кислота – регуляторы pH, обеспечивают оптимальные значения для слизистой оболочки горла.

12. Яблочная кислота – альфа-гидроксикислота, регулирует pH и способствует обновлению клеток слизистой оболочки.

13. Натрия хлорид – осмотический агент, способствует поддержанию осмотического давления.

14. Вода очищенная – растворитель, основа формулы.

Для получения максимально сбалансированной лекарственной формы были подобраны вспомогательные вещества, широко применяемые в производстве спреев для горла. Эти вещества выполняют функции увлажнителей, стабилизаторов, консервантов, эмульгаторов и регуляторов pH, а также способствуют формированию стабильной дисперсной системы, удобной в применении и соответствующей нормативным требованиям.

Были разработаны шесть модельных композиций, представленных в таблице 36. Каждая модель отличалась составом увлажняющих компонентов, эмульгаторов, регуляторов pH и консервантов, что позволяло определить наиболее эффективный и стабильный вариант композиции для применения в области горла (таблица 33).

Таблица 33 – Состав модельных композиций спрея с экстрактом *Cetraria islandica*

| Ингредиенты   | Функциональное назначение  | Модели, концентрация (%) |     |     |     |     |     |
|---|--|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|   |  | 3                        |     |     |     |     |     |
| 1   | 2  | 3                        |     |     |     |     |     |
| Густой экстракт <i>Cetraria islandica</i> .                         | Основное действующее вещество: антисептик, заживление, снятие воспаления | 3.0                      | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| Пантенол (Dexpanthenol)   | Регенерация тканей, уменьшение воспаления                                |                          | 2.0 |     | 2.0 |     |     |
| Экстракт алоэ вера  |  | 2.0                      |     | 2.0 |     |     |     |
| Гиалуроновая кислота  |  |                          |     |     |     | 2.0 | 2.0 |
| Глицерин  | Увлажнение, защита кожи, стабилизация вязкости                           | 4.0                      |     |     | 4.0 |     |     |
| Сорбитол  |  |                          | 4.0 |     |     | 4.0 |     |
| Натрия ПЦА (Sodium PCA натриевая соль пирролидонкарбоновой кислоты) |  |                          |     | 4.0 |     |     | 4.0 |

Продолжение таблицы 33

| 1                                     | 2  | 3                       | 4                       | 5                       | 6                       | 7                       | 8                       |
|---------------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Полисорбат 80                         | Эмульгатор,<br>улучшает<br>растворение и<br>стабильность | 0,8                     |                         |                         | 0,8                     |                         | 0,8                     |
| Карбоксиметилцеллюлоза                |  |                         | 0,8                     | 0,8                     |                         | 0,8                     |                         |
| Феноксиэтанол +<br>этилгексилглицерин | Консерванты  | 1,0                     |                         | 1,0                     | 1,0                     |                         |                         |
| Бензалконий хлорид                    |  |                         | 1,0                     |                         |                         |                         | 1,0                     |
| Цитрат натрия / лимонная<br>кислота   | Регуляция pH до<br>физиологического<br>уровня            | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 |                         |                         | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 |                         |
| Яблочная кислота                      |  |                         | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 |                         |                         | до<br>pH<br>5.5–<br>6.5 |
| Натрия хлорид                         | Осмотический<br>компонент                                | 0,2                     | 0,2                     |                         | 0,2                     | 0,2                     |                         |
| Эфирное масло мяты                    | Ароматизатор   |                         |                         |                         | 0,5                     |                         |                         |
| Вода очищенная                        | Растворитель   | до<br>100.0             | до<br>100               | до<br>100.0             | до<br>100.0             | до<br>100.0             | до<br>100               |

Измерения кинематической вязкости проводилась с использованием стеклянных капиллярных вискозиметров, соответствующих требованиям ГОСТ 33-2016 или ГОСТ 33768–2015. Сущность метода заключается в измерении времени истечения определённого объёма жидкости под действием силы тяжести при контролируемой температуре. Кинематическая вязкость рассчитывается как произведение времени истечения на постоянную вискозиметра (таблица 34).

- Единицы измерения: кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт), где  $1 \text{ сСт} = 1 \text{ мм}^2/\text{с}$ .

- Температура измерения: измерения следует проводить при температуре, соответствующей условиям хранения и применения спрея (обычно 20–25 °С).

- Повторяемость: для повышения точности рекомендуется проводить не менее трёх измерений для каждой модели и использовать среднее значение.

- Калибровка оборудования: перед проведением измерений необходимо убедиться в калибровке вискозиметра и соблюдении всех требований стандарта.

Таблица 34 - Кинематическая вязкость рабочих композиций спрея

| № модели | Средняя кинематическая вязкость, сСт | Стандартное отклонение (S*) | Погрешность ( $\Delta x$ ) | Интервал ( $x \pm \Delta x$ ), сСт | Относительная погрешность ( $\epsilon$ ) |
|----------|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|--|
| 1        | $1,8 \pm 0,2$ сСт                    | 0.0208                      | 0.0535                     | $1,8 \pm 0,2$                      | $\pm 1.81\%$                             |
| 2        | $2,0 \pm 0,2$ сСт                    | 0.0186                      | 0.0477                     | $2,0 \pm 0,2$                      | $\pm 1.09\%$                             |
| 3        | $1,6 \pm 0,2$ сСт                    | 0.0231                      | 0.0594                     | $1,6 \pm 0,2$                      | $\pm 0.74\%$                             |
| 4        | $2,4 \pm 0,2$ сСт                    | 0.0200                      | 0.0710                     | $2,4 \pm 0,2$                      | $\pm 0.59\%$                             |

Продолжение таблицы 34

| 1 | 2             | 3      | 4      | 5         | 6      |
|---|---------------|--------|--------|-----------|--------|
| 5 | 1,3 ± 0,2 сСт | 0.2506 | 0.6440 | 1,3 ± 0.2 | ±4.03% |
| 6 | 2,2 ± 0,2 сСт | 0.2877 | 0.7394 | 2,2 ± 0.2 | ±3.70% |

Оптимальными считаются модели 2, 3, 4 и 6, так как их значения находятся в диапазоне от 1,5 до 2,5 сСт. Особенно выделяется модель 4, которая при оптимальной вязкости от 1,5 до 2,5 сСт показывает наименьшую относительную погрешность ( $\pm 0,59\%$ ), что свидетельствует о высокой стабильности и надежности данной композиции.

Модели 1 и 5 имеют погрешности и выходят за пределы оптимального диапазона.

Проведённый анализ экспериментальных моделей спреев для горла показал, что модель 4 является наиболее оптимальной по совокупности фармацевтических, физико-химических и технологических параметров (таблица 35). Прозрачный и однородный внешний вид указывает на стабильность состава и равномерное распределение компонентов. Значение рН в пределах 5,0–6,0 соответствует физиологическим условиям слизистой оболочки рта, что минимизирует риск раздражения. Оптимальная вязкость ( $2,4 \pm 0,2$  сСт) обеспечивает хорошую распыляемость, достаточную адгезию к слизистой и отсутствие стекания. Размер капель (60–100 мкм) и плотность ( $1,02 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>) отвечают требованиям к орошающим формам, обеспечивая равномерное покрытие поверхности. Скорость распыления (0,35 сек) и точность дозирования ( $\pm 10\%$ ) соответствуют нормативам, что позволяет точно контролировать введение препарата. Устойчивость модели при хранении подтверждает сохранение эффективности на всём сроке годности.

Остальные модели показали существенные отклонения от оптимальных характеристик, что ограничивает их применимость. Модель 1 отличалась мутноватым внешним видом и высокой погрешностью дозирования ( $\pm 20\%$ ), модель 2 – избыточной вязкостью, мутностью и максимальной ошибкой дозирования ( $\pm 25\%$ ). Модель 3 имела чрезмерную плотность (до 1,27 г/см<sup>3</sup>) и высокую вязкость, что затрудняет распыление. Модель 5 характеризовалась нестабильным внешним видом и низкой вязкостью, а модель 6 – высокой погрешностью дозирования ( $\pm 22\%$ ) и наименьшей скоростью распыления (0,25 сек). Повышенная плотность в моделях 3, 5 и 6 превышает оптимальный уровень для спреев, что негативно влияет на текучесть, равномерность распыления и удобство применения.

Таблица 35 - Сравнение технологических характеристик экспериментальных моделей спрея

| Технологические параметры    | Модели                |               |               |                       |                |                              |
|------------------------------|-----------------------|---------------|---------------|-----------------------|----------------|------------------------------|
|                              | 1                     | 2             | 3             | 4                     | 5              | 6                            |
| Внешний вид                  | Мутноваты, густоватый | Мутны, вязкий | Мутны, вязкий | Прозрачны, однородный | Мутный, вязкий | Прозрачны й, умеренно вязкий |
| рН                           | 5.5–6.0               | 5.0–5.5       | 5.5–6.0       | 5.0–6.0               | 5.0–5.5        | 5.0–6.0                      |
| Вязкость, сСт                | 1.8 ± 0.2             | 2.0 ± 0.2     | 1.6 ± 0.2     | 2.4 ± 0.2             | 1.3 ± 0.2      | 2.2 ± 0.2                    |
| Размер капель, мкм           | 60–100                | 70–110        | 80–120        | 60–100                | 50–90          | 60–100                       |
| Плотность, г/см <sup>3</sup> | 1.02 ± 0.02           | 1.02 ± 0.02   | 1.10 ± 0.02   | 1.05 ± 0.02           | 1.10 ± 0.02    | 1.10 ± 0.02                  |
| Скорость распыления, сек     | 0.50                  | 0.45          | 0.40          | 0.35                  | 0.30           | 0.25                         |
| Точность дозирования         | ±20%                  | ±25%          | ±25%          | ±10%                  | ±10%           | ±22%                         |

Таким образом, выбор модели 4 основан на её сбалансированных характеристиках и способности удовлетворять потребности целевой аудитории, что делает её наиболее перспективной для дальнейшей разработки.

Разработан опытно-промышленный регламент, включающий оптимальную технологию производства растительного спрея на основе густого экстракта исландского мха. Документ охватывает все ключевые этапы производственного процесса: подготовку жидких и твердых компонентов, растворение, гомогенизацию, регулирование рН, фильтрацию, фасовку и упаковку. Установлены обоснованные параметры времени, температуры и последовательности операций, обеспечивающие однородность, стабильность и соответствие продукции требованиям. Все стадии сопровождаются контрольными точками, отвечающими принципам надлежащей производственной практики (GMP).

Установлены показатели качества спрея для горла на основе густого экстракта *Cetraria islandica* и определены критерии их приемлемости. Разработана спецификация качества на готовую лекарственную форму (приложение Ф).

Долгосрочные испытания стабильности спрея для горла проводились на трёх пилотных сериях препарата в первичной упаковке, предназначенной для хранения и реализации. Условия испытаний соответствовали нормативным требованиям: температура 25±2 °С и относительная влажность 60±5 %. Оценка включала контроль органолептических и физико-химических показателей, а также микробиологическую чистоту на различных этапах хранения.

Полученные данные позволили установить срок годности и оптимальные условия хранения лекарственной формы, подтверждающие стабильность состава

на протяжении всего заявленного срока. Результаты испытаний оформлены в соответствии с действующими фармакопейными стандартами и приведены в таблице 36.

Таблица 36 – Дизайн испытания стабильности спрея

| № серии  | Объем серии, шт. | Дата выпуска | Порядок исследования, мес. |
|----------|------------------|--------------|----------------------------|
| SP-01/23 | 500              | 01.2023 г.   | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24     |
| SP-02/23 | 500              | 01.2023 г.   | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24     |
| SP-03/23 | 500              | 01.2023 г.   | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24     |

В течение 24 месяцев были проведены испытания стабильности, установлены сроки годности и рекомендованные условия хранения спрея для горла (Приложение X).

## **6.2 Обзор фармацевтического рынка ингаляторов и препаратов для рассасывания в Казахстане**

В условиях стратегического развития фармацевтической отрасли РК, которая играет ключевую роль в обеспечении доступности и качества медицинской помощи, особое внимание уделяется производству ингаляторов и препаратов для рассасывания. Государственная политика, направленная на локализацию производства и развитие отечественного фармацевтического сектора, способствует увеличению объемов рынка и укреплению позиций местных производителей. Согласно аналитическим данным, объем фармацевтического рынка Казахстана демонстрирует устойчивый рост, что подтверждается увеличением закупок лекарственных средств для стационаров и амбулаторного обеспечения [138].

В представленной таблице 37 отражены данные о рынке готовых лекарственных средств в разрезе АТХ-классификации по статусу ОТС по итогам 1 квартала 2025 года, включая динамику продаж, долю рынка и средние цены по различным группам лекарственных средств.

Таблица 37 - Структура рынка безрецептурных лекарственных средств (ОТС) по АТХ-классификации за 1 квартал 2025 г.

| Рейтинг | Динамика в рейтинге | Группа ГЛС по АТХ классификации  | Динамика продаж в тенге (%) | Динамика продаж в упаковках (%) | Доля рынка в тенге (%) | Доля рынка в упаковках (%) | Сумма в тенге | Динамика средней цены (%) |
|---------|---------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------|---------------------------|
| 1       | 0                   | R05 Препараты, применяемые при кашле и простудных заболеваниях                                       | 1,8                         | -22,4                           | 9,2                    | 9,9                        | 5,71 млрд     | 31,2                      |
| 2       | 0                   | N02 Анальгетики  | 4                           | -12,2                           | 7,6                    | 17,8                       | 4,75 млрд     | 18,5                      |
| 3       | 0                   | A07 Противодиарейные, кишечные противовоспалительные / противомикробные препараты                    | 22,1                        | -22,5                           | 6,9                    | 4                          | 4,29 млрд     | 57,6                      |
| 4       | 0                   | R02 Препараты для лечения заболеваний горла  | 14,7                        | -4,9                            | 5                      | 3,8                        | 3,13 млрд     | 20,6                      |
| 5       | 0                   | R01 Препараты для лечения заболеваний носа   | 12,8                        | -3                              | 4,9                    | 9,3                        | 3,04 млрд     | 16,3                      |
| 6       | 0                   | G04 Препараты для лечения урологических заболеваний  | 14,5                        | -3,2                            | 4,5                    | 1,1                        | 2,82 млрд     | 18,3                      |
| 7       | 0                   | A09 Препараты, стимулирующие пищеварение, включая ферменты   | 21,7                        | 7,4                             | 4,4                    | 2,6                        | 2,72 млрд     | 13,4                      |
| 8       | 0                   | A05 Препараты для лечения заболеваний желчного пузыря и печени                                       | 22,5                        | -5,1                            | 4,1                    | 1,5                        | 2,52 млрд     | 29,1                      |
| 9       | 0                   | M01 Противовоспалительные и противоревматические препараты   | 26,8                        | -4,5                            | 3,9                    | 3,5                        | 2,44 млрд     | 10,7                      |
| 10      | 2                   | J05 Противовирусные препараты для системного применения  | 36,8                        | 18,5                            | 3,9                    | 1,3                        | 2,42 млрд     | 15,4                      |
| 11      | 4                   | C05 Ангиопротекторы  | 17,4                        | 4,6                             | 3,4                    | 1,3                        | 2,11 млрд     | 12,2                      |
| 12      | 4                   | D08 Антисептики и дезинфицирующие препараты  | 44,5                        | 19,1                            | 3,2                    | 1,3                        | 2,01 млрд     | 73                        |
| 13      | 0                   | A12 Минеральные добавки  | 25,2                        | -27,6                           | 3                      | 2,3                        | 1,86 млрд     | 13,4                      |
| 14      | 0                   | A11 Витамины   | 17,2                        | -59                             | 2,8                    | 1,5                        | 1,74 млрд     | 186,1                     |
| 15      | 0                   | M02 Препараты для наружного применения при болевом синдроме при заболеваниях костно-мышечной системы | 15                          | -4,7                            | 2,6                    | 2,1                        | 1,64 млрд     | 20,7                      |

По данным аналитической компании Vi-Ortis за 1 квартал 2025 года розничный рынок показывает, что наибольшую долю в денежном выражении занимают препараты, применяемые при кашле и простудных заболеваниях (R05), анальгетики (N02) и противодиарейные препараты (A07). Несмотря на положительную динамику продаж в тенге для некоторых групп, наблюдаются значительные колебания в количестве реализованных упаковок, что может свидетельствовать о изменении потребительских предпочтений или о влиянии сезонных факторов. Например, группа R05 демонстрирует рост в денежном выражении на 1,8%, но при этом отмечается снижение продаж в упаковках на 22,4%. Это может указывать на повышение цен на данные препараты или на переход потребителей к более эффективным или альтернативным средствам. В то же время противовирусные препараты для системного применения (J05) показали наибольший рост в продажах как в денежном выражении, так и в упаковках, что может быть связано с увеличением спроса на такие препараты в условиях пандемии и роста заболеваемости. Таким образом, данные таблицы предоставляют ценную информацию для оценки динамики фармацевтического рынка и выявления ключевых тенденций в потреблении лекарственных средств в Казахстане [139-140].

Эти наблюдения создают основу для дальнейшего анализа, который будет сосредоточен на специфических сегментах рынка. В данной экспериментальной части будет представлен анализ текущего состояния и динамики рынка ингаляторов и препаратов для рассасывания в Казахстане, что позволит выявить ключевые тенденции и направления для дальнейшего развития.

В целях оценки структуры потребления лекарственных средств на розничном фармацевтическом рынке РК был проведен анализ по международной классификации АТХ (Anatomical Therapeutic Chemical Classification). Особое внимание заслуживает присутствие в ТОП-10 терапевтических направлений таких групп, как R05 (препараты, применяемые при кашле и простудных заболеваниях) и R02 (препараты для лечения заболеваний горла). Данный факт отражает высокую эпидемиологическую и социальную значимость заболеваний респираторного тракта, в том числе фарингита, ларингита, трахеита и острых вирусных инфекций.

Актуальность разработки и производства лекарственных средств, предназначенных для симптоматической терапии этих состояний, подтверждается устойчивым потребительским спросом. Наличие в лидирующих позициях именно этих АТХ-групп обосновывает целесообразность выбора фармацевтической формы, направленной на локальное воздействие на слизистую оболочку ротоглотки, таких как спреи, пастилки и таблетки для рассасывания, включая разработки на основе растительного сырья.

Таким образом, анализ рынка подчеркивает необходимость дальнейшего изучения и внедрения эффективных фармацевтических форм, которые смогут удовлетворить растущий спрос на средства для лечения заболеваний верхних дыхательных путей, что, в свою очередь, открывает перспективы для развития новых продуктов и технологий в фармацевтической отрасли Казахстана.

Анализ структуры розничного фармацевтического рынка Казахстана за 1 квартал 2025 года позволяет выделить наиболее востребованные бренды готовых лекарственных средств (таблица 38). В десятку лидирующих позиций вошли препараты с высокой потребительской узнаваемостью и широким спектром клинического применения. Особенно примечательно, что на 6 месте по объёму продаж в денежном выражении расположился препарат Танфлекс – средство для местного лечения воспалительных заболеваний горла. Его присутствие в списке лидеров подтверждает актуальность лекарственных форм локального действия, направленных на терапию заболеваний ротоглотки, таких как фарингит и тонзиллит.

Таблица 38 – ТОП 15 брендов на розничном рынке по ОТС-статусу за 1 квартал 2025 г.

| Рейтинг | Динамика в рейтинге брендов | Бренд          | Динамика продаж в тенге (%) | Динамика продаж в упаковке (%) | Доля рынка в тенге (%) | Доля рынка в упаковке (%) | Средняя цена (тенге) | Динамика средней цены (%) |
|---------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| 1       | 1                           | Креон          | 24,5                        | -0,4                           | 2,8                    | 0,8                       | 3472                 | 25,1                      |
| 2       | -1                          | Терафлю        | 6,2                         | 4,5                            | 2,5                    | 1,2                       | 2039                 | 1,6                       |
| 3       | 0                           | Канефрон       | 12,3                        | -11,7                          | 2,4                    | 0,9                       | 3730                 | 27,1                      |
| 4       | –                           | Энтерожермина  | 19,4                        | 21,3                           | 2,1                    | 0,6                       | 3224                 | -1,6                      |
| 5       | 14                          | Этиловый спирт | 98,4                        | 56,4                           | 1,6                    | 6,3                       | 224                  | 26,9                      |
| 6       | 1                           | Танфлекс       | 28,7                        | 15,5                           | 1,6                    | 1,1                       | 1394                 | 11,5                      |
| 7       | -1                          | Ибуфен         | 19,6                        | 9,1                            | 1,6                    | 1,6                       | 1360                 | 9,7                       |
| 8       | 2                           | Магне В6       | 28,8                        | 1,2                            | 1,5                    | 0,5                       | 5191                 | 27,1                      |
| 9       | -4                          | АЦЦ            | -0,5                        | -3,6                           | 1,5                    | 1,6                       | 3591                 | 3,2                       |
| 10      | 4                           | Кардиомагнит   | 32                          | 2,4                            | 1,4                    | 0,6                       | 3594                 | 28                        |
| 11      | 2                           | Линекс         | 28,9                        | 4,8                            | 1,3                    | 0,4                       | 4564                 | 9,1                       |
| 12      | 4                           | Хилак          | 35,1                        | 12,3                           | 1,2                    | 0,5                       | 3845                 | 12,6                      |
| 13      | -4                          | Ингавирин      | 3,6                         | -2,1                           | 1,2                    | 0,6                       | 4325                 | 7,3                       |
| 14      | 3                           | Отривин        | 22,7                        | 0,2                            | 1,2                    | 0,5                       | 3053                 | 7,7                       |
| 15      | 2                           | Синупрет       | 31,8                        | 0,6                            | 1,1                    | 0,4                       | 2944                 | 30,9                      |

Данные анализа показывают активный спрос на препараты, обеспечивающие эффективное лечение заболеваний дыхательных путей, что открывает возможности для дальнейших исследований и разработки новых лекарственных форм. Включение Танфлекса в число ведущих брендов подчеркивает необходимость разработки аналогичных лекарственных средств, включая препараты растительного происхождения с противовоспалительным и антисептическим действием, например на основе экстракта *Cetraria islandica*

Стабильно высокий потребительский спрос на лекарственные формы, применяемые при острых респираторных инфекциях, особенно характерен для зимне-весеннего периода. В числе наиболее продаваемых брендов уверенно присутствует Танфлекс, антисептический и противовоспалительный спрей для горла.

Исследуемую группу лекарственных форм можно разделить на растительные, синтетические и комбинированные. Для маркетингового исследования было отобрано 445 наименований препаратов, представленных в различных формах, таких как спреи, аэрозоли, пастилки и леденцы (таблица 39). Это разнообразие форматов позволяет удовлетворить потребности различных категорий пациентов и обеспечивает широкий выбор для эффективного лечения заболеваний дыхательных путей.

Таблица 39 – Распределение лекарственных форм по количеству и процентному соотношению в ассортимент

| Лекарственная форма       | Количество ЛФ, шт | Процентное соотношение |
|---------------------------|-------------------|------------------------|
| Леденцы                   | 190               | 43%                    |
| Пастилки                  | 116               | 26%                    |
| Таблетки для рассасывания | 101               | 23%                    |
| Аэрозоль                  | 3                 | 1%                     |
| Спрей                     | 35                | 8%                     |
| Итого                     | 445               | 100 %                  |

На рисунке 42 видно, что лидерами продаж в денежном выражении являются производители из следующих стран: Российская Федерация – 108 наименований, Индия – 100, Казахстан – 44, Германия – 33 и другие. Эти данные подчеркивают важность международного сотрудничества и конкуренции на фармацевтическом рынке Казахстана, а также указывают на значительное присутствие как отечественных, так и зарубежных производителей в сегменте лекарственных средств (рисунок 52).



Рисунок 52 – Лидеры продаж лекарственных средств в денежном выражении по странам-производителям

Казахстанские производители присутствуют на фармацевтическом рынке, однако их доля в денежном выражении за период с апреля 2024 по март 2025 года составляет всего около 4%. Это свидетельствует о значительном потенциале для роста. В этом году также было исключено 5 наименований казахстанских препаратов с рынка.

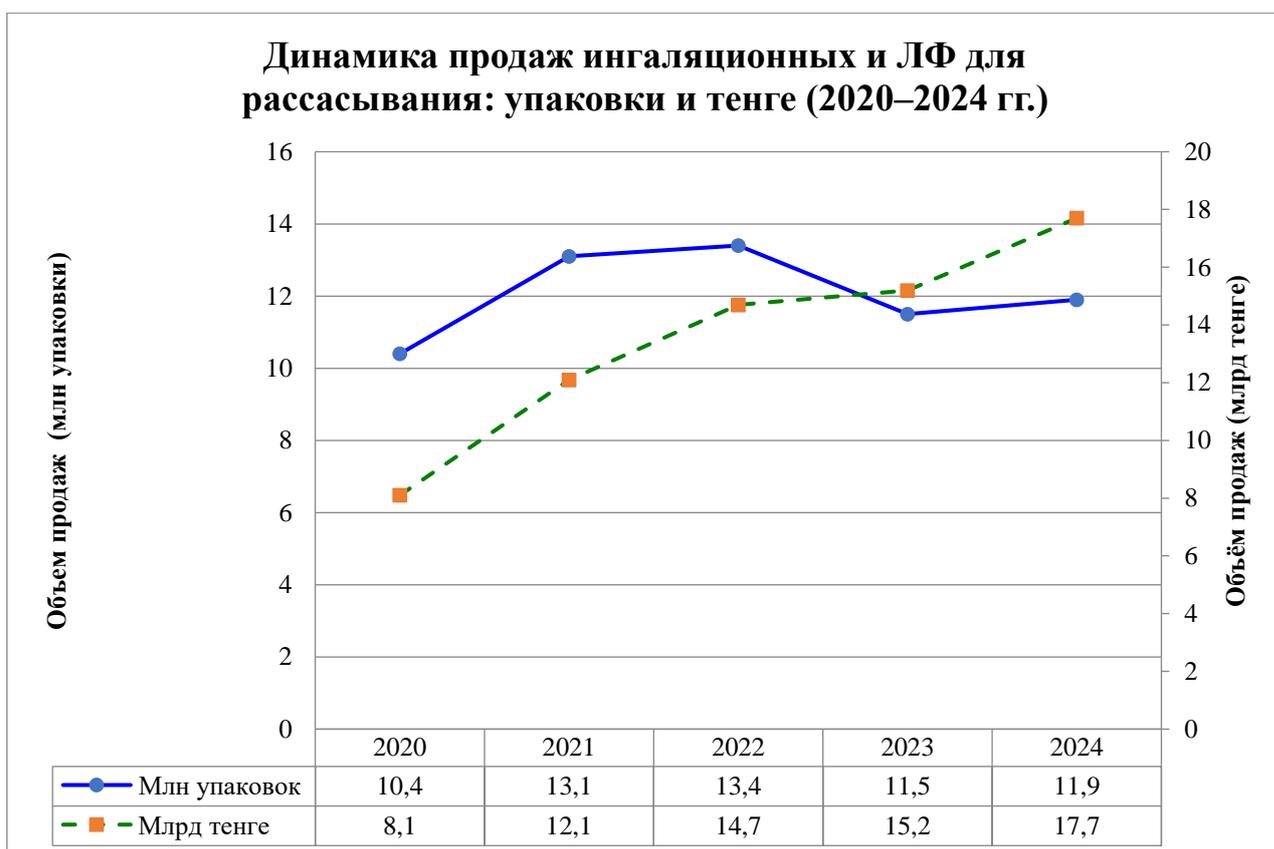


Рисунок 53 – Динамика продаж ингаляторов и лекарственных форм для рассасывания: объемы в упаковках и денежные показатели (2020–2024 гг.)

Анализ динамики продаж препаратов для местного лечения заболеваний ротоглотки (спреи, пастилки, таблетки для рассасывания) за период с 2020 по 2024 годы (рисунок 53) демонстрирует разнонаправленные тренды, отражающие количественные и стоимостные изменения на фармацевтическом рынке РК. В количественном выражении наблюдается рост: с 10,4 млн упаковок в 2020 году до 13,4 млн в 2022 году, после чего фиксируется снижение до 11,5 млн в 2023 году, с частичным восстановлением в 2024 году (11,9 млн упаковок). Это указывает на сформировавшийся стабильный спрос с периодической волатильностью, обусловленной как эпидемиологическими, так и экономическими факторами. В денежном выражении наблюдается устойчивый рост: с 8,1 млрд тенге в 2020 году до 17,7 млрд тенге в 2024 году, что эквивалентно более чем двукратному увеличению за пятилетний период (рисунок 43). Этот тренд свидетельствует о росте средней стоимости упаковки и смещении потребительского спроса в сторону более дорогостоящих и комплексных препаратов [141].

Для оценки рыночной динамики лекарственных средств, применяемых при заболеваниях ротоглотки, в данном разделе проанализированы данные за период МАТ (*Moving Annual Total*), охватывающий апрель 2024 – март 2025 года. Формат МАТ представляет собой скользящий год, позволяющий сгладить сезонные колебания спроса и получить объективную картину потребительской активности за 12 месяцев. В рамках анализа особое внимание уделено твёрдым

лекарственным формам – пастилкам, таблеткам для рассасывания и жевательным таблеткам, а также жидким формам – спреям и аэрозолям для местного применения в полости рта и горла. Выбор указанных форм обоснован их высокой долей в сегменте препаратов для терапии воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, а также стабильным спросом со стороны различных возрастных групп. Применение формата МАТ позволяет проследить долгосрочные рыночные тренды, исключая искажения, связанные с сезонностью или разовыми всплесками продаж.

В последующих разделах будут представлены ключевые показатели – объём продаж в натуральном и денежном выражении, темпы прироста, структура рынка и ценовая динамика, что позволит оценить рыночную значимость указанных лекарственных форм и перспективы их развития (рисунок 54).

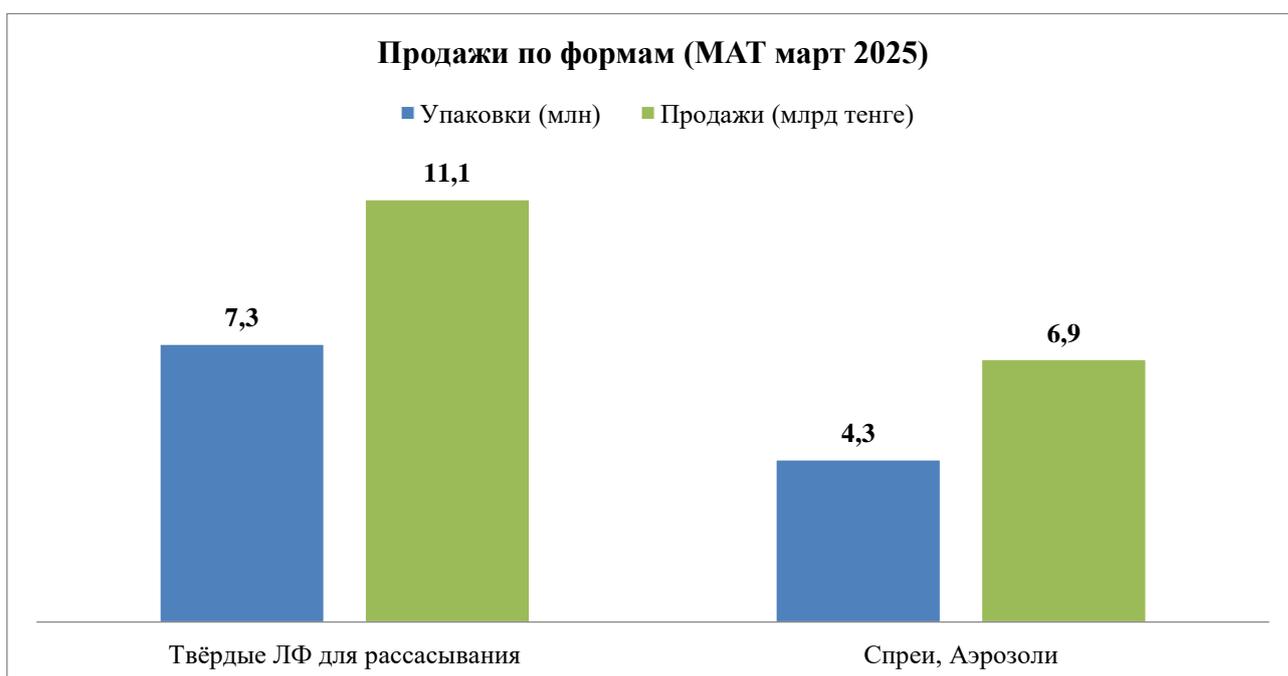


Рисунок 54 - Динамика продаж спреев для лечения заболеваний горла за период МАТ

По результатам анализа продаж спреев, применяемых при заболеваниях горла (группа R02A), за период МАТ (апрель 2024 – март 2025 года), было реализовано около 4,26 млн упаковок на сумму более 6,88 млрд тенге. Рыночная структура демонстрирует высокую концентрацию продаж в лидирующих брендах, что подчеркивает значимость данного сегмента на фармацевтическом рынке Казахстана.

В таблице 34 представлена структура розничных продаж спреев, применяемых при воспалительных заболеваниях горла, за указанный период. В обзор включены основные торговые наименования, охватывающие более 85% всего объёма продаж в данном сегменте. Приведены данные по количеству реализованных упаковок, объёму продаж в тенге, доле на рынке в денежном

выражении, а также указаны производители, страны происхождения и состав действующих веществ (таблица 40).

Таблица 40 - Структура розничных продаж спреев для лечения заболеваний горла за период МАТ

| №  | Торговое наименование  | Действующие вещества  | Компания      | Страна производителя | Упаковки  | Продажи (тенге) | Доля в деньгах |
|----|--|---|---------------|----------------------|-----------|-----------------|----------------|
| 1  | Tanflex 0,15 % flask 30 ml, with spray                         | Бензидамина гидрохлорид   | Абди Ибрагим  | Турция               | 1 219 920 | 2 780 598 300   | <b>40%</b>     |
| 2  | Inhaluptum 30 ml   | Сульфаниламид + тимол + эвкалиптовое масло + мятное масло       | Алтайвитамины | РФ                   | 1 365 506 | 951 419 330     | 14%            |
| 3  | Angal S spray 30 ml  | Хлоргексидин + тетракаин  | Сандоз        | Бельгия              | 194 947   | 623 992 135     | 9%             |
| 4  | Jox 30 ml  | Повидон-йод + аллантоин   | Тева          | Чехия                | 170 387   | 373 445 046     | 5%             |
| 5  | Anzibel 30 ml  | бензидамина гидрохлорид + хлоргексидина диглюконата 20% раствор | Нобель        | Турция               | 175 789   | 321 398 629     | 5%             |
| 6  | Angal S spray 30 ml, with taste of lemon                       | Хлоргексидин + тетракаин  | Сандоз        | Бельгия              | 96 710    | 307 130 319     | 4%             |
| 7  | Pafesan 2 mg/ml + 0,5 mg/ml flask 30 ml, with taste of menthol | Хлоргексидина глюконат + лидокаина гидрохлорид                  | Ворд Медицин  | Турция               | 103 913   | 249 659 198     | 4%             |
| 8  | Hexaspray 30 g,  | Биклотимол  | Рекарди       | Франция              | 93 841    | 219 586 513     | 3%             |
| 9  | Inhaluptum-N 30 g  | Сульфаниламид + тимол + эвкалиптовое масло + мятное масло       | Юнифарма      | Украина              | 325 038   | 211 644 687     | 3%             |
| 10 | Другие   |   |               |                      | 513 235   | 850 967 682     | 12%            |
|    | Всего  |   |               |                      | 4 259 288 | 6 889 841 837   | 100%           |

Лидером в группе спреев для лечения заболеваний горла является препарат Танфлекс от компании Abdi Ibrahim (Турция), содержащий бензидамин. За

период МАТ (март 2025 года) продажи Танфлекса составили 2,8 млрд тенге, что эквивалентно 1,2 млн упаковок в натуральном выражении. Основная часть лекарственных форм в данной категории включает два или более активных вещества, одно из которых обладает противовоспалительным и обезболивающим действием, а другое – антимикробным. На казахстанском рынке представлены такие препараты, как Анзибел (с хлоргексидином и бензидамином) от АО «Нобел Алматинская Фармацевтическая Фабрика», Лидин D (с хлоргексидином и лидокаином), а также Люголя спрей (с йодом, калия йодидом и глицеролом) от ТОО «Досфарм».

