

НАО «Медицинский университет Караганды»

УДК 615.014:615.322

На правах рукописи

ЖҰМАБЕКОВА АЙНҰР МАРАТҚЫЗЫ

Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus L.* и перспективы их применения в медицине

6D110400 – Фармация

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты

д.фарм.н., профессор Ивасенко С. А.

к.б.н., ассоц. профессор Ишмуратова М. Ю.

Зарубежный консультант

PhD, Associate Professor, Agnieszka Ludwiczuk

Республика Казахстан

Караганда, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Ботаническая характеристика рода <i>Thymus</i> L.	13
1.2 Распространение и экология	14
1.3 Характеристика эндемичных видов тимьяна флоры Центрального Казахстана.....	16
1.4 Химический состав различных видов тимьяна.....	17
1.5 Биологические свойства тимьянов и их применение в официальной и народной медицине	24
1.6 Сведения о фармакогностическом изучении различных видов тимьянов и стандартизации лекарственного растительного сырья.	28
2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	31
2.1 Материалы исследований	31
2.2 Методы исследований.....	33
3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО, ТИМЬЯНА БРИТОГО И ТИМЬЯНА ПУСТЫННИКА	42
3.1 Идентификация растительного сырья тимьяна частолистного (<i>Thymus crebrifolius</i> Klok.).....	42
3.2 Идентификация растительного сырья тимьяна бритого (<i>Thymus rasitatus</i> Klok).....	51
3.3 Идентификация растительного сырья тимьяна пустынника (<i>Thymus eremita</i> Klok.).....	60
3.4 Стандартизация лекарственного растительного сырья тимьяна частолистого.....	68
4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ	77
4.1 Способ получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынника с использованием ультразвука.....	77
4.2 Исследование химического состава полифенольных соединений сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынника	78
4.3 Технология получения сухого экстракта из тимьяна частолистого.....	83
4.4 Стандартизация субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»	84

4.5	РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА НА ПОЛУЧЕНИЕ СУБСТАНЦИИ «ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО ЭКСТРАКТ СУХОЙ».....	90
5	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО, ТИМЬЯНА БРИТОГО И ТИМЬЯНА ПУСТЫННИКА.....	102
5.1	Изучение антимикробной активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного.....	102
5.2	Изучение отхаркивающей активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного.....	104
5.3	Изучение мутагенной активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного.....	105
5.4	Определение острой токсичности сухого экстракта тимьяна частолистого.....	106
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	111
	ПРИЛОЖЕНИЯ А – Заключение о видовой принадлежности растительного сырья.....	124
	ПРИЛОЖЕНИЯ Б – Решение Комитета по биоэтике.....	125
	ПРИЛОЖЕНИЯ В – Проекты нормативных документов на лекарственное растительное сырье.....	126
	ПРИЛОЖЕНИЯ Г - Проекты нормативных документов на лекарственную субстанцию.....	127
	ПРИЛОЖЕНИЯ Д – Лабораторный регламент.....	128
	ПРИЛОЖЕНИЯ Е – Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы.....	129
	ПРИЛОЖЕНИЯ Ж – Акты антимикробной активности.....	130
	ПРИЛОЖЕНИЯ З – Патент на изобретение «Применение сухого экстракта тимьяна частолистого (<i>Thymus crebrifolius</i> Клок.) в качестве антимикробного средства широкого спектра действия».....	153

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертационной работе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

Кодекс РК «О здоровье народа и системе здравоохранения» от 7 июля 2020 г. № 360-VI Закон РК

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 2020г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств»

Приказа Министра здравоохранения РК № ҚР ДСМ-11 от 27 января 2021 года «Об утверждении правил маркировки лекарственных средств и медицинских изделий»

Приказа Министра здравоохранения РК от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик»

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"

Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2014. – 592 с.

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

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

ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АНД	Аналитический нормативный документ
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
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
НД	Нормативный документ
ОФС	Общая фармакопейная статья
о.с.ч.	Особо чистый

ТП	Технологический процесс
ТСХ	Тонкослойная хроматография
УМО	Стадии упаковки, маркировки, отгрузки
УФ	Ультрафиолетовая спектрофотометрия
Ф ЕАЭС	Фармакопея Евразийского экономического совета

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Работа посвящена изучению биологически активных веществ эндемичных видов травы тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьяна бритого (*Th. rasitatus* Klok.), тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.), и отбору образцов с практически ценными свойствами для применения в медицине.

Актуальность проблемы. Увеличение спроса на лекарственные средства растительного происхождения может привести к истощению запасов отечественной флоры. Что обосновывает необходимость расширения сырьевой базы официальных лекарственных растений за счет дополнительных растительных источников и их комплексного использования. Согласно национальному проекту «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация»» МЗ РК увеличение доли отечественной фармацевтической продукции с 17% в 2020 году до 50% в 2025 году является основной целью. В рамках реализации Комплексного плана развития фармацевтической промышленности на 2020-2025 годы вопрос организации производства лекарственных препаратов с использованием лекарственных растений, произрастающих на территории Республики Казахстан, получил статус государственного приоритета [1-4]. Поиск перспективных лекарственных растений как источников биологически активных веществ и разработка оригинальных эффективных фитопрепаратов на их основе являются актуальными.

В этом отношении несомненный интерес представляют растения рода Тимьян (*Thymus* L.). Растения рода Тимьян популярен в традиционной медицине многих стран и народов как ценное лекарственное сырье. В Государственную фармакопею Республики Казахстан в качестве лекарственных растений включены тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.) и тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.). В официальной медицине данные травы применяются 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.

Возможное сокращение запасов лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего и тимьяна обыкновенного приводит к необходимости расширения сырьевой базы официальных лекарственных растений за счет использования эндемичных видов флоры Казахстана. На территории Центрального Казахстана произрастают 15 видов растений рода Тимьян, из них 5 видов являются эндемичными, в том числе, тимьян частолистый (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьян бритый (*Thymus rasitatus* Klok.) и тимьян пустынный (*Thymus eremita* Klok.).

Тимьян частолистый, тимьян бритый и тимьян пустынный

распространены на территории Центрального Казахстана. По результатам обследования сырьевых запасов на территории Карагандинской области данные растения имеют достаточные общие эксплуатационные запасы и возможные объемы ежегодных заготовок для использования в фармации и медицине. Тем не менее, химический состав и биологические свойства данных видов растений изучены не достаточно.

Поэтому исследование химического состава тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного, разработка способа и технологии получения суммы экстрактивных веществ и изучение ее биологических свойств является актуальной и приоритетной задачей.

Цель работы. Комплексное изучение биологически активных веществ тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного, разработка технологии их получения и исследование биологических свойств.

Задачи исследования:

- Фармакогностическое изучение тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьяна бритого (*Th. rasitatus* Klok.) и тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.).

- Разработать способ и технологию получения суммы экстрактивных веществ тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного с использованием ультразвука.

- Провести изучение химического состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного.

- Изучить биологические свойства ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного, произвести отбор образцов обладающих выраженным биологическим действием для разработки эффективных отечественных лекарственных средств.

Объекты исследования: растительное сырье: трава тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), т. бритого (*Th. rasitatus* Klok.) и т. пустынного (*Th. eremita* Klok.), собранные в популяциях Карагандинской области РК; суммы экстрактивных веществ: сухие ультразвуковые экстракты тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного, субстанция «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

Предмет исследования: ареал произрастания, биоморфологические особенности, диагностические признаки, товароведческие показатели и химический состав тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного; способ и технология получения сухих ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного; химический состав и биологические свойства сухих ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного; нормативная документация на субстанцию «Тимьяна частолистого экстракт сухой».

Методы исследования: макроскопический, микроскопический, товароведческий, физико-химические, микробиологический, технологические и статистические методы.

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 фармакогностическое изучение эндемичных видов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного, описаны внешние признаки и микроскопические характеристики, представлены результаты товароведческого анализа, проведено комплексное изучение содержания различных классов биологически активных веществ и минеральных элементов;
- впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного применена ультразвуковая экстракция растительного сырья;
- впервые проведено изучение флавоноидов и фенольных кислот ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного с применением ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС;
- в результате проведенного биоскрининга впервые установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна частолистого, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 6 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), вызывает задержку роста 2 штаммов грибов *Candida albicans*, *Candida krusi*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*;
- впервые по данным биоскрининга выявлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна бритого, обладает выраженной антимикробной активностью в отношении 3 штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*;
- впервые установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна пустынного, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культур 4 штаммов грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*;

- впервые установлено, что отхаркивающее действие близкое к препарату сравнения «Бронхикум С» проявляет ультразвуковой экстракт тимьяна бритого, ультразвуковой экстракт тимьяна частолистого - уступает препарату сравнения в 1,5 раза, а ультразвуковой экстракт тимьяна пустынного практически не обладает отхаркивающей активностью;

- по результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, установлено, что субстанция ультразвукового экстракта тимьяна частолистого относится к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности);

- разработана технология получения субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»;

- разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава», нормативные документы на субстанцию «Тимьяна частолистого экстракт сухой», в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Практическая значимость работы:

- по результатам комплексного изучения содержания различных классов биологически активных веществ установлено, что трава тимьяна частолистого, трава тимьяна бритого и трава тимьяна пустынного содержат значительное количество 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, определяют перспективность их использования в фармации и медицине;

- на основе результатов фармакогностического исследования и товароведческого анализа тимьяна частолистого разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава»;

- с учетом выхода ультразвукового экстракта и биологических свойств, в качестве субстанции перспективной для разработки отечественных лекарственных средств широкого спектра антимикробного действия, в том числе *Helicobacter pylori*, рекомендуется сухой экстракт тимьяна частолистого;

- разработана и внедрена технология получения субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»;

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

- разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой» (ЛР-005491-МК-05-21);

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

Приоритет проведенных исследований защищен патентом РК на изобретение: «Применение сухого экстракта тимьяна частолистого (*Thymus*

crebrifolius Klok.) в качестве антимикробного средства широкого спектра действия» (патент № 32162) (Приложение Ж).

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты фармакогностического изучения эндемичных видов тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьяна бритого (*Th. rasilatus* Klok.) и тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.);
- экспериментальные данные по технологии получения экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного полученных методом ультразвукового экстрагирования;
- результаты исследования качественного и количественного состава полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного;
- результаты биологических свойств и острой токсичности ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного.

Личный вклад автора заключается в испытательных работах, выполненных лично соискателем и включенных в диссертацию: в проведении фармакогностического изучения, в разработке нового способа и технологии получения ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.); тимьяна бритого (*Th. rasilatus* Klok.); тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.), в разработке нормативных документов, обобщении полученных исследовательских данных.

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 научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений, сохранения биоразнообразия и рационального использования биоресурсов в аридных условиях» (Актау, 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.); IV (XII) международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.); международной конференции молодых ученых и студентов «Мир науки и молодежь: эра стремительных изменений» (Караганда, 28 апреля 2018 г.); IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертации получен 1 патент РК, основные положения диссертации отражены в следующих публикациях:

- 4 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан;

- 1 статья в международном научном издании, входящем в базу данных Scopus Q3;
- 9 статей и тезисов в сборниках Международных конференций;
- 1 статья в Республиканском научном журнале.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, включает 31 рисунок и 39 таблиц; состоит из введения, 5 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 150 литературных источников.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Ботаническая характеристика растений рода *Thymus* L., распространение и экология

Ботанический перечень растений Казахстана включает в себя огромный уникальный запас лекарственных растительных ресурсов, большей частью представленных дикорастущими видами, имеющими значительные перспективы в плане изучения химического состава и биологической активности метаболитов. К плюсам препаратов и БАДов на растительной основе относятся: широкий спектр фармакологических свойств, низкие проявления токсичности и удовлетворительная ценовая доступность среди среднестатистических покупателей [5].

Благодаря обнаружению и научному подтверждению новых свойств дикорастущих лекарственных растений открываются новые возможности для фармацевтической сферы и медицины. Флора Казахстана насчитывает более 6000 видов растений, однако степень их изученности на низком уровне, а также фармакологические действия их не были полностью исследованы [6].

