

НАО «Медицинский университет Караганды»

УДК 615.014:615.322

На правах рукописи

ОРАЗБАЕВА ПЕРИЗАТ ЗАРУХАНОВНА

Химический состав и биологические свойства ультразвукового экстракта тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, перспективы его применения в медицине

6D110400 – Фармация

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
доктор фармацевтических наук,
ассоциированный профессор С.А. Ивасенко,
кандидат медицинских наук, доцент
С.Б. Ахметова,
PhD, ассоциированный профессор
К. Скалица-Возняк

Республика Казахстан
Караганда, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО, СПОСОБЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ	12
1.1 Компонентный состав эфирного масла тимьяна ползучего, способы получения и биологическая активность	12
1.2 Способы и технология получения биологически активных веществ из тимьяна ползучего.....	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Материалы исследований	36
2.2 Методы исследований.....	38
3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (<i>THYMUS SERPYLLUM L.</i>) ФЛОРЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАЗАХСТАНА	49
3.1 Идентификация лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (<i>Thymus serpyllum L.</i>).....	49
3.2 Стандартизация лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего	62
4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО	74
4.1 Разработка нового способа получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвуковой экстракции	74
4.2 Исследование химического состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего.....	76
4.3 Технология получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего.....	83
4.4 Разработка показателей качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой	84
4.5 Разработка лабораторного регламента на получение субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой.....	96
5 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ДВУХ ХЕМОТИПОВ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО	108
5.1 Изучение антимикробной активности ультразвуковых экстрактов и эфирных масел двух хемотипов тимьяна ползучего методом микроразведений	108
5.2 Исследование антимикробной активности ультразвуковых	

экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом диффузии в агар.....	112
5.3 Отхаркивающая активность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего.....	113
5.4 Изучение противовоспалительной активности в эксперименте <i>in vivo</i>	114
5.5 Исследование мутагенной активности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего (тест Эймса).....	116
5.6 Изучение острой токсичности ультразвуковых экстрактов.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	125
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Решение Комитета по биоэтике.....	139
ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Проекты нормативных документов	140
ПРИЛОЖЕНИЕ В - Патенты на изобретение	142
ПРИЛОЖЕНИЕ Г - Лабораторный регламент	144
ПРИЛОЖЕНИЕ Д - Акт внедрения результатов научно - исследовательской работы	145
ПРИЛОЖЕНИЕ Е - Акты испытаний	146

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие документы:
Постановление Правительства Республики Казахстан об утверждении «Государственной программы индустриально-инновационного развития Республики Казахстан на 2020-2025 годы» № 1050 от 31 декабря 2019 года.

Приказ Министра здравоохранения 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».

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

Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 77 от 3 ноября 2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 15 от 26 января 2018 г. «Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения».

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 69 от 10 мая 2018 г. «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

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

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 169 от 07 декабря 2021 г. «Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного сырья) и лекарственных растительных препаратов».

ГОСТ Р 7.0.100-2018 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления».

ГОСТ 2226-2013 Мешки из бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия.

ГОСТ 17768-90E Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение (с изменениями 01.03.2003).

ГОСТ 7732-2017 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

АТСС - Американской коллекции типовых культур

БАВ - биологически активные вещества

ВР – вспомогательные работы

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором

ВЭЖХ/УФ - высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектором

г – грамм

га - гектар

ГФ РК – Государственная фармакопея Республики Казахстан

ГХ – газовая хроматография

ГХ/ПИД - газовая хроматография

ГХ/МС - хромато-масс-спектрометрия

ДМСО - диметилсульфоксид

Ф ЕАЭС - Фармакопея Евразийского экономического совета

кг – килограмм

кГц – килогерц

К_м – контроль микробиологический

КОЕ - колониеобразующие единицы

К_т – контроль технологический

К_х – контроль химический

л - литр

ЛР – лабораторный регламент

ЛС - лекарственное средство

МБК - минимальная бактерицидная концентрация

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

мкл – микролитр

мкм - микрометр (μм)

мл – миллилитр

мм – миллиметр

МФК - минимальная фунгицидная концентрация

ПК – производственный комплекс

ПНД - природоохранные нормативные документы

НАО «МУК» - Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды»

НД – нормативный документ

ОФС – общая фармакопейная статья

о.с.ч. - особо чистый

см - сантиметр

СО – стандартный образец

США - соединенные штаты Америки

т - тонна

ТОО - товарищество с ограниченной ответственностью

ТП - технологический процесс

ТСХ - тонкослойная хроматография

УМО - стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УФ - ультрафиолетовая спектрофотометрия

ФС - фармакопейная статья

х.ч. - химически чистый

ч.д.а. - чистый для анализа

LD₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов
испытуемой группы

M_r - молекулярная масса

LD₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытуемой
группы

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Данная диссертация посвящена фармакогностическому изучению тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, разработке рационального способа и технологии получения суммы полифенольных соединений для применения в медицине.

Актуальность проблемы. Лечебные свойства тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в народной медицине. Травя тимьяна ползучего включена в Государственные Фармакопеи Казахстана, Российской Федерации, Украины, Британии и других стран, в официальной медицине применяется как лекарственное растительное сырье, обладающее антибактериальным, вяжущим, противовоспалительным, успокаивающим, противосудорожным, отхаркивающим, спазмолитическим, желчегонным, болеутоляющим, мочегонным, ранозаживляющим и глистогонным действием, используется в виде отваров и настоев.

И в настоящее время тимьяна ползучего привлекает пристальное внимание ученых всего мира, благодаря своим фармакологическим свойствам. В последние годы увеличился интерес к этноботаническим, фитохимическим и фармакологическим исследованиям тимьяна ползучего. В мировой практике доказано, что тимьяна ползучего в природе, в зависимости от географического региона, климатических условий и среды произрастания, представлен несколькими хемотипами, т.е. изменяется качественный состав и количественное содержание эфирного масла и основных групп биологически активных веществ, следовательно, изменяются и фармакологические свойства.

Несмотря на то, что трава тимьяна ползучего включена в Государственную Фармакопею Республики Казахстан, химический состав данного отечественного лекарственного растения практически не изучен. Поэтому исследование химического состава и биологических свойств тимьяна ползучего, в зависимости от территории и условий произрастания, имеет большое значение для использования данного лекарственного растения в фармацевтической промышленности и применения в медицине.

Кроме того, важное значение имеет способ получения биологически активных веществ из растительного сырья. На сегодняшний день в фармацевтической промышленности жидкий экстракт тимьяна ползучего производят классическим методом реперколяции, применяемая технология является многоступенчатой, трудоемкой и времязатратной.

Вследствие этого, фармакогностическое изучение тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана, разработка нового рационального способа и технологии получения суммы экстрактивных веществ из отечественного лекарственного растения тимьяна ползучего, изучение ее химического состава и биологических свойств, является важной и приоритетной задачей.

Цель работы. Исследование химического состава и биологических свойств ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) флоры Центрального Казахстана, разработка нового лекарственного средства на их основе.

Задачи исследования:

- Провести фармакогностическое изучение тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего на территории Центрального Казахстана.
- Разработать разработан метод интенсификации процесса и технологию получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвуковой экстракции.
- Исследовать химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего с применением современных инструментальных методов.
- Исследовать биологические свойства и острую токсичность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего, научно обосновать возможности их применения в медицине.

Объекты исследования: лекарственное растительное сырье: два образца травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранные в популяциях Карагандинской области РК; суммы экстрактивных веществ: сухие ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего, субстанция тимьяна ползучего экстракт сухой.

Предмет исследования: биоморфологические особенности, диагностические признаки, товароведческие показатели и химический состав двух образцов травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.); способ и технология получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего; химический состав и биологические свойства сухих ультразвуковых экстрактов хемотипов образцов тимьяна ползучего; нормативная документация на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой».

Методы исследования: в работе использованы: ультразвуковая экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/МС), газовая хроматография (ГХ/ПИД), хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС), ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия.

Связь работы с планом государственных научных программ. Диссертация выполнена в НАО «Медицинский университет Караганды» в рамках внутривузовского проекта «Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus* L., произрастающих на территории Казахстана, для создания эффективных отечественных фитопрепаратов на их основе» на 2017 г.; внутривузовского проекта №0118РКИ0152 «Разработка состава и технологии получения новых лекарственных средств противомикробного и отхаркивающего действия на основе некоторых представителей рода *Thymus* L.» на 2018-2020 гг.

Научная новизна работы:

- впервые проведено сравнительное фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.),

собранного в популяциях Карагандинской области РК, по внешним признакам, микроскопическим характеристикам, результатам товароведческого анализа оба образца соответствуют ГФ РК и Ф ЕАЭС, при этом, установлены значительные отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по количеству и компонентному составу эфирного масла, также по количественному содержанию основных групп биологически активных веществ;

- разработан метод интенсификации процесса получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвука;

- впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять – флавоноиды.

- разработана эффективная, экономичная и экологически безопасная технология получения субстанции ультразвукового экстракта тимьяна ползучего;

- в результате проведенного биоскрининга впервые установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*, также проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 5 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*). Кроме того, обладает отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения «Бронхикум С»;

- впервые по данным биоскрининга выявлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*, но, проявляет выраженную антимикробную активность только в отношении 3 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, при этом, вызывает задержку роста культур *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), также вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*. По отхаркивающему действию уступает препарату сравнения «Бронхикум С».

- в эксперименте *in vivo* установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего обладают противовоспалительной активностью сопоставимой с препаратом сравнения диклофенаком натрия;

- по результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, определено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего относятся к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности) и не обладают мутагенной активностью;

Практическая значимость работы:

- разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян

ползучий трава»);

- впервые ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области, рекомендуются в качестве субстанции перспективной для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний;

- разработана, апробирована и внедрена технология получения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего, которая характеризуется значительным уменьшением продолжительности и увеличением производительности технологического процесса, увеличением выхода готового продукта и содержания действующих веществ, отсутствием токсичных растворителей;

- разработан проект НД на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой»;

- разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» (ЛР-005491-МК-04-21);

- на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК» организован выпуск опытных партий субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для фармакологического исследования.

Обоснованность и достоверность. Экспериментальные работы выполнены с применением современного оборудования, проходящего ежегодную поверку, что обосновывает достоверность и надежность результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- сравнительные фармакогностический, фитохимический и товароведческий анализы двух образцов травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранные в популяциях Карагандинской области РК;

- метод интенсификации процесса и технология получения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего;

- химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов травы тимьяна ползучего;

- результаты биологических свойств и острой токсичности ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего;

- нормативные документы на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой», в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Личный вклад автора. Все исследования выполнены соискателем лично: фармакогностическое изучение тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана; рациональный способ получения и технология суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвука; исследование химического состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего; изучение биологических свойств и острой токсичности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего; разработка нормативных документов на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой» в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены на: V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 15 марта 2017 г.); международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: тенденции и новые горизонты» (Караганда, 12 апреля 2017 г.); международной научно-практической конференции «Современная биология. Теоретические, прикладные аспекты и междисциплинарные связи» (Караганда, 12-13 октября 2017 г.); V международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, 8-9 декабря 2017 г.); 18th International Congress on Infectious Diseases (Buenos Aires, March 1-4, 2018); IV (XII) международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.); XXV International scientific and practical conference of young scientists and students «Topical issues of new drugs development» (Kharkiv, April 18-20, 2018); международной конференции молодых ученых и студентов «Мир науки и молодежь: эра стремительных изменений» (Караганда, 28 апреля 2018 г.); IX Всероссийской научной конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2019 г.).

Публикации. По материалам диссертации получены 1 Евразийский патент, 1 патент РК. Опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных КОКШВО РК, 1 статья в международном научном журнале, входящем в базу данных Scopus Q3, тезисы 9 докладов, из них тезисы 7 докладов в материалах международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, включает 14 рисунков и 31 таблицу; состоит из введения, 5 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 167 литературных источников.

1 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО, СПОСОБЫ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

1.1 Компонентный состав эфирного масла тимьяна ползучего, способы получения и биологическая активность

Thymus serpyllum L. (тимьян ползучий, чабрец) - многолетний кустарник, евразийский вид, произрастает в Евразии, от Британских островов до Восточной Сибири и от Скандинавии до Средиземноморья. Произрастает на свежих и сухих песчаных почвах, в хвойных и лиственных лесах, на лесных опушках и полянах, в степной зоне, лугах, вырубках, в молодых посадках леса, на южных склонах, скалах. В европейской части тимьян ползучий растет на подзолистых почвах, часто образуя дерновники, распространен в европейской части России, на всей территории Беларуси, Украины, произрастает в Западной Сибири, Забайкалье, на Кавказе, встречается в Казахстане (рисунок 1) [1].



Рисунок 1 - Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.) в природе

Лечебные свойства травы тимьяна ползучего (дикого тимьяна) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в народной медицине. Например, фармакологические документы, датированные 15 веком, свидетельствуют об использовании чабреца при лечении головных болей, вызванных простудой и ларингитом, а также как при лечении заболеваний органов дыхания, желудочно-кишечного и мочеполового тракта. В 16-м и 17-м веках тимьяна ползучего использовался перорально при лечении малярии и эпилепсии [2, 3]. Трава тимьяна ползучего издавна применяется в качестве глистогонного, антисептического, потогонного, мочегонного, болеутоляющего и отхаркивающего средства [3, 4]. На Балканском полуострове дикий тимьян используется как седативное средство, средство для снижения уровня холестерина в крови и улучшения периферического кровообращения, а также как иммуностимулятор [3, 5]. В Индии, благодаря его спазмолитическим свойствам, тимьян ползучий употребляют при менструальных расстройствах и болях [3, 6]. В китайской медицине он используется при тошноте, диарее, метеоризме, кашле, зубной боли, зуде и болях [3, 7]. Благодаря своим противомикробным и противокашлевым свойствам его трава традиционно применяется при простуде, фарингите и кашле [3].

Крепкий отвар чабреца снимает симптомы коклюша и позволяет разжижать выделения при бронхите и астме, что отводит этому растению особое место в лечении заболеваний дыхательной системы [3, 8, 9].

Трава тимьяна ползучего является лекарственным растением и включена в Государственную фармакопею республики Казахстан [10], Европейскую фармакопею 5.0 [11], Британскую фармакопею [12], ГФ Российской Федерации [13], ГФ республики Беларусь [14] и других стран [15].

Тимьяна ползучего трава применяется в официальной медицине как средство растительного происхождения, которое оказывает отхаркивающее, противомикробное и анальгезирующее действие, используется в виде отваров и настоев. Показания к применению:

- Инфекционно-воспалительные заболевания дыхательных путей и легких: бронхит, трахеит, пневмония;

- Воспалительные заболевания полости рта и глотки: фарингит, тонзиллит, стоматит, гингивит.

Сравнение показателей идентификации по химическому составу и количественного определения БАВ в сырье тимьяна ползучего в соответствии с нормативными документами [10-14] представлено в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, по требованиям ГФ Республики Казахстан, Европейской фармакопеи, Британской фармакопеи и ГФ Республики Беларусь в лекарственном растительном сырье тимьяна ползучего устанавливают наличие монотерпеноидов тимола и карвокрола и количественное содержание эфирного масла в сырье [10-12, 14].

ГФ Российской Федерации [13] регламентирует идентификацию лекарственном растительном сырье тимьяна ползучего по наличию флавоноида лютеолин-7-О-глюкозида (цинарозида) и по количественному содержанию в сырье суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид, также по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых водой и спиртом 30%.

В мировой практике наблюдается повышенный интерес к этноботаническим, фитохимическим и фармакологическим исследованиям тимьяна ползучего. Этот род очень сложен с таксономической и систематической точек зрения, демонстрируя значительный полиморфизм не только по морфологическим признакам, но и по составу биологически активных веществ [3, 16]. Тимьян ползучий, как в природе, так и в культуре, в зависимости от географического региона, климатических условий и среды произрастания, представлен несколькими хемотипами, т.е. изменяется качественный состав и количественное содержание эфирного масла и основных групп биологически активных веществ, следовательно, изменяются и фармакологические свойства [3, 16].

Активно проводятся систематические исследования компонентного состава и биологических свойств эфирного масла тимьяна ползучего в зависимости от географического региона, климатических условий и среды произрастания, сезона сбора и фазы вегетации [17-54]. Некоторые примеры представлены в таблице 2.

Таблица 1 - Сравнение показателей идентификации и количественного определения БАВ в сырье тимьяна ползучего в соответствии с нормативными документами [10-14]

Показатели качества	ГФ Республики Казахстан	Европейская фармакопея	Британская фармакопея	ГФ Российской Федерации	ГФ республики Беларусь
<i>Идентификация</i>					
Тонкослойная хроматография	Наличие в ЛРС тимола и карвокрола	Наличие в ЛРС тимола и карвокрола	Наличие в ЛРС тимола и карвокрола	Наличие лютеолин-7-О-глюкозида	Наличие в ЛРС тимола и карвокрола
<i>Количественное определение</i>					
Содержание эфирного масла в сухом сырье	не менее 3,0 мл/кг	не менее 3,0 мл/кг	не менее 3,0 мл/кг	-	не менее 1,0 мл/кг
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид	-	-	-	не менее 0,9 %	-
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой	-	-	-	не менее 18,0 %	-
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %	-	-	-	не менее 18,0 %	-

Таблица 2 – Компонентный состав и биологическая активность эфирного масла тимьяна ползучего в зависимости от места произрастания

Место произрастания, способ получения, выход и основные компоненты эфирного масла	Биологическая активность	Лит-ра
1	2	3
<i>Армения</i>		
На склоне старого Хндзореска Сюникского региона. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч., выход ЭМ 0,95%. Линалоол (86,01%), кариофиллен (3,24%), тимол (2,09%).	-	17
<i>Беларусь</i>		
На территории Витебской и Гродненской областей, всего собрано 9 образцов. Фракцию липофильных веществ получали экстракцией растительного сырья диэтиловым эфиром, в ультразвуковой ванне в течение 15 минут при температуре 20°С. Экстрагент упарили на роторном испарителе. (-)-Борнеол (2,02-33,39%), кариофиллен оксид (3,79-28,70%), камфора (4,24-27,59%), β -кариофиллен (1,12-22,64%), β -мирцен (2,26-14,61%).	-	18
<i>Босния и Герцеговина</i>		
Центральная Далмация. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч. 1 - ЭМ: карвакрол (49,4%), тимол (30,0%), γ -терпинен (5,3%), p -цимол (5,2%). 2 - Фракции ЭМ, полученные с применением колоночной хроматографии: фракция (СН) - γ -терпинен (29,5%), кариофиллен (29,3%), p -цимол (26,1%); фракция (СНО) - карвакрол (62,7%), тимол (35,4%).	ЭМ обладает антиоксидантной активностью по результатам трех разных методов DPPH (в концентрации 0,2 г/л и 2,0 г/л), TBARS (4,0, 20,0 и 40,0 г/л) и ВСВ (0,04 г/л и 0,2 г/л).	19
<i>Венгрия</i>		
1. Популяция флоры Венгрии Баконь-Хиллз (Феньёфё). 2. Экспериментальная станция Университета Корвинуса в г. Будапешт. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья на аппарате Клевенджера в течение 2 ч. Выход ЭМ 0.316 мл/100 г и 0.366 мл/100 г. 1 - Геранил изобутират (44,0%), 1,8-цинеол (16,9%). 2 - 1,8-Цинеол (53,9%), β -кариофиллен (9,5%).	-	20

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Индия</i>		
<p>В природе: Малари (выс. 3255 м); Индрадхара возле Бадринатха Чамоли (выс. 3350 м); Чакрата, Дехрадун (выс. 2133 м) Гарвал, регион Утта-раханд, Гималаи. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья на аппарате Клевенджера в течение 4 ч. Выходы ЭМ: 0,26%, 0,32%, и 0,30%. 1 - Тимол (55,56%), тимол метиловый эфир (12,93%), α-терпинеол (8,09%), <i>p</i>-цимен (6,83%). 2 - Тимол (45,20%), <i>p</i>-цимен (6,83%), тимол ацетат (5,74%). 3 - Тимол (37,33%), γ-терпинен (10,66%), <i>p</i>-цимен (12,42%), β-бисаболен (4,42%).</p>	-	21
<p>Экспериментальное поле Центрального института лекарственных и ароматических растений (СИМАР), исследовательского центра Пурара, Уттаракханд. Первичное ЭМ получено перегонкой с водяным паром в малогабаритной полевой дистилляционной установке из нержавеющей стали (СИМ-Asvika) до полного извлечения масла (5 ч). Сырье свежесобранное. Вторичное ЭМ получено реэкстракцией водного дистиллята гексаном. Первичное ЭМ: тимол (34,9%), γ-терпинен (22,7%), <i>p</i>-цимен (8,1%), метиловый эфир тимола (6,5%), терпинен-4-ол (4,9%). Вторичное ЭМ: тимол (90,6%).</p>	<p>Антимикробная активность, диско-диффузионный метод, в концентрации 5 мкл/диск, против <i>S. aureus</i> (MTCC 96), <i>S. epidermidis</i> (MTCC 435), <i>E. faecalis</i> (MTCC 439), <i>S. mutans</i> (MTCC 890), <i>E. aerogenes</i> (MTCC 111), <i>K. pneumoniae</i> (MTCC 109); <i>C. neoformans</i> (штамм АИМС) и <i>C. albicans</i> (MTCC Chandigarh). Первичное ЭМ: ДЗИ = 7 мм - >35 мм. Вторичное ЭМ: ДЗИ = 20 мм - >35 мм.</p>	22
<i>Иордания</i>		
<p>В природе, в Аш-шубакском районе. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера.</p>	<p>Антимикробная активность, метод диффузии в лунки агара, в концентрациях 15, 10 и 5 мкл, в отношении: <i>S. aureus</i> (клин.) ДЗИ = 18, 12, 9 мм, <i>S. aureus</i> ATCE 25923 ДЗИ = 20, 13, 11 мм, <i>E. coli</i> (клин.) ДЗИ = 17, 10, 5 мм, <i>E. coli</i> ATCE 25922 ДЗИ = 15, 9, 5 мм, <i>P. aeruginosa</i> (клин.) ДЗИ = 18, 11, 8 мм, <i>P. aeruginosa</i> ATCE 27853 ДЗИ = 16, 10, 7 мм.</p>	23

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Иран</i>		
<p>Национальный ботанический сад Ирана (провинция Тегеран), сырье собирали: в фазу бутонизации и в фазу цветения. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 1,5 ч на аппарате Клевенджера, выходы ЭМ 0,59%, и 0,90%.</p> <p>1 - γ-Терпинен (21,9%), <i>p</i>-цимен (21,1%), тимол (18,7%), β-кариофиллен (7,1%), гермакрен D (6,0%).</p> <p>2 - γ-Терпинен (22,7%), <i>p</i>-цимен (20,7%), тимол (18,7%), гермакрен D (5,1%).</p>	-	24
<p>В провинции Мазандаран, расположенной на севере Ирана.</p> <p>Экстракцию проводили методом ТФМЭ: 2,0 г листьев тимьяна и 10 мл гексана помещали в стеклянную пробирку объемом 20 мл, которую затем помещали в ванну для обработки ультразвуком с листом полиамидного нановолокна внутри для сбора летучих веществ в течение 30 минут при комнатной температуре (25°C). После экстракции лист полиамидного нановолокна складывали и помещали в стеклянный флакон объемом 5 мл для десорбции, и приливали 1 мл ацетона в течение 10 мин. Раствор концентрировали слабым током азота до 200 мкл.</p> <p>Тимол (48,24%), карвакрола (23,95%), γ-терпинен (3,95%).</p>	-	25
<i>Италия</i>		
<p>Эфирное масло тимьяна ползучего было поставлено компанией «Flora srl» (Lorenzana, Пиза, Италия)</p> <p>Тимол (52,6%), <i>p</i>-цимен (15,3%), β-кариофиллен (6,8%).</p>	<p>Антимикотическую активность ЭМ <i>in vitro</i> оценивали на клинических изолятах <i>Microsporum canis</i>, <i>Microsporum gypseum</i>, <i>Trichophyton mentagrophytes</i>, <i>Trichophyton erinacei</i> и <i>Trichophyton terrestre</i> методом микроразведений в бульоне.</p> <p>ЭМ обладает антимикотической активностью в отношении всех тест-штаммов с диапазоном МИК = 0,025-0,25% и МФК = 0,05-1,00%.</p>	26
<p>Культура тимьяна ползучего выращена в Карнии (регион Фриули-Венеция-Джулия, Италия), до культивирования трава росла в природе.</p>	-	27

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<p>Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ: 1,9%. Карвакрол (35,8%), <i>p</i>-цимен (10,6%), метиловый эфир карвакрола (9,1%), γ-терпинен (8,6%), тимол (6,0%).</p>		
<i>Казахстан</i>		
<p>Северный Казахстан: 1. Акмолинская обл., пушка березового леса. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 1,30%. Карвакрол (55,19%), γ-терпинен (13,52%), тимол (13,21%), <i>p</i>-цимол (11,24%). 2. Акмолинская обл., поляна, центральная часть. Выход ЭМ 1,30%. Карвакрол (38,42%), тимол (28,56%), γ-терпинен (13,92%), <i>p</i>-цимол (12,69%). 3. Акмолинская обл., поляна, окруженная березовым лесом. Выход ЭМ 1,20%. Карвакрол (55,85%), γ-терпинен (15,73%), <i>p</i>-цимол (13,33%), тимол (11,31%). 4. Акмолинская обл., окрестности г. Шу-чинск, склон сопки Каменуца Выход ЭМ 1,25% <i>trans</i>-Гераниол (55,93%), лавандулил ацетат (28,51%), тимол (5,11%). 5. Северо-Казахстанская обл., Государственный национальный природный парк «Кокшетау», поляна. Выход ЭМ 0,70%. Тимол (31,74%), карвакрол (25,68%), γ-терпинен (13,52%), <i>p</i>-цимол (13,34%). 6. Северо-Казахстанская обл., Государственный национальный природный парк «Кокшетау», центральная часть склона в долине. Выход ЭМ 0,97%. Тимол (58,25%), γ-терпинен (14,60%), <i>p</i>-цимол (13,44%), карвакрол (6,21%). 7. Северо-Казахстанская обл., Государственный национальный природный парк «Кокшетау», склон. Выход ЭМ 0,40%. Тимол (44,30%), <i>p</i>-цимол (25,46%), γ-терпинен (15,08%), карвакрол (6,08%). 8. Северо-Казахстанская обл., Государственный национальный природный парк «Кокшетау», центральная часть склона в долине. Выход ЭМ 1,40%. Карвакрол (35,31%), тимол (24,18%), γ-терпинен (16,52%), <i>p</i>-цимол (14,75%).</p>	-	28, 29

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<p>Восточно-Казахстанская обл., в горах Тарбагатайского хребта, Южный Алтай. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 2-2,5 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 0,2%. Тимол (41,8%), γ-терпинен (15,3%), <i>o</i>-цимен (10,9%).</p>	<p>Противоопухолевую активность тимола в отношении клеток колоректального рака (НСТ-15) изучали с использованием МТТ-теста, установлена $IC_{50} = 40$ мкМ.</p>	<p>30</p>
<i>Ливия</i>		
<p>В природе, на открытых участках Гариана и Тархуны. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 1,5 ч на аппарате Клевенджера, после 4 ч замачивания листьев в воде. Выход ЭМ 1,23%. Тимол (62,02%), β-фелландрен (13,50%), <i>cis</i>-сабинен гидроксид (8,09%).</p>	<p>ЭМ обладает фунгицидной активностью против пищевого грибка <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 и ингибирует продукцию им микотоксина - афлатоксина.</p>	<p>31</p>
<i>Марокко</i>		
<p>В регионе Таунат. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 0,9%. <i>p</i>-Цимен (36,16%), γ-терпинен (18,31%), тимол (17,29%), линалол (4,51%).</p>	<p>Антибактериальную активность в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 3366 и <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. Оптимальная смесь, состоящая из 28%, 30% и 42% ЭМ <i>Origanum compactum</i>, <i>Origanum majorana</i> и <i>Thymus serpyllum</i> соответственно, показала выраженный антибактериальный эффект в отношении <i>B. subtilis</i> и <i>S. aureus</i>.</p>	<p>32, 33</p>
<p>Укаймеден на юго-западе Марокко. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 0,88%. Линалил ацетат (52,2%), (<i>E</i>)-неролидол (15,1%), геранилацетат (5,0%).</p>	<p>Противогрибковую активность изучали методом диффузии в агар в отношении <i>Candida albicans</i> ССММ L4, ССММ L5, <i>Candida krusei</i> ССММ L10, <i>Candida glabrata</i> ССММ L7 и <i>Candida parapsilosis</i> ССММ L18. ДЗИ = 12,00-17,33 мм в концентрации 10 мкл на диск. МИК и МФК оценивали методом микроразведения в бульоне, МИК = МФК = 3,52-7,05 мг/мл.</p>	<p>34</p>

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Пакистан</i>		
<p>Университет GC, Лахор, факультет ботаники. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья. Выход ЭМ 0,48%. Тимол (53,3%), карвакрол (10,4%), <i>p</i>-цимен (8,8%), Δ^3-карен (5,1%).</p>	<p>ЭМ обладает бактерицидным действием в отношении <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella typhae</i>, <i>Shigella ferarie</i>, <i>Bacillus magaterium</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Lactobacillus acidophilis</i>, <i>Micrococcus leuteus</i>, <i>Stephylococcus albus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Vibrio cholera</i>.</p>	35
<p>В лесу долины Гилгит. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 2,9%. Карвакрол (44,4%), <i>o</i>-цимен (14,0%), α-терпинеол (6,47%), α-пинен (6,06%), β-кариофиллен (5,25%).</p>	<p>Антибактериальную активность ЭМ оценивали диско-диффузионным методом в отношении патогенных и клинически штаммов: <i>S. aureus</i> NCTC 6571, <i>B. cereus</i> ATCC 11778, <i>B. subtilis</i> NCTC 10400, <i>B. pumilis</i> (дикий тип), <i>P. aeruginosa</i> NCTC 1662, <i>S. poona</i> NCTC 4840, <i>E. coli</i> ATCC 8739 и устойчивый к ампициллину <i>E. coli</i> NCTC 10418. ЭМ обладает антибактериальной активностью в отношении тест-штаммов с ДЗИ = 13,3–25,9 мм. МИК= 80,0–2083,5 мг/мл были определены методом микроразведений. ЭМ обладает антиоксидантной активностью, определяли методом DPPH, IC₅₀=34,8 мг/мл. По данным МТТ-теста, ЭМ ингибирует рост клеток двух видов рака человека (молочной железы MCF-7 и простаты LNCaP) и одного фибробласта (NIH-3T3) на 83-89% в концентрации 0,5 мг/мл. ЭМ проявляет низкую противомаларийную активность.</p>	36

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Польша</i>		
<p>Северо-Западная Польша, Садоводческая экспериментальная станция под Щецином, принадлежащая Поморскому технологическому университету Щецина</p> <p>1. <i>T. serpyllum</i>; 2. <i>T. serpyllum</i> 'Aureus'.</p> <p>Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 2 ч на аппарате Клевенджера. Выходы ЭМ 1,50% и 1,45% соответственно.</p> <p>1 - Карвакрол (37,49%), γ-терпинен (10,79%), β-кариофиллен (6,51%), <i>p</i>-цимен (6,06%), (<i>E</i>)-β-оцимен (4,63%), β-бисаболен (4,51%), карвакрол метиловый эфир (4,40%).</p> <p>2 - Карвакрол (44,93%), γ-терпинен (10,08%), <i>p</i>-цимен (7,39%), β-кариофиллен (6,77%), 3-октанон (6,19%).</p>	<p>Антимикробная активность изучена методом микроразведений в отношении девяти эталонных штаммов: <i>S. aureus</i> (FRI 913), <i>S. epidermidis</i> (ATCC49461), <i>S. agalactiae</i> (ATCC 12386), <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212), <i>B. cereus</i> (ATCC 14579), <i>M. luteus</i> (ATCC 10240), <i>E. coli</i> (MG1655), <i>P. vulgaris</i> (ATCC 6380) и <i>C. albicans</i> (ATCC 10231).</p> <p>ЭМ <i>T. serpyllum</i> обладает антимикробным действием с МИК = 0,025-0,78 мкл/мл и МБК = 0,1-1,56 мкл/мл, МФК = 0,1 мкл/мл.</p> <p>ЭМ <i>T. serpyllum</i> 'Aureus' обладает антимикробным действием с МИК = 0,025-0,39 мкл/мл и МБК = 0,1-1,56 мкл/мл, МФК = 0,1 мкл/мл.</p>	37
<p>Тимьян ползучий из 16 польских популяций, интродуцированных в условиях <i>ex situ</i>. Гидродистилляция в течение 3 ч на аппарате Деринга. Выход ЭМ от 0,23 до 0,97 г/100 г.</p> <p>Линалоол (0,44-56,58%), цитронеллол (0,02-23,87%), геранил ацетат (0,36-22,90%), β-терпинеол (5,60-21,90%), борнеол (0,00-21,54%), нерал (0,03-16,55%), β-мирцен (0,96-16,19%), борнил ацетат (0,00-12,67%), кариофиллен оксид (0,18-10,67%), <i>p</i>-цимен (0,08-10,57%), тимол (0,01-8,43%), камфора (0,12-7,37%).</p>	-	38
<p>Растение выращивали на экспериментальных участках Садоводческой опытной станции в Долуе близ Щецина. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 2, 3 и 4 часов на аппарате Деринга. Выход ЭМ 0,45%, 0,53% и 0,55%.</p> <p>Карвакрол (30,90-46,16%), <i>p</i>-цимен (4,51-13,46%), β-кариофиллен (7,68-10,75%), γ-терпинен (5,73-9,09%), карвакрол метиловый эфир (4,93-8,63%), (-)-β-бисаболен (3,70-5,68%).</p>	-	39

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Россия</i>		
Трава тимьяна ползучего собрана на территории Самарской области. Тимол (54,35%), гермакрен D (4,47%), бициклогермакрен (3,91%).	-	40
<p>В Алтайском крае и Республике Алтай. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 1,5 ч. Выходы ЭМ 0,9%, 0,8%, 0,6%, 0,8%, 0,7%, 1,0%, 1,0% и 0,5% соответственно.</p> <p>1. Окрестности р/п Колывань, Курьинский район; <i>транс</i>-Неролидол (29,8%), 1,8-цинеол (14,0%), <i>цис</i>-β-терпинеол (8,2%).</p> <p>2. Окрестности п. Чинита, Чарышский район; <i>транс</i>-Неролидол (13,8%), <i>цис</i>-β-терпинеол (7,2%), <i>n</i>-цимол (5,6%), камфора (5,4%), 1,8-цинеол (5,3%), камфен (5,2%), β-мирцен (5,1%).</p> <p>3. Окрестности п. Тулата, Чарышский район; <i>цис</i>-β-Терпинеол (15,3%), β-мирцен (10,3%), <i>транс</i>-неролидол (8,5%).</p> <p>4. Окрестности п. Каргон, Усть-Канский район; <i>n</i>-Цимол (15,0%), линалоол (8,2%), борнеол (7,8%), γ-терпинен (7,7%), <i>транс</i>-неролидол (5,5%), тимол (5,3%), камфен (5,1%).</p> <p>5. Кырлыкский перевал; <i>n</i>-Цимол (25,2%), γ-терпинен (8,9%), тимол (8,8%), карвакрол (7,8%).</p> <p>6. Окрестности п. Юстик, Усть-Коксинский район; Карвакрол (27,6%), терпинен (8,2%), <i>n</i>-цимол (7,9%), 1,8-цинеол (7,5%), γ-борнеол (7,5%), тимол (6,8%).</p> <p>7. Окрестности п. Мендур-Соккон, Усть-Канский район; Карвакрол (29,6%), γ-терпинен (17,2%), <i>n</i>-цимол (14,5%), 1,8-цинеол (5,6%).</p> <p>8. Окрестности д. Топольная, Солонешенский район; <i>цис</i>-β-Терпинеол (20,2%), <i>транс</i>-неролидол (11,3%), β-мирцен (7,8%), гермакрадиенол (6,2%), борнеол (5,8%), терпинеол-4 (4,4%), <i>n</i>-цимол (4,1%).</p>	-	41

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Румыния</i>		
<p>Сад лекарственных растений Университета медицины и фармации в Тыргу-Муреше. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера. Карвакрол (25,8%), <i>p</i>-цимен (25,0%), карвакрол метиловый эфир (11,1%), терпинил ацетат (10,1%), 1,8-цинеол (9,5%).</p>	<p>Антимикробную активность ЭМ изучали в отношении <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCAIM В.01053 и <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544^T, <i>Listeria innocua</i> T1 и <i>Streptococcus pyogenes</i> NCAIM В.1998, <i>Candida albicans</i> HA 201 (клинический) и <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BF (пекарские дрожжи). ЭМ обладает выраженной антимикробной активностью против всех тестируемых микроорганизмов.</p>	42
<p>Тимьян ползучий вырастили недалеко от Тимишоары. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья на аппарате Клевенджера. γ-Терпинен (23,85%), карвакрол (22,2%), <i>p</i>-цимен (16,16%), тимол (6,31%), <i>trans</i>-кариофиллен (4,48%).</p>	<p>Противогрибковая активность в отношении <i>Verticillium dahliae</i> и <i>Penicillium aurantiogriseum</i>. Эфирное масло ингибирует рост <i>V. dahlia</i> в концентрации 0,25 мг/л, и рост <i>P. aurantiogriseum</i> - в концентрации 0,5 мг/л.</p>	43
<p>Тимьян ползучий собирали в природе в трех разных регионах Трансильвании: Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 4 ч на аппарате Клевенджера. Выходы ЭМ: 0,38%, 0,41%, 0,50% и 0,56% соответственно. 1. Район Мочу. Карвакрол (31,32%), метилкарвакрол (13,35%), <i>p</i>-цимен (10,66%), γ-терпинен (7,55%), β-бисаболен (5,18%), тимол (4,84%), кариофиллен (4,83%). 2. Район Тамашести. Карвакрол (47,62%), метилкарвакрол (8,81%), <i>p</i>-цимен (8,61%). 3. Район Насауд. Карвакрол (26,58%), <i>p</i>-цимен (18,97%), тимол (11,07%), метилкарвакрол (9,17%). 4. Район Насауд, после обработки ферментами. Карвакрол (28,81%), тимол (24,01%), метилкарвакрол (8,21%), β-бисаболен (5,62%).</p>	<p>Антибактериальную активность изучали методом диффузии в агар в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536, <i>Klebsiella pneumoniae</i> (клинический штамм), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Candida albicans</i>. Антиоксидантная активность исследована методом DPPH. Все образцы ЭМ проявляют выраженную антиоксидантную и антимикробную активность.</p>	44