В дальнейшем был проведён анализ рынка лекарственных форм для рассасывания, который демонстрирует интересную динамику продаж. В эту группу входят твердые дозированные лекарственные формы, предназначенные для рассасывания, и в ходе исследования было проанализировано 407 наименований лекарств и БАДов (рисунок 55).

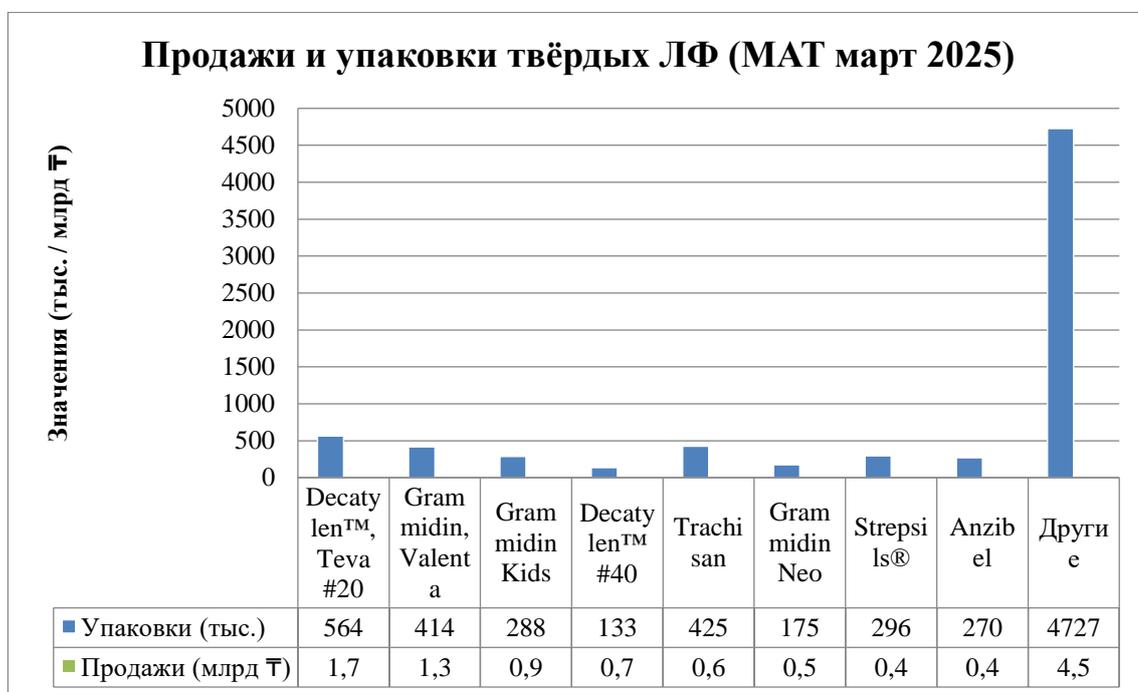


Рисунок 55 – Динамика продаж лекарственных форм для рассасывания за 2019–2023 годы

В 2024 году фармацевтический рынок РК продемонстрировал значительный рост. Общий объем продаж составил 1,3 трлн тенге, что на 17,1% больше по сравнению с предыдущим годом. В натуральном выражении продажи увеличились на 5,8%, достигнув 1,46 млрд упаковок.

Розничный сектор занял 57,5% рынка с темпом роста 17,3%. Госпитальный сегмент также показал положительную динамику, увеличившись на 17,4% и достигнув объема 244,9 млрд тенге.

Собственное производство фармацевтической продукции в Казахстане выросло на 18,9%, достигнув 171,6 млрд тенге. Основной вклад внесли регионы

Шымкент (61,2 млрд тенге), Алматинская область (43,5 млрд тенге) и Карагандинская область (30,6 млрд тенге).

Несмотря на рост внутреннего производства, зависимость от импорта остается высокой. С января по ноябрь 2024 года в страну было ввезено 30 тыс. тонн медикаментов на сумму 1,5 млрд долларов США, что составляет рост на 13,5% в натуральном и 25,7% в денежном выражении.

В 2024 году ведущие позиции на фармацевтическом рынке Казахстана заняли иностранные компании: Santo (55,28 млрд тенге, +12,8%), Johnson & Johnson (52,19 млрд тенге, +23,8%) и Nobel (48,92 млрд тенге, +12,1%) (таблица 41).

Таблица 41 – Продажи лекарственных форм для рассасывания и ингаляционных лекарственных форм по действующим веществам за 1-ое полугодие 2024 г.

| Действующие вещества | ЛФ для рассасывания (тенге) | Ингаляционные ЛФ (тенге) | Сумма (тенге) | Доля в % |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------|----------|
| Растительные         | 500 млн                     | 36 млн                   | 536 млн       | 8%       |
| Синтетические        | 3,8 млрд                    | 1,8 млрд                 | 5,6 млрд      | 80%      |
| Комбинированные      | 538 млн                     | 361 млн                  | 899 млн       | 13%      |
| Итого                | 7,0 млрд                    | 2,2 млрд                 | 9,2 млрд      | 100%     |

Растительные препараты составляют 8% фармацевтического рынка Казахстана, что соответствует 536 млн тенге. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) поддерживает использование фитопрепаратов, рекомендуя их применение для лечения около 75% заболеваний. Казахстан обладает разнообразием лекарственных трав, включая *Cetraria islandica* (L. Ach., собранную в Карагандинской области на высоте 1200 м. Фитохимический анализ выявил 37 соединений, подтверждающих противовоспалительные и антимикробные свойства данного лишайника. Это открывает перспективы для разработки комбинированных препаратов на основе синтетических и растительных компонентов [142].

Анализ фармацевтического рынка Казахстана подтверждает устойчивый спрос на препараты для лечения заболеваний горла, при этом годовой объём продаж безрецептурных средств достигает 18 миллиардов тенге. Из этой суммы около 6,9 млрд тенге приходится на спреи, а 11,1 млрд тенге – на твёрдые лекарственные формы. Преобладание синтетических препаратов, таких как Tanflex, подчёркивает потребность в эффективных местных растительных средствах.

Высокая заболеваемость инфекционно-воспалительными заболеваниями ротоглотки делает актуальной разработку новых фитопрепаратов. *Cetraria islandica* обладает выраженными противовоспалительными и антимикробными свойствами, что делает её перспективным растительным сырьём для создания местного препарата [143].

Разработка растительного спрея на основе исландского мха может значительно расширить ассортимент средств для терапии заболеваний горла,

удовлетворяя растущий рыночный спрос и обеспечивая высокий профиль безопасности.

### 6.3 Техничко-экономическое обоснование производства спрея с экстрактом *Cetraria islandica* (L.) Ach.

При запланированном объёме выпуска 36 000 флаконов спрея объёмом 30 мл в год проведён расчёт производственной себестоимости одной упаковки. В структуру себестоимости включены прямые затраты на сырьё, вспомогательные материалы и упаковку, а также удельная доля постоянных производственных расходов – заработной платы, энергопотребления, амортизации оборудования и прочих накладных расходов. Такой подход обеспечивает объективную оценку экономической эффективности производства и позволяет спрогнозировать отпускную цену на конкурентоспособном уровне (таблица 42).

Таблица 42 – Структура себестоимости производства 1 флакона спрея

| Статья затрат                             | Количество           | Себестоимость на 1 флакон, тг |
|---|----------------------|-------------------------------|
| 1   | 2                    | 3                             |
| Сырьё и материалы:                        |                      |                               |
| Густой экстракт <i>Cetraria islandica</i> | 1,5г                 | 50                            |
| D-Пантенол                                | 0,6 мл               | 20                            |
| Глицерин                                  | 1,2 мл               | 5                             |
| Полисорбат-80                             | 0,24 мл              | 3                             |
| Феноксизтанол +<br>этилгексилглицерин     | 0,3 мл               | 10                            |
| Эфирное масло мяты                        | 0,09 мл              | 5                             |
| Прочие (соль, буфер, вода)                |                      | 2                             |
| Итого сырьё:                              |                      | 95                            |
| Упаковка:                                 |                      |                               |
| Флакон пластиковый 30 мл +<br>распылитель | 1                    | 200                           |
| Этикетка, вкладыш, пачка картонная        | 1                    | 50                            |
| Итого упаковка:                           |                      | 250                           |
| Переменные затраты на ед.                 |                      | 345                           |
| Распределение постоянных расходов:        |                      |                               |
| Труд персонала                            | (в расчёте на 1 шт.) | 300                           |
| Амортизация оборудования                  | на 1 шт.)            | 50                            |
| Коммунальные и прочие                     | на 1 шт.)            | 200                           |
| Итого постоянные на ед.:                  |                      | 550                           |
| Себестоимость полная:                     |                      | 895                           |

Расчёт себестоимости показывает, что при объёме выпуска 36 000 флаконов в год переменные затраты (сырьё и упаковка) составляют около 345 тг на единицу продукции, где наибольшую долю занимает стоимость упаковки – 200–250 тг. Постоянные расходы (заработная плата, аренда, амортизация и прочее)

составляют около 550 тг на флакон. Таким образом, полная себестоимость одного спрея составляет примерно 895 тг.

Учитывая установленную себестоимость, предприятие выходит на проектную мощность сразу после запуска – 36 000 флаконов в год (3000 флаконов в месяц). Максимальная отпускная цена установлена на уровне 2000 тг за флакон, что позволяет рассчитать выручку, которая составит 72 000 000 тг в год при условии реализации всего объёма по установленной цене.

Для более полного понимания финансового положения важно рассмотреть как переменные, так и постоянные затраты: переменные затраты составляют 12 420 000 тг в год, а постоянные затраты – около 21 000 000 тг в год, что позволяет оценить общие издержки на уровне 33 420 000 тг. Прибыль до налогообложения составляет 38 580 000 тг, а чистая прибыль – 30 864 000 тг с учетом налога на прибыль. Эти показатели позволяют оценить ожидаемую рентабельность продукта, которая составляет около 43% от выручки, что объясняется значительным превышением цены над себестоимостью.

Важно отметить, что в расчёте не учтены коммерческие расходы (дистрибуция, логистика) и маржа посредников, что имеет значение для реального планирования. Для окончательной оценки финансовой эффективности проекта проведём расчет чистой приведённой стоимости (NPV) [143] и анализ окупаемости инвестиций.

Чистая приведённая стоимость (NPV) рассчитывается по формуле:

$$NPV = -I_0 + \sum \frac{CF_t}{(1+r)^t} \quad (10)$$

где

$t = 1 \dots n$

$CF_t$  – денежный поток в году  $t$ ;

$r$  – ставка дисконтирования;

$I_0$  – инвестиции

Окупаемость инвестиций (Payback Period) рассчитывается как время, необходимое для возврата первоначальных инвестиций, и определяется по формуле:

$$\text{Payback Period} = I_0 / CF \quad (11)$$

где:

$I_0$  – первоначальные инвестиции;

$CF$  – среднегодовой денежный поток

При анализе финансовой эффективности разработки и внедрения растительного спрея на основе *Cetraria islandica* для лечения заболеваний ротоглотки необходимо учитывать ряд ключевых экономических факторов. На основании представленных данных, ожидаемая чистая рентабельность продукта является высокой, поскольку чистая прибыль оценивается примерно в 30,9 млн тенге, что составляет около 43% от выручки, а прибыльность каждого флакона в

пересчете достигает 857 тенге. Проведение расчетов чистой приведенной стоимости (NPV) и анализа окупаемости инвестиций, предполагая капитальные вложения в размере 25 млн тенге и ставку дисконтирования 15%, позволит оценить финансовую устойчивость и целесообразность проекта, подчеркивая потенциал для создания конкурентоспособного и прибыльного продукта на фармацевтическом рынке Казахстана.

Теперь рассчитаем чистую приведённую стоимость (NPV) проекта по формуле:

$$NPV = -I_0 + \sum_{t=1}^5 \frac{CF_t}{(1+r)^t} \quad (12)$$

где

$I_0 = 25$  млн тг – первоначальные инвестиции,  
 $CF_t = 30$  млн тг – ежегодный чистый денежный поток,  
 $r = 0,15$  – ставка дисконтирования,  
 $t$  – номер года (от 1 до 5)

Расчёт даёт следующие результаты:

$$\text{За 1-й год: } \frac{30}{(1+0,15)^1} = \frac{30}{1,15} \approx 26,09 \text{ млн тг}$$

$$\text{За 2-й год: } \frac{30}{(1+0,15)^2} = \frac{30}{1,3225} \approx 22,69 \text{ млн тг}$$

$$\text{За 3-й год: } \frac{30}{(1+0,15)^3} = \frac{30}{1,5209} \approx 19,73 \text{ млн тг}$$

$$\text{За 4-й год: } \frac{30}{(1+0,15)^4} = \frac{30}{1,7490} \approx 17,16 \text{ млн тг}$$

$$\text{За 5-й год: } \frac{30}{(1+0,15)^5} = \frac{30}{2,0114} \approx 14,92 \text{ млн тг}$$

Итоговый расчёт NPV:

$$NPV = -25 + 26,09 + 22,69 + 19,73 + 17,16 + 14,92 \approx 75,59 \text{ млн тг}$$

Сумма дисконтированных потоков за 5 лет составляет примерно 100,6 млн тг. Вычтя первоначальные инвестиции в 25 млн тг, получаем  $NPV \approx 75,6$  млн тг.

Для более точной оценки можно учесть меньшие поступления в 1-м году (например, 15 млн вместо 30). В этом случае: ( $CF_1 = 15$ ) млн тг, и сумма за 5 лет составит примерно 87 млн тг, что приводит к  $NPV \approx 62$  млн тг. В любом случае, NPV остаётся положительной, что свидетельствует о высокой инвестиционной привлекательности проекта. В литературных примерах по сходным проектам (например, косметический крем) NPV за 5 лет составляет +137,6 млн тг, однако в тех случаях объёмы выручки были выше. Наш расчёт показывает NPV в диапазоне 60–80 млн тг, что подтверждает, что проект окупает вложения и приносит чистый дисконтированный доход.

Внутренняя норма доходности (IRR) при таких потоках будет значительно выше ставки дисконта, оцениваемая  $IRR > 50\%$ . Это связано с быстрой окупаемостью: почти за 1 год чистая прибыль в размере ~30 млн тг практически полностью покрывает первоначальные инвестиции в 25 млн тг. Срок окупаемости (Payback Period) составляет около 1 года (без дисконтирования) или примерно 1,2–1,5 года с учётом дисконтирования (DPP). Таким образом, проект быстро выходит на самоокупаемость и начинает генерировать чистый доход.

Однако следует провести анализ чувствительности, поскольку прибыльность проекта может зависеть от цены продажи и объёма. Например, если отпускную цену придётся снизить на 30% (до ~1400 тг/флакон) для конкуренции, то прибыль может сократиться, и NPV может снизиться вплоть до нуля при падении цены на ~36%. В то же время, если удастся увеличить объём реализации (например, выйти на экспорт и продавать 50 тыс. флаконов в год), NPV и прибыль будут расти пропорционально. Анализ показывает, что проект устойчив в разумных пределах: даже при снижении цены на 20% NPV остаётся положительной, и лишь падение цены более чем на 35% приведёт к убыточности.

*Анализ рисков проекта.* Проект по производству лекарственного спрея с экстрактом *Cetraria islandica*, хоть и выглядит прибыльным, сопряжён с рядом рисков. Необходимо их идентифицировать и предложить меры по снижению:

- регистрационные и законодательные риски. Возможны задержки или сложности при государственной регистрации препарата как лекарственного средства. Требования регулятора могут потребовать дополнительных исследований (например, доказательства эффективности через клинические испытания), что повлечёт непредвиденные расходы и отложит старт продаж. Также изменения в законодательстве (ужесточение правил растительных препаратов, ценовое регулирование) могут повлиять. Меры: тщательно подготовить досье, консультироваться с Национальным центром экспертизы, заранее учесть возможные требования;

- производственные риски. Сюда входят технические проблемы – сбои оборудования, несоответствие качества серий. Например, риск расслоения спрея или микробного обсеменения, если технология нарушена. Меры: инвестировать в качественное оборудование, провести квалификацию/валидацию процессов, обучить персонал GMP-требованиям;

- сырьевой риск. Экстракт *Cetraria islandica* – ключевое сырьё. Необходимо стабильное снабжение им по приемлемой цене. Меры: диверсифицировать поставщиков, иметь 2–3 альтернативных источника экстракта, заключать долгосрочные контракты с поставщиками на фиксированную цену;

- рыночные риски. Продукт может столкнуться с конкуренцией и не добиться планируемого объёма продаж. Меры: провести маркетинговое исследование перед запуском, выделить бюджет на продвижение, позиционировать спрей как натуральное и эффективное средство;

- финансовые риски. Включают колебания курсов валют, рост процентных ставок, непредвиденные расходы. Меры: заключать контракты в тенге или

хеджировать валютные риски, не брать избыточных кредитов с плавающей ставкой;

- риск безопасности и ответственности. Как лекарственное средство, спрей может вызвать побочные реакции. Меры: тщательно отслеживать безопасность на этапе разработки, обеспечить систему фармаконадзора после вывода на рынок.

В совокупности, при проактивном управлении рисками (регулярный мониторинг, планирование сценариев, страхование) проект может успешно преодолеть возможные проблемы.

Социально-экономический эффект реализации. Проект обладает значимым положительным влиянием на социально-экономическое развитие как на региональном, так и на национальном уровнях. Импортозамещение и фармацевтическая безопасность. Запуск производства отечественного спрея для горла снизит зависимость от импортных аналогов. Создание рабочих мест. На производстве спрея будут заняты квалифицированные кадры, что создаст новые рабочие места. Увеличение налоговых поступлений. Действующее производство будет платить налоги в бюджеты, что значительно увеличит налоговые поступления. Доступность и удобство терапии для населения. Выпуск эффективного и доступного по цене средства для лечения горла улучшит здоровье населения. Развитие фармацевтической науки и технологий. Проект базируется на использовании местных природных ресурсов и научных исследованиях их свойств. Экспортный потенциал. Если продукт зарекомендует себя на внутреннем рынке, возможен выход на рынки соседних стран. Косвенные эффекты. Проект демонстрирует успешный пример импортозамещения, что может вдохновить других предпринимателей. Социальная значимость проекта. Население получит более безопасное лечение, что улучшит качество жизни пациентов.

Подводя итог, реализация данного технико-экономического обоснования (ТЭО) принесёт не только коммерческую выгоду инвесторам, но и ощутимую пользу обществу и государству. Проект встраивается в стратегию локализации фармацевтического производства РК, создаёт высокомаржинальный отечественный продукт, улучшает здоровье граждан и способствует экономии бюджета за счёт снижения импорта. Все эти эффекты делают проект по производству спрея для горла с экстрактом исландского мха социально-экономически значимым и подтверждают целесообразность его внедрения.

В заключение расчёты финансовых показателей демонстрируют, что при заявленных условиях (цена до 2000 тенге и объём 36 000 флаконов в год) предприятие будет получать значительную прибыль. Проект способен окупиться менее чем за два года и обеспечить устойчивый денежный поток, что делает его экономически целесообразным.

### **Выводы по шестому разделу**

В данном разделе был проведён комплексный анализ разработки спрея с экстрактом *Cetraria islandica*, который демонстрирует высокую

фармацевтическую ценность и потенциальную эффективность как лечебного средства. Исследование показало, что экстракт обладает выраженной противовоспалительной, антимикробной и антималярийной активностью, что подтверждает его возможность применения в медицинской практике. Валидация технологического процесса производства экстракта обеспечила его высокое качество и стабильность, что является необходимым условием для дальнейшего использования в фармацевтической промышленности.

Анализ фармацевтического рынка Казахстана показал устойчивый спрос на препараты для лечения заболеваний горла, что создаёт благоприятные условия для внедрения нового спрея. Разработка эффективной и безопасной лекарственной формы, основанной на растительном сырье, отвечает современным требованиям потребителей и способствует расширению ассортимента отечественных препаратов. Установление оптимальных технологических параметров и стандартизация экстракта *Cetraria islandica* (L.) Ach. обеспечивают его соответствие нормативным требованиям, что подтверждает его статус как стандартизированной фармацевтической субстанции.

Финансовое обоснование проекта, проведённое в рамках технико-экономического обоснования (ТЭО), демонстрирует высокую рентабельность и быструю окупаемость спрея. При запланированном объёме выпуска 36 000 флаконов в год, полная себестоимость одного спрея составит около 895 тенге, а максимальная отпускная цена – 2000 тенге. Ожидаемая чистая прибыль составляет примерно 30,9 млн тенге, что соответствует 43% от выручки. Чистая приведённая стоимость (NPV) проекта, рассчитанная с учётом первоначальных инвестиций в 25 млн тенге и ставки дисконтирования 15%, показывает положительное значение около 75,6 млн тенге, что свидетельствует о высокой инвестиционной привлекательности. Срок окупаемости (Payback Period) составляет около 1 года, что делает проект экономически целесообразным.

Социально-экономический эффект от внедрения спрея включает создание новых рабочих мест, повышение доступности и качества медицинских услуг, а также снижение зависимости от импортных препаратов. Таким образом, проект по производству спрея для горла на основе экстракта *Cetraria islandica* (L.) Ach. имеет значительный потенциал для успешной реализации на фармацевтическом рынке Казахстана, что подтверждает целесообразность его внедрения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена фармацевтической разработке лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach. В ходе исследования было проведено комплексное фармакогностическое изучение, разработка оптимальной технологии получения экстрактов и оценка их биологической активности, что подтвердило ценность *Cetraria islandica* как возобновляемого источника растительного сырья с выраженным фармакологическим потенциалом.

Первая часть работы описывает технологию сбора и заготовки *Cetraria islandica*, основанную на принципах устойчивого природопользования и рекомендациях надлежащей практики сбора (GACP). Заготовка проводилась в соответствии с Законом РК «О растительном мире», что обеспечивает рациональное использование биологических ресурсов. Образцы собирались в стабильных экологических условиях, что подтверждает здоровье популяции и возможность частичного сбора без ущерба для экосистемы.

Морфолого-анатомическое исследование показало, что *Cetraria islandica* имеет гетеромерное листоватое слоевище высотой 12–15 см с характерными анатомическими структурами, такими как корковый и фотобионтный слой. Гистохимические реакции подтвердили наличие усниновой и фумарпротоцетраровой кислот, что подчеркивает фармакогностическую значимость данного сырья.

Фитохимическое исследование выявило широкий спектр биологически активных соединений, включая полисахариды и фенольные соединения, с содержанием усниновой кислоты в 2,98% на сухое вещество. Контроль качества подтвердил соответствие физико-химических, микробиологических и токсикологических показателей нормативным требованиям, позволяя рассматривать *Cetraria islandica* как стандартизованную фармацевтическую субстанцию.

В разделе, посвященном технологии экстракции, было установлено, что 70% этанол является наиболее эффективным экстрагентом, обеспечивающим максимальный выход активных веществ, таких как усниновая кислота. Валидация технологического процесса на предприятии ТОО «ПЛП Жанафарм» подтвердила управляемость и стабильность, что гарантирует высокое качество получаемого экстракта.

Долгосрочные исследования стабильности экстракта *Cetraria islandica* показали, что он сохраняет свои физико-химические и микробиологические характеристики на протяжении 24 месяцев при температуре  $25 \pm 2$  °C и относительной влажности  $60 \pm 5$  %. Это подтверждает высокую однородность и качество продукта.

Экспериментальные исследования противовоспалительной активности экстракта показали значительное снижение объема отека при дозе 500 мг/кг, достигая 69,90% эффекта, что сопоставимо с действием ибупрофена. Антимикробная и противогрибковая активность экстракта была подтверждена на десяти клинически значимых микроорганизмах, включая *Staphylococcus*

aureus, а также продемонстрировал антималярийную активность против *Plasmodium falciparum*.

Финансовое обоснование проекта по производству спрея на основе экстракта *Cetraria islandica* показывает высокую рентабельность и быструю окупаемость. При запланированном объеме выпуска 36 000 флаконов в год, полная себестоимость одного спрея составит около 895 тенге, а максимальная отпускная цена – 2000 тенге. Ожидаемая чистая прибыль составляет примерно 30,9 млн тенге, что соответствует 43% от выручки. Срок окупаемости составляет около 1 года, что делает проект экономически целесообразным.

Таким образом, проект по производству спрея на основе экстракта *Cetraria islandica* (L.) Ach. имеет значительный потенциал для успешной реализации на фармацевтическом рынке Казахстана, что подтверждает целесообразность его внедрения и открывает перспективы для дальнейшего использования данного экстракта в разработке новых фитопрепаратов

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Указ Президента Республики Казахстан от 30 июля 2024 года № 611 «Об утверждении Национального плана развития Республики Казахстан до 2029 года и признании утратившими силу некоторых указов Президента Республики Казахстан» // Информационно-правовая система «Әділет». // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/U2400000611> (дата обращения 01.05.2025).
- 2 Постановление Правительства Республики Казахстан от 12 октября 2022 года № 945 «Об утверждении Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года» // Информационно-правовая система «Әділет» // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/P2200000945> (дата обращения 01.05.2025).
- 3 Флора Казахстана. В 9 т. - Алма-Ата: Наука, 1968. - Т. 3. – С. 311–315.
- 4 Vladimirova I.N., Georgiyants V.A. Extracted compounds from *Cetraria islandica* // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49, № 2. – P. 347–348.
- 5 Фролова Л.Н., Ковалева Е.Л., Сахацки Е.И. и др. Сравнительный анализ номенклатуры лекарственного растительного сырья, используемого в отечественной и мировой фармакопейной практике // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 29–40. – DOI: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-1-29-40>.
- 6 Sánchez M., Ureña-Vacas I., González-Burgos E. и др. The genus *Cetraria* s. str.– A review of its botany, phytochemistry, traditional uses and pharmacology // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 15. – P. 4990. – DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27154990>.
- 7 Lutsak T., Fernández-Mendoza F., Greshake B. и др. Characterization of microsatellite loci in the lichen-forming fungus *Cetraria aculeata* (Parmeliaceae, Ascomycota) // Applications in Plant Sciences. – 2016. – Vol. 4, № 9. – Article apps.1600047. – DOI: <https://doi.org/10.3732/apps.1600047>.
- 8 Stolte, K.; Mangis, D.; Doty, R.; Tonnessen, K.; Huckaby, Laurie S. ed. 1993. Lichens as bioindicators of air quality. Gen. Tech. Rep. RM-GTR-224. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 131 p.
- 9 Leavitt, Steven & Lumbsch, Thorsten. (2016). Ecological Biogeography of Lichen-Forming Fungi. 10.1007/978-3-319-29532-9\_2.
- 10 Shpychak, A., Khvorost, O. (2022). Pharmacognostic study of *Cetraria islandica* (L.) Ach. thalli made in Ukraine. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 5 (39), 4–15. doi: <http://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.265019>
- 11 DÜLGER, Başaran; GÜCİN, Fahrettin; and ASLAN, Ali (1998) "Antimicrobial Activity of the Lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach.," Turkish Journal of Biology: Vol. 22: No. 1, Article 13. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol22/iss1/13>
- 12 Kosanić M, Ranković B. Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents. J Med Food. 2011 Dec;14(12):1624-30. doi: 10.1089/jmf.2010.0316. Epub 2011 Aug 23. PMID: 21861720

- 13 Soloveva MI, Kuzmina SS (2023) Antioxidant and antimicrobial activity of extracts of *Cetraria islandica* (L.) Ach. and *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. *Acta Biologica Sibirica* 9: 139–146. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7751287>
- 14 Sargsyan, R., Gasparyan, A., Tadevosyan, G. et al. Antimicrobial and antioxidant potentials of non-cytotoxic extracts of corticolous lichens sampled in Armenia. *AMB Expr* 11, 110 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01271-z>
- 15 Ranković, Branislav. (2019). Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. 10.1007/978-3-030-16814-8.
- 16 Manassov N., Samy M.N., Datkhayev U. и др. Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach. // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, № 11. – P. 4493. – DOI: 10.3390/molecules28114493.
- 17 Klarenberg IJ, Keuschnig C, Warshan D, Jónsdóttir IS, Vilhelmsson O. The Total and Active Bacterial Community of the Chlorolichen *Cetraria islandica* and Its Response to Long-Term Warming in Sub-Arctic Tundra. *Front Microbiol.* 2020 Dec 18; 11:540404. doi: 10.3389/fmicb.2020.540404. PMID: 33391192; PMCID: PMC7775390
- 18 Huneck S., Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. – Berlin: Springer-Verlag, 1996. – 505 p.
- 19 Elix, J.A. Progress in the Generic Delimitation of *Parmelia* Sensu Lato Lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a Synoptic Key to the Parmeliaceae. *Bryologist* 1993, 96, 359–383.
- 20 Bhagarathi L., Maharaj G., da Silva P., Subramanian G. A review of the diversity of lichens and what factors affect their distribution in the neotropics // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. – 2022. – Vol. 20. – P. 27–63. – DOI: 10.30574/gscbps.2022.20.3.0348.
- 21 Gómez-Serranillos M., Fernández-Moriano C., González-Burgos E. и др. Parmeliaceae family: Phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features // *RSC Advances*. – 2014. – Vol. 4. – P. 59017–59047.
- 22 Meessen, Joachim & Sánchez, Francisco & Brandt, Annette & Balzer, E.-M & Noetzel, Rosa & Sancho, Leopoldo & de Vera, Jean-Pierre & Ott, Sieglinde. (2013). Extremotolerance and Resistance of Lichens: Comparative Studies on Five Species Used in Astrobiological Research I. Morphological and Anatomical Characteristics. *Origins of life and evolution of the biosphere: the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*. 43. 10.1007/s11084-013-9337-2.
- 23 Thell A., Högnabba F., Elix J. и др. Phylogeny of the cetrarioid core (Parmeliaceae) based on five genetic markers // *Lichenologist*. – 2009. – Vol. 41. – P. 489–511.
- 24 Divakar P., Crespo A., Kraichak E. и др. Using a temporal phylogenetic method to harmonize family- and genus-level classification in the largest clade of lichen-forming fungi // *Fungal Diversity*. – 2017. – Vol. 84. – P. 101–117.
- 25 Randle T., Saag A. *Cetrarioid Lichens in Europe: An Identification Key for the Species*. – Tartu: University of Tartu, 2006. – 56 p.

- 26 Crespo, A., Kauff, F., Divakar, P. K., del Prado, R., Pérez-Ortega, S., de Paz, G. A., Thorsten Lumbsch, H. (2010). Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon*, 59(6), 1735–1753. <https://doi.org/10.1002/tax.596008>.
- 27 Thell A., Högnabba F., Elix J. и др. Phylogeny of the cetrarioid core (Parmeliaceae) based on five genetic markers // *Lichenologist*. – 2009. – Vol. 41. – P. 489–511.
- 28 Nash T.H., Ryan B.D., Gries C., Bungartz F. Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. – Tempe, AZ. - USA: Lichens Unlimited. - 2002. – Vol. 1.
- 29 Randle T., Saag A. Cetrarioid lichens in Europe – an identification key for the species // In: *Central European Lichens – Diversity and Threat* / Eds. Lackovičová A., Guttová A., Lisická E., Lizon P. – Ithaca, NY, USA: Mycotaxon, 2006. – P. 75–84.
- 30 Nadyeina O., Lutsak T., Blum O. и др. *Cetraria steppae* Savicz is conspecific with *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. according to morphology, secondary chemistry and ecology // *Lichenologist*. – 2013. – Vol. 45. – P. 841–856.
- 31 Kärnefelt I., Mattsson J.-E., Thell A. The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities // *Bryologist*. – 1993. – Vol. 96. – P. 394–404.
- 32 Thompson J.N. Conserving interaction biodiversity // In: *The Ecological Basis of Conservation* / Eds. Pickett S.T.A., Ostfeld R.S., Shachak M., Likens G.E. – Boston: Springer, 1997. – P. 285–293.
- 33 Van den Boom P.P.G., Sipman H.J.M. *Cetraria obtusata* comb. et stat. nov., an overlooked lichen species from the Central Alps // *Lichenologist*. – 1994. – Vol. 26. – P. 105–112.
- 34 Barreno E., Vázquez V.M. *Coelocaulon crespoe* Barreno & Vázquez sp. nova (Lichenes): Notas sobre la flora líquénica de brezales españoles // *Lazaroa*. – 1981. – Vol. 3. – P. 235–246.
- 35 Randle T., Saag A. Cetrarioid lichens in the Southern Hemisphere – an identification key and distribution patterns of the species // *Bibliotheca Lichenologica*. – 2007. – Vol. 95. – P. 489–499.
- 36 Singh C.P., Bajpai R., Singh R., Upreti D. Improving bioclimatic envelop modeling for lichens through remote sensing-based substratum correction: A study over Indian Himalaya // *Cryptogam Biodivers. Assess.* – 2016. – Vol. 1. – P. 30–48.
- 37 Goffinet B., Thomson J. *American Arctic Lichens. 2. The Microlichens* // *Bryologist*. – 2000. – Vol. 102. – P. 345.
- 38 Zhurbenko M., Laursen G., Walker D. New and rare lichenicolous fungi and lichens from the North American Arctic // *Mycotaxon*. – 2005. – Vol. 92. – P. 201–212.
- 39 Thompson J. *American Arctic Lichens: The Macrolichens*. – Madison, WI. - USA: University of Wisconsin Press, 1984. – Vol. 1.
- 40 Randle T., Saag A. Distribution patterns of some primary and secondary cetrarioid species // *Symbolae Botanicae Upsalienses*. – 2004. – Vol. 34. – P. 359–376.

41 Oscar Blanco, Ana Crespo, Richard H. Ree, H. Thorsten Lumbsch, Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 39, Issue 1, 2006, Pages 52-69, ISSN 1055-7903, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.12.015>.

42 Barreno E., Vázquez V.M. *Coelocaulon crespoae* Barreno & Vázquez sp. nova (Lichenes): Notas sobre la flora líquénica de brezales españoles // *Lazaroa*. – 1981. – Vol. 3. – P. 235–246.

43 Randlane T., Saag A. Distribution patterns of some primary and secondary cetrarioid species // *Symbolae Botanicae Upsalienses*. – 2004. – Vol. 34. – P. 359–376.

44 Ureña Vacas, Isabel & González Burgos, Elena & De Vita, Simona & Divakar, Padreep & Bifulco, Giuseppe & Gómez-Serranillos, Maria. (2022). Phytochemical Characterization and Pharmacological Properties of Lichen Extracts from Cetrarioid Clade by Multivariate Analysis and Molecular Docking. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022. 1-16. 10.1155/2022/5218248.