На сегодняшний момент в условиях суверенного Казахстана проводится всесторонняя оценка видового разнообразия лекарственной флоры и ее ресурсного потенциала в целях обеспечения фармпроизводства растительным сырьем. Одним из плацдармов, благодаря которому, проводится первичные исследования растений на пригодность использованию в лечебных целях, является народная медицина. Данные многовекового опыта применения растений у разных народов содержат информацию о возможных потенциально значимых для официальной медицины объектах растений. К таковым источникам относятся и растения рода Тимьяна (*Thymus* L.), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*).

Растения, принадлежащие к семейству Яснотковых (*Lamiaceae*), в большинстве своем представлены низкорослыми ароматическими кустарничками и полукустарничками, нашедшими свое применение в народной медицине как обезболивающее, противовоспалительное, дезинфицирующее и антисептическое средство, также известно использование данного вида растений в виде пряностей и источников меда [7].

Жизненная форма растений рода *Thymus* L. в основном представлена полукустарничками, с лежачими или восходящими, одревеневшими стеблями, с травянистыми цветоносными ветвями, чаще всего с лежачими бесплодными побегами, заканчивающимися ползучими по земле стебельками.

На территории Кавказа обнаружены два вида тимьяна – тимьян красивенький (*Thymus pulchellus* С.А.Мей.) и тимьян ложноблосниный (*Thymus pseudopulegioides* Klok. et Shost.) с необычной жизненной формой. В целом, оба эти вида имеют свойственный роду общий план строения побеговой системы, однако, по форме роста они скорее ближе к многолетним травам, нежели к полукустарничкам [8].

В данном роде растений просматривается огромное разнообразие форм

листьев, видов жилкования, наличие или отсутствие черешков, при этом края самих листьев могут быть зазубренными или наоборот цельнокрайними. Полукустарники имеют мелкие, линейно-ланцетные прицветники. Цветки мелкие, редко встречается белый окрас таковых, основная масса представителей с розовыми или фиолетовыми цветками, которые могут быть обоеполыми или же вторично неполно-двудомными. Чашечка с 10-13 жилками, ресничато-опушенная, ясно двугубая, форма цилиндрическая или колокольчатая, внутри зева наблюдается венец волосков. Венчик имеет двугубый отгиб, цвет лиловый, розовый или же белый; в середине виднеется короткая или более удлиненная трубка. Соцветие растения продолговатое или головчатое, цветки в ложных мутовках. Можно рассмотреть четыре прямостоящих от основания расходящихся тычинок, с двугнездными (часто недоразвитыми) пыльниками; столбик имеет шиловидные лопасти; плодики (орешки) черного или бурого цвета, эллипсоидальной или реже шаровидной формы [9].

Отличительной чертой для всех видов тимьянов выступает малое число зачатков в зимующих почках, необходимость в хорошей аэрации субстрата, светолюбие растений, отсутствие на растениях защитных почечных чешуй. Все представители данного вида характеризуются небольшими по размерам эфирномасличными железками, отмечается зимнезеленость растений, значительная часть которых одревеснела; в целом, в жизни тимьянов проходит два периода активного роста - весенний и летне-осенний периоды.

Ботанический состав в Республике Казахстан включено более 6000 дикорастущих видов разнообразных растений. В этот состав входят более 10 % эндемичных представителей [10]. По данным на 2010 г., более 1500 видов отнесены к лекарственным (официальным или используемым в народной медицине) кустарникам и травам [11]. В целом, лекарственные растения служат сырьем для производства более 40% всех медикаментов в мире [12].

По данным отечественных исследователей, культивирование и сбор растительного сырья в Республике плохо развиты [13]. Лишь 14 % от всех отечественных фармацевтических предприятий культивируют и собирают лекарственные растительные ресурсы (рисунок 1). К таковым относятся ПК «Алтей», ПК «Биян-Фарм», ТОО «ТЭС», ТОО «Фитолеум», ТОО «Бурли», Крестьянское Хозяйство «Алтын-Тамыр», АО «Химфарм», ТОО «Зерде-Фито», АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»» и другие. На долю данных предприятий приходится 44% лекарственных препаратов из растительного сырья, остальные 56% импортируются из стран ближнего и дальнего зарубежья [14].

Семейство *Lamiaceae* L. заслуживает детального изучения, поскольку оно имеет лидерские позиции среди флоры Казахстанского региона. В целом, семейство на территории Казахстана включает в себя 233 вида, объединенных в 45 родов [15].

Растения рода *Thymus* распространены на равнинных и высокогорных территориях, посреди луговых и кустарниковых зарослей, в условиях степей,

полупустынь.



Рисунок 1 - Оценка состояния культивирования и сбора растительного сырья в Республике Казахстан

Ареал распространения тимьянов довольно широк – в него входят влажные и аридные условия, с большим интервалом температурных колебаний, что в итоге привело к возможности охвата территории Евразии (за исключением тропиков) и Северной Африки [16].

Тимьяны не произрастают в условиях повышенного застойного увлажнения или в лесных ценозах с плотно сомкнутым пологом. Без исключения все представители тимьянов проявляют отчетливую приуроченность к открытым, предпочтительно скалистым, песчаным, щебнистым субстратам. Данный род насчитывает 214 видов, разделяющихся на 8 секций.

На территории СНГ род тимьян (*Thymus* L.) представлен 136 видами, при этом на территории Республики Казахстан их количество доходит до 27 видов. В количество эндемичных представителей входят следующие виды: тимьян бритый (*Thymus rasitatus* Klok.), тимьян Лавренковский (*Thymus lavrenkoanus* Klok.), тимьян частолистый (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьян пустынный (*Thymus eremita* Klok.), тимьян нарымский (*Thymus narymensis* Serg.), тимьян каратавский (*Thymus karatavicus* A. Dm.), тимьян алтайский (*Thymus altaicus* Klok. et Schost.), тимьян каменистый (*Thymus petraeus* Serg.), тимьян казахстанский (*Thymus kasakstanikus* Klok. et Schost.), тимьян иртышский (*Thymus irtyschensis* Klok.) [17].

По данным М.А. Байтенова [17] в нашей стране число тимьянов достигает 30 представителей. На основании исследования был сделан вывод, что флора

Центрального Казахстана включает 12 видов растений рода *Thymus* L.: *Thymus asiaticus* Serg., *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus eremita* Klok., *Thymus guberlinensis* Пjin, *Thymus kasakstanicus* Klok., *Thymus kirgisorum* Dub., *Thymus lavrenkoanus* Klok., *Thymus marschallianus* Willd., *Thymus minussinensis* Serg., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus roseus* Schipz., *Thymus stepposus* Klok. et Schost., из них 5 видов являются эндемичными *Thymus lavrenkoanus*, *Thymus crebrifolius*, *Thymus rasitatus*, *Thymus kasakstanicus*, *Thymus eremita*.

По одним из последних исследований флора Центрального Казахстана включает примерно 12 видов тимьянов, из них 4 вида представлены наиболее часто: тимьян ползучий, тимьян Маршалла, тимьян степной и тимьян Лавренковский [18].

Учитывая некоторую разрозненность в данных о видовой принадлежности представителей указанного вида на территории страны, создается необходимость в умении различать виды тимьянов. Данный момент возникает в виду затруднения в идентификации из-за расплывчатости и нечеткости видовых признаков.

1.2 Характеристика эндемичных видов тимьяна флоры Центрального Казахстана

Тимьян частолистный (*Thymus crebrifolius* Klok.). В народе известен, как тимьян частолистный. Растение представляет собой полукустарничек. Относится к ксерофитам, петрофит. Период цветения VI-VII месяц, плодоносит в VII-VIII месяце. Высота растения доходит до 4 см, стволики толстоваты (до 4 мм в диаметре), которые заканчиваются бесплодным, стелющимся, укороченно-ветвистым побегом с длиной до 6 см; при этом цветоносные ветви имеют лиловато-бурый цвет, с густым довольно длинным опушением; листья продолговато-эллиптические, черешковые, по краю длинно-реснитчатые, с обеих сторон опушенные длинными и очень короткими жесткими волосками, боковые жилки слабо выраженные, точечные железки рассеянные, неясные; у основания листья очень мелкие (2-4 мм длиной, 0,7-1 мм шириной) и короткочерешковые, при этом стеблевые листья крупнее (4,5-11 мм длиной и до 2,25 мм шириной), нижние на более длинном черешке, часто превышающем половину длины пластинки, средние превышают длину междоузлий более чем вдвое и черепичато налегают друг на друга, на лежащих бесплодных побегах листья несколько кособокие, у большинства листьев в пазухах имеются развитые укороченные веточки; цветки растения собраны в плотные головки; нижние прицветники имеют яйцевидно-ланцетную форму, туповатые; цветоножки очень короткие, отстояще-опушенные. Чашечка узкоколокольчатой формы, во время цветения длина достигает 4 мм, кругом коротко-волосистая, зубчики верхней губы ланцетные, по краю реснитчатые; венчик 5-6 мм длиной, ярко-фиолетового цвета; все растение пахнет сильным лимонным запахом. Ареал распространения: каменистые склоны, расщелины скал. Произрастает в горах Улытау – локальный эндем [18].

Тимьян бритый (*Thymus rasitatus* Klok.). Жизненная форма -

полукустарничек. Как и предыдущий представитель тимьянов является ксерофитом и петрофитом. Период цветения VI-VII месяц, период плодоношения VII-VIII месяц. Тимьян имеет высоту в 3-8 см, стволики ветвистые приподнимающиеся и высоко древеснеющие, плодики можно обнаружить на верхушках побегов. Цветоносные ветви 3-8 см высотой, имеют очень короткие, вниз отогнутые волоски, нижняя часть которых почти голая, фиолетового цвета, реже темно-фиолетовые. Строение листьев черешковое, продолговато-эллиптическое, довольно узкие (4-10 мм в длину и 1-2 мм в ширину), с немногими ресничками, в остальной части растение голое, боковые жилки толстоватые, снизу выдающиеся, железки хорошо просматриваются невооруженным взглядом.

Книзу растение имеет мелкие продолговато-яйцевидные листья, с коротким широким черешком, нижние листья с более длинным черешком, часто короче пластинки. Соцветие головчатое, небольшое, нередко с немного отставленной нижней малоцветковой мутовкой. Цветоножки 1,5-4 мм длиной, густо опушенные мелкими, вниз отогнутыми волосками. Чашечка узкоколокольчатая (3-4 мм длина), коротко волосистая в нижней части, форма зубчиков верхней губы ланцетная или узко-ланцетная, по краю опушение отсутствует. Венчик имеет длину в 6 мм, цвет розовато-фиолетовый, неяркий. Ареал распространения: каменистые склоны и расщелины скал. Растет в горах Улытау, Бектаута, Ортау, Кызылтау, Чингистау [18].

Тимьян пустынный (Thymus eremita Клок.). Жизненная форма представлена полукустарничком. Относится к ксерофитам, петрофит. Цветение в VI месяце, плодоношение в VII-VIII месяце. Растение имеет длину в 2-5 см, стволики толстые и коротковатые, плодущими на верхушке и стелющимися, только на верхушках восходящими бесплодными побегами. Цветоносные ветви 1,5-4 см высотой, лилового цвета, негусто или густо опушенные с короткими, вниз отогнутыми волосками. Листья короткочерешковые, типичная форма продолговато-эллиптическая, реже продолговато-яйцевидной или обратно-яйцевидной формы, (2,5-11 мм длина и 1-3 мм ширина), по краю книзу имеются редкие реснички до 1,5 мм в длину. Растение характеризуется не сильно выдающимися боковыми жилками, точечные железки неясные, листья бесплодных побегов нередко кособокие. Число боковых жилок 2-4 пары, при этом соцветие плотно-головчатое, реже с отставленной нижней мутовкой. Чашечка узкоколокольчатой формы, длина до 3-4,5 мм, окрас темно-фиолетовый, зубчики верхней губы ланцетные, туповатые, по краю отсутствуют реснички, но иногда прослеживаются щетинки. Тип плодиков - сухой орешек. Венчик имеет длину в 6-7 мм, цвет его розово-фиолетовый, неяркий. Ареал распространения: каменистые склоны, у подножья скал и на гранитах. Встречается в горах Бектаута и подгорной равнине [18].

Представители рода тимьян все без исключения содержат в своем составе эфирные масла в той или иной концентрации, что дает возможность отнести их к важным эфирномасличным растениям. В общем виде, эфирные масла, накапливающиеся в растениях, формируют собой смесь душистых летучих

веществ, представляют собой сложный комплекс различных летучих органических соединений, главными компонентами которых выступают моно- и сесквитерпеноиды - ароматические и алифатические соединения, лактоны, кислоты, альдегиды, фенолы, спирты, углеводороды, кетоны, простые и сложные эфиры, а также дубильные вещества [19].