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Сербия</i>		
<p>Центральная Сербия, на горе Пасьяча, недалеко от села Житорадье. Для гидродистилляции эфирного масла использовали полупромышленный перегонный аппарат СП-130. Продолжительность процесса гидродистилляции 5 ч. <i>trans</i>-Неролидол (24,2%), гермакрен D (16,0%), тимол (7,26%).</p>	<p>ЭМ показало значительно лучшую способность нейтрализовать свободные радикалы DPPH (IC₅₀ = 0,503 мкл/мл) по сравнению с синтетическими антиоксидантами ВНА и ВНТ.</p>	45
<p>Трава получена из Института исследований лекарственных растений «Josif Pančić», Белград, Сербия. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 4 ч на аппарате Клевенджера. Выход ЭМ 0,48%. <i>p</i>-Цимен (34,84%), тимол (34,48%), карвакрол (5,56%), γ-терпинен (4,38%).</p>	<p>ЭМ, а также карвакрол и тимол, обладают антибактериальной активностью в отношении <i>Salmonella</i> Enteritidis и препятствуют образованию биопленок, а также могут уничтожить уже сформированные биопленки <i>Salmonella</i> Enteritidis.</p>	46
<p>Трава тимьяна ползучего получена с Органической фермы «Фараго», Ором, Сербия. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 2 ч на аппарате Клевенджера. Тимол (37,10%), γ-терпинен (8,70%), <i>p</i>-цимен (8,10%), тимол метиловый эфир (5,75%), β-бисаболен (4,64%), борнеол (4,13%).</p>	<p>Для изучения антимикробной активности в отношении эталонного штамма <i>Helicobacter pylori</i> ATCC26695 (ATCC 700392) и <i>H. pylori</i> SS1, устойчивого к метронидазолу, был использован новый колориметрический метод микроразведений в бульоне, разработанный авторами статьи. ЭМ обладает антимикробной активностью в отношении тест-штаммов с МИК = 2,0-4,0 мкл/мл (мг/мл).</p>	47
<i>Словакия</i>		
<p>ЭМ было приобретено в Nanus, s.r.o. (Нитра, Словакия) Гидродистилляция воздушно-сухого сырья. Тимол (18,8%), карвакрол (17,4%), <i>o</i>-цимен (15,4%), гераниол (10,7%), γ-терпинен (8,1%), линалоол (5,3%).</p>	<p>Антимикробная активность в отношении коллекционных штаммов <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2772, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1959, <i>Yersinia enterocolitica</i> CCM 5671, <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> CCM 2461, <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224, <i>Salmonella enteritidis subsp.</i></p>	48

Продолжение таблицы 2

1	2	3
	<p><i>enteritidis</i> CCM 4420, <i>Candida krusei</i> CCM 8271, <i>Candida albicans</i> CCM 8186, <i>Candida tropicalis</i> CCM 8223, <i>Candida glabrata</i> CCM 8270 и биопленкообразующих бактерий <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. ЭМ обладает выраженной антимикробной активностью, а также антибиопленочными эффектами.</p>	
<p>Эфирное масло произведено в Словакии в Ганусе, Нитра. Применялась классическая методология крупносерийного производства эфирных масел. ЭМ получали на перегонных аппаратах двух типов, специально предназначенных для ароматических и лекарственных растений: аппарат типа HV-3000 для сухого сырья и аппарат типа HV-300 для свежего растительного сырья. Тимол (31,29%), α-терпинен (14,58%), карвакрол (5,11%).</p>	<p><i>Pseudomonas agglomerans</i>, <i>P. antarctica</i>, <i>P. brassicacearum</i>, <i>P. frederiksbergensis</i>, <i>P. koreensis</i>, <i>P. lundensis</i>, <i>P. mandelii</i>, <i>P. proteolytica</i>, <i>P. synxantha</i>, <i>P. veronii</i> были выделены из свежесобранной пресноводной рыбы. Антимикробную активность ЭМ изучали диско-диффузионным методом ДЗИ = 3,00-7,33 мм в концентрации 15 мкл. МИК определяли методом микроразведений в бульоне, МИК = 12,50-50,00 мкл/мл. ЭМ показало высокую антиоксидантную активность 74,28 мкг ТЕАС/мл.</p>	49
<i>Турция</i>		
<p>Популяция флоры Турции. 1. Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 5 ч на аппарате Клевенджера. Карвакрол (46,53%), 2,4,6-триметил анизол (24,95%), <i>p</i>-цимен (5,41%). 2. Экстракцией сырья сверхкритическим диоксидом углерода. 2,4,6-Триметил анизол (73,4%), мезитиленовая кислота (5,38%).</p>	<p>При анализе способности нейтрализовать свободные радикалы DPPH, эфирные масла, полученные путем экстракции сырья сверхкритическим диоксидом углерода и гидродистилляцией, показали сравнительно равноценную антиоксидантную активность.</p>	50

Продолжение таблицы 2

1	2	3
<i>Украина</i>		
<p>Сырье собранно в естественных и искусственных биогеоценозах на территории Запорожской области.</p> <p>Гидродистилляция воздушно-сухого сырья.</p> <p>Тимол (29,73%), <i>p</i>-цимен (22,88%), γ-терпинен (17,41%), α-терпинил ацетат (10,65%), сабинил ацетат (10,21%).</p>	<p>ЭМ обладает высоким акарицидным эффектом в отношении иксодовых клещей <i>Ixodes ricinus</i> и <i>Dermacentor marginatus</i>, и может быть использовано для борьбы с численностью иксодовых клещей в районах, где есть условия для заражения клещевыми инфекциями.</p>	51
<i>Чехия</i>		
<p>Экспериментальное поле Чешского университета наук о жизни в Праге.</p> <p>Гидродистилляция воздушно-сухого сырья в течение 3 ч на аппарате Клевенджера.</p> <p>Карвакрол (36,5%), <i>p</i>-цимен (22,1%), β-бисаболен (12,5%), карвакрол метиловый эфир (10,9%) β-кариофиллен (10,9%).</p>	<p>Антимикробная активность в отношении 3 коллекционных штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> MSSA ATCC 25923, ATCC 25913, MRSA ATCC 43300 и шести клинических изолятов.</p> <p>Эфирное масло обладает антимикробной активностью в отношении все испытываемых тест-штаммов с МИК 33,0-530,0 мкл/л.</p>	52
<i>Эстония</i>		
<p>Из 33 различных популяций флоры Эстонии.</p> <p>Получено 46 образцов эфирного масла гидродистилляцией воздушно-сухого сырья в течение 2 ч на аппарате Клевенджера с выходами 0,6-4,4 мл/кг.</p> <p>(<i>E</i>)-Неролидол (1,7-70,1%), геранил ацетат (0-46,4%), кариофиллен оксид (1,4-45,0%), линалил ацетат (0-31,0%), линалоол (0,4-22,8%), мирцен (0-20,2%), борнеол (0-19,0), камфора (0,2-14,2%), (<i>E</i>)-<i>b</i>-кариофиллен (0-13,3%), гермакрен D (0-12,4%), камфен (0-10,8%), α-терпинеол (0,2-9,7%).</p>	-	53, 54
<p>ДЗИ - диаметр зоны ингибирования, мм; IC₅₀ минимальную ингибирующую (МИК) и минимальную фунгицидную (МФК) концентрации бактерицидные/фунгицидные (МБК/МФК) концентрации</p>		

Данные представленные в таблице 2 [17-54], а так же анализ литературы [55-75], показывают, что химический состав и выход эфирного масла тимьяна ползучего существенно отличаются в зависимости от места произрастания. Содержание эфирного масла в тимьяне диком колеблется от 0,07 до 2,9%, что не всегда соответствует требованиям Европейской фармакопеи и других нормативных документов не менее 3 мл/кг ($\approx 0,3\%$) [10-12, 14].

Химический состав эфирного масла тимьяна ползучего весьма разнообразен. Тимол и карвокрол, являются основными компонентами эфирного масла из тимьяна ползучего, произрастающего в природе Боснии и Герцеговины [19], на севере Ирана [25], в 7 из 8 популяций Северного Казахстана [28, 29], Румынии [43], Словакии [48, 49], также выращенного в Университете GC, Лахор, Пакистан [35]. Что отвечает требованиям Европейской фармакопеи и других нормативных документов [10-12, 14].

Значительное количество тимола содержит эфирное масло тимьяна ползучего из высокогорных районов Индии (19,4-90,6%) [21, 22], также Египта (62,02%) [28, 29], Италии (52,6%) [26], Восточного Казахстана (41,8%) [30], Ливии (62,0%) [31], Самарской области Россия (54,35%) [40] и Украины (29,73%) [51]. Карвокрол - доминирующий компонент для эфирного масла тимьяна дикого из леса долины Гилгит Пакистана (44,4%) [36], Турции (46,53%) [50], также выращенного на экспериментальных участках садоводческой опытной станции под Щецином Польши (30,9-46,16%) [37, 39], в саду лекарственных растений Университета медицины и фармации в Тыргу-Муреше Румынии (25,8%) [42], на экспериментальном поле Чешского университета наук о жизни в Праге Чехия (36,5%) [52].

Тимол и карвакрол отсутствуют в эфирных маслах хемотипов тимьяна ползучего, произрастающих в Беларуси [18], Венгрии [20], Литве (*Thymus serpyllum* ssp. *serpyllum*, *T. serpyllum* var. *rigidus*, *T. serpyllum* var. *ericoides*, *T. serpyllum* var. *lineatus*) [64], на юго-западе Марокко [34], в 4 из 8 популяций Алтайского края и Республики Алтай [41], Брянской области России [62], на юго-западе Сербии [58], в Эстонии [53, 54].

В эфирных маслах тимьяна ползучего из Беларуси основным компонентом является (-)-борнеол до 33,39% [18], Венгрии - 1,8-цинеол (53,9%), геранил изобутират (44,0%) [20], с юго-запада Марокко - линалил ацетат (52,2%) [34], в 4 из 8 популяций Алтайского края и Республики Алтай - *транс*-неролидол (13,8%, 29,8%), *цис*- β -терпинеол (15,3%, 20,2%) [41], с Брянской области России - α -терпинеол (3381,06 мг/кг) [62], с юго-запада Сербии - α -терпинил ацетат (66,2%), мирцен (74,2%) [58]. В 21 образце ЭМ тимьяна дикого из 14 популяций флоры Литвы - гермакрен В (10,4%, 23,6%, 25,4%), β -кариофиллен (7,2% 15,2%, 16,4%, 23,3% 27,2%), (*Z*)- β -оцимен (14,7%, 20,0%), (*E*)- β -оцимен (34,8%), *cis*-дигидрокарвон (14,9%, 17,2%), α -кадинол (28,6%), 1,8-цинеол (13,9%, 16,3%, 18,6%, 19,0%, 29,5%, 30,3%), β -бисаболен (18,1%), кариофиллен оксид (18,9%, 27,2%), мирцен (15,4%, 15,9%), *cis-p*-мент-2-ен-1-ол (24,1%) [64]. В 46 образцах ЭМ тимьяна ползучего из 33 различных популяций флоры Эстонии - (*E*)-неролидол (1,7-70,1%), геранил ацетат (0-46,4%), кариофиллен оксид (1,4-

45,0%), линалил ацетат (0-31,0%), линалоол (0,4-22,8%), мирцен (0-20,2%) [53, 54].

Итак, в мировой практике экспериментально установлено, что для компонентного состава эфирного масла тимьяна ползучего, в зависимости от места и условий произрастания, характерен химический полиморфизм, выделяют более 10 хемотипов в соответствии с преобладающими компонентами: карвакрол + тимол, тимол, карвакрол, неролидол, терпинеол, гермакрен, гераниол, терпинен, линалоол, цимен, борнеол, 1,8-цинеол и другие.

В основном эфирное масло тимьяна ползучего получают гидродистилляцией воздушно-сухого сырья на аппарате Клевенджера в течение 3 часов, тем не менее, по литературным данным продолжительность перегонки может составлять и 1,5 часа, 2 часа, 4 часа, 5 часов. Также для гидродистилляции эфирного масла используют полупромышленный перегонный аппарат СП-130, продолжительность процесса 5 часов. Эфирное масло получают из свежесобранного сырья перегонкой с водяным паром в малогабаритной полевой дистилляционной установке из нержавеющей стали (СІМ-Asvika) до полного извлечения масла (5 часов). Применяется классическая методология крупносерийного производства эфирных масел - ЭМ получают на перегонных аппаратах двух типов, специально предназначенных для ароматических и лекарственных растений: аппарат типа HV-3000 для сухого сырья и аппарат типа HV-300 для свежего растительного сырья. В том числе, эфирное масло получали экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода, также фракцию липофильных веществ тимьяна ползучего извлекали экстракцией растительного сырья диэтиловым эфиром с использованием ультразвука.

Несмотря на то, что эфирное масло тимьяна ползучего не всегда соответствует требованиям Европейской фармакопеи и других нормативных документов, оно привлекает пристальное внимание ученых всего мира, благодаря своим фармакологическим свойствам: антиоксидантной, противомикробной, противоопухолевой и другими видами активности. Рассматриваются возможности использования эфирного масла тимьяна дикого в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности.

1.2 Способы и технология получения биологически активных веществ из тимьяна ползучего

В последние годы возрастает интерес к изучению лечебных свойств и химического состава экстрактов тимьяна дикого, поскольку растение богато не только эфирным маслом, но и биологически активными полифенольными соединениями с практически ценными свойствами [3, 16, 17, 20, 23, 28, 76-107].

Несмотря на то, что тимьян ползучий является хорошо известным лекарственным растением, проводятся исследования полифенольных соединений, в зависимости от места произрастания, также по выбору оптимального метода и параметров экстракции, повышающих эффективность извлечения полифенолов, изучаются состав и биологические свойства экстрактов [3, 16, 17, 20, 23, 28, 76-107]. Для извлечения полифенолов

рассматривается использование различных методов экстракции: мацерация, перколяция, на аппарате Сокслета, при температуре кипения растворителя, ультразвуковая и микроволновая экстракции. Наиболее часто используемые растворители для экстракции полифенолов из растительного сырья это этанол, метанол, вода, а также смеси этанол:вода и метанол:вода в различных соотношениях. Для изучения качественного состава и определения количественного содержания фенольных соединений, в основном, используют фармакопейные методы: УФ-спектрофотометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/МАСС. В литературных источниках представлена информация об антиоксидантном, противомикробном, спазмолитическом, ферментативном, противоопухолевом и цитотоксическом потенциале экстрактов тимьяна ползучего.

Например, исследован состав полифенолов тимьяна ползучего, выращенного в саду лекарственных растений Университета медицины и фармации в Тыргу-Муреше, Румыния. Сумму фенольных соединений получали микроэкстракцией, к 200 мг сырья, измельченного в порошок, приливали 1,5 мл смеси растворителей метанол:вода 3:2 (об./об.) и обработали ультразвуком. Полученный жидкий экстракт анализировали методом ВЭЖХ-МС, в это состав входят катехин (2,18 мкг/г), эпикатехин нг/г (не обнаружен), рутин (3,84 мкг/г), эриодиктиол (31,13 мкг/г), апигенин-7-глюкозид (3,90 мкг/г), нарингенин (13,48 мкг/г), кверцетин (6,58 мкг/г), гесперетин нг/г (не обнаружен), апигенин (124,44 мкг/г). Розмариновая кислота (1372,76 мкг/г), кофейная кислота (109,59 мкг/г), хлорогеновая кислота (13,03 мкг/г), *p*-кумаровая кислота (1,60 мкг/г), феруловая кислота (3,64 мкг/г) [17].

Образцы тимьяна ползучего, собранные в популяции флоры Венгрии Баконь-Хиллз (Феньёфё), высушенные на воздухе, измельчали в порошок, а растительный порошок взвешивали в количестве 200 мг в пробирках Эппендорф перед анализом полифенолов ВЭЖХ-МС. Экстракцию обеспечивали ультразвуковой обработкой после добавления 1,5 мл смеси растворителей метанол:вода = 3:2 (об./об.). По результатам анализа ВЭЖХ-МС определены: катехин (0,06 мкг/г), эпикатехин (132,26 нг/г), дигидрокверцетин (2,70 мкг/г), рутин (6,70 мкг/г), апигенин-7-глюкозид (не обнаружен), эриодиктиол (0,48 мкг/г), кверцетин (1,29 мкг/г), нарингенин (3,08 мкг/г), гесперетин (92,2 нг/г), апигенин (30,42 мкг/г). Розмариновая кислота (1121,31 мкг/г), кофейная кислота (61,08 мкг/г), хлорогеновая кислота (26,98 мкг/г), *p*-кумаровая кислота (0,94 мкг/г), феруловая кислота (2,10 мкг/г) [20].

Исследована антимикробная активность тимьяна ползучего, произрастающего в природе Иордании в Аш-шубакском районе, для этого 100 г высушенного порошкообразного материала исчерпывающе экстрагировали в аппарате Сокслета хлороформом. Антимикробную активность экстракта изучали методом диффузии в лунки агара, в концентрациях 300, 200 и 100 мкг/мл, в отношении коллекционных и клинических штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Получены следующие результаты: диаметры зон ингибирования (ДЗИ) *S. aureus* (клинический) равны

9, 7, 5 мм, *S. aureus* (ATCE 25923) ДЗИ = 12, 9, 5 мм, *E. coli* (клинический) ДЗИ = 11, 8, 4 мм, *E. coli* (ATCE 25922) ДЗИ = 5, 4, 3 мм, *P. aeruginosa* (клинический) ДЗИ = 10, 7, 6 мм, *P. aeruginosa* (ATCE 27853) ДЗИ = 8, 6, 5 мм [23].

Суммарное содержание флавоноидов в этанольном экстракте тимьяна дикого, собранного в горах Тарбагатайского хребта, Южный Алтай Восточно-Казахстанской области, определяли спектрофотометрически, которое составило 1,51%, в пересчете на массу воздушно-сухого сырья. По данным ВЭЖХ-ДАД установлено наличие апигенин-7-глюкозида (0,24%), лютеолина (0,039%), кверцетина (0,006%). Противоопухолевую активность апигенин-7-глюкозида, лютеолина и кверцетина в отношении клеток колоректального рака (НСТ-15) изучали с использованием МТТ-теста. Цитотоксический эффект исследуемых веществ снижается в ряду: лютеолин ($IC_{50} = 50$ мкМ) > кверцетин ($IC_{50} = 100$ мкМ) > апигенин-7-глюкозид (IC_{50} не установлена) [28].

Трава тимьяна ползучего была приобретена в Институте исследований лекарственных растений «Доктор Джозиф Панчич», Белград, Сербия. Для оптимизации процесса экстракции были изучены продолжительность (3, 7 и 10 мин), соотношение сырье:экстрагент (1:10, 1:20 и 1:30) и размер частиц растительного сырья (0,3, 0,7 и 1,5 мм), экстрагент - 30%-ный этанол, при частоте ультразвукового излучения 20 кГц, при комнатной температуре. Определены оптимальные параметры получения жидкого экстракта тимьяна ползучего: ультразвуковая экстракция растительного сырья 30%-ным этанолом в течение 3 мин, в соотношении сырье:экстрагент 1:30, степень измельчения сырья 0,3 мм. Данные условия обеспечивают наибольшее содержание полифенолов в жидком экстракте до 23,03 мг/л, в пересчете на галловую кислоту, и сравнительно высокую антиоксидантную активность по данным DPPH метода $IC_{50}=3,00$ мг/мл, по данным ABTS метода 10,32 ммоль/мг Trolox [76].

В продолжение исследования, было изучено влияние на выход полифенолов из травы тимьяна ползучего различных методов экстракции (мацерация, ультразвуковая, при нагревании до 80°C). Исследовано влияние: размера частиц (0,3, 0,7 и 1,5 мм), соотношения сырье:экстрагент (1:10, 1:20 и 1:30), экстрагента (30%, 50%, 70%, 96% этанол и вода) и продолжительности экстрагирования (5, 15, 30, 60 и 90 мин). Эффективность экстракции оценивали по общему содержанию полифенолов и общему содержанию флавоноидов. Экспериментально установлено, что сравнительно высокий выход суммы полифенолов (32,7 мг ГАЕ/л) и суммы флавоноидов (16,7 мг СЕ/л) обеспечивает экстракция растительного сырья 50% этанолом с использованием ультразвука при 20 кГц, в сочетании с размером частиц 0,3 мм, соотношением массы сырья и объемом экстрагента 1:30. Продолжительность экстракции не показало статистически значимого влияния на выход полифенолов и флавоноидов во всех экспериментах. По общему выходу полифенолов эффективность методов экстракции для всех переменных ранжировала по значимости в следующем порядке: ультразвуковая > при нагревании > мацерация, тогда как суммарный выход флавоноидов был самым высоким при экстракции с использованием ультразвука, хотя не установлено статистически значимой разницы между

результатами экстракции при нагревании и мацерацией. По данным ВЭЖХ-МС в экстрактах установлено наличие фенольных кислот: хлорогеновая кислота (следовые количества), кофейная кислота (0,04-0,20 мкг/мл), К-изомер сальвианоловой кислоты (0,49-0,97 мкг/мл), розмариновая кислота 1,69-4,18 мкг/мл), сальвианоловая кислота I (0-1,21 мкг/мл) и флавоноидов: 6,8-ди-С-глюкозилапигенин (0,06-0,17 мкг/мл), 6-гидрокси-лютеолин-7-О-глюкозид (0,21-0,78 мкг/мл), лютеолин-7-О-глюкуро-нид (0,88-2,04 мкг/мл) и апигенин-глюкуронид (0,13-0,42 мкг/мл) [77].

В работе Брезойу [78] описано получение спиртовых и водно-спиртовых экстрактов из дикого тимьяна, собранного в природе горного района Трансильвании (Румыния). Спиртовый и водно-спиртовый (этанол:вода = 4:1 об./об.) экстракты из растения получали трехкратной экстракцией при кипячении в течение 1 часа. Также были получены спиртовый и водно-спиртовый экстракты с помощью микроволн (MW). Полученные экстракты были включены в мезопоры наноматериалов кремнезема и титана, изучено влияние на их способность поглощать радикалы и противомикробный потенциал. Антимикробную активность полифенольных экстрактов оценивали методом диффузии в агар в отношении девяти эталонных штаммов бактерий и двух штаммов грибов, приобретенных у компании Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США): *Salmonella enterica* serotype typhimurium ATCC 14028, *Shigella flexneri* serotip 2b ATCC 12022, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacteroides fragillis* ATCC 25285, *Candida albicans* ATCC 10231 и *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Полученные экстракты и экстракты, включенные в мезопористую матрицу, проявляли выраженное антирадикальное действие и хорошую бактерицидную активность в отношении нескольких эталонных штаммов. Химический профиль полифенольных экстрактов определяли анализом ВЭЖХ-ФДА. Основным соединением, обнаруженным в экстрактах дикого тимьяна, была розмариновая кислота. Остальные четыре полифенольных соединения - протокатеховая кислота, кафтариновая кислота, хлорогеновая кислота и цеиновая кислота, были идентифицированы и количественно определены во всех приготовленных экстрактах.

В Вроцлавском медицинском университете (Польша) проведена водная экстракция тимьяна ползучего, приобретенного в польской фармацевтической компании «Kawon», сертифицированной по GMP и ISO 9002. Для получения сухого водного экстракта из тимьяна ползучего, порошкообразный растительный материал (5 г) заливали дистиллированной водой доведенной до кипения (350 мл) и перемешивали. Через 30 минут водный экстракт фильтровали через фильтры (Whatman № 1, Великобритания). Фильтрат (200 мл) подкисляли 1 мл муравьиной кислоты и наносили на октадецильную колонку (2×7 см, Bakerbond Octadecyl 40 µm Prep LC Packing, JT Baker, USA), который затем 100 мл промывали метанола (метод SPE). Элюат упаривали при 40 °С (система Бюхи,

Швейцария) досуха, получая сухой водный экстракт тимьяна ползучего. Изучена цитотоксическая активность сухого водного экстракта тимьяна ползучего, в отношении двух линий клеток рака молочной железы человека [79].

На кафедре биологии факультета естественных наук и искусств Университета Челал-Баяр (Маниса, Турция) получены предварительные результаты о влиянии густого метанольного экстракта тимьяна ползучего, приобретенного в фармацевтической компании ООО «Naturin» (Измир, Турция), на здоровые клетки и клетки рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231). При этом отмечены перспективы разработки на основе густого метанольного экстракта тимьяна ползучего новых терапевтических препаратов для лечения рака молочной железы [80].

В фармацевтической промышленности трава тимьяна ползучего используется при производстве галеновых препаратов (настоек, жидких экстрактов), которые является источником лекарственных средств, используемых при лечении заболеваний верхних дыхательных путей в качестве отхаркивающего средства.

Чабреца экстракт жидкий зарегистрирован как отхаркивающее средство растительного происхождения (ЛСР-002826/07 от 30.10.2017; ФСП 42–2627–08 «Чабреца экстракт жидкий субстанция») [108]. Средство растительного происхождения, которое оказывает отхаркивающее, противомикробное и анальгезирующее действие. Показания к применению инфекционно-воспалительные заболевания дыхательных путей и легких: бронхит, трахеит, пневмония; воспалительные заболевания полости рта и глотки: фарингит, тонзиллит, стоматит, гингивит.

В фармацевтической промышленности для получения жидкого экстракта тимьяна ползучего используют классический метод реперколяции. Применяется технология получения отхаркивающего средства, экстракта чабреца жидкого, которая заключается в экстракции растительного сырья - травы чабреца 30% спиртом этиловым в соотношении 1:1. В экстрагент добавляют глицерин в количестве 10% от массы сырья. Используют реперколяцию в модификации ВНИИФ. Процесс проводят в батарее из трех диффузоров. Измельченное сырье укладывают поровну в 3 перколятора, экстрагент делят на три равные части. Первую порцию сырья экстрагируют чистым экстрагентом (смесь глицерина и 30% этилового спирта), а каждую последующую (вторую, третью) экстрагируют вытяжкой, полученной при экстрагировании предыдущей порции сырья. Готовые порции вытяжки получают из третьего диффузора. Все три порции готовой вытяжки смешивают, отстаивают при температуре не выше 10°C не менее двух суток. Процесс экстрагирования занимает 30 часов, отстаивания и фильтрация занимают еще 2,5 суток. Продолжительность технологического процесса получения одной серии экстракта чабреца жидкого занимает 90 часов или 3,75 суток. Получают прозрачную, бурую жидкость, с содержанием спирта не менее 22%, плотность не более 1.01, экстракционных веществ 8% [109].

Ввиду недостатков технологии, применяемой на производстве, исследователи занимаются совершенствованием технологии получения жидкого

экстракта чабреца. Так, Назаровым Б.В. предложено увеличить концентрацию спирта этилового от 30% до 70% с добавлением глицерина и проводить экстракцию сырья чабреца быстротекущей реперколяцией, что способствует более полному извлечению биологически активных веществ и сокращению экстракционного процесса более чем в два раза [110].

В Пятигорском фармацевтическом институте была разработана технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на теории производства жидких экстрактов с максимальным истощением лекарственного растительного сырья за счет увеличения соотношения сырья и экстрагента. Разработанная технология основана на увеличении количества перколяторов до 7 и изменении соотношения сырье: экстрагент (1:1,93), что позволяет наиболее полно экстрагировать сырье чабреца [111].

Зыковой Н.А. и Муравьевым И.А. на той же базе была разработана новая ресурсосберегающая технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на увеличении соотношения сырья и экстрагента 1:1,66 и использования батареи из 6 диффузоров, что позволило им увеличить эффективность экстракции до 80%. При этом снижается расход растительного сырья со 100 кг до 60 кг на каждые 100 л жидкого экстракта при сохранении установленных норм качества. Ими же была предложена технология получения полифракционного экстракта чабреца. В качестве экстрагентов были предложены 96% спирт этиловый и вода дистиллированная. При этом первый экстрагент достаточно полно извлекал эфирное масло и сумму тритерпеновых соединений, а второй – сумму фенольных соединений. При изучении оптимальных условий экстракции установили преимущество дробного использования экстрагента при производстве полифракционного экстракта в четыре ступени [112, 113].

Алаева-Зыкова Н.А. и Пшуков Ю.Г. разработали ресурсосберегающую технологию получения жидкого экстракта, основанную на использовании при экстрагировании батареи из 6 диффузоров пятью ступенями при соотношении фаз 1:1,992. Проведенная ими сравнительная оценка качества жидких экстрактов полученными разработанным и промышленным способами показало их равноценность [114].

Старчак Ю.А. проведен ряд экспериментальных исследований для определения оптимальных параметров технологического процесса для получения жидкого экстракта чабреца, используя вакуум-фильтрационный способа экстрагирования, обеспечивающий истощение сырья по флавоноидам до 87% [62].

Однако, вышеперечисленные совершенствования технологии получения чабреца экстракта жидкого не нашли применения в фармацевтическом производстве.

Жидкий экстракт трава тимьяна ползучего является действующей основой препарата «Пертуссин», знакомого всем с детства, производится в виде сиропа и применяется в качестве отхаркивающего средства в комплексной терапии острых респираторных заболеваний, трахеитов, бронхитов, а также при коклюше

у детей. Сироп «Пертуссин» изготавливается фармацевтическими предприятиями в России, Республике Молдова, на Украине [115, 116].

В Казахстане «Пертуссин» производится АО «Химфарм» (г. Шымкент) по лицензии российской фармацевтической компании «Akrikhin-Pharma», входящей в состав группы «Polpharma».

Жидкий экстракт травы тимьяна ползучего входит в состав комплексных препаратов «Мелрозум», «Коделак® бронхо с чабрецом», «Стоптуссин-Фито». «Чабреца экстракт жидкий» зарегистрирован как отхаркивающее средство растительного происхождения.

Из стандартизированного экстракта готовят препарат «Пертуссин» смешением компонентов в заводских условиях. В процессе описанной технологии остаётся шрот травы тимьяна ползучего, который считается отходом производства. Группой авторов [117] разработана технология получения из шрота травы чабреца суммарного экстракта сапонинов, который обладает пятью фармакологическими действиями, на основе данного экстракта производился препарат «Терисерп». «Терисерп» таблетки 0.25 г, гиполипидемическое средство растительного происхождения, оказывает антиатеросклеротическое, антиоксидантное и гепатопротекторное действие. Снижает в крови концентрацию общего холестерина, ЛПНП и ЛПОНП, с одновременным повышением ЛПВП, тормозит атероматоз сосудов. Улучшает мозговое кровообращение. Применение: атеросклероз (гиперлипидемия II-IV типы). Производится в России.

Жидкий экстракт трава тимьяна ползучего входит в состав сиропа «Мелрозум», который обладает противокашлевым, отхаркивающим, спазмолитическим и бактерицидным действием. Показания к применению: кашель при катаральных заболеваниях верхних дыхательных путей (фарингиты, ларингиты), трахеитах, бронхитах, гриппе, кори. «Мелрозум» производится компанией «МСМ Klosterfrau Vertriebsgesellschaft GmbH» (Германия).

Экстракт травы тимьяна ползучего также входит в состав лекарственных препаратов: эликсир «Коделак® бронхо с чабрецом», применяется при заболевании дыхательных путей с образованием вязкой мокроты (острый и хронический бронхит, пневмония, ХОБЛ, бронхоэктатическая болезнь). Эликсир «Коделак Фито» применяют для симптоматической терапии пациентов, страдающих непродуктивным кашлем при заболеваниях дыхательных путей различной этиологии, производство России.

Сироп «Стоптуссин-Фито» содержит жидкий спиртовой экстракт тимьяна ползучего, применяется в составе комплексного лечения острых и хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, сопровождающихся кашлем с трудноотделяемой мокротой, таких как трахеит, бронхит, трахеобронхит, производится в Чехии по лицензии компании «Тева Фармацевтические Предприятия Лтд» (Израиль).

В Белградском университете на кафедре химической инженерии (Сербия) использовали микросферы хитозана для инкапсулирования полифенолов чабреца [118]. Так же проведено инкапсулирование водного экстракта *Thymus*

serpyllum L. в шарики альгината кальция для получения лекарственных форм, содержащих полифенольные соединения [119].

Выводы по главе I

1. Лечебные свойства травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в традиционной и народной медицине всего мира. Трава тимьяна ползучего является лекарственным растением и включена в Государственную фармакопею Республики Казахстан, Европейскую фармакопею, Британскую фармакопею, ГФ Российской Федерации, ГФ Республики Беларусь и других стран. Тимьяна ползучего трава применяется в официальной медицине как средство растительного происхождения, которое оказывает отхаркивающее, противомикробное и анальгезирующее действие, используется в виде отваров и настоев.

2. И в настоящее время тимьян ползучий привлекает пристальное внимание ученых всего мира, благодаря своим фармакологическим свойствам. В последние годы увеличился интерес к этноботаническим, фитохимическим и фармакологическим исследованиям лекарственных свойств тимьяна ползучего. На основании, которых установлено, что эфирное масло и экстракты тимьяна ползучего являются перспективным природным ресурсом для фармацевтической промышленности, в плане разработки и внедрения в традиционную медицину новых эффективных лекарственных средств растительного происхождения.

3. В мировой практике доказано, что тимьян ползучий, как в природе, так и культивируемый, в зависимости от географического региона, климатических условий и среды произрастания, представлен несколькими хемотипами, т.е. изменяется качественный состав и количественное содержание эфирного масла и основных групп биологически активных веществ, следовательно, изменяются и фармакологические свойства. Также ключевым фактором при получении суммы экстрактивных веществ из лекарственных растений является метод и условия экстракции. Поэтому изучение химического состава и биологических свойств тимьяна ползучего, в зависимости от территории и условий произрастания, является актуальным и имеет большое значение для использования данного лекарственного растения в фармацевтической промышленности и применения в медицине. Исследование химического состава и биологических свойств тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана будет проведено впервые.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении научно-исследовательской работы были использованы материалы и методы в соответствии с требованиями нормативных документов, действующих на территории РК.

2.1 Материалы исследований

Лекарственное растительное сырье. Надземная часть тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) была собрана в популяциях Карагандинской области Республики Казахстан: образец 1 в горно-лесном массиве Каркаралинска (N 49°38395'; E 75°47577') и образец 2 в Корнеевских лесах (N 50°21652'; E 74°33377'), в июле 2017 г., в фазу полного цветения (ГФ РК I, Т. 2) [10]. Ботаническая идентификация подтверждена в Институте ботаники и фитоинтродукции Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (заключение о видовой принадлежности растительного сырья № 01-04/358).

Ультразвуковые экстракты из двух образцов тимьяна ползучего получали двукратной экстракцией воздушно-сухого сырья (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) 70% этанолом, без замачивания, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 30 минут. После ультразвуковой обработки жидкие экстракты отфильтровали и упарили экстрагент на ротационном испарителе, при температуре 50°C. Из густых экстрактов остаточный растворитель выпаривают на водяной бане при температуре 70°C [120, 121].

Субстанция «Тимьяна ползучего экстракт сухой» (проект НД РК).

Стандартные образцы фенольных соединений: кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид), кверцетин-3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол (Sigma-Aldrich, США).

Эфирное масло из двух образцов тимьяна ползучего получали методом гидродистилляции в течение 3 часов на аппарате Клевенджера.

Эталонные штаммы микроорганизмов Американской коллекции типовых культур (ATCC):

- грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Micrococcus luteus* ATCC10240, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619 [122];

- грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Proteus mirabilis*

ATCC12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 [122], *Helicobacter pylori* ATCC43504);

- дрожжевые грибки: *Candida albicans* ATCC102231, *Candida albicans* ATCC2091, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida glabrata* ATCC90030, *Candida krusi* ATCC14243.

Препараты сравнения:

Гентамицин (ГФ РК I, Т. 2). Антибиотик группы аминогликозидов широкого спектра действия. Гигроскопический порошок белого или почти белого цвета. Гентамицина сульфат представляет собой смесь сульфатов антибиотиков С1, С1а, С2, С2а и С2б, продуцируемых *Micromonospora purpurea*. Антимикробная активность субстанции должна быть не менее 590 МЕ/мг в пересчете на безводное вещество [10, с. 175].

Бензилпенициллина натриевая соль (ГФ РК I, Т. 2). Антибиотик группы биосинтетических пенициллинов. Бензилпенициллин натрия содержит не менее 96.0 % и не более 102.0 % натрия (25,5/R,6/R)-3,3-диметил-7-оксо-6-[(фенилацетил)амино]-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-кар-боксилата в пересчете на сухое вещество. Субстанция производится определенными штаммами *Penicillium notatum* или родственными организмами [10, с. 133].