45 Thompson J.N. Conserving interaction biodiversity // In: *The Ecological Basis of Conservation* / Eds. Pickett S.T.A., Ostfeld R.S., Shachak M., Likens G.E. – Boston: Springer, 1997. – P. 285–293.

46 Randlane T., Saag A. Cetrarioid lichens in the Southern Hemisphere – an identification key and distribution patterns of the species // *Bibliotheca Lichenologica*. – 2007. – Vol. 95. – P. 489–499.

47 Randlane T., Saag A. Cetrarioid lichens in Europe – an identification key for the species // In: *Central European Lichens – Diversity and Threat* / Eds. Lackovičová A., Guttová A., Lisická E., Lizon P. – Ithaca, NY, USA: Mycotaxon, 2006. – P. 75–84.

48 Kärnefelt I., Mattsson J.-E., Thell A. The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities // *Bryologist*. – 1993. – Vol. 96. – P. 394–404.

49 Printzen C., Domaschke S., Fernández-Mendoza F., Pérez-Ortega S. Biogeography and ecology of *Cetraria aculeata*, a widely distributed lichen with a bipolar distribution // *MycoKeys*. – 2013. – Vol. 6. – P. 33–53. – DOI: 10.3897/mycokeys.6.3185.

50 Kärnefelt I., Mattsson J.-E., Thell A. The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities // *Bryologist*. – 1993. – Vol. 96. – P. 394–404.

51 Howe R.H. The genus *Cetraria* as represented in the United States and Canada // *Torreyia*. – 1915. – Vol. 15. – P. 213–230.

52 Randlane T., Saag A. Distribution patterns of some primary and secondary cetrarioid species // *Symbolae Botanicae Upsalienses*. – 2004. – Vol. 34. – P. 359–376.

53 Thompson J.N. Conserving interaction biodiversity // In: *The Ecological Basis of Conservation* / Eds. Pickett S.T.A., Ostfeld R.S., Shachak M., Likens G.E. – Boston: Springer, 1997. – P. 285–293.

54 Thompson J. *American Arctic Lichens: The Macrolichens*. – Madison, WI. - USA: University of Wisconsin Press, 1984. – Vol. 1.

- 55 Fernández-Mendoza F., Printzen C. Pleistocene expansion of the bipolar lichen *Cetraria aculeata* into the Southern Hemisphere // *Molecular Ecology*. – 2013. – Vol. 22. – P. 1961–1983.
- 56 Pérez-Ortega S., Fernández-Mendoza F., Raggio J. и др. Extreme phenotypic variation in *Cetraria aculeata* (lichenized Ascomycota): adaptation or incidental modification? // *Annals of Botany*. – 2012. – Vol. 109. – P. 1133–1148.
- 57 Kärnefelt I., Mattsson J.-E., Thell A. The lichen genera *Arctocetraria*, *Cetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities // *Bryologist*. – 1993. – Vol. 96. – P. 394–404.
- 58 Randlane T., Saag A. Cetrarioid lichens in the Southern Hemisphere – an identification key and distribution patterns of the species // *Bibliotheca Lichenologica*. – 2007. – Vol. 95. – P. 489–499.
- 59 EMA/HMPC/36866/2014. Assessment report on *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l., Thallus. – London: European Medicines Agency. - 2014. - ??
- 60 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. – e2200805 p. – DOI: 10.1002/jssc.202200805.
- 61 Rassabina AE, Gurjanov OP, Beckett RP, Minibayeva FV. Melanin from the Lichens *Cetraria islandica* and *Pseudevernia furfuracea*: Structural Features and Physicochemical Properties. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 May;85(5):623-628. doi: 10.1134/S0006297920050119. PMID: 32571192.
- 62 RU 2412718 C1. Гель, обладающий противомикробной активностью / В.В. Фролова, Н.А. Криштянова, Е.А. Климкина, О.М. Тихомирова; заявитель и патентообладатель: Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. – № заявки 2009113476/14; заявл. 13.04.2009; опубл. 10.03.2011. – 2 с. – URL: <https://patents.google.com/patent/RU2412718C1/ru> (дата обращения: 05.06.2025).
- 63 Vladimirova, Inna & Georgiyants, Victoriya. (2013). Extracted compounds from *Cetraria islandica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 49. 10.1007/s10600-013-0601-5.
- 64 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. 20, № 3. – P. 31–39.
- 65 Sánchez M., Ureña-Vacas I., González-Burgos E. и др. The genus *Cetraria* s. str. – A review of its botany, phytochemistry, traditional uses and pharmacology // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – Article 4990. – DOI: 10.3390/molecules27154990.
- 66 Lutsak T., Fernández-Mendoza F., Nadyeina O. и др. Testing the correlation between norstictic acid content and species evolution in the *Cetraria aculeata* group in Europe // *The Lichenologist*. – 2017. – Vol. 49, № 1. – P. 39–56. – DOI: 10.1017/S0024282916000566.
- 67 Krämer P., Wincierz U., Grübler G. и др. Rational approach to fractionation, isolation, and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica* // *Arzneimittelforschung*. – 1995. – Vol. 45. – P. 726–731.

68 Zacharski D.M., Esch S., König S. и др.  $\beta$ -1,3/1,4-Glucan Lichenan from *Cetraria islandica* (L.) ACH. induces cellular differentiation of human keratinocytes // *Fitoterapia*. – 2018. – Vol. 129. – P. 226–236.

69 Chang S.C., Saldivar R.K., Liang P.H., Hsieh Y.S.Y. Structures, biosynthesis, and physiological functions of (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucans // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – Article 510.

70 Sánchez M., Ureña-Vacas I., González-Burgos E., Divakar P.K., Gómez-Serranillos M.P. The genus *Cetraria* s. str. – A review of its botany, phytochemistry, traditional uses and pharmacology // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 15. – Article 4990. – DOI: 10.3390/molecules27154990.

71 Nybakken L., Solhaug K.A., Bilger W., Gauslaa Y. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats // *Oecologia*. – 2004. – Vol. 140, № 2. – P. 211–216. – DOI: 10.1007/s00442-004-1583-6.

72 Sánchez M., Ureña-Vacas I., González-Burgos E., Divakar P.K., Gómez-Serranillos M.P. The genus *Cetraria* s. str. – A review of its botany, phytochemistry, traditional uses and pharmacology // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – Article 4990. – DOI: 10.3390/molecules27154990.

73 Сухая таблетированная форма экстракта *Cetraria islandica*: пат. РФ № RU2321419C1. Заявл. 29.08.2006; опубл. 27.03.2008. // <https://patents.google.com/patent/RU2321419C1>.

74 Utilisation d'un extrait de *Cetraria islandica* pour le traitement de l'asthme bronchique: пат. FR № 2756182. Заявл. 09.05.1997; опубл. 13.11.1998. // <https://patents.google.com/patent/FR2756182A1>.

75 Даминова А.Г., Галеева Э.И., Рахматуллина Д.Ф. и др. Морфологические, физиологические и биохимические особенности меланизированного таллома лишайника *Cetraria islandica* // *Физиология растений*. – 2024. – Т. 71, № 3. – 92 с. – DOI: 10.1134/S1021443724606104.

76 Grujičić D., Stošić I., Kosanić M. и др. Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica* // *Cytotechnology*. – 2014. – Vol. 66, № 5. – P. 803–813. – DOI: 10.1007/s10616-013-9629-4.

77 Cernescu I., Tarțau L., Macavei A., Lupușoru C.E. Experimental research on the effects of a *Cetraria islandica* extract on oxidative stress in laboratory animals // *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*. – 2011. – Vol. 115, № 3. – P. 899–904. – PMID: 22046806.

78 Igoli J.O., Gray A.I., Clements C.J. и др. Antitrypanosomal activity & docking studies of isolated constituents from the lichen *Cetraria islandica*: possibly multifunctional scaffolds // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 1014–1021. – DOI: 10.2174/1568026614666140324122323.

79 Fernández-Moriano C., Divakar P.K., Crespo A., Gómez-Serranillos M.P. In vitro neuroprotective potential of lichen metabolite fumarprotocetraric acid via intracellular redox modulation // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2017. – Vol. 320. – P. 20–30. – DOI: 10.1016/j.taap.2016.12.020.

80 Makarevich E.V., Filippova E.I., Sedel'nikova N.V. и др. Anti-influenza activity of *Cetraria islandica* lichen extracts in in vitro experiments // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – Vol. 175, № 2. – P. 215–218. – DOI: 10.1007/s10517-023-05837-8.

81 Surayot U., Yelithao K., Tabarsa M., Lee D-Hee., Palanisamy S., Marimuthu Prabhu N., Lee J., You S., Structural characterization of apolysaccharide from *Cetraria islandica* and its derivatives affecting immune cells, Process Biochemistry. – 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.022>

82 Minganti V., Drava G., De Pellegrini R., Modenesi P., Malaspina P., Giordani P. Временные тенденции (1981–2007 гг.) накопления микро - и редкоземельных элементов в лишайнике *Cetraria islandica* (L.) Ach. из итальянских гербариев // Chemosphere. – 2013. – Т. 93, № 9. – С. 2254–2261. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.067.

83 Salama M. El-Darier & Amani W. Nasser *Cetraria Islandica* as a Pulmonary Cytoprotective and Supportive Herbal Remedy for Lung Complications Related to COVID-19. Sch Int J Tradit Complement Med. - 2021. - 4(10). – P. 168-174.

84 Zacharski D.M., Esch S., König S., Mormann M., Brandt S., Ulrich-Merzenich G., Hensel A.  $\beta$ -1,3/1,4-глюкан лишайника из *Cetraria islandica* (L.) Ach. индуцирует дифференцировку клеток человека – кератиноцитов // Fitoterapia. – 2018. – Т. 129. – С. 226–236. – DOI: 10.1016/j.fitote.2018.07.010.

85 Babich O., Sukhikh S., Prosekov A., Asyakina L., & Ivanova S. (2020). Medicinal Plants to Strengthen Immunity during a Pandemic. Pharmaceuticals, 13, 313. Assessment report on *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l., thallus, Committee on Herbal Medicinal Products. European Medicines Agency, 2014.

86 Encyclopedia of Herbs and Their Uses / Deni Bown. — London: Dorling Kindersley, 2001. — 1-34 p.

87 Роль лекарственных растительных препаратов для симптоматического лечения в реализации стратегии рационального использования антибактериальных препаратов и сохранения микрофлоры // Российский медицинский журнал. // [https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Roly\\_lekarstvennyh\\_rastitelnyh\\_preparatov\\_dlya\\_simptomaticheskogo\\_lecheniya\\_v\\_realizacii\\_strategii\\_racionalnogo\\_ispolzovaniya\\_antibakterialnyh\\_preparatov\\_i\\_sohraneniya\\_mikroflory\\_referat/](https://www.rmj.ru/articles/pediatriya/Roly_lekarstvennyh_rastitelnyh_preparatov_dlya_simptomaticheskogo_lecheniya_v_realizacii_strategii_racionalnogo_ispolzovaniya_antibakterialnyh_preparatov_i_sohraneniya_mikroflory_referat/) 25.05.2025.

88 Общий фармацевтический рынок ЕАЭС продолжает формироваться // Pharmnews.kz. – 2025. // [https://pharmnews.kz.com/ru/article/obschiy-farmaceuticheskiy-rynok-evraziyskogo-ekonomicheskogo-soyuza-prodolzhaet-formirovatsya\\_24757](https://pharmnews.kz.com/ru/article/obschiy-farmaceuticheskiy-rynok-evraziyskogo-ekonomicheskogo-soyuza-prodolzhaet-formirovatsya_24757) 25.05.2025.

89 Лужанин В.Г., Куркин В.А., Гравель И.В. Качество лекарственных растительных препаратов: новые аспекты и решения // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 128–133. – DOI: 10.30895/1991-2919-2023-13-2-128-133.

90 Приказ МЗ РК от 27 декабря 2021 года № КР ДСМ-128 «Об утверждении правил экспертизы, регистрации, перерегистрации и внесения изменений в регистрационное досье лекарственных средств, медицинских

изделий и медицинской техники» // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2100025969> 25.05.2025.

91 Технический регламент ТР ЕАЭС 030/2017 «О безопасности лекарственных средств для медицинского применения». Принят Решением Совета ЕЭК от 3 ноября 2017 г. № 78. // [https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01414390/ti\\_30112017/](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01414390/ti_30112017/) 25.05.2025.

92 International Council for Harmonisation. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q6A Женева, 1999. // <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf> 25.05.2025.

93 European Medicines Agency. Guideline on quality of herbal medicinal products / Traditional herbal medicinal products. ЕМА/НМРС/СНМР/СVMP/201116/2005 Rev. 3 – 2011. // <https://www.ema.europa.eu/en/quality-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal-products-scientific-guideline> 25.05.2025.

94 Плетнёва Т.В., Успенская Е. В., Мурадова Л. И. Контроль качества лекарственных средств: учебник / под ред. Т.В. Плетнёвой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 560 с. // <https://ru.scribd.com/document/522375284> 25.05.2025.

95 Приказ МЗ РК от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении стандартов надлежащих фармацевтических практик» // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2100022167> 25.05.2025.

96 Промышленная технология лекарственных средств: учеб. пособие: в 2 т. / под ред. И.И. Краснюка, Н. Б. Деминой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – Т. 1. – 496 с. – ISBN 978-5-9704-5742-3.

97 Приказ МЗ РК от 11 декабря 2020 года № ҚР ДСМ-248/2020 «Об утверждении правил проведения клинических исследований лекарственных средств и медицинских изделий...» // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2000021772> 25.05.2025.

98 Thenmozhi N., Clement Atlee W., Amutha P., A review on pharmacological activity and traditional medicine of *Commelina benghalensis* Linn. // International Journal of Pharmacy and Analytical Research (IJPAR). – 2024. – Vol. 13, № 4. – P. 673–677. – DOI: <https://doi.org/10.61096/ijpar.v13.iss4.2024.673-677>

99 Zarabska-Bo, Daria & Zejewicz, & Zbieta, El & Nska-Sroka, Studzi & Faltynowicz, Wiesław. (2015). Transplantation of lichen thalli: a case study on *Cetraria islandica* for conservation and pharmaceutical purposes.

100 Airaksinen M.M., Peura P., Antere S. Toxicity of Iceland Lichen and Reindeer Lichen // Archives of Toxicology. – 1986. – Vol. 9. – P. 406–409. – DOI: 10.1007/978-3-642-71248-7\_81.

101 Giordani P., Drava G., De Pellegrini R. и др. Temporal trends (1981–2007) of trace and rare earth elements in the lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach. from Italian herbaria // Chemosphere. – 2014. – Vol. 99. – P. 180–185. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.067.

102 Манасов Н. Қ., Датхаев У.М., Кисличенко А.В., Журавель И.А. Исследование жирнокислотного состава лишайников, произрастающих в

Казахстане: *Cetraria islandica* и *Xanthoparmelia vagans* // *Фармация*. – 2024. – № 1 (252). – С. 333–340. – DOI:10.53511/PHARMKAZ.2024.12.21.044

103 ЕМА. Guideline on quality of herbal medicinal products. ЕМА/НМРС/СНМР/СVMP/201116/2005 Rev. 3 // <https://www.ema.europa.eu/en/quality-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal-products-scientific-guideline> 25.05.2025.

104 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.

105 Agnan Y., Séjalon-Delmas N., Probst A., Comparing early twentieth century and present-day atmospheric pollution in SW France: a story of lichens. *Environ. Pollut.* - 2013. – 172. – P. 139–148.

106 De Bruyn A. The identification by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy of Sucrose, I-Kestose, and Neokestose in Mixtures Present in Plant Extracts. *Carbohydr. Res.* – 1991. - 211. – P. 131-136.

107 Xu M., Heidmarsson S., Thorsteinsdottir M., Kreuzer M., Hawkins J., Omarsdottir S., Olafsdottir E. S. Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLCQToFMS Chemical Profiling and DNA Barcoding. *Food Chem.* – 2018. – 245. - 989996 p.

108 Nguyen K.H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi S. UV-Protectant Metabolites from Lichens and their Symbiotic Partners. *Nat. Prod. Rep.* – 2013. – 30. – P. 1490-1508.

109 Solberg Y.J. Studies on Chemistry of Lichens. III. Long Chain Tetrahydroxy Fatty Acids from Some Norwegian lichens. *Acta Chem. Scand.* – 1960. – 14. – P. 2152-2160.

110 Всемирная организация здравоохранения. Надлежащая практика выращивания и сбора лекарственных растений (ГАСР): руководство. – Женева: ВОЗ, 2003. – 72 с.

111 FAO. Good Practice in the Collection of Non-Wood Forest Products. – Rome: FAO, 2010. – 85 p.

112 Яценко-Хмелевский А.А. (ред.). Лишайники: биоразнообразие, мониторинг и охрана. – М.: Научный мир, 2001. – 384 с.

113 Orange A., James P.W., White F.J. *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. – 2nd ed. – London: British Lichen Society, 2010.

114 Butan S., Ghinea I., Adam G. и др. Characterization of bioactive compounds from Romanian *Cetraria islandica* (L) Ach. // *Revista de Chimie*. – 2019. – Vol. 70. – P. 2186–2191. – DOI: 10.37358/RC.19.6.7302.

115 Eifler-Lima V.L., Sperry A., Sinbandhit S., Boustie J., Tomasi S., Schenkel E. NMR Spectral Data of Salazinic Acid Isolated from Some Species of Parmotrema. *Magn. Reson. Chem.* – 2000. - 38. – P. 472–474.

116 OECD (1998), OECD Principles on Good Laboratory Practice, OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 1, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264078536-en>. Di Pietro M.E., Mannu A., Mele A. NMR Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils. *Processes*. – 2020. - 8(10). – 410 p.

117 Latkowska E., Bober B., Chrapusta E., Adamski M., Kaminski A., Bialczyk J. Secondary Metabolites of the Lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) Bark. *Phytochemistry*. – 2015. – 118. – P. 116-123.

118 Vačkor M., Zetikova J. Effects of Copper Cobalt and Mercury on the Chlorophyll Contents of Lichens *Cetraria islandica* and *Flavocetraria cucullata*. *J. Hattori Bot. Lab.* – 2003. – 93. – P. 175– 187.

119 Ahmadjian V., Hale M.E. *The lichens*, Academic Press: New York. – 1973. – 697 p.

120 Яницкий Я.В., Лузина Л. А., Мингазов А.Р. Усниновая кислота: получение, строение, свойства и химические превращения // *Химическая наука для устойчивого развития*. – 2012. – Т. 81, № 8. – С. 747–768.

121 О растительном мире: Закон РК от 2 января 2023 года № 183-VII ЗРК // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/Z2300000183> 25.05.2025.

122 Freysdottir J., Omarsdottir S., Ingolfssdottir K., Vikingsson A., Olafsdottir E.S. In vitro and in vivo immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica* // *International Immunopharmacology*. – 2008. – Vol. 8, № 3. – P. 423–430. – DOI: 10.1016/j.intimp.2007.11.007.

123 Prasedya E.S., Frediansyah A., Martyasari N.W.R. и др. Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – Article 17876. – DOI: 10.1038/s41598-021-95769-y.

124 Fito I., Stadnytska N.E., Gubitskaya I.I. и др. Влияние растворителя на содержание общих фенольных соединений, флавоноидов и антиоксидантную активность экстрактов *Cetraria islandica* // *International Journal of PharmTech Research*. – 2020. – Т. 13, № 3. – С.198–201.

125 ООО «Вилитек». Ультразвуковые ванны // <https://vilitek.ru/products/ultrazvukovye-vanny> 25.05.2025.

126 Zhang Q.W., Lin L.G., Ye W.C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review // *Chinese Medicine*. – 2018. – Vol. 13. – Article 20. – DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x. – PMID: 29692864. – PMCID: PMC5905184.

127 Sultan M., Rahmawati R., Puspitasari N. Development and validation of analytical method for ethanol content in herbal medicine // *Journal of Halal Science and Research*. – 2025. – Vol. 6, № 1. – P. 92–101. // <https://journal2.uad.ac.id/index.php/jhsr/article/download/12217/5185> 25.05.2025.

128 О хранении и транспортировке лекарственных средств и медицинских изделий: МЗ РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-19 // <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2100022230> 25.05.2025.

129 G.A. Gudjónsdóttir, K. Ingólfssdóttir, Quantitative determination of protolichesterinic- and fumarprotocetraric acids in *Cetraria islandica* by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 757, Issues 1–2, 1997, Pages 303-306, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00670-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00670-X).

130 Xu, Maonian & Heiðmarsson, Starri & Thorsteinsdottir, Margret & Kreuzer, Marco & Hawkins, Julie & Omarsdottir, Sesselja & Olafsdottir, Elin. (2017). Authentication of Iceland Moss by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding. *Food Chemistry*. 245. 10.1016/j.foodchem.2017.11.073.

131 Kumar, K.; Siva, B.; Sarma, V.U.M.; Mohabe, S.; Reddy, A.M; Boustie, J.; Tiwari, A.K.; Rao, N.R., Babu K.S. UPLC-MS/MS quantitative analysis and structural fragmentation study of five Parmotrema lichens from the Eastern Ghats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 156, 45-57.

132 Nguyen, K.H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. UV-Protectant Metabolites from Lichens and their Symbiotic Partners. *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30, 1490-1508.

133 Reddy, S.D.; Siva, B.; Kumar, K.; Babu, V.S.P.; Sravanthi, V.; Boustie, J.; Nayak, V.L.; Tiwari, A.K.; Rao, C.H.V.; Sridhar, B.; Shashikala, P.; Babu, K.S. Comprehensive Analysis of Secondary Metabolites in *Usnea longissima* (Lichenized Ascomycetes, Parmeliaceae) Using UPLC-ESI-QTOF-MS/MS and Pro-Apoptotic Activity of Barbatic Acid. *Molecules*. 2019, 24(12), 2270.

134 Gudjónsdóttir, G.A.; Ingólfssdóttir, K. Quantitative Determination of Protolichesterinic- and Fumaroprotocetraric Acid in *Cetraria islandica* by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997, 757, 303-306.

135 Solberg, Y.J. Studies on Chemistry of Lichens. III. Long Chain Tetrahydroxy Fatty Acids from Some Norwegian lichens. *Acta Chem. Scand.* 1960, 14, 2152-2160.

136 Xu, M.; Heidmarsson, S.; Thorsteinsdottir, M.; Kreuzer, M.; Hawkins, J.; Omarsdottir, S.; Olafsdottir, E. S. Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLCQToFMS Chemical Profiling and DNA Barcoding. *Food Chem.* 2018, 245, 989996

137 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. - 944 с. – ISBN 978-5-8124-1223-8.

138 Сетевое издание «Фармацевтическое обозрение Казахстана» // <https://pharm.reviews/ru/analitika/item/8515-proxima-research-roznichnyj-segment-farmatsevticheskogo-rynka-kazakhstana-itogi-yanvaryaya-maya-2023-g> / 02.08.2023.

139 Итоги фармацевтического рынка ГЛС. Главные тренды 1 квартала 2025 года // [Viortis.kz](https://viortis.kz) // <https://viortis.kz> 25.05.2025.

140 Прогноз по рынку за 1 квартал 2025 года // [Proxima Research Kazakhstan](https://proximaresearch.com/kz/ru/) // <https://proximaresearch.com/kz/ru/> 25.05.2025.

141 Zhakipbekov, Kairat & Posylkina, Olga & Zhumabayev, Narbek & Datkhayev, Ubaidilla & Zhumabayev, Nurdaulet & Almurzaeva, Almira & Mukanova, Arailym. (2023). Analysis of the current state of the pharmaceutical market of the Republic of Kazakhstan. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 57-67. 10.15587/2519-4852.2023.267787.

142 Манасов Н.Қ., Датхаев У.М., Махатова Б.Г., Маркетинговый анализ лекарственных форм для рассасывания на фармацевтическом рынке Республики Казахстан за 2019–2020 годы // *Фармация*. – 2021. – 6 марта. – [Электронный

ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmkaz.kz/wp-content/uploads/2024/03/МАНАСОВ.pdf>

143 Манасов Н.Қ., Датхаев У.М., Махатова Б. Г. Обзор фармацевтического рынка ингаляционных ЛФ и ЛФ для рассасывания, представленных в Казахстане // Фармация Казахстана. – 2023. – № 4. – С. 12–25. – URL: <https://pharmkaz.kz/wp-content/uploads/2024/03/МАНАСОВ.pdf>

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

|   |  |                                |
|---|--|--------------------------------|
|  | <b>«С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАҚ</b><br><b>НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д.АСФЕНДИЯРОВА»</b> |                                |
|   | Локальная этическая комиссия (ЛЭК)   | Заключение                     |
|   |  | Редакция: 1<br>Страница 1 из 1 |

### Заключение

Локальная этическая комиссия (ЛЭК)

НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова»

|    |  |   |
|----|--|---|
| 1. | ФИО докторанта   | Манасов Нурлен Қыдырбайұлы  |
| 2. | Специальность (образовательная программа) докторантуры   | Фармация  |
| 3. | Период обучения в докторантуре   | 2019-2022   |
| 4. | Тема диссертации, дата утверждения   | «Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья Цетрарии исландской <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach» |
| 5. | Данные о научных консультантах – Ф.И.О. (при его наличии), должности и места работы, ученые степени, гражданство                                     | Датхаев У.М., д.фарм.н., профессор (Казахстан)<br><br>Samir A. Ross PhD, профессор фармакогнозии(США)   |
| 6. | Объекты исследования   | экстракт <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach   |
| 7. | Нарушения в процессе планирования, оценки, отбора и проведения научных исследований  | Нарушения не выявлены.  |
| 8. | Нарушения в процессе распространения результатов научных исследований  | Нарушения не выявлены.  |
| 9. | Каким образом проводилась защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования (в случае наличия объектов живой природы и среды обитания)? | Защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования проводилась по соблюдению руководств по проведению клинических исследований.             |

**Председатель ЛЭК**



**Т.Салиев**

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ      РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**ПАТЕНТ**  
**PATENT**

№ 9692

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

 (21) 2024/0772.2

(22) 15.06.2024

(45) 18.10.2024

(54) Цетрария исландика *Cetraria islandica* L. Ach. қабаттарынан қою сығынды алу тәсілі  
Способ получения густого экстракта из слоевищ Цетрарии исландской *Cetraria islandica* L. Ach.  
Method of obtaining a thick extract from *Cetraria islandica* L. Ach.

(73) Манасов Нурлен Қыдырбайұлы (KZ)  
Manasov Nurlen Kydyrbayuly (KZ)

(72) Манасов Нурлен Қыдырбайұлы (KZ)      Manasov Nurlen Kydyrbayuly (KZ)  
Датхаев Убайдила Махамбетович (KZ)      Datkhayev Ubaidilla Makhambetovich (KZ)  
Махатова Балжан Галымжановна (KZ)      Makhatova Balzhan Galymzhanovna (KZ)



ЭШК қол қойылды  
Подписано ЭШП  
Signed with EDS

С. Ахметов  
С. Ахметов  
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директорының м.а.  
И.о. директора РП «Национальный институт интеллектуальной собственности»  
Executive director of RSE «National institute of intellectual property»

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ  
ЭКОЛОГИЯ ЖӘНЕ ТАБИҒИ РЕСУРСТАР  
МИНИСТРЛІГІ ОРМАН  
ШАРУАШЫЛЫҒЫ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР  
ДҮНИЕСІ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасының Экология және табиғи ресурстар министрлігі Орман шаруашылығы және жануарлар дүниесі комитетінің «Ботаника және фитоинтродукция институты» шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны



МИНИСТЕРСТВО ЭКОЛОГИИ И  
ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ РЕСПУБЛИКИ  
КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА И  
ЖИВОТНОГО МИРА

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт ботаники и фитоинтродукции» Комитета лесного хозяйства и животного мира Министерства экологии и природных ресурсов Республики Казахстан

050040, Алматы қ., Тимирязев к., 36 «Д»,  
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 36 «Д»,  
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

№ 04-05/252

«03» июль 2023 г.

Проректору НАО  
«Казакский национальный  
медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова»,  
д. фарм. н. Датхаеву У.М.

**Уважаемый Убайдилла Махамбетович!**

В ответ на Ваше письмо 3921-09-04-01-22-09 от 16.06.2023 сообщаем, что присланный нам образец, собранный в Каркаралинском районе Карагандинской области, действительно относится к виду *Cetraria islandica* (L.) Ach. Согласно современной классификации, вид относится не к растениям, а к лишенизированным грибам (лишайникам). Видовая принадлежность установлена на основе морфологических признаков и химических реакций, специфических для лишайников.

Генеральный директор, д.б.н.



Ситпаева Г.Т.

Ответственный исполнитель: ГНС лаборатории микологии и альгологии, д.б.н. Рахимова Е.В.  
тел.: 8-777-346-10-40

Исполнитель: ст. лаборант лаборатории микологии и альгологии, Мырзахан А.  
Тел.: +7-708-364-85-36

## Приложение Г

| <br>ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ<br>АУЫЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫ МИНИСТРЛІГІ<br>АГРОӨНЕРКӘСІПТІК КЕШЕНДЕГІ<br>МЕМЛЕКЕТТІК ИНСПЕКЦИЯ КОМИТЕТІ  |  | REPUBLIC OF KAZAKHSTAN<br>MINISTRY OF AGRICULTURE<br>COMMITTEE OF STATE INSPECTION<br>IN THE AGROINDUSTRIAL COMPLEX  |   |
|--|--|--|---|
| (1) Экспорттаушы және оның мекен-жайы<br><i>Name and address of exporter</i><br>Manassov Nurlen Kydyrbayuly<br>198 ULICA Islam Karimov, Apt. 72, Almalinskij rajon, Almaty, KAZAKHSTAN   |  | (2) ФИТОСАНИТАРЛЫҚ СЕРТИФИКАТ<br>PHYTOSANITARY CERTIFICATE<br>0702/202109151456744   |   |
| (3) Мәлімденген алушы және оның мекен-жайы<br><i>Declared name and address of consignee</i><br>Manassov Nurlen Kydyrbayuly<br>The University of Mississippi P.O. Box 1848, University, MS 38677 USA  |  | (4) Кімге: Өсімдіктер карантині және оларды қорғау жөніндегі ұйымына (елі)<br>TO: Plant Protection and Quarantine Organization(s) of (country)<br>UNITED STATES OF AMERICA |   |
|  |  | (5) Мәлімденген тасып әкелу пункті<br><i>Declared point of entry</i><br>USA  |   |
| (6) Шыққан жері<br><i>Place of origin</i><br>REPUBLIC OF KAZAKHSTAN  |  | (7) Мәлімденген тасымалдау тәсілі<br><i>Declared means of conveyance</i><br>Air transport  |   |
| (8) Өнімнің атауы; орын саны және бұйым-түйдің сипаттамасы; айрықша белгілер (маркировка); өсімдіктің ботаникалық атауы<br><i>Name of produce; number and description of packages, Distinguishing marks and botanical name of plants</i>   |  |  | (9) Мәлімденген саны<br><i>quantity declared</i>  |
| Plants and their parts (including seeds and fruits), used primarily in perfumery, in pharmacy or for insecticidal, fungicidal or similar purposes, fresh or dried, whole or chopped, crushed or ground.  |  |  | 1825 g  |
| XXX  | packet - 2   | XXX  | XXX   |
| XXX  | XXX  | XXX  | XXX   |
| XXX  | XXX  | XXX  | XXX   |
| XXX  | XXX  | XXX  | XXX   |
| (10) Жоғарыда көрсетілген өсімдіктер, өсімдік өнімдері немесе басқа да карантинге жатқызылған материалдар тиісті ресми процедураларға сәйкес зерттелді және/немесе талданды және импорттаушы келісуші тарап мәлімдеген карантиндік зиянкес организмдерден таза деп танылды және реттелетін карантиндік емес зиянкес организмдерге арналғандарын да қоса импорттаушы келісуші тараптың қолданысындағы фитосанитарлық ережелеріне сәйкес келеді деп танылды.<br>This is to certify that the plants, plant products or other regulated articles described herein have been inspected and/or tested according to appropriate official procedure and are considered to be free from the quarantine pests specified by the importing contracting party and to form with the current phytosanitary requirements of the importing contracting party, including those for regulated non-quarantine pests. |  |  |   |
| (11) Қосымша декларация<br><i>Additional declaration</i>   |  |  |   |
| Зарарсыздандыру<br><i>disinfection and/or disinfection treatment</i>   |  | Берілген жері<br><i>Place of issue</i><br>The Almaty city territorially inspection   |   |
| (12) Өңдеу тәсілі / Treatment<br>xxx   |  | Күні/Date<br>15.09.2021  |   |
| (13) Химикат (қолданыстағы зат) /<br><i>Chemical (active ingredient)</i><br>xxx  | (14) Экспозициясы және температурасы<br><i>Duration and temperature</i><br>xxx |  | Үкілетті инспектордың тегі<br><i>Name of authorized officer</i><br>Сейтқожа Айкерім Дауленқызы                    |
| (15) Концентрация / Concentration<br>xxx   | (16) Күні / Date<br>xxx  |  | Қолы<br><i>Signature</i><br> |
| (17) Қосымша ақпарат / Additional information<br>xxx   |  | Ұйымының мөрі<br><i>Stamp of organization</i><br>                                     |   |

AA №2191943

## Приложение Д

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Директор ТОО «ПСП «ЖАНАФАРМ»  
Коржумбаев А.А.

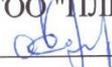


«\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

### **ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ** на производство экстракта *Cetraria islandica Ach.*, густой

---

Согласовано:  
Директор  
ТОО «ПСП ЖАНАФАРМ»

  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Рекомендовано к утверждению:  
Начальник производства

«\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

**Разработчик:**  
Докторант 3 курса Манасов Нурлен

## Приложение Е



Коржумбаев А.А.

**ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА**  
РГП на ПХВ «Национальный центр  
экспертизы лекарственных средств,  
медицинских изделий» МЗ РК

**ПРИКАЗ**  
Комитета фармации МЗ РК  
от «\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.  
№ \_\_\_\_\_

«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.  
М.П.

### НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

**Наименование лекарственного продукта**

Исланд мүгі кою экстракт

Исландский мох экстракт густой

**Наименование и страна организации-производителя**

ТОО «ПЛП «ЖАНАФАРМ», Казахстан

**Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения**

ТОО «ПЛП «ЖАНАФАРМ», Казахстан

**Наименование и страна организации-упаковщика**

ТОО «ПЛП «ЖАНАФАРМ», Казахстан

НД РК № \_\_\_\_\_

Срок введения установлен с  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Срок действия до  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

---

**ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

## Приложение Ж

|   |  |  |
|---|--|--|
|  | «С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАҚ<br>НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д.АСФЕНДИЯРОВА» |  |
|   | Кафедра фармацевтической технологии  | Методическая разработка для<br>практического занятия |
|   |  | Редакциясы: 1<br>1 страница из 1                     |

**УТВЕРЖДАЮ**  
**Зав. кафедрой**  
**фармацевтической**  
**технологии**  
\_\_\_\_\_ Устенова Г.О.  
« 21 » 05 2025 г.

**АКТ**  
**о внедрении фрагмента научно-исследовательской работы**  
**Манасов Н.К.**

**Тема:** «Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica (L.) Ach.*»

**Наименование предложения для внедрения:** «Получение густого экстракта методом мацерации с применением ультразвукового воздействие. Технологический процесс изготовления экстракта *Cetraria islandica* с применением ультразвукового воздействие» по теме диссертации «Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica (L.) Ach.*»

**Учреждение,** автор: НАО «Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова», кафедра фармацевтической технологии, PhD докторант по специальности 8D1010102 - «Фармация» Манасов Н.К.