Лидирующие позиции в эфирных маслах многих тимьянов занимают тимол, карвакрол, альфа-пинен, бета-пинен, неролидол, 1,8-цинеол, лимонен, линалоол, камфора, борнеол, гераниол, кариофиллен и камфен [20-27].

Часть исследований указывает на связь защитных свойств растений к болезням и присутствию определенных категории терпеноидов в составе эфирных масел. Содержание терпеноидов изменяется в зависимости от природы растения и влияет на биологическую активность [28, 29].

При этом стоит отметить тот факт, что химический состав тимьянов подвержен изменению в зависимости от места их произрастания. Наиболее часто изучаемой составляющей выступали эфирные масла данных растений. Исследование в Украине эфирного масла тимьяна ползучего, заготовленного в различных районах Запорожской области, показало, что изучаемые образцы имели высокое содержание суммы карвакрола и тимола. В других образцах из Васильевского района ведущими компонентами выступали карвакрол, в остальных случаях – тимол. Проведенный химический скрининг эфирного масла тимьяна, собранного на территории Республики Беларусь представил процентное содержание следующих основных компонентов: β -кариофиллен (1,12-22,64%), камфен (1,75 – 12,62%), 1,8-цинеол (0 – 23,12%), камфора (4,24 – 27,59%), кариофиллен оксид (3,79 – 28,70%), β -мирцен (2,26 – 14,61%) и борнеол (2,02-33,39%). Концентрация ожидаемого тимола и карвакрола в составе масла была всего 0 – 3,59% и 0 – 3,69% соответственно [30].

Прослеживается следующая зависимость - в северных широтах встречаются тимьяны с большим количеством карвакрола (21-37%), чем тимола (10-17%), при наличии п-цимола (15-17%), кариофиллена (5-12%), γ -терпинена (16-18%). Известен линалоольный тип чабреца, основным компонентом которого представлен линалоол и его ацетат (33%). В эфирном масле тимьяна индийского происхождения найдены тимол (65%), п-цимол (9%), карвакрол (5%), γ -терпинен (4%). Другой представитель тимьянов - *Thymus dahuricus* Serg. в процентном содержании позволил выделить из него до 0,2 % эфирного масла следующего состава: тимол (2,64-5,20%), гамма-терпинеол (4,00-19,70), п-цимол (6,00-22,00%), карвакрол (8,24-22,46%), лимонен (2%), борнеол (10,18%), альфа-терпинеол (1,82-29,00%), линалоол (1,62-14,00%), камфора (3,85-7,00%), камфен (0,34%), альфа-пинен (0,45%), терпинеол-4 (6,00%), бета-пинен (0,52), трициклен (0,04%), туйен (0,02%), мирцен (1,18%), 1,8-цинеол (0,10%), альфа-терпинен (0,10%), карвакролацетат (0,10%), сабиненгидрат (0,10%), тимолацетат (0,10%). Образец эфирного масла тимьяна флоры Финляндии проявило существование 5 хемотипов растения: 1 тип содержал монотерпеновые углеводороды (33%), 1,8-цинеол (12,5-15,0%), гермакра-1(10), 5-диен-4-ол (3-12%), гермакрен D (10,0-12,0%), гермакра-1(10),4-диен-6-ол; 2

тип содержал - монотерпеновые углеводороды (30%), 1,8-цинеол (26%), β -кариофиллен, гермакрен D, гедикариол; 3 тип содержал - монотерпеновые углеводороды (27%), 1,8-цинеол (19%), гермакрен D, β -кариофиллен, камфора; 4 тип содержал - линалоол (21,9-43,8%), линалил ацетат (8,9-17,6%), β -кариофиллен, 1,8-цинеол, камфора; 5 тип содержал - 1,8-цинеол (17,2-27,6%), мирцен (15,4-22,4%), β -кариофиллен (6,8-19,1%), камфора, линалоол [30].

Примечателен тот факт, что среди видов тимьяна наблюдается существенный полиморфизм не только морфологических признаков (например, в Азербайджане произрастает 21 вид тимьяна), но и компонентного состава эфирных масел. Так, например, в случае тимьяна блошиного – *Thymus pulegioides* L. авторы указывают на наличие восьми его хемотипов, различающихся составом эфирного масла. К этим типам относятся: тип тимола, карвакрола, цитраля-гераниола, цитраля, гераниола, линалоола, линалилацетата и фенхона. В случае тимьяна обыкновенного – тимольный тип, карвакрольный тип, лимонный тип.

Эфирное масло тимьяна ползучего из Кавказа бывает двух хемотипов: 1 тип имеет в своем составе - тимол (76,1 – 81,5%), p-цимен, карвакрол, β -кариофиллен, α -терпинеол; и 2 тип имеет в своем составе - карвакрол (49,0 – 62,0%), тимол (21,5 – 29,7%), p-цимен, β -кариофиллен, α -терпинеол. В случае тимьяна блошиного (*Thymus pulegioides*) авторы исследования указывают на существование восьми его хемотипов, отличных друг от друга составом эфирного масла. На территории Алтая обнаружено два хемотипа *Thymus serpyllum*, в которых изменяется соотношение тимола, карвакрола и неролидола. В Поволжье подверглись исследованию представители рода *Thymus* L., произрастающие лишь в Волгоградской области. Для этого региона указаны виды тимольного хемотипа (*Thymus marschallianus*, *Thymus kirgisorum*) с содержанием тимола от 30 до 65% и виды со значительным количеством нероля, гераниола, гераниола (*Thymus calcareous*, *Thymus kirgisorum var cretica*) [30].

Выход эфирного масла из Кашмира (Индия), составил 0.67%. Состав был следующий: p-цимол (22.6%), цингеберен (14.69%), гамма-терпинен (10.71%), альфа-пинен (15.15%), бета-пинен (3.91%), линалилацетат (3.91%), камфен (3.33%), лимонен (2.64%), борнеол (2.23%), гераниол (2.01%), линалоол (1.39%), карвакрол (49.52%), тимол (8.14%), эвгенол (4.34%), изоэвгенол (1.36%). Эфирное масло этого же вида из Куллу (Индия) содержало: гамма-терпинен (3.6%), линалоол (3.1%), цитронеллал (0.4%), борнеол (5.6%), карвакрол (5.0%), тимол (64,6%), борнилацетат (5.4%), бета-ионон (0.6%), неролидол (2.6%). Основными компонентами эфирного масла другого образца этого вида из Индии также были тимол (60%) и карвакрол (2%). Содержание эфирного масла в данном образце тимьяна ползучего составило 0,5% [30].

Основными составляющими эфирного масла тимьяна из флоры Литвы были: 1,8-цинеол (16,3 – 19,0%), β -кариофиллен (9,6 – 11,3%), мирцен (9,7-10,7%), гермакрен-D, камфора. В эфирном масле чабрецов из Пакистана и Китая лидировал тимол: 42,6% и 23,9% соответственно. Кроме тимола в

эфирном масле чабреца флоры Пакистана входили: р-цимен, карвакрол, терпене-4-ол, борнеол, а из флоры Китая – 2,4,5-триметилбензиловый спирт (16,9%), р-цимен(16,3%), карвакрол (10,6%) и о-бутилфенол. По результатам химического скрининга главными компонентами эфирного масла *Thymus baicalensis* Serg. выступают п-цимол (24,2%), тимол (19,1%), гамма-терпинен (16,2), изоборнеол (9,7%), линалоол (2,04%), камфора (1,5%), также входили: карвакрола, пинен, камфен, сабинен, мирцен, лимонен, фелландрен, терпинеола-4, карвакролацетат. Эфирные масла растений *Thymus talijevii* Klok. et Schost. (тимьян Талиева), произрастающих во флоре Интинского района Республики Коми России имеют необычный состав, изумление вызвано наличием высокого содержания бициклических сесквитерпенов [31]. По литературным данным сделан вывод, что для представителей рода *Thymus* характерно низкое процентное содержание бициклических сесквитерпенов. В состав эфирного масла тимьяна байкальского, произрастающего на территории Монголии, входит большое количество тимола, п-цимола при небольшой составляющей карвакрола. В то время как эфирное масло *Thymus baicalensis* Serg. из Бурятии характеризуется высоким содержанием карвакрола, п-цимола, у-терпинена, борнеола [32]. Основной составляющей эфирного масла тимьяна енисейского, по которым оно отличается от других тимьянов, выступают камфора (8,46%), борнеол (7,53%) и практически полное отсутствие тимола, цитронеллола, карвакрола, гераниола.

Известны исследования посвященные изучению состава эфирного масла по фазам вегетации тимьяна ползучего, взятого из Центрального Сибирского ботанического сада. Эксперимент показал, что максимальный пик концентрации эфирного масла просматривается в период цветения (0,80%), во время фазы бутонизации его количество резко снизилось до 0,12 % [33].

В работах Касумова Ф.Ю. публикуется, что количественный состав эфирного масла тимьяна ползучего, собранного в различных точках Азербайджана варьирует от 0,27% до 2,33% . Интересен факт того, что тимьяны не подвержены изменению состава в зависимости от высоты произрастания растения над уровнем моря. Данному вопросу было посвящено исследование чабрецов алтайского края. В ходе работы было идентифицировано с использованием метода хромато-масс-спектрологии 64 компонента эфирных масел (94-99% от общего количества). По итогам исследования все изучаемые образцы тимьянов были условно разделены на две части: первые имели в своем составе в качестве доминирующего компонента неролидол и низкие концентрации тимола и карвакрола; вторые же, наоборот, были насыщены тимолом и карвакролом; неролидол они содержали в низких концентрациях [34].

Другое исследование посвящено изучению эфирного масла двух популяций *Thymus marschallianus* Willd, собранных на разных высотах в горах Заилийского Алатау. В ходе работы обнаружено 49 составляющих эфирного масла, идентифицировано из них 35. Заметных отличий в составе эфирного масла с изменением высоты также не обнаружено [35].

В литературе имеются данные, что содержание полифенолов отражено в эквиваленте таких индивидуальных веществ как галловая, кофейная, протокатехиновая кислоты, рутин и тимол, проявляющих выраженный антиоксидантный эффект. Анализ полученных данных указывает на наличие зависимости между качественным составом масел и проявлением антиоксидантного эффекта в модельных системах из ионов восстановленного железа, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, а также с о-фенантролином, образующего окрашенные комплексы с ионами переходных металлов [36].

На основании обработанных литературных данных можно сделать следующие выводы:

- Выявленные различия в химическом составе эфирных масел тимьянов скорее всего обусловлены как генетическими особенностями видов, так и экологическими условиями произрастания этих растений;

- Не прослеживаются качественных или количественных изменений в компонентах эфирных масел в зависимости от высоты произрастания растений над уровнем моря;

- На территории произрастания одного и того же вида возможно обнаружение нескольких хемотипов растений, которые содержат разный компонентный состав;

- Эфирные масла помогают тимьянам противостоять болезням и вредителям;

- Колебания в процентном содержании эфирных масел наблюдаются в зависимости от фазы роста, цветения и плодоношения.

Изучение компонентного состава и биологической активности эндемичных представителей тимьянов Республики Казахстан находится в зачаточном состоянии, основная доля имеющихся исследований приходится на исследование эфирных масел некоторых видов [37].

Систематическое изучение компонентного состава и биологической активности эфирных масел растений рода *Thymus* L., произрастающих на территории Казахстана, проводится в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», иные классы биологически активных веществ не исследовались [38, 39].

В соответствии с литературными данными, основными компонентами эфирных масел, которые наиболее часто встречаются в растениях данного рода являются тимол, линалилацетат, 1,8-цинеол, линалоол и карвакрол [40].