Нистатин - противогрибковый препарат полиенового ряда, используется в терапии кандидозов, впервые выделен из *Streptomyces noursei* (ГФ РК I, Т. 1).

Бронхикум® С сироп 100 мл (130 г), лекарственный препарат растительного происхождения (номер гос. регистрации РК-ЛС-5-№019584 действующее), производитель: Наттерман ГмбХ, для Авентис Фарма ГмбХ (Германия). Оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, бронхолитическое, противомикробное действие, способствует снижению вязкости мокроты и ускорению ее эвакуации. 100 мл сиропа содержат 15 г жидкого экстракта травы тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), соотношение травы тимьяна к экстрагенту (1:2-2.5), экстрагент: р-р аммиака 10%, глицерол 85%, этанол 90%, вода [123].

Диклофенак натрия, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, производитель Merckle GmbH (Германия) (ГФ РК I, Т. 2). Лекарственный препарат группы нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов (НПВП), оказывающее противовоспалительное, обезболивающее и жаропонижающее действие [10, с. 625].

Растворители и реактивы:

При выполнении научно-исследовательских работ были использованы растворители и химические реактивы квалификации «ч.д.а.», «о.с.ч.», «х.ч.».

Гексан. C₆H₁₄. (M_r 86.2). 1042600. [110-54-3]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 348) [124].

Спирт этиловый 96%. C₂H₅OH. (M_r 46.07). 102500. [64-17-5]. (ГФ РК I, Т. 2, с. 581) [124].

Вода очищенная. H₂O. (M_r 18, 02). 1095500. [7732-18-5]. (ГФ РК I, Т. 2, с. 168).

Алюминия хлорид. AlCl₃·6H₂O (M_r 241.4). 1002700. [7784-13-6]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 330).

Металлический магний. Mg. (A_r 24.30). 1049500. [7439-95-4]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 381).

Уксусная кислота. C₂H₄O₂. (M_r 60.1). 1000300. [64-19-7]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 432).

Хлороводородная кислота. HCl (M_r 36.46). 1043500. [7647-01-0]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 439).

Муравьиная кислота. CH₂O₂ (M_r 46.03). 1039300. [64-18-6]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 392).

2.2 Методы исследований

Для исследований использовано следующее оборудование: ультразвуковая баня «Ultrasonic cleaner Sonic-3» (Польша), УФ-спектрофотометр Implen «Nanophotometr P 330» (Германия), газовый хроматограф Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (США). Жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity с УФ-детектором и масс-спектрометром (США).

Физико-химические методы

Газовая хроматография

Компонентный состав эфирного масла определяли методом газовой хроматографии-масс-спектрологии (ГХ/МС).

Анализ ГХ/МС проводили на газовом хроматографе Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (MSD). Капиллярная колонка HP-5MS 30 м x 0,25 мм (толщина пленки 0,25 мкм). Анализ проводили с использованием следующей температурной программы: изотерма печи при 70°C в течение 2 мин, затем от 70 до 270°C при 20°C/мин и 270°C в течение 30 мин. Гелий использовали в качестве газа-носителя при скорости потока 2 мл/мин без разделения. Температура испарителя 250°C и детектора составляла 230°C. Масс-спектры регистрировали с использованием энергии ионизации 70 эВ и температуры разделения 280°C, диапазон масс m/z 10-650.

Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их записанных масс-спектров с данными, хранящимися в библиотеке масс-спектрометров библиотеки NIST 2017 (версия 2.3) системы данных GC-MS в сочетании с AMDIS 32. Содержание компонентов в эфирном масле рассчитано с использованием программного обеспечения ChemStation.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для анализа полифенольных соединений экстрактов была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS) [125].

В исследовании были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (ACN) для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Франция), муравьиная кислота (99-100%, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Франция), вода высокой степени очистки приготовлена с использованием системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция). Стандарты 20 фенольных соединений: кофейная кислота,

галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин 3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол (Sigma – Aldrich, США).

Анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» (Agilent Technologies, США), оборудованном четырехканальным насосом G1311C 1260 Pump VL, автосамплером G1329B 1260 ALS, термостатом колонки G1316A 1260 TCC; детектором с переменной длиной волны G1314C 1260 VWD VL + и масс-спектрометром G6130A Quadrupole LC-MS/MS. Использовалось программное обеспечение ChemStation с управлением Windows NT.

Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом «Zorbax Eclipse Plus C18» (150 мм × 4,6 мм, 3,5 мкм, Agilent Technologies, США). Для разделения использовали градиент подвижной фазы А (2,5% раствор муравьиной кислоты в воде) и подвижной фазы В (2,5% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле). Профиль градиента был установлен следующим образом: 0,00 мин 3% элюент В, 7,00 мин 20% элюент В, 7,10 мин 30% элюент В, 27,00 мин 40% элюент В, 35,00 мин 50% элюент В, 35,10 мин 20% элюент В и 40.00 мин. 3% элюент В. Скорость потока 0,4 мл/мин, температура колонки 30 °С. Ультразвуковые экстракты и стандарты растворяли в смеси растворителей ацетонитрил:вода = 1:1 (об./об.). Объем инъекции составлял 20 мкл для растворов экстрактов и стандартов. Выходящий из колонки поток проходил через УФ-детектор до попадания на интерфейс МС. Длины волн УФ-детектирования составляли 280 нм и 360 нм. Детектирование масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением проводили в отрицательном режиме со следующими оптимизированными параметрами: температура капилляра 350°С; осушающий газ N₂ 8 л/мин; давление распылителя 45 фунтов на квадратный дюйм. Сбор данных осуществлялся с использованием метода мониторинга множественных реакций (MRM), который отслеживает только определенные массовые переходы в течение заданного времени удерживания.

Идентификация каждого соединения была выполнена путем сравнения их времени удерживания с аутентичными стандартами, а также подтверждена спектрометром Agilent G6130A LC-MS/MS, оборудованным источником ионизации электрораспылением.

Содержание фенольных соединений в экстрактах рассчитывали методом внешнего стандарта по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times 25 \times P \times 100}{S_0 \times m_1 \times 25 \times 100}, \quad (1)$$

где S₁ - значение площади пика соединения на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - значение площади пика соединения на хроматограмме СО;
 m_0 - навеска СО соединения, в граммах;
 m_1 - навеска экстракта, в граммах;
 P - содержание соединения в СО соединения, в %;
 25, 25 - разведения.

Определение содержания основных групп БАВ в образцах травы тимьяна ползучего

Количественное определение суммы флавоноидов в ЛРС определяли спектрофотометрическим методом по следующей методике [13]:

К около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья приливали 100 мл 70% спирта этилового и экстрагировали в колбе со шлифом объемом 250 мл, на водяной бане, при температуре кипения экстрагента в течение 1 часа. Извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр и получили раствор А.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 70 % спирте этиловом и через 10 мин - 1 мл 3 % раствора кислоты уксусной, доводили объем раствора 70 % спирте этиловом до метки, перемешивали и оставляли на 30 мин (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, который состоял из 2,5 мл раствора А, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной, доведенный 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид, в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_1 \times a \times 2,5 \times (100 - W)}, \quad (2)$$

где А - оптическая плотность раствора Б;

A_1 - удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Количественное определение суммы фенолкарбоновых кислот в ЛРС определяли спектрофотометрическим методом по следующей методике [126]:

К около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья приливали 100 мл 70% спирта этилового и экстрагировали в колбе со шлифом объемом 250 мл, на водяной бане, при температуре кипения экстрагента в течение 1 часа. Извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр и получили раствор А.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2,5 мл раствора А, доводят объем раствора 70% спиртом этиловым до метки и перемешивают (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве

раствора сравнения 70% спирт этиловый.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот, в пересчете на розмариновую кислоту, в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_1 \times a \times 2,5 \times (100-W)}, \quad (3)$$

где А - оптическая плотность раствора Б;

А₁ - удельный показатель поглощения розмариновой кислоты при длине волны 326 нм, равный 500;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Количественное определение тритерпеновых соединений в ЛРС осуществляли спектрофотометрическим методом [127].

Для определения количественного содержания тритерпеновых сапонинов проводили селективную экстракцию хлороформом. Спектрофотометрическое определение продуктов, после их взаимодействия с кислотой серной концентрированной, проводили при длине волны 321 нм. Содержание суммы тритерпеновых соединений в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли в пересчете на сапонин.

Содержание дубильных веществ в ЛРС, в пересчете на танин, определяли титриметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1) [128].

Количественное определение полисахаридов в ЛРС определяли гравиметрическим методом [129]. Навеску массой около 10,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане и экстрагируют в течение 1 часа. После извлечение фильтруют через тканевый фильтр и экстракцию повторяют ещё 1 раз. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» под вакуумом. Фильтрат упаривают на роторном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляют трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживают в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Затем осадок отфильтровывают через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр, осадок на фильтре промывают горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Определение содержания пектиновых веществ в ЛРС, в частности их функциональных групп (метоксилированных карбоксильных, свободных карбоксильных, метоксильных групп, общее количество карбоксильных) проводили титриметрическим методом [62].

Определение содержания свободных аминокислот в ЛРС осуществляли спектрофотометрическим методом, основанном на взаимодействии с 2 % раствором нингидрина в этаноле с последующим спектрофотометрическим определением продукта реакции [130].

Определение содержания свободных органических кислот в ЛРС проводили титриметрическим методом, в пересчете на яблочную кислоту, согласно ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды *Rosae fructus*» [131, 132].

Минеральный состав растительного сырья изучали методом испарения с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан).

Определение радионуклидов (Cs, Sr) в двух исследуемых образцах растительного сырья проводилось радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан).

УФ-спектрофотометрия:

УФ-спектры ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего и стандартного образца цинарозида снимали на УФ-спектрофотометре Implen «Nanophotometr P 330» (Германия) от 200 до 500 нм [133].

Количественное определение суммы флавоноидов в субстанции, проводили спектрофотометрическим методом, по следующей методике [134]:

Точную навеску 0,03 г субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливали 15 мл 70% спирта этилового и растворяли, затем доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу объемом 25,0 мл помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5,0 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, выдерживали 10 минут и далее приливали 1,0 мл 3% раствора кислоты уксусной. Объем полученного раствора доводили 70% спиртом этиловым до метки (раствор Б) и оставляют на 30 минут. Далее проводили измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10,0 мм при длине волны 395 ± 2 нм.

В качестве раствора сравнения выступал раствор, состоящий из 2,5 мл раствора А, 1,0 мл раствора кислоты уксусной 3% и доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25,0 мл.

Содержание суммы флавоноидов в субстанции, в пересчете на цинарозид, в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 25 \times 25 \times 100}{A_1 \times a \times 2,5}, \quad (3)$$

где А - оптическая плотность раствора Б;

A_1 - удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345;

а – навеска субстанции, г.

Химические методы:

Точную навеску 0,02 г экстракта растворяют в 25 мл 70% этанола (испытуемый раствор). К 2 мл испытуемого раствора прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной и 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

Фармакопейные методы:

- органолептические характеристики (цвет, вкус, запах) ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего определяли по методике ГФ РК I, Т. 1, с. 548 [133];
- растворимость ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего определяли по методике ГФ РК I, Т. 1, с. 175 [133].

Морфологические признаки двух образцов травы тимьяна ползучего из двух точек сбора изучали по свежесобраным растениям и высушенному сырью в сравнении с описанием, изложенным в статье «Тимьян ползучий» Государственной фармакопеи Республики Казахстан. Соответствие морфологическим признакам исследовали при просмотре невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) по методике ГФ РК I, Т. 2, с. 735 [10].

Анатомическое строение двух образцов травы тимьяна ползучего исследовали на временных микропрепаратах, приготовленных по методике ГФ РК I, Т. 2, с. 735 [10] с последующей микрофотосъемкой.

Товароведческий анализ растительного сырья:

- определение посторонних примесей (пожелтевшие, побуревшие и почерневшие части растения, органические примеси, минеральные примеси) проводили по ГФ РК, Т. 1, раздел 1.4 и монографией Ф ЕАЭС 2.1.8.2;
- определение потери в массе при высушивании осуществляли согласно требованиям ГФ РК, Т. 1, раздел 2.8.17;
- определение золы общей проводили по ГФ РК, Т. 1, раздел 2.4.16;
- определение золы нерастворимой в 10 % кислоте хлороводородной, осуществляли по ГФ РК, Т. 1, раздел 2.8.1. и фармакопейному методу Ф ЕАЭС 2.1.8.1 и Ф ЕАЭС 2.3.1.4.;
- определение микробиологической чистоты проводили по ГФ РК, Т. 1, раздел 5.1.4, категория 3, разделы 2.6.12 и 2.6.13;

Получено разрешение Комитета по биоэтике НАО «МУК» на проведение медико-биологических экспериментов и исследований с вовлечением животных, Протокол № 47 от 18.06.2018 г. с присвоенным № 57 (Приложение А).

Изучение антимикробной активности методом микроразведений

Изучение антимикробной активности ультразвуковых экстрактов проводили методом микроразведений с использованием бульона Мюллера-Хинтона (МН) и бульона МН с 5% лизированной овечьей / лошадиной крови для роста неприхотливых и прихотливых бактерий соответственно или бульона МН с 2% глюкозы для роста грибов. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) тестируемых экстрактов оценивали в отношении эталонных микроорганизмов из Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая 6 штаммов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* ATCC25922,

Klebsiella pneumoniae ATCC13883, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Proteus mirabilis* ATCC12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 [122], *Helicobacter pylori* ATCC43504), 9 штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Micrococcus luteus* ATCC10240, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619) [122] и 5 штаммов грибов (*Candida albicans* ATCC102231, *Candida albicans* ATCC2091, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida glabrata* ATCC90030, *Candida krusi* ATCC14243).

Ультразвуковые экстракты, растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО), сначала разбавляли до концентрации 20 мг/мл в соответствующей бульонной среде, рекомендованной для бактерий или грибов. Затем, используя ту же среду, были сделаны серийные двукратные разведения для получения конечных концентраций тестируемых экстрактов в диапазоне от 20,0 до 0,156 мг/мл. Стерильные 96-луночные микротитратные планшеты из полистирола (Nunc, Дания) готовили путем внесения 200 мкл соответствующего разведения тестируемых экстрактов в бульонную среду на лунку. Посевной материал был приготовлен из свежих микробных культур в стерильном 0,85% NaCl, чтобы соответствовать мутности 0,5 стандарта МакФарланда, и 2 мкл были добавлены в лунки для получения конечной плотности $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл для бактерий и 5×10^4 КОЕ/мл для грибов, КОЕ - колониеобразующие единицы. После инкубации (35°C в течение 24 ч) МИК оценивали визуально как самую низкую концентрацию экстрактов, показывающую полное ингибирование роста контрольных штаммов микробов. Соответствующий контроль ДМСО (в конечной концентрации 10%), положительный контроль (содержащий инокулят без тестируемых экстрактов) и отрицательный контроль (содержащий тестируемые экстракты без инокулята) были включены в каждый микропланшет.

МИК *Helicobacter pylori* определяли с использованием метода двукратного микроразбавления в бульоне МН с 7% лизированной лошадиной крови при концентрации экстрактов и эфирных масел от 20,0 до 0,0024 мг/мл и от 2,0 до 0,00195 мг/мл, с бактарным инокулятом 3 стандарта МакФарланда. После инкубации при 35°C в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях (5% O₂, 15% CO₂ и 80% N₂) рост *Helicobacter pylori* визуализировали путем добавления резазурина. Конечная точка МИК была зафиксирована как самая низкая концентрация образцов, которая полностью подавляла рост.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) или минимальную фунгицидную концентрацию (МФК) определяли путем посева по 5 мкл из каждой лунки, которая проявляла ингибирование роста, из последней положительной лунки и из контроля роста на рекомендуемые чашки с агаром. Планшеты инкубировали при 35°C в течение 24 часов для всех микроорганизмов, кроме *Helicobacter pylori*, который инкубировали в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях. МБК/МФК определяли как самую низкую концентрацию экстрактов без роста микроорганизмов. Отношения МБК/МИК

были рассчитаны для определения бактерицидного или бактериостатического эффекта исследуемых экстрактов. Каждый эксперимент повторяли в трехкратной повторности [135, 136].

Изучение антимикробной активности методом диффузии в агар

Изучение антимикробной активности образцов проводили по методике [137] в отношении штаммов грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и к дрожжевому грибку *Candida albicans* ATCC 10231 методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения – гентамицин, бензилпенициллина натриевая соль для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка.

Культуры выращивали на жидкой среде pH $7,3 \pm 0,2$ при температуре от 30 до 35°C в течение 18-20 часов. Культуры разводили 1:1000 в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими элективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засеивали по методу «сплошного газона». После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6,0 мм, в которые вносили растворы исследуемых образцов, гентамицина, бензилпенициллина натриевой соли и нистатина. В качестве контроля использовали диметилсульфоксид в эквивалентных количествах. Исследуемые образцы испытывались в концентрации 2 мг/мл. Концентрация препаратов сравнения составляла 2 мг/мл. Посевы инкубировали при 37°C, учет растущих культур проводили через 24 часа.

Антимикробная активность образцов оценивалась по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10-15 мм – слабая активность, 15-20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная.

Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки.

Изучение отхаркивающей активности в эксперименте in vivo

Исследование отхаркивающей активности образцов экстрактов по методике В.В. Гацура, на осенних лягушках *Rana Temporarea* [62, 138].

Лягушку фиксировали на корковой пластинке брюшком вверх. По 0,01 г исследуемых образцов растворяли в 1 мл среды Игла (питательная среда для культивирования клеток и тканей, содержащая большой набор аминокислот), 0,07 мл препарата сравнения разводили в 1 мл среды Игла. На кончик языка наносили исследуемый настой в количестве 0,1 мл. Для регистрации движения ресничек мерцательного эпителия пищевода использовали шелковую нить размером 15 мм, которую по истечении 30 секунд после нанесения исследуемых настоев помещали у основания языка. По секундомеру замечали время, в течение которого заглатывалась нить. Регистрировали время, затраченное на перемещение нитки на 10 мм без настоя (контроль) и после нанесения исследуемого настоя [62, 138].

Препаратом сравнения являлся сироп Бронхикум С - средство растительного происхождения, которое оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, бронхолитическое, противомикробное действие, способствует снижению вязкости мокроты и ускорению ее эвакуации. 100 мл сиропа содержат 15 г жидкого экстракта травы тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), соотношение травы к экстрагенту (1:2-2.5), экстрагент: раствор аммиака 10%, глицерол 85%, этанол 90%, вода.

Учитывая значительный разброс исходных скоростей движения мерцательного эпителия от одного животного к другому, нами произведен расчет коэффициента ускорения (КУ) как отношения скорости, полученной после аппликации исследуемого образца к исходной. Уменьшение данного коэффициента говорит о повышении двигательной активности мерцательного эпителия [62, 138].

Изучение противовоспалительной активности в эксперименте in vivo

Исследование противовоспалительного действия ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего проводили на модели острой экссудативной реакции (перитонит) по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139].

Для исследования были отобраны 40 белых беспородных крыс обоего пола массой 190-210 г, которые были распределены на 4 группы по 10 животных в каждой:

Группа №1 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №2 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №3 - группа сравнения, животные получали препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №4 - контрольная группа, животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи, n=10.

Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 часа животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его объем. Исследуемые объекты вводили животным перорально однократно в виде крахмальной слизи, препарат сравнения диклофенак натрия вводили внутривентрикулярно однократно за 1 час до введения 1% раствора уксусной кислоты.

Противовоспалительную активность оценивают по уменьшению объема воспалительного экссудата в брюшной полости у опытных крыс, в процентах по сравнению с контрольными животными.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые

отличия оценивали непараметрическим критерием Mann-Whitney U-test. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Исследование мутагенной активности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего (тест Эймса)

Исследование мутагенной активности осуществляли в тесте Эймса по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139].

Целью данного эксперимента являлось выявление способности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, которые несут мутации аутокотрофности по гистидину, и проявлять ДНК-повреждающий эффект в REC-тесте на тестерных штаммах *Escherichia coli* B/r WP2 и WP67 (polA), дефектных по разным путям репарации.

Бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98, *Salmonella typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* B/r WP2 получены из Республиканской коллекции микроорганизмов (г. Астана), дикий штамм *Escherichia coli* WP67 (polA) получен из Коллекция кафедры микробиологии КГМУ.

Изучение острой токсичности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего

Исследование острой токсичности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего проводили по методике, представленной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139].

В экспериментах были использованы 2 вида животных: беспородные белые мыши обоего пола массой 18,0-20,0 г и белые крысы обоего пола массой 250,0-300,0 г. Животные находились на обычном рационе вивария. Энтеральное введение осуществлялось внутривентрально (с помощью зонда). Парентеральное - внутривентрально. Каждая группа состояла из 5 животных, всего исследовано 70 мышей и 45 крыс.

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего растворяли в ДМСО и вводили животным однократно в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг. В течение двухнедельного периода за состоянием животных осуществлялось ежедневное наблюдение, и они трижды взвешивались. При этом обращали внимание на: общее состояние животных, поведение, характер дыхательных движений, двигательную активность, внешний вид шерстного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек, употребление воды и корма, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания, окраску мочи.

По окончании срока наблюдения выживших животных забивали декапитацией, вскрывали, описывали, органы взвешивали и отбирали пробы тканей для гистологического изучения.

Определяли LD₅₀ при введении максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг).

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «GraphPad Prism v. 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием Mann-Whitney U-test. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. При обработке полученных результатов исследований применен метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0,95$).

3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (*THYMUS SERPYLLUM* L.) ФЛОРЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАЗАХСТАНА

3.1 Идентификация лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.)

Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.) - многолетний стелющийся по земле полукустарник семейства Яснотковых (*Lamiaceae*), относится к ценным лекарственным растениям, благодаря своим фармакологическим свойствам: отхаркивающей, антиоксидантной, противоопухолевой и противомикробной активности.

Тимьян ползучий в Карагандинской области встречается в горах Кент, Каркаралы, Корнеевских лесах. Произрастает в степной зоне, на сухих и свежих песчаных почвах, в хвойных и лиственных лесах, на лесных опушках и полянах, вырубках, лугах, в молодых посадках леса, на южных склонах, скалах, в сосновых лесах, по склонам сопок в кустарниковых зарослях [140].

Надземная часть тимьяна ползучего была собрана в популяциях Карагандинской области Республики Казахстан: образец 1 в горно-лесном массиве Каркаралинска (N 49°38395'; E 75°47577') и образец 2 в Корнеевских лесах (N 50°21652'; E 74°33377'), в июле 2017 г., в фазу полного цветения. Ботаническая идентификация подтверждена в Институте ботаники и фитоинтродукции Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (заключение о видовой принадлежности растительного сырья № 01-04/358).

Впервые проведен сравнительный фармакогностический анализ надземной части двух образцов тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области [141].

Морфологические признаки двух образцов тимьяна ползучего.

Изучение морфологических признаков травы тимьяна ползучего из двух точек сбора проводили по свежесобраным растениям и высушенному сырью, в сравнении с описанием, изложенным в статье «Тимьян ползучий» Государственной фармакопеи Республики Казахстан [10].

Морфологически тимьян ползучий представлен полукустарничками с лежащими одревесневшими стеблями и приподнимающимися травянистыми цветоносными ветвями, имеет цельные тонкие стебли, листья и цветки.

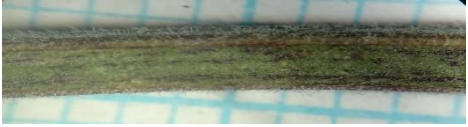
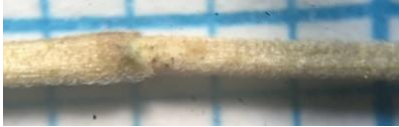


Стебли тонкие высотой до 0,5 см, четырехгранные, зелено-коричневого цвета, иногда присутствует фиолетовый оттенок. Листья длиной около 1,5-2,2 см серовато-зеленого цвета с короткими черешками, продолговато-эллиптические, ланцетные, слабоопушенные, на нижней стороне листа резко выступают жилки. На поверхности листа заметны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев видны длинные щетинистые волоски.

Цветки одиночные, мелкие, временами собраны в полумутовки по несколько штук. Цветок включает двугубую чашечку и двугубый венчик.

Чашечка красновато-коричневого цвета около 0,4 см, венчик синевато-фиолетового цвета длиной 0,5-0,8 см, 4 тычинки, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Данные по сравнительному анализу морфологических признаков тимьяна ползучего представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Сравнительная характеристика морфологических признаков сырья тимьяна ползучего из двух точек сбора

Диагностические признаки	Тимьян ползучий (Горно-лесной массив Каркаралинска)	Тимьян ползучий (Корнеевские леса)
1	2	3
<i>Стебель</i>		
Поперечное сечение стебля	Округло-четырёхгранный	Цилиндрический, неясно четырёхгранный
Характер опушения стебля	Стебель опушен мелкими оттопыренными трихомами, отмечены немногочисленные эфирно-масличные железки 	Стебель со всех сторон опушен мелкими трихомами, расположенными перпендикулярно стеблю, отмечены немногочисленные железки 
<i>Листья</i>		
Форма листьев	Узко-эллиптические, край ровный, 1,8-2,2 см длиной и 2-2,5 мм шириной 	Линейные или узко-эллиптические, край ровный, 1,5-2 см длиной и до 2-2,5 мм шириной 
Наличие черешка	Листья сидячие, имеется очень короткий черешок	Листья сидячие или имеется очень короткий черешок
Опушение листьев	Листья голые, с незначительным опушением по краю и главной жилке, с обеих сторон ясно-железистые. Железки погружены в эпидерму листа	До середины или в нижней трети реснитчатые по краю, поверхность листа почти голая, ясно-железистая. Железки погруженные в эпидерму листа
<i>Соцветия</i>		
Соцветие	Головчатое	Головчатое
Направление роста волосков на цветоножке	Трихомы белые, хорошо выраженные, перпендикулярно оттопыренные, реже слегка приподнимающиеся над поверхностью	Трихомы хорошо выраженные, перпендикулярны оси цветоножки или слегка вниз направленные

Продолжение таблицы 3

1	2	3
Форма чашечки	Колокольчатая или узко-колокольчатая	Узко-колокольчатая
Цвет чашечки	Лиловый, лилово-фиолетовый	Лиловый
Опушение чашечки	Отмечено густое опушение длинными беловатыми трихомам; расположение трихом – преимущественно по ребрышкам чашечки 	Отмечено густое опушение длинными беловатыми трихомами; расположение трихом – преимущественно по ребрышкам чашечки 
Характеристика зубцов верхней губы чашечки	Чашечка 3-зубчатая, зубцы почти одинакового размера, мелкие, треугольные, отогнутые	Чашечка 3-зубчатая, зубцы мелкие (средний более крупный), остротреугольные, отогнутые
Опушение верхних зубцов чашечки	По краю густо-реснитчатые	По краям реснитчатые
Цвет венчика	Розово-фиолетовый	Розово-фиолетовый, ярко-розовый, редко белый

Анализ сырья, собранного в Корнеевских лесах и Каркаралинских горах показывает сходство в строении вегетативных и генеративных органов, хотя отмечены некоторые отличия, которые связаны с экологическими условиями произрастания.

Так, для сырья тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, поперечное сечение стебля - почти цилиндрическое или неясно четырехгранное, для сырья, собранного в Каркаралинских горах - ясно-округло-четырехгранное. Для обеих точек сбора отмечено, что стебель опушен мелкими трихомами, которые расположены перпендикулярно оси стебля.

Листья узко-эллиптические, реже линейные с ровным краем, сидячие либо с очень коротким черешком. Размер листьев сырья из первой точки сбора – 1,5-2,0 см длиной и 2,0-2,5 мм шириной, для сырья из второй точки сбора – 1,8-2,2 см длиной и 2,0-2,5 мм шириной. Поверхность листьев почти голая с хорошо выраженными многочисленными эфирно-масличными железками, для сырья из первой точки сбора – по краю реснитчатая, для сырья из второй точки сбора – с незначительным опушением по главной жилке.

Цветки мелкие, собраны в полумутовки по несколько штук, образующие головчатое соцветие, в нижней части соцветия располагаются мутовки, реже могут присутствовать одиночные цветки. На цветоножке отмечены белоокрашенные трихомы, образующие не густое опушение. Для сырья из первой точки сбора чашечка длиной 0,40-0,45 см, узко-колокольчатая, лиловая,

опушённая густо. Верхняя губа чашечки имеет три мелких зубца (относительно крупный из них средний) остроугольные, отогнутые. Для сырья из второй точки чашечка колокольчатая, реже узко-колокольчатая, лиловая или лилово-фиолетовая; 3-зубчатая с зубцами почти одинакового размера, треугольной формы и слегка отогнутыми зубцами. В обоих местах сбора чашечка густо опушена трихомами по ребрышкам и краям зубцов. Цвет венчика розово-фиолетовый, ярко-розовый, реже белый - для сырья из Корнеевки, розово-фиолетовый – для сырья из Каркаралы.

Таким образом, экспериментальные данные указывают на то, что на территории Карагандинской области выявлено два хемотипа тимьяна ползучего.

Диагностическими признаками сырья тимьяна ползучего являются:

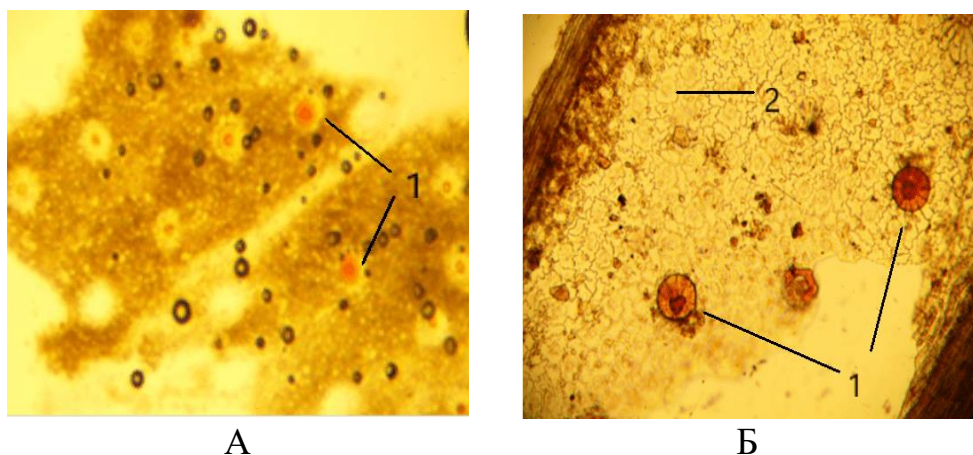
- для стебля - форма поперечного среза стеблей, тип опушения;
- для листа - общая форма листовой пластинки, реснитчатый край, наличие большого количества, слегка погруженных в эпидерму листа, эфирно-масличных железок;

- для чашечки - форма и цвет чашечки, строение зубцов, степень опушения, размещение трихом [142, 143].

Анатомическое строение двух образцов тимьяна ползучего.

Изучение микродиагностических признаков сырья проводили на временных микропрепаратах, приготовленных по методике ГФ РК I, Т. 2, с. 735 с последующей микрофотосъемкой [10].

По краю листа и на верхнем эпидермисе местами заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение стенок клеток; у клеток верхнего и нижнего эпидермиса отмечены извилистые боковые стенки (рисунок 2).



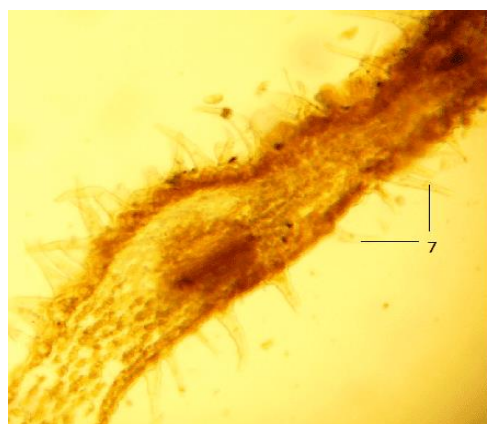
А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис с приподнимающейся железкой, 1 – эфирно-масличная железка, 2 – основные клетки эпидермиса

Рисунок 2 – Фрагменты строения верхнего и нижнего эпидермиса листа тимьяна ползучего. Ув. 10x16

Устьица присутствуют по обеим сторонам листа, которых существенно больше на нижней стороне; устьица сопровождают две околоустьичные клетки, их смежные клетки размещены перпендикулярно устьичной щели по

диацитному типу. Крупные эфиромасличные железки, содержат 8 выделительных клеток, которые расположены радиально; клетки эпидермиса часто образуют розетку вокруг места прикрепления железки [141].

Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположены у основания листа («щетинистые волоски») (рисунок 3). Сравнительно мелкие простые двух- и трехклеточные волоски, которые имеют бородавчатую поверхность, наблюдаются выше на краю листа. По всей поверхности листа встречаются очень мелкие головчатые волоски с одноклеточной овальной головкой, расположенные на одноклеточной короткой ножке. По краю и на верхней стороне листа чаще наблюдаются сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые [141]. Полученные данные сопоставимы с результатами работы [144].

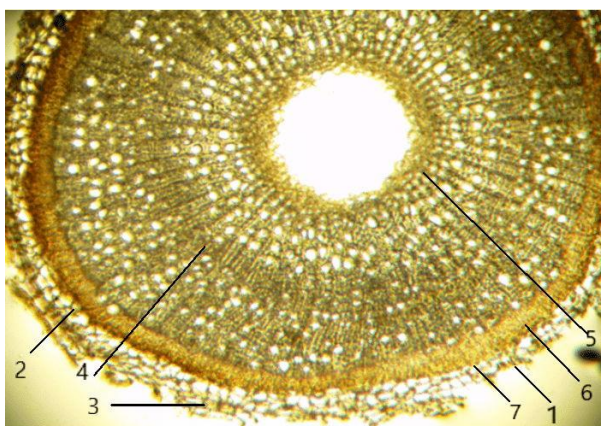


1 – нижний эпидермис, 2 – верхний эпидермис, 3 – губчатый мезофилл, 4 – флоэма, 5 – столбчатый мезофилл, 6 – ксилема, 7 – трихомы

Рисунок 3 – Поперечный срез листа тимьяна ползучего. Ув. 10x16

Эпидермис стебля состоит из прямоугольных, удлинённых клеток, концы которых прямые или скошенные, клеточные стенки с четковидным утолщением, устьица располагаются, в основном, на ребрах по диацитному типу (рисунок 4). Опушен эпидермис простыми, коленчатоизогнутыми двух- и пятиклеточными волосками с бородавчатой кутикулой, присутствуют головчатые волоски с одноклеточной овальной головкой на одноклеточной короткой ножке, реже наблюдаются сосочковидные выросты эпидермиса с немного бородавчатой или гладкой кутикулой. Также наблюдается наличие эфирномасличных железок, состоящих из 8 выделительных клеток, которые расположены радиально [145].

Трубка венчика имеет прямостенный эпидермис, складчатость кутикулы продольная, концы прямые или скошенные (рисунок 5). Эпидермис в зеве и отгибе венчика извилистостенный, с наличием сосочковидных выростов, и опушен разнообразными волосками: простыми, двух-, четырех-, иногда пятиклеточными с бородавчатой кутикулой и головчатыми волосками двух типов, а именно, на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой, на двухклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой [145].



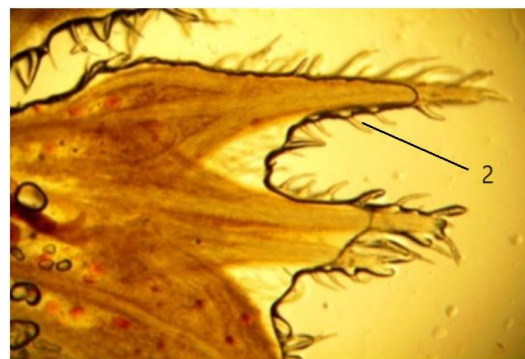
1 – эпидермис, 2 – коровая паренхима, 3 – колленхима, 4 – вторичная ксилема,
5 – первичная ксилема, 6 – флоэма, 7 – эндодерма

Рисунок 4 – Поперечный срез стебля тимьяна ползучего. Фрагмент. Ув. 10x16

На эпидермисе листочков венчика и чашечки наблюдаются крупные эфирномасличные железки местами с желто-бурым содержимым, которые состоят из восьми выделительных клеток расположенных радиально. В местах прикрепления эфиромасличных железок клетки эпидермиса образуют розетку [145].



А



Б

А – венчик цветка, Б – чашелистик, 1 – эфирно-масличные железки,
2 – трихомы

Рисунок 5 – Эпидермис венчика цветка и чашелистик тимьяна ползучего.
Препарат с поверхности. Ув. 10x16

На эпидермисе черешка располагаются сосочковидные выросты с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой и многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой. Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски трех типов: простые, двух-, пятиклеточные с бородавчатой кутикулой, сосочковидные выросты эпидермиса

с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой, головчатые на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой [145].

По внешним признакам и микроскопическим характеристикам оба образца тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области, соответствуют ГФ РК.

Идентификация тимьяна ползучего по химическому составу согласно требованиям ГФ РК.

Эфирные масла из двух исследуемых объектов получали методом перегонки с водяным паром на аппарате Клевенджера. Выход эфирного масла из тимьяна ползучего, произрастающего в Каркаралинске, составил $1,38 \pm 0,03\%$, а выход эфирного масла из тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, составил $0,42 \pm 0,02\%$ в пересчете на воздушно-сухое сырье. По количественному содержанию эфирного масла в растительном сырье, не менее 3 мл/кг ($\approx 0,3\%$), оба образца тимьяна ползучего соответствуют требованиям ГФ РК.