**Где внедрено:** Кафедра фармацевтической технологии

**Форма внедрения:** Получение густого экстракта методом мацерации с применением ультразвукового воздействие. Технологический процесс изготовления экстракта *Cetraria islandica* методом мацерации с применением ультразвукового воздействие

**Эффективность внедрения:** внедрение способа получения спиртового экстракта из слоевищ лишайника *Cetraria islandica (L.) Ach.*

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: Нет

Ответственные за внедрение, исполнитель:

**Ответственный от кафедры фармацевтической технологии, ас. проф. б/уз, Кантуреева А.М.**

**Исполнитель, PhD докторант Манасов Н.К.**



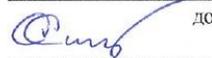
## Приложение И

### УТВЕРЖДЕН

ООО «Инновационные Медицинские Решения» (ООО «ИМР»)

наименование организации-производителя

Уполномоченное лицо по качеству



должность

Смирнов С.А.

подпись

ФИО

### АКТ

Внедрение результатов научно-исследовательской работы

**Производство фармацевтических препаратов:** ООО «ИМР»

**Наименование предложения:** технология получения спрея из густого экстракта Цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)

Тема PhD диссертационной работы: «Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach.»

**Учреждение, автор:**

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова», специальность 8D10102 -«Фармация» PhD докторант Манасов Нурлен Қыдырбайұлы

**Область применения:** фармация, технология фармацевтического производства, технология лекарственных форм

**Форма внедрения:** практическое применение получения спрея из густого экстракта Цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)

**Эффективность внедрения:** Предлагаемая технология позволяет разработать новое высокоэффективное фармацевтическое средство - спрей, изготовленный из густого экстракта Цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.). Этот препарат предназначен для использования в фармацевтической промышленности, обеспечивая высокую эффективность лечения благодаря уникальным свойствам экстракта.

**Предложения и замечания учреждения, осуществляющего внедрения:** Нет

Ответственные за внедрение, исполнитель:

|   |  |
|---|--|
| От НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова»   | От производство фармацевтических препаратов: ООО «ИМР»   |
| Научные консультанты:<br>д.фарм.н., профессор Датхаев У.М. _____<br>профессор фармакогнозии, PhD Samir A. Ross _____<br>«    »                   20    г. | Уполномоченное лицо по качеству<br>ООО «ИМР» _____<br>Смирнов С.А. _____<br>«02» июля 2024 г.<br> |
| Исполнитель:<br>PhD докторант Манасов Н.К. _____<br>«    »                   20    г.   |  |

## Приложение К

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ  
Минздрава России  
д.фарм.и. профессор



И.А. Наркевич

202\_ г.

### Акт внедрения результатов научно-практической работы в научно-исследовательский процесс

Комиссия в составе:

|                   |  |               |
|-------------------|--|---------------|
| Председателя      | проректора по научной работе,<br>д-р. фармацевт. наук, профессора  | Е.В. Флисюк   |
| и членов комиссии | научного сотрудника<br>департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров, канд.<br>фармацевт. наук | К.О. Сидорова |
|                   | директора департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров,<br>канд. биол. наук, доцента          | И.А. Титович  |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем:

Результаты диссертационного исследования Манасова Нурлена Қыдырбайұлы на тему «Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья *Cetraria islandica* (L.) Ach», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Технология получения спрея из густого экстракта Цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.)», использовано в научно-исследовательской деятельности кафедры промышленной технологии лекарств ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках практического применения получения спрея из густого экстракта Цетрарии исландской (*Cetraria islandica* (L.) Ach.).

|                |  |   |              |
|----------------|--|---|--------------|
| Председатель   | проректор по научной работе,<br>д-р. фармацевт. наук, профессор  |  | Е.В. Флисюк  |
| члены комиссии | научный сотрудник<br>департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров,<br>канд. фармацевт. наук |  | К.О. Сидоров |
|                | директор департамента науки и<br>подготовки научно-<br>педагогических кадров,<br>канд. биол. наук, доцент          |  | И.А. Титович |

# Приложение Л

Образец внесен в Гербарий NCNPR (University of Mississippi) #24269



Article

## Ultrastructural, Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, Chemical Study and LC-DAD-QToF Chemical Characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach

Nurlen Manasov <sup>1,2</sup>, Mamdouh Nabil Samy <sup>3</sup>, Ubaidilla Datkhayev <sup>2</sup>, Bharathi Avula <sup>1</sup>, Sebastian John Adams <sup>1</sup>, Kumar Katragunta <sup>1</sup>, Vijayasankar Raman <sup>1</sup>, Ikhlas A. Khan <sup>1,4</sup> and Samir A. Ross <sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA; nura134@mail.ru (N.M.); bavula@olemiss.edu (B.A.); jasabest@olemiss.edu (S.J.A.); kkatragu@olemiss.edu (K.K.); vraman@olemiss.edu (V.R.); khan@olemiss.edu (I.A.K.)

<sup>2</sup> S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, School of Pharmacy, Almaty 050012, Kazakhstan; u.datkhayev@kaznmu.kz

<sup>3</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Minia University, Minia 61519, Egypt; mamdouh.elskandri@mu.edu.eg

<sup>4</sup> Division of Pharmacognosy, Department of BioMolecular Sciences, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA

\* Correspondence: sross@olemiss.edu

### 4.2. Sample collection

*Cetraria islandica* was collected in the region of the Republic of Kazakhstan, Karagandy Province, Karkaraly national park, during the summer of 2021. The sample was assigned with NCNPR #24269 and deposited in the Botanical Repository of the National Center for Natural Product Research at the University of Mississippi. This specimen was found near the famous lake in this region - Shaitankol growing on the fallen pine needles litter in the pine forest. *C. islandica* was identified by Prof. Bruce McCune, Alumni Association Distinguished Professor, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.

## Приложение М



### Botany and Plant Pathology

Oregon State University  
2082 Cordley Hall  
Corvallis, Oregon 97331

**P** 541-737-3451

**F** 541-737-3573

[bpp.oregonstate.edu](http://bpp.oregonstate.edu)

11 January 2022

Dear Mr. Manassov and Dr. Ross,

I have studied the specimen that you sent and can confirm that it is the lichenized fungus, *Cetraria islandica*. The specimen is fairly typical for that species, based on its broad lobes, laminal pseudocyphellae, and medulla that reacts orange-red in ethanol solution of paraphenylenediamine.

This species is broadly distributed in the northern Hemisphere, so its presence in Kazakhstan is not surprising.

Please let me know what you would like me to do with the specimen. If you send collection data to me (collector, date, location including coordinates and elevation), we can archive it in our herbarium here (OSC).

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script that reads "Bruce McCune".

Dr. Bruce McCune,  
OSU Alumni Association Distinguished Professor  
Oregon State University

## Приложение Н

Образец внесен в Гербарий Орегонского университета, под кодом OSC-M-050921

Details Map Comments Linked Resources

 **Oregon State University Herbarium (OSC)** Share 0 Tweet

**Catalog #:** OSC-M-050921  
**Occurrence ID:** 4932d60a-97f3-48ac-8e86-40448c622b77  
**Taxon:** *Cetraria islandica* (L.) Ach.  
**Family:** Parmeliaceae  
**Determiner:** Bruce McCune (Jan 2022)  
**ID Remarks:** Medulla P+ red.  
**Collector:** Nurlen Massanov  
**Number:** s.n.  
**Date:** 2021-06-18  
**Verbatim Date:** 18 June 2021  
**Locality:** Kazakhstan, Karaganda Region, Karkaraly National Park, near Lake Shaitankol  
49.38881 75.40594  
**Elevation:** 1200 meters (3936ft)  
**Substrate:** soil  
**Usage Rights:** <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>  
**Record ID:** 4932d60a-97f3-48ac-8e86-40448c622b77

For additional information about this specimen, please contact: Aaron Liston, Herbarium Director ([lilstona@science.oregonstate.edu](mailto:lilstona@science.oregonstate.edu))  
See an error? [Log In](#) to edit data

# Приложение II

## Ultrastructural and Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy characterization of *Cetraria islandica* (L.) Ach.

Nurlen Manasov<sup>1,2</sup>, Sebastian John Adams<sup>1</sup>, Ubaidulla Datkhayev<sup>2</sup>, Vijayasankar Raman<sup>1</sup>, Ikhlas A. Khan<sup>1,3</sup> and Samir A. Ross<sup>1,2,3</sup>



<sup>1</sup>National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA

<sup>2</sup>S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, School of Pharmacy, Almaty, 050012, Kazakhstan

<sup>3</sup>Division of Pharmacognosy, Department of BioMolecular Sciences, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA



### ABSTRACT

The lichen *Cetraria islandica* was used in traditional and modern medicines for its many biological properties such as immunological, immunomodulating, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities. This species is gaining popularity in the market and interest among the many industries for selling as medicines, dietary supplements, and daily herbal drinks. Due to its high demand, adulteration is becoming a very common problem in cases of intentional and un-intentional add up. This study aimed to profile the morpho-anatomical features by light and scanning electron microscopy and analysis the presence of basic surface elements using Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS). The microscopic studies shown that the heteromerous foliose thallus is glabrous, flat, with brittle bands and the transverse section of thallus, the outer epicortex of 0.5–1.5 µm thick and covered with biofilm. Followed by the upper cortex, 30.05–50.6 µm wide, formed by the collocation of tightly packed cortical cells, loaded with fungal hyphae. The medullary region measures 70–100 µm wide and consists of loosely interwoven mycobiont hyphae that run horizontally and provide large airspaces for the phycobiont. The algal cell measures 3.25–12.5 µm in diameter and form a bi-stratified structure. These phycobiont cells are located immediately below the upper cortex region of the medulla and absent or lack abundance in the lower medulla region. EDS analysis shows that the calcium present in the upper surface and not in the lower surface. The trace amount of sodium is also observed in the upper surface along with the iron. This result will be a helping tool to authentic the samples sold in the market in the name of *C. islandica*.

### INTRODUCTION

- Lichens are complex organisms composed of a fungus and algae (and/or cyanobacterial photobionts living in a symbiotic relationship in the different habitat to most extreme environmental conditions (Nash, 2008).
- The importance of this lichen is high in the market, especially in the medicine and pharmaceutical industries. Thus, this poster emphasizes profiling this macro and microscopic level of authentication.

### MATERIAL AND METHODS

The *Cetraria islandica* (Family: Parmeliaceae), collected from Karaganda region, Karkaraly National Park, located at an altitude of 1200 m above sea level.

Transverse section were stained with toluidine blue for histology observations, and used autofluorescence to characterize the mycobiont and phycobiont. External morphology was photographed using a Nikon SMZ-U equipped with Nikon DSFiV Camera systems and Nikon Element BR Imaging Software (Nikon Inc.). The micromorphology captured using an Olympus BX53 fluorescence microscope equipped with DP74 camera systems and CellSens standard version imaging software (Olympus Corp., Tokyo, Japan).

For SEM, the samples were imaged using a JSM-7200F field-emission SEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Mineral elements were mapped and analyzed using an EDS detector (Oxford Instruments, Oxford, UK) attached to the SEM.

### Macro & Microscopic studies

This fruticose lichen is a small to medium, heteromerous foliose thallus of 12–15 cm long, growing loosely and irregularly attached to the substrate at one part of the thallus (Fig.1A)



Fig.1. External morphology of *C. islandica*. A: Freeze-dried lichen. B: Upper surface view; C: Lower surface view; D: Pyrenidia.

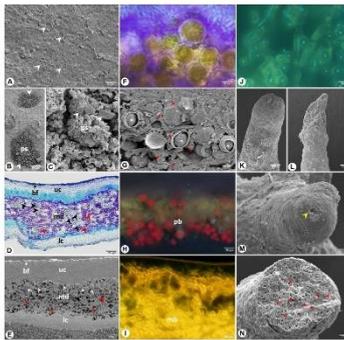


Fig.2. *C. islandica* thallus observed under Light and Scanning Electron Microscopy. A: Upper surface, autofluorescence indicating the opening of outer *Ascladia* layer, cortical hyphae are visible and also those present only in the *Ascladia* layer. B & C: Pyrenidia of pseudocyphella in lower surface (transverse) and non-lyophilized section in normal. D & E: Transverse section of thallus, showing the heteromerous structure of thallus (the uppermost layer, upper cortex (red), middle (red), lower cortex (blue)). Middle composed of network of mycobiont hyphae (red) and pseudocyphella associated with algal cells (white & black arrowheads). The magnified view of pyrenidium under light microscopy (F): the mycobiont (red arrowheads) and the chlorococcal alga (white arrowheads) visible in open algal cells under SEM observation (G). H & I: Autofluorescence of phycobiont (red) and mycobiont (yellow). J: Highly differential with the specific emission of spectra of algal and fungal components. K: Hyphae plasma autofluorescence in bright green and the cell wall in yellow. K & N: Pyrenidia. M: Showing the outline (yellow arrowheads) of the apex. N: View of a flattened pseudocyst showing hyphae and clusters of filamentous (red arrowheads) pseudocystophytes; the upper cortex, pseudocyst, the lower cortex, chlorococcal phycobiont, sub-apophysis. Bars: 1µm (A, C, G, I, M & N); 20µm (B, K & L); 200µm (D, E, F & J).

- The thallus is composed of dead, collapsed, and gelatinized hyphae on both surfaces and middle photobiont layer.
- The upper surface is a glossy and smooth texture (Fig.2A).
- The lower surface shows uneven and, in many places, phycobiont and mycobiont hyphae are visible (Fig.2B).
- The hyphae extend through the hydrophilic cortex layer to the lower surface and extend to form a patch of pseudocyphella (Fig. 2C).
- Notably, the ascomata were not observed.
- The margin of thallus with regular lobes of teeth-like structures, called pycnidia, an asexual fruiting body.
- Microscopical structure describes that the outer epicortex region with 0.5–1.5 µm thick and covered with biofilm (generally bacterial) (Fig.2D).

### RESULTS

- This is followed by the upper cortex, 30.05–50.6 µm wide, formed by the collocation of tightly packed cortical cells, loaded with fungal hyphae (Figs. 2 D & E).
- The medullary region measures 70–100 µm wide and consists of loosely interwoven mycobiont hyphae that run horizontally and provide large airspaces for the phycobiont. The algal cell measures 3.25–12.5 µm in diameter and form a bi-stratified structure.

### EDS Analysis

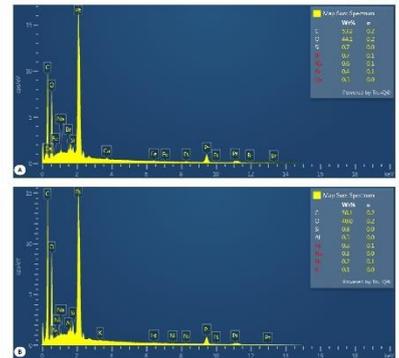


Fig.3. EDS spectra of Upper surface (A), Lower surface (B).

- The both surfaces and transverse sections of thalli were subjected to the Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) analysis to record the presence of minerals
- Our observation data noted that calcium is only present in the upper surface (Fig. 3A) and not in the lower (Fig. 3B). In many lichens, the secondary metabolites form calcium crystalline on the surface of the hyphal cell wall; this was not observed in this species.

### CONCLUSIONS

- The organization of mycobiont and phycobiont in this species is habitat to the cold climate region. It appears that the fungal partner is more responsible for the nutritional supply to the algal partner and maintains them hydrated. Thus, this lichen behaves poikilohydric to survive unfavorable conditions.
- There was no association of crystalline metabolites around the hyphae and no evidence of rhizines in vegetative bodies were observed. Thus, this lichen is attached to the substrate mainly by the clusters of agglutinated parallel hyphae at the basal region.
- These elements also significantly help to know the spatial relationship between the lichen and its habitat and environment.
- The profile of *C. islandica* illustrated in this paper will help authentication and quality control of this species.

### REFERENCES

[1] Nash, T.H., 2008. Lichen Biology, second ed. Cambridge University Press.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Republic of Kazakhstan, and the National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, USA.

## Chemical profiling of *Cetraria islandica* lichen using LC-DAD-QToF approach



Nurlen Manasov<sup>1,2</sup>, Kumar Katragunta<sup>1</sup>, Bharathi Avula<sup>1</sup>, Ubaidulla Datkhayev<sup>2</sup>, Ikhlas A. Khan<sup>1,3</sup> and Samir A. Ross<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS 38677 USA.

<sup>2</sup>S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, School of Pharmacy, Almaty, 050012, Kazakhstan,

<sup>3</sup>Division of Pharmacognosy, Department of BioMolecular Sciences, School of Pharmacy, University of Mississippi, University, MS 38677, USA.



### ABSTRACT

Phytochemical analysis of *Cetraria islandica* lichen was performed using high resolution mass spectrometry combined with liquid chromatography system (LC-DAD-QToF). Total 37 compounds were identified and characterized based on comparing with literature data, retention times and their mass fragmentation mechanisms. The identified compounds were classified under five different classes i.e., depsidones, depsides, dibenzofurans, aliphatic acids and others which contains simple organic acids in majority. Four different solvent extracts were investigated and substantial variations observed among chromatographic profiles of aqueous ethanolic, ethanolic, methanolic and acetone extracts. Two major compounds (fumaroprotocetraric acid and cetraric acid) were identified in aqueous ethanolic and ethanolic extracts of *C. islandica* lichen. Apart from the identified and characterized compounds 24 unknown compounds were observed and their molecular formulas were summarized based on exact masses. The developed LC-DAD-QToF approach for *C. islandica* lichen allowed us to characterize and classify the known secondary metabolites and preliminary confirmation of unknown compounds led to further isolation of compounds of interest and their pharmacological activities.

### INTRODUCTION

- Lichens are resilient symbiotic consortia that consist of a fungus and an algal/cyanobacterial partner. Symbiosis in lichens leads to production of typical secondary metabolites that includes depsides, depsidones, dibenzofurans, anthraquinones, aliphatic acids, xanthones, pulvinic acid derivatives and naphthoquinones [1].
- Cetraria islandica* is a fruticose lichen with a small to medium brown thallus growing loosely on the soil. It is usually tufted, many lobed, and irregularly branched. *C. islandica* exhibits cushion like growth, making suited to weather high winds in harsh environments [2, 3].
- Right identification of lichen species is also a challenge and a focused study of *C. islandica* lichen compounds by usual LC-MS techniques or direct spectroscopic analysis offers a helpful tool for chemotaxonomic determination of compounds and dereplication strategies. Accurate techniques as LC-QToF-MS are now available to identify a number of compounds. Identification of secondary metabolites provide a better indication of their ecological significance.
- This study resulted in the characterization of about thirty seven compounds (37 secondary metabolites identified) along with 24 unknown compounds. All the metabolites were systematically identified through exact molecular masses from their MS/MS spectra and literature data.

### EXPERIMENTAL

#### CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

**Chemicals:** Acetonitrile, methanol, formic acid used are of LC-MS certified grade and water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### Liquid Chromatography-Time of flight mass spectrometry (LC-DAD/QToF-MS)

The liquid chromatographic system was an Agilent Series 1290 and the separation was achieved on an Acquity UPLC™ HSS C18 column (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm). The mobile phase consisted of water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B) at a flow rate of 0.2 mL/min. Analysis was performed using the following gradient elution: 95% A/5% B to 85% A/15% B in 3 min; in next 17 minutes to 85% B and finally in next 3 min to 100% B. Each run was followed by a 3 min wash with 100% B and an equilibration period of 5 min with 95% A/5% B. Two microliters of sample was injected. The column temperature was 40 °C.

The mass spectrometric analysis was performed with a QToF-MS-MS (Model #66545B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an ESI source with Jet Stream technology using the following parameters: drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate, 13 L/min; drying gas temperature, 300 °C; nebulizer pressure, 20 psig; sheath gas temperature, 300 °C; sheath gas flow, 12 L/min; capillary voltage, 4000 V; nozzle voltage, 0 V; skimmer, 65V; Or RF V, 750 V; and fragmentor voltage, 150 V. All the operations, acquisition and analysis of data were controlled by Agilent MassHunter Acquisition Software Ver. A.10.1 and processed with MassHunter Qualitative Analysis software Ver. B.10.00. Each sample was analyzed in positive mode over the range of *m/z*: 50–1100 and extended dynamic range (flight time to *m/z*: 1700 at 2GHz acquisition rate). Accurate mass measurements were obtained by means of reference ion correction using reference masses at *m/z*: 121.0509 (protonated purine) and 922.0098 [protonated hexakis(1H, 1H, 3H, tetrafluoropropoxy) phosphazine or HP-9211] in positive ion mode. Samples were analyzed in all-ion MS-MS mode, where experiment 1 was carried out with collision energy of zero and experiment two with a fixed collision energy of 45 eV. The compounds were confirmed in each spectrum.

### REFERENCES

- [1] S. Dimock, I. Yoshimura, Identification of Lichen Substances, Springer, Berlin/Heidelberg, 1996.
- [2] B. Fink, The lichen flora of the United States, Ann Arbor, University of Michigan press, 1935, p126.
- [3] G.F. Howard, Lichens of the state of Washington, Seattle, WA, University of Washington press, 1950, p191.
- [4] M. Xu, S. Heikkinen, M. Thissenstein, M. Krenser, J. Hawkins, S. Onoshima, and E.S. Olfelt, Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLC/QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding, Food Chemistry, 2018, p188996.

### RESULTS AND DISCUSSION

Chemical constituents of *C. islandica* were separated using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the identification of chromatographic peaks using their exact masses and their observed fragment ions. The characterization of chemical constituents resulted in identification of depsidones (1–15), depsides (16), dibenzofuran (17), aliphatic acids or lipids (18–32) and other acids etc., (33–37) [4]. Data was obtained using both positive and negative ESI modes, and suggested that negative mode performed better than the positive mode. The chromatographic profiles and major compounds fragmentation patterns were presented in Table 1 and Figures 1–3.

Fig 1. LC-DAD chromatograms for *Cetraria islandica* lichen extracts (A. Aqueous EtOH; B. EtOH; C. MeOH; D. Acetone)

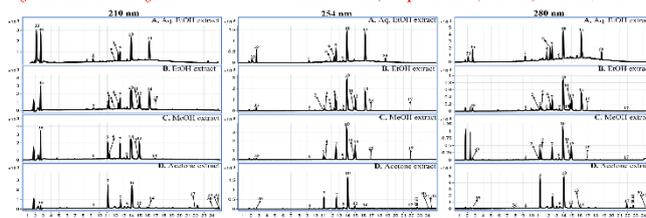
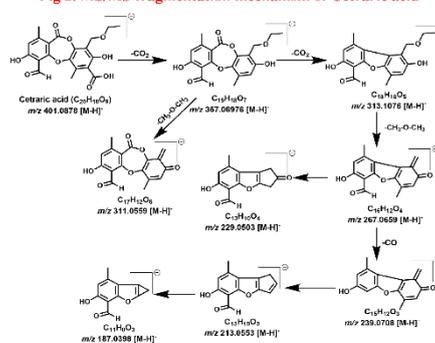


Fig 2. MS/MS fragmentation mechanism of Cetraric acid



### CONCLUSIONS

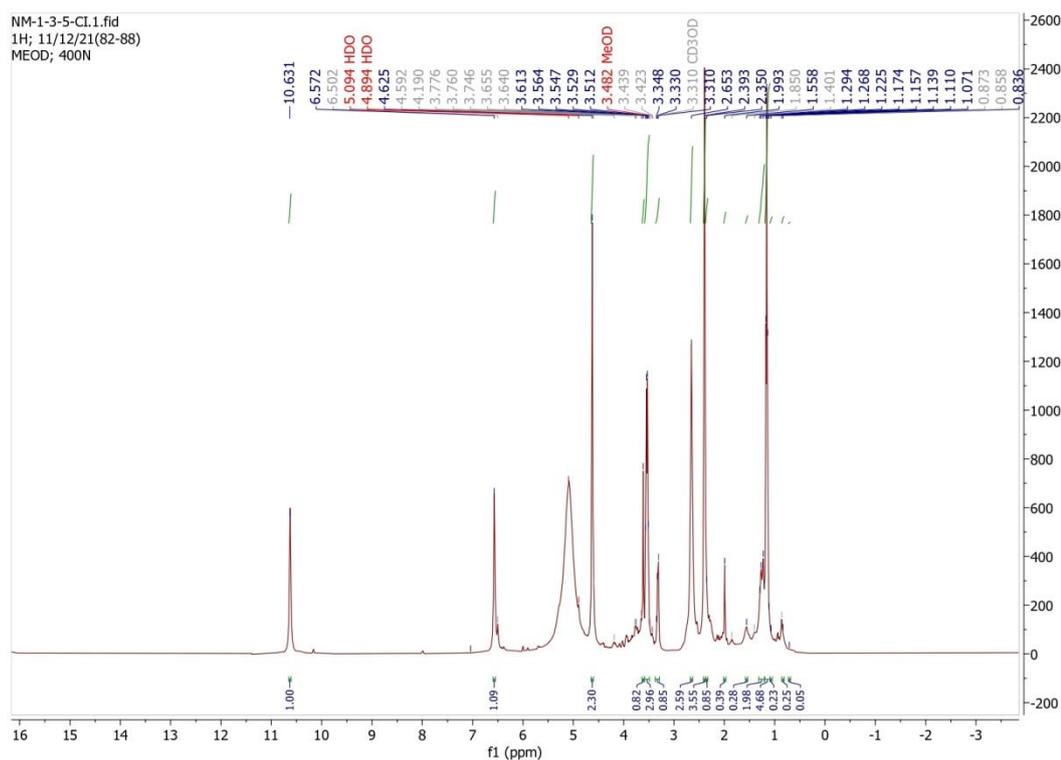
- The developed method provides better insights about identification of secondary metabolites from *C. islandica* under different extraction conditions
- LC-DAD-QToF-MS method led to identify a total number of about 37 compounds including 24 unknown compounds which requires further confirmation
- LC-DAD-QToF method will be useful for the dereplication to decrease the tedious process of isolation.
- As suitable for minute amount of raw material and more informative than the thallus reactions and TLC profiles usually performed in lichen identification, these methods are of great interest for lichen analysis.

### ACKNOWLEDGEMENTS

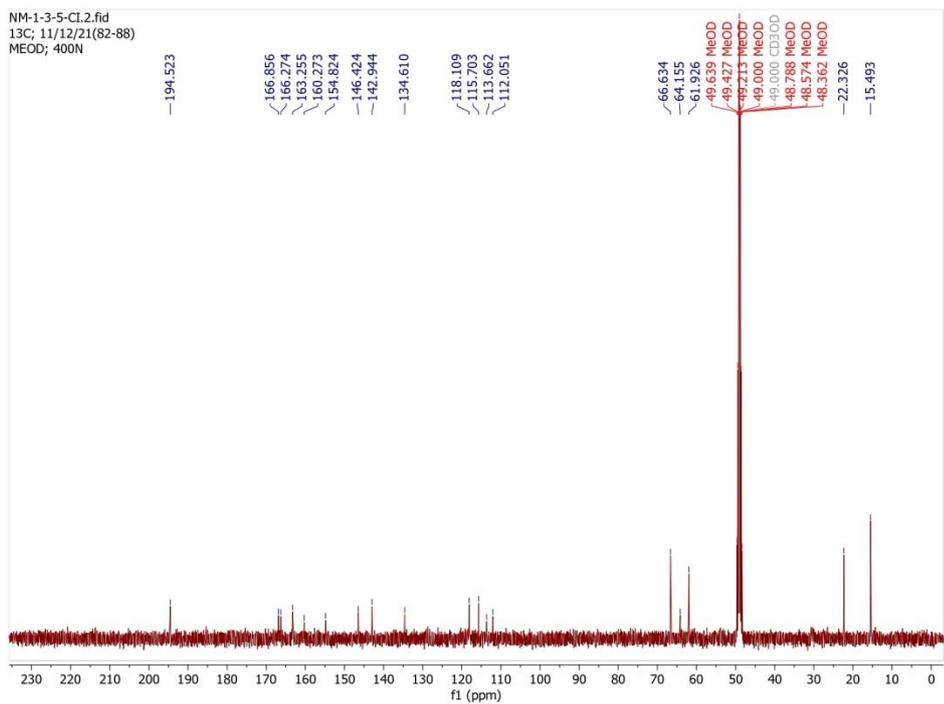
**ПРИЛОЖЕНИЕ С**  
**Испытание стабильности ЛРС *Cetraria islandica* (L.) Ach.**

| Упаковка: мешки из крафт-бумаги, трехслойные<br>Температура: (25 ± 2) °С, относительная влажность: 60±5 %  |   | Серии: 1 - 01CI-2020; 2- 02CI-2020; 3 - 03CI-2020<br>Начало и окончание испытания: 06.2020 г. - 063.2022 г. |           |           |           |           |           |           |
|--|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Показатели   | Показатели соответствующие спецификации качества                                      | Бақылау мерзімділігі, айлар   |           |           |           |           |           |           |
|  |   | 0   | 3         | 6         | 9         | 12        | 18        | 24        |
| Описание   | В соответствии со спецификацией   | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
| Идентификация  | А. В соответствии со спецификацией  | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
|  | Б. В соответствии со спецификацией  | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
|  | С. В соответствии со спецификацией  | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
|  | Д. В соответствии со спецификацией  | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
| Посторонние примеси  | Не более 5 %  | 3,54 %  | 3,54 %    | 3,54 %    | 3,54 %    | 3,54 %    | 3,54 %    | 3,54 %    |
|  |   | 3,08 %  | 3,08 %    | 3,08 %    | 3,08 %    | 3,08 %    | 3,08 %    | 3,08 %    |
|  |   | 3,34 %  | 3,34 %    | 3,34 %    | 3,34 %    | 3,34 %    | 3,34 %    | 3,34 %    |
| Потеря в массе при высушивания   | Не более 12 %   | 11,32 %   | 11,32 %   | 11,32 %   | 11,32 %   | 11,32 %   | 11,32 %   | 11,32 %   |
|  |   | 10,78 %   | 10,78 %   | 10,78 %   | 10,78 %   | 10,78 %   | 10,78 %   | 10,78 %   |
|  |   | 10,29 %   | 10,29 %   | 10,29 %   | 10,29 %   | 10,29 %   | 10,29 %   | 10,29 %   |
| Общая зола   | Не более 3 %  | 1,58 %  | 1,58 %    | 1,59 %    | 1,59 %    | 1,57 %    | 1,58 %    | 1,57 %    |
|  |   | 1,83 %  | 1,83 %    | 1,82 %    | 1,84 %    | 1,84 %    | 1,85 %    | 1,483 %   |
|  |   | 1,87 %  | 1,86 %    | 1,86 %    | 1,85 %    | 1,86 %    | 1,87 %    | 1,87 %    |
| Микробиологическая чистота   | Категория 4А ( $\leq 10^7$ бактерий, $\leq 10^5$ грибов, $\leq 10^2$ <i>E. coli</i> ) | соответст   | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст | соответст |
| Количественное определение<br>- лишайниковые кислоты<br>в пересчете на усниновую кислоту:<br>- полисахариды в пересчете на глюкозу:<br>- полифенольные соединения в пересчете на кофейную кислоту: | не менее 2.0 %  | 2,98 %  | 2,97 %    | 2,97 %    | 2,94 %    | 2,91 %    | 2,87 %    | 2,81 %    |
|  | не менее 40 %   | 56,7 %  | 56,1 %    | 55,4 %    | 55,2 %    | 55,2 %    | 54,7 %    | 54,5 %    |
|  | не менее 2 %  | 2,79 %  | 2,73 %    | 2,70 %    | 2,67 %    | 2,65 %    | 2,65 %    | 2,63 %    |

## ПРИЛОЖЕНИЕ Т



**Рисунок S1. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР соединения 1 (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



**Рисунок S2. Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР соединения 1 (100 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