По исследованиям отечественных ученых в эфирных маслах основными компонентами являются для: *Thymus crebrifolius* –борнеол (9.6%), п-мент-1-ен-8-ол (11.0%), п-цимол (12.9%), линалоол (27.9%); *Thymus rasiatus* - п-мент-1-ен-8-ол (8.1%), γ -терпинен (11.1%), п-цимол (21.2%), тимолметиловый эфир (5.5%), тимол (23.6%). Из эндемичных представителей в плане компонентного состава эфирного масла также был изучен *Thymus karatavicus* A. Dm. Исследовательская работа сделала выводы, что основными составляющими в эфирном масле *Thymus karatavicus* является тимол (39,46%), о-цимол (12,45%),

ацетат тимола (8,91%) и тимолметилловый эфир (7,63%). Авторы исследования [41] указывают на то, что тимол был обнаружен в небольших количествах в эфирных маслах тимьянов *Thymus Dmitrivae* Gamajun., *Thymus stepposus* Klok. et Schost., *Thymus crebrifolius* Klok. и в довольно больших количествах в *Thymus petraeus* Serg., *Thymus minussinensis* Serg., *Thymus Marschallianus* Willd., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus karatavicus* A. Dm., *Thymus mugodzharcicus* Klok. et Schost. По мнению исследователей перспективными для выделения новых соединений считаются эфирные масла следующих видов: *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus Dmitrivae* Gamajun. В состав данных растений входит широкий комплекс биологически активных веществ, что ведет к обширному перечню видов фармакологического действия, что представляет собой несомненный интерес для дальнейшего изучения и создания новых эффективных лекарственных средств на их основе. Эфирное масло одного из эндемиков Казахстана, а именно тимьяна бритого, содержит в своем составе флавоноиды, дубильные вещества (до 7,4 %), масла, минеральные вещества, некоторое количество витаминов группы В: В1, В2, В6 и В9, а также другие классы витаминов – А, С, Е, РР, холин и К [42].

Отечественные исследователи отмечают, что основные компоненты эфирного масла *Thymus rasitatus* являются монотерпеноиды: α -терпинеол – 25,4%, тимол – 13,5%, линалоол – 9,3%, 1,8-цинеол – 3,0%; монотерпены: р-цимен – 14,8%, γ -терпинен – 6,3%, мирцен – 5,5%; сесквитерпены: β -кариофиллен – 2,6%. В этом же исследовании указано, что в случае эфирного масла другого эндема (*Thymus crebrifolius*) таковыми выступают монотерпеноиды: линалоол – 60,3%, α -терпинеол – 6,8%, 1,8-цинеол – 4,7%, борнеол – 2,6%, гераниол – 2,2%; сесквитерпены: β -кариофиллен – 2,1%. Большинство работ ведет к тому, что терпеноиды также отвечают за антимикробную активность эфирных масел. На основании этого становится понятно, почему активные образцы содержали относительно большое количество тимола (например, *Thymus rasitatus* включал 13,5% тимола), а в эфирном масле, проявившем слабую антимикробную активность (*Thymus crebrifolius*) его концентрация достигла лишь 0,1% [42].

В литературе можно найти указания на изменение содержания терпеноидов в зависимости от природы растения и соответственно влияние этого фактора на биологическую активность [43].

В материалах конференции указаны данные, что с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) был исследован композиционный анализ эфирных масел 47 видов растений семейства Lamiaceae включая *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus rasitatus* Klok. Итогом работы является вывод, что скрининг биологической активности позволил выдвинуть для дальнейшего фармакологического исследования эфирное масло *Thymus rasitatus* Klok., как проявившее относительно высокую противовирусную, антимикробную, антиоксидантную и анальгезирующую активности, с ярко выраженным цитотоксическим эффектом [44].

Отечественными исследованиями изучены изопреноидные соединения (полифенолы, моно - и сесквитерпеноиды эфирных масел) тимьяна бритого (*Thymus rasiatus* Klokov). Было обнаружено, что эфирные масла тимьянов *rasitatus* Klokov и *petraeus* Surge превышают деятельность коммерческих агентов в отношении вируса A/FPV/Rostock/34 (H7N1) на более чем 1,0 ЛГ. Экспериментально установлено, что эфирные масла данных двух видов тимьянов обладают выраженным обезболивающим действием[45].

Производство новых антиоксидантов из растительного сырья в наше время набирает стремительные обороты в планетарном объеме. Принимая во внимание данный факт, изучение антиоксидантной и антирадикальной активности эфирных масел различных видов тимьяна является весьма перспективным. В АО «МНПХ «Фитохимия» был проведен ряд экспериментов по оценке антиоксидантной активности (АОА) *in vitro* эфирных масел тимьяна *Thymus roseus* (Ros), *Thymus petraeus* (Pet), *Thymus marschallianus* (Mar), *Thymus serphullum* (Ser), *Thymus rasiatus* (Ras), *Thymus crebrifolius* (Cre) и *Thymus lavrenkoanus* (Lav) с помощью орто-фенантролинового метода, с восстанавливающего потенциала (FRAP-метод), определение общего количества полифенолов реактивом ФолинаЧокальтеу. По результатам полученных данных была установлена последовательность возрастания антиокислительных свойств: наиболее высокую антиоксидантную активность проявило эфирное масло из *Thymus Roseus*, что возможно обусловлено повышенным содержанием полифенольных веществ в данном образце. *Thymus Crebrifolius* в сравнении с остальными маслами показал наименьшую активность в перекисных процессах. Эфирное масло из *Thymus Rasiatus* приняло срединные позиции в полученной последовательности. Наибольшее количество полифенольных соединений имело место в маслах *Thymus Lavrenkoanus*, *Thymus Petraeus* и *Thymus Roseus*, а наименьшее содержание в сравнении с остальными было в *Thymus Crebrifolius* и *Thymus Serphullum*. В ходе исследования выдвинуто предположение о возможной взаимосвязи между содержанием полифенольных соединений и антирадикальной активностью (по отношению к гидроксильным радикалам) изучаемых объектов. Наблюдается наличие прямо пропорциональной зависимости между полифенольным компонентным составом эфирных масел и проявлением их антиоксидантной активности. В работе было показано сравнение эфирных масел из *Thymus Marschallianus*, *Thymus Roseus*, *Thymus Crebrifolius*, *Thymus Rasiatus*, *Thymus Petraeus*, *Thymus Lavrenkoanus*, *Thymus Serphullum* и *Thymus Serphullum* с аскорбиновой кислотой (стандартное вещество): масла проявляют более низкую антиоксидантную активность по методу FRAP[44].

Казахстанские ученые определили, что для эфирных масел *Thymus crebrifolius* и *Thymus serphullum* характерно малое количество полифенолов по эквиваленту галловой кислоты, протокатехиновой кислоты, кофейной кислоты, рутина и тимола [45].

На данном этапе работы отечественных ученых подтверждается факт того, что эндемичные представители рода тимьян обладают широким спектром

активностей, которые необходимо подтвердить и внедрить в официальную медицину.

1.3 Биологические свойства тимьянов и их применение в официальной и народной медицине

Перспективность исследований и разработки препаратов из растения рода тимьян (*Thymus* L.) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) не оставляет сомнений. Род Тимьян широко распространен в традиционной медицине многих стран и народов как ценный лекарственный источник. По результатам научных исследований описаны различные виды биологических активностей растений рода тимьян [46, 47, 48].

Терапевтический эффект тимьянов объясняется широким композиционным составом биологически активных соединений, включая эфирные масла, макро- и микроэлементы. Тимол и карвакрол, наиболее распространенные и весомые составляющие компоненты эфирных масел чабрецов, проявляют доказанную противовоспалительную, антимикробную, противогрибковую, антигельминтную, антиоксидантную и иные виды активностей.

Интересно, что в экспериментах искусственно полученная смесь тимола и карвакрола проявляла более бактерицидно активное действие, чем ныне известный антисептик - фенол. В мировой практике в целях продления срока годности не пастеризованных соков в пищевой промышленности вносят смесь карвакрола и п-цимена.

Широко известно, что моно- и сесквитерпеноиды в эфирных маслах способствуют подавлению развития многих видов бактериальных и грибковых представителей, простейших и вирусов. Одну из важных ролей в создании антимикробной активности оказывают синергические и тормозные процессы, происходящие в смесях моно- и моноклональных сесквитерпеноидов.

Моно- и сесквитерпеноиды растений способны проявлять антипищевую, инсектицидную, репеллентную активности, исполнять функции половых или ювенильных гормонов, стимуляторов физиологических циклов у некоторых насекомых.

Стоит отметить, что исследования по компонентному составу и активностям растений рода *Thymus* L. проводятся во многих научных институтах ближнего и дальнего зарубежья: Узбекистана, Казахстана, Белоруссии, Турции, России, Индии, Китая, Пакистана, США и иных, в зависимости от местообитания чабрецов [49-54].

Интерес к тимьянам не ограничивается их использованием в качестве лекарственных средств: косметология, парфюмерия и пищевая промышленность также имеют свои разработки в изучении данного вида растений [55, 56, 57].

Согласно литературе, многие исследования выделяли именно тимол, 1,8-цинеол, линалоол, линалилацетат и карвакрол [58-60] в качестве основных составляющих эфирных масел этого рода. В официальной медицине трава

тимьяна используется в виде жидкого экстракта и в качестве препарата с отхаркивающим и противомикробным действием.

Известны способы как внутреннего, так и наружного применения травы чабреца. В простонародье травяные компрессы и ванночки тимьяна применяется в качестве анальгетика при ишиасе, радикулите и неврите. Внутрь используется в виде настоя и отвара как отхаркивающее, обезболивающее, противомикробное и успокоительное при остром и хроническом бронхите, бронхопневмонии и других бронхолегочных болезнях. Терапевтическая активность препаратов тимьяна обусловлена присутствием в них различных классов биологически активных веществ - эфирного масла, танинов, флавоноидов, терпеновых соединений. По данным исследований - тритерпеновые соединения проявили антиатеросклеротические и антигормональные эффекты. Помимо основных вышеуказанных компонентов, чабрец содержит смолы, жиры, урсоловую кислоту и олеиновую кислоту, витамины группы В и С. Примочки из травы используют, как антисептик при лечении дезинфекции и раневого воздействия на организм. Стоит также отметить превосходные успокоительные свойства растения при депрессии, усталости, неврастении. Возможен вариант дезинфицирования воздуха в помещениях. Список применения травы чабреца довольно широк: медицина, сельское хозяйство, косметика, пищевая промышленность. По литературным данным найдены исследования по антиоксидантной [61], антимикробной [62], антирадикальной [63], противовирусной [64] активностям, о применении при тревожности и депрессии [65, 66], при стоматитах и акне, а также акарицидным эффектам [67,68] растений рода тимьян.

Монгольская народная медицина предлагает использование травы тимьяна (воздушная часть *Thymus gobicus*) в виде отхаркивающего и спазмолитического отвара, а также как анальгетик при невритах и радикулитах. Эфирное масло Байкальского тимьяна показывает разницу в содержании карвакрола и в то же время низкое содержание тимола. В образце эфирного масла тимьяна Сибирского и тимьяна Гоби доминирующим компонентом является тимол [69].

В тибетской медицине надземная часть используется для лечения тифа, различных инфекции у детей, венерических и кожных заболеваний, кашле, интоксикации как антилихорадочное средство, при заживлении ран и как антигельминтное лекарство.

Одним из широко известных представителей данного вида является *Thymus marshalianus*. Надземная часть растения имеет ярко выраженные спазмолитические и седативные эффекты. В состав *Thymus marschallianus* входят фенолкарбоновые кислоты и их производные, флавоноиды, антоцианы, эфирные масла - до 0,84%. Вполне вероятно, что *Thymus marshalianus* может служить заменой ползучего тимьяна. В отношении нашей страны стоит отметить, что данный вид широко распространен в центральном Казахстане.

По литературным данным на Южном Урале и Алтае исследованы характеристики фитоценоотического содержания и состояние девяти

зенопопуляций тимьяна Маршалла. Показана зависимость онтогенетической структуры антропогенного стресса и условий экотипа. Оценивалась устойчивость центропопуляций и определилось, что их оптимальное состояние достигается в луговой степи [69].

Исследования подтвердили, что эфирные масла действуют на биохимические процессы в клетках микроорганизмов путем инактивирования ферментов, влияния на текучесть клеточных мембран и увеличения их проницаемости [70 - 74].

Эфирное масло *Thymus serpyllum* L. может проявлять антирадикальную активность, близкую к активности синтетического бутилированного гидрокситолуола в системе β -каротин/линолевая кислота. Объяснение кроется в том, что антиоксидантная активность обусловлена высоким содержанием таких фенольных компонентов, как тимол и карвакрол [75].