Компонентный состав эфирных масел тимьяна ползучего определяли методом хромато-масс-спектрологии на газовом хроматографе Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (MSD) в следующих условиях: капиллярная колонка HP-5MS 30 м x 0,25 мм (толщина пленки 0,25 мкм), изотерма печи при 70°C в течение 2 мин, затем от 70 до 270°C при 20°C/мин и 270°C в течение 30 мин, газ-носитель гелий при скорости потока 2 мл/мин без разделения, температура испарителя 250°C и детектора составляла 230°C. Масс-спектры регистрировали с использованием энергии ионизации 70 эВ и температуры разделения 280°C, диапазон масс m/z 10-650. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их записанных масс-спектров с данными, хранящимися в библиотеке масс-спектрометров библиотеки NIST 2011 MS Bundle (G1033A) системы данных GC-MS. Хроматограммы эфирных масел двух образцов травы тимьяна ползучего представлены на рисунках 6 и 7, компонентный состав в таблице 4.

По результатам качественного и количественного анализа методом хромато-масс-спектрометрии (таблица 4) в эфирном масле тимьяна ползучего, произрастающего в Каркаралинске, идентифицирован 41 компонент, что составляет 94,99% от общего количества, основными являются карвакрол (26,06%), тимол (14,78%), *O*-цимен (13,17%), γ -терпинен (11,13%), β -бисаболен (5,16%). Наличие в эфирном масле карвакрола и тимола соответствует требованиям ГФ РК.

В эфирном масле тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, идентифицировано 43 компонента, что составляет 91,39% от общего количества, преобладают *trans*-неролидол (33,59%), β -линалоол (6,19%), 1,8-цинеол (5,91%), α -терпинеол (5,39%). Отсутствие или минимальное количество карвакрола и тимола в составе эфирного масла не соответствует требованиям ГФ РК.

Полученные данные еще раз доказывают, что тимьян ползучий, произрастающий в популяциях Карагандинской области, представлен двумя хемотипами.

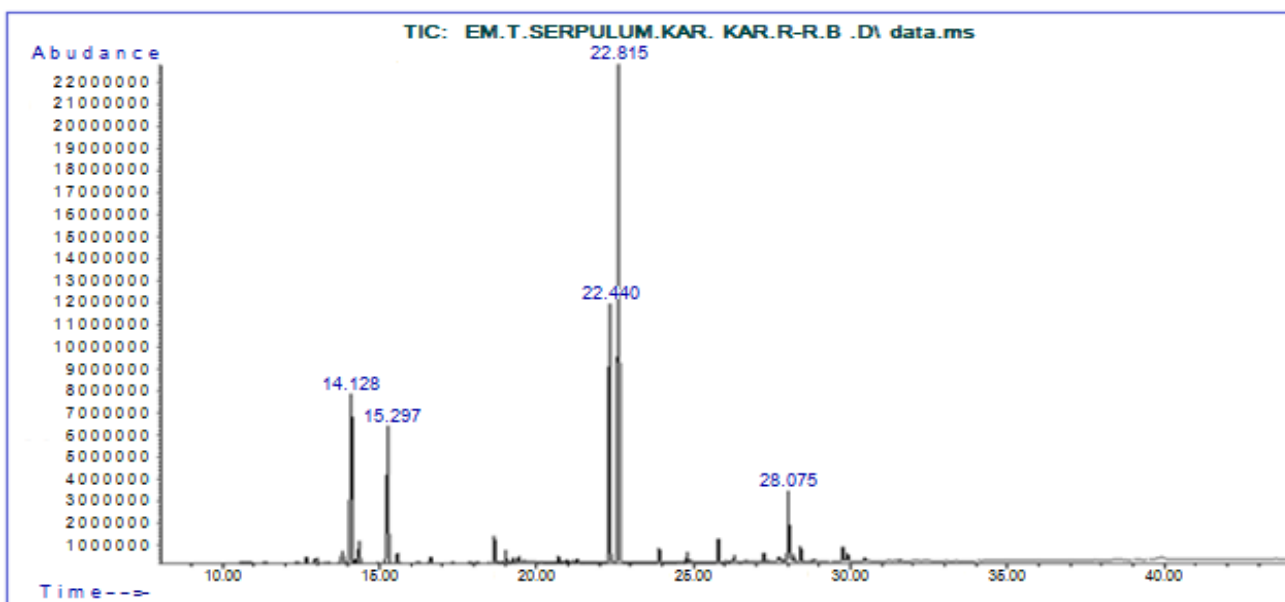


Рисунок 6 - Хроматограмма ГХ-МС эфирного масла тимьяна ползучего (образец 1)

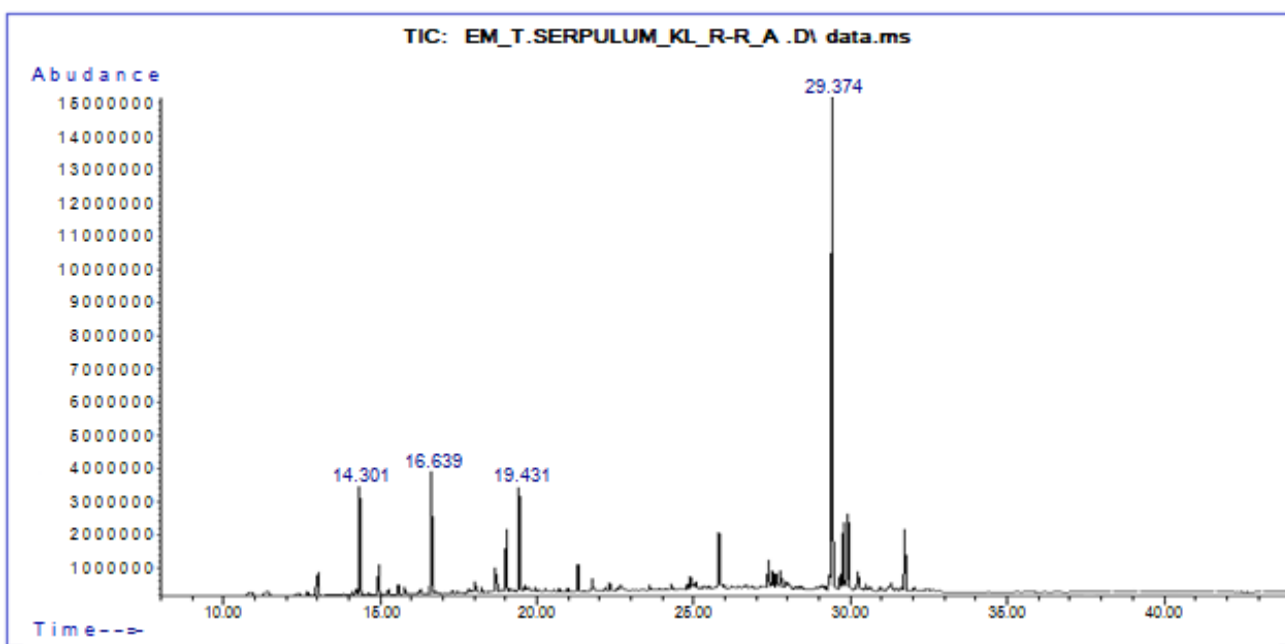


Рисунок 7 - Хроматограмма ГХ-МС эфирного масла тимьяна ползучего (образец 2)

Таблица 4 – Компонентный состав эфирных масел двух образцов травы тимьяна ползучего

№ пика	t _R (мин)	АКомпонет	aIR	Содержание (%)	
				Эфирное масло тимьяна ползучего (образец 1)	Эфирное масло тимьяна ползучего (образец 2)
1	2	3	4	5	6
1	10.592	α -Туйен	929	0.54	-
2	10.801	α -Пинен	934	0.41	0.71
3	11.408	Камфен	948	-	0.82
4	12.360	β -Терпинен	962	-	0.35
5	12.418	β -Пинен	976	0.23	2.28
6	12.584	1-октен-3-ол	979	0.64	-
7	12.822	3-Октанон	983	0.27	-
8	13.356	α -Фелландрен	1002	0.13	-
9	13.796	α -Терпинен	1008	1.74	-
10	14.128	O-Цимен	1015	13.17	0.46
11	14.229	Лимонен	1023	0.43	0.47
12	14.301	1,8-Цинеол	1030	1.95	5.91
13	14.936	Δ -3-Карен	1033	0.07	-
14	14.957	<i>cis</i> - β -Оцимен	1037	-	1.87
15	15.297	γ -Терпинен	1057	11.13	0.41
16	15.535	<i>cis</i> -Сабинен гидрат	1070	0.89	-
17	15.571	<i>cis</i> - β -Терпинеол	1080	-	0.52
18	16.242	α -Терпинолен	1092	-	0.19
19	16.639	β -Линалоол	1103	0.71	6.19
20	18.002	(+)-Камфора	1144	-	0.76
21	18.233	Нерол оксид	1155	-	0.25
22	18.659	<i>endo</i> -Борнеол	1161	2.60	1.28
23	19.020	(-)-Терпинен-4-ол	1177	1.04	3.25
24	19.186	<i>cis</i> -Вербенол	1180	-	0.16
25	19.258	<i>p</i> -Цимен-8-ол	1183	0.08	0.13
26	19.431	α -Терпинеол	1189	0.05	5.39
27	20.528	<i>cis</i> -Гераниол	1228	0.49	0.11
28	20.701	Тимол метиловый эфир	1235	0.53	0.16
29	20.968	<i>iso</i> -Тимол метиловый эфир	1244	0.27	0.19
30	21.141	Тимохинон	1249	0.14	-
31	21.292	<i>trans</i> -Гераниол	1263	-	1.50
32	21.740	α -Цитраль	1270	-	0.79
33	22.180	<i>iso</i> -Борнил ацетат	1286	-	0.20
34	22.440	Тимол	1293	14.78	0.45
35	22.815	Карвакрол	1304	26.06	-
36	23.940	α -Терпинеол ацетат	1316	1.18	-
37	24.287	(<i>R</i>)-Лавандулил ацетат	1344	-	0.25
38	24.655	α -Копаен	1376	0.10	0.23

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6
39	24.814	Нерол ацетат	1387	0.90	-
40	24.900	(-)- β -Бурбонен	1404	0.19	0.67
41	25.816	Кариофиллен	1423	2.00	3.10
42	26.307	1Н-Циклопро[е]азулен	1449	0.69	0.10
43	26.675	Гумулен	1454	-	0.11
44	26.682	<i>cis</i> - α -Бисаболен	1461	0.12	0.13
45	27.252	γ -Муролен	1477	0.78	-
46	27.361	β -Копаен	1486	0.35	1.42
47	27.765	γ -Элемен	1498	-	1.00
48	27.844	α -Муролен	1505	0.24	0.94
49	28.075	β -Бисаболен	1540	5.16	0.16
50	28.205	γ -Кадинен	1542	0.65	-
51	28.428	Δ -Кадинен	1552	1.38	-
52	29.374	(\pm)- <i>trans</i> -Неролидол	1571	-	33.59
53	29.785	(-)-Спагуленол	1582	1.60	3.99
54	29.922	Кариофиллен оксид	1593	0.92	4.60
55	30.232	Алкофен Б	1627	-	1.24
56	31.279	α - <i>epi</i> -Кадинол	1649	0.14	0.90
57	31.711	Можжевеловая камфора	1709	-	4.16
58	32.382	Леден оксид-(I)	1890	0.24	-
Идентификация (%)				94.99	91.39
Монотерпены				27.85	7.56
Монотерпеноиды				51.67	27.49
Сесквитерпены				11.66	7.86
Сесквитерпеноиды				2.90	47.24
Другие				0.91	1.24
^A Компоненты указаны в порядке элюирования из колонки HP-5MS;					
^a IR:Идентификация по индексу удерживания и по сравнению масс-спектров.					

Поскольку тимьян ползучий является возобновляемым источником не только эфирного масла, но и других групп биологических веществ. Нами впервые проведено сравнительное изучение основных групп БАВ наземной части двух хемотипов тимьяна ползучего, произрастающих на территории Центрального Казахстана, что является первым этапом фитохимического исследования данного перспективного вида.

Содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот, органических кислот в исследуемых образцах определяли с использованием методик, описанных в Государственных Фармакопеях Республики Казахстан, Российской Федерации. Полученные результаты представлены в таблице 5.

Установлено, что трава тимьяна ползучего, произрастающего в Каркаралинске, отличается сравнительно большим содержанием флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ и аминокислот. Трава тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, содержит сравнительно большее количество

дубильных веществ и органических кислот.

Таблица 5 - Содержание основных групп БАВ в образцах травы тимьяна ползучего, произрастающих на территории Центрального Казахстана

Растительное сырье	Эфирное масло, %	Флавоноиды, %	Фенолкарбоновые кислоты, %	Дубильные вещества, %	Тритерпеновые соединения, %	Водорастворимые полисахариды, %	Пектиновые вещества, %	Аминокислоты, %	Органические кислоты, %
Трава тимьяна ползучего (образец 1)	1,38 ±0,03	5,22 ±0,04	1,52 ±0,06	12,00 ±0,28	2,40 ±0,12	5,82 ±0,14	16,74 ±0,34	0,92 ±0,03	5,54 ±0,21
Трава тимьяна ползучего (образец 2)	0,42 ±0,02	2,92 ±0,09	1,34 ±0,05	15,82 ±0,69	1,79 ±0,07	5,34 ±0,15	9,95 ±0,24	0,62 ±0,03	10,45 ±0,49

Минеральный состав растительного сырья изучали методом испарения с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан). Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Минеральный состав двух хемотипов тимьяна ползучего, собранных на территории Карагандинского региона

№	Химический элемент	Содержание (%)	
		Тимьян ползучий (образец 1)	Тимьян ползучий (образец 2)
1	2	3	4
1	Алюминий	397,40	1166,95
2	Барий	245,00	289,66
3	Бериллий	< 0,80	< 0,80
4	Бор 2	20,54	33,44
5	Ванадий 1	< 5	5,91
6	Висмут	< 1	< 1
7	Вольфрам	3,28	< 2
8	Галлий	< 3	< 3
9	Гафний	< 3	< 3

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
10	Германий	863,87	1734,25
11	Железо 1	< 10	< 10
12	Золото	< 5	< 5
13	Индий	< 0,50	< 0,50
14	Иттербий	< 3	< 3
15	Иттрий	< 3	< 3
16	Кадмий	< 1	< 1
17	Кобальт 1	< 5	< 5
18	Лантан	< 1	2,10
19	Литий 1	166,87	103,01
20	Марганец 1	10,22	12,59
21	Медь 1	< 1,50	< 1,50
22	Молибден 1	< 5	< 5
23	Мышьяк 1	< 10	< 10
24	Никель 1	< 5	< 5
25	Ниобий	< 1	< 1
26	Олово	< 10	< 10
27	Платина	< 10	< 10
28	Свинец	< 0,10	< 0,10
29	Серебро	< 1	< 1
30	Скандий	81,88	77,69
31	Стронций 2	< 5	< 5
32	Сурьма	< 10	< 10
33	Таллий	< 10	< 10
34	Тантал	< 20	< 20
35	Теллур	103,82	318,50
36	Титан	< 2	< 2
37	Торий	< 500	< 500
38	Уран	1334,83	1270,61
39	Фосфор 1	26,32	27,32
40	Хром 1	47,99	37,69
41	Цинк 1	< 20	< 20
42	Церий	2,90	3,86
43	Цирконий	397,40	1166,95

По результатам исследования минерального состава в двух образцах травы тимьяна ползучего определено наличие 43 биоэлементов. В траве тимьяна ползучего, произрастающей в Каркаралинске, установлены в значительных количествах железо (1734,25 мг/кг), фосфор (1270,61 мг/кг) и алюминий (1166,95 мг/кг), а тимьян ползучий, собранный в Корнеевке, содержит железа меньше в 2 раза (863,87 мг/кг), сравнительно столько же фосфора (1334,83 мг/кг) и алюминия меньше в 3 раза (397,40 мг/кг), все значения соответствуют требованиям ГФ РК.

Определение радионуклидов (Cs, Sr) в двух исследуемых образцах растительного сырья проводилось радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан).

По результатам определения радионуклидов, проведенного

радиохимическим методом без озоления в бета-спектре, установлено, что содержание радионуклидов (Cs, Sr), в двух исследуемых образцах растительного сырья соответствует требованиям ГФ РК и Ф ЕАЭС (таблица 7).

Таблица 7 - Результаты определения радионуклидов в двух хемотипах тимьяна ползучего, собранных на территории Карагандинского региона

Наименование растительного сырья	Содержание Cs-137, Бк/кг		Содержание Sr-90, Бк/кг	
	Норма по нормативным документам	Фактические данные	Норма по нормативным документам	Фактические данные
Трава тимьяна ползучего (образец 1)	200 Бк/кг	3 Бк/кг	100 Бк/кг	< 8 Бк/кг
Трава тимьяна ползучего (образец 2)	200 Бк/кг	11 Бк/кг	100 Бк/кг	< 10 Бк/кг

По результатам товароведческого анализа оба хемотипа травы тимьяна ползучего соответствуют требованиям ГФ РК и Ф ЕАЭС (таблица 8).

Таблица 8 - Результаты товароведческого анализа двух образцов травы тимьяна ползучего

Серия	Посторонние примеси, % не более 3 %	Потеря в массе при высушивании, % не более 10 %	Общая зола, % не более 10 %	Зола, нерастворимая в HCl, % не более 3 %	Микробиологическая чистота в соответствии с требованиями ГФ РК и Ф ЕАЭС
Трава тимьяна ползучего (образец 1)					
220717	2,26	6,54	8,77	2,33	соответствует
230717	2,21	6,48	8,72	2,29	соответствует
240717	2,23	6,51	8,75	2,31	соответствует
Трава тимьяна ползучего (образец 2)					
250717	2,09	6,79	8,91	2,19	соответствует
260717	1,96	6,72	8,84	2,05	соответствует
270717	2,02	6,76	8,87	2,14	соответствует

Полученные данные позволяют отметить, что в двух образцах травы тимьяна ползучего, содержится значительное количество различных классов биологически активных веществ, а именно, терпеноидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот. Наличие которых, в комплексе с количественным содержанием многих важнейших минеральных элементов, показывает необходимость дальнейшего фармакогностического и фитохимического

изучения данных видов растительного сырья, оценки их биологической активности с целью разработки новых отечественных лекарственных средств и более детального изучения сырьевой базы для обеспечения потребностей фармацевтической промышленности.

Таким образом, результаты исследований позволили определить, что тимьян ползучий, собранный на территории Центрального Казахстана, представлен двумя хемотипами. Хемотипы тимьяна ползучего имеют внешнее сходство, однако, под влиянием различных факторов окружающей среды определены отличия по внешней характеристике стеблей, листьев, соцветий, строению и опушению чашечки и венчика, что позволяет их использовать для идентификации вида. По внешним признакам, микроскопическим характеристикам, результатам товароведческого анализа оба образца соответствуют ГФ РК и Ф ЕАЭС.

Впервые проведено сравнительное фитохимическое изучение основных групп биологически активных соединений надземной части двух хемотипов травы тимьяна ползучего, произрастающих на территории Центрального Казахстана. Установлены значительные отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по количеству и компонентному составу эфирного масла, также по количественному содержанию флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот [141, 146].

3.2 Стандартизация лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего

Тимьян ползучий является перспективным источником не только эфирного масла, но и полифенольных соединений. Разработку показателей качества травы тимьяна ползучего проводили на 3 сериях опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК и Ф ЕАЭС. Результаты приведены в таблице 9.

Внешние признаки. Цельное сырье. Полукустарник высотой 4-10 см с лежащими одревесневшими стеблями и приподнимающимися травянистыми цветоносными ветвями, имеет цельные тонкие стебли, листья и цветки. Стебли тонкие высотой до 0,5 см, четырехгранные, зелено-коричневого цвета, иногда присутствует фиолетовый оттенок. Листья длиной около 1,5-2,2 см серовато-зеленого цвета с короткими черешками, продолговато-эллиптические, ланцетные, слабоопушенные, на нижней стороне листа резко выступают жилки. На поверхности листа заметны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев видны длинные щетинистые волоски. Цветки одиночные, мелкие, временами собраны в полумутовки по несколько штук. Цветок включает двугубую чашечку и двугубый венчик.

Таблица 9 - Контроль качества лекарственного растительного сырья «Тимьян ползучий трава» по показателям согласно НД

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Трава тимьяна ползучего (образец 1) Серия			Трава тимьяна ползучего (образец 2) Серия		
			220717	230717	240717	250717	260717	270717
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Идентификация: А. Внешние признаки	А. Визуально	А. Соответствие морфологическим признакам при просмотре невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
В. Микроскопия	В. ГФ РК I, Т. 2, 2.8.3 Ф ЕАЭС 2.1.8.17	В. Соответствие анатомическим признакам при просмотре под микроскопом с увеличением (не менее 40х).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
С. - цинарозид	С. ТСХ ГФ РК I, Т. 2, 2.2.27 Ф ЕАЭС 2.1.2.26	С. Rf около 0,45 (кислота муравьиная-вода очищенная-этилаце-тат 15:15:70).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Д. - флавоноиды	Д. Качественная реакция	Д. - реакция с кислотой хлороводородной концентрированной при добавлении металлического магния или цинка, наблюдается оранжевое окрашивание (флавоноиды).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Посторонние примеси: - пожелтевшие, побуревшие и почерневшие части растения	ГФ РК I, Т. 1, 1.4 Ф ЕАЭС 2.1.8.2	Не более 1,0%.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
- органические примеси - минеральные примеси		Не более 0,5%. Не более 0,5%.	соот-ет соот-ет	соот-ет соот-ет	соот-ет соот-ет	соот-ет соот-ет	соот-ет соот-ет	соот-ет соот-ет
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК I, Т. 1, 2.2.32 Ф ЕАЭС 2.1.2.31	Не более 10,0%	6,54	6,48	6,51	6,79	6,72	6,76
Общая зола	ГФ РК I, Т. 1, 2.4.16 Ф ЕАЭС 2.1.4.16	Не более 10,0%	8,77	8,72	8,75	8,91	8,84	8,87
Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной	ГФ РК I, Т. 1, 2.5.12 Ф ЕАЭС 2.1.8.1	Не более 3,0 %	2,33	2,29	2,31	2,19	2,05	2,14
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, Т. 1, 5.1.4 Категория 3; 2.6.12 и 2.6.13 Ф ЕАЭС 2.3.1.4	В 1.0 г сырья допускается общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^5 бактерий, не более 10^4 грибов и не более 10^3 энтеробактерий. Не допускается наличие <i>Escherichia</i> <i>coli</i> в 1.0 г и <i>Salmonella</i> в 10.0 г.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Радионуклиды:	В соответст- вии с НД	Сырье должно выдерживать требова- ниям СанПиН №4.01.071.03.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Тяжелые металлы	ГФ РК, Т. 1, с. 558, 2.4.8, метод А Ф ЕАЭС 2.1.4.21	Не более 0,01 %	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид	УФ-спектрофотометрия; ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29 Ф ЕАЭС 2.1.2.24	Не менее 2,0 %	5,22	5,19	5,15	2,92	2,87	2,90

Чашечка красновато-коричневого цвета около 0,4 см, венчик синевато-фиолетового цвета длиной 0,5-0,8 см, 4 тычинки, пестик с четырехраздельной верхней завязью [141].

Измельченное сырье. Воздушно-сухое сырье (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) измельченное до размера 2-3 мм, проходящие сквозь сито диаметром 5 мм.

Микроскопия. Микроскопию препаратов осуществляют согласно ГФ РК I, Т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» [124, 141].

Диагностические признаки тимьяна ползучего: для стебля - форма поперечного среза стеблей, тип опушения; для листа - общая форма листовой пластинки, реснитчатый край, наличие большого количества, слегка погруженных в эпидерму листа, эфирно-масличных железок; для чашечки - форма и цвет чашечки, строение зубцов, степень опушения, размещение трихом.

Идентификацию травы тимьяна ползучего также проводили реакцией на присутствие в сырье флавоноидов. Сумму флавоноидов из растительного сырья получали экстракцией 70% этанолом 3-х кратно. К 20 мг экстракта, растворенного в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

Наличие флавоноида цинарозида в сырье определяла методом ТСХ (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.27).

На стартовую линию хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) 7,5 x 15 мм наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, рядом 5 мкл (0,005 мл) стандартного образца цинарозида 0,1 % раствора. Пластинку высушивают на воздухе 5 минут, помещают в камеру с залитой системой растворителей: кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70) и проводят хроматографирование восходящим способом (смесь растворителей используют свежеприготовленной и вносят в камеру перед хроматографированием непосредственно). При прохождении фронта растворителя до конца пластинки, пластинку вынимают, сушат в вытяжном шкафу до удаления запаха растворителей, далее обрабатывают спиртовым раствором алюминия хлорида 2 %, высушивают. На хроматограмме стандартного образца цинарозида появляется пятно желтого цвета. На хроматограмме анализируемого образца должно присутствовать пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.

Приготовление растворов сравнения. 10 мг цинарозида (СО) растворяют в 10 мл 70 % этанола.

Количественное определение. Количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид, в растительном сырье осуществляли методом УФ-спектрофотометрии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29).

Количественное определение суммы флавоноидов в ЛРС определяли

спектрофотометрическим методом по следующей методике [13]:

К около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья приливали 100 мл 70% спирта этилового и экстрагировали в колбе со шлифом объемом 250 мл, на водяной бане, при температуре кипения экстрагента в течение 1 часа. Извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр и получили раствор А.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 70 % спирте этиловом и через 10 мин - 1 мл 3 % раствора кислоты уксусной, доводили объем раствора 70 % спирте этиловом до метки, перемешивали и оставляли на 30 мин (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, который состоял из 2,5 мл раствора А, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной, доведенный 70% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид, в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_1 \times a \times 2,5 \times (100-W)}, \quad (2)$$

где А - оптическая плотность раствора Б;

А₁ - удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Изучение стабильности лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего проведено при хранении в следующих условиях: 25°С±2°С, относительная влажность воздуха не более 60±5%. На хранение были заложены 3 серии травы тимьяна ползучего. Основные показатели качества контролировали согласно НД каждые три месяца на протяжении 1-го года и каждые шесть месяцев в течение 2-го года хранения. В ходе хранения существенных изменений показателей качества не установлено (таблицы 10-12). На основании полученных результатов установлен срок хранения травы тимьяна ползучего 2 года.

Тимьян ползучий - перспективный возобновляемый источник не только эфирных масел, но и полифенольных соединений. По результатам исследования установлено, что тимьян ползучий является одним из наиболее распространенных видов рода Тимьян на территории Центрального Казахстана [147].

Таблица 10 – Изучение стабильности травы тимьяна ползучего, серия 220717

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 220717										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья <i>Thymus serpyllum</i> L.). Запах ароматный, Вкус водного извлечения горьковато-пряный.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - флавоноиды		В соответствии с НД	К 20 мг экстракта, растворенного в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание Rf около 0,45 (кислота муравьиная-вода очищенная-этилаце-тат 15:15:70)	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
- потемневшие и побуревшие части сырья		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 10.0 %	5,18	5,13	5,10	5,17	5,18	5,16	5,19
- органические примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
минеральные примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,44	0,44
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32	не более 10.0 %	6,54	6,56	6,58	6,55	6,57	6,57	6,94
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,13	6,18	6,15	6,11	6,18	6,14	6,14

Продолжение таблицы 10

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид		В соответствии с НД	не менее 2%	5,24	5,22	5,21	5,22	5,20	5,18	5,16
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	В 1.0 г сырья допускается общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ бактерий, не более 10 ⁴ грибов и не более 10 ³ энтеробактерий. Не допускается наличие <i>Escherichiacoli</i> в 1.0 г и <i>Salmonella</i> в 10.0 г.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

Таблица 11 – Изучение стабильности травы тимьяна ползучего, серия 230717

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 230717										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья <i>Thymus serpyllum</i> L.). Запах ароматный, Вкус водного извлечения горьковато-пряный.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - флавоноиды - цинарозид		В соответствии с НД	К 20 мг экстракта, растворенного в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание Rf около 0,45 (кислота муравьиная-вода очищенная-этилаце-тат 15:15:70)	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
- потемневшие и побуревшие части сырья		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 10.0 %	5,22	5,24	5,22	5,27	5,18	5,2	5,19
- органические примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8
минеральные примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,47	0,47	0,43	0,43	0,45	0,47	0,44
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32	не более 10.0 %	6,88	6,86	6,88	6,85	6,87	6,87	6,84
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,33	6,38	6,35	6,31	6,38	6,34	6,34

Продолжение таблицы 11

Количественное определение: -		В соответствии с НД	не менее 2%	5,34	5,32	5,31	5,32	5,20	5,18	5,16
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК, т.1, 2.6.12 и ГФ РК, т.2, 2.6.13	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

Таблица 12 – Изучение стабильности травы тимьяна ползучего, серия 240717

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 240717										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья <i>Thymus serpyllum</i> L.). Запах ароматный, Вкус водного извлечения горьковато-пряный.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Идентификация - флавоноиды		В соответствии с НД	К 20 мг экстракта, растворенного в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание Rf около 0,45 (кислота муравьиная-вода очищенная-этилаце-тат 15:15:70)	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
- потемневшие и побуревшие части сырья		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 10.0 %	5,28	5,33	5,20	5,27	5,18	5,26	5,19
- органические примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,6	0,7	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7
минеральные примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,41	0,44	0,43	0,42	0,43	0,43	0,44
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32	не более 10.0 %	6,74	6,77	6,78	6,75	6,77	6,57	6,74
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,23	6,28	6,25	6,11	6,28	6,14	6,24
Количественное определение: -		В соответствии с НД	не менее 2%	5,23	5,22	5,24	5,21	5,22	5,19	5,16
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК, т.1, 2.6.12 и ГФ РК, т.2,2.6.13	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

В результате изучения сырьевых запасов тимьяна ползучего на территории Карагандинской области определено, что общий эксплуатационный запас сырья в исследованных сообществах составляет 14,5 ц/га. Доступный объем для заготовки каждый год тимьяна ползучего определен в 7,26 ц/га.

Таким образом, разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава» и проведена его стандартизация (Приложение Б). Нами предложена стандартизация травы тимьяна ползучего по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид. На основании результатов изучения стабильности установлен срок хранения травы тимьяна ползучего 2 года.

Выводы по главе 3

1. Впервые проведен сравнительный фармакогностический анализ надземной части двух образцов тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области. Результаты исследований позволили определить, что тимьян ползучий, собранный на территории Центрального Казахстана, представлен двумя хемотипами. Хемотипы тимьяна ползучего имеют внешнее сходство, однако, под влиянием различных факторов окружающей среды определены некоторые отличия по внешней характеристике стеблей, листьев, соцветий, строению и опушению чашечки и венчика, что позволяет их использовать для идентификации вида. По внешним признакам и микроскопическим характеристикам, результатам товароведческого анализа оба образца травы тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области, соответствуют ГФ РК и Ф ЕАЭС.

По количественному содержанию эфирного масла в растительном сырье, оба образца травы тимьяна ползучего отвечают требованиям ГФ РК. Однако, по наличию тимола и карвокрола, тимьян ползучий, собранный в горно-лесном массиве Каркаралинска, соответствует требованиям ГФ РК, а тимьян ползучий, произрастающий в Корнеевских лесах, не соответствует требованиям ГФ РК.

2. Впервые проведено сравнительное фитохимическое изучение основных групп биологически активных соединений надземной части двух хемотипов травы тимьяна ползучего, произрастающих на территории Центрального Казахстана. Установлены значительные отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по количеству и компонентному составу эфирного масла, также по количественному содержанию флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот.

3. Разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава» и проведена его стандартизация. Нами предложена стандартизация травы тимьяна ползучего по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид. На основании результатов изучения стабильности установлен срок хранения травы тимьяна ползучего 2 года.

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО

4.1 Разработка нового способа получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвуковой экстракции

В настоящее время в фармацевтической промышленности для получения жидкого экстракта тимьяна ползучего используют классический метод реперколяции. «Чабреца экстракт жидкий» зарегистрирован как отхаркивающее средство растительного происхождения [108].

Применяется способ получения отхаркивающего средства - жидкого экстракта чабреца, заключающийся в экстракции растительного сырья травы тимьяна ползучего 30% спиртом этиловым в соотношении 1:1. В экстрагент добавляют глицерин в количестве 10% от массы сырья. В качестве способа экстрагирования используют реперколяцию в модификации ВНИИФ. Процесс проводят в батарее из трех диффузоров. Измельченное сырье укладывают поровну в 3 перколятора, экстрагент делят на три равные части. Первую порцию сырья экстрагируют чистым экстрагентом (смесь глицерина и 30% спирта этилового), а каждую последующую (вторую, третью) экстрагируют вытяжкой, полученной при экстрагировании предыдущей порции сырья. Готовые порции вытяжки получают из третьего диффузора. Готовые порции вытяжки смешивают, отстаивают при температуре не выше 10°C не менее двух суток. Процесс экстрагирования занимает 30 часов, отстаивания и фильтрация занимают еще 2,5 суток. Итого продолжительность технологического процесса получения одной серии экстракта чабреца жидкого занимает 90 часов или 3,75 суток (рисунок 8) [109]. Получают прозрачную, бурюю жидкость, с содержанием спирта не менее 22%, плотность не более 1,01, экстракционных веществ 8% [108].

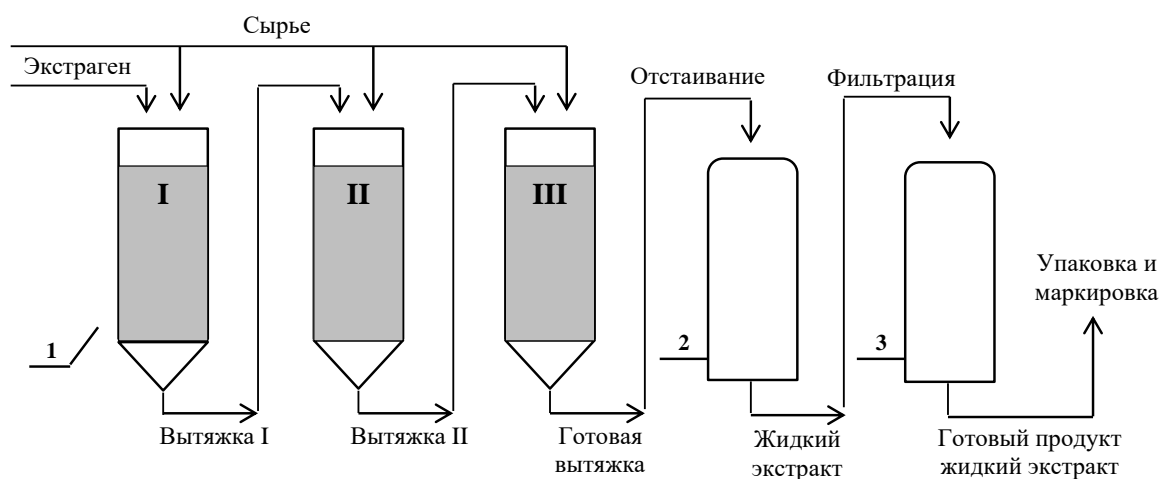


Рисунок 8 - Аппаратурная схема получения жидкого экстракта чабреца

Недостатки технологии – производственный процесс является многоступенчатой, трудоемкой и времязатратной (90 часов или 3,75 суток).

Нами впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из травы

тимьяна ползучего, произрастающей в природе Центрального Казахстана, применена ультразвуковая экстракция.

В мировой практике экспериментально установлено, что наиболее эффективными растворителями для извлечения суммы флавоноидов из растительного сырья являются 96% этанол и 70% этанол, поэтому они были выбраны в качестве экстрагентов.

Для исследования влияния выбора экстрагента и частоты ультразвукового излучения на выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего, нами впервые проведена двукратная экстракция воздушно-сухого сырья (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 96% этанолом, 70% этанолом, без замачивания, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане, при частоте ультразвукового излучения 28 кГц, 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 30 минут. После ультразвуковой обработки жидкие экстракты отфильтровывали и экстрагенты упаривали на роторном испарителе при температуре 50°C. Остаточное количество экстрагентов из густых экстрактов выпаривали на водяной бане при температуре 70°C и получили сухие экстракты. Полученные результаты представлены в таблицах 13, 14.

Таблица 13 - Условия экстракции и выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 1)

№ образца	Условия экстракции		Выход суммы экстрактивных веществ, %
	Экстрагент	Частота ультразвукового излучения, кГц	
Образец 1	96% этанол	28 кГц	2,08±0,05
Образец 2	70% этанол	28 кГц	14,14±0,12
Образец 3	96% этанол	40 кГц	2,13±0,07
Образец 4	70% этанол	40 кГц	14,25±0,14

Как видно из таблицы 13, использование в качестве экстрагента 70% этанола увеличивает выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 1) в 7 раз и составляет 14,14-14,25%. При этом, изменение частоты ультразвукового излучения, при аналогичных условиях экстракции, существенного влияния на выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 1) не оказывает 14,14% и 14,25% соответственно.

Результаты, представленные в таблице 14, также подтверждают, что применение в качестве экстрагента 70% этанола увеличивает выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 2) в 6 раз и составляет 6,12-6,30%. Также изменение частоты ультразвукового излучения значимого влияния на выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 2) не оказывает 6,12% и 6,30% соответственно.