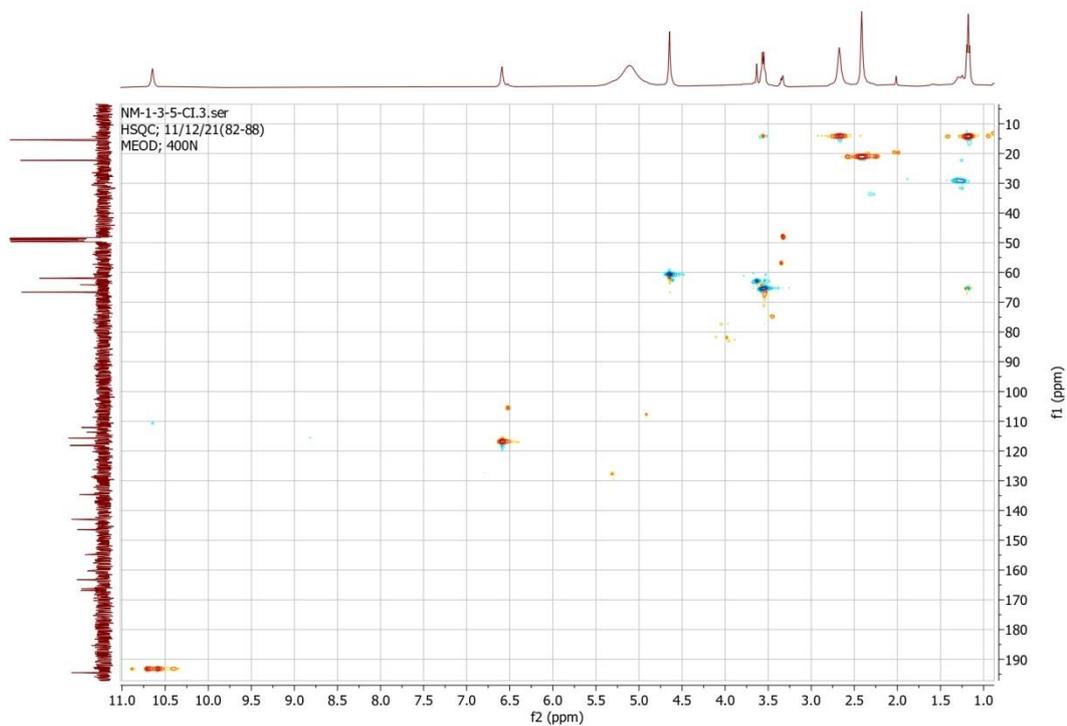


Рисунок S3. HSQC спекты соединения № 1

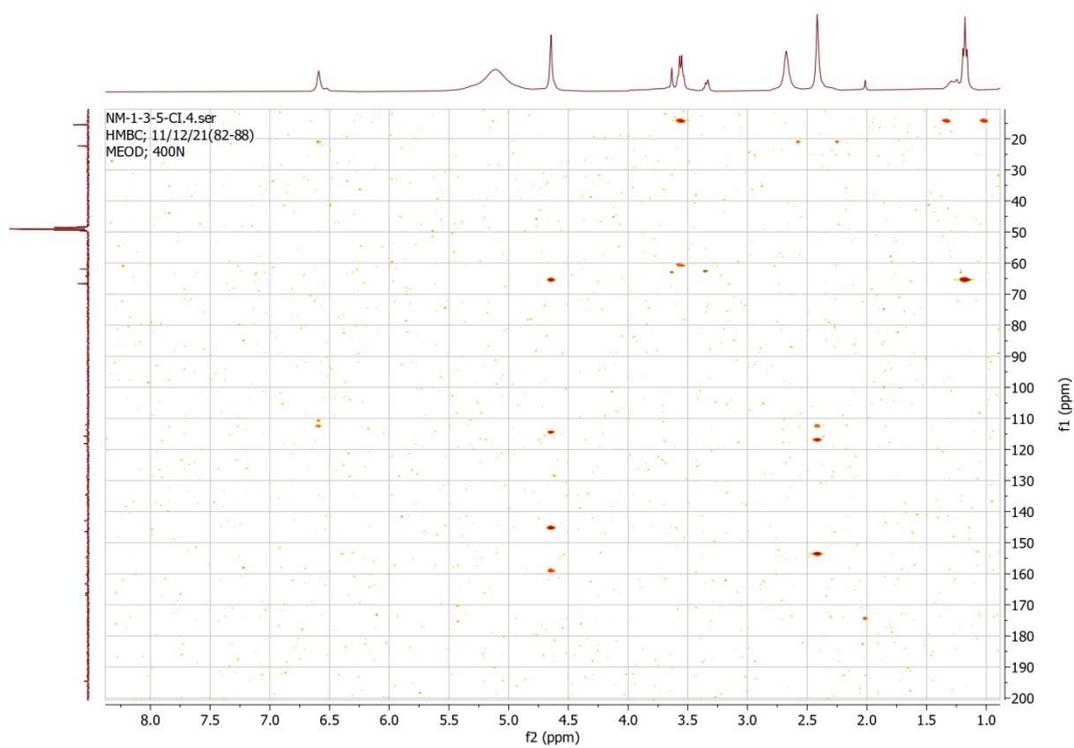


Figure S4. HMBC спекты соединения № 1

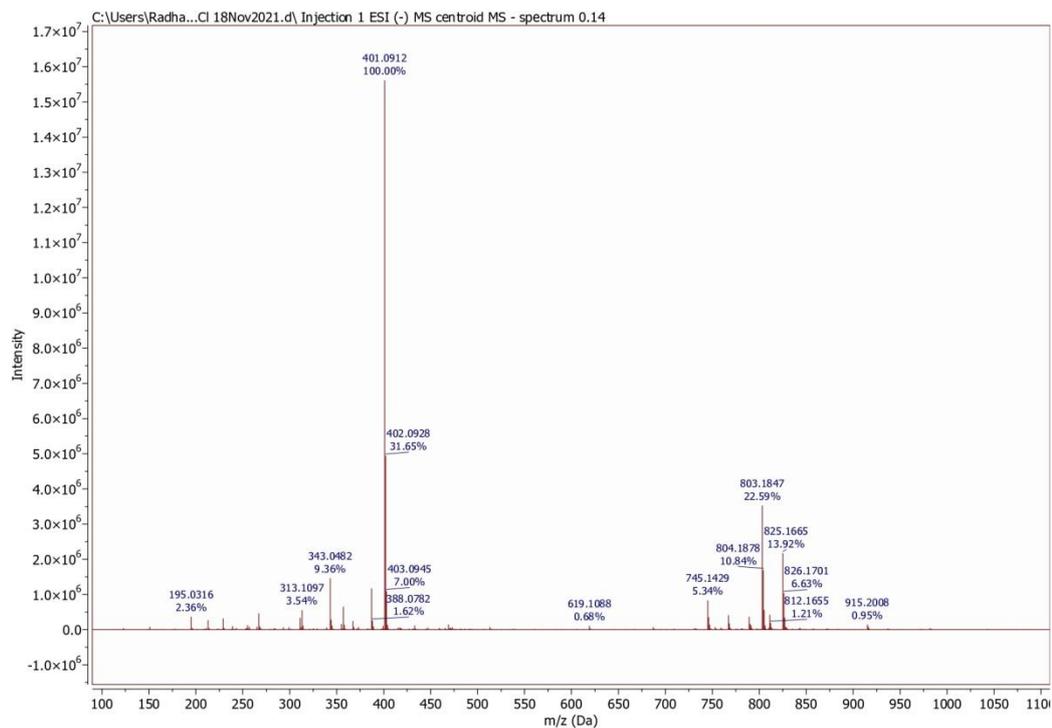


Figure S5. HR-ESI-MS спекты соединения № 1

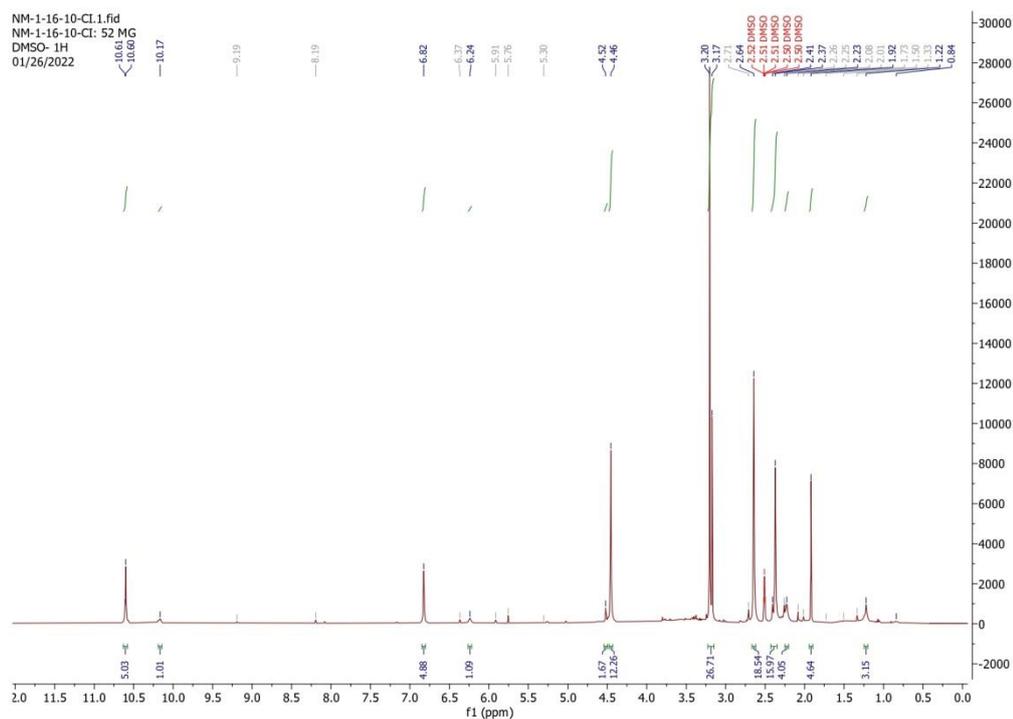


Figure S6. <sup>1</sup>H NMR спекты соединения № 2 (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

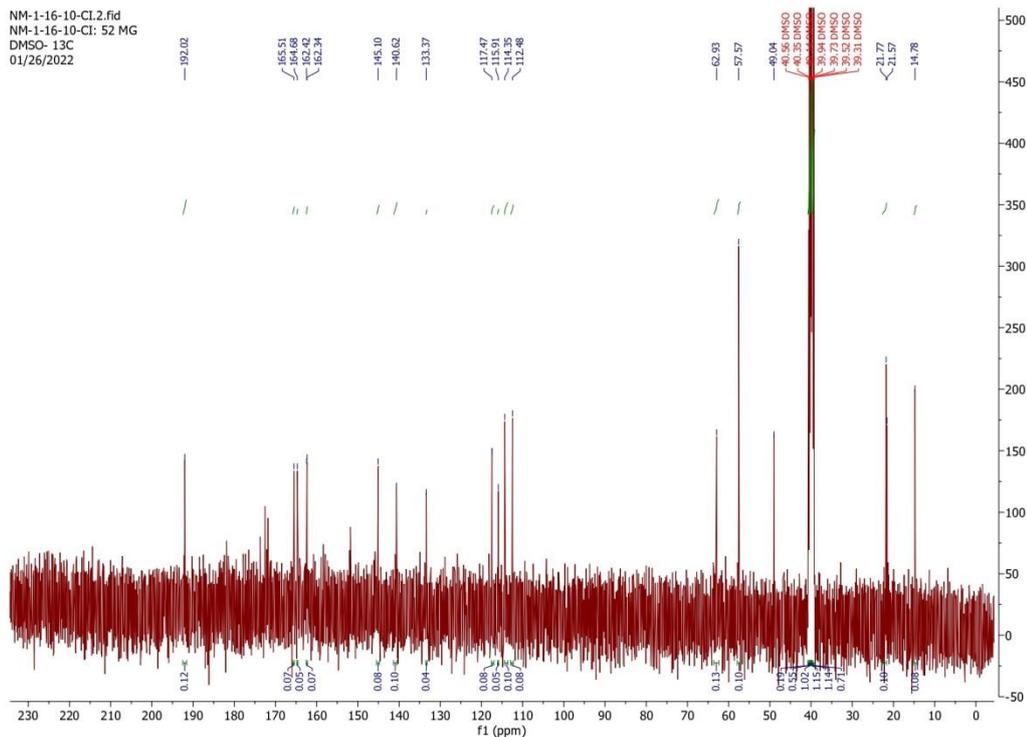


Рисунок S7.  $^{13}\text{C}$  NMR спекты соединения № 2 (100 MHz, DMSO- $d_6$ )

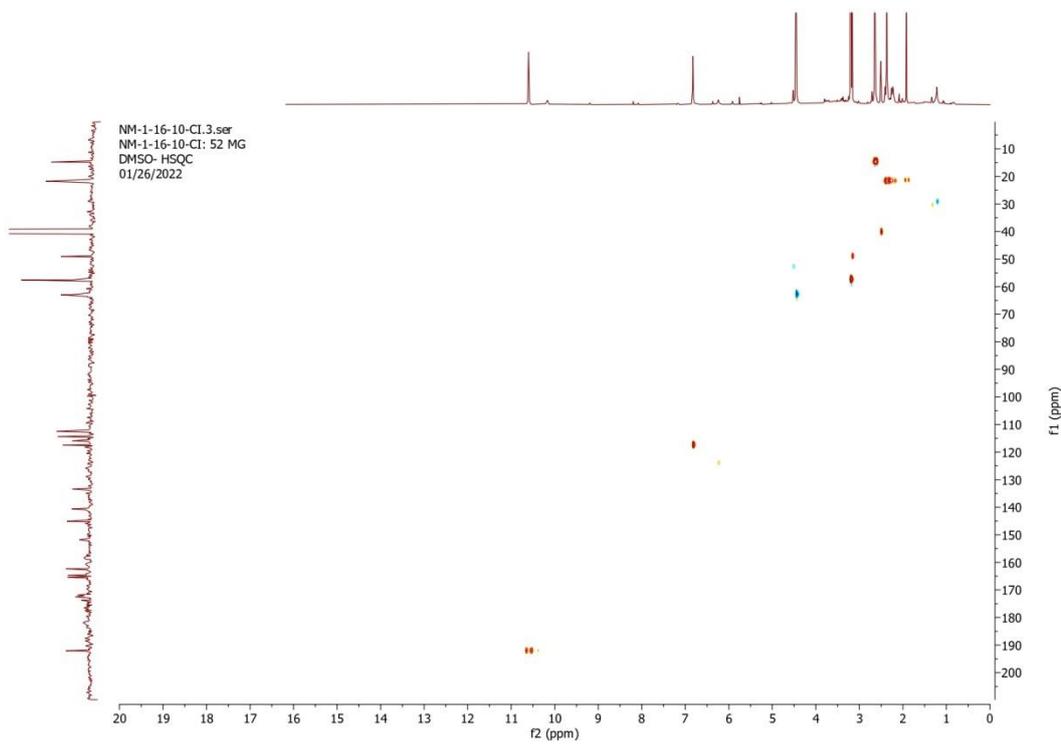


Рисунок S8. HSQC спекты соединения № 2

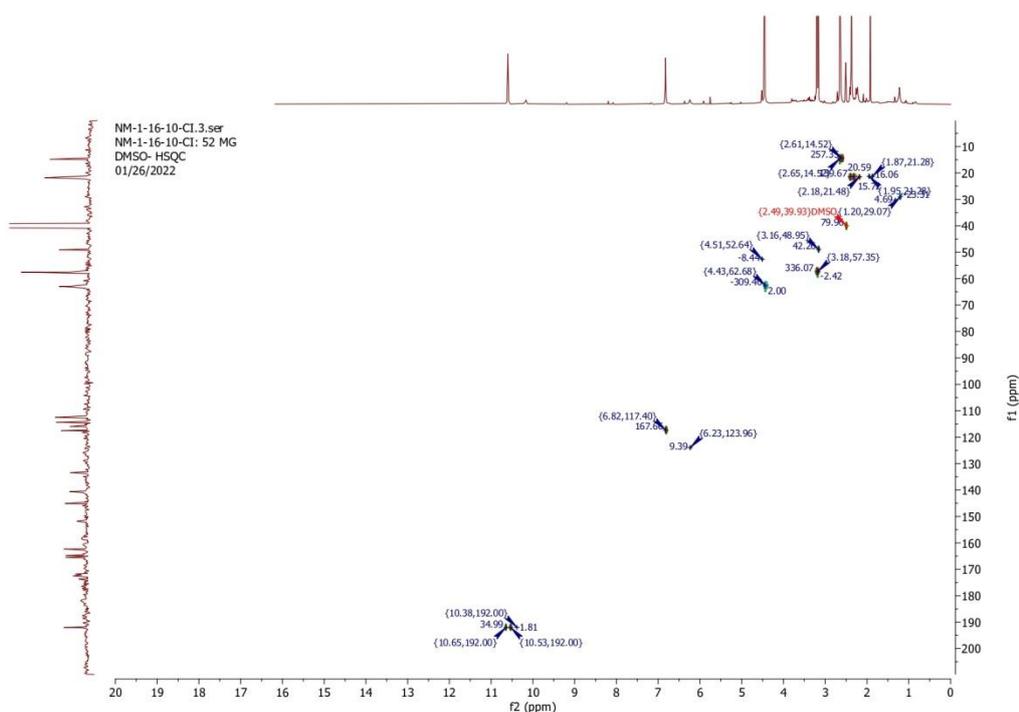


Рисунок S9. HMQC спекты соединения № 2

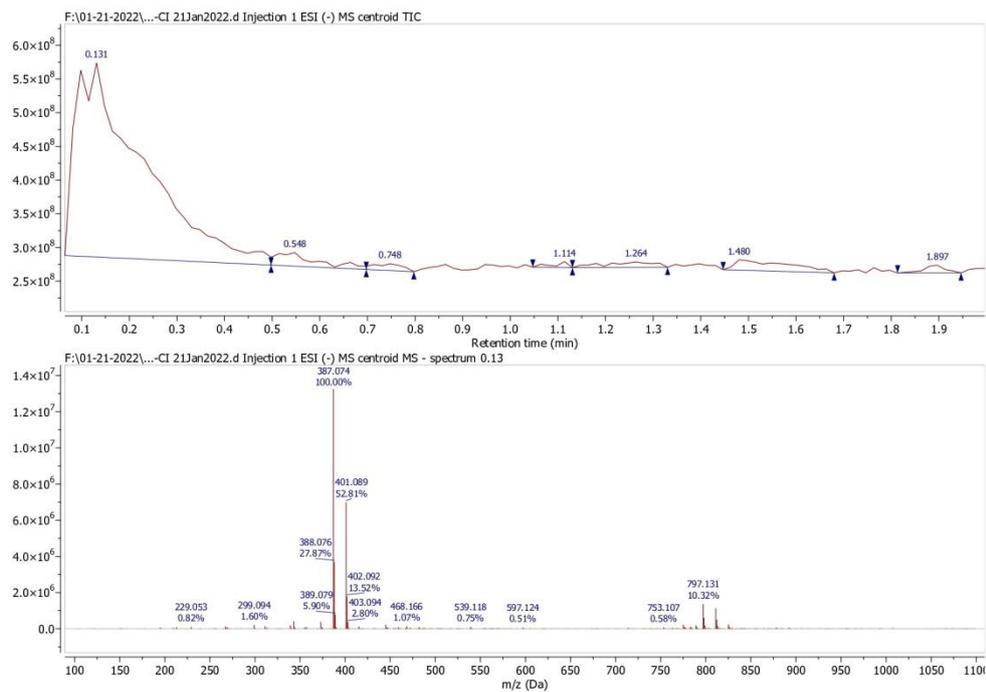


Рисунок S10. HR-ESI-MS спекты соединения № 2

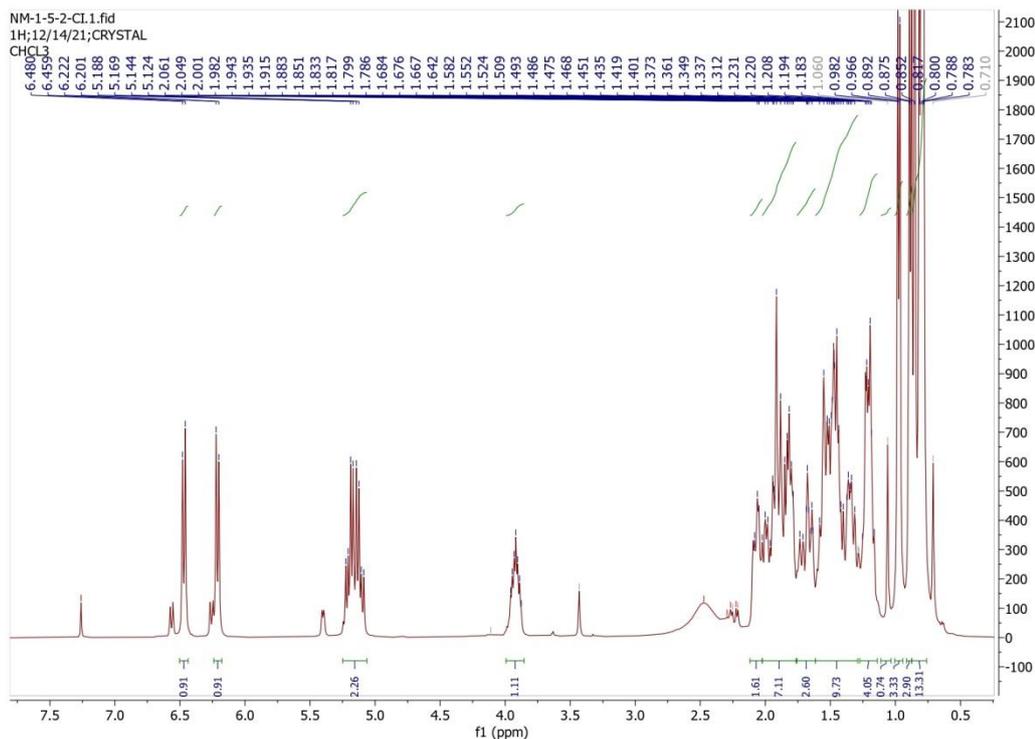


Рисунок S11. <sup>1</sup>H NMR спекты соединения № 4 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

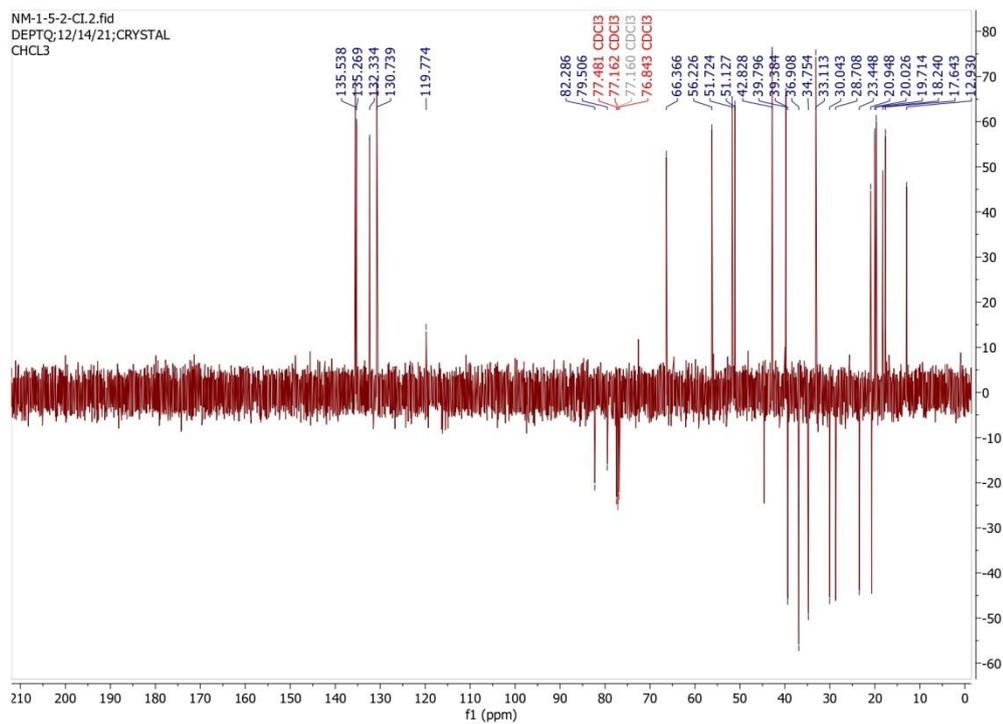


Рисунок S12. DEPTQ спекты соединения № 4 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

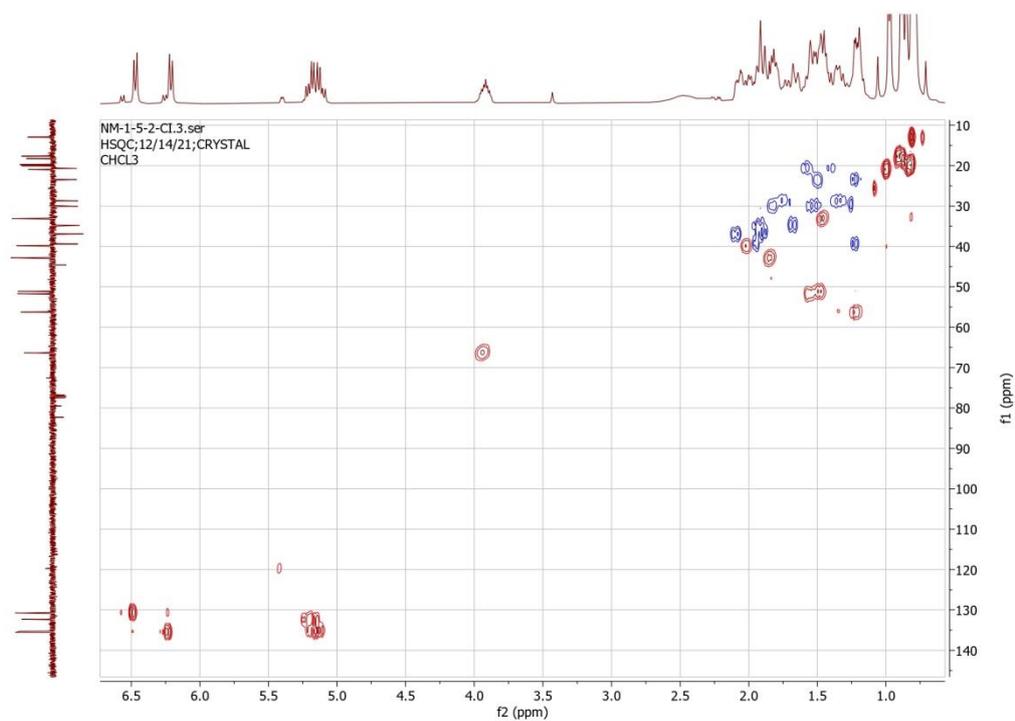


Рисунок S13. HSQC спекты соединения № 4

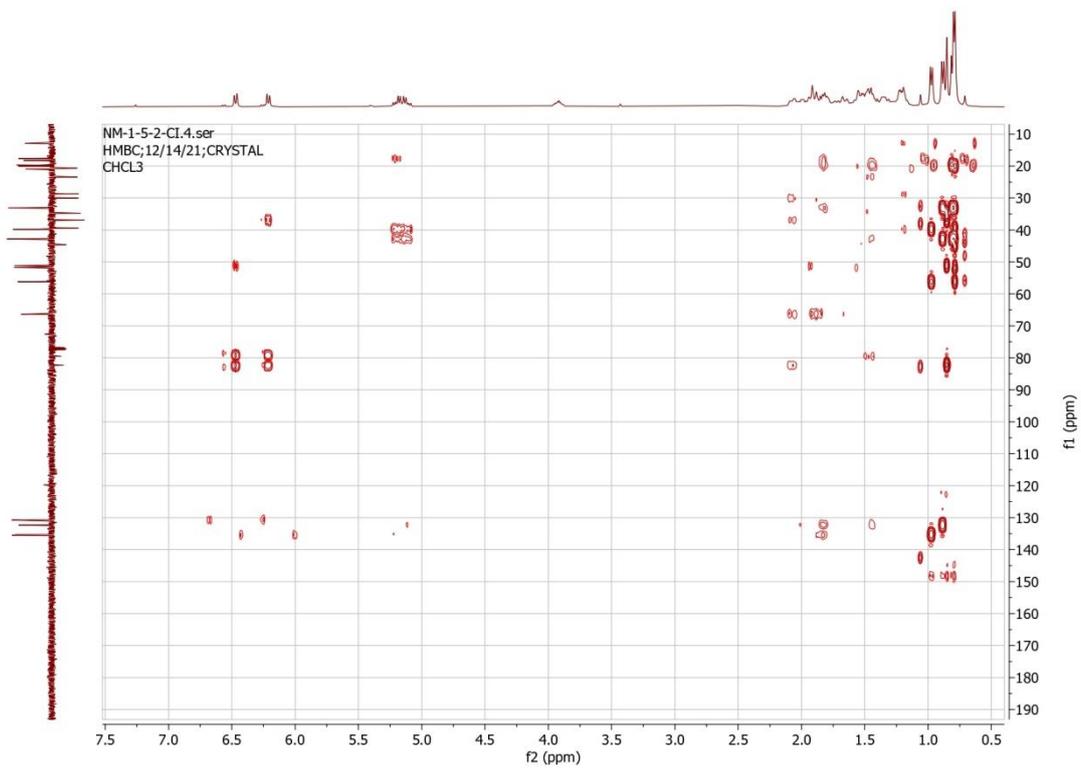


Рисунок S14. HMBC спекты соединения № 4

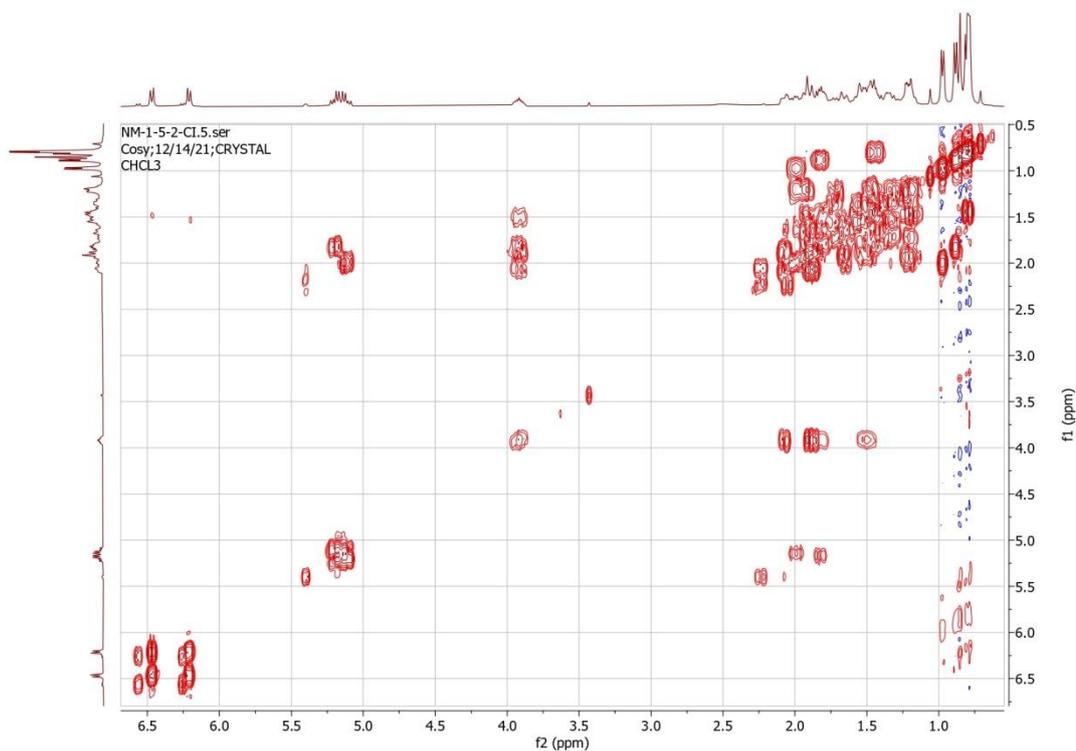


Рисунок S15.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY спекты соединения № 4

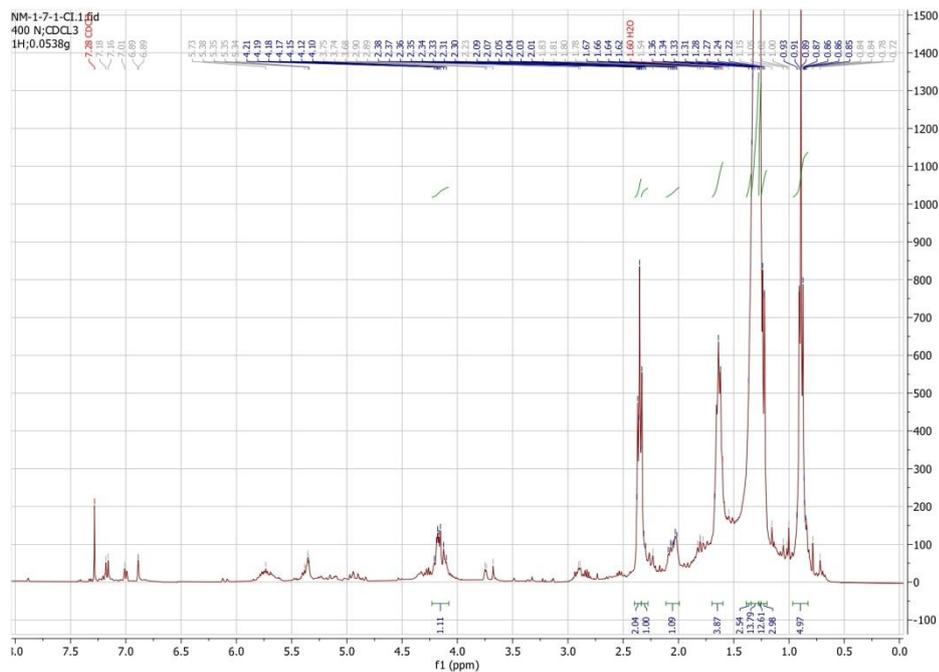


Рисунок S16.  $^1\text{H}$  NMR спектры соединений 5,6,7 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

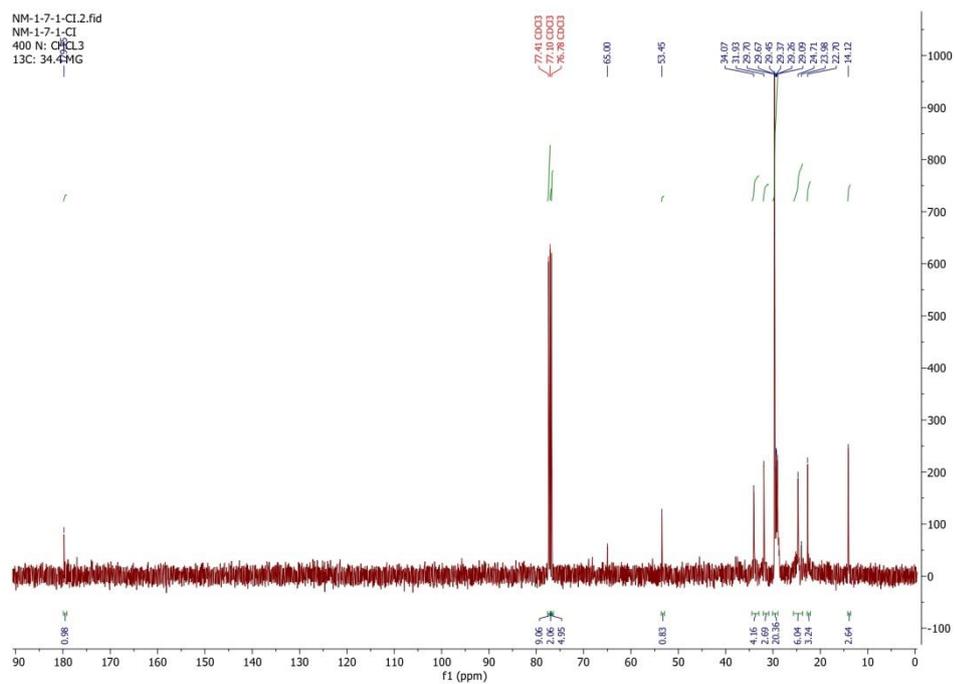


Рисунок S17.  $^{13}\text{C}$  NMR спектры соединений 5,6,7 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