Исследование 2013 года обнаружило, что эфирное масло *Thymus schimperi* Ronniger проявляет фунгицидную активность против широкого спектра патогенных грибов, включая *Penicillium chrysogenum*, *Verticillium sp.*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus minutus*, *Beauveria bassiana* и *Microsporium gypseum* [76].

Такие части тимьянов, как листья и цветки в традиционной медицине используют как освежающий, антимикробный чай, в качестве противовоспалительного и антисептического средства [77].

Известен препарат экстракт травы чабреца (*Thymus serpyllum* Extract) в виде крема «Алезан» для лошадей в качестве противовоспалительного, болеутоляющего и хондропротекторного средства самостоятельно и в составе комплексной терапии острых и хронических заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Фитопрепараты растительного происхождения, исключают возникновение резистентности микроорганизмов даже при длительном применении.

Данный факт очень актуален в современной ситуации, где микроорганизмы быстро мутируют и становятся невосприимчивыми к антибиотикам.

На сегодняшний момент времени Казахстан находится в активной фазе развития собственной фармацевтической промышленности, и поэтому вопрос создания устойчивой сырьевой базы стоит довольно остро. Снижение импортозависимости страны необходимо для дальнейшего развития фармацевтической индустрии [78]. Большинство официальных представителей лекарственных растения не произрастают на территории нашей страны или же их запасы довольно ограничены и не могут соответствовать требованиям для их реализации в большом объеме. К ним также относятся официальные виды тимьяна. Народная медицина запечатлела в многовековой истории, что трава различных типов тимьяна используется при лечении радикулита, а эфирные масла можно использовать в парфюмерии, кондитерских изделиях и медицине. Такой широкий диапазон использования данного рода растений требует

больших растительных запасов. Возможное сокращение запасов лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.) приводит к необходимости расширения сырьевой базы официальных лекарственных растений за счет дополнительных растительных источников и комплексного их использования. Поэтому проведение исследований комплексного изучения содержания различных классов биологически активных веществ в других представителях данного рода, а именно - травы тимьяна бритого (*Thymus rasitatus* Klok.) и тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.), тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius*), эндемичных видов, произрастающих на территории Карагандинского региона, очень актуально.

Установлено, что трава тимьяна бритого, частолистого и трава тимьяна пустынного содержат 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, определяют перспективность их использования в фармации и медицине. Исследования подтверждают антимикробную активность данных тимьянов: эфирные масла *Thymus rasitatus*, *Thymus marschallianus* и их основные компоненты: 1,8-цинеол и тимол обладают выраженной антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *E. coli* [79 - 83].

Фитопрепараты, предназначенные для лечения заболеваний микробной этиологии, как правило, включают в себя растительные экстракты, содержащие комплекс БАВ, которые в большинстве случаев нетоксичны, имеют сравнительно низкую частоту побочных реакций и не оказывают раздражающего действия, очень редко вызывают аллергические реакции. На данный момент времени особый интерес представляют растительные экстракты, проявляющие активность в отношении штаммов микроорганизмов, устойчивых к некоторым антибиотикам и синтетическим лекарственным препаратам [84-90].

Золотистый стафилококк является настоящей проблемой современного мира.

Метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA) является одним из основных возбудителей кожных инфекций и инфекций мягких тканей. Данный вид стафилококка устойчив ко всем классам β -лактамов антибиотиков, а некоторые штаммы MRSA оказались также устойчивыми к антибиотикам широкого спектра действия - клиндамицину и эритромицину. Исследования в этой области идут бурным ходом. Изучение эфирных масел тимьянов не осталось в стороне и для этой сферы медицины. Работы в данном направлении показали, что наибольшим ингибирующим эффектом на рост метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) обладали эфирные масла *Thymus marschallianus* и *Thymus rasitatus* (IC₂₅ = 30,9 и 32,7 мкг/мл,

соответственно); эфирное масло *T. crebrifolius* показало низкую активность (IC₂₅ = 73,0 мкг/мл) [91].

Выдвинута теория о том, что антибактериальный эффект эфирных масел тимьянов возможно связан с высоким процентным содержанием монотерпеноида тимола. Тимол - один из главных компонентов эфирных масел тимьянов, обладает антимикробной активностью против различных классов микроорганизмов.

В экспериментальной работе установлено, что лечебные свойства тимьяна бритого обусловлены наличием целого комплекса различных классов соединений: эфирного масла, полифенольных соединений, органических кислот, дубильных веществ, горечи, смол, смол, жирных масел, минеральных солей и витаминов [92].

Свежие исследования указывают на то, что сухой экстракт тимьяна бритого, полученный методом ультразвуковой экстракции, обладает отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С, исследование сухого экстракта тимьяна пустынного показало менее выраженное действие, чем образец сравнения [93].

Известны исследования по ингибирующей активности тимьяна бритого на рост клеток кишечной палочки (*E. coli*) и на грампозитивные кокки (*S. aureus*). По результатам работы выявлено, что при высокой концентрации 0,02 г/мл подавляется рост указанных микробов [94].

1.4 Сведения о фармакогностическом изучении различных видов тимьянов и стандартизации лекарственного растительного сырья

В настоящее время в официальной медицине на территории Казахстана разрешены к применению два вида тимьяна – тимьян ползучий и тимьян обыкновенный [95], в то время как в естественной флоре есть другие виды [6], которые могут действовать как викарные. На протяжении столетий трава многих видов тимьянов широко используется в народной медицине. Вместе с тем, возможное сокращение запасов лекарственного растительного сырья приводит к необходимости расширения сырьевой базы официальных лекарственных растений за счет дополнительных растительных источников и комплексного их использования.

На территории Казахстана существуют эндемичные представители рода тимьян с многовековой историей использования вне официальной медицины.

Флора Центрального Казахстана включает 12 видов растений рода Тимьян, из них 5 видов являются эндемичными, в том числе тимьян бритый (*Thymus rasitatus* Klok.), тимьян частолистый (*Thymus crebrifolius*) и тимьян пустынный (*Thymus eremita* Klok.) [96, 97].

Ареал произрастания эндемичных видов довольно широк - встречаются они на различных ландшафтных рельефах. Так, *Thymus crebrifolius* произрастает на обрывах временных водотоков и скалах в районах Западного Мелкосопочника и Улытау; *Thymus rasitatus* можно найти на каменистых и степных склонах, вершинах низкогорий, на гранитных осыпях, в трещинах скал

Джунгарского Алатау, в Каркаралинске, в Иртышском и Балхаш-Алакульском флористических районах, на Восточном мелкосопочнике. *Thymus eremita* обнаруживается на каменистых склонах, на гранитах Восточного мелкосопочника [98, 99].

Thymus rasitatus Klok. (тимьян бритый) это эндемичное растение [93], которое растет на каменистых и крутых склонах, невысоких горах пиках, на гранитных плитках и в трещинах горных пород Джунгарского Алатау, в Каркаралы, в Иртыш и Балхаш-Алакульский флористического района, Восточно-казахской возвышенности *Thymus rasitatus* Klok. – тимьян бритый. Местообитание: растет по каменистым и степным склонам сопок, в трещинах гранитов, на осыпях. Отмечен на территории ГНПП «Буйратау» [100, 101, 102].

Thymus crebrifolius Klok. (тимьян частолистый) представляет собой полукустарник высотой до 4 см с приятным лимонным ароматом. Он находится на обрывах временных водных течений и скалах в районах Западно-казахской возвышенности (Мелкосопочника) и гор Улытау. Отмечен по сопкам Кургальджинской впадины. Это эндемичное растение. Замечены сырьевые запасы этого вида на территории Карагандинской области. *Thymus crebrifolius*, занимает гранитные поверхности, на которых образует доминирующие сообщества. Этот вид тимьяна широко используется местным населением в качестве лекарственного растения. Растение можно встретить в горах Каркаралы, Кент, Нияз, Бектауата, Атау, Кызылтау, Чингизтау. Имеет ценное для производства эфирное масло [103, 104].

Исследования указывают, что эфирное масло тимьяна частолистого, представляет собой подвижную прозрачную жидкость желтого цвета с приятным лимонным ароматом. Среди выявленных 74 компонентов основными являются (в %) в эфирном масле тимьяна частолистого: линалол 31,9; борнеол – 9,6 [105].

Проведены исследовательские работы по сравнительной характеристике официального сырья и эндемиков Карагандинского региона. За основу были взяты макроскопические показатели лекарственного сырья - тимьяна ползучего и тимьяна частолистого. Оба вида произрастают на территории Карагандинской области, образуют значительные заросли. Результаты показали, что тимьян частолистый и тимьян ползучий имеют общие и отличительные признаки. Отмечено, что морфологическими признаками, имеющими значение для диагностики сырья двух видов, являются: для стебля - поперечное сечение стебля, характер опушения, цвет молодых и одревесневших стеблей; для листа - форма листьев, наличие черешка, степень опушения, расположение эфирно-масличных железок и выраженность жилок; для соцветий - форма и размер соцветия; для чашечки - форма и размер зубцов чашечки, степень опушения, наличие железок, цвет; для венчика - направление роста волосков, наличие железок, цвет венчика [106].

В исследовательских работах отмечается факт возможного искусственного заселения подходящих территории эндемичными тимьянами с доказанными лечебными свойствами. В связи с данным вопросом возникает

необходимость сохранения семенного материала растений. Данной теме посвящены ряд научных работ. Например, в одной из статей изучено и описано влияние различных криопротекторов на сохранение жизнеспособности семенного материала *Thymus rasiatus*. В результате проведенных исследований установлено, что для семян *Thymus rasiatus* наилучшие условия, позволяющие сохранить наиболее высокие показатели всхожести, — использование пластиковой тары, криопротектора — 5%-ного ДМСО и медленного размораживания при комнатной температуре. При этом наблюдается увеличение уровня энергии прорастания и всхожести на 15% и 10,7% по сравнению с контролем. В ходе работы проанализирована динамика прорастания семян исследуемого эндемичного вида. Итогом является то, что семена, предварительно обработанные глицерином и 5%-ным ДМСО, с последующей криоконсервацией, прорастают быстрее, и фазы развития проходят наиболее быстрым способом [107].

Чуть раньше были проведены эксперименты по оценке жизнеспособности и энергии прорастания семян после криоконсервации в жидком азоте. Наблюдалось, что семена, замороженные в пластиковых пробирках, имели жизнеспособность от 20,7% до 24,7% в зависимости от условий размораживания. В сравнении с исходными показателями процент жизнеспособности семян ниже на 4,6%, но, тем не менее, семена сохранили жизнеспособность [108].

Введение новых видов в Государственную фармакопею является важным этапом во включении растений в ряды официальных. Исходным пунктом служат анатомическое и морфологическое изучение растения. В научной работе представлено анатомическое исследование некоторых надземных органов тимьяна-пустынника. Эндемичный представитель был собран в горах Каркаралы (Карагандинская область) в фазе цветения. В ходе исследования было установлено, что изучаемый вид тимьяна обладает ксеромезофитным и ксерофитным типом строения, которое выражается в мелкоклеточной эпидерме листа, наличии многочисленных крупных эфирномасличных железок округлой или овальной формы, устьица характеризуются аномоцитным типом, расположены преимущественно на нижней стороне листа. Диагностическими признаками сырья тимьяна пустынного выступают следующие: для стебля — тип сосудисто-проводящей системы, характер расположения и размер участков флоэмы и ксилемы, наличие вместилищ; для листа — строение верхнего и нижнего эпидермиса, эфирно-масличные железки, форма мезофила [109, 110].

Вывод по главе 1

Анализ имеющихся данных об эндемических видах растения рода *Thymus* L. показывает необходимость их дальнейшего фармакогностического и фитохимического изучения, оценки их биологической активности с целью дальнейшей разработки новых отечественных лекарственных средств и более детального изучения сырьевой базы для обеспечения потребностей фармацевтической промышленности нашей страны.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям ОФС Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, ЕАЭС Фармакопеи, United States Pharmacopeia, British Pharmacopeia, ФС, ВФС и других нормативных документов, действующих на территории Республики Казахстан.