Таблица 14 - Условия экстракции и выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего (образец 2)

№ образца	Условия экстракции		Выход суммы экстрактивных веществ, %
	Экстрагент	Частота ультразвукового излучения, кГц	
Образец 1	96% этанол	28 кГц	1,21±0,07
Образец 2	70% этанол	28 кГц	6,12±0,09
Образец 3	96% этанол	40 кГц	1,34±0,08
Образец 4	70% этанол	40 кГц	6,30±0,08

Кроме того установлено, что при аналогичных условиях экстрагирования, выход сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего (образец 1) значительно больше 14,25±0,14%, чем выход сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего (образец 2) 6,3±0,08% ($p < 0,001$).

Проведенные исследования показывают, что количественный выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего, обеспечивает двукратная экстракция воздушно-сухого сырья ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 70% этанолом при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, в течение 30 минут.

Таким образом, разработан метод интенсификации процесса получения сухого экстракта из тимьяна ползучего, который за счет применения ультразвуковой экстракции, характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным [120, 121] (Приложение В).

4.2 Исследование химического состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего

В последние годы возрастает интерес к изучению биологических свойств тимьяна дикого, так как растение представляет собой высококачественное сырье, богатое не только эфирным маслом, но и фармакологически активными полифенольными соединениями, в частности, флавоноидами и фенольными кислотами.

Флавоноиды - одна из самых распространенных групп фенольных соединений растений, которые обладают ценными фармакологическими свойствами, такими как противовоспалительной, диуретической, желчегонной, спазмолитической, противовирусной, антиоксидантной, антимикробной и другими видами активности [148-153].

Для количественного определения флавоноидов наиболее часто применяются УФ-спектрофотометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [154-157]. Метод УФ-спектрофотометрии позволяет определить количественное содержание суммы полифенольных соединений в растительных объектах, в тоже время, с использованием метода ВЭЖХ, как

правило, определяют качественный состав и количественное содержание индивидуальных компонентов в исследуемых образцах [154, 157].

Также для качественной оценки и количественного определения БАВ в растительном сырье активно используется дифференциальная УФ-спектрофотометрия [157]. Суть дифференциальной УФ-спектрофотометрии основана на образовании стабильного комплекса между катионом алюминия, карбонилем и гидроксильными группами флавоноида, в результате происходит bathochromный сдвиг максимума поглощения флавоноидов в УФ-спектре с 330-350 нм до 390-410 нм [158-161].

УФ-спектры ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего и стандартного образца цинарозида снимали на УФ-спектрофотометре Implen «Nanophotometr P 330» (Германия) от 200 до 500 нм (рисунки 9, 10).

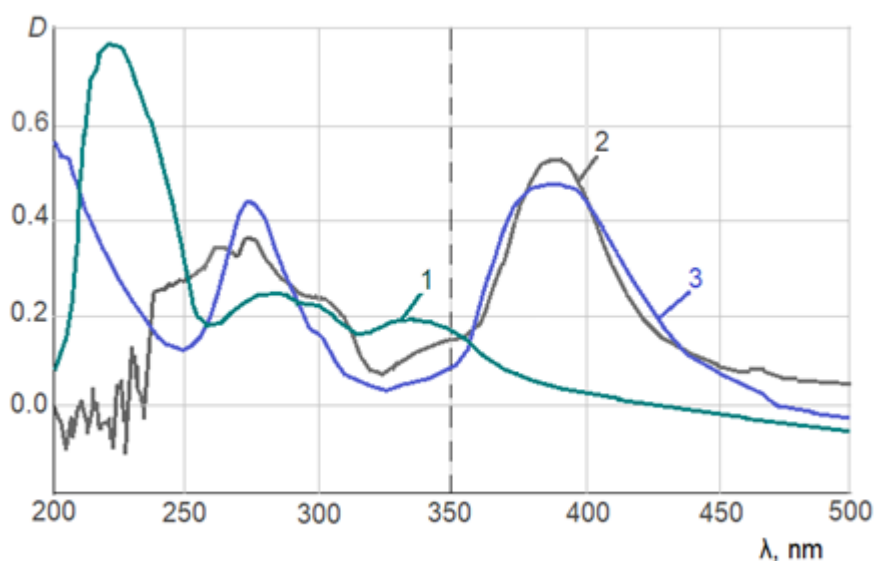


Рисунок 9 – УФ-спектры: 1 – раствора ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 1); 2 - раствора ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 1) с алюминия хлоридом; 3 - раствора РСО цинарозида с алюминия хлоридом

Анализ УФ-спектров растворов ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего в 70% спирте этиловом выявил два выраженных максимума поглощения в области 288 ± 2 нм и 334 ± 2 нм, данные максимумы поглощения спектра характерны для флавоноидов [159, 160]. При добавлении алюминия хлорида в УФ-спектрах растворов ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего появляются максимумы поглощения при 276 ± 2 нм и 395 ± 2 нм, которые совпадают с максимумами поглощения спектра РСО цинарозида с алюминия хлоридом.

Полученные данные позволяют предположить, что флавоноидный гликозид цинарозид (лютеолин-7-О-гликозид) является преобладающим компонентом ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего, что дает нам основание использовать дифференциальную спектрофотометрию для

количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид [62, 161].

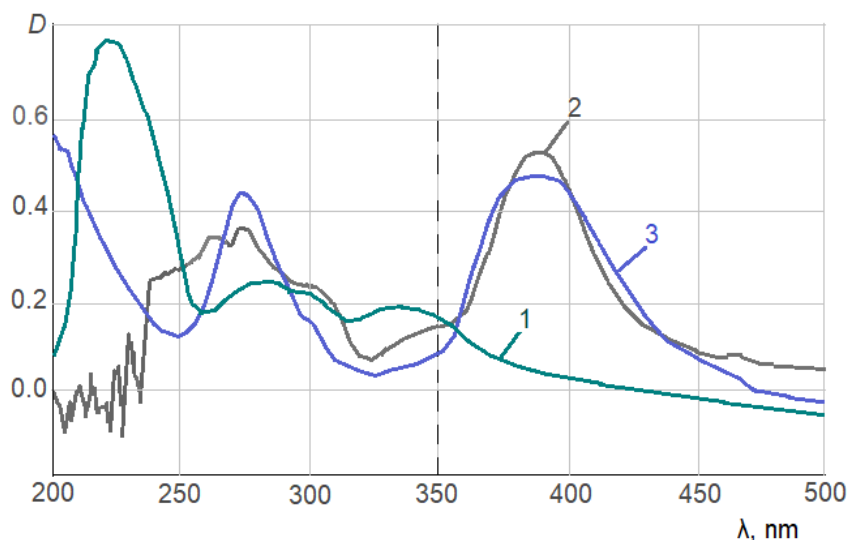


Рисунок 10 – УФ-спектры: 1 – раствора ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 2); 2 - раствора ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 2) с алюминия хлоридом; 3 - раствора РСО цинарозида с алюминия хлоридом

Сделанное нами предположение было научно обосновано с применением ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС при проследующей работе, цинарозид является основным компонентом ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего.

Для анализа полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS) [125].

В исследовании были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (ACN) для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Франция), муравьиная кислота (99-100%, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Франция), вода высокой степени очистки приготовлена с использованием системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция). Стандарты 20 фенольных соединений: кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин 3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол (Sigma – Aldrich, США).

Анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» (Agilent Technologies, США), оборудованном четырехканальным насосом G1311C 1260 Pump VL, автосамплером G1329B 1260 ALS, термостатом колонки G1316A 1260 TCC; детектором с переменной длиной волны G1314C

1260 VWD VL + и масс-спектрометром G6130A Quadrupole LC-MS/MS. Использовалось программное обеспечение ChemStation с управлением Windows NT.

Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом «Zorbax Eclipse Plus C18» (150 мм × 4,6 мм, 3,5 мкм, Agilent Technologies, США). Для разделения использовали градиент подвижной фазы А (2,5% раствор муравьиной кислоты в воде) и подвижной фазы В (2,5% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле). Профиль градиента был установлен следующим образом: 0,00 мин 3% элюент В, 7,00 мин 20% элюент В, 7,10 мин 30% элюент В, 27,00 мин 40% элюент В, 35,00 мин 50% элюент В, 35,10 мин 20% элюент В и 40.00 мин. 3% элюент В. Скорость потока 0,4 мл/мин, температура колонки 30 °С. Ультразвуковые экстракты и стандарты растворяли в смеси растворителей ацетонитрил: вода = 1:1 (об./об.). Объем инъекции составлял 20 мкл для растворов экстрактов и стандартов. Выходящий из колонки поток проходил через УФ-детектор до попадания на интерфейс МС. Длины волн УФ-детектирования составляли 280 нм и 360 нм. Детектирование масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением проводили в отрицательном режиме со следующими оптимизированными параметрами: температура капилляра 350°С; осушающий газ N₂ 8 л/мин; давление распылителя 45 фунтов на квадратный дюйм. Сбор данных осуществлялся с использованием метода мониторинга множественных реакций (MRM), который отслеживает только определенные массовые переходы в течение заданного времени удерживания.

Идентификация каждого соединения была выполнена путем сравнения их времени удерживания с аутентичными стандартами, а также подтверждена спектрометром Agilent G6130A LC-MS/MS, оборудованным источником ионизации электрораспылением. Уровень содержания фенольных соединений в экстрактах рассчитывали методом внешнего стандарта.

Состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего и масс-спектры для идентифицированных соединений в режиме отрицательной ионизации перечислены в таблице 15. Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего представлены на рисунках 11, 12.

Как видно из таблицы 15, в ультразвуковых экстрактах двух хемотипов тимьяна ползучего всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. У полученных ультразвуковых экстрактов обнаружено сходство по качественному составу фенольных соединений, но установлены значительные отличия по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов, кроме розмариновой кислоты. Доминирующими полифенольными соединениями в исследуемых ультразвуковых экстрактах являются цинарозид с содержанием 94,69 и 119,26 мг/г, розмариновая кислота (32,61 и 32,62 мг/г), нарингенин (7,69 и 17,82 мг/г) и эпикатехин (9,03 и 11,74 мг/г) соответственно. Таблица 15 – Идентификация и содержание фенольных соединений в ультразвуковых экстрактах двух хемотипов тимьяна ползучего

Номер пика	Время удерживания (мин)	M-H ⁻ (m/z)	Идентифицированные компоненты	Содержание (мг/г на массу экстракта)	
				Ультразвуковой экстракт т. ползучего (образец 1)	Ультразвуковой экстракт т. ползучего (образец 2)
1	3.928	179	Кофейная кислота	0,07±0,01	0,53±0,04
2	4.932	169	Галловая кислота	3,89±0,11	4,18±0,12
3	13.466	353	Хлорогеновая кислота	0,46±0,04	0,92±0,04
4	15.588	289	Катехин	1,74±0,07	1,30±0,04
5	17.187	289	Эпикатехин	9,03±0,11	11,74±0,15
6	19.166	609	Рутин	2,54±0,08	2,94±0,09
7	19.880	447	Лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид)	94,69±0,24	119,26±0,32
8	21.926	193	Феруловая кислота	2,64±0,06	3,03±0,05
9	22.699	359	Розмариновая кислота	32,61±0,13	32,62±0,15
10	23.327	317	Мирицетин	3,08±0,09	2,95±0,12
11	30.956	301	Кверцетин	0,65±0,04	0,47±0,05
12	33.723	271	Нарингенин	7,69±0,20	17,82±0,34
13	35.360	269	Апигенин	1,16±0,08	0,72±0,05
14	37.057	285	Лютеолин	0,87±0,05	1,30±0,07
15	38.924	285	Кемпферол	0,53±0,04	0,19±0,05
Флавоноиды				121,98	158,69
Фенольные кислоты				39,67	41,28

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) содержит сравнительно большее количество флавоноидов катехина, мирицетина, кверцетина, апигенина и кемпферола. В ультразвуковом экстракте тимьяна ползучего (образец 2) установлено сравнительно большее содержание флавоноидов цинарозида, нарингенина, эпикатехина, рутина и лютеолина, а также фенольных кислот - кофейной, галловой, хлорогеновой и феруловой кислот.

Впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. У полученных ультразвуковых экстрактов обнаружено сходство по качественному составу фенольных соединений, но установлены значительные отличия по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов, кроме розмариновой кислоты. Доминирующими полифенольными соединениями в исследуемых экстрактах являются цинарозид, розмариновая кислота, нарингенин и эпикатехин.

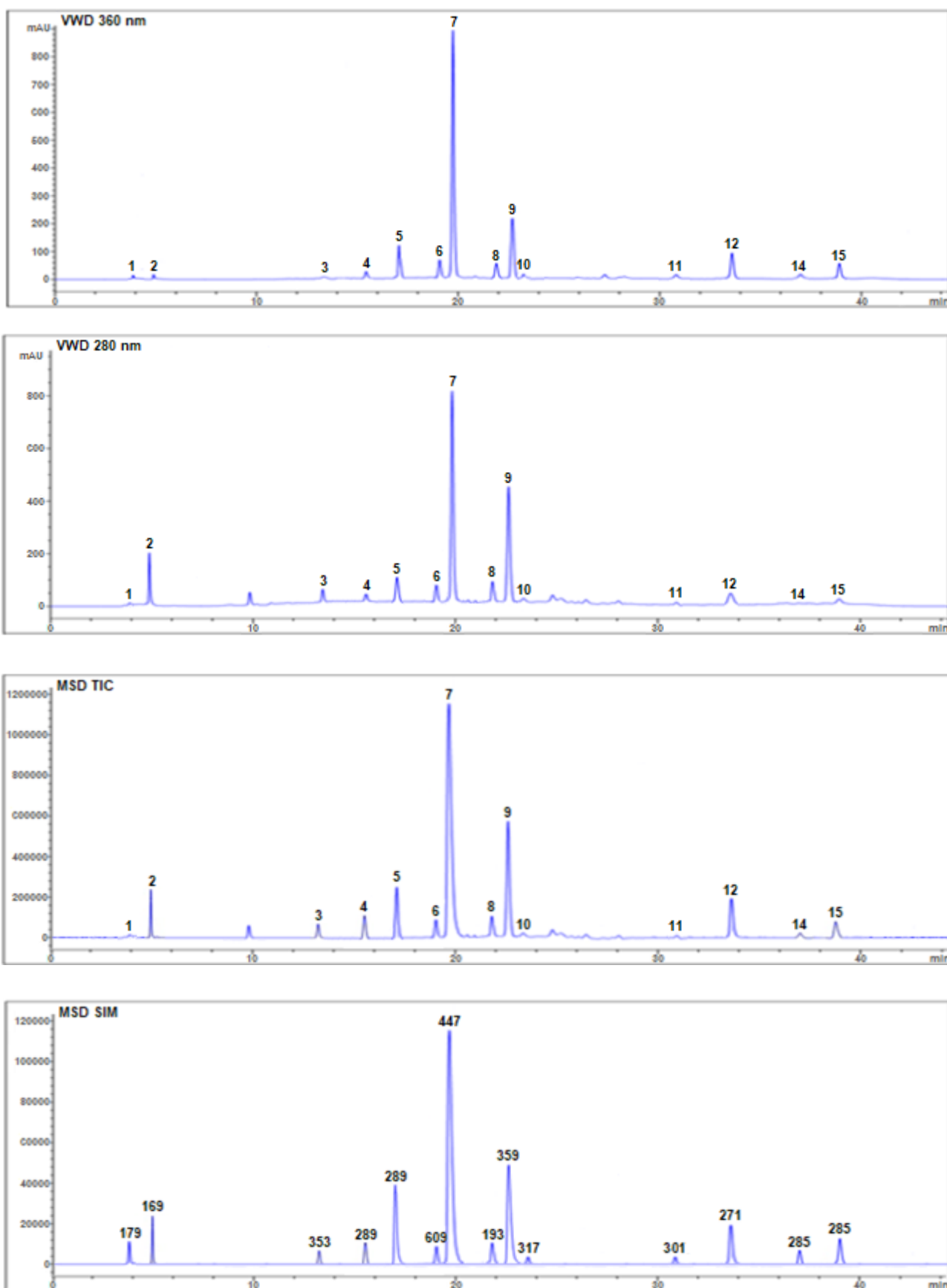


Рисунок 11 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС: суммарная ионная хроматограмма (ТIC) и идентифицированных фенольных соединений (SIM) ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 1)

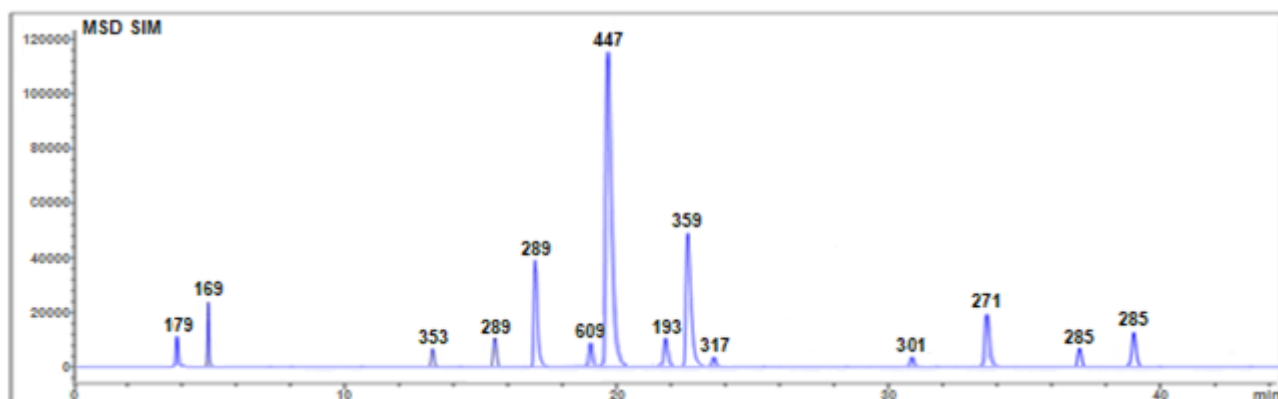
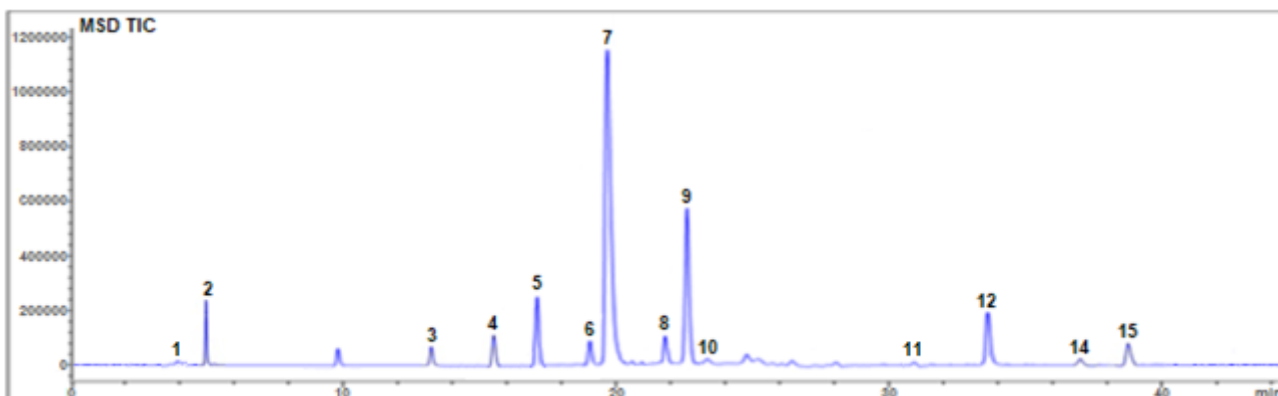
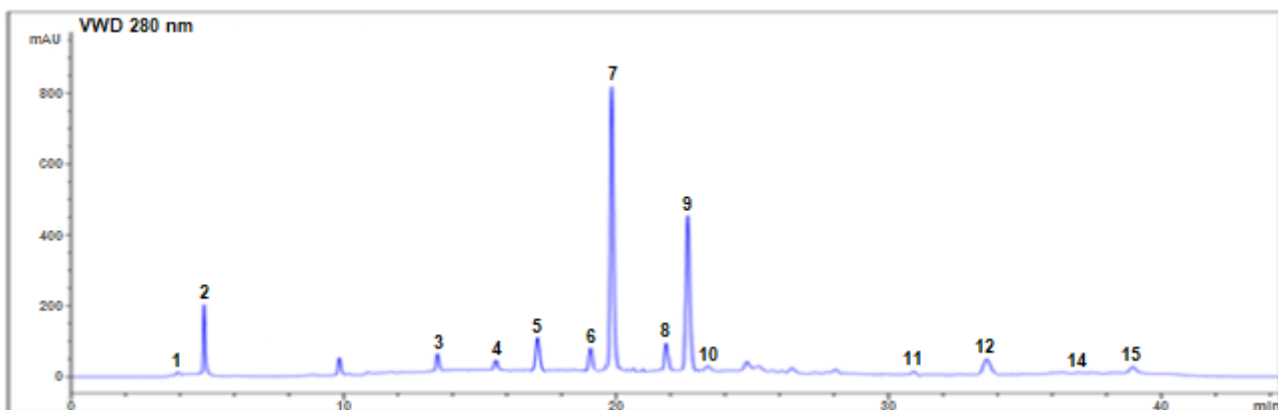
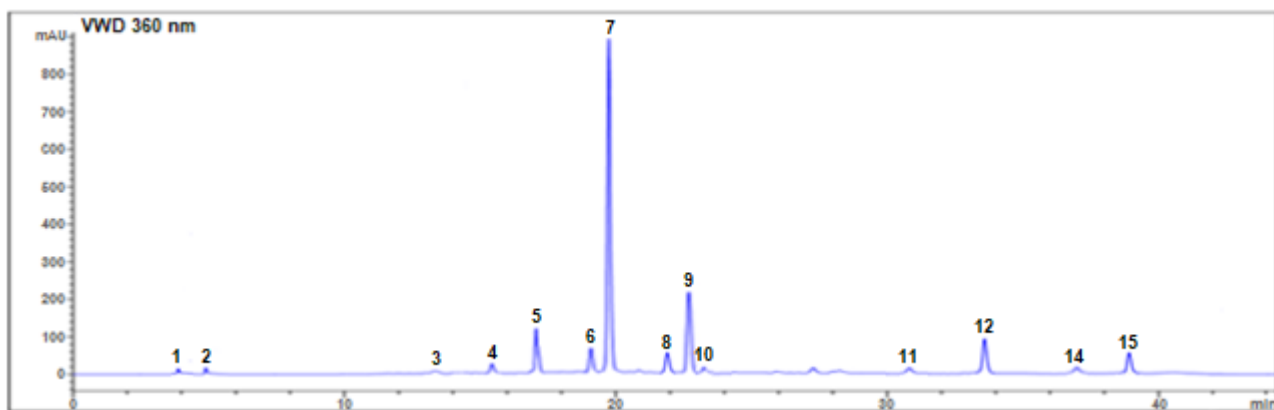


Рисунок 12 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС: суммарная ионная хроматограмма (TIC) и идентифицированных фенольных соединений (SIM) ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 2)

4.3 Технология получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего

Впервые разработана технология получения и организован выпуск опытных партий ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

Технология состоит из двух этапов:

Этап 1 - получение густого экстракта. Воздушно-сухое сырье тимьяна ползучего (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) дважды экстрагируют 70% этанолом, без замачивания, соотношение массы сырья и объема экстрагента 1:20, на ультразвуковой бане при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 30 минут.

Жидкий экстракт тимьяна ползучего фильтруют через бумажный фильтр. В роторном испарителе проводится упаривание экстрагента при температуре 50°C, получают густой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего.

Этап 2 - получение сухого экстракта. Из густого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего остаточный растворитель выпаривают на водяной бане при температуре 70°C. Получают сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего.

На рисунке 13 представлена аппаратная схема получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

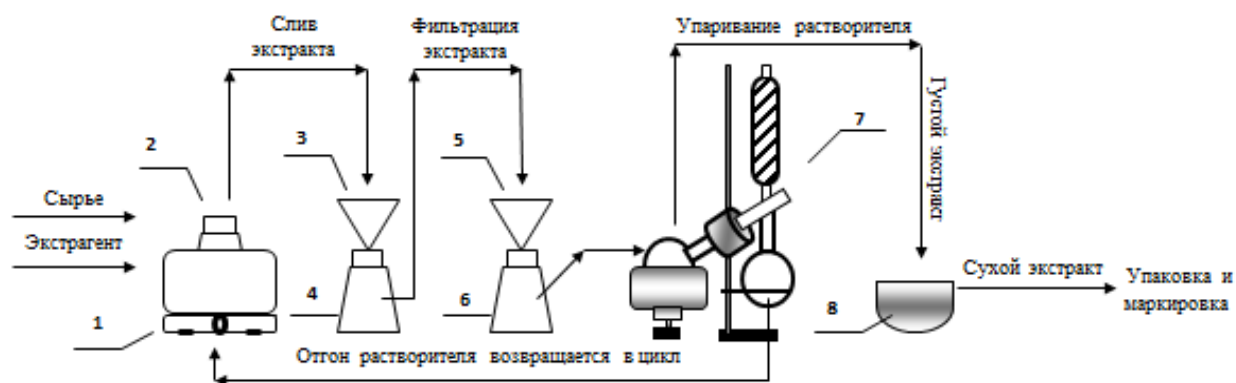


Рисунок 13 - Аппаратурная схема получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего

В таблице 16 представлено сравнение основных показателей технологий получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (СУЭТП) и жидкого экстракта чабреца (ЖЭЧ).

Преимуществом разработанной технологии является увеличение производительности технологического процесса в 2,5 раз и значительное сокращение его продолжительности в 18 раз, увеличение выхода готового продукта.

Таблица 16 - Сравнение основных показателей технологий получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (СУЭТП) и жидкого экстракта чабреца (ЖЭЧ)

Показатели	СУЭТП	ЖЭЧ	Эффективность
Продолжительность технологического процесса	5 часов	90 часов	Снижена в 18 раз
Производительность технологического процесса	2,5 кг	1 кг	Увеличена в 2,5 раза
Выход продукта	Сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего – сумма экстрактивных веществ 14 %	Жидкий экстракт чабреца с содержанием суммы экстрактивных веществ 8 %	Увеличен в 1,75 раза
Применение	На основе сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего можно получать твердые лекарственные формы (таблетки, капсулы и т.д.), жидкие лекарственные формы (сиропы, эликсиры и т.д.) и мягкие лекарственные формы (мази, суппозитории и т.д.).	Жидкий экстракт травы тимьяна ползучего входит в состав комплексных препаратов «Пертуссин», «Мелрозум», «Коделак® бронхо с чабрецом», «Стоптуссин-Фито» и других, которые производится в виде сиропа или эликсира и применяется в качестве отхаркивающего средства в комплексной терапии острых респираторных заболеваний, трахеитов, бронхитов, а также при коклюше у детей.	На основе сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего можно получать твердые лекарственные формы (таблетки, капсулы и т.д.), жидкие лекарственные формы (сиропы, эликсиры и т.д.) и мягкие лекарственные формы (мази, суппозитории и т.д.).

Таким образом, разработана, апробирована и внедрена технология получения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего, которая характеризуется значительным уменьшением продолжительности и увеличением производительности технологического процесса, увеличением выхода готового продукта и содержания действующих веществ, отсутствием токсичных растворителей.

4.4 Разработка показателей качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

Для контроля качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой, на основе проведенных исследований, в соответствии с требованиями ГФ РК и Ф ЕАЭС, разработан проект НД и проведена стандартизация 5 серий опытной партии. Показатели качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой представлены в таблице 17.

В спецификацию качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой включены следующие показатели:

Описание. Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.

Растворимость. Легко растворим в 70% этаноле *P*, диметилсульфоксиде *P*. Частично растворим в 96% этаноле *P*, воде очищенной *P*. Практически не растворим в хлороформе *P*, этилацетате *P* (ГФ РК I, Т. 1, 1.4).

Идентификация. К 20 мг субстанции, растворенной в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

На стартовую линию хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) 7,5 x 15 мм наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, рядом 5 мкл (0,005 мл) стандартного образца цинарозида 0,1 % раствора. Пластинку высушивают на воздухе 5 минут, помещают в камеру с залитой системой растворителей: кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70) и проводят хроматографирование восходящим способом (смесь растворителей используют свежеприготовленной и вносят в камеру перед хроматографированием непосредственно). При прохождении фронта растворителя до конца пластинки, пластинку вынимают, сушат в вытяжном шкафу до удаления запаха растворителей, далее обрабатывают спиртовым раствором алюминия хлорида 2 %, высушивают. На пластинке ТСХ СО цинарозида проявляется в виде пятна желтого цвета. На пластинке ТСХ испытуемого раствора, на уровне зоны адсорбции СО цинарозида, должно быть установлено наличие пятна желтого цвета (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.27).

Вода. Потеря в массе при высушивании должна быть не более 0,5% (ГФ РК I, Т. 1, 2.5.12).

Тяжелые металлы. Определяют по методике (ГФ РК I, Т. 1, с. 558 2.4.8, метод А), допускается не более 0,01 %.

Остаточные количества этанола. Содержание должно соответствовать требованиям ГФ РК I, Т. 1, 5.4, не более 0,5 %. Определение проводят с применением газовой хроматографии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.28).

Микробиологическая чистота. Определяют по методике ГФ РК I, Т. 1, 2.6.12 и 2.6.13. Микробиологическая чистота субстанции должна отвечать требованиям ГФ РК I, Т. 1, 5.1.4, категория 4 В и Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.9.10.

Количественное определение. Количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид, в субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой проводят методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29 и Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.2.27).

Таблица 17 - Контроль качества субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой по показателям согласно НД

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Серия				
			190917	200917	210917	220917	230917
1	2	3	4	5	6	7	8
Описание	Визуально	Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Растворимость	ГФ РК I, Т. 1, 1.4	Легко растворим в 70% этаноле Р, диметилсульфоксиде Р. Частично растворим в 96% этаноле Р, воде очищенной Р. Практически не растворим в хлороформе Р, этилацетате Р.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Идентификация: - флавоноиды	Качественная реакция	К 20 мг субстанций, растворенных в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
- цинарозид	ТСХ ГФ РК I, Т. 1, 2.2.27	На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Вода	ГФ РК, Т. 1, 2.5.12	Не более 5,0 %	4,1	4,3	4,3	4,2	4,1
Тяжелые металлы	ГФ РК, Т. 1, с. 558 2.4.8, метод А	Не более 0,01 %	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет

Продолжение таблицы 17

1	2	3	4	5	6	7	8
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	ГФ РК, Т. 1, 5.4. ГХ, ГФ РК, Т. 1, 2.2.28	Не более 0.5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Микробиологическая чистота	ГФ РК, Т. 1, 5.1.4 Категория 4 В; 2.6.12 и 2.6.13	- Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (2.6.12): не более 10^5 бактерий и не более 10^4 грибов в грамме или миллилитре; - не более 10^3 энтеробактерии и некоторых других грамотрицательных бактерий в грамме или миллилитре (2.6.13); - отсутствие <i>Escherichia coli</i> (1 г или 1 мл) (2.6.13); - отсутствие <i>Salmonella</i> (10 г или 10 мл) (2.6.13).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид	УФ-спектрофотометрия; ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29	Не менее 9,0 %.	9,46	9,51	9,49	9,47	9,50

Испытуемый раствор. Точную навеску 0,03 г субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливали 15 мл 70% спирта этилового и растворяли, затем доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали (*раствор А*).

В мерную колбу объемом 25,0 мл помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5,0 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, выдерживали 10 минут и далее приливали 1,0 мл 3% раствора кислоты уксусной. Объем полученного раствора доводили 70% спиртом этиловым до метки (*раствор Б*) и оставляют на 30 минут. Далее проводили измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10,0 мм при длине волны 395 ± 2 нм.

Раствор сравнения. В качестве раствора сравнения выступал раствор, состоящий из 2,5 мл раствора А, 1,0 мл раствора кислоты уксусной 3% и доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25,0 мл.

Содержание суммы флавоноидов в субстанции, в пересчете на цинарозид, в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 25 \times 25 \times 100}{A_1 \times a \times 2,5}, \quad (3)$$

где А - оптическая плотность раствора Б;

A_1 - удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм;

а – навеска субстанции, г.

Изучение стабильности субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой проведено при хранении в следующих условиях: $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха не более $60 \pm 5\%$. На хранение были заложены 3 серии опытных образцов субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой.

Основные показатели качества контролировали согласно НД каждые три месяца на протяжении 1-го года и каждые шесть месяцев в течение 2-го года хранения. В ходе хранения существенных изменений показателей качества не установлено. Установлены отклонения по отдельным показателям близкие к допустимым пределам (таблицы 18-20).

На основании полученных результатов установлен срок хранения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой 2 года.

Таким образом, разработана спецификация качества и проведена стандартизация субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой, разработан проект НД (Приложение Б).

Таблица 18 – Изучение стабильности субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой серия 190917

Упаковка: в соответствии с проектом НД Дата начала испытания: 09.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 190917										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
Растворимость		В соответствии с НД	Легко растворим в 70% этаноле Р, диметилсульфоксиде Р. Частично растворим в 96% этаноле Р, воде очищенной Р. Практически не растворим в хлороформе Р, этилацетате Р.							
Идентификация - флавоноиды		В соответствии с НД	К 20 мг субстанций, растворенных в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
- цинарозид		На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.								
Вода			Не более 5.0%	4,1	4,0	4,2	4,4	4,4	4,6	4,6
Тяжелые металлы			Не более 0,01 %	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв

Продолжение таблицы 18

Остаточные количества органических растворителей (этанол)			Не более 0.5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,05
Микробиологическая кислота			<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г</p>	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
В. ВЭЖХ - флавоноиды			Время удерживания цинарозида	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5.0%	3,7	2,8	2,5	3,8	2,5	2,6	3,0
Количественное определение: флавоноидов (в пересчете на цинарозид)		Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.2.28 ГФ РК I, т.1, 2.2.25	Не менее 2,0 %	9,46	9,50	9,02	9,45	9,18	9,26	9,37

Таблица 19 – Изучение стабильности субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой серия 200917

Упаковка: в соответствии с проектом НД Дата начала испытания: 09.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 190917										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
Растворимость		В соответствии с НД	Легко растворим в 70% этаноле Р, диметилсульфоксиде Р. Частично растворим в 96% этаноле Р, воде очищенной Р. Практически не растворим в хлороформе Р, этилацетате Р.							
Идентификация - флавоноиды		В соответствии с НД	К 20 мг субстанций, растворенных в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
- цинарозид		На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.								
Вода		Не более 5.0%			4,3	4,3	4,5	4,5	4,6	4,7
Тяжелые металлы	Не более 0,01 %			соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв

Продолжение таблицы 19

Остаточные количества органических растворителей (этанол)			Не более 0.5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,05
Микробиологическая кислота			<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г</p>	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
В. ВЭЖХ - флавоноиды			Время удерживания цинарозида	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5.0%	3,7	2,8	2,5	3,8	2,5	2,6	3,0
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид			Не менее 9,0 %	9,51	9,50	9,50	9,49	9,49	9,35	9,23

Таблица 20 – Изучение стабильности субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой серия 210917

Упаковка: в соответствии с проектом НД Дата начала испытания: 09.2017 г Дата окончания испытания: 07.2019 г Серия: 190917										
Показатели качества	Условия исследований	Методы исследований	Нормы	Периоды контроля, мес						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) %;	ГФ РК, т.1	Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
Растворимость		В соответствии с НД	Легко растворим в 70% этаноле Р, диметилсульфоксиде Р. Частично растворим в 96% этаноле Р, воде очищенной Р. Практически не растворим в хлороформе Р, этилацетате Р.							
Идентификация - флавоноиды		В соответствии с НД	К 20 мг субстанций, растворенных в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв
- цинарозид		На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.								
Вода		Не более 5.0%			4,1	4,0	4,2	4,4	4,4	4,6
Тяжелые металлы	Не более 0,01 %			соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв	соотв

Продолжение таблицы 20

Остаточные количества органических растворителей (этанол)		Не более 0.5 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,05
Микробиологическая кислота		<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г</p>	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
В. ВЭЖХ - флавоноиды		Время удерживания цинарозида	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5.0%	3,7	2,8	2,5	3,8	2,5	2,6	3,0

Продолжение таблицы 20

Микробиологическая кислота		ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13 Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.3.1.4.	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А. Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г. Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .	соотв .
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид			Не менее 9,0 %	9,51	9,50	9,50	9,49	9,49	9,35	9,23

4.5 Разработка лабораторного регламента на получение субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

На основе полученных результатов разработан и утвержден лабораторный регламент на получение тимьяна ползучего экстракт сухой (Приложение Г).

Наименование продукта: Тимьяна ползучего экстракт сухой.

Основное назначение продукта: Субстанция для производства лекарственного средства антимикробного действия.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции: Сумма полифенольных соединений тимьяна ползучего, основные компоненты: цинарозид, розмариновая кислота, нарингенин и эпикатехин.

Описание. Порошок темно-зеленого цвета со специфическим запахом.

Растворимость. Легко растворим в 70% этаноле, диметилсульфоксиде. Частично растворим в 96% этаноле, воде очищенной. Практически не растворим в воде хлороформе, этилацетате.

Идентификация. К 20 мг субстанции, растворенной в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной концентрированной, 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды).