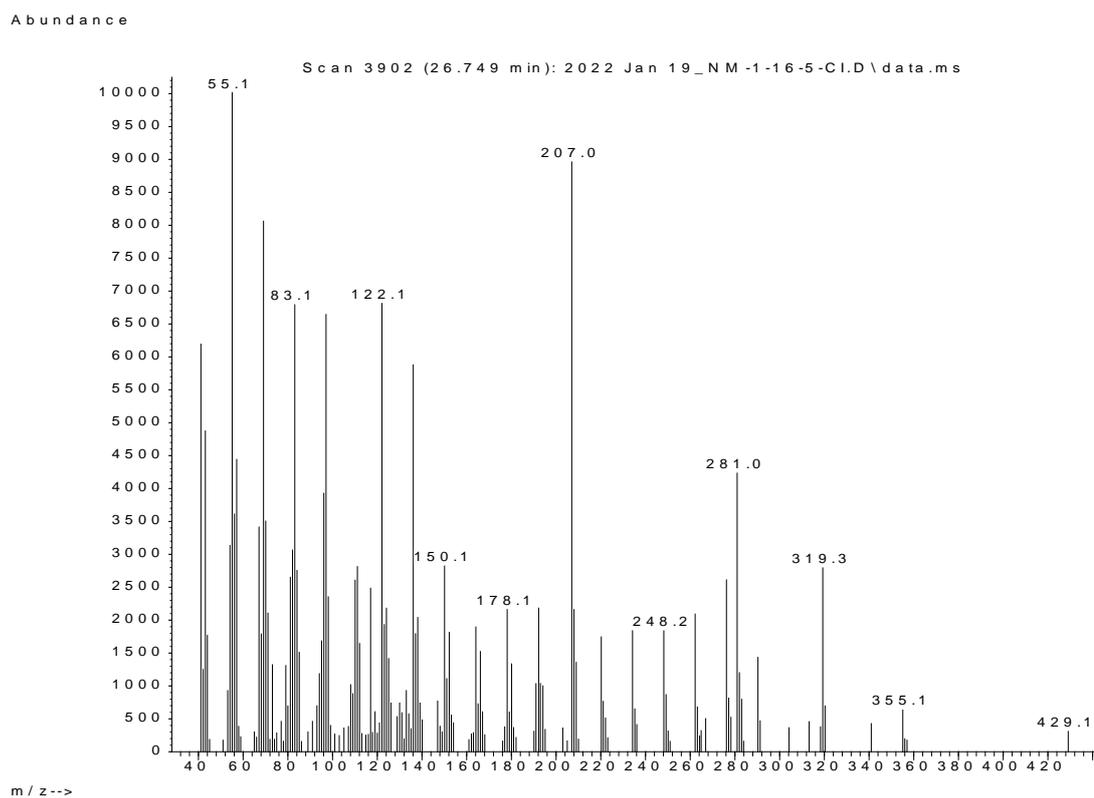


Рисунок S18. EI-MS спектры соединения № 5

Abundance

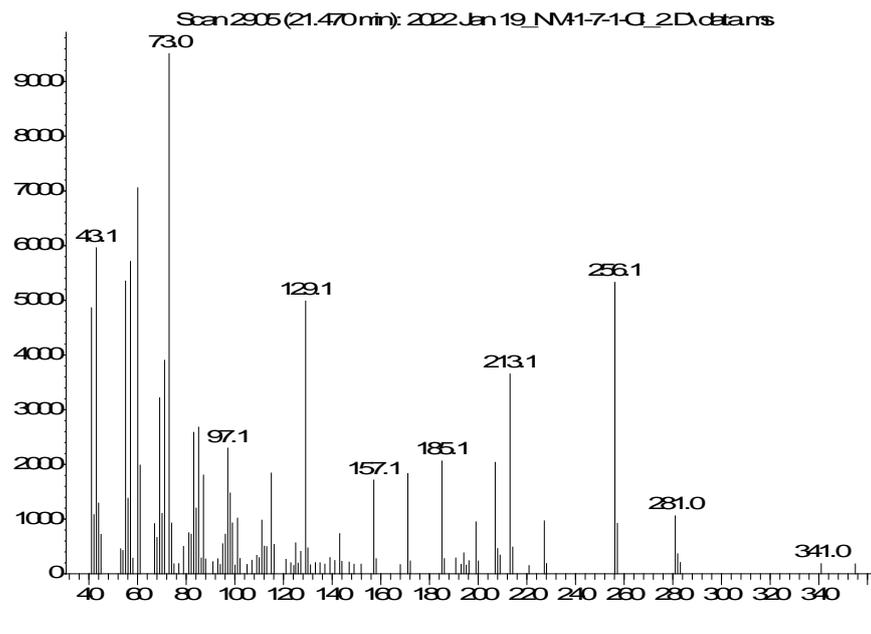


Рисунок S19. EI-MS спектры соединения № 6

Abundance

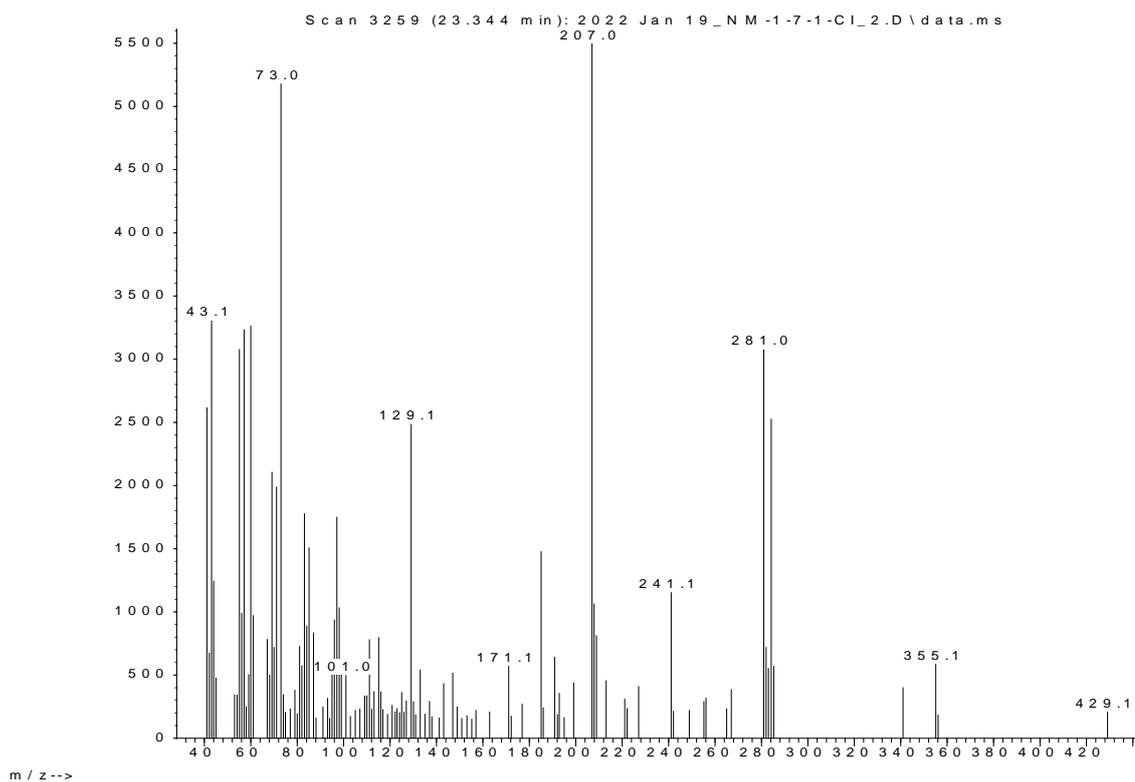


Рисунок S20. EI-MS спектры соединения № 7

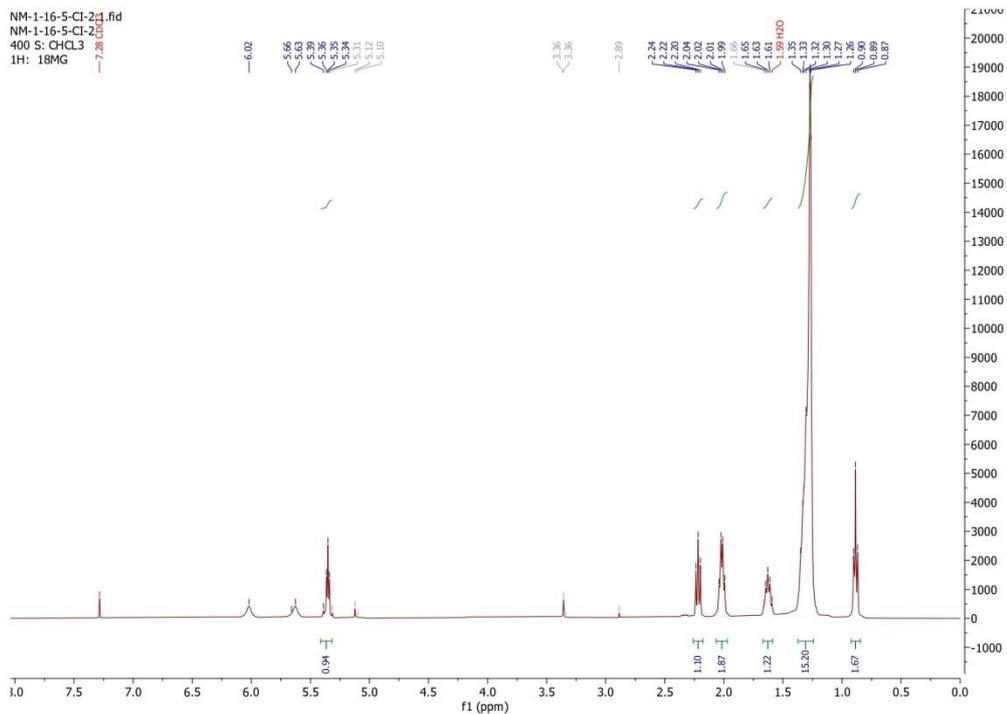


Рисунок S21. <sup>1</sup>H NMR спектры соединения №5 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

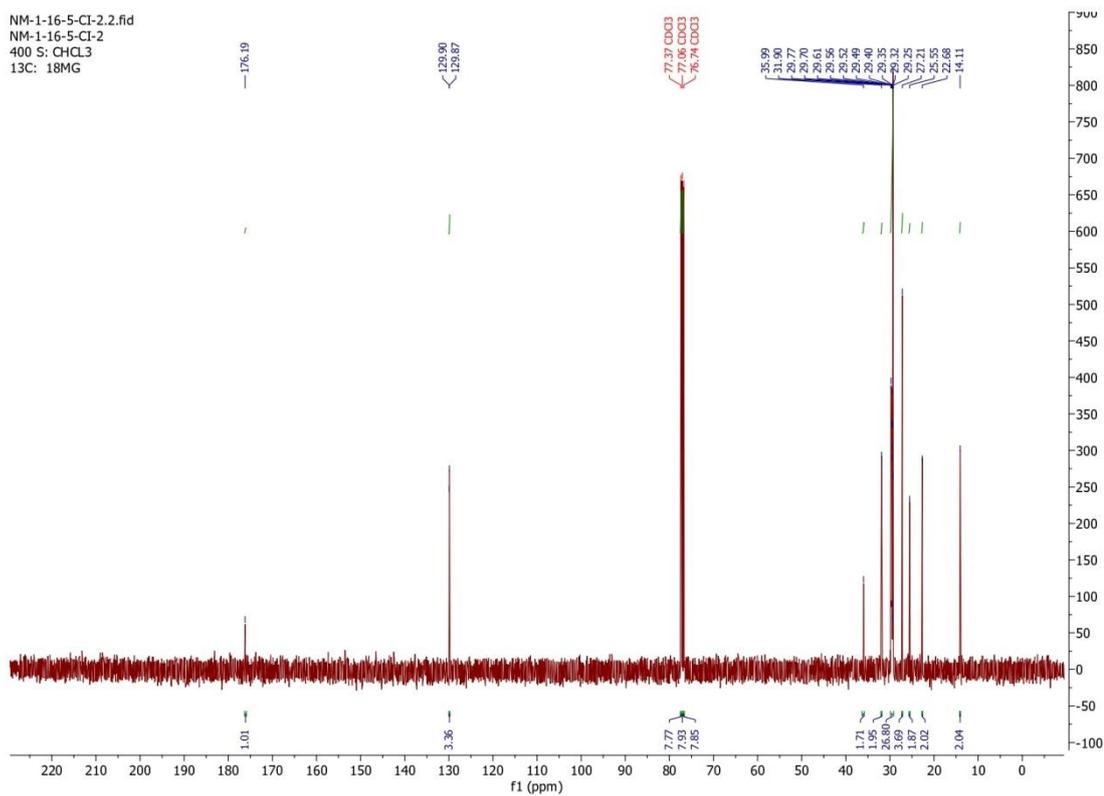


Рисунок S22. <sup>13</sup>C NMR спектры соединения №5 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

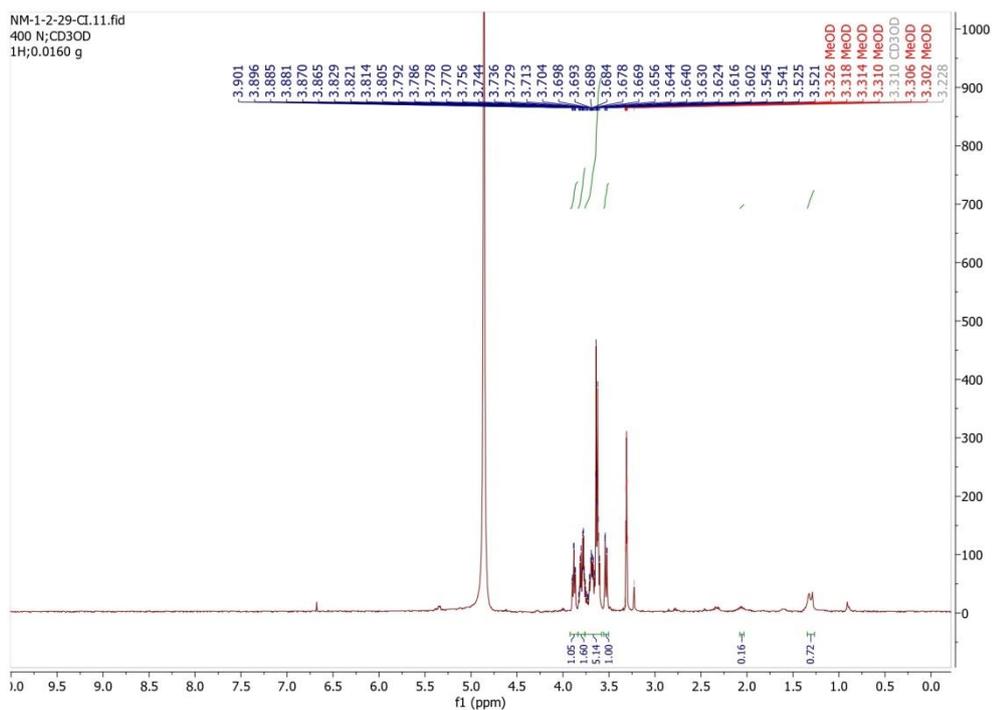


Рисунок S23.  $^1\text{H}$  NMR спектры соединения №8 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

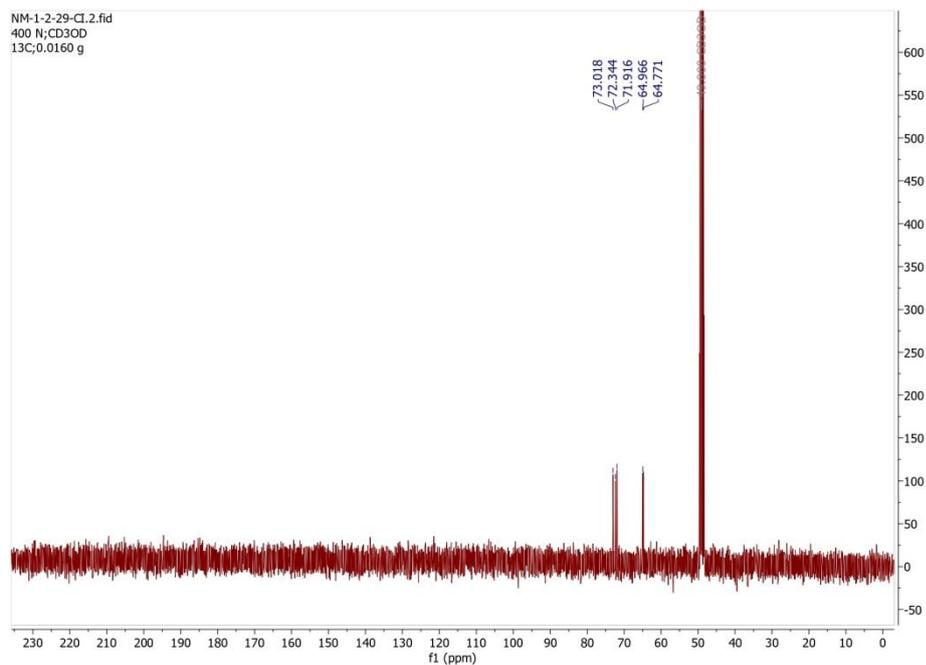


Рисунок S24.  $^{13}\text{C}$  NMR спектры соединения №8 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

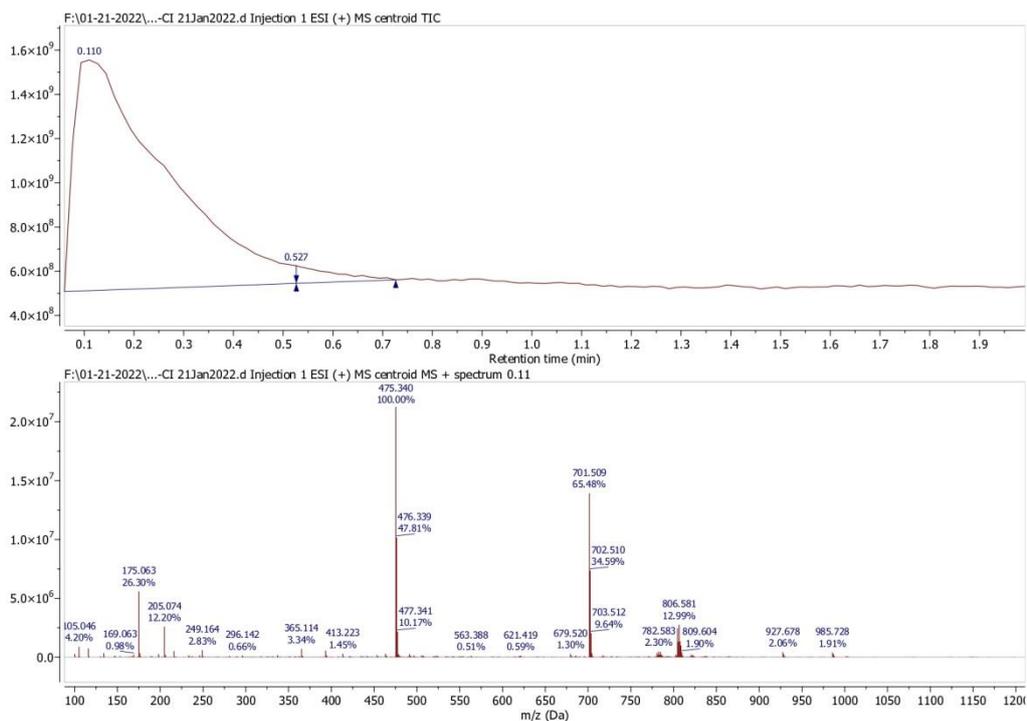


Рисунок S25. HR-ESI-MS спектры соединения №8

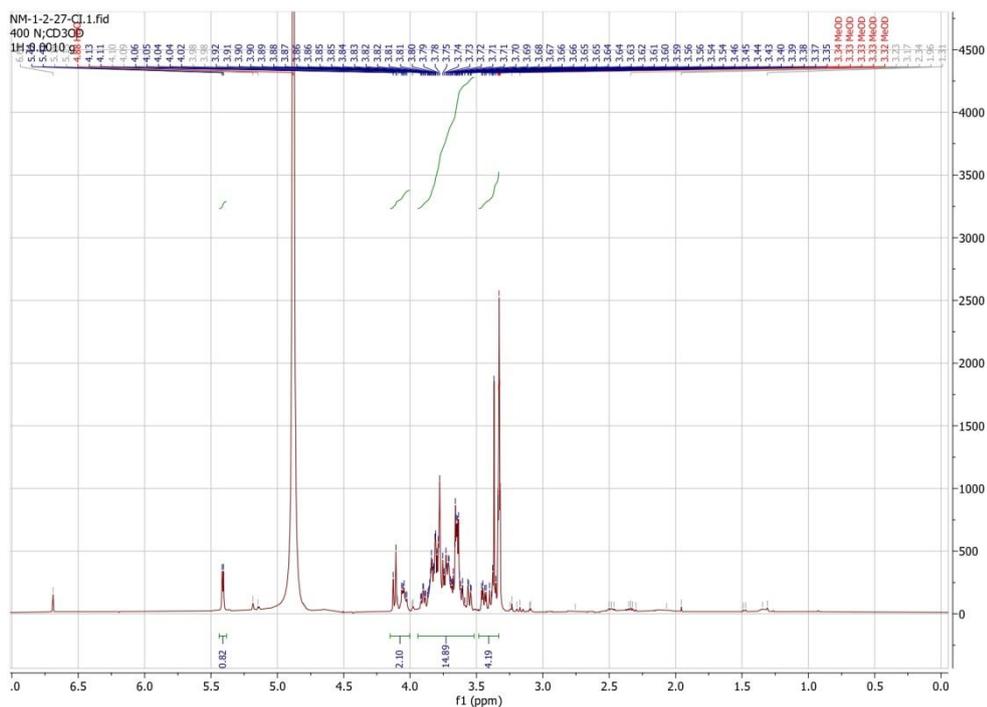


Рисунок S26.  $^1\text{H}$  NMR спектры смеси соединений № 9 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

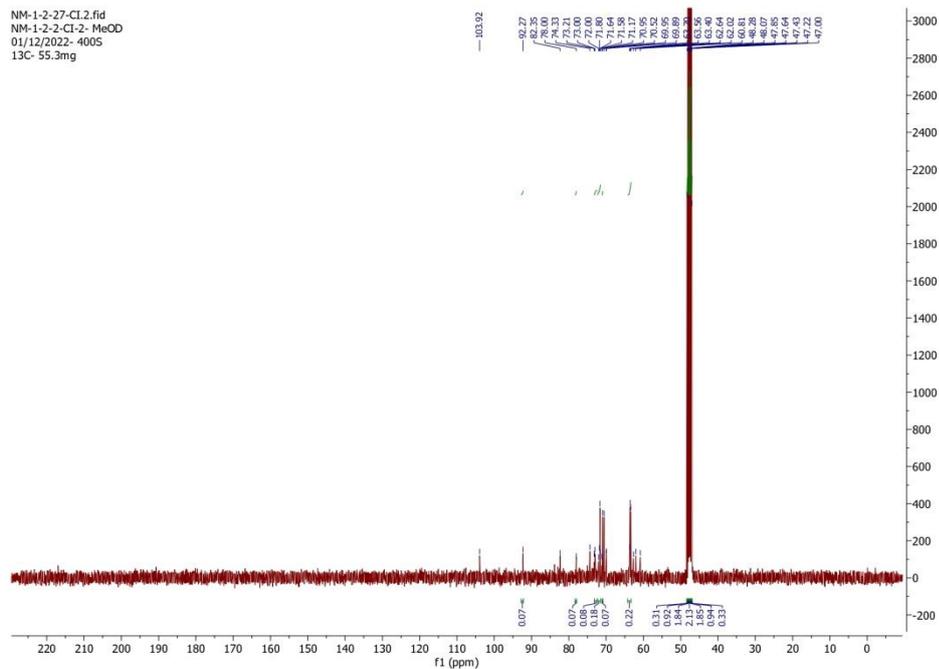


Рисунок S27.  $^{13}\text{C}$  NMR спектры смеси соединений №9 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

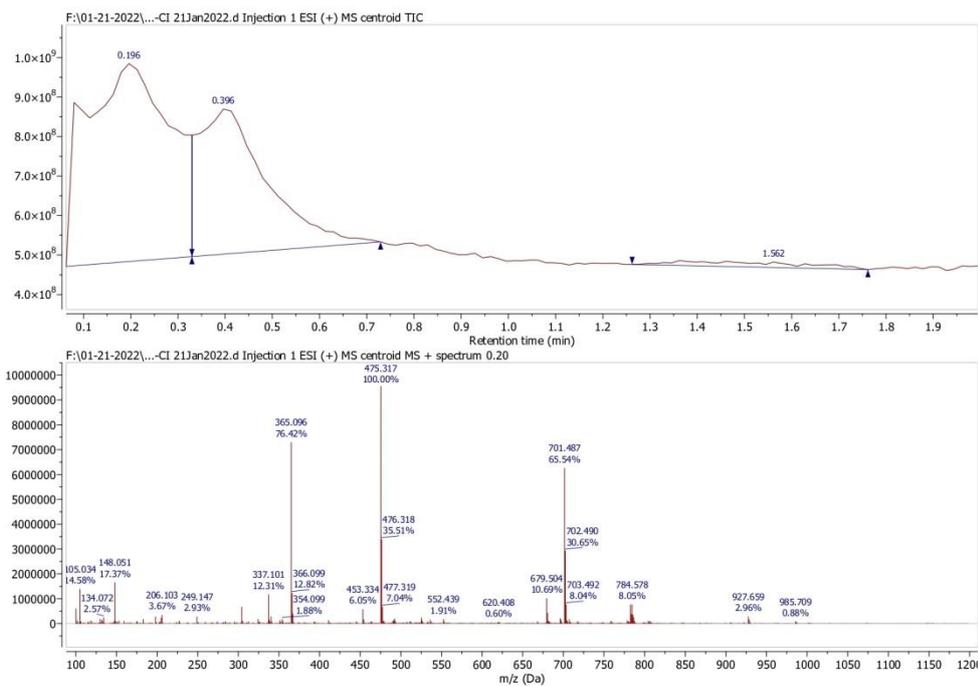
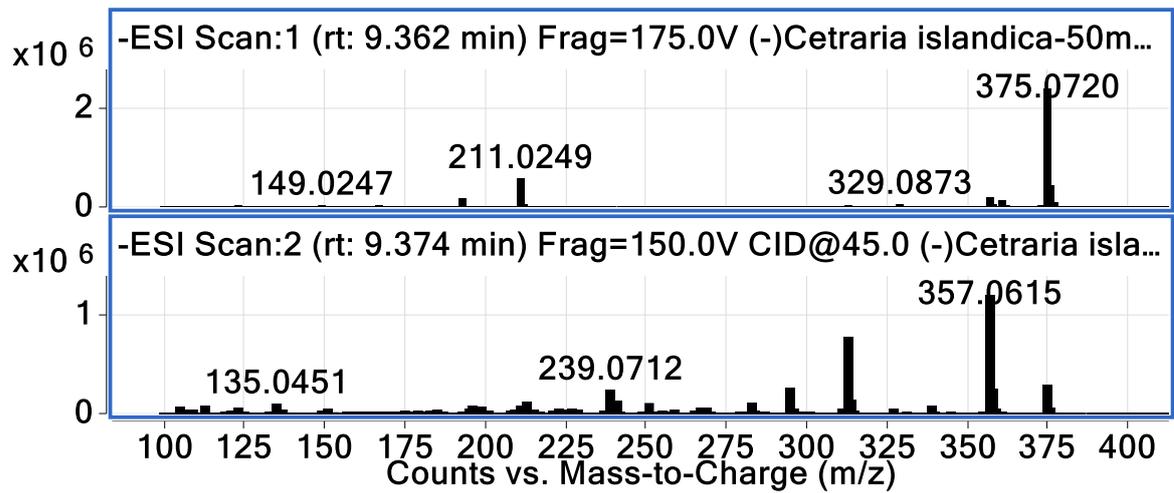
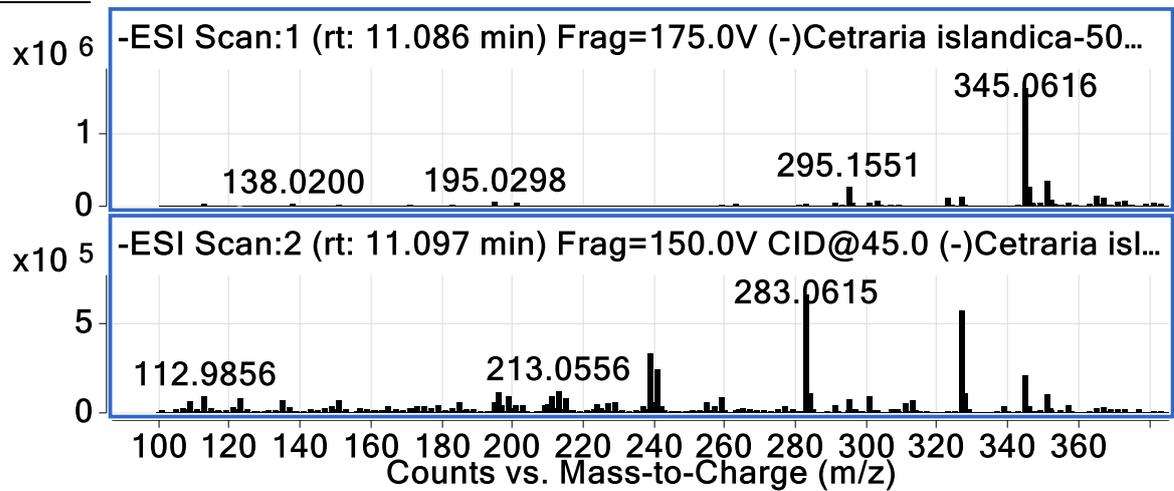