2.1 Материалы исследований

Объектами исследования являлись:

Растительное сырье. Трава тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.) была собрана в окрестностях города Жезказган в горах Улытау (N 48°4213'; E 66°5910') (<http://www.plantarium.ru/page/view/item/38303.html>), трава тимьяна бритого (*Th. rasitatus* Klok.) - в горнолесном массиве Каркаралинска (N 49°57407'; E 75°30976') (<http://www.plantarium.ru/page/view/item/38444.html>), трава тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.) - в окрестностях города Балхаш в горах Бектауата (N 47°2554'; E 74°4738') (<http://www.plantarium.ru/page-view/item/38326.html>), в июле 2016 г., в фазу полного цветения. Сбор и заготовка растительного сырья были осуществлены в соответствии с Надлежащей практикой сбора лекарственных растений (GACP) и решении Совета Евразийской экономической комиссии № 15 от 26 января 2018 г. "Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения". Ботаническая идентификация подтверждена в Институте ботаники и фитоинтродукции Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (заключение о видовой принадлежности растительного сырья № 01-04/261) (Приложение А). Согласно регламентируемым принципам GACP сбор тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна бритого проведен в сухую погоду, в дневное время, срезая надземную часть (стебли, цветки и листья) растения ножом на высоте 10-15 см от земли, собранное сырье контролировали на содержание частиц почвы, грязи, пыли, насекомых. Далее образцы высушили, измельчили и хранили в соответствии с требованиями ГФ РК для лекарственных растений.

Сушку травы тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна бритого осуществляли в тенистом в хорошо проветриваемом помещении при температуре окружающей среды (25±2) °С, и относительной влажности (60±5)%. Сырье раскладывали слоями на поверхность крафт бумаги и периодически и переворачивали каждые 20 минут. Окончание сушки сырья определяли по характеристическому треску. Сырье упаковывали в мешки из крафт-бумаги (ГОСТ 2226-2013) по 5 кг, наклеивая этикетку с указанием наименования сырья, места заготовки, времени сбора и массы нетто.

Эфирные масла из тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна бритого были получены методом гидродистилляции в течение 3 часов на аппарате Клевенджера [111].

Сухие экстракты из тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна бритого 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. Остаточный растворитель из густых экстрактов выпаривают при температуре 70°C на водяной бане [112-115].

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

Стандартные образцы фенольных соединений: катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид), кверцетин-3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол, кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, (Sigma-Aldrich, США) [113].

Эталонные штаммы микроорганизмов Американской коллекции типовых культур (АТСС):

- 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 [113, 116];

- грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Proteus mirabilis* ATCC12453, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 [116], *Helicobacter pylori* ATCC43504) [106];

- дрожжевые грибки: *Candida albicans* ATCC102231, *Candida albicans* ATCC2091, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida glabrata* ATCC90030, *Candida krusi* ATCC14243 [113].

Препараты сравнения:

Бронхikum 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 [113, 117].

Растворители и реактивы:

В работе использовались 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, т.1, с. 348).

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

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

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

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

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

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

Муравьиная кислота. CH₂O₂ (M_r 46.03). 1039300. [64-18-6]. (ГФ РК, 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 эфирных масел тимьяна частолистого, тимьяна бритоного и тимьяна пустынного, определяли методом хромато-масс-спектроскопии 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.

Содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот, органических кислот, биоэлементов и радионуклидов в исследуемых образцах определяли с использованием методик, описанных в Государственных Фармакопеях Республики Казахстан и описанных в работе [111, 113, 116].

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) [113, 119].

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: катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин 3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол, кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота (Sigma – Aldrich, США) [113, 119, 120].

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 [113, 119, 120].

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. Сухие 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 MS. 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 [113, 119, 120].

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 [113, 119, 120].

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 S_1 - 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.

Количественное определение БАВ в растительном сырье тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Определение содержания суммы флавоноидов в растительном сырье проводили с использованием спектрофотометрического метода по методике [113, 121]:

Раствор А. Около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в колбу объемом 250 мл со шлифом, приливают 100 мл 70% спирта этилового и экстрагируют на водяной бане в течение 1 часа. Извлечения отфильтровывают через бумажный фильтр и получают раствор А.

Раствор Б. В мерную колбу объемом 25 мл приливают 2,5 мл раствора А, затем 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом и через 10 мин - 1 мл 3 % раствора кислоты уксусной, доводят объем раствора 70% спиртом этиловым до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин.

Через 30 мин измеряют на спектрофотометре оптическую плотность раствора Б при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения состоит из 2,5 мл раствора А, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной, в мерной колбе вместимостью 25 мл доводят до метки 70% спиртом этиловым.

Содержание суммы флавоноидов, в абсолютно сухом сырье, в пересчете на цинарозид, 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 A - 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 сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Определение содержания суммы фенолкарбоновых кислот в растительном сырье осуществляли с использованием спектрофотометрического метода по методике [113, 122]:

Раствор А. Около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в колбу объемом 250 мл со шлифом, приливают 100 мл 70% спирта этилового и экстрагируют на водяной бане в течение 1 часа. Извлечения отфильтровывают через бумажный фильтр и получают раствор А.

Раствор Б. В мерную колбу объемом 25 мл помещают 2,5 мл раствора А, доводят объем раствора до метки 70% спиртом этиловым и перемешивают.

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 326 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, с использованием в качестве раствора сравнения 70% спирт этиловый.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в абсолютно сухом сырье, в пересчете на розмариновую кислоту, 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;

A₁ - удельный показатель поглощения розмариновой кислоты при длине волны 326 нм, равный 500;

а – навеска сырья, г;
W – влажность сырья, %.

Определение количественного содержания тритерпеновых соединений в растительном сырье проводили спектрофотометрическим методом [113, 123].

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

Определение содержания дубильных веществ в растительном сырье, в пересчете на танин, осуществляли титриметрическим методом согласно ОФС «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1) [113, 124].

Количественное определение полисахаридов в растительном сырье определяли гравиметрическим методом [113,125]. Навеску растительного сырья массой около 10,0 г (точная навеска) помещают в колбу объемом 500 мл, приливают 200 мл воды очищенной, и дважды экстрагируют на водяной бане в течение 1 часа. Извлечения фильтруют через бумажный фильтр. На роторном испарителе фильтрат упаривают до 1/5 исходного объема, затем прибавляют

трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживают в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, затем осадок на фильтре промывают горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Количественное определение пектиновых веществ в растительном сырье, а именно, их функциональных групп (метоксилированных карбоксильных, свободных карбоксильных, метоксильных групп, общее количество карбоксильных) осуществляли титриметрическим методом [113, 118].

Количественное определение свободных аминокислот в растительном сырье проводили с применением метода, который основан на взаимодействии с 2 % раствором нингидрина в этаноле с последующим спектрофотометрическим определением продукта реакции [113, 126].

Количественное определение свободных органических кислот в растительном сырье проводили титриметрическим методом, в пересчете на яблочную кислоту, в соответствии с ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды *Rosae fructus*» [113, 127, 128].

Минеральный состав растительного сырья исследован методом испарения с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан) [113].

Определение радионуклидов (Cs, Sr) в растительном сырье проводили радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан) [113].

УФ-спектрофотометрия:

УФ-спектры экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного и СО цинарозида снимали на УФ-спектрофотометре Implen «Nanophotometr P 330» (Германия) от 200 до 500 нм [113, 129].

Содержание суммы флавоноидов в экстрактах и субстанции, определяли с использованием спектрофотометрического метода, по методике [113, 130]:

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

Раствор Б. В мерную колбу вместимостью 25,0 мл помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5,0 мл 5% раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом, через 10 минут приливали 1,0 мл 3% раствора кислоты уксусной. Объем раствора Б доводили 70% спиртом этиловым до метки и выдерживали 30 минут. Затем на спектрофотометре измеряют оптическую плотность раствора Б в кювете с толщиной рабочего слоя 10,0 мм при длине волны 395 ± 2 нм.

Раствор сравнения состоит из 2,5 мл раствора А, 1,0 мл раствора 3% кислоты уксусной и доведен до метки 70% спиртом этиловым в мерной колбе объемом 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;

А₁ - 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) [113].

Фармакопейные методы:

- органолептические характеристики (цвет, вкус, запах) экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного определяли по методике ГФ РК I, Т. 1, с. 548 [113, 129];

- растворимость экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного определяли по методике ГФ РК I, Т. 1, с. 175 [113, 129].

Морфологическое исследование травы тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного проводили по свежесобраным растениям и высушенному сырью. Морфологические признаки исследовали при просмотре невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) по методике ГФ РК I, Т. 2, с. 735 [111, 113] и Ф ЕАЭС 2.1.8.17.

Анатомическое строение травы тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного исследовали на временных микропрепаратах, приготовленных по методике ГФ РК I, Т. 2, с. 735 [111, 113] с последующей микрофотосъемкой.

Товароведческий анализ растительного сырья:

Определение посторонних примесей (пожелтевшие, побуревшие и почерневшие части растения, органические примеси, минеральные примеси) проводили по ГФ РК I, Т. 1, раздел 1.4; 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.; определение микробиологической чистоты проводили по ГФ РК, Т. 1, раздел 5.1.4, категория 3, разделы 2.6.12 и 2.6.13.

На проведение медико-биологических экспериментов и исследований с вовлечением животных получено разрешение Комитета по биоэтике НАО «МУК», Протокол № 45 от 07.06.2018 г. с присвоенным № 56 (Приложение Б).

Изучение антимикробной активности методом микроразведений

Исследование антимикробной активности экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного 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 (АТСС), включая 6 штаммов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* АТСС25922, *Klebsiella pneumoniae* АТСС13883, *Salmonella typhimurium* АТСС14028, *Proteus mirabilis* АТСС12453, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС9027 [109], *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) [109] и 5 штаммов грибов (*Candida albicans* АТСС102231, *Candida albicans* АТСС2091, *Candida parapsilosis* АТСС22019, *Candida glabrata* АТСС90030, *Candida krusi* АТСС14243) [113].

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 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/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 [113, 131, 132, 133].

Изучение отхаркивающей активности

Отхаркивающая активность экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного была исследована на осенних лягушках *Rana temporaria*, по методике В.В. Гацура [113, 118, 134].

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 [113, 118, 134].

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 [113, 118, 134].

Исследование мутагенной активности (тест Эймса)

Мутагенная активность экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного изучена в тесте Эймса согласно методике,

представленной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [113, 135].

Цель эксперимента - выявление способности экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна пустынного индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, которые несут мутации ауксотрофности 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 субстанции тимьяна частолистого экстракт сухой

Острая токсичность субстанции изучена по методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [113, 135].

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 внутрижелудочно (с помощью зонда). Парентеральное - внутрибрюшинно. Каждая группа состояла из 5 животных.

Субстанцию тимьяна частолистого экстракт сухой 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.

Определяли LD₅₀ при введении максимально технически достижимой концентрации субстанции тимьяна частолистого экстракт сухой 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 ± 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 РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО, ТИМЬЯНА БРИТОГО И ТИМЬЯНА ПУСТЫННИКА

3.1 Идентификация растительного сырья тимьяна частолистного (*Thymus crebrifolius* Klok.)

Жизненная форма тимьяна частолистого представляет собой многолетний полукустарничек высота которого может достигать 4 см. Стволики утолщенные до 4 мм в диаметре, заканчиваются бесплодными, укороченно-ветвистыми, стелющимися побегами до 6 см длиной. Цветоносные ветви окрашены в лиловато-бурый цвет, довольно густо олиственные, опушенные длинноватыми, но при этом не превышающими половины диаметра стеблей, слегка вниз наклоненными волосками, также наблюдаются более короткие, отдельно растущие волоски. Цветочки образуют плотные головки, размер самих цветков не превышает 1 см; околоцветник зигоморфного строения, сростнолепестный, число лепестков 5; нижние прицветные листья яйцевидно-ланцетной формы, туповатые; цветоножки укороченные, отстояще опушенные. Вид чашечки узкоколокольчатый, который во время цветения достигает 4 мм длиной, кругом коротковолосистая, форма зубчиков верхней губы ланцетная, по краю ресничатые.

Тип листьев – простые, черешковые, продолговато-эллиптические, по краю длинноресничатые, прикрепление - черешковое, членение отсутствует, с обеих сторон опушенные длинными и очень короткими волосками, сами волоски плотные и жестковатые на ощупь, боковые жилки слабо выдающиеся или малозаметные, наблюдаются точечные неясные, рассеянные железки; листорасположение супротивное; самые нижние листья очень мелкие, размер 2-4 мм длиной, 0,7-1 мм шириной, короткочерешковые; край листа гладкий. Стеблевые листья крупнее, достигают 4,5-11 мм длиной и до 2,25 мм в ширину, нижние листья на более длинном черешке, в большинстве своем превышающем половину длины пластинки, средние превышают длину междоузлий более чем вдвое и черепичато налегают друг на друга. На лежачих бесплодных побегах листья выглядят несколько кособо, у большинства листьев в пазухах развиты укороченные веточки.