На стартовую линию хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) 7,5 x 15 мм наносят 20 мкл (0,02 мл) испытуемого раствора, рядом 5 мкл (0,005 мл) стандартного образца цинарозида 0,1 % раствора. Пластинку высушивают на воздухе 5 минут, помещают в камеру с залитой системой растворителей: кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70) и проводят хроматографирование восходящим способом (смесь растворителей используют свежеприготовленной и вносят в камеру перед хроматографированием непосредственно). При прохождении фронта растворителя до конца пластинки, пластинку вынимают, сушат в вытяжном шкафу до удаления запаха растворителей, далее обрабатывают спиртовым раствором алюминия хлорида 2 %, высушивают. На пластинке ТСХ СО цинарозида проявляется в виде пятна желтого цвета. На пластинке ТСХ испытуемого раствора, на уровне зоны адсорбции СО цинарозида, должно быть установлено наличие пятна желтого цвета.

Количественное определение. Количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид, в субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой проводят методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29) в соответствии проекту НД (глава 4.4.).

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортированию и хранению.

Упаковка. Субстанцию упаковывают во флаконы (стекло типа АБ-1 или НС-1) по 1 г (объем флаконов 10 мл) по ТУ 9461-025-00480678-99. Флаконы укупорены резиновыми пробками, изготовленными по ТУ 38006108-76 следующих марок ИР-119, ИР-119А (серого или черного цвета). Крышка и часть горловины закатывают алюминиевыми колпачками. На флаконах наклеены

этикетки по ГОСТу 7625-86. Транспортная тара и групповая упаковка по ГОСТу 17768-90Е.

Маркировка. На этикетке указано наименование и адрес предприятия-изготовителя, его товарный знак, название продукта на латинском, государственном и русском языках, количество препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности [124]. Надписи на упаковочном листе соответствуют ГОСТ 17768-90Е. Маркировка тары транспортной по ГОСТу 14192-96.

Транспортирование. По ГОСТу 17768-90 Е.

Хранение. В прохладном, защищенном от света месте при температуре +2°С до +8°С [124].

Срок годности. 2 года.

Химические превращения при получении субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой отсутствуют, поэтому химическая схема производства не приводится.

Исходным сырьем для получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой является воздушно-сухое растительное сырье тимьяна ползучего. Технологическая схема получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой представлена на рисунке 14.

Аппаратурная схема получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой приведена на рисунке 13.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР 1. Подготовка материалов

ВР 1.1 Сушка травы тимьяна ползучего

Надземную часть (соцветия, цветочные корзинки, листья, тонкие стебли) тимьяна ползучего сушили в специальном сухом помещении с хорошей циркуляцией воздуха и отсутствием прямых солнечных лучей. Сухое сырье тимьяна ползучего передается на ВР 1.2.

ВР 1.2 Измельчение сырья тимьяна ползучего

Из сухого сырья тимьяна ползучего удаляются грубые стебли. Цветочные корзинки, соцветия и листья измельчают на ножевой мельнице для тонкого измельчения до 2-3 мм. Сухое измельченное сырье тимьяна ползучего передается на ВР 1.3.

ВР 1.3 Просевка сырья тимьяна ползучего

Сухое измельченное сырье тимьяна ползучего просеивают через сита с диаметром отверстий 5 мм.

В сухом измельченном просеянном сырье тимьяна ползучего поводится определение количественного содержания суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид (проект НД).

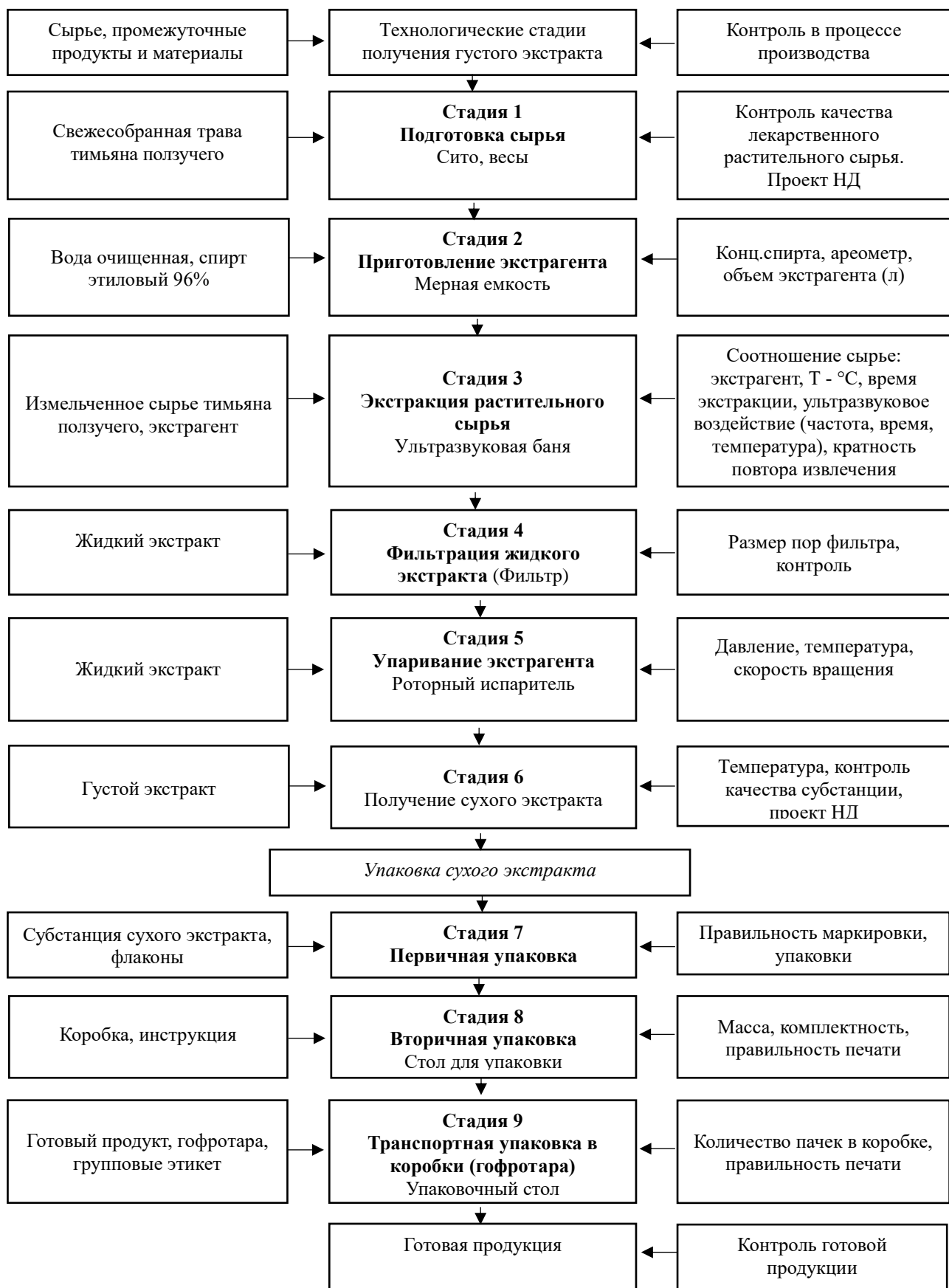


Рисунок 14 - Технологическая схема получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна ползучего передается на ВР 1.4.

ВР 1.4 Определение массы сырья

Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна ползучего взвешивают на весах электронных АУ120 по 40,0 г. Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна ползучего определенной массы передается на ТП 1.1.

ВР 1.5 Приготовление экстрагента

В две бутылки объемом по 1 литру приливают по 448,78 г 96 %-ного этанола и 240 г воды очищенной, перемешивают. Общая масса экстрагента 1377,56 г.

Стадии технологического процесса

ТП 1. Получение густого экстракта

ТП 1.1 Загрузка сырья и экстрагента

40,0 г травы тимьяна ползучего загружают в емкость и заливают экстрагент – смесь спирт этиловый:вода (7:3) в количестве 688,78 г, соотношение массы сырья и массы растворителя 1:20.

ТП 1.2 Экстракция сырья

Экстракцию сырья тимьяна ползучего проводят дважды без замачивания на ультразвуковой бане при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 30 минут. Объединенный жидкий экстракт поступает на ТП 1.3.

ТП 1.3 Фильтрация жидкого экстракта

Объединенный жидкий экстракт тимьяна ползучего фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат жидкого экстракта передают на ТП 1.4

ТП 1.4 Упаривание экстрагента

Фильтрат жидкого экстракта помещают в роторный испаритель и упаривают экстрагент при температуре 50°C, полученный густой экстракт поступает на ТП 2.

ТП 2. Получение сухого экстракта

ТП 2.1 Упаривание остаточного растворителя

Из густого экстракта остаточный растворитель выпаривают с использованием водяной бани при 70°C. Выход субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой составляет 14,25 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье [124].

Количественное определение. Количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид, в субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой проводят методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29) в соответствии проекту НД (глава 4.4.).

Полученную субстанцию тимьяна ползучего экстракт сухой передают на ТП 2.2.

ТП 2.2 Взвешивание сухого экстракта

Полученную субстанцию тимьяна ползучего экстракт сухой взвешивают по 1,0 г.

Ведомость спецификации оборудования с его техническими характеристиками представлена в таблице 21.

Таблица 21 - Ведомость спецификации оборудования

Наименование	Количество единиц	Материал рабочей зоны, способ защиты	Техническая характеристика
Ножевая мельница для тонкого измельчения	1	Сталь	CS 500/1000-6Z.Германия пропускная способность 100кг/ч, конечная дисперсность 90% менее 2-5мм, номинальная мощность 75 кВт/ч
Сито	2	Сталь	ГОСТ 214-83 номинальный размер отверстий 5.0 ± 0.090
Весы неавтоматического действия	1	-	Navigator 51262-12. Китай. Максимальная нагрузка - 510 г, цена деления - 0,1 г
Баня ультразвуковая	1	Нержавеющая сталь	Ultrasonic cleaner Sonic-3. Польша. Объем 2,8 л. Диапазон контролируемых температур от 30 до 80°C. Мощность нагрева 150 Вт. Габаритные размеры 265x165x230 мм. Мощность ультразвука (пик / период) 2x160 Вт. Частота 40 кГц.
Весы электронные	1	-	Shimadzu AY 120. Япония. Максимальная нагрузка - 510 г, цена деления - 0,1 г
Испаритель ротационный	1	Стекло	LAVTEX ИР-1 ЛТ. Россия. Объем испарительной колбы 1000 мл. Диапазон скорости вращения 20 - 280 об/минуту. Диапазон контролируемых температур от 25 до 180°C. Габаритные размеры 465x457x583 мм.
Цилиндр мерный	4	Стекло	цилиндр мерный 250 мл, ГОСТ 1770-74
Бутыль стеклянная	4	Стекло	бутылка стеклянная 10117-91
Воронка коническая	4	Стекло	В-25-38 ХС, ГОСТ 25336-82
Колба коническая	4	Стекло	Колба Кн-1-1000-29/32 ТС ГОСТ 25336-82
Колба круглодонная термостойкая	2	Стекло	К-1-1000-29/32, ГОСТ 25336-82
Весы неавтоматического действия	1	-	Navigator 51262-12. Китай. Максимальная нагрузка - 510 г, цена деления - 0,1 г
Баня водяная	1	Алюминий	V=1 л
Чашка выпарительная фарфоровая	4	Фарфор	ГОСТ 9147-80

Нормы технологического режима и параметры безопасности процесса получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Параметры режима и безопасности процесса получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

Наименование стадии, операции	Наименование и позиция аппарата	Наименование элемента операции (работы)	Параметры технологического процесса						
			Наименование, единицы	Значение				Критическое	
				Технологическая норма		Предельно безопасное	Предельно допустимое		
				Мин.	Макс.				
ТП 1.2 Экстракция сырья	Ультразвуковая баня	Время экстракции	Продолжитель- ность, мин	30	30	35	40	>40	
ТП 1.4 Упаривание экстрагента	Ротационный испаритель LAVTEX ИР-1 ЛТ	Упаривание экстрагента	Давление, кгс/см ²	-0,6	-0,8	-0,9	-0,9	-1,0	
			Температура, °С	45	50	55	60	65	
ТП 2.1 Упаривание остаточного растворителя	Баня водяная	Нагревание этилового спирта, нагревание воды	Температура, °С	65	70	75	-	-	

Материальный баланс получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой приведен в таблице 23.

Таблица 23 - Материальный баланс получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

ИЗРАСХОДОВАННО		ПОЛУЧЕНО	
Наименование сырья и полупродуктов	Значение, г	Наименование конечного продукта, отходов и потерь	Значение, г
1	2	3	4
ВР 1. Подготовка материалов			
ВР 1.1 Сушка травы тимьяна ползучего		Воздушно-сухое сырье тимьяна ползучего	65,39
Сырье тимьяна ползучего	196,17	Потери влаги	130,78
Итого	196,17	Итого	196,17
ВР 1.2 Измельчение травы тимьяна ползучего		Измельченное воздушно-сухое сырье тимьяна ползучего	43,59
Воздушно-сухое сырье тимьяна	65,39	Потери	21,80
Итого	65,39	Итого	65,39
ВР 1.3 Просевка сырья		Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна ползучего	40,56
Измельченное воздушно-сухое сырье тимьяна ползучего	43,59	Потери	3,03
Итого	43,59	Итого	43,59
ВР 1.4 Определение массы сырья		Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна ползучего определенной массы	40,56
Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна ползучего	40,56	Потери	0,56
Итого	40,56		40,00

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4
ВР 1.5 Приготовление экстрагента Этиловый спирт Вода очищенная	897,56 480,00	Смесь этанол–вода (7:3)	1377,56
Итого	1377,56	Итого	1377,56
ТП 1. Получение жидкого экстракта			
ТП 1.1 Загрузка сырья и экстрагента Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна ползучего определенной массы Экстрагент	40,00 1377,56	Растительное сырье тимьяна ползучего и экстрагент в емкости для экстрагирования	1417,56
Итого	1417,56	Итого	1417,56
ТП 1.2 Экстракция сырья Растительное сырье тимьяна ползучего и экстрагент в емкости для экстрагирования	1417,56	Объединенный жидкий экстракт, Шрот Потери экстрагента	1251,94 34,0 131,62
Итого	1417,56	Итого	1417,56
ТП 1.3 Фильтрация жидкого экстракта Объединенный жидкий экстракт	1251,94	Фильтрат жидкого экстракта Отходы фильтрации	1245,94 6,00
Итого	1251,94	Итого	1251,94
ТП 1.4 Упаривание экстрагента Жидкий экстракт	1245,94	Густой экстракт Отгон экстрагента Потери экстрагента	7,13 1108,68 130,13
Итого	1245,94	Итого	1245,94

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4
ТП 2. Получение сухого экстракта			
ТП 2.1 Упаривание остаточного растворителя Густой экстракт	7,13	Сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего Потери влаги	5,76 1,37
Итого	7,13	Итого	7,13
ТП 2.2 Взвешивание сухого экстракта Сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего	5,76	Сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего Потери	5,66 0,10
Итого	5,76	Итого	5,76

Перечень важнейших контрольных точек производства субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Перечень важнейших контрольных точек получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой

Наименование стадий, места измерения параметров или отбора проб	Наименование объекта контроля	Наименование контролируемого параметра	Регламентируемый норматив (значение параметра)	Методы и средства контроля	Кто производит контроль и в каком документе регистрируются результаты
ВР 1.3 Просевка сырья тимьяна ползучего	Сырье тимьяна ползучего	Количественное суммы флавоноидов	Не менее 2,0 %	УФ-спектрофотометр	ЛКП НИЦ МУК
ВР 1.4 Определение массы сырья	Сырье тимьяна ползучего	Масса	40,0 г	Весовой (весы электронные)	Инженер в производственном журнале
ВР 1.5 Приготовление экстрагента	Этиловый спирт Вода очищенная	Масса	448,78 г 240,00 г	Весовой (весы неавтоматического действия)	Инженер в производственном журнале
ТП 1.2 Экстракция сырья	Ультразвуковая баня	Продолжительность экстракции	30 мин.	Визуальный (часы).	Инженер в производственном журнале
ТП 1.4 Упаривание экстрагента	Ротационный испаритель	Температура бани, остаточное давление	Не более 50°C, не более -0,9 кгс/см ²	Температурный (термометр), манометр	Инженер в производственном журнале
ТП 2.1 Упаривание остаточного растворителя	Водяная баня	Температура	Не более 70°C	Температурный (термометр)	Инженер в производственном журнале
УМО 1. Упаковка и маркировка	Упаковка	Герметичность			Оператор

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО 1. Упаковка и маркировка

УМО 1.1 Фасовка в банки

Субстанцию упаковывают во флаконы (стекло типа АБ-1 или НС-1) по 1 г (объем флаконов 10 мл) по ТУ 9461-025-00480678-99. Флаконы укупорены резиновыми пробками, изготовленными по ТУ 38006108-76 следующих марок ИР-119, ИР-119А (серого или черного цвета). Крышка и часть горловины закатываются алюминиевыми колпачками. На флаконах наклеены этикетки по ГОСТу 7625-86. Транспортная тара и групповая упаковка по ГОСТу 17768-90Е.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетке указано наименование и адрес предприятия-изготовителя, его товарный знак, название продукта на латинском, государственном и русском языках, количество препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности [124]. Надписи на упаковочном листе соответствуют ГОСТ 17768-90Е. Маркировка тары транспортной по ГОСТу 14192-96. Затем упаковки с субстанцией тимьяна ползучего экстракт сухой передают на склад.

Таким образом, разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой (ЛР-005491-МК-04-21).

Технология получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой апробирована и внедрена на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК», организован выпуск опытных партий (Приложение Д).

Выводы по главе 4

1. Впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из травы тимьяна ползучего, произрастающей в природе Центрального Казахстана, применена ультразвуковая экстракция.

Проведенные исследования показывают, что количественный выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего, обеспечивает двукратная экстракция воздушно-сухого сырья ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 70% этанолом при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, в течение 30 минут. Разработан метод интенсификации процесса получения сухого экстракта из тимьяна ползучего, который за счет применения ультразвуковой экстракции, характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным.

2. Впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. У полученных ультразвуковых экстрактов обнаружено сходство по качественному составу фенольных соединений, но установлены значительные отличия по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов, кроме розмариновой кислоты. Доминирующими полифенольными

соединениями в исследуемых экстрактах являются цинарозид, розмариновая кислота, нарингенин и эпикатехин.

3. Впервые разработана технология получения и организован выпуск опытных партий ультразвукового экстракта тимьяна ползучего. Преимуществом разработанной технологии является увеличение производительности технологического процесса в 2,5 раз и значительное сокращение его продолжительности в 18 раз, увеличение выхода готового продукта.

4. Разработана спецификация качества и проведена стандартизация субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой, разработан проект НД. По результатам исследования стабильности установлен срок хранения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой 2 года.

5. На основе полученных результатов разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой (ЛР-005491-МК-04-21).

6. Технология получения субстанции тимьяна ползучего экстракт сухой апробирована и внедрена на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК», организован выпуск опытных партий.

5 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ДВУХ ХЕМОТИПОВ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО

5.1 Изучение антимикробной активности ультразвуковых экстрактов и эфирных масел двух хемотипов тимьяна ползучего методом микроразведений

Изучение антимикробной активности ультразвуковых экстрактов проводили методом микроразведения с использованием бульона Мюллера-Хинтона (МН) и бульона МН с 5% лизированной овечьей/лошадиной крови или бульона МН с 2% глюкозы для роста грибов (Приложение Е). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) тестируемых экстрактов оценивали в отношении эталонных микроорганизмов из Американской коллекции типовых культур (АТСС), включая 6 штаммов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* АТСС25922, *Klebsiella pneumoniae* АТСС13883, *Salmonella typhimurium* АТСС14028, *Proteus mirabilis* АТСС12453, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС9027 [122], *Helicobacter pylori* АТСС43504), 9 штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* АТСС25923, *Staphylococcus aureus* АТСС6538, *Micrococcus luteus* АТСС10240, *Staphylococcus epidermidis* АТСС12228, *Bacillus cereus* АТСС10876, *Bacillus subtilis* АТСС6633, *Streptococcus pyogenes* АТСС19615, *Streptococcus mutans* АТСС25175, *Streptococcus pneumoniae* АТСС49619) [122] и 5 штаммов грибов (*Candida albicans* АТСС102231, *Candida albicans* АТСС2091, *Candida parapsilosis* АТСС22019, *Candida glabrata* АТСС90030, *Candida krusi* АТСС14243).

Ультразвуковые экстракты, растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО), сначала разбавляли до концентрации 20 мг/мл в соответствующей бульонной среде, рекомендованной для бактерий или грибов. Затем, используя ту же среду, были сделаны серийные двукратные разведения для получения конечных концентраций тестируемых экстрактов в диапазоне от 20,0 до 0,156 мг/мл. Стерильные 96-луночные микротитратные планшеты из полистирола (Nunc, Дания) готовили путем внесения 200 мкл соответствующего разведения тестируемых экстрактов в бульонную среду на лунку. Посевной материал был приготовлен из свежих микробных культур в стерильном 0,85% NaCl, чтобы соответствовать мутности 0,5 стандарта МакФарланда, и 2 мкл были добавлены в лунки для получения конечной плотности $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл для бактерий и 5×10^4 КОЕ/мл для грибов, КОЕ - колониеобразующие единицы. После инкубации (35°C в течение 24 ч) МИК оценивали визуально как самую низкую концентрацию экстрактов, показывающую полное ингибирование роста контрольных штаммов микробов. Соответствующий контроль ДМСО (в конечной концентрации 10%), положительный контроль (содержащий инокулят без тестируемых экстрактов) и отрицательный контроль (содержащий тестируемые экстракты без инокулята) были включены в каждый микропланшет.

МИК *Helicobacter pylori* определяли с использованием метода двукратного микроразбавления в бульоне МН с 7% лизированной лошадиной крови при

концентрации экстрактов и эфирных масел от 20,0 до 0,0024 мг/мл и от 2,0 до 0,00195 мг/мл, с бактериальным инокулятом 3 стандарта МакФарланда. После инкубации при 35°C в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях (5% O₂, 15% CO₂ и 80% N₂) рост *Helicobacter pylori* визуализировали путем добавления резазурина. Конечная точка МИК была зафиксирована как самая низкая концентрация образцов, которая полностью подавляла рост.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) получали путем пересева по 5 мкл из каждой лунки, которая проявляла ингибирование роста, из последней положительной лунки и из контроля роста на рекомендуемые чашки с агаром. Планшеты инкубировали при 35°C в течение 24 часов для всех микроорганизмов, кроме *Helicobacter pylori*, который инкубировали в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях. МБК определяли как самую низкую концентрацию экстрактов без роста микроорганизмов. Отношения МБК/МИК были рассчитаны для определения бактерицидного или бактериостатического эффекта исследуемых образцов. Эксперимент повторяли в трех экземплярах [135, 136]. Данные представлены в таблицах 25-27.

Таблица 25 - Результаты изучения антимикробной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 1)

Микроорганизмы	МИК мг/мл	МБК мг/мл	МБК/МИК
1	2	3	4
Грамположительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1.25	1.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.25	2.5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1.25	1.25	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	2.5	2.5	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.25	1.25	1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	5	10	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	5	10	2
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	5	20	4
Грамотрицательные бактерии			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	10	10	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1.25	1.25	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	2.5	2.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	10	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5	10	2
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 (экстракт)	0.625	1.25	2
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 (эфирное масло)	0.0156	0.0156	1
Грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10	10	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	10	10	1

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	10	10	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	10	>20	>2
<i>Candida krusi</i> ATCC 14243	10	10	1

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) показал максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori* с МИК=0,625 мг/мл и МБК=1,25 мг/мл (МБК/МИК=2). Обладает более сильным бактерицидным эффектом в отношении 5 штаммов грамположительных бактерий двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* в концентрации 1,25-2,5 мг/мл (МБК/МИК=1), и вызывает задержку роста культур *Bacillus cereus* МИК=2,5 мг/мл. Также в концентрации 1,25-2,5 мг/мл проявляет бактерицидное (МБК/МИК=1) действие по отношению к грамотрицательным штаммам *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*.

Таблица 26 - Результаты изучения антимикробной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 2)

Микроорганизмы	МИК мг/мл	МБК мг/мл	МБК/МИК
Грамположительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2.5	2.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.25	2.5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1.25	1.25	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	2.5	5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.25	5	4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	2.5	5	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	2.5	10	4
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	5	5	1
Грамотрицательные бактерии			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1.25	1.25	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	2.5	2.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	5	10	2
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	0.0625	0.250	4
Грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	2.5	10	4
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	5	10	2
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	5	10	2
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	5	10	2
<i>Candida krusi</i> ATCC 14243	5	10	2

Для ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (образец 2) обнаружена максимальная бактерицидная активность в отношении *Helicobacter pylori* с наименьшими значениями МИК=0,0625 мг/мл и МБК=0,250 мг/мл (МБК/МИК=4). Этот ультразвуковой экстракт проявляет более сильную бактерицидную активность в отношении только 3 штаммов грамположительных бактерий двух линий штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* в концентрации 1,25-2,5 мг/мл (МБК/МИК=1), при этом, ингибирует рост культур 5 штаммов *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* в концентрации 1,25-2,5 мг/мл. Также в концентрации 1,25-2,5 мг/мл обладает бактерицидным (МБК/МИК=1) действием в отношении 2 штаммов грамотрицательных бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*. Кроме того, в концентрации 2,5 мг/мл вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*.

Таблица 27 - Результаты изучения антимикробной активности эфирных масел двух хемотипов тимьяна ползучего

Образец	<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504		
	МИК мг/мл	МБК мг/мл	МБК/МИК
Эфирное масло тимьяна ползучего (образец 1)	0.0156	0.0156	1
Эфирное масло тимьяна ползучего (образец 2)	0.0078	0.0313	4

Эфирное масло из тимьяна ползучего (образец 1) обладает максимальной бактерицидной активностью в отношении *Helicobacter pylori* с МИК=МБК=0,0156 мг/мл (МБК/МИК=1). Для эфирного масла из тимьяна ползучего (образец 2) установлена бактерицидная активность в отношении *Helicobacter pylori* с наименьшими значениями МИК=0,0078 мг/мл, но сравнительно большим значением МБК=0,0313 мг/мл (МБК/МИК=4).

Установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность против 9 штаммов грамположительных бактерий, 6 штаммов грамотрицательных бактерий и 5 культур грибов в концентрации от 0,0625 до 20 мг/мл, но отличаются по силе воздействия в отношении тест-штаммов микроорганизмов, показывают максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori* [125, 162, 163].

Эфирные масла двух хемотипов тимьяна ползучего обладают бактерицидным действием в концентрации 0,0156 и 0,0313 мг/мл соответственно [164].

Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего являются перспективной субстанцией для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний.

5.2 Исследование антимикробной активности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом диффузии в агар

Изучение антимикробной активности образцов проводили по методике [137] в отношении штаммов грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и к дрожжевому грибку *Candida albicans* ATCC 10231 методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения – гентамицин, бензилпенициллина натриевая соль для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка (Приложение Е).

Культуры выращивали на жидкой среде pH $7,3 \pm 0,2$ при температуре от 30 до 35°C в течение 18-20 часов. Культуры разводили 1:1000 в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими селективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засеивали по методу «сплошного газона». После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6,0 мм, в которые вносили растворы исследуемых образцов, гентамицина, бензилпенициллина натриевой соли и нистатина. В качестве контроля использовали диметилсульфоксид в эквивалентных количествах. Исследуемые образцы испытывались в концентрации 2 мг/мл. Концентрация препаратов сравнения составляла 2 мг/мл. Посевы инкубировали при 37°C, учет растущих культур проводили через 24 часа.

Антимикробная активность образцов оценивалась по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10-15 мм – слабая активность, 15-20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная.

Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки. Полученные результаты представлены в таблицах 28.

Таблица 28 - Результаты изучения антимикробной активности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом диффузии в агар

Шифр (название)	<i>St. aureus</i> (мм)	<i>B. subtilis</i> (мм)	<i>E. coli</i> (мм)	<i>Ps. aeruginosa</i> (мм)	<i>C. albicans</i> (мм)
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1)	14±0,8	18±1,1	15±0,8	11±1,0	15±0,9
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2)	22±1,0	16±1,1	21±0,9	11±1,1	15±1,0
Гентамицин	22±1,1	19±0,9	21±1,0	-	-
Бензилпенициллина натриевая соль	14±1,2	16±1,1	13±1,1	-	-
Нистатин	-	-	-	-	22±1,0
Контроль (диметилсульфоксид)	-	-	-	-	-

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) обладает умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2) проявляет выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* сопоставимую с препаратом сравнения гентамицином, и превышает действие бензилпенициллина натриевой соли. Также обладает умеренно выраженной антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

Таким образом, ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего можно рассматривать как перспективную субстанцию для разработки отечественных лекарственных средств антимикробного действия.

5.3 Отхаркивающая активность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего

Исследование отхаркивающей активности образцов экстрактов по методике В.В. Гацура, на осенних лягушках *Rana Temporarea* [62, 138] (Приложение Е).

Лягушку фиксировали на корковой пластинке брюшком вверх. По 0,01 г исследуемых образцов растворяли в 1 мл среды Игла (питательная среда для культивирования клеток и тканей, содержащая большой набор аминокислот), 0,07 мл препарата сравнения разводили в 1 мл среды Игла. На кончик языка наносили исследуемый настой в количестве 0,1 мл. Для регистрации движения ресничек мерцательного эпителия пищевода использовали шелковую нить размером 15 мм, которую по истечении 30 секунд после нанесения исследуемых настоев помещали у основания языка. По секундомеру замечали время, в течение которого заглатывалась нить. Регистрировали время, затраченное на перемещение нитки на 10 мм без настоя (контроль) и после нанесения исследуемого настоя.

Препаратом сравнения являлся сироп Бронхикум С - средство растительного происхождения, которое обладает отхаркивающим, противовоспалительным, бронхолитическим, противомикробным действием, также снижает вязкость мокроты и ускоряет ее эвакуацию. 100 мл сиропа содержат 15 г жидкого экстракта травы тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), соотношение травы к экстрагенту (1:2-2,5), экстрагент: раствор аммиака 10%, глицерол 85%, этанол 90%, вода.

Учитывая значительный разброс исходных скоростей движения мерцательного эпителия от одного животного к другому, нами произведен расчет коэффициента ускорения (КУ) как отношения скорости, полученной после аппликации исследуемого образца к исходной. Уменьшение данного коэффициента говорит о повышении двигательной активности мерцательного

эпителия, полученные результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Результаты исследования отхаркивающей активности сухих ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего

Образец	Коэффициент ускорения (КУ)	Увеличение двигательной активности, %
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1)	0,67	49,0
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2)	0,71	40,0
Препарат сравнения Бронхикум С	0,66	52,5

Как видно из таблицы 29, при равном значении коэффициентов ускорения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего, собранного в лесах Каркаралинска, и препарата сравнения, испытуемый образец повышает двигательную активность мерцательного эпителия лягушки на 49 %, следовательно, проявляет отхаркивающее действие сопоставимое с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С. Сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, обладает менее выраженной отхаркивающей активностью (Приложение Л).

Таким образом, экспериментально установлено, что сухой ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в лесах Каркаралинска, является перспективной субстанцией для разработки отечественного лекарственного средства отхаркивающего действия [165].

5.4 Изучение противовоспалительной активности в эксперименте *in vivo*

Исследование противовоспалительного действия ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего проводили на модели острой экссудативной реакции (перитонит) по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139] (Приложение Е).

Для исследования были отобраны 40 белых беспородных крыс обоего пола массой 190-210 г, которые были распределены на 4 группы по 10 животных в каждой:

Группа №1 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №2 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №3 - группа сравнения, животные получали препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №4 - контрольная группа, животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи, n=10.

Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 часа животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его объем. Исследуемые объекты вводили животным перорально однократно в виде крахмальной слизи, препарат сравнения диклофенак натрия вводили внутривентрально однократно за 1 час до введения 1% раствора уксусной кислоты.

Противовоспалительную активность оценивают по уменьшению объема воспалительного экссудата в брюшной полости у опытных крыс, в процентах по сравнению с контрольными.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием Mann-Whitney U-test. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования приведены в таблице 30.

Таблица 30 – Противовоспалительная активность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего

Исследуемые образцы	Доза, мг/кг	Количество экссудата, мл	% к контролю	Противовоспалительная активность
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1)	25	3,6±1,1*	55,4	44,6
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2)	25	4,4±1,0	54,8	45,2
Диклофенак натрия	25	4,0 ± 0,8	61,6	38,4
Контроль	-	6,5± 0,5	100	-
Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.				

В результате проведенного эксперимента выявлено, что образцы ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего в дозах 25 мг/кг обладают противовоспалительной активностью и вызывают уменьшение количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс на 44,6% и 45,2%. Противовоспалительная активность исследуемых образцов сопоставима с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

5.5 Исследование мутагенной активности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего (тест Эймса)

Исследование мутагенной активности осуществляли в тесте Эймса по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139] (Приложение Е).

Изучению в стандартном тесте Эймса подлежали ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего в концентрациях 10; 100; 1000 и 10000 мкг/мл. Использовали питательные среды и растворы: мясопептонный агар (МПА) 0,6%; МПА 2%; водный агар 2%; солевой концентрат; 20% раствор глюкозы; 1% раствор сернокислого магния; минимальный агар 1,5%; полужидкий минимальный агар 0,7%; раствор гистидина 2,5 мМ; раствор биотина 1,25 мМ; верхний полуобогатенный агар.

Бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium* ТА 100, ТА 98 культивировали в (МПБ) при температуре от 37°C. Раствор исследуемого образца готовили в дистиллированной воде в стандартных концентрациях (10; 100 мкг/мл). Селективный полуобогатенный агар (0,6 %) в пробирках плавил в водяной бане при 100°C и помещали в термостатируемую водяную баню при температуре 45-46°C. Вначале в пробирки с агаром вносили раствор исследуемого образца в используемых концентрациях (0,1 мл), затем в пробирки вносили 0,1 мл суспензии бактерий. После этого вносили 0,5 мл микросомальной активирующей смеси, быстро размешивали содержимое пробирки и выливали его на слой нижнего минимального агара на чашке Петри ровным тонким слоем. Чашку оставляли при комнатной температуре на 40 минут и после полного застывания агара переносили в термостат на 37°C. Учет результатов проводили через 48 часов инкубации при температуре 37°C.

В опыт включали варианты с полной микросомальной активирующей смесью (ПМАС) и неполной микросомальной активирующей смесью (НМАС). В состав первой входили: суспензия бактерий, исследуемый образец, гомогенат и кофакторы. В вариантах НМАС вместо кофакторов вносили соответствующий объем растворителя – воду. В контрольном варианте в слой верхнего полужидкого агара вместе с суспензией бактерий вносили микросомальную активирующую смесь, а также соответствующий объем растворителя образца. В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (НММ) (100 мкг/чашку).

Бактерии были обработаны раствором экстракта в ДМСО в стандартных концентрациях 10 и 100 мкг/чашку с системой метаболической активации и без метаболической активации. После инкубации было подсчитано количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантных вариантах негативного контроля (культуры, обработанные только растворителем). Позитивный контроль - нитрозометилмочевина (100 мкг/чашку) [166].

Превышение в числе колоний-ревертантов в полной микросомальной активирующей смеси свидетельствует об эффективности функционирования системы микросомального окисления [166].

О выраженности токсического действия исследуемых биоконплексов определяем по выживаемости тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA98. Согласно рекомендациям по проведению теста Эймса максимальная доза исследуемых соединений не должна подавлять рост тестерных бактерий более чем на 50%.

Учет генных мутаций (тест Эймса) считали полуколичественным методом, и мутагенную активность засчитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования. Для исключения артефактов в тесте Эймса в образцах определяли количественное содержание гистидина по методу, разработанному Ильинской с соавторами. Результаты исследования мутагенной активности образцов приведены в таблице 31.

Таблица 31 - Мутагенная активность экстрактов тимьяна ползучего (Корнеевские леса) и тимьяна ползучего (горно-лесной массив Каркаралинска)

Наименование	Влияние на рост штамма количество КОЕ на чашку							
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100				<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98			
	В-во 1000 мкг/чашка	В-во 100 мкг/чашка	В-во 10 мкг/чашка	НММ	В-во 1000 мкг/чашка	В-во 100 мкг/чашка	В-во 10 мкг/чашка	НММ
УЭТП-1 Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (Корнеевские леса)	8±1	7±1	8±1	16±1	5±1	7±1	8±1	15±1
УЭТП-2 Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (горно-лесной массив Каркаралинска)	6±1	6±1	8±1	14±1	7±1	5±1	9±1	14±1

В результате проведенного эксперимента выявлено, что число колоний-ревертантов в ПМАС с концентрациями экстракта 10γ/чашка, экстракта 100γ/чашка не превышало числа колоний-ревертантов по отношению к позитивному контролю.

Таким образом, по полученным данным у ультразвукового экстракта тимьяна ползучего не выявлено мутагенного эффекта.

Для определения ДНК-повреждающего эффекта использовали REC-тест, основанный на использовании штаммов *Escherichia coli*, дефектных по разным путям репарации: Wp2 («дикий» тип), *Escherichia coli* polA (нарушен синтез

ДНК-полимеразы I).

Изучение прямого действия образца на популяцию бактерий оценивали по изменению оптической плотности бактериальной суспензии *Escherichia coli* при совместной инкубации с исследуемым образцом, и посевной дозы на плотные питательные среды Эндо, кровяной агар. Результаты оценивали по форме и размеру колоний, а также по наличию гемолиза, фенотипическим свойствам бактерий.

Установлено, что образец в исследуемых концентрациях не влияют на скорость роста клеток дикого и мутантного штаммов *Escherichia coli*. Добавление образца не приводило к изменению количества колоний, их формы, не повлияло на размер зон гемолиза. При этом, нафталин в исследуемой концентрации ингибирует рост и гемолитические свойства мутантного штамма *Escherichia coli*.