Рисунок S28. HR-ESI-MS спектры соединения №9

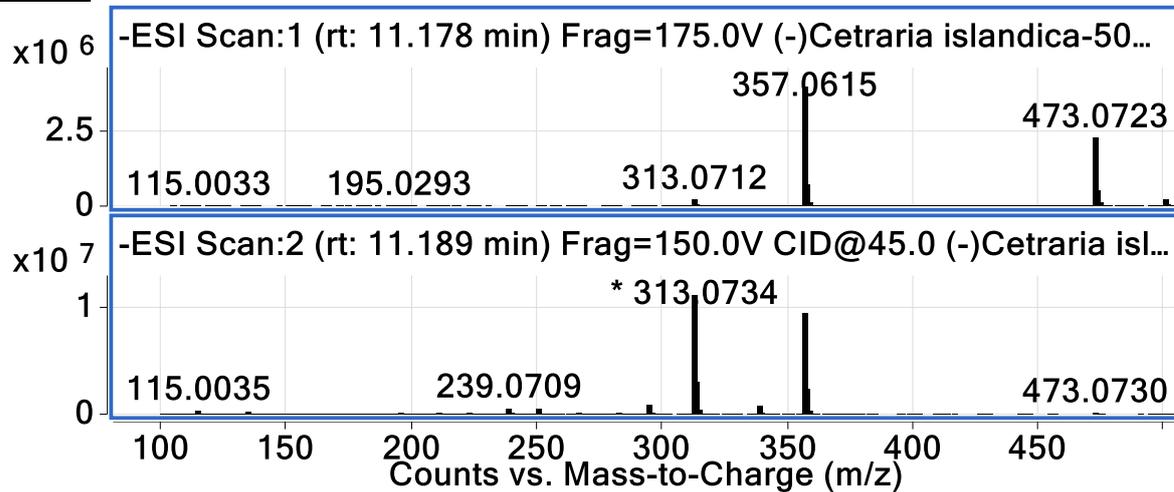
Peak-1



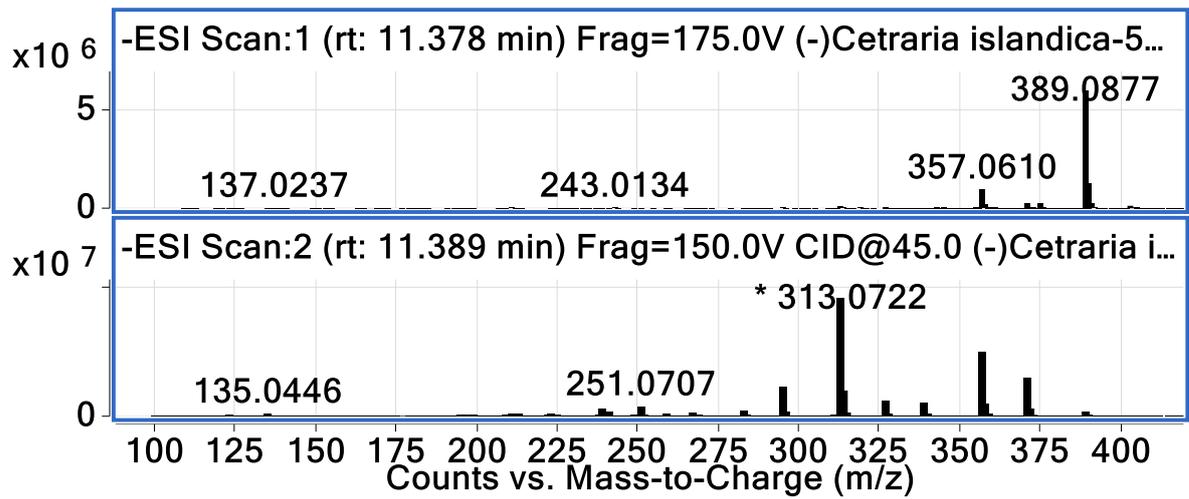
**Peak-2**



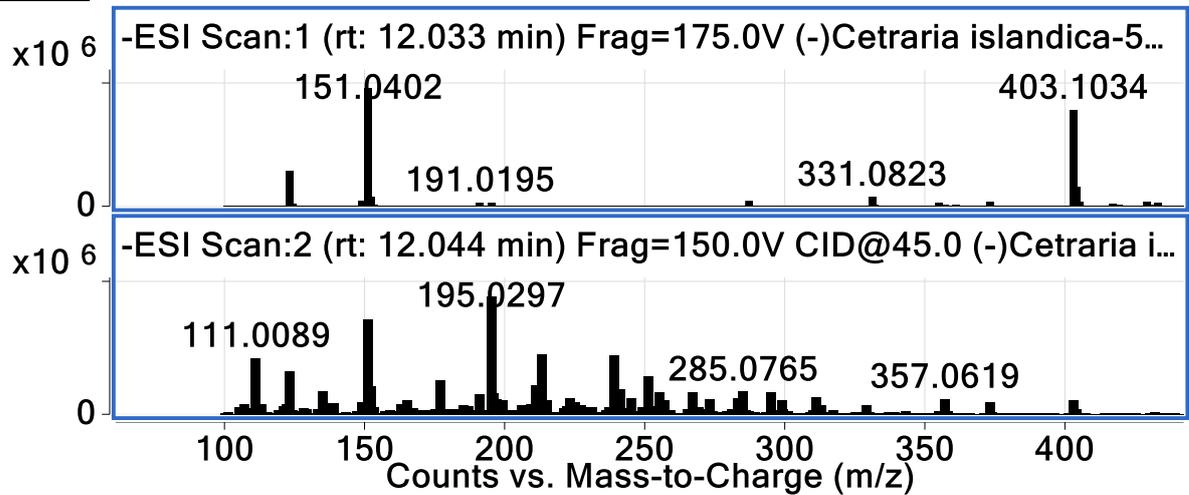
**Peak-3**



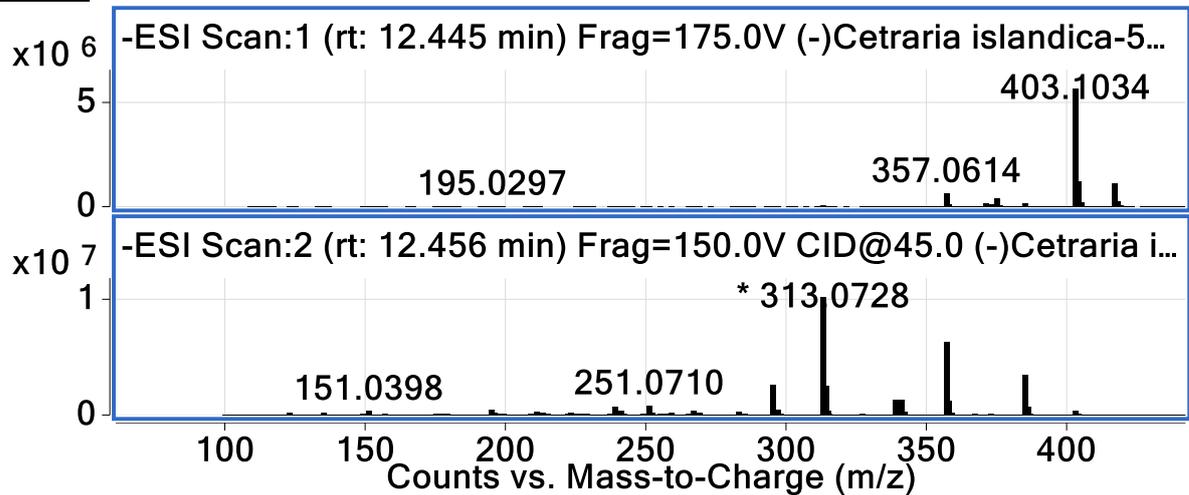
**Peak-4**



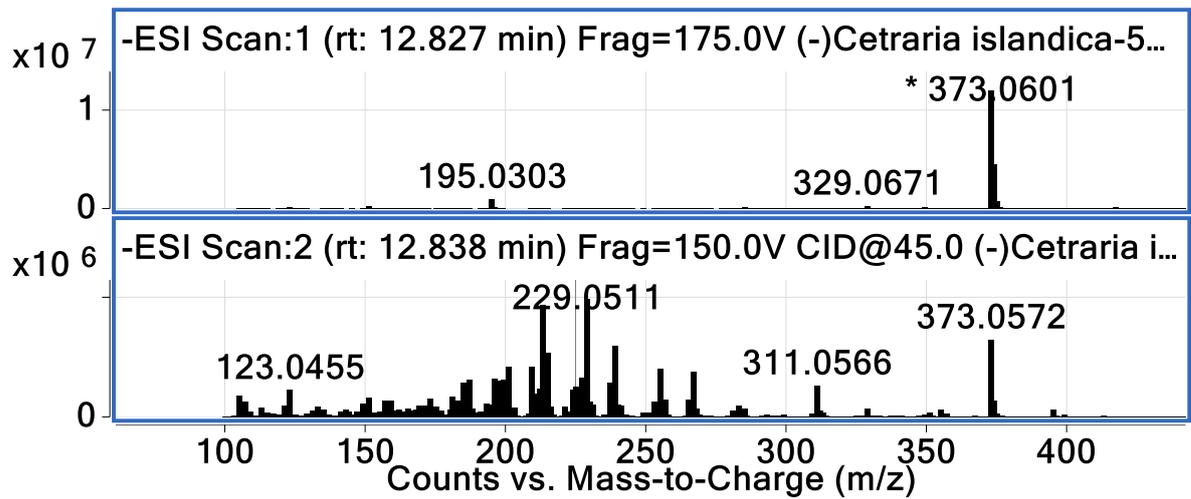
**Peak-5**



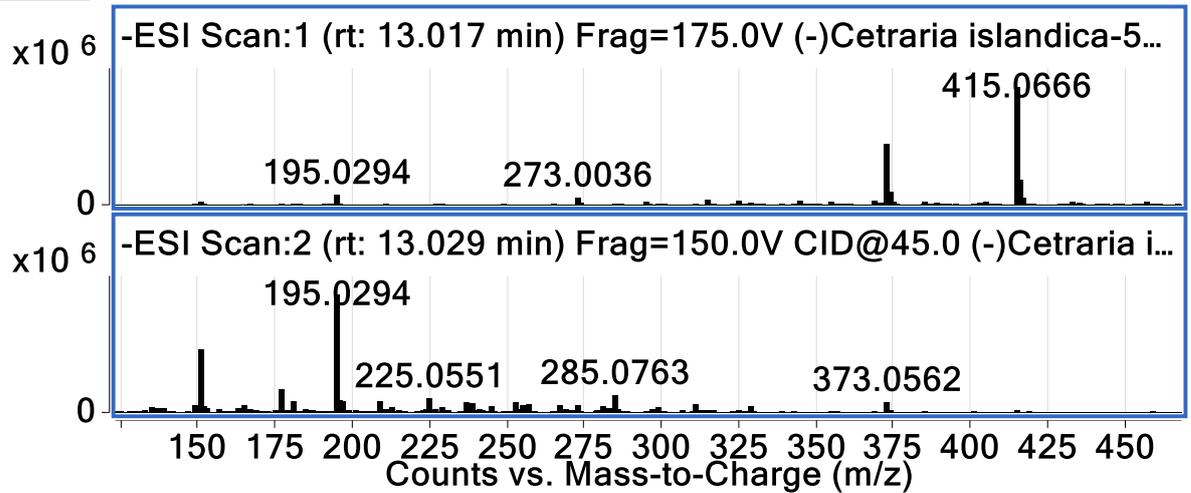
**Peak-6**



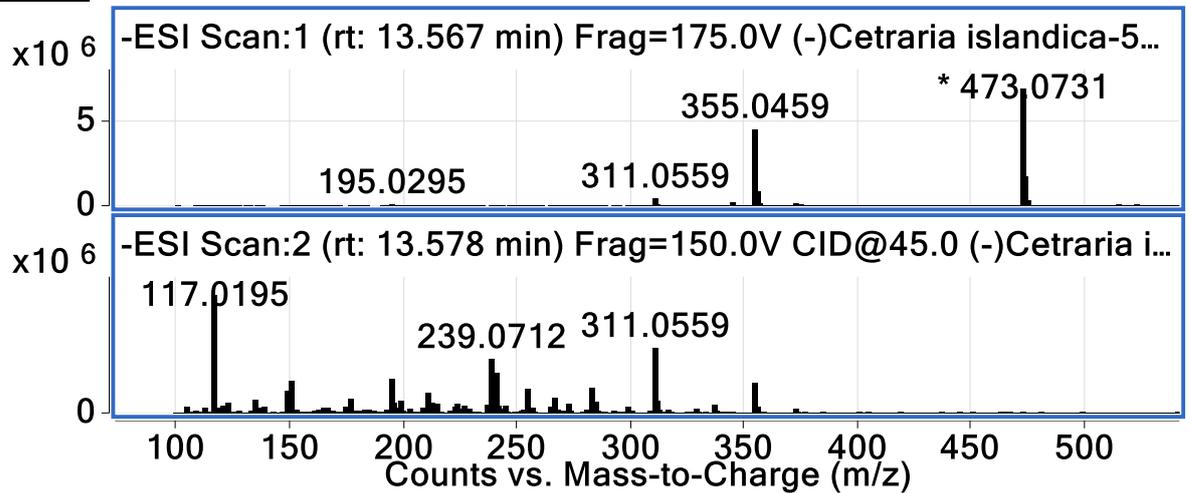
**Peak-7**



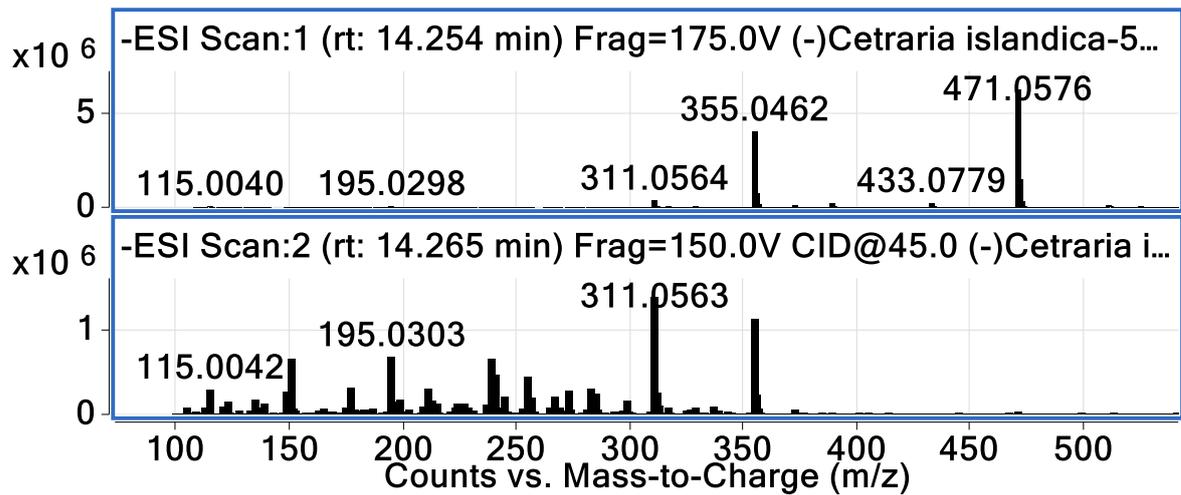
**Peak-8**



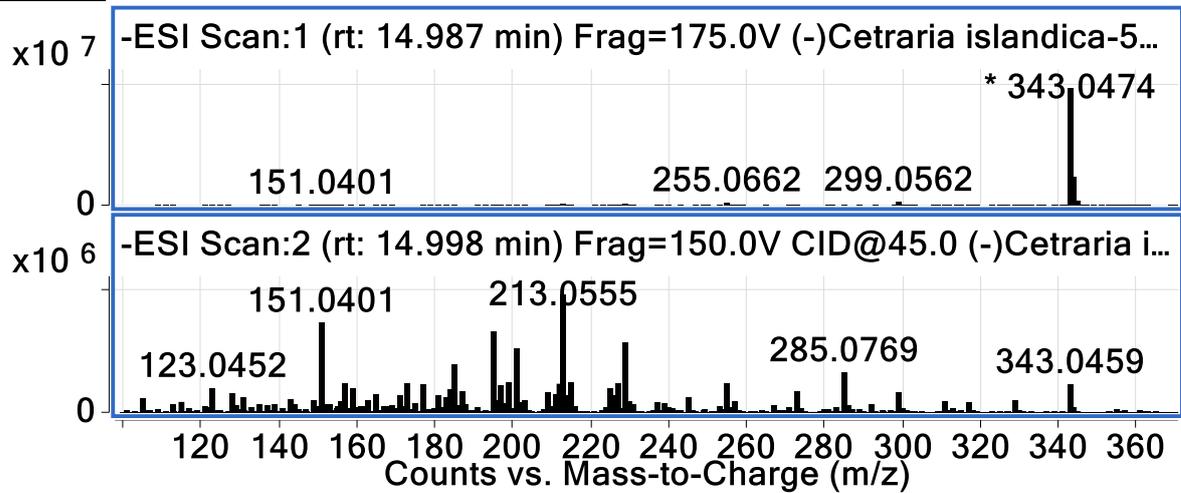
**Peak-9**



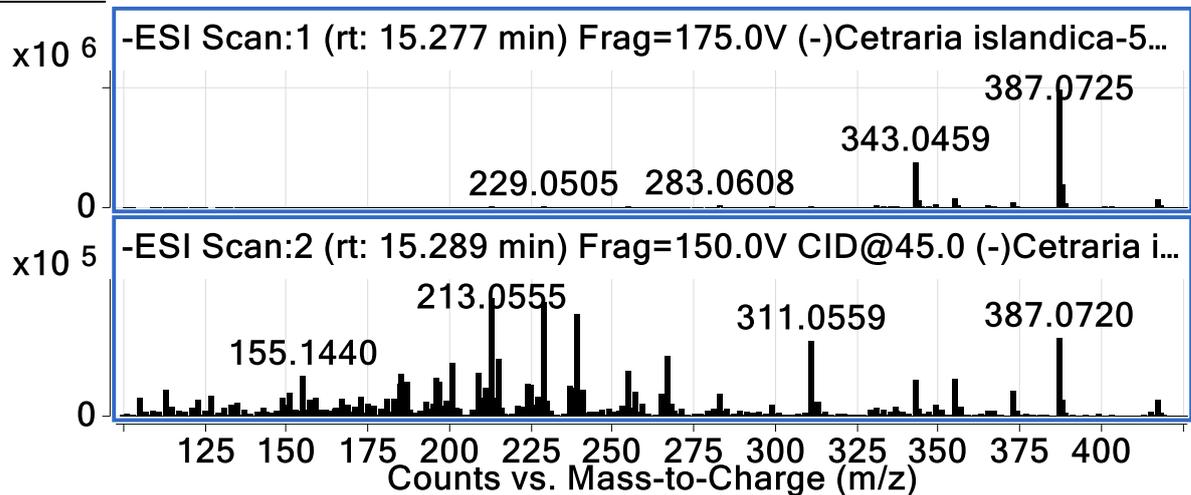
**Peak-10**



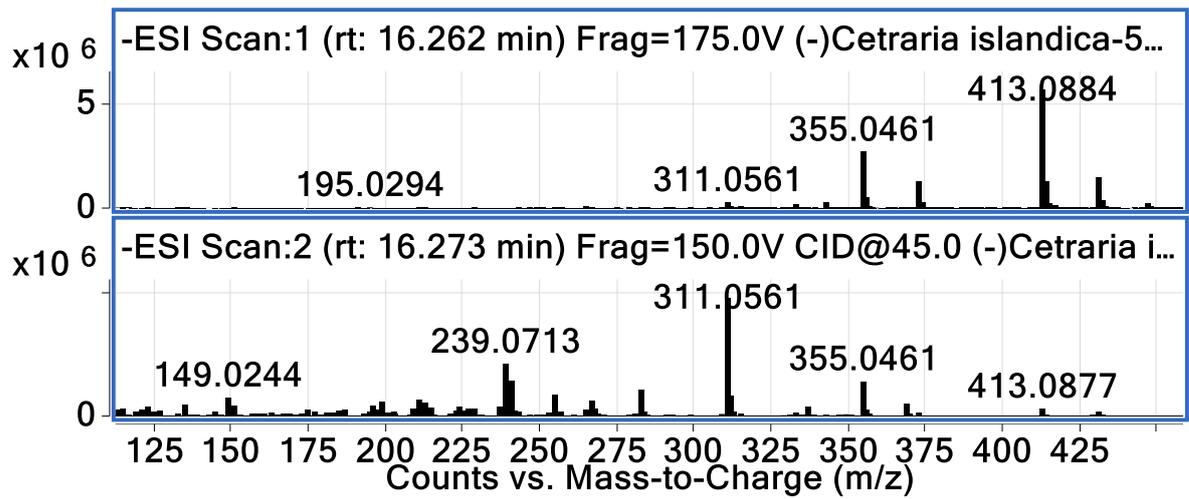
Peak-11



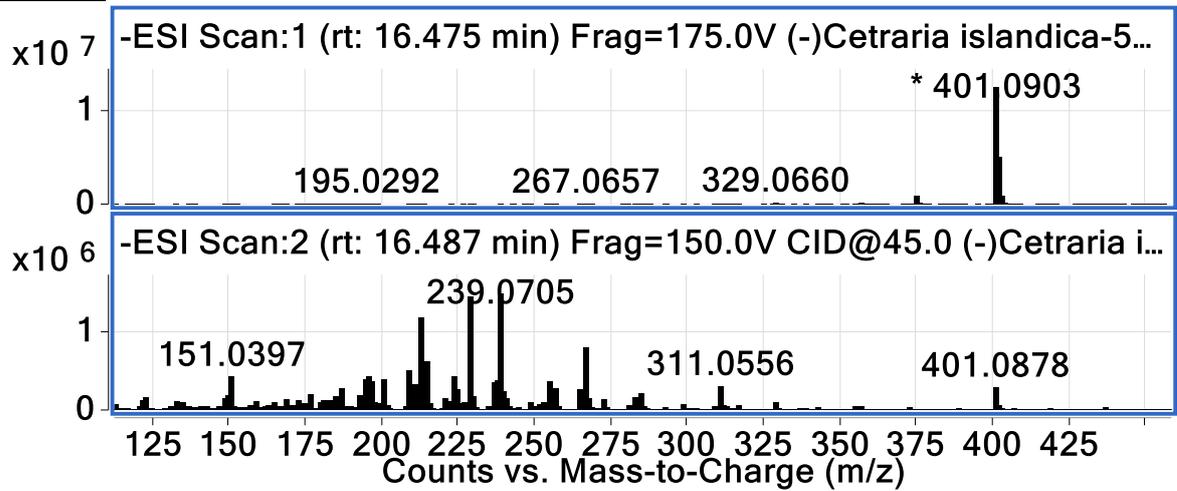
Peak-12



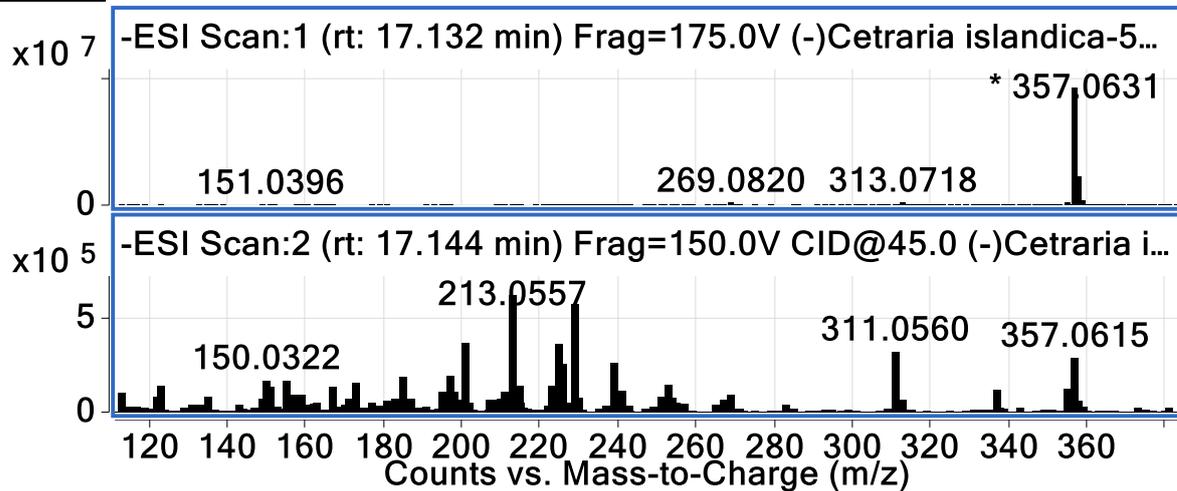
Peak-13



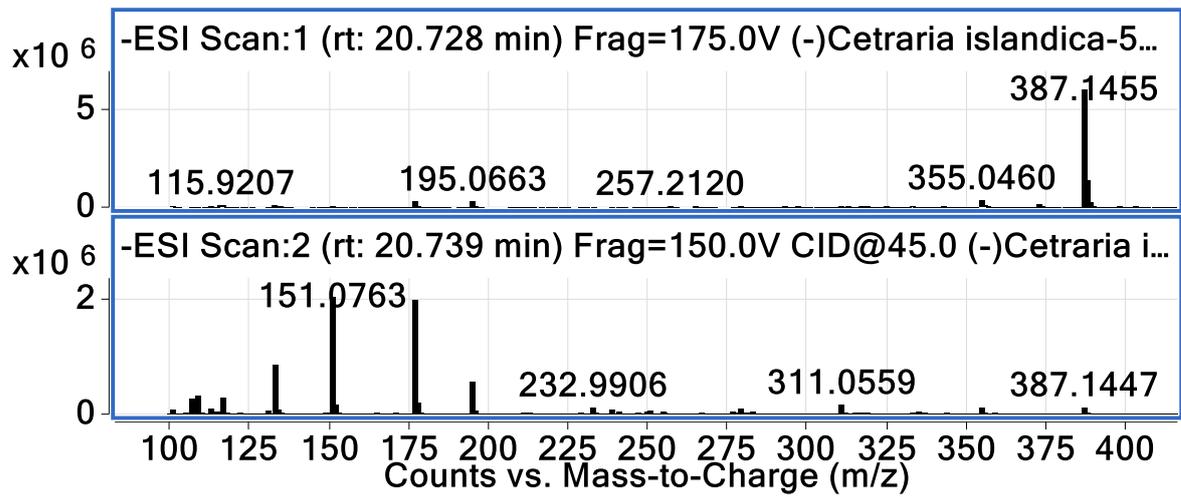
Peak-14



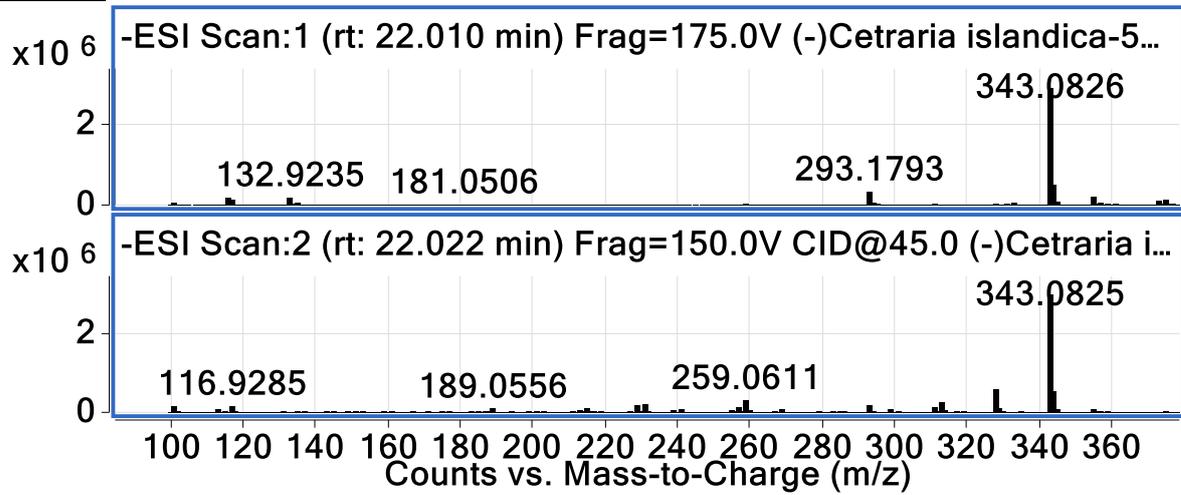
Peak-15



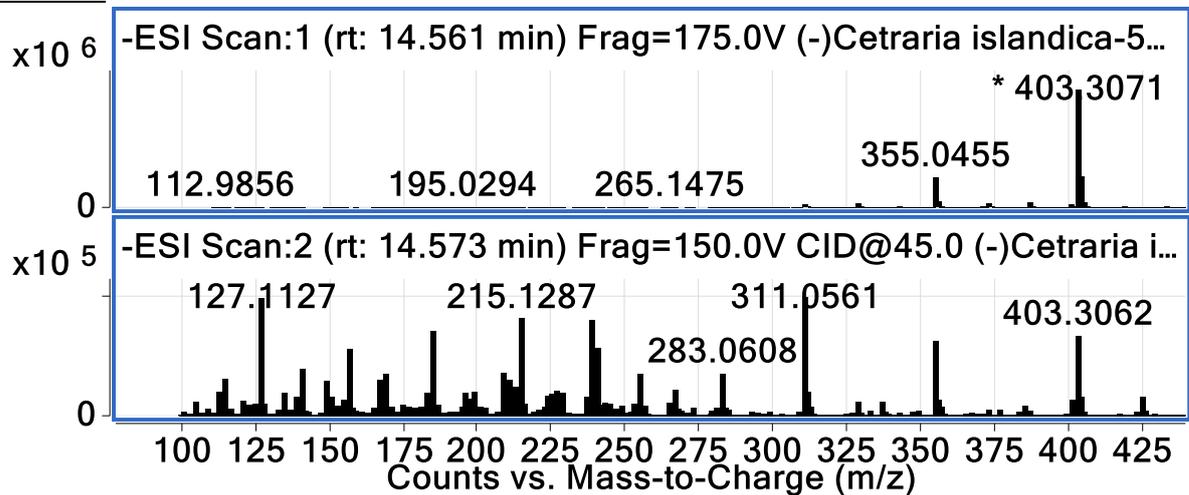
Peak-16



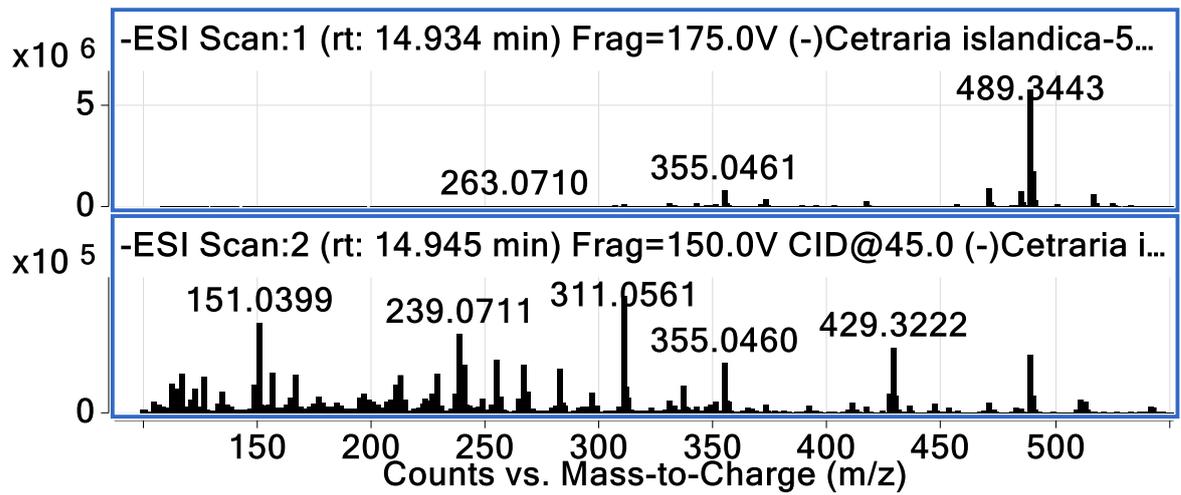
Peak-17



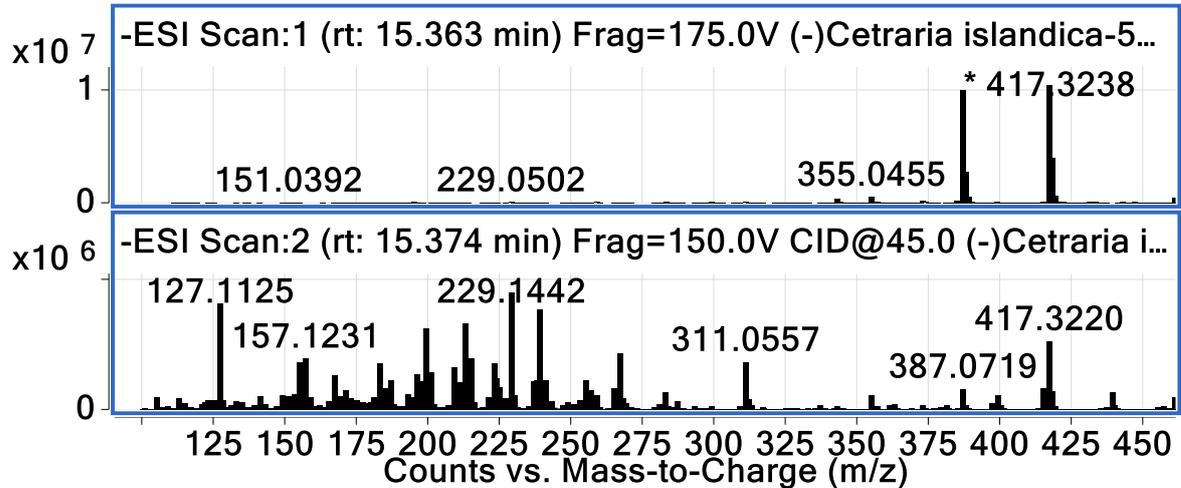
Peak-18



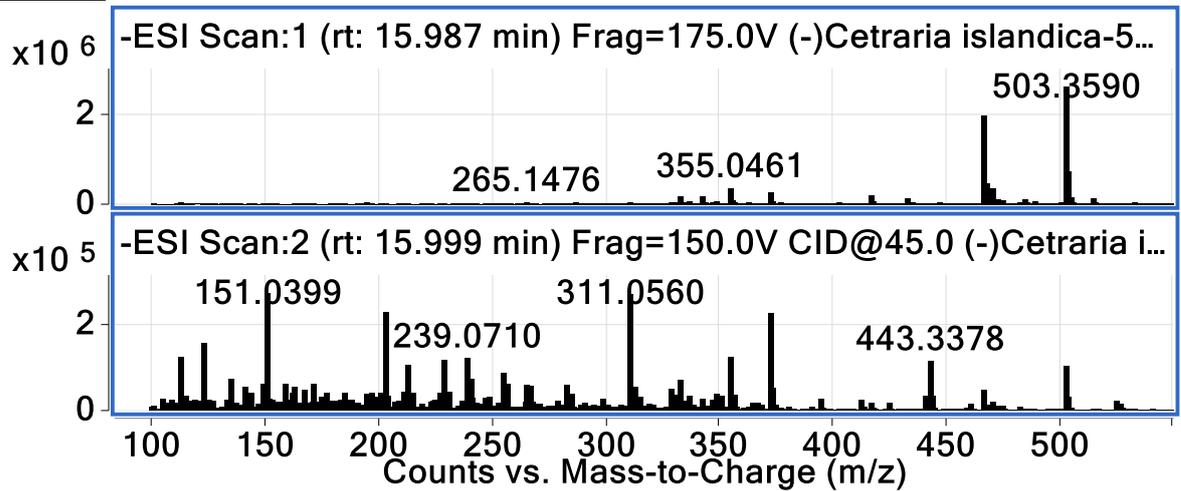
Peak-19



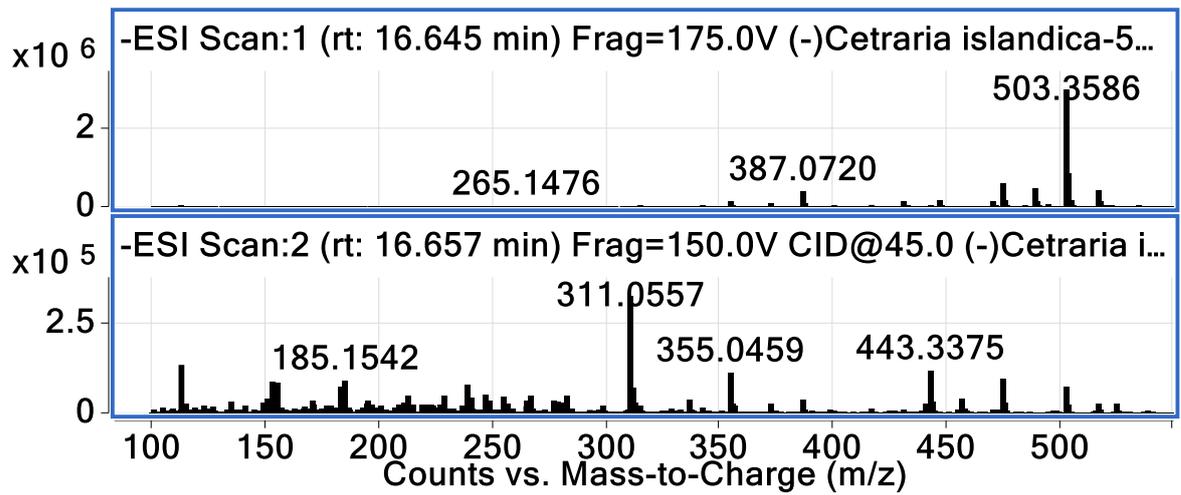
**Peak-20**



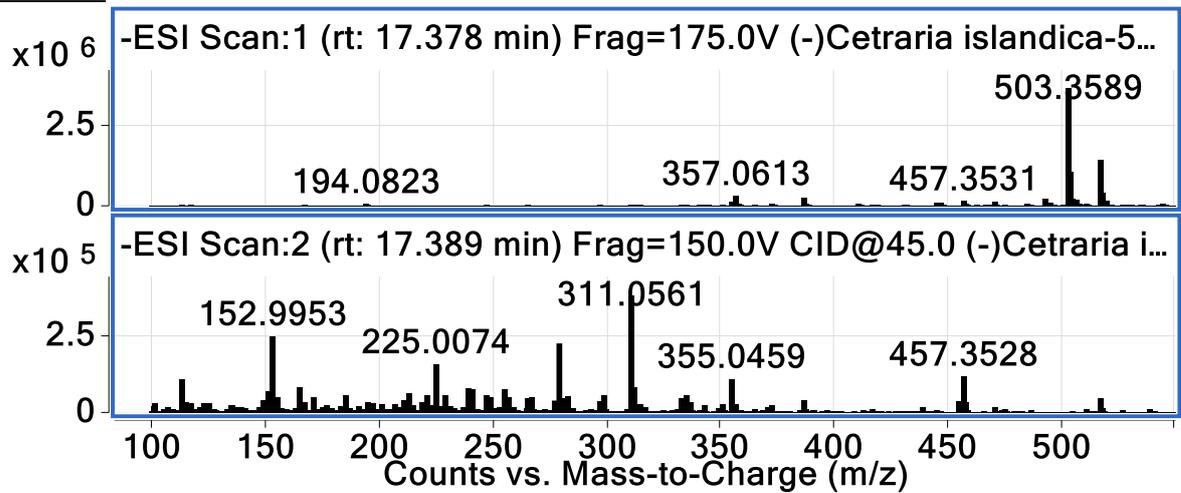
**Peak-21**



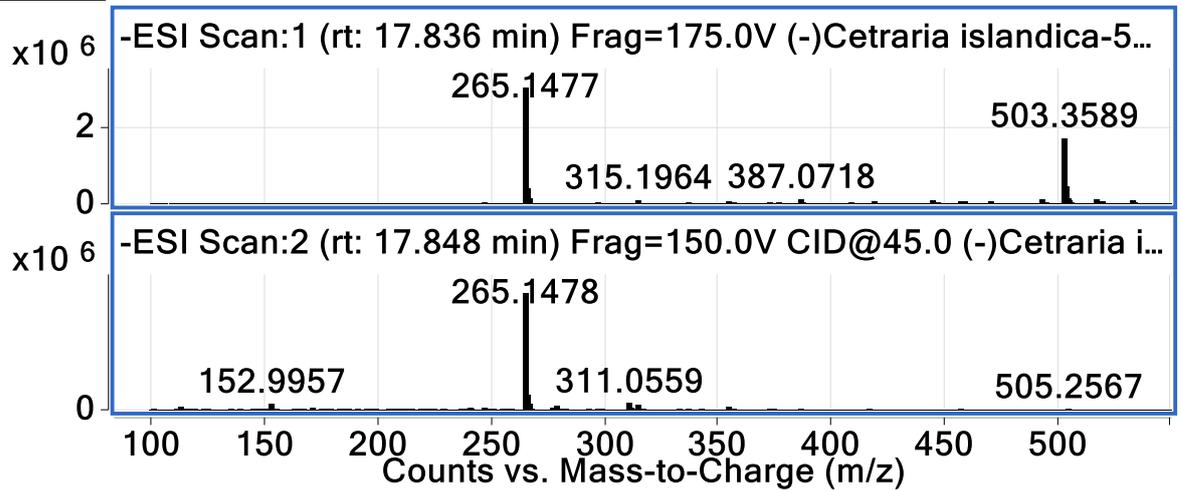
**Peak-22**



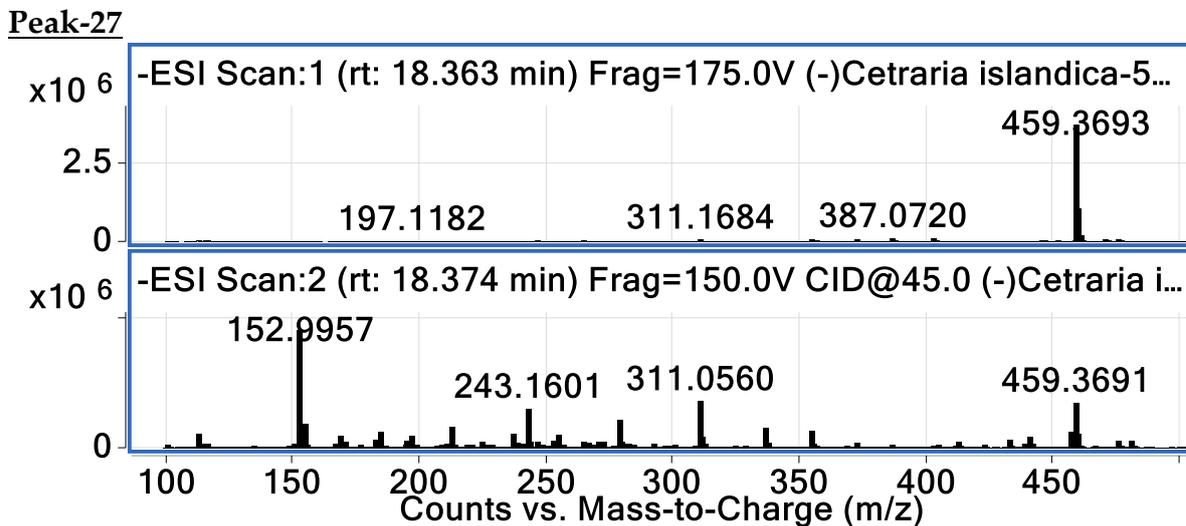
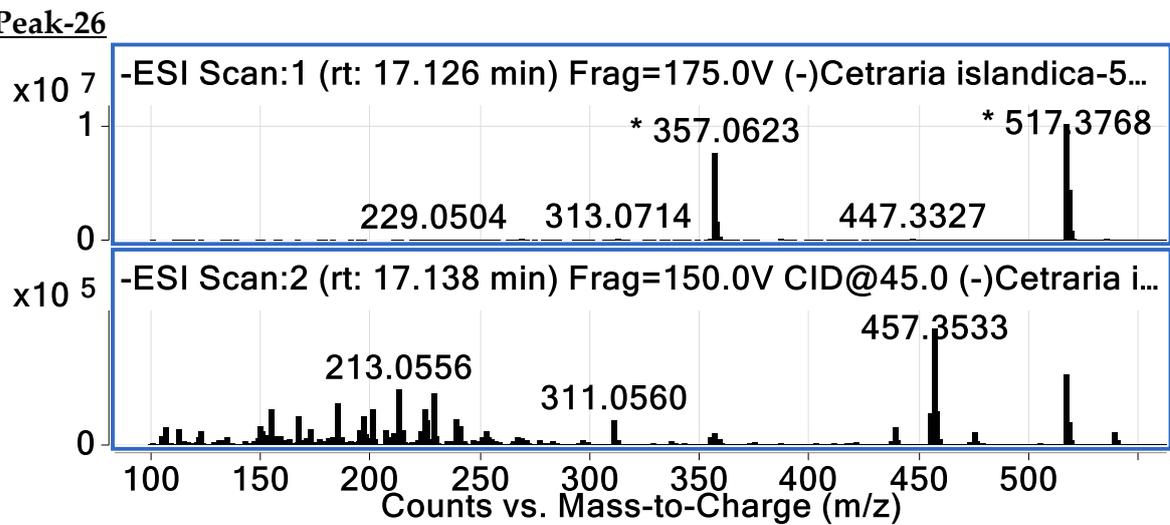
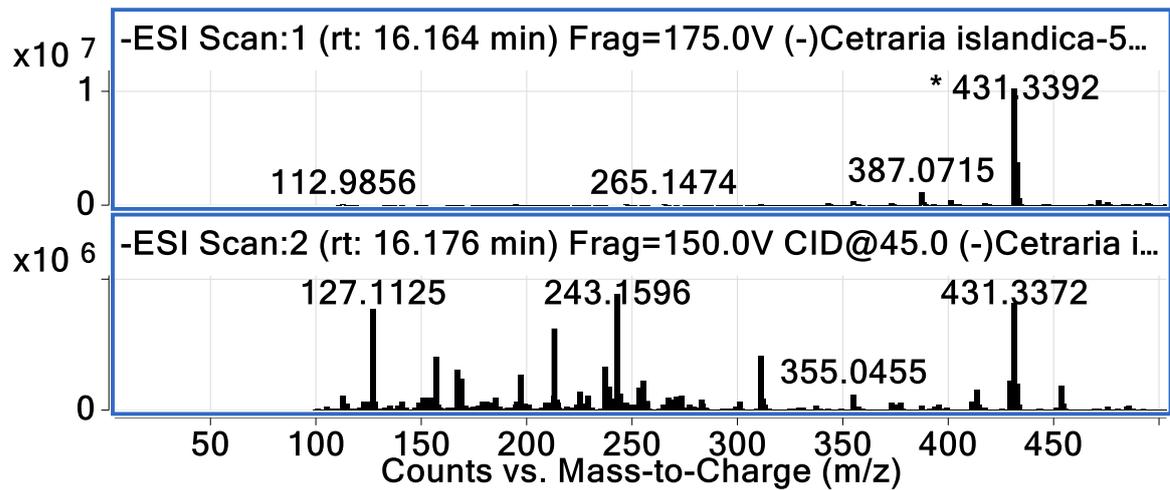
Peak-23