Венчик цветка тимьяна частолистого 5-6 мм длиной, окрас ярко-фиолетовый; плодики представляют собой сухой орешек, все растение испускает сильный лимонный запах. Цветение и плодоношение наблюдается в VII-VIII месяцы [7].

Ареал распространения: каменистые склоны, у подножья скал и на гранитах. Встречается в горах Бектаутата и подгорной равнине [18] (рисунок 2).

Основополагающим этапом стандартизации цельного сырья является определение подлинности по внешним и микроскопическим характеристикам.



Рисунок 2 – Типичные места обитания тимьяна частолистного в горах Улытау

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично измельченные верхние части стеблей с цветками и листьями. Высота растения достигает до 4 см, стволики толстоваты (до 4 мм в диаметре), которые заканчиваются бесплодным, стелющимся, укороченно-ветвистым побегом с длиной до 6 см; при этом цветonoсные ветви имеют лиловато-бурый цвет, с густым довольно длинным опушением (рисунки 3, 4).



Рисунок 3 - Тимьян частолистый

Листья продолговато-эллиптические, черешковые, по краю длинно-рассеченчатые, с обеих сторон опушенные длинными и очень короткими жесткими волосками, боковые жилки слабо выраженные, точечные железки рассеянные, неясные (рисунок 5); у основания листья очень мелкие (2-4 мм длиной, 0,7-1 мм шириной) и короткочерешковые, при этом стеблевые листья крупнее (4,5-11 мм длиной и до 2,25 мм шириной), нижние на более длинном черешке, часто превышающем половину длины пластинки, налегают друг на

друга, на лежачих бесплодных побегах листья несколько кособокие, у большинства листьев в пазухах имеются развитые укороченные веточки. Цветки растения собраны в плотные головки; нижние прицветники имеют яйцевидно-ланцетную форму, туповатые; цветоножки очень короткие, отстояще-опушенные. Чашечка узкоколокольчатой формы, во время цветения длина достигает 4 мм, кругом коротко-волосистая, зубчики верхней губы ланцетные, по краю реснитчатые (рисунок 6); венчик 5-6 мм длиной, ярко-фиолетового цвета; все растение пахнет сильным лимонным запахом [106, 136].



Рисунок 4 – Стебель воздушно-сухого сырья тимьяна частолистого: диаметр до 4 мм



Рисунок 5 – Лист воздушно-сухого сырья тимьяна частолистого: а – железки, б – волоски

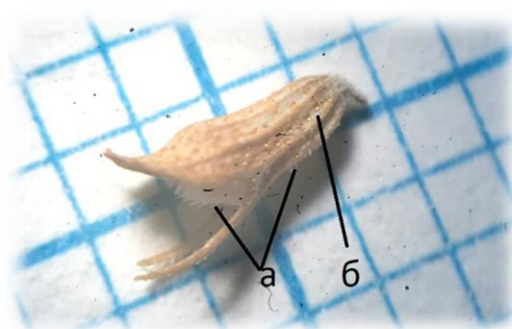
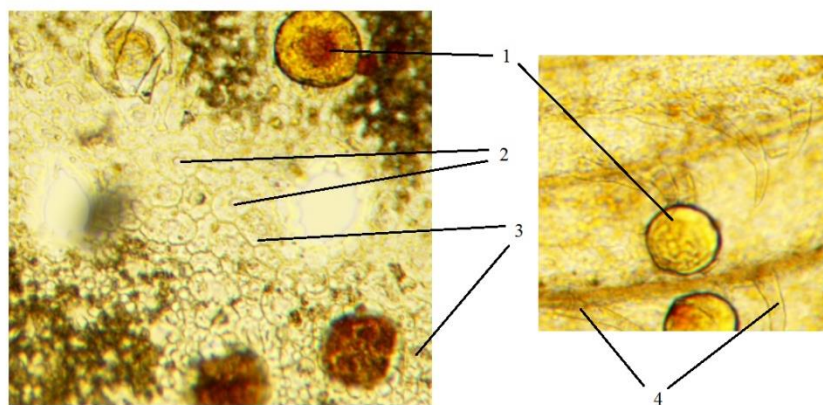


Рисунок 6 – Чашечка цветка воздушно-сухого сырья тимьяна частолистого: а – опушение, б – железки

Измельченное сырье. Кусочки стеблей до 0,5-1 см утолщенной формы, жестких листьев от зеленого до серовато-зеленого цвета. Желтые цветки, собранные в плотные головки, проходящие сквозь сито диаметром 8 мм.

Идентификация. Микроскопию препарата проводили в соответствии с ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

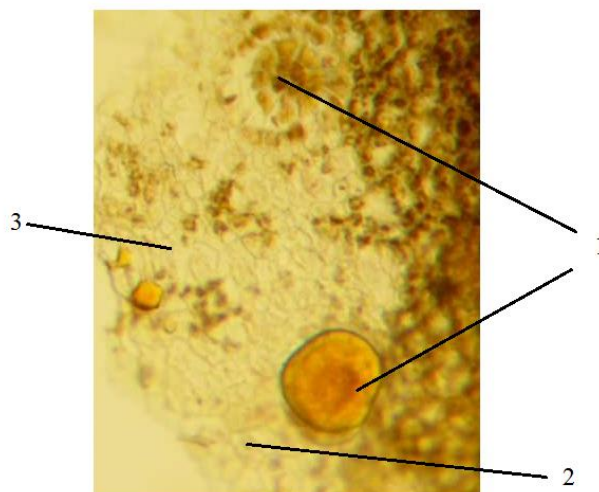
При рассмотрении препаратов листа с поверхности видны клетки нижнего эпидермиса округлой или овальной формы в очертании с извилистыми стенками (рисунок 7).



1 – эфирно-масличная железка, 2 – устьица, 3 – основные клетки эпидермиса,
4 - трихомы

Рисунок 7 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа. Препарат с поверхности.
Ув. 10x10

Поверхность эпидермиса покрыта слоем кутикулы, образующей складки вокруг железок и устьиц. Устьица многочисленные, аномоцитного типа (одно устьице окружено 4 и более основными клетками эпидермы). Эфирно-масличные железки крупные, округлой формы, приподнимающиеся над поверхностью; состоят из 8 клеток, расположенные в 2 яруса. По поверхности разбросаны редкие простые, 1-клеточные трихомы. Волоски слегка-изогнутой формы, образуют скопления вдоль жилок листа. Клетки верхнего эпидермиса более прозенхимной формы со слабо извилистыми стенками (рисунок 8).



1 – эфирно-масличная железка, 2 – устьица, 3 – основные клетки эпидермиса

Рисунок 8 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа. Препарат с поверхности.
Ув. 10x10

Устьица редкие, железки – многочисленные, также приподнимающиеся над поверхностью. Трихомы не обнаружены [137].

Диагностические признаки сырья тимьяна частолистого. Клетки нижнего эпидермиса листа округлой или овальной формы в очертании с извилистыми стенками. Устьица многочисленные, аномоцитного типа. Эфирно-масличные железки крупные, округлой формы, 1-клеточные трихомы. Клетки верхнего эпидермиса более прозенхимной формы со слабо извилистыми стенками. Устьица редкие, железки – многочисленные, также приподнимающиеся над поверхностью. Трихомы не обнаружены.

Идентификацию сырья также подтверждали, исходя из химического состава тимьяна частолистого согласно требованиям ГФ РК.

Эфирные масла являются сложными смесями органических соединений, широко применяемых в пищевой промышленности, медицине, фармации, косметологии, ароматерапии [138 - 141]. Эфирное масло из воздушно-сухого растительного сырья получали методом перегонки с водяным паром на аппарате Клевенджера. Выход эфирного масла из тимьяна частолистого составил $0,86 \pm 0,04$ %, в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Компонентный состав эфирного масла тимьяна частолистого 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.. Хроматограмма эфирного масла тимьяна частолистого представлена на рисунке 9, компонентный состав в таблице 1.

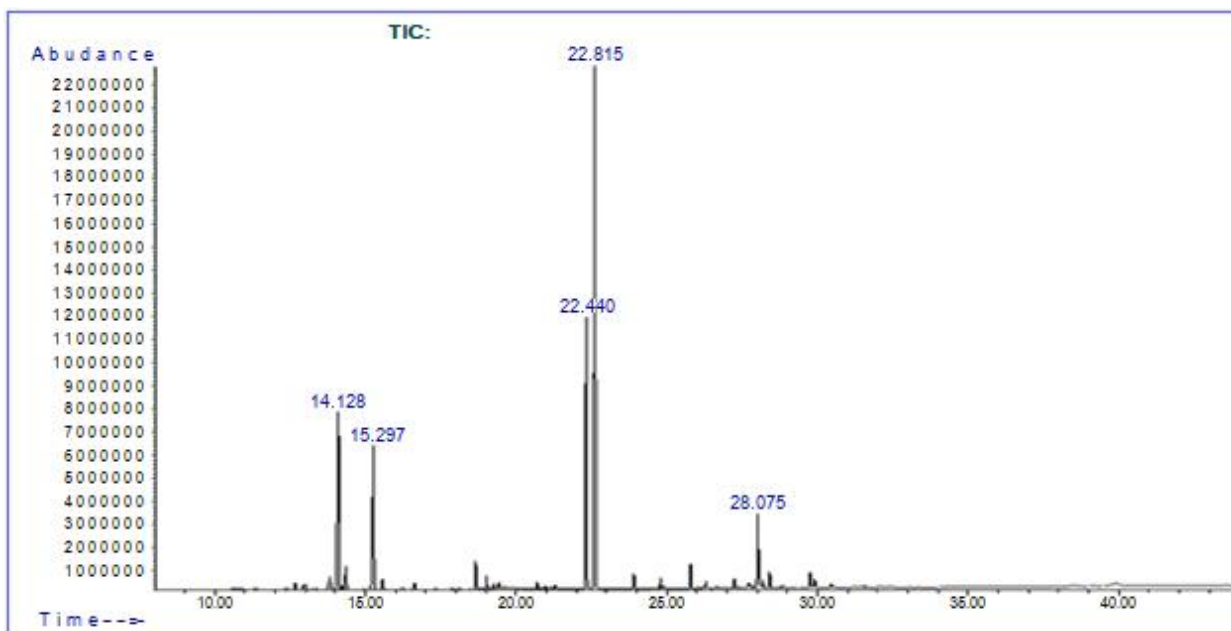


Рисунок 9 - Хроматограмма ГХ-МС эфирного масла тимьяна частолистого

Таблица 1 – Компонентный состав эфирного масла тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.)

№ пика	t _R (мин)	^a IR	^A Компонет	Содержание, %
1	10.592	929	α -Туйен	1.06
2	10.801	934	α -Пинен	1.74
3	11.408	948	Камфен	1.64
4	12.360	962	β -Терпинен	0.81
5	12.418	976	β -Пинен	0.48
6	12.584	979	1-октен-3-ол	0.49
7	13.017	992	β -Мирцен	2.62
8	13.796	1008	α -Терпинен	1.11
9	14.128	1015	<i>O</i> -Цимен	30.0
10	14.229	1023	Лимонен	0.94
11	14.301	1030	1,8-Цинеол	7.69
12	14.957	1037	<i>cis</i> - β -Оцимен	0.23
13	15.297	1057	γ -Терпинен	6.62
14	15.535	1070	<i>cis</i> -Сабинен гидрат	0.39
15	16.242	1092	α -Терпинолен	0.36
16	16.639	1103	β -Линалоол	3.43
17	18.002	1144	(+)-Камфора	0.64
18	18.659	1161	<i>endo</i> -Борнеол	2.98
19	19.020	1177	(-)-Терпинен-4-ол	1.53
20	19.431	1189	α -Терпинеол	5.84
21	20.701	1235	Тимол метиловый эфир	4.00
22	22.440	1293	Тимол	13.79
23	22.815	1304	Карвакрол	1.85
24	25.816	1423	Кариофиллен	1.47
25	27.361	1486	β -Копаен	0.12
26	29.785	1582	(-)-Спатуленол	0.53
27	29.922	1593	Кариофиллен оксид	1.30
28	31.279	1649	α - <i>epi</i> -Кадинол	0.15
Идентификация (%)				93.81
^A Компоненты указаны в порядке элюирования из колонки HP-5MS;				
^a IR:Идентификация по индексу удерживания и по сравнению масс-спектров.				