В результате проведения репарационного теста на *Escherichia coli*, используя микроорганизм как бактериальную тест-систему для учета дифференциальной выживаемости бактерий при совместном культивировании образцов на наличие индуцирующих в геноме *Escherichia coli*, повреждений ДНК, ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего не индуцируют повреждений ДНК у *Escherichia coli*. Результаты испытания образца в батарее КСТ позволяют сделать заключение об отсутствии канцерогенной опасности. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего не обладает мутагенной активностью.

5.6 Изучение острой токсичности ультразвуковых экстрактов

Исследование острой токсичности образцов проводили по методике, представленной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [139] (Приложение Е).

В экспериментах были использованы 2 вида животных: беспородные белые мыши обоего пола массой 18,0-20,0 г и белые крысы обоего пола массой 250,0-300,0 г. Животные находились на обычном рационе вивария. Энтеральное введение осуществлялось внутривентрикулярно (с помощью зонда). Парентеральное - внутривенно. Каждая группа состояла из 5 животных, всего исследовано 70 мышей и 45 крыс.

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего растворяли в ДМСО и вводили животным однократно в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг, 16,7 г/кг. В течение двухнедельного периода за состоянием животных осуществлялось ежедневное наблюдение, и они трижды взвешивались. При этом обращали внимание на: общее состояние животных, поведение, характер дыхательных движений, двигательную активность, внешний вид шерстного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек, употребление воды и корма, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания, окраску мочи.

Определяли LD₅₀ при введении максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг).

Острая токсичность УЭТП при энтеральном введении мышам

После внутрижелудочного введения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг, 16,7 г/кг первые 10-15 минут мыши находились в заторможенном состоянии, в течение первых часов введение экстракта вызывало у животных некоторые признаки интоксикации, проявляющиеся в виде снижения аппетита, вялости, учащения дыхания, гиподинамии. Затем поведение животных нормализовалось. В течение последующих суток, каких-либо изменений со стороны внешнего вида, поведения и активности мышцей не отмечалось. При этом в течение первых трех суток и в последующие дни мыши опытных групп вели себя также, как и мыши контрольной группы (интактные мыши, которым вводили воду очищенную в эквивалентном объеме). LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Таким образом, изучение острой токсичности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего показало, что при внутрижелудочном введении испытуемых образцов, во всех исследованных дозах гибели животных в течение всего периода наблюдения не отмечали.

Острая токсичность УЭТП при парентеральном введении мышам

После внутрибрюшинного введения исследуемого образца в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг, 16,7 г/кг в течение 15 минут отмечалось прогрессирующее снижение двигательной активности животных, дыхание было поверхностным, наблюдалась вялость. Реакция на прикосновение была необычно резкой, которая затем, в течение 1-3 часов нормализовалась. LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Острая токсичность УЭТП при энтеральном введении крысам

После внутрижелудочного введения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего крысам в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг, 16,7 г/кг, при наблюдении за животными не было замечено изменений со стороны их внешнего вида, общего поведения и активности. LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Острая токсичность УЭТП при парентеральном введении крысам

После внутрибрюшинного введения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего крысам в дозах 0,9 г/кг, 1,5 г/кг, 1,8 г/кг, 16,7 г/кг, при наблюдении за животными не было замечено изменений со стороны их внешнего вида, общего поведения и активности. LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Таким образом, на основании полученных данных ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего отнесен по классификации Е.А. Лужникова к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности). LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой

концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало [167].

Выводы по главе 5

1. По результатам изучения антимикробной активности методом микроразведений, впервые установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность против 9 штаммов грамположительных бактерий, 6 штаммов грамотрицательных бактерий и 5 культур грибов в концентрации от 0.0625 до 20 мг/мл, но отличаются по силе воздействия в отношении тест-штаммов микроорганизмов, показывают максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori*. Эфирные масла двух хемотипов тимьяна ползучего обладают бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori* в концентрации 0,0156 и 0,0313 мг/мл соответственно. Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего предложены в качестве субстанции для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний.

Изучение антимикробной активности исследуемых образцов методом диффузии в агар, показало, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) обладает умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2) проявляет выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* сопоставимую с препаратом сравнения гентамицином, и превышает действие бензилпенициллина натриевой соли. Также обладает умеренно выраженной антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

2. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладают отхаркивающим свойством, сопоставимым с препаратом сравнения «Бронхикум С», ультразвуковой экстракт из тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, по отхаркивающему действию уступает препарату сравнения «Бронхикум С».

3. Ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего в дозах 25 мг/кг обладают противовоспалительной активностью и вызывают уменьшение количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс на 44,6% и 45,2%. Противовоспалительная активность исследуемых образцов сопоставима с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

4. По результатам изучения острой токсичности ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего отнесен по классификации Е.А. Лужникова к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности). LD₅₀ в опытах не была

установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации ультразвукового экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало. По результатам проведенного теста Эймса определено, что ультразвуковые экстракты тимьяна ползучего не обладают мутагенной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие **выводы**:

1 Впервые по результатам сравнительного фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранного в популяциях Карагандинской области РК, установлено, что тимьян ползучий представлен двумя хемотипами. Два образца травы тимьяна ползучего имеют внешнее сходство и идентичные анатомические диагностические признаки, при этом, установлены значительные отличия по выходу и компонентному составу эфирного масла. Также определены отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по количественному содержанию суммы флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот. По результатам товароведческого анализа оба хемотипа травы тимьяна ползучего соответствуют требованиям ГФ РК. Полученные данные включены в проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава».

2 Разработан метод интенсификации процесса и технология получения сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего. Преимуществом разработанной технологии является увеличение производительности технологического процесса в 2,5 раз и значительное сокращение его продолжительности, увеличение выхода готового продукта.

3 Впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. У полученных ультразвуковых экстрактов обнаружено сходство по качественному составу фенольных соединений, но установлены значительные отличия по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов, кроме розмариновой кислоты. Доминирующими полифенольными соединениями в исследуемых экстрактах являются цинарозид, розмариновая кислота, нарингенин и эпикатехин.

4 Впервые установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность против 9 штаммов грамположительных бактерий, 6 штаммов грамотрицательных бактерий и 5 культур грибов в концентрации от 0.0625 до 20 мг/мл, но отличаются по силе воздействия в отношении тест-штаммов микроорганизмов, показывают максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori*, при исследовании методом методом микроразведений. Эфирные масла двух хемотипов тимьяна ползучего обладают бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori* в концентрации 0,0156 и 0,0313 мг/мл соответственно. Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего предложены в качестве субстанции для создания

отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний. Изучение антимикробной активности исследуемых образцов методом диффузии в агар против 2 штаммов грамположительных бактерий, 2 штаммов грамотрицательных бактерий и 1 культуры грибов показало, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) обладает умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2) проявляет выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* сопоставимую с препаратом сравнения гентамицином, и превышает действие бензилпенициллина натриевой соли. Также обладает умеренно выраженной антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

5 Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладают отхаркивающим свойством, сопоставимым с препаратом сравнения «Бронхикум С», ультразвуковой экстракт из тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, по отхаркивающему действию уступает препарату сравнения «Бронхикум С». Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего обладают противовоспалительной активностью сопоставимой с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

6 По результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, установлено, что ультразвуковые экстракты тимьяна ползучего относятся к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности). По результатам проведенного теста Эймса определено, что ультразвуковые экстракты тимьяна ползучего не обладают мутагенной активностью.

7 Разработан проект НД и проведена стандартизация субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой», изучена ее стабильность. Разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» (ЛР-005491-МК-04-21). На базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК» организован выпуск опытных партий субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для фармакологического исследования.

Оценка полноты решения поставленных задач. Поставленные задачи по фармакогностическому изучению тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана; разработке нового способа и технологии получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвука; исследованию химического состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего; изучению биологических свойств и острой токсичности ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего; разработке нормативных документов на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой» в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение, выполнены полностью.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов. По результатам сравнительного фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранного в популяциях Карагандинской области РК, установлено, что тимьян ползучий представлен двумя хемотипами. Оба хемотипа могут быть использованы в официальной медицине, разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава». Разработан метод интенсификации процесса и технология получения сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего. Преимуществом разработанной технологии является увеличение производительности технологического процесса в 2,5 раз и значительное сокращение его продолжительности, увеличение выхода готового продукта. Исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность против 9 штаммов грамположительных бактерий, 6 штаммов грамотрицательных бактерий и 5 культур грибов, показывают максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori*, не токсичны и не обладают мутагенной активностью. Разработаны нормативные документы на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой» в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Результаты диссертации можно использовать в фармации, медицине и технологии фармацевтического производства.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения. Представленные результаты обладают высокой технико-экономической эффективностью, так как результаты фармакогностического изучения позволяют рационально использовать лекарственное растительное сырье тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана. Разработан метод интенсификации процесса и технология получения сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего, которые могут найти применение в фармацевтической промышленности. Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего предложены в качестве субстанции для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. По материалам диссертации получены 1 Евразийский патент, 1 патент РК. Опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных КОКСНВО РК, 1 статья в международном научном журнале, входящем в базу данных Scopus Q3, тезисы 9 докладов, из них тезисы 7 докладов в материалах международных конференций.

В общей сложности, научный уровень диссертационной PhD работы отвечает современным аналогам, которые представлены в научной печати.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Павлов Н.В. Флора Казахстана. - Алма-Ата: изд. АН Казахской ССР, 1964. – Т. 7. - 497 с.
- 2 Adams M., Schneider S.-V., Kluge M., Kessler M., Hamburger M. Epilepsy in the renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century german herbals // Journal of Ethnopharmacology. - 2012. – V. 143, № 1. – P. 1–13.
- 3 Jovanović A.A., Balanč B.D., Petrović P., Pravić R., Djordjević V.B. Pharmacological potential of *Thymus serpyllum* L. (wild thyme) extracts and essential oil: A review // Journal of Engineering & Processing Management. - 2021. - V. 13, № 2. - P. 32-41.
- 4 Aziz S., et al. Studies on the chemical constituents of *Thymus serpyllum* // Turkish Journal of Chemistry. - 2008. - V. 32, № 5. – P. 605-614.
- 5 Mustafa B., Hajdari A., Pieroni A., Pulaj B., Koro X., Quave C.L. A cross-cultural comparison of folk plant uses among Albanians, Bosniaks, Gorani and Turks living in south Kosovo // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. - 2015. - V. 11, № 1. - P. 605-614.
- 6 Gairola S., Sharma J., Bedi Y.S. A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use // Journal of Ethnopharmacology. - 2014. - V. 155, № 2. - P. 925-986.
- 7 Čančarević A., Bugarski B., Šavikin K., Zdunić G. Biological activity and ethnomedicinal use of *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum* // Lekovite sirovine. - 2013. - № 33. – P. 3–17.
- 8 Kayani S., Ahmad M., Zafar M., Sultana S., Khan M.P.Z., Ashraf M. A., Yaseen G. Ethnobotanical uses of medicinal plants for respiratory disorders among the inhabitants of gallies – abbotabad, Northern Pakistan // Journal of Ethnopharmacology. - 2014. - V. 156. - P. 47–60.
- 9 Stojanovic R., Belscak-Cvitanovic A., Manojlovic V., Komes D., Nedovic V., Bugarski B. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2012. - V. 92, №3. – P. 685 – 696.
- 10 Государственная фармакопея Республики Казахстан. - Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2009. - Т. 2. – С. 735-736.
- 11 European Pharmacopoeia 5th Ed. Main, 2005. - V. 5.0. - P. 2701-2702.
- 12 British Pharmacopoeia, 2022. – Т. IV - P. 505-506.
- 13 Государственная фармакопея РФ XIII online, ФС.2.5.0047.15. «Трава тимьяна. *Thymi serpylli herba*». - 2016. - 10 с.
- 14 Государственная фармакопея Республики Беларусь. – Молодечно: Типография Победа, 2008. - Т. 2. – P. 443-444.
- 15 Киселева В.Г., Смирнова Ю. А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М.: Издательство профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. - 295 с.

16 Jaric S., Mitrovic M., Pavlovic P. Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2015. – V. 2015. - P. 1 – 10.

17 Айрапетян С.А., Варданян Л.Р., Варданян Р.Л. Химический состав эфирного масла тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего в с. Хндзореск Сюникского региона республики Армении // Научно-медицинский журнал. – 2014. – V. 9, № 2. – С. 54-59.

18 Бузук А.Г., Юрченко Р.А., Винарский В.А., Бузук Г.Н. Сравнительный фармакогностический анализ травы чабреца // Вестник фармации. – 2011. - №3 (53). – С. 19-24.

19 Kulisic T., Radonic A., Milos M. Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils // Ital. J. Food Sci. - 2005. – V. 17, № 3. - P. 315-324.

20 Pluhar Z., Simko H., Sarosi S., Boros B., Dornyei A., Felinger A., Horvath G. Determination of essential oil and polyphenolic compounds in *Thymus* species // II International symposium on horticulture in Europe. – 2015. - V. 1099. – P. 661–670.

21 Mohan M., Seth R., Singh P., Lohani H., Gupta S. Composition of the Volatiles of *Hyssopus officinalis* (L.) and *Thymus serpyllum* (L.) from Uttarakhand Himalaya // National Academy Science Letters-India. – 2012. - V. 35, № 5. - P. 445-448.

22 Verma R.S., Padalia R.C., Saikia D., Chauhan A., Krishna V., Sundaresan V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils isolated from the herbage and aqueous distillates of two *Thymus* species // Journal of essential oil bearing plants. – 2016. - V. 19, № 4. – P. 936 –943.

23 Abu-Darwish M.S., Al-Ramamneh E.A.M., Kyslychenko V.S., Karpiuk U.V. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan // Pakistan journal of pharmaceutical sciences. – 2012. - V. 25, № 1. – P. 239–246.

24 Sefidkon F., Dabiri M., Mirmostafa S.A. The composition of *Thymus serpyllum* L. oil // Journal of Essential Oil Research. - 2004. - V. 16, № 3. - P. 184-185.

25 Asadollahi-Baboli M., Aghakhani A., Bikdelool V. Application of Polyamide Nanofibers, SPME/GC-MS, and Chemometrics for Comprehensive Analysis of Volatiles in *Thymus vulgaris* L. and *Thymus serpyllum* L. // Food analytical methods. - 2016. – V. 9, № 2. – P. 528-536.

26 Nardoni S., Giovanelli S., Pistelli L., Mugnaini L., Profili G., Pisseri F., Mancianti F. *In Vitro* Activity of Twenty Commercially Available, Plant-Derived Essential Oils against Selected Dermatophyte Species // Natural Product Communications. - 2015. - V. 10, № 8. - P. 1473-1478.

27 Porto C., Decorti D. Analysis of the volatile compounds of aerial parts and essential oil from *Thymus serpyllum* L. cultivated in North East Italy by HS-SPME/GC-MS and evaluation of its flavouring effect on Ricotta Cheese // Journal of Essential Oil Bearing Plants. - 2012. - V. 15, № 4. - P 561-571.

28 Kirillov V., Stikhareva T., Mukanov B., Chebotko N., Ryazantsev O., Atazhanova G., Adekenov S. Composition of the Essential Oil of *Thymus serpyllum* L.

from Northern Kazakhstan // Journal of essential oil bearing plants. – 2016. - V. 19, № 1. – P. 212 – 222.

29 Atazhanova G.A. Essential oils from plants of the genus *Thymus* L. of Kazakhstan flora: chemical composition and prospects of application // News of the National Academy of sciences of the republic of Kazakhstan. Series of biological and medical. – 2018. – V. 5, № 329. – P. 45-57.

30 Tazabayeva K., Sylibayeva B. Chemical composition of the essential oil and flavonoids of *Thymus serpyllum* L., growing on territory of the East Kazakhstan // Acta Poloniae Pharmaceutica c Drug Research. - 2018 - V. 75, № 6. - P. 1329-1337.

31 Eweis M., Imhemmed A.A.-A., Gad A.S. Influence of *Thymus serpyllum* essential oil on *Aspergillus parasiticus* morphology and aflatoxins production // Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences. - 2012. - V. 3, № 2. - P. 322-332.

32 Ouedrhiri W., Balouiri M., Bouhdid S., Moja S., Ouazzani Chahdi F., Taleb M., Greche H. Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect // Industrial Crops and Products. - 2016. - V. 89, № 30. - P. 1-9.

33 Ouedrhiri W., Balouiri M., Harki E.H., Moja S., Greche H. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils // International Journal of Food Properties. – 2017. – V. 20, № 12. - P. 3149-3158.

34 Jamali C.A., Bouzidi L.E., Bekkouche K., Lahcen H., Markouk M., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild moroccan *Thymus* Species // Chemistry & biodiversity. – 2012. - V. 9, № 6. – P. 1188–1197.

35 Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A., Ahmad M. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* // Journal of Food Safety. – 2006. - V. 5. - P. 56–60.

36 Hussain A.I., Anwar F., Chatha, S.A.S., Latif S., Sherazi S.T.H., Ahmad A., Worthington J., Sarker S.D. Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora // LWT-Food Science and Technology. – 2013. - V. 50, № 1. - P. 185-192.

37 Wesolowska A., Grzeszczuk M., Jadczyk D., Nawrotek P., Struk M. Comparison of the chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus serpyllum* essential oils // Notulae botanicae horti agrobotanici cluj- napoca. – 2015. - V. 43, № 2. – P. 432–438.

38 Bączek K., Pióro-Jabrucka E., Kosakowska O., Węglarz Z. Intraspecific variability of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) occurring in Poland // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. – 2019. – V. 12. – P. 30–35.

39 Wesołowska A., Jadczyk D., Grzeszczuk M. Influence of distillation time on the content and composition of essential oil isolated from wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) // Herba Polonica. - 2012. - V. 58, № 4. - P. 40-50.

40 Куркин В.А., Куркина А.В., Хусаинова А.И., Рязанова Т.К., Сазонова О.В. Исследование компонентного состава эфирных масел тимьяна ползучего и душицы обыкновенной, произрастающих в Самарской области // Медицинский вестник Башкортостана. - 2018. – Т. 13, № 2 (74). – С. 44-47.

41 Дурнова, Н.А. Химический состав эфирного масла *Thymus Marshallianus* Willd. и *Thymus Pallasianus* Н.Вр., произрастающих на территории Саратовской области / Н.А. Дурнова, Ю.В. Романтеева, А.Н. Ковтун // Химия растит. сырья. – 2014. - №2. – С. 115-119.

42 Varga E., Bardocz A., Belak A., Maraz A., Boros B., Felinger A., Boszormenyi A., Horvath G. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different *Thymus* extracts // *Farmacia*. – 2015. - V. 63, № 3. - P. 357-361.

43 Rus C., Sumalan R.M., Alexa E., Copolovici D.M., Pop G., Botau D. Study on chemical composition and antifungal activity of essential oils obtained from representative species belonging to the Lamiaceae family // *Plant Soil Environ.* – 2015. - V. 61, №7. – P. 297–302.

44 Goja I., Ulici A., Culea M., Munteanu V., Podea P. Influence of geographic location and enzyme-assisted extraction on essential oils composition of *Thymus serpyllum* growing wild in Transylvania // *STUDIA UBB CHEMIA*. - 2020. - LXV, № 3. - P. 135-147.

45 Petrovic S.S., Ristic M.S., Petrovic N.V., Lazic M.L., Franciskovic M., Petrovic S.D. Chemical composition and antioxidative activity of essential oil of *Thymus serpyllum* L. // *Hemijaska Industrija*. – 2014. - V. 68, № 3. - P. 389-397.

46 Čabarkapa I., Čolović R., Đuragić O., Popović S., Kokić B., Milanov D., Pezo L. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis // *Biofouling*. – 2019. – V. 35, № 3. – P. 361-375.

47 Knezevic P., Saboa V.A., Simin N., Lesjak M., Mimica-Dukic N. A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2018. - V. 152. – P. 271–278.

48 Galovičová L., Borotová P., Valková V., Vukovic N.L., Vukic M., Terentjeva M., Štefániková J., D'úranová H., Kowalczewski P.Ł., Kačániová M. *Thymus serpyllum* Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver // *Plants*. – 2021. - № 10. – P. 1416-1433.

49 Kačániová M., Terentjeva M., Vukovic N., Puchalski C., Roychoudhury S., Kunová S., Klūga A., Tokár M., Kluz M., Ivanišová E. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish // *Saudi Pharmaceutical Journal*. - 2017. - V. 25, № 8. – P. 1108-1116.

50 Topal U., Sasaki M., Goto M., Otles S. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2008. – V. 59 (7-8). – P. 619-634.

51 Voronova N., Horban V., Bohatkina V. The effectiveness of acaricidal drugs based on herbal raw material // *Ecological Questions*. – 2022. - V. 33, № 1. – P. 55–71.

52 Nedorostova L., Kloucek P., Urbanova K., Kokoska L., Smid J., Urban J., Valterova I., Stolcova M. Antibacterial effect of essential oil vapours against different strains of *Staphylococcus aureus*, including MRSA // *Flavour Fragr. J.* - 2011. - V. 26, № 6. – P. 403–407.

53 Raal A., Paaver U., Arak E., Orav A. Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia // *Medicina.* - 2004. – V. 40, № 8. - P. 795–800.

54 Paaver U., Orav A., Arak E., Mäeorg U., Raal A. Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia // *Natural product research.* – 2008. – V. 22, № 2. - P. 108–115.

55 Verma R.S., Verma R.K., Chauhan A., Yadav A.K. Seasonal variation in essential oil content and composition of Thyme, *Thymus serpyllum* L. Cultivated in Uttarakhand Hills // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2011. - V. 73, № 2. - P. 233-U12.

56 Verma R.S., Rahman L., Chanotiya C.S., Verma R.K., Singh A., Yadav A., Chauhan A., Yadav A.K., Singh A. K. Essential oil composition of *Thymus serpyllum* cultivated in the Kumaon Region of Western Himalaya, India // *Natural Product Communications.* – 2009. – V. 4, № 7, P. 987 – 988.

57 Aziz S., Habib-ur-Rehman, Irshad M., Asghar S.F., Hussain H., Ahmed I. Phytotoxic and Antifungal Activities of Essential Oils of *Thymus serpyllum* Grown in the State of Jammu and Kashmir // *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* - 2010. - V. 13, № 2. - P. 224-229.

58 Nikolić B., Matović M., Mladenović K., Todosijević M., Stanković J., Đorđević I., Marin P.D., Tešević V. Volatiles of *Thymus serpyllum* Obtained by Three Different Methods // *Natural Product Communications.* – 2019. – P. 1-3.

59 Nikolić M., Glamočlija J., C.F.R. Ferreira I. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils // *Industrial Crops and Products.* - 2014. - V. 52. - P. 183–190.

60 Aćimović M., Cvetković M., Stanković J., Igić R., Todosijević M., Vuković D., Brašanac D. Essential oil composition of the *Thymus serpyllum* L. from Kopaonik Mountain // *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management.* - 2019. - V. 2(2). - P. 241-247.

61 Stanisavljević D., Zlatković B., Ristić M., Veličković D., Đorđević S., Lazić M. The chemical composition of the essential oil of (*Thymus serpyllum* L.) from Kopaonik Mountain // *Advanced Technologies.* - 2012. - V. 1(1). - P. 25-29.

62 Старчак Ю. А. Фармакогностическое изучение растений рода Тимьян (*Thymus* L.) как перспективного источника получения фитопрепаратов. Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности: 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. – Курск, 2016. - 440 с.

63 Goyal S., Pathak R., Pandey H.K., Kumari A., Tewari G., Bhandari N. S., Bala M. Comparative study of the volatile constituents of *Thymus serpyllum* L. grown

at different altitudes of Western Himalayas // SN Applied Sciences. - 2020. - V. 2. – P. 1208.

64 15. Loziene K., Venskutonis P.R. Chemical composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. ssp. *serpyllum* growing wild in Lithuania // Journal of Essential Oil Research. - 2006. - V. 18, № 2. - P. 206-211.

65 52. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E-coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* // Food control. – 2007. - V. 18, № 5. – P. 414–420.

66 Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria // Food control. – 2009. - V. 20, № 2. – P. 157–160.

67 Loziene K., Venskutonis P.R. Chemotypes of interspecific hybrid of *Thymus* x *oblongifolius* opiz growing wild in Lithuania and effects of cloning on essential oil composition // Journal of essential oil research. – 2010. - V. 22, № 6. – P. 581–588.

68 Loziene K. Selection of fecund and chemically valuable clones of thyme (*Thymus*) species growing wild in Lithuania // Industrial crops and products. - 2009. - № 29. – P. 502–508.

69 Mockute D., Bernotiene G. 1,8-cineole-caryophyllene oxide chemotype of essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Vilnius (Lithuania) // Journal of essential oil research. 2004. Vol. 16, N 3. P. 236-238.

70 Kulisic T., Dragovic-Uzelac V., Milos M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from Oregano, Thyme and wild Thyme // Food Technol. Biotechnol. - 2006. - V. 44, № 4. - P. 485-492.

71 Božik M., Cejnar P., Šašková M., Nový P., Maršík P., Klouček P. Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components – insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF // Scientific Reports. – 2018. - № 8.- P. 13042.

72 Lević J., Čabarkapa I., Todorović G., Pavkov S., Sredanović S., Coghill-Galonja T., Kostadinović L. *In vitro* antibacterial activity of essential oils from plant family *Lamiaceae* // Romanian Biotechnological Letters. - 2011- V. 16, № 2. – P. 6034-6041.

73 Mengulluoglu M., Soylu S. Antibacterial activities of essential oils extracted from medicinal plants against seed-borne bacterial disease agent, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* // Res. on Crops. - 2012. - V. 13, № 2. - P. 641-646.

74 Kloucek P., Smid J., Frankova A., Kokoska L., Valterova I., Pavela R. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase // Food Research International. - 2012. - V. 47. - P. 161–165.

75 Acimovic M., Zoric M., Cvetkovic M. Chemical characterization and antibacterial activity of essential oil of medicinal plants from Eastern Serbia // Molecules. – 2020. - V. 25. – P. 5482-5507.

76 Jovanovic A.A., Dordevic V.B., Zdunic G.M., Savikin K.P., Pljevljakusic D.S., Bugarski B.M. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity // Hemijska industrija. – 2016. - V. 70, №4. – P. 391 – 398. Прототип

77 Jovanovic A.A., Dordevic V.B., Zdunic G.M., Pljevljakusic D.S., Savikin K.P., Godevac D.M., Bugarski B.M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques // Separation and Purification Technology. – 2017. - V. 179. – P. 369–380.

78 Brezoiu A.-M., Prundeanu M., Berger D., Deaconu M., Matei C., Oprea O., Vasile E., Negreanu-Pîrjol T., Muntean D., Danciu C. Properties of *Salvia officinalis* L. and *Thymus serpyllum* L. extracts free and embedded into mesopores of silica and titania nanomaterials // Nanomaterials. - 2020. - V. 10(820). - P. 1-21.

79 Berdowska I., Zielinski B., Fecka I., Kulbacka J., Saczko J., Gamian A. Cytotoxic impact of phenolic from Lamiaceae species on human breast cancer cells // Food chemistry. – 2013. - V. 141, №2. – P. 1313 – 1321.

80 Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R., Karaca B. Effects of *Thymus serpyllum* Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells // Nutrition and cancer-an international journal. – 2012. - V. 64, №8. – P. 1245 – 1250.

81 Pruteanu A., Popescu C., Vladut V., Gageanu G. Biochemical analysis of some vegetal extracts obtained from indigenous spontaneous species of *Thymus serpyllum* L. // Romanian Biotechnological Letters. - 2018. - V. 23, № 5. - P. 14013-14024.

82 Винокурова О.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И. Сравнительная характеристика различных видов тимьяна: состав, свойства, применение (ОБЗОР) // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2016. - №4 (17). - С. 134-150.

83 Abramovic H., Abram V., Cuk A., Ceh B., Smole Možina S., Vidmar M., Pavlovič M., Poklar Ulrich N. Antioxidative and antibacterial properties of organically grown thyme (*Thymus* sp.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. – 2018. – V. 42. - P. 185 – 194.

84 Cakmakci E., Deveoglu O., Muhammed A., Fouad A., Torgan E., Karadag R. HPLC-DAD analysis of *Thymus serpyllum* based natural pigments and investigation of their antimicrobial properties // Pigment & Resin Technology. - 2014. – V.43, №1. - С. 19–25.

85 Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhar Z., Kilar F., Felinger A. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species // Journal of chromatography. – 2010. - Vol. 1217, №51. – P. 7972 – 7980.

86 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Изучение дубильных веществ растений рода Тимьян флоры средней полосы европейской части России // Научные ведомости. - 2015. - В. 31, № 16 (213). - С. 174–179.

87 Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В., Быструшкин А.Г., Булышева А. Фенольные соединения и антиоксидантная активность уральских представителей рода *Thymus* (*Lamiaceae*) // Растительные ресурсы. – 2012. - Вып. 1. – С. 110-117.

- 88 Mata A. T., Proenca C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F., Araujo M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices // *Food Chem.* - 2007. - V.103. - P. 778-786.
- 89 Губаненко Г.А., Маюрникова Л.А. Перспективы применения тимьяна ползучего в производстве продуктов питания // *Ползуновский вестник.* - 2013. - № 4-4. - С. 183-187.
- 90 Pereira O., Cardoso S. Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols // *Current Analytical Chemistry.* - 2013. - V. 9. - P. 382-396.
- 91 Wojdylo A., Oszmianski J., Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs // *Food Chem.* – 2007. - № 105(3). – P. 940-949.
- 92 Hossain M.B., Rai D.K., Brunton N.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* - 2010. - № 58(19). – P. 10576-10581.
- 93 A. Janiak M., Slavova-Kazakova A., D. Kancheva V., Ivanova M., Tsrunchev T., Karamać M. Effects of γ -Irradiation of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the phenolic compounds profile of its ethanolic extract // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* - 2017. - V.67, №4. - P. 309-315.
- 94 Kindl M., Blazekovic B., Bucar F., Vladimir-Knezevic S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* – 2015. – V. 2015. – 10 p.
- 95 Jovanovic A.A., Djordjevic V., Petrovic P., Pljevljakusic D., Zdunic G.M., Savikin K.P., Bugarski B.M. The influence of different extraction conditions on polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of wild thyme // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants.* - 2021. – V. 25. – P. 100328.
- 96 Jovanovic A.A., Petrovic P., Zdunic G.M., Savikin K.P., Djordjevic V., Bugarski B.M., Brankovic S. Influence of lyophilized *Thymus serpyllum* L. extracts on the gastrointestinal system: Spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties // *South African Journal of Botany.* – 2021. – V. 142. – P. 274 -283.
- 97 Prundeanu M., Brezoiu A.M., Deaconu M., Berger D. Chemical profiling of polyphenols from *Salvia officinalis* and *Thymus serpyllum* extracts during a three-stage extraction process // *University politehnica of Bucharest Scientific Bulletin.* - 2021. - V. 83(1). - P. 3-16.
- 98 Gulten O., Arslan K., Tekin R., Camur I., Gorda S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Different Spice Extracts // *European Journal of Science and Technology.* - 2021. - № 22. – P. 421-429.
- 99 Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Сорокина А.А., Галько М.Н. Определение флавоноидов в траве и лекарственных формах тимьяна ползучего // *Фармация.* - 2013. - №5. - С. 14–17.
- 100 Fecka I., Turek S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques // *Food Chem.* - 2008. - № 108. - P. 1039-1053.
- 101 Wang H., Provan G.J., Helliwell, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC // *Food Chemistry.* - 2004. - № 87. - P. 307–311.

102 Liu A.H., Li L., Xu M., Lin Y.H., Guo H.Z., Guo D.A. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2006. - № 41. - P. 48-56.

103 Milevskaya V.V., Statkus M.A., Temerdashev Z.A, Kiseleva N.V., Butyl'skaya T.S., Shil'ko E.A. Extraction and Determination of Biologically Active Components of St. John's Wort and Its Pharmaceutical Preparations // *Journal of Analytical Chemistry*. - 2016. - V. 71, № 7. - P. 741-747.

104 Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples // *J. Chromatogr. A*. - 2005. - № 1089. - P. 1-17.

105 Benvenuti L., Zielinski A.A.F., Ferreira S.R.S. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? // *Trends Food Sci. Technol.* - 2019. - № 90. - P. 133–146.

106 Mišan A., Nadpal. J., Stupar A., Poji'c M., Mandi'c A., Verpoorte R., Choi Y.H. The perspectives of natural deep eutectic solvents - in agri-food sector // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* - 2019. - № 60. – P. 2564–2592.

107 Pavli'c B., Mrkonji'c Z., Tesli'c N., Kljaki'c A.C., Poji'c M., Mandi'c A., Stupar A., Santos F., Duarte A.R., Mišan A. Natural deep eutectic solvent (NADES) extraction improves polyphenol yield and antioxidant activity of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extracts // *Molecules*. - 2022. - № 27(5). - P. 1508.

108 ФСП 42–2627–08 «Чабреца экстракт жидкий субстанция» ОАО «Фармстандарт–Томскхимфарм» // Введ.29.12.2008.– М., 2008 –С. 14. ЛСР-002826/07 от 30.10.2017.

109 В.И. Чуешов, Е.В. Гладух, И.В. Сайко. Технология лекарств промышленного производства. В 2-х томах – Винница: Нова книга, 2014. Промышленная технология лекарств. / Под ред. профессора В. И. Чуешова -Х.: МТК Книга. Изд. НФАУ, 2014.

110 Коницев А.С., Баурин П.В. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки // *Вестник МГОУ*. – 2011. – № 3 –С. 49-53.

111 Касымова Д.Т., Алиева А.Б., Жузеева М.С., Жусупова Г.Е. Ультразвуковая экстракция как способ оптимизации технологии извлечения биологически активных веществ из растений вида *Limonium Gmelinii* // *Известия Научно-Технического Общества «КАХАК»*. - 2020. - № 2 (69). – 58 с.

112 А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, М.Н. Галько Определение флавоноидов в траве и лекарственных формах тимьяна ползучего // *Фармация*. – 2013. - № 5. – С. – 14-17

113 Ashok Kumar Gupta, Surendra Gaur, Sawan Kumar. Descriptions, Ethnobotany and Diuretic activity of Indian medicinal plants // *Journal of scientific & innovative research*. - 2013. №2. – P.76-83

114 Sam S. Importance and effectiveness of herbal medicines // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2019. - Vol.8, №2. - P.354-357.

115 Государственный реестр средств. Т.1: Типовые клинико-фармакологические статьи Официальное издание (по состоянию на 25.04.2012 г.). – М., 2012.;

116 Машковский, М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. - 1200 с.

117 Рыжов В.М., Куркин В.А., Степанова Е.В. Исследование возможности вторичной переработки шрота травы тимьяна ползучего как отхода производства лекарственного препарата «Пертуссин» // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2012. - Т. 14, №1(9). - С. 2285-2287.

118 Stojanovic R., Belscak-Cvitanovic A., Manojlovic V., Komes D., Nedovic V., Bugarski B. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads // Journal of the science of food and agriculture. - 2012. - V. 92, №3. - P. 685-696.

119 Trifkovic K. T., Milasinovic N. Z., Djordjevic V. B., Krusic M.T.K., Knezevic-Jugovic Z. D., Nedovic V. A., Bugarski B. M. Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols // Carbohydrate polymers. - 2014. - V. 111. - P. 901-907.

120 Патент РК № 34245 на изобретение от 26.03.2020. Способ получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), обладающего антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori* // Оразбаева П.З., Шакаримова К.К., Ивасенко С.А., Ахметова С.Б., Лосева И.В.

121 Евразийский патент № 036266 от 20.10.2020 г. Способ получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), обладающего антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori* // Оразбаева П.З., Шакаримова К.К., Ивасенко С.А., Ахметова С.Б., Лосева И.В.

122 Маматова А.С. Фармакогностическое, фармакотехнологическое изучение полыни *Artemisia gmelinii* и создание на ее основе фитосубстанций. Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD). 6D110400 – Фармация. – Алматы, 2018. – 185 с.

123 Vidal, справочник лекарственных препаратов Казахстана https://www.vidal.kz/poisk_preparatov/bronchicum-s.htm

124 Адекенова А.С. Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств. Диссертация на соискание ученой степени доктора философии (PhD). 6D110400 – Фармация. – Караганда, 2016. – 143 с.

125 Ivasenko S., Orazbayeva P., Skalicka-Wozniak K., Ludwiczuk A., Marchenko A., Ishmuratova M., Poleszak E., Korona-Glowniak I., Akhmetova S., Karilkhan I., Loseva I. Antimicrobial activity of ultrasonic extracts of two chemotypes of *Thymus serpyllum* L. of Central Kazakhstan and their polyphenolic profiles // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2021. - 9(A). – P. 61-67.

126 Санникова Е.Г., Попова О.И., Компанцева Е.В., Фролова О.О. Изучение фенолкарбоновых кислот побегов ивы трехтычинковой, произрастающей на Северном Кавказе // Фармация и фармакология. – 2015. - № 2 (9). – С. 13-17.