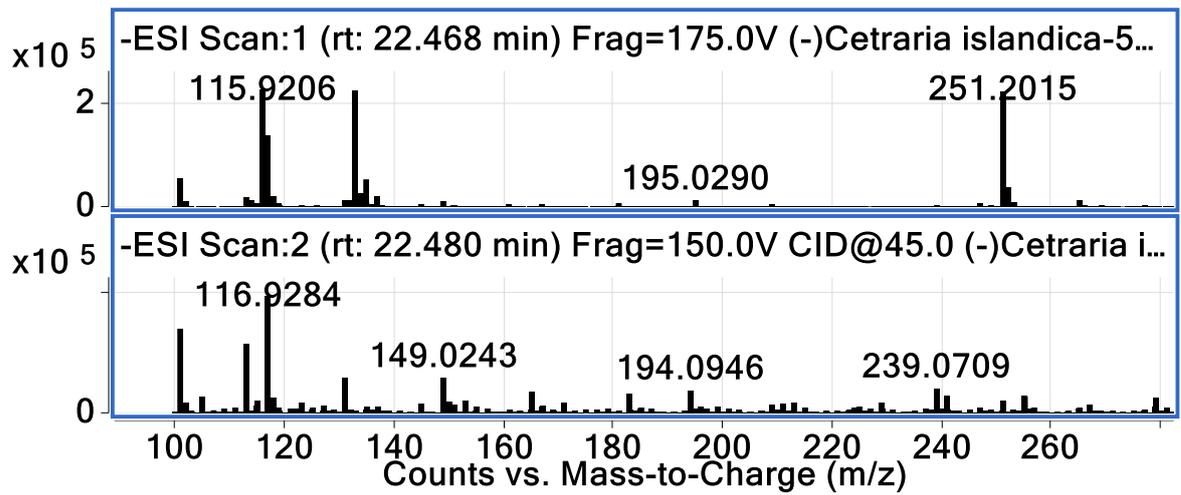
Peak-24



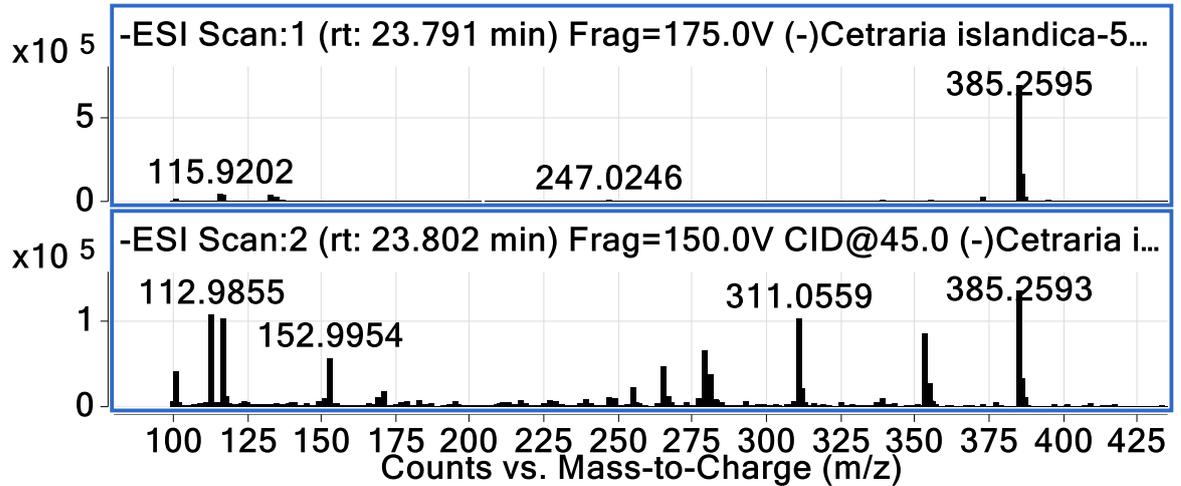
Peak-25



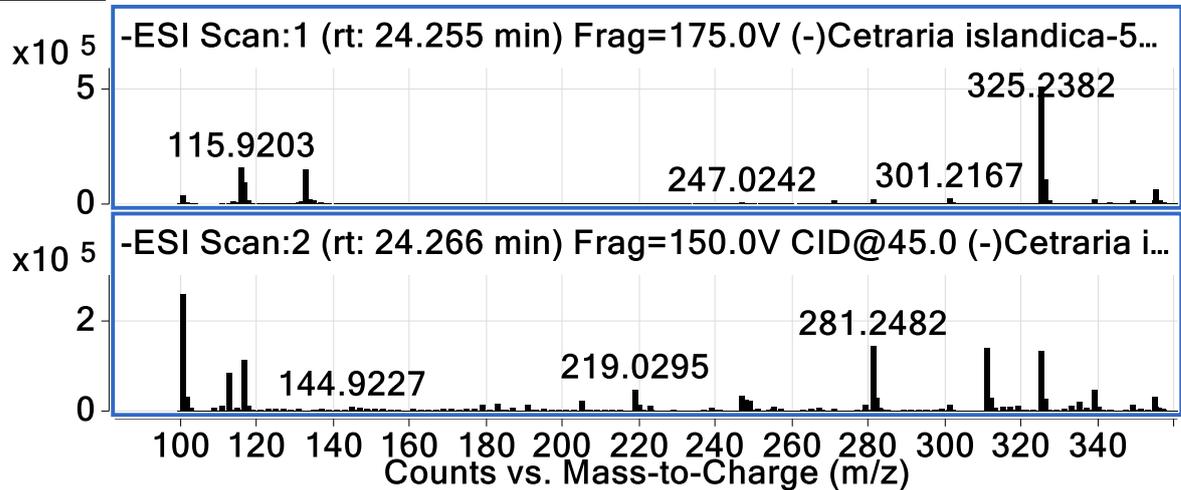
**Peak-28**



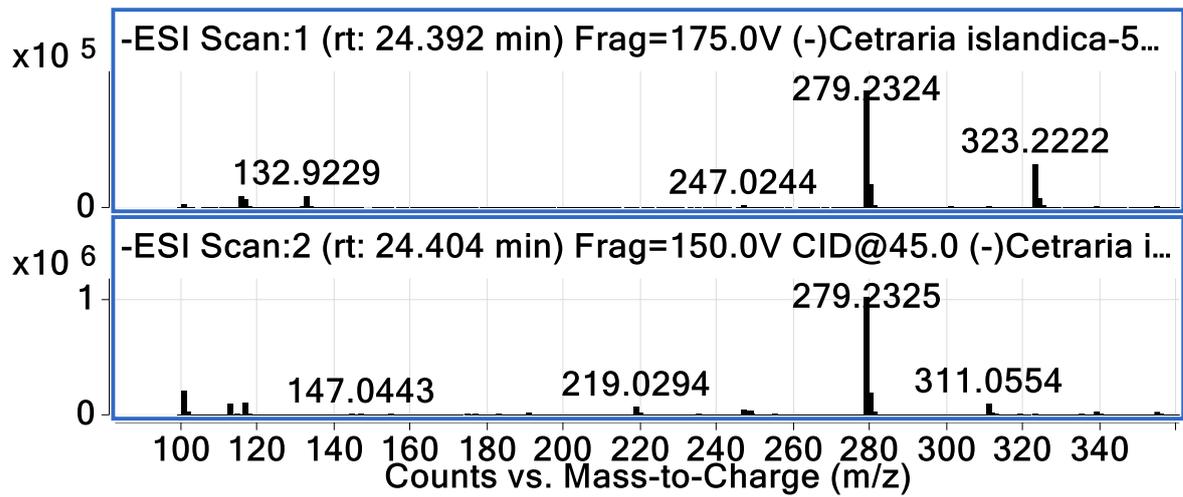
Peak-29



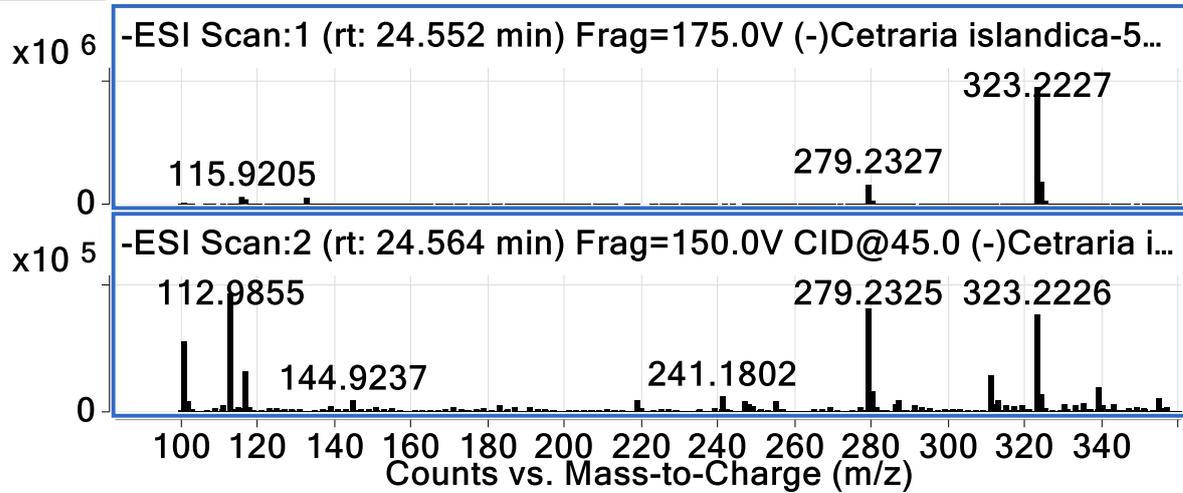
Peak-30



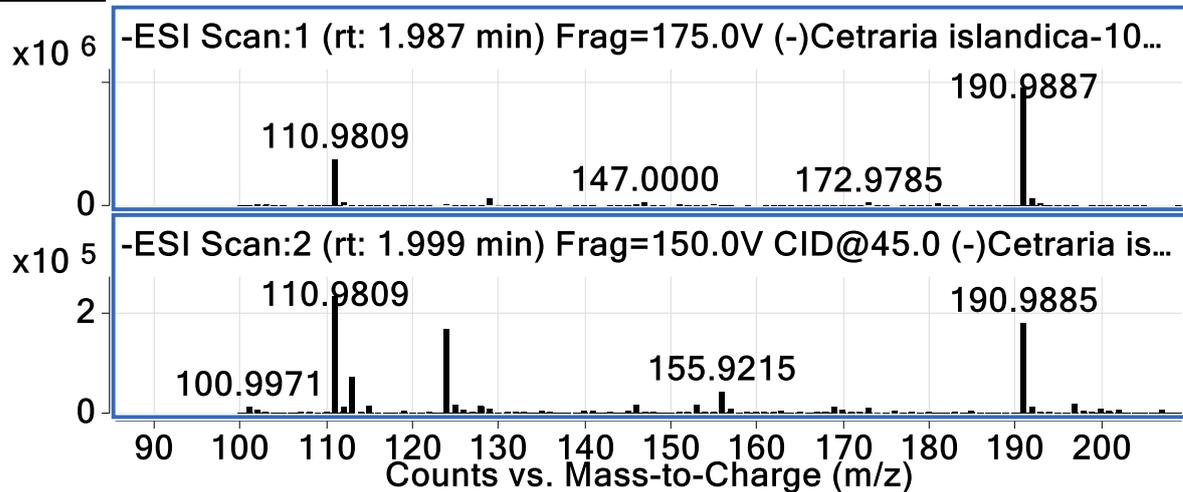
Peak-31



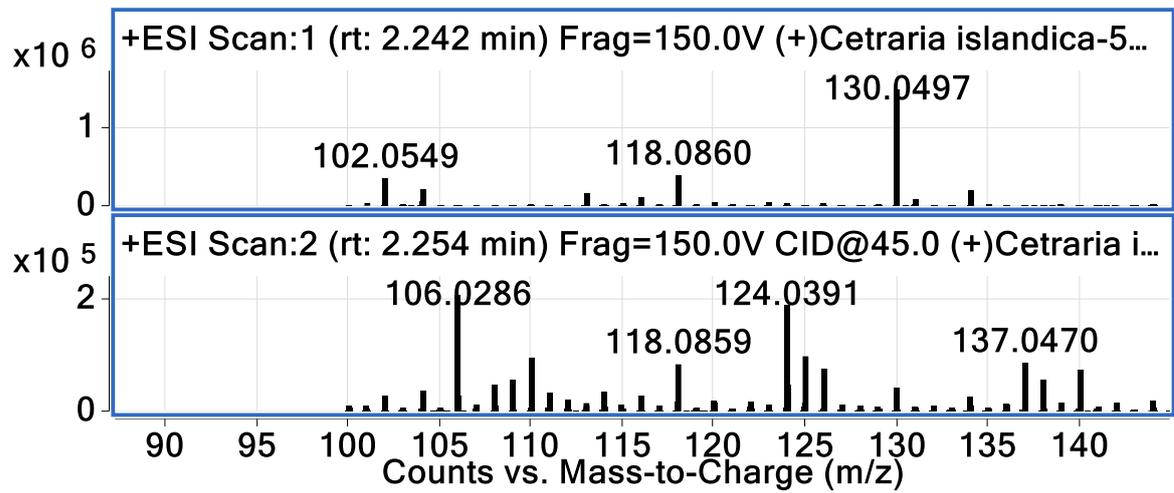
Peak-32



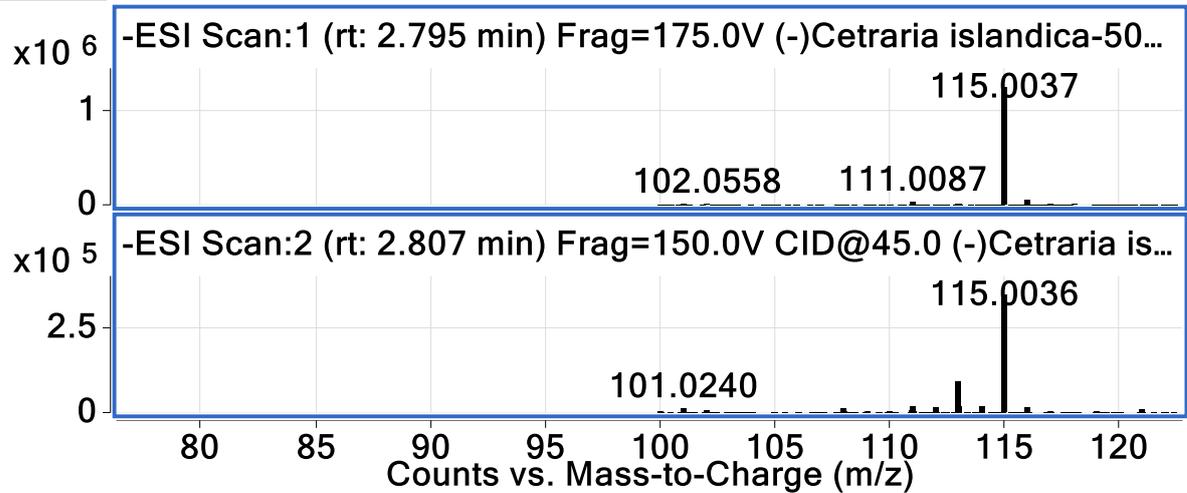
Peak-33



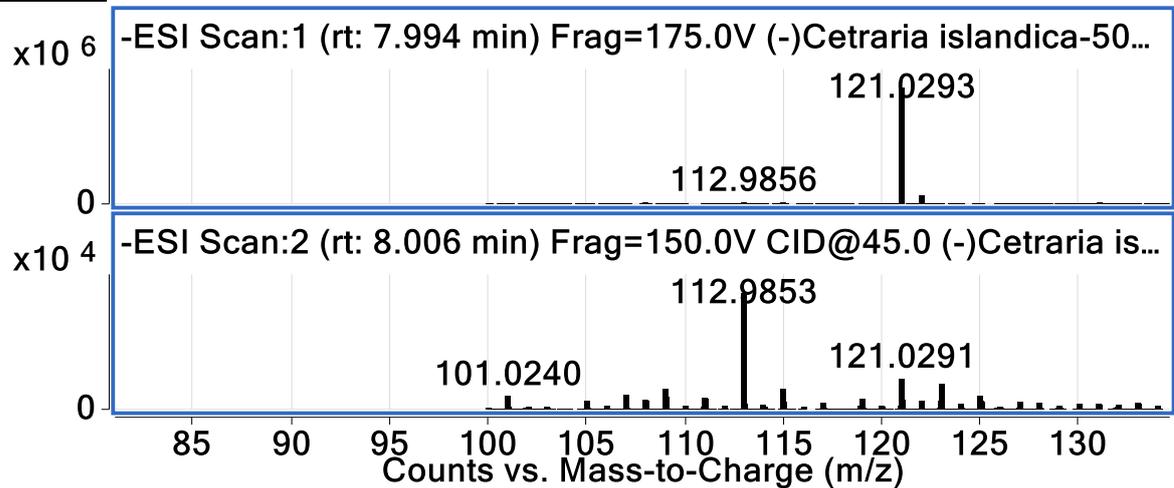
Peak-34



**Peak-35**



**Peak-36**



**Peak-37**

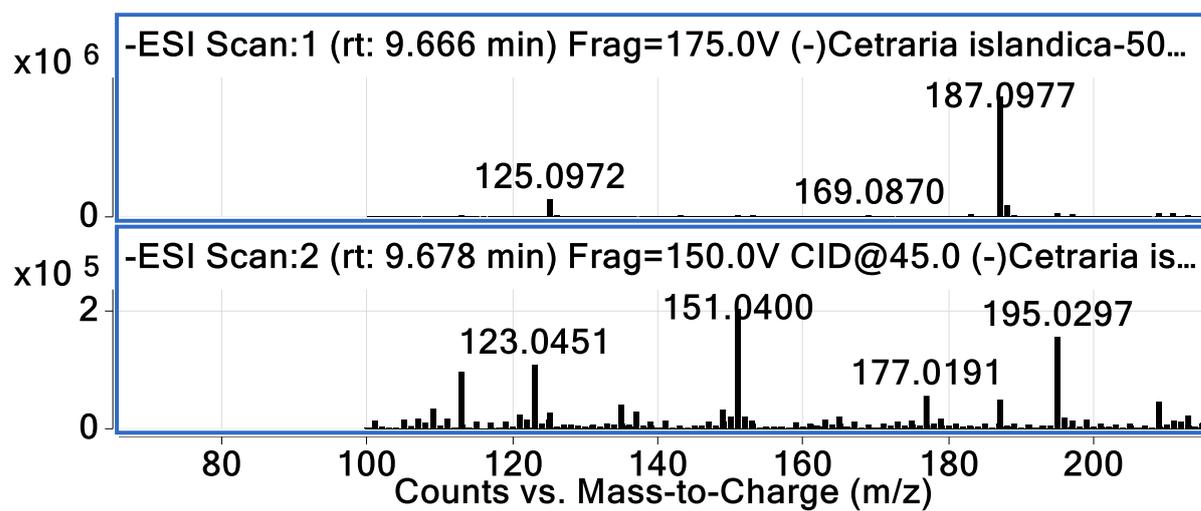


Figure S29. HR-MS/MS spectra of the identified compounds 1-37

**Приложение У**  
**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА *CETRARIA ISLANDICA***

| Упаковка: в соответствии с проектом НД<br>Дата начала испытания: 15.03. 2021г. Дата окончания испытания: 15.03.2023г. |   |   |  |                        |          |          |          |          |          |          |          |
|---|---|---|--|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Показатели качества   | Условия исследований  | Метод исследований                                | Нормы отклонения   | Периоды контроля, мес. |          |          |          |          |          |          |          |
|   |   |   |  | Серия                  | 0        | 3        | 6        | 9        | 12       | 18       | 24       |
| Описание  | Температура: (25±2) оС.<br>Относительная влажность: (60±5)% | Визуально ГФ РК I, т. 2, общая статья «Экстракты» | Тёмно-коричневая вязкая масса с характерным запахом и горьким вкусом. Консистенция тягучая, не растекающаяся при комнатной температуре. При хранении может наблюдаться образование небольшого осадка, допускаемого в рамках нормативной документации | 01ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |
|   |   |   |  | 02ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |
|   |   |   |  | 03ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |
| Идентификация - лишайниковые кислоты (усниновая кислота)<br>-полифенольные соединения (кофейная кислота)              |   | ВЭЖХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.29                       | Время удерживания<br>22 мин<br>3.5 мин   | 01ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |
|   |   |   |  | 02ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |
|   |   |   |  | 03ЦИЭ/ОП-2021          | Соответ. |

|   |   |   |               |          |          |          |          |          |          |          |          |
|---|---|---|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Сухой остаток                                   | ГФ РК<br>т. I.<br>2.8.16                | Не менее 70%  | 01ЦИЭ/ОП-2021 |          | 73       | 73       | 73       | 73       | 73       | 73       |          |
|   |   |   | 02ЦИЭ/ОП-2021 | 74       | 74       | 74       | 74       | 74       | 74       | 74       |          |
|   |   |   | 03ЦИЭ/ОП-2021 | 71       | 71       | 71       | 71       | 71       | 71       | 71       |          |
| Микробиологическая чистота                      | ГФ РК<br>1 т.,<br>2.6.12<br>и<br>2.6.13 | Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1. 5.1.4. категория 4В.<br>В 1 г (мл) препарата допускается наличие не более $10^5$ жизнеспособных аэробных микроорганизмов, не более $10^4$ энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий. Не допускается наличие бактерий Salmonella в 10 г. E.coli в 1.0 г. | 01ЦИЭ/ОП-2021 | Соответ. |          |
|   |   |   | 02ЦИЭ/ОП-2021 | Соответ. |
|   |   |   | 03ЦИЭ/ОП-2021 | Соответ. |
| Количественное определение<br>-кислота усиновая | ВЭЖХ<br>ГФ РК<br>I, т.1,<br>2.2.29      | Не менее 2 %  | 01ЦИЭ/ОП-2021 | 2,93     | 2,93     | 2,93     | 2,93     | 2,93     | 2,93     | 2,93     |          |
|   |   |   | 02ЦИЭ/ОП-2021 | 2,98     | 2,98     | 2,98     | 2,98     | 2,98     | 2,98     | 2,98     |          |
|   |   |   | 03ЦИЭ/ОП-2021 | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     |          |
| - кислота кофейная                              | ВЭЖХ<br>ГФ РК<br>I, т.1,<br>2.2.29      | Не менее 1,5 %  | 01ЦИЭ/ОП-2021 | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     | 1,90     |          |
|   |   |   | 02ЦИЭ/ОП-2021 | 1,82     | 1,82     | 1,82     | 1,82     | 1,82     | 1,82     | 1,82     |          |
|   |   |   | 03ЦИЭ/ОП-2021 | 1,84     | 1,84     | 1,84     | 1,84     | 1,84     | 1,84     | 1,84     |          |

## Приложение Ф

### СПЕЦИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВА СПРЕЯ С ЭКСТРАКТОМ *CETRARIA ISLANDICA*

| Показатели качества   | Нормы отклонений  | Методы испытаний  |
|---|---|---|
| Описание  | Прозрачная или слегка опалесцирующая вязкая жидкость от светло-жёлтого до жёлтого цвета с характерным ароматом мяты | Визуально, в соответствии с АНД   |
| Идентификация:<br>- усниновая кислота<br>- кофеиновая кислота | Время удерживания<br>22 мин<br>3.5 мин  | ВЭЖХ, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч.1, 2.1.2.28  |
| Выход содержимого из упаковки (спрея).                        | Не менее 90% от заявленного объема/массы содержимого упаковки   | Взвешивание, Ф.ЕАЭС, т. 1, ч. 2, раздел 2.1.9.18  |
| Однородность массы доставляемых (высбавождаемых) доз          | Средняя масса одной дозы должна быть в пределах от 85% до 115% от заявляемой массы дозы                             | Весовой метод – взвешивание серийных доз, выпускаемых из упаковки при стандартном числе нажатий, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч.2, 2.5.1.31 |
| Цветность   | Цветность продукта должна быть в пределах $\pm 10\%$ от эталонной   | Визуальное сравнение с эталонными растворами, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.2.2  |
| pH  | От 5.0 до 6.5   | Потенциометрический, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.1.2.3   |
| Вязкость  | От 1.5 до 2.5 сСт   | Ротационная вискозиметрия, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, раздел 2.1.2.10   |
| Относительная плотность                                       | 1,05–1,07 г/см <sup>3</sup>   | Пикнометрический, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.1.2.5  |
| Механические включения  | Отсутствуют   | Визуальный контроль на просвет в условиях   |

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  | рассеянного света, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 2, ОФС 2.5.1.31 «Спреи» |
| Микробиологическая чистота   | Общее количество аэробных микроорганизмов не более 10 <sup>3</sup> КОЕ/мл; общее количество дрожжевых и плесневых грибов не более 10 <sup>2</sup> КОЕ/мл; отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 мл  | Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.1.6                                   |
| Количественное определение:<br>- усниновая кислота<br>- кофеиновая кислота | не менее 0,018%<br>не менее 0,015%   | ВЭЖХ, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч.1, 2.1.2.28                           |
| Упаковка   | По 30 мл препарата разливают во флаконы с насосом-распылителем и защитным колпачком типа ФВ-ОС по ОСТ 64-2-71-80, ОСТ 64-2-82-85 или ТУ У 26.1-00480810-004:2011, либо во флаконы типа ФС-ОС-1 по ТУ 9461-002-53945143-2015. Флаконы укупориваются распылительными устройствами и навинчивающимися крышками типа 1.1-20 по ТУ РБ 700000577.001-2002. На флаконы наклеиваются самоклеящиеся этикетки. Флаконы, без вложения в индивидуальную пачку, вместе с инструкциями по медицинскому применению на государственном и русском языках помещаются в групповую упаковку. Количество инструкций должно соответствовать количеству флаконов. | В соответствии с АНД   |

|                                     |  |                      |
|-------------------------------------|--|----------------------|
|                                     | Групповая упаковка и транспортная тара — в соответствии с ГОСТ 17768-90. |                      |
| Маркировка                          | См. утвержденный макет упаковки  | В соответствии с АНД |
| Транспортирование                   | В соответствии с ГОСТ 17768-90   | ГОСТ 17768-90        |
| Хранение                            | В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С                | В соответствии с АНД |
| Срок хранения                       | 2 года   | В соответствии с АНД |
| Основное фармакологическое действие | Противовоспалительное, противомикробное                                  | В соответствии с АНД |

**Приложение X**  
**РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНОСТИ СПРЕЯ С ЭКСТРАКТОМ *CETRARIA ISLANDICA***

| Упаковка: в соответствии с проектом НД<br>Дата начала испытания: 15.03. 2021г. Дата окончания испытания: 15.03.2023г. |  |  |  |          |                        |         |         |         |         |         |         |         |         |
|---|--|--|--|----------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Показатели качества   | Условия исследований   | Метод исследований   | Нормы отклонения   | Серия    | Периоды контроля, мес. |         |         |         |         |         |         |         |         |
|   |  |  |  |          | 0                      | 3       | 6       | 9       | 12      | 18      | 24      |         |         |
| Описание  | Температура: (25±2) °С.<br>Относительная влажность: (60±5)%              | Визуально, в соответствии с АНД  | Прозрачная или слегка опалесцирующая вязкая жидкость от светло-желтого до желтого цвета с характерным ароматом мяты    | SP-01/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |         |
|   |  |  |  | SP-02/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |
|   |  |  |  | SP-03/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |
| Идентификация<br>- усниновая кислота<br><br>- кофейная кислота  |  | ТСХ, Ф. ЕАЭС, 2.1.2.26<br>Абсорбционная спектрофотометрия в видимой области, Ф. ЕАЭС, 2.2.25 | Rf около 0,95 (бутанол: уксусная кислота: вода – 4:1:5)<br><br>Rf около 0,95 (бутанол: уксусная кислота: вода – 4:1:5) | SP-01/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |
|   |  |  |  | SP-02/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |
|   |  |  |  | SP-03/24 | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |
| Выход содержимого из упаковки (спрея)   |  | Взвешивание, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 2, 2.1.9.18   | Не менее 90% от заявленного объема/массы содержимого упаковки  | SP-01/24 | 30,0                   | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    |
|   |  |  |  | SP-02/24 | 30,0                   | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    |
|   |  |  |  | SP-03/24 | 30,0                   | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    | 30,0    |
| Цветность   | Визуальное сравнение с эталонными растворами, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.2.2 | Цветность продукта должна быть в пределах ±10% от эталонной                                  | SP-01/24   | Соответ  | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |         |
|   |  |  | SP-02/24   | Соответ  | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |         |
|   |  |  | SP-03/24   | Соответ  | Соответ                | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ | Соответ |         |
| рН  | Потенциометрический, Ф. ЕАЭС, т. 1, ч. 1, 2.1.2.3                        | От 5.0 до 6.5  | SP-01/24   | 5,0      | 5,0                    | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     |         |
|   |  |  | SP-02/24   | 5,0      | 5,0                    | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     |         |
|   |  |  | SP-03/24   | 5,0      | 5,0                    | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     | 5,0     |         |
| Относительная   |  | Пикнометрический   | 1,05–1,07 г/см <sup>3</sup>  | SP-01/24 | 1,05                   | 1,05    | 1,05    | 1,05    | 1,05    | 1,05    | 1,05    |         |         |

|  |  |   |   |          |              |              |              |              |              |              |              |              |       |
|--|--|---|---|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| плотность  |  | ий, Ф. ЕАЭС,<br>т. 1, ч. 1, 2.1.2.5         |   | SP-02/24 | 1,05         | 1,05         | 1,05         | 1,05         | 1,05         | 1,05         | 1,05         | 1,05         |       |
|  |  |   |   | SP-03/24 | 1,06         | 1,06         | 1,06         | 1,06         | 1,06         | 1,06         | 1,06         | 1,06         |       |
| Микробиологическая чистота   |  | ВЭЖХ,<br>Ф. ЕАЭС,<br>т. 1, ч.1, 2.1.2.28    | Общее количество аэробных микроорганизмов не более 10 <sup>3</sup> КОЕ/мл; общее количество дрожжевых и плесневых грибов не более 10 <sup>2</sup> КОЕ/мл; отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 мл | SP-01/24 | Соответ<br>. |       |
|  |  |   |   | SP-02/24 | Соответ<br>. |              |       |
|  |  |   |   | SP-03/24 | Соответ<br>. |              |       |
| Количественное определение:<br>- усниновая кислота<br><br>- кофеиновая кислота |  | ВЭЖХ,<br>Ф. ЕАЭС,<br>т. 1, ч.1,<br>2.1.2.28 | Не менее 0,018 %  | SP-01/24 | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        |       |
|  |  |   |   | SP-02/24 | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        | 0,024        |              |       |
|  |  |   |   | SP-03/24 | 0,026        | 0,026        | 0,026        | 0,026        | 0,026        | 0,026        | 0,026        |              |       |
|  |  |   | Не менее 0,015 %  | SP-01/24 | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018        | 0,018 |
|  |  |   |   | SP-02/24 | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        |              |       |
|  |  |   |   | SP-03/24 | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        | 0,016        |              |       |