- 127 Хитева О.О. Изучение некоторых видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе: Автореф. дис. канд. фармац. наук. – Пятигорск, 2012. – 24 с.
- 128 Государственная фармакопея РФ XIII online, ОФС.1.5.3.0008.1 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». - 2016. - 4 с.
- 129 Кахраманова С.Д., Боков Д.О., Самылина И.А. Количественное определение полисахаридов в лекарственном растительном сырье. // Фармация. - 2020. - № 69 (8). - С. 5–12.
- 130 Духанина И.В., Айрапетова А.Ю., Лазарян Г.Д. и др. Количественное определение аминокислот в пыльце (обножке) // Хим.-фарм. журн. - 2006. - Т. 40, № 2. - С. 22–23.
- 131 Государственная фармакопея РФ XIV, ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды *Rosae fructus*». - 2018.
- 132 Егорова И.Н., Мальцева Е.М., Большаков В.В. Оценка содержания биологически активных соединений в плодах шиповника майского (*Rosa majalis* Herrm.) флоры Кузбасса // Медико-фармацевтический журнал "Пульс". - 2021. - Т. 23, № 5. - С. 47-51.
- 133 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с.
- 134 Рябов Н.А., Рыжов В.М., Куркин В.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого *Quercus robur* L. // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9 (5). – С. 356-366.
- 135 Tejchman W., Korona-Glowniak I., Malm A., Zylewski M., Suder P. Antibacterial properties of 5-substituted derivatives of rhodanine-3-carboxyalkyl acids // Medicinal Chemistry Research. - 2017. - V. 26 (6). - P. 1316-1324.
- 136 Malm A., Glowniak-Lipa A., Korona-Glowniak I., Baj T. Anti-*Helicobacter pylori* activity *in vitro* of chamomile flowers, coneflower herbs, peppermint leaves and thyme herbs – a preliminary report // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. - 2015. - V. 28 (1). - P. 30-32.
- 137 Государственная фармакопея РФ XIII online, ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» - 2016. - 43 с.
- 138 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Изучение отхаркивающей активности растений рода Тимьян // Медицинский вестник Башкортостана. - 2013. - Т. 8, № 5. – С. 78-80.
- 139 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Хабриева Р.У. – 2-изд., перераб. и доп. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. - 832 с. ISBN 5-225-04219-8
- 140 Оразбаева П.З., Ахметалимова А.М., Ивасенко С.А., Лосева И.В., Ишмуратова М.Ю. Распространение некоторых растений рода Тимьян на территории Центрального Казахстана // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: сб. - Москва, 2017. - С.170-172.

141 Оразбаева П.З., Ишмуратова М.Ю., Ивасенко С.А., Марченко А.Б., Лосева И.В. Сравнительное фармакогностическое изучение двух хемотипов *Thymus serpyllum* L. Центрального Казахстана // Фармация Казахстана. – 2018. - № 10 (207). – С. 42-47.

142 Akhmetalimova A.M., Orazbayeva P.Z., Ishmuratova M.Yu., Ivasenko S.A., Glowniak K. Determination of macroscopic diagnostic signs of raw materials of *Thymus serpyllum* and *Thymus crebrifolius* // Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География». - 2017. - № 2 (86). – С. 15-19.

143 Оразбаева П.З., Ишмуратова М.Ю., Лосева И.В., Ивасенко С.А. Исследование особенностей диагностических признаков двух хемотипов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающих на территории Казахстана // IV (XII) Международная ботаническая конференция молодых учёных: сб. - Санкт-Петербург, 2018. - С. 46-47.

144 Саякова Г.М., Ахатаева У.А. Фармакогностическое изучение травы тимьяна ползучего (чабрец) (*Herba Thymi serpylli*). - Алматы. - С. 506–507.

145 Оразбаева П.З., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю., Лосева И.В. Изучение анатомического строения надземных органов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*) // Современная биология. Теоретические, прикладные аспекты и междисциплинарные связи: сб. - Караганда, 2017. - С.61-64.

146 Orazbayeva P.Z., Shakarimova K.K., Ivasenko S.A. Content of main groups of biologically active substances in two chemotypes of *Thymus serpyllum* L., growing in the Kazakhstan territory // Topical issues of new drugs development: book. - Kharkiv, 2018. - P. 60-62.

147 Оразбаева П.З., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю., Лосева И.В. Запасы сырья некоторых растений рода Тимьян на территории Центрального Казахстана // Мир науки и молодежь: тенденции и новые горизонты: сб. – Караганда, 2017 г. - С. 308-309.

148 Grotewold E. The Science of Flavonoids. New York: Springer. – 2006. – 274 p.

149 Cushnie T.P., Lamb A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids // Int. J. Antimicrob Agents. - 2011. - № 38. - P. 99–107.

150 Magnus S., Gazdik F., Anjum N.A., Kadlecova E., Lackova Z., Cernei N., Brtnicky M., Kynicky J., Klejdus B., Necas T., Zitka O. Assessment of Antioxidants in Selected Plant Rootstocks // Antioxidants (Basel). – 2020. – V. 9, № 3. – P. 209.

151 Dureshahwar K., Mubashir M., Upaganlwar A.B., Sangshetti J., Upasani C., Une H. Quantitative assessment of tactile allodynia and protective effects of flavonoids of *Ficus carica* Lam. leaves in diabetic neuropathy // Pharmacognosy Magazine. – 2019. – V. 15, № 62. – P. 128–134.

152 Макарова Н.В., Игнатова Д.Ф., Еремеева Н.Б. Влияние технологии экстрагирования на содержание фенолов, флавоноидов и уровень антиоксидантной активности для плодов шиповника (*Rosa* L.), коры дуба (*Quercus robur* L.), корня ревеня (*Rheum officinale*), корня жень-шеня (*Panax* L.), почек березы (*Betula* L.) // Химия растительного сырья. – 2020. – № 3. – С. 271–

278.

153 Рябов Н.А., Рыжов В.М., Куркин В.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого *Quercus robur* L. // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9(5). – С. 356-366.

154 Куркин В.А., Павел П.В., Рыжов В.М. Количественное определение суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, №2. – С. 47–51. DOI:10.30906/0023-1134-2019-53-2-47-51.

155 Куркин В.А., Белов П.В., Рыжов В.М., Браславский В.Б. Определение содержания рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, №12. – С. 21–25. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-12-21-25.

156 Куркина А.В., Савельева А.Е., Куркин В.А. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, №2. – С. 46–50.

157 Lysiuk R., Hudz N. Differential Spectrophotometry: Application for Quantification of Flavonoids in Herbal Drugs and Nutraceuticals Editorial // International Journal of Trends in Food and Nutrition. – 2017. – V. 1. – P. 102.

158 Bunaciu A.A., Vu Dang H., Hassan Y. Aboul-Enein. Applications of Differential Spectrophotometry in Analytical Chemistry // Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2013. – V. 43, №3. – P. 25–130.

159 Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) // В.А. Куркин. – 3-е изд., перераб. и доп. - Самара: ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – С. 1152-1153.

160 Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография // А.В. Куркина – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.

161 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2012. - Вып. 20/1, № 22(141). - С. 157-160.

162 Оразбаева П.З., Ахметалимова А.М., Ахметова С.Б., Korona – Glowniak I., Абубакирова Р.Б., Ишмуратова М.Ю., Лосева И.В., Ивасенко С.А. Изучение антимикробной активности суммарных экстрактов *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus serpyllum* L. // Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік фармацевтика академиясының хабаршысы». – 2017. - № 4(81). - С. 29–31.

163 Шакаримова К.К., Оразбаева П.З., Ахметова С.Б., Ивасенко С.А. Средство, обладающее антимикробным действием в отношении *Staphylococcus aureus* // Мир науки и молодежь: эра стремительных изменений: сб. – Караганда, 2018 г. - С. 107-108.

164 Lavrinenko A.V., Orazbayeva P.Z., Akhmetalimova A.M., Poleszak E., Korona – Glowniak I, Skalicka – Wozniak K, Ludwiczuk A., Loseva I.V., Ivasko S.A. Anti-*Helicobacter pylori* activity *in vitro* of biologically active substances of some representatives of the genus *Thymus* L., growing on the territory of Kazakhstan

// 18th International Congress on Infectious Diseases. - Buenos Aires, Argentina, 2018. - UMP.096.

165 Оразбаева П.З., Шакаримова К.К., Ахметова С.Б., Медешова, А.Т., Лосева И.В., Ивасенко С.А. Оценка отхаркивающего действия суммарных экстрактов тимьяна ползучего, произрастающего на территории Казахстана // Медицина и экология. – 2018. - № 2 (87). – С. 77-79.

166 Ахметова С.Б., Тастанова Г.М., Атажанова Г.А., Медешова А.Т., Филатова, Л.Г., Умарова А.Г. Тестирование на канцерогенность эфирного масла ромашки аптечной // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2014. - №1/1 (60). – С. 64-66.

167 Оразбаева П.З., Шакаримова К.К., Ивасенко С.А., Ахметова С.Б., Скалица-Возняк К. Способ получения, биологические свойства и острая токсичность ультразвукового экстракта тимьяна ползучего // Фармация. – 2019. – Спец. выпуск. - С. 760–764.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Решение Комитета по биоэтике Карагандинского государственного медицинского университета

Заседание № 47 _____
Протокол № 47 _____

Дата (Д/М/Г) 18.06.2018г.
Присвоенный номер 57

Название протокола: «Химический состав и биологические свойства ультразвукового экстракта тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, перспективы его применения в медицине»					
Основной исследователь:	Оразбаева Перизат Зарухановна				
Институт:	КГМУ				
Рассмотренные элементы	<input checked="" type="checkbox"/> Приложены <input type="checkbox"/> Не приложены				
Повторное рассмотрение <input type="checkbox"/> да <input checked="" type="checkbox"/> Нет	Дата предыдущего рассмотрения:				
Решение:	<input checked="" type="checkbox"/> Разрешено (Р) <input type="checkbox"/> Разрешено с рекомендациями (Рек) <input type="checkbox"/> Повторная заявка (ПЗ) <input type="checkbox"/> Не разрешено (НР)				
№.	Голосование членов КБЭ	решение			
		Р	Рек	ПЗ	НР
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мациевская Л.Л.	✓			
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Ауезова М.Х.	✓			
5.	Бадыров Р.М.	✓			
6.	Бакирова Р.Е.	✓			
7.	Битнер Е.С.	✓			
8.	Блок О.Г.	✓			
9.	Вистерничан О.А.	✓			
10.	Калиева Ш.С.				
11.	Касапиди Д.И.	✓			
12.	Омаркулов Б.К.	✓			
13.	Понамарева О.А.	✓			
14.	Сорокина М.А.	✓			
15.	Тулетаева С.Т.	✓			

Примечание: Р - Разрешено; Рек – Разрешено с рекомендациями;
ПЗ – Повторная заявка; НР – Не разрешено

Подпись: _____

**Председатель: д.м.н., профессор
Молотов-Лучанский В.Б.**

Дата: 18.06.2018г.



.....
**Ответственный секретарь
Куаныш Ж.М.**

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

СОГЛАСОВАНО

И.о. Председателя Правления
Ректора НАО «МУК»
Дуррес А.А. Турмухамбетова
« 03 » 08
М.П.



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского центра
НАО «МУК»
Л.Л. Ахмалтдинова
от « 03 » 08 2021 г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» Комитета медицинского и фармацевтического контроля МЗ РК

« ___ » _____ 20__ г.
М.П.

ПРИКАЗ

РГУ «Комитет контроля качества и безопасности товаров и услуг» МЗ РК
от « ___ » _____ 20__ г.
№ _____
М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья

Thymus serpyllum herba

Тасшөп жебірдің шөбі

Тимьяна ползучего трава

Семейство Яснотковые (*Lamiaceae* L.).

Сбор сырья в фазу цветения

Наименование и страна организации-производителя

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна держателя регистрационного удостоверения

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна организации-упаковщика

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Область применения – исходное сырье для получения природных полифенольных соединений.

НД РК 42-

Срок введения установлен с
« ___ » _____ 20__ г.

Водится в первые

Срок действия до
« ___ » _____ 20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА

СОГЛАСОВАНО

И.о. Председателя Правления –
Ректора НАО «МУК»
А.А. Турмухамбетова
« 03 » 08 2021 г.
М.П.



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского центра
НАО «МУК»
Л.Л. Ахмалтдинова
от « 03 » 08 2021 г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГП на ПХВ "Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий" Комитета медицинского и фармацевтического контроля КМиФК МЗ РК

« ___ » _____ 20__ г.
М.П.

ПРИКАЗ

РГУ «Комитет медицинского и фармацевтического контроля МЗ РК»
от « ___ » _____ 20__ г.
№ _____
М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственной субстанции

Thymus serpyllum extractum siccum

Тасшөп жебірдің құрғақ сығындысы

Тимьяна ползучего экстракт сухой

Наименование и страна организации-производителя

НАО «Медицинский университет Караганды», Республика Казахстан.

Наименование и страна держателя регистрационного удостоверения

НАО «Медицинский университет Караганды», Республика Казахстан.

Наименование и страна организации – упаковщика

НАО «Медицинский университет Караганды», Республика Казахстан.

НД РК 42-

Срок введения установлен с
“ ___ ” _____ 20__ г.

Водится в первые

Срок действия до
“ ___ ” _____ 20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА

ПРИЛОЖЕНИЕ В



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО



ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 036266

Название изобретения:

«СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЭКСТРАКТА
ИЗ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (THYMUS SERPYLLUM L.S.I.),
ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ В
ОТНОШЕНИИ HELICOBACTER PYLORI»

Патентовладелец (льцы):

НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ" (KZ)

Изобретатель (и):

Оразбаева Перизат Зарухановна, Шакаримова Куаныш Казбековна,
Ивасенко Светлана Александровна, Ахметова Сауле Балтабаевна,
Лосева Ирина Викторовна (KZ)

Заявка №:	201800259
Дата подачи заявки:	09 апреля 2018 г.
Дата выдачи патента:	20 октября 2020 г.

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение с формулой, опубликованной в Бюллетене Евразийского патентного ведомства «Изобретения (евразийские заявки и патенты)» № 10 / 2020 год.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств - участников Евразийской патентной конвенции - Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана.



ТЛЕВЛЕСОВА Сауле Январбековна
Президент Евразийского патентного ведомства

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**ПАТЕНТ
PATENT**

№ 34245

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION



(21) 2018/0220.1

(22) 09.04.2018

Қазақстан Республикасы Өнертабыстары мемлекеттік тізілімінде тіркеу күні / Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан / Date of the registration in the State Register of Inventions of the Republic of Kazakhstan: 26.03.2020

(54) *Helicobacter pylori*-ға қатысты антибактериалды қасиетке ие тасшөп жебірдің (*Thymus serpyllum* L.s.l.) ультрадыбыстық сығындысын алу әдісі

Способ получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.l.), обладающего антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*

Method of obtaining an ultrasonic extract from thyme creeping (*Thymus serpyllum* L.s.l.) having antibacterial action against *Helicobacter pylori*

(73) "Қарағанды медицина университеті" коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)

Некоммерческое акционерное общество "Медицинский университет Караганды" (KZ)

"Karaganda Medical University" Non-Commercial Joint-Stock Company (KZ)

(72) Оразбаева Перизат Зарухановна (KZ)

Шакаримова Куаныш Казбековна (KZ)

Ивасенко Светлана Александровна (KZ)

Ахметова Сауле Балтабаевна (KZ)

Лосева Ирина Викторовна (KZ)

Orazbayeva Perizat Zarukhanovna (KZ)

Shakarimova Kuanyshe Kazbekovna (KZ)

Ivassenko Svetlana Alexandrovna (KZ)

Akhmetova Saule Baltabayevna (KZ)

Losseva Irina Viktorovna (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды

Подписано ЭЦП

Signed by EDS

Е. Куантыров

Е. Куантыров

Y. Kuantyrov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Для служебного пользования. Экз.№ _____

Министерство здравоохранения Республики Казахстан
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»
(НАО «МУК»)

СОГЛАСОВАНО

И.о. Председателя Правления
Ректора НАО «МУК»

А.А. Турмухамбетова
А.А. Турмухамбетова

«03» 08



УТВЕРЖДАЮ

И.о. Директора Научно-исследовательского центра НАО «МУК»

Л.Л. Ахмалтдинова
Л.Л. Ахмалтдинова

«03» 08 2021 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ на получение субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой»

ЛР-005491-МК-04-21

Срок действия регламента до «03» 08 2024 г.

Декан Школы фармации,
к.б.н., доцент

И.В. Лосева

Научный консультант:
Профессор-исследователь
Школы фармации, д.фарм.н.

С.А. Ивасенко

Разработчик:
Преподаватель
Школы фармации

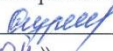
П.З. Оразбаева

КАРАГАНДА 2021

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

СОГЛАСОВАНО


И.о. Председателя Правления
Ректора НАО «МУК»


«04» 08 2021 г.
М.П.



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского
центра НАО «МУК»


«04» 08 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научно-исследовательской работы

Научно-исследовательский центр НАО «МУК»

(название учреждения, где внедрена работа)

Наименование предложения: Технология получения субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой»

(наименование работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:

«Химический состав и биологические свойства ультразвукового экстракта тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, перспективы его применения в медицине».

Форма внедрения: Опытная технология получения субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой».

(внедрение метода, способа, аппарата в учебном заведении)

Ответственные за внедрение, исполнители:

Сторона 1. Оразбаева П.З. - преподаватель Школы фармации НАО «МУК»

Сторона 2. Ахмалтдинова Л.Л. - И.о. Директора Научно-исследовательского центра НАО «МУК».

Эффективность внедрения: Впервые разработана технология получения субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для производства отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний.

(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная – указать конкретно)

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:

Внедрить технологию получения субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для производства отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики

Helicobacter pylori – ассоциированных заболеваний на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК».

Сроки внедрения до 04.08.2024 г.

Преподаватель Школы фармации
НАО «МУК»



П.З. Оразбаева

ПРИЛОЖЕНИЕ Е



АКТ

испытаний на антимикробную и противогрибковую активность,
выполненных в учебной микробиологической лаборатории на базе кафедры
микробиологии КГМУ

Объекты исследования: ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска (УЭТП-1), ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах (УЭТП-2).

Цель работы: изучение антибактериальной и противогрибковой активности ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска и Корнеевских лесах, в рамках внутривузовского проекта «Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus* L., произрастающих на территории Казахстана, для создания эффективных отечественных фитопрепаратов на их основе».

Изучение антимикробной активности вышеуказанных образцов проводилось по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательных штаммов *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 и к дрожжевому грибку *Candida albicans* ATCC 10231 методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения – гентамицин, бензилпенициллина натриевая соль для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка.

Культуры выращивали на жидкой среде pH $7,3 \pm 0,2$ при температуре от 30 до 35°C в течение 18-20 часов. Культуры разводили 1:1000 в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими селективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засеивали по методу «сплошного газона». После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6,0 мм, в которые вносили растворы исследуемых образцов, гентамицина, бензилпенициллина натриевой соли и нистатина. В качестве контроля использовали диметилсульфоксид в эквивалентных количествах. Исследуемые образцы испытывались в концентрации 2 мг/мл. Концентрация препаратов сравнения составляла 2 мг/мл. Посевы инкубировали при 37°C, учет растущих культур проводили через 24 часа.

Антимикробная активность образцов оценивалась по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10-15 мм – слабая активность, 15-20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная.

Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки. Результаты исследования антимикробной активности образцов приведены в таблице.

Таблица - Антимикробная активность образцов методом диффузии в агар

Шифр (название)	<i>St. aureus</i> (мм)	<i>B. subtilis</i> (мм)	<i>E. coli</i> (мм)	<i>Ps. aeruginosa</i> (мм)	<i>C. albicans</i> (мм)
УЭТП-1	14±0,8	18±1,1	15±0,8	11±1,0	15±0,9
УЭТП-2	22±1,0	16±1,1	21±0,9	11±1,1	15±1,0
Гентамицин	22±1,1	19±0,9	21±1,0	-	-
Бензилпенициллина натриевая соль	14±1,2	16±1,1	13±1,1	-	-
Нистатин	-	-	-	-	22±1,0
Контроль (диметилсульфаксид)	-	-	-	-	-

Заключение. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (УЭТП-1) обладает умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (УЭТП-2) проявляет выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* сопоставимую с препаратом сравнения гентамицином, и превышает действие бензилпенициллина натриевой соли. Также обладает умеренно выраженной антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

Таким образом, ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего можно рассматривать как перспективную субстанцию для разработки отечественных лекарственных средств антимикробного действия.

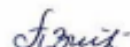
Исполнители:

Зав. кафедрой микробиологии



Ахметова С.Б.

Докторант КГМУ



Ораббаева П.З.



Medical University of Lublin
Chair and Department of Pharmaceutical Microbiology
with Laboratory for Microbiological Diagnostics
 Chodzki 1 str., 20-093 Lublin, Poland
 tel. (fax) +48 81 448 71 00

Thymus serpyllum L. Karkaralinsk

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC ratio
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	2.5	2.5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1.25	1.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	1.25	2.5	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	1.25	2.5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1.25	1.25	1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	5	5	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	5	10	2
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	5	1
Gram-negative bacteria			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	10	10	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	1.25	1.25	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	2.5	2.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	10	10	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	10	2
Yeasts			
<i>Candida albicans</i> ATCC102231	>20	10	
<i>Candida albicans</i> ATCC2091	>20	10	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019	5	10	2
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	10	10	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10	2
Helicobacter pylori ATCC43504			
Plant extract	0.0625	1.25	2
Plant oil	0.0156	0.0156	1

KIEROWCA
 Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
 i Pracownia Diagnostyki Mikrobiologicznej

 dr inż. dr hab. Anna Malin



Medical University of Lublin
Chair and Department of Pharmaceutical Microbiology
with Laboratory for Microbiological Diagnostics
Chodzki 1 str., 20-093 Lublin, Poland
tel. (fax) +48 81 448 71 00

Thymus serpyllum L. Korney

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC ratio
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	2.5	2.5	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	2.5	5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1.25	1.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2.5	2.5	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1.25	5	4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	2.5	5	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	2.5	10	4
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	5	1
Gram-negative bacteria			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	1.25	1.25	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	2.5	2.5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	10	2
Yeasts			
<i>Candida albicans</i> ATCC102231	2.5	10	4
<i>Candida albicans</i> ATCC2091	5	5	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019	5	10	2
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	5	10	2
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10	2
Helicobacter pylori ATCC43504			
Plant extract	0.0625	0.250	4
Plant oil	0.0078	0.0313	4

KIEROWNIK
 Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
 z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

 prof. dr hab. Anna Majmi

«Утверждаю»

Проведено по стартовой программе, посвященной 100-летию Республики Казахстан, развитию науки и международному сотрудничеству

 А. А. Турмухамбетова

АКТ

результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории на отхаркивающую активность на базе кафедры микробиологии КГМУ

Объекты исследований: ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска (УЭТП-1), ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах (УЭТП-2).

Цель работы: изучить отхаркивающую активность ультразвуковых экстрактов растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего в Корнеевских лесах и горно-лесном массиве Каркаралинска, переданных для исследования на кафедру микробиологии, в рамках внутривузовского проекта «Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus* L., произрастающих на территории Казахстана, для создания эффективных отечественных фитопрепаратов на их основе».

Материалы и методы исследований:

Нами было проведено исследование отхаркивающей активности следующих фармакологических веществ:

УЭТП-1 - Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.l), произрастающего в Корнеевских лесах;

УЭТП-2 - Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.l), произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска.

Разведение производили из расчета 1 мг вещества на 1 мл растворителя.

Исследования отхаркивающей активности выполнены на 36 лягушках вида *Rana temporaria*. Животные содержались в стандартных условиях в виварии. Животных разделяли на группы по принципу рандомизации. Все животные содержались в идентичных условиях.

Отхаркивающее действие исследовали на модели изучения моторной функции мерцательного эпителия пищевода лягушек. При этом лягушек закрепляли на корковой пластинке брюшком вверх. Наносили исследуемые образцы сырья растений рода тимьян, которые готовили в концентрации 2 мкг/1000 мкл, на кончик языка в объеме равном 0,1 мл. В качестве препарата сравнения служил препарат официального вида - травы тимьяна ползучего - Бронхикум. Регистрацию движения ресничек мерцательного эпителия проводили с использованием шелковой нити длиной 15,0 мм, которую помещали у основания языка, по истечению 30 секунд после нанесения изучаемых настоев. Фиксировали время, в течение которого происходило заглатывание нити. При этом отмечали время, пошедшее на движение нити на расстоянии 10,0 мм без настоя (контроль) и после нанесения исследуемого настоя. Учитывая, что разные животные имеют значительный разброс скоростей движения мерцательного эпителия, нами был использован коэффициент ускорения (КУ), который рассчитывали как отношение скорости, полученной после нанесения исследуемого настоя к исходной скорости.

Образец	Увеличение двигательной активности, %	Коэффициент ускорения (КУ)
УЭТП-2	49	0,67
УЭТП-1	40	0,71
Контроль Бронхикум С	52,5	0,66

Экспериментально установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладает отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С.

Таким образом, ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего является перспективной субстанцией для разработки отечественных лекарственных средств отхаркивающего действия.

Исполнители:

Зав. кафедрой микробиологии



Ахметова С.Б.

Докторант КГМУ



Оразбаева П.З.



«Утверждаю»

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству

А.А. Түрмухамбетова

АКТ

испытаний на противовоспалительную активность,
выполненных в учебной микробиологической лаборатории на базе кафедры
микробиологии КГМУ

Объекты исследования: ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска (УЭТП-1), ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах (УЭТП-2).

Исследование противовоспалительного действия ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего проводили на модели острой экссудативной реакции (перитонит) по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.

Для исследования были отобраны 40 белых беспородных крыс обоего пола массой 190-210 г, которые были распределены на 4 группы по 10 животных в каждой:

Группа №1 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №2 - опытная группа, животные получали ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах, в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №3 - группа сравнения, животные получали препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 25 мг/кг, n=10;

Группа №4 - контрольная группа, животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи, n=10.

Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 часа животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его объем. Исследуемые объекты вводили животным перорально однократно в виде крахмальной слизи, препарат сравнения диклофенак натрия вводили внутривенно однократно за 1 час до введения 1% раствора уксусной кислоты.

Противовоспалительную активность оценивают по уменьшению объема воспалительного экссудата в брюшной полости у опытных крыс, в процентах по сравнению с контрольными.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием Mann-Whitney U-test. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Противовоспалительная активность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего

Исследуемые образцы	Доза, мг/кг	Количество экссудата, мл	% к контролю	Противовоспалительная активность
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (УЭТП-1)	25	3,6±1,1*	55,4	44,6
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (УЭТП-2)	25	4,4±1,0	54,8	45,2
Диклофенак натрия	25	4,0 ± 0,8	61,6	38,4
Контроль	-	6,5± 0,5	100	-

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Заключение. В результате проведенного эксперимента выявлено, что образцы ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего в дозах 25 мг/кг обладают противовоспалительной активностью и вызывают уменьшение количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс на 44,6% и 45,2%. Противовоспалительная активность исследуемых образцов сопоставима с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

Исполнители:

Зав. кафедрой микробиологии



Ахметова С.Б.

Докторант КГМУ



Оразбаева П.З.

«Утверждаю»
Проректор по стратегическому развитию,
науче и международному сотрудничеству
А.А. Турмухамбетова
«21» 03. 2018 г.



АКТ

результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории на мутагенную активность на базе кафедры микробиологии КГМУ.

Объекты исследований: ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в горно-лесном массиве Каркаралинска (УЭТП-1), ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, произрастающего в Корнеевских лесах (УЭТП-2).

Цель работы: изучить мутагенную активность ультразвуковых экстрактов растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего в Корнеевских лесах и горно-лесном массиве Каркаралинска, переданных для исследования на кафедру микробиологии, в рамках внутривузовского проекта «Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus* L., произрастающих на территории Казахстана, для создания эффективных отечественных фитопрепаратов на их основе».

Изучение мутагенной активности проводилось с целью выявления способности 2 экстрактов тимьяна ползучего индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 и проявлять ДНК-повреждающий эффект в REC-тесте на тестерных штаммах *Escherichia coli* B/r WP2 и WP67 (poA), дефектных по разным путям репарации.

Изучение мутагенной активности оценивали в тесте Эймса, для этого использовали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 102. Эти штаммы несут мутации аутоксτροφности по гистидину.

Использовали питательные среды и растворы: мясопептонный агар (МПА) 0,6%; МПА 2%; водный агар 2%; солевой концентрат; 20% раствор глюкозы; 1% раствор сернистого магния; минимальный агар 1,5%; полужидкий минимальный агар 0,7%; раствор гистидина 2,5 мМ; раствор биотина 1,25 мМ; верхний полуобогатенный агар.

Бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 102 культивировали в (МПБ) при температуре от 37 °С в течение 2-х часов на водяной бане. Раствор исследуемого образца готовили в дистиллированной воде в стандартных концентрациях (10; 100 мкг/мл) Селективный полуобогатенный агар (0,6 %) в пробирках плавил в водяной бане при 100° С и помещали в термостатируемую водяную баню при температуре 45-46°С. Вначале в пробирки с агаром вносили раствор исследуемого образца в используемых концентрациях (0,1 мл), затем в пробирки вносили 0,1 мл суспензии бактерий. После этого вносили 0,5 мл микросомальной активирующей смеси, быстро размешивали содержимое пробирки и выливали его на слой нижнего минимального агара на чашке Петри ровным тонким слоем. Чашку оставляли при комнатной температуре на 40 минут и после полного застывания агара переносили в термостат на 37°С. Учет результатов проводили через 48 часов инкубации при температуре 37°С.

На первом этапе эксперимента исследуемый образец наносили на чашку в двух стандартных дозах (10; 100 мкг). Параллельно в опыт включали варианты с полной микросомальной активирующей смесью (ПМАС) и неполной микросомальной активирующей смесью (НМАС). В состав первой входили: суспензия бактерий, исследуемый образец, гомогенат и кофакторы. В вариантах НМАС вместо кофакторов

вносили соответствующий объем растворителя – воду. В контрольном варианте в слой верхнего полужидкого агара вместе с суспензией бактерий вносили микросомальную активирующую смесь, а также соответствующий объем растворителя образца. В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (НММ) (100 мкг/чашку). Бактериальные штаммы, использованные в работе, перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Тестерные штаммы бактерий

№	Штамм	Генотип	Источник
1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	his G46	ркм г. Астана
2	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100,	<i>his G46, rfa, uvr, bio, pkm</i> <i>101</i>	ркм г. Астана
3.	<i>Escherichia coli</i> BL/Pet32/VPI. WP2		ркм г. Астана
4.	<i>Escherichia coli</i> B/r WP2 и <i>E. coli</i> B/r WP2		ркм г. Астана
5	<i>Escherichia coli</i> WP67 (polA)	<i>дикий тип</i>	Коллекция кафедры микробиологии КГМУ

Использовали питательные среды и растворы: мясопептонный агар (МПА) 0,6%; МПА 2%; водный агар 2%; солевой концентрат; 20% раствор глюкозы; 1% раствор сернокислого магния; минимальный агар 1,5%; полужидкий минимальный агар 0,7%; раствор гистидина 2,5 мМ; раствор биотина 1,25 мМ; верхний полуобогатенный агар.

Бактерии обрабатывали раствором эфирных масел тимьяна (растворитель – диметилсульфоксид) в стандартных концентрациях 10 и 100 мкг/чашку с системой метаболической активации и без метаболической активации. После инкубации подсчитывали количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантных вариантах негативного контроля (культуры, обработанные только растворителем). В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (100 мкг/чашку).

Превышение в числе колоний-ревертантов в полной микросомальной активирующей смеси говорит об эффективности функционирования системы микросомального окисления.

О выраженности токсического действия исследуемых биоконплексов определяем по выживаемости тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA100 *Salmonella typhimurium* TA98. Согласно рекомендациям по проведению теста Эймса максимальная доза исследуемых соединений не должна подавлять рост тестерных бактерий более чем на 50% [Дурнев с соавт., 2003].

Таблица 2 - Мутагенная активность ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего (Корнеевские леса) и тимьяна ползучего (горно-лесной массив Каркаралинска)

Наименование	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100				<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98			
	в-во 1 000 мкг/чашка	в-во 100 мкг/чашка	в-во 10 мкг/чашка	НММ	в-во 1 000 мкг/чашка	в-во 100 мкг/чашка	в-во 10 мкг/чашка	НММ
УЭТП-1	8±1	7±1	8±1	16±1	5±1	7±1	8±1	15±1
УЭТП-2	6±1	6±1	8±1	14±1	7±1	5±1	9±1	14±1

Учет генных мутаций (тест Эймса) считали полукolicественным методом, и мутагенную активность засчитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертангов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 2003].

Результаты исследования мутагенной активности образцов приведены в таблице 2.

В результате проведенного эксперимента выявлено, что число колоний-ревертангов в ПМАС с концентрациями ЭМ 10γ/чашка, ЭМ 100γ/чашка не превышало числа колоний-ревертангов по отношению к позитивному контролю.

Таким образом, по полученным данным у представленных образцов эфирного масла тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна Маршалла, тимьяна пустынного, тимьяна ползучего (Корнеевские леса) и тимьяна ползучего (горно-лесной массив Каркаралинска) не выявлено мутагенного эффекта.

Репарационный тест на *Escherichia coli* является бактериальной тест-системой для учета дифференциальной выживаемости бактерий при действии соединений, индуцирующих в геноме *Escherichia coli* повреждения ДНК, репарируемые в ходе эксцизионной и пострепликативной репарации. Метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ и их метаболитов индуцировать повреждения ДНК у индикаторных штаммов *Escherichia coli*. Репарационный тест на *Escherichia coli* основан на регистрации дифференциальной выживаемости бактерий дикого типа и мутантных бактерий, дефектных по определенным этапам репарации ДНК. Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации и без метаболической активации в жидкой среде. После инкубации регистрируется наличие бактериального роста у разных тестерных штаммов при одних и тех же концентрациях тестируемого соединения. В качестве тестерных организмов использовали штаммы *Escherichia coli* В/г WP2 (дикий тип по репарации ДНК) и WP67 (polA) (мутантный штамм, дефектный по репарации ДНК).

Исследование проводилось для выявления способности исследуемых образцов индуцировать повреждения ДНК у индикаторных штаммов *Escherichia coli*. Бактерии *Escherichia coli* обрабатывали раствором образцов (растворитель – диметилсульфоксид) в дозах 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125 мкг/мл. Негативный контроль обрабатывали только растворителем – диметилсульфоксидом. В качестве позитивного контроля использовали нафталин. Оптимальной дозой нафталина, вызывающей субингибирующий антимикробный эффект, оказалась доза 0,005 мкг/мл, так как 0,001, это конечная доза

проявляющая бактериостатический эффект, выявлена в серии тестов при определении минимальной ингибирующей концентрации. Изучение прямого действия образцов на популяцию бактерий оценивали по изменению оптической плотности бактериальной суспензии *Escherichia coli* при совместной инкубации с исследуемыми образцами, и посевной дозы на плотные питательные среды Эндо, кровяной агар. Результаты оценивали по форме и размеру колоний, а также по наличию гемолиза, фенотипическим свойствам бактерий. Показано, что образцы в исследуемых концентрациях не влияют на скорость роста клеток дикого и мутантного штаммов *Escherichia coli*. Добавление образцов не приводило к изменению количества колоний, их формы, не повлияло на размер зон гемолиза. При этом, нафталин в исследуемой концентрации ингибирует рост и гемолитические свойства мутантного штамма *Escherichia coli*. В результате проведения репарационного теста на *Escherichia coli*, используя микроорганизм как бактериальную тест-систему для учета дифференциальной выживаемости бактерий при совместном культивировании образцов на наличие индуцирующих в геноме *Escherichia coli*, повреждений ДНК, образцы ультразвуковых экстрактов не индуцируют повреждений ДНК у *Escherichia coli*. Результаты испытания образцов в батарее КСТ позволяют сделать заключение об отсутствии канцерогенной опасности. Мутагенной активностью не обладает ни один из представленных на исследование образцов. Исходя из полученных результатов не выявлено мутагенного эффекта.

Наличие мутагенного эффекта у исследуемых препаратов учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. В качестве позитивных контролей использовали мутаген прямого действия N-нитрозометилмочевину (NMM), вызывающий мутации замены пар оснований на штамме *Salmonella typhimurium* TA 100. Чистым контролем служили варианты с растворителем. Образцы растворяли в диметилсульфоксиде. Активность препаратов изучалась в виде средних значений (3 опыта, в каждом опыте по 3 чашки на каждое разведение препарата) количества ревертангов в опыте по сравнению с контролем. Получены результаты, показавшие, что количество ревертангов в опытных чашках не превышало контроль. На основании этого сделан вывод об отсутствии мутагенности исследуемых препаратов, в пределах чувствительности данного метода на штамме *Salmonella typhimurium* TA 98 и на штамме *Salmonella typhimurium* TA 100 без микросомальной активирующей смеси.

Вывод. Установлено, что ультразвуковые экстракты растительного сырья *Thymus serpyllum* L.s.l. не вызывали статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертангов, воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки. Исходя из полученных результатов не выявлено мутагенного эффекта. Таким образом, подобные исследования являются важными при первичном скрининге мутагенности различных новых биологически активных препаратов перспективных для современной фармакологии.

Исполнители:

Зав. кафедрой микробиологии



Ахметова С.Б.

Докторант КГМУ



Оразбаева П.З.

Министерство здравоохранения Республики Казахстан
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»
(НАО «МУК»)

СОГЛАСОВАНО  **УТВЕРЖДАЮ**
И.о. Председателя Правления, Ректора НАО «МУК» А.А. Турмухамбетова И.о. Директора Научно-исследовательского центра НАО «МУК» Л.Л. Ахмалтдинова
«03» 08 2021 г. «03» 08 2021 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
«ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО»

Руководитель НИР,
д. фарм. наук, проф.



С. А. Ивасенко

Караганда 2021