В эфирном масле тимьяна частолистого идентифицировано 28 компонентов, что составляет 93,81%, из которых преобладают *o*-цимен (30,0 %), тимол (13,79 %), 1,8-цинеол (7,69%), γ -терпинен (6,62%), α -терпинеол (5,84%).

Поскольку тимьян частолистый является возобновляемым источником не только эфирного масла, но и других групп биологических веществ. Нами впервые проведено изучение основных групп БАВ надземной части тимьяна частолистого. 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 2.

Таблица 2 - Содержание основных групп БАВ в траве тимьяна частолистого, произрастающего на территории Карагандинского региона

Растительное сырье	Эфирное масло, %	Флавоноиды, %	Фенолкарбоновые кислоты, %	Дубильные вещества, %	Тритерпеновые соединения, %	Водорастворимые полисахариды, %	Пектиновые вещества, %	Аминокислоты, %	Органические кислоты, %
Трава тимьяна частолистого	0,86 ±0,04	3,2 ±0,04	0,8 ±0,04	14,92 ±0,59	1,49 ±0,06	5,44 ±0,12	9,15 ±0,21	0,65 ±0,05	7,02 ±0,35

Минеральный состав растительного сырья изучали методом испарения с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан). Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Минеральный состав травы тимьяна частолистого, собранной на территории Карагандинского региона

№	Химический элемент	Содержание, %	№	Химический элемент	Содержание, %
1	2	3	4	5	6
1	Алюминий	864,30	23	Мышьяк 1	<5
2	Барий	429,80	24	Никель 1	<10
3	Бериллий	0,96	25	Ниобий	<5
4	Бор	29,41	26	Олово	<1
5	Ванадий	<5	27	Платина	<10
6	Висмут	<1	28	Свинец	<10
7	Вольфрам	<2	29	Серебро	<0,10
8	Галлий	<3	30	Скандий	<1
9	Гафний	<5	31	Стронций 2	71,13
10	Германий	<3	32	Сурьма	<5
11	Железо	1298,50	33	Таллий	<10
12	Золото	<10	34	Тантал	<10
13	Индий	<5	35	Теллур	<20
14	Иттербий	0,90	36	Титан	88,15

Определение радионуклидов (Cs, Sr) в исследуемом образце растительного сырья проводилось радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан). По результатам анализа установлено, что содержание радионуклидов (Cs, Sr) в траве тимьяна частолистого соответствует требованиям ГФ РК (таблица 4).

Таблица 4 - Результаты определения радионуклидов в траве тимьяна частолистого

Наименование растительного сырья	Содержание Sr-137, Бк/кг		Содержание Sr-90, Бк/кг	
	Норма по нормативным документам	Фактические данные	Норма по нормативным документам	Фактические данные
Трава тимьяна частолистого	200 Бк/кг	5,1 Бк/кг	100 Бк/кг	< 10 Бк/кг

По результатам товароведческого анализа трава тимьяна частолистого соответствуют требованиям ГФ РК (таблица 6).

Таблица 5 - Показатели микробиологической чистоты травы тимьяна частолистого

Наименование микроорганизмов	Требование НД	Результаты				
		Серия 230716	Серия 240716	Серия 250716	Серия 260716	Серия 270716
Общее число аэробных бактерий, КОЕ/г	Не более 10^7	$6,1 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$
Общее число грибов, КОЕ/г	Не более 10^5	41	33	31	35	30
E.Coli в 1 г	Отсутствие	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 6 - Результаты товароведческого анализа травы тимьяна частолистого

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, % не более 12 %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота
230716	0,7	6,62	5,76	2,70	соответствует
240716	0,9	6,67	5,83	2,86	соответствует
250716	0,7	6,92	5,78	2,89	соответствует
260716	0,8	7,10	5,63	2,88	соответствует
270716	0,9	6,81	5,87	2,89	соответствует

Тимьян частолистый является перспективным возобновляемым источником эфирных масел и других биологически активных веществ. По результатам обследования сырьевых запасов тимьяна частолистого на территории Центрального Казахстана выявлено, что тимьян частолистый распространен на каменистых склонах, у подножья скал и на гранитах. Встречается в горах Бектаутата и Улытау [142-144].

В горах Улытау встречается в 2-х сообществах: тимьяновом (*Thymus Ass.*) и таволгово-тимьяновом (*Thymus - Spiraea hypericifolia*).

Встречаемость растений составила от 0,5 до 3,4 штук на 1 м², урожайность надземных органов от 62,0 до 164,8 кг/га (таблица 6).

Совокупность площадь зарослей оценена в 22,8 га, эксплуатационный запас – 2,8 тонны, объем возможного ежегодного сбора сырья – 1,7 тонна. Сбор сырья на 1 участке можно вести 1 раз в 3 года.

Таблица 7 - Урожайность и сырьевые запасы наиболее распространенных лекарственных растений гор Улытау

Вид растения / сырье	Наименование сообщества	Площадь заросли, га	Урожайность, кг/га	Эксплуатационный запас, т	Объем ежегодного возможного сбора сырья, т
Тимьян частолистый трава	Тимьяновое	9,6	62,0±4,0	0,6	0,4
	Таволгово-тимьяновое	13,2	164,8±8,0	2,2	1,3
	Итого:	22,8		2,8	1,7

Таким образом, впервые проведено фармакогностическое изучение эндемичного вида тимьяна частолистого, описаны внешние признаки и микроскопические характеристики, представлены результаты товароведческого анализа. По результатам комплексного изучения установлено, что трава тимьяна частолистого, содержит значительное количество 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, определяют перспективность ее использования в фармации и медицине.

3.2 Идентификация растительного сырья тимьяна бритого (*Thymus rasitatus* Klok.)

Ареал распространения: каменистые склоны и расщелины скал. Растет в горах Улытау, Бектауата, Ортау, Кызылтау, Чингистау.

Жизненная форма тимьяна бритого представляет собой небольшой полукустарничек, высота, которого колеблется от 3 до 8 см высотой, многолетник, растение состоит из приподнимающихся и высоко древеснеющих ветвистых стволиков с множеством плодущих восходящих побегов на верхушках и боковых ветвях. Цветоносные ветви опушены под соцветием очень короткими, отогнутыми книзу волосками, такие ветви достигают 3-8 см, в нижней части они почти голые, окрас варьируется от фиолетового до темно-фиолетового (рисунок 10).



Рисунок 10 - Тимьян бритый

Соцветие представляет собой колос, головчатое, небольших размеров, довольно часто со слегка отставленной нижней малоцветковой мутовкой.

Размер цветков до 1 см, околоцветник зигоморфного строения, сростнолепестный, количество лепестков 5. Длина цветоножек находится в пределах 1,5-4(5) мм, которые окружены множеством вниз отогнутых волосков. Форма чашечки узкоколокольчатая, длина 3-4 мм, нижняя часть коротко- или очень коротковолосистая, у верхней губы зубчики ланцетные узколанцетные, по краям голые.

Листорасположение супротивное, листья размещены по всей длине стебля, строение листьев – простое, членение отсутствует. Прикрепление листьев – черешковое, в большинстве своем листья продолговато-эллиптические, довольно длинные и узкие, длина 4-10 мм и 1-2 мм ширина, края гладкие.

Иногда до половины пластины или с нижнего края наблюдаются реснички, в остальном же голые, железки хорошо выражены, боковые жилки утолщенные, с нижней стороны резко выступающие. В нижней части листья более мелкие, форма продолговато-яйцевидная, с коротким широким черешком. Венчик достигает 6 мм в длину, цвет неяркий, розовато-фиолетовый. Тип плодиков – сухой орешек, эллиптического строения, цвет темно-бурый, размер около 1 мм в длину. Цветение наблюдается в VI—VIII месяце.

Одним из основных этапов стандартизации цельного сырья является определение подлинности по внешним и микроскопическим характеристикам.

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично измельченные верхние части стеблей с цветками и листьями. Тимьян бритый имеет высоту в 3-8 см, с стволики ветвистые приподнимающиеся и высоко древеснеющие (рисунок 11), плодики можно обнаружить на верхушках побегов. Цветоносные ветви 3-8 см высотой, имеют очень короткие, вниз отогнутые волоски, нижняя часть которых почти голая, фиолетового цвета, реже темно-фиолетовые. Строение листьев черешковое, продолговато-эллиптическое, довольно узкие (4-10 мм в длину и 1-2 мм в ширину), с немногими ресничками (рисунок 12), в

остальной части растение голое, боковые жилки толстоватые, снизу выдающиеся, железки хорошо просматриваются невооруженным взглядом.

Книзу растение имеет мелкие продолговато-яйцевидные листья, с коротким широким черешком, нижние листья с более длинным черешком, часто короче пластинки. Соцветие головчатое, небольшое, нередко с немного отставленной нижней малоцветковой мутовкой. Цветоножки 1,5-4 мм длиной, густо опушенные мелкими, вниз отогнутыми волосками. Чашечка узкоколокольчатая (3-4 мм длина), коротко волосистая в нижней части, форма зубчиков верхней губы ланцетная или узко-ланцетная, по краю опушение отсутствует. Венчик имеет длину в 6 мм, цвет розовато-фиолетовый, неяркий (рисунок 13).



Рисунок 11 – Стебель воздушно-сухого сырья тимьяна бритого

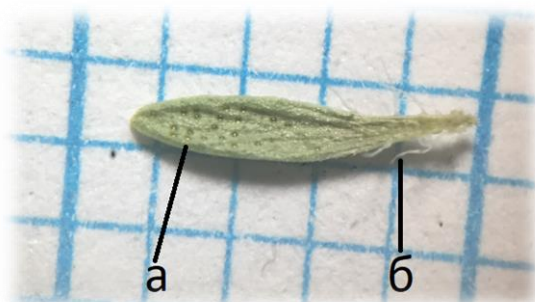


Рисунок 12 – Лист воздушно-сухого сырья тимьяна бритого:
а – железки, б – волоски



Рисунок 13 – Цветок воздушно-сухого сырья тимьяна бритого:
а - венчик, б - опушение, в - железки

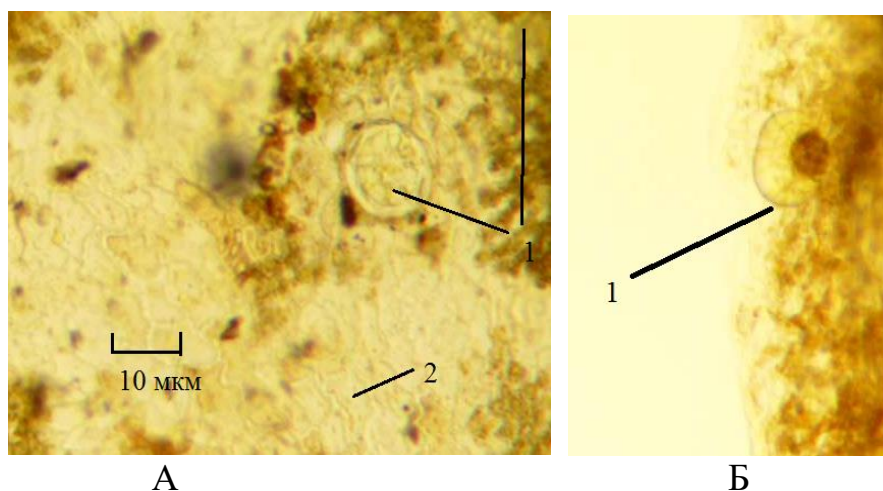
Измельченное сырье. Кусочки стеблей до 0,5-1 см утолщенной формы, жестких листьев от зеленого до серовато-зеленого цвета. Желтые цветки, собранные в плотные головки, проходящие сквозь сито диаметром 8 мм.

Идентификация. Микроскопию препарата проводят в соответствии с ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

Эпидермис верхней стороны листа тимьяна бритого состоит из прозенхимных клеток со слабо извилистыми стенками. По поверхности разбросаны крупные эфирно-масличные железки, округлой или овальной

формы (рисунок 14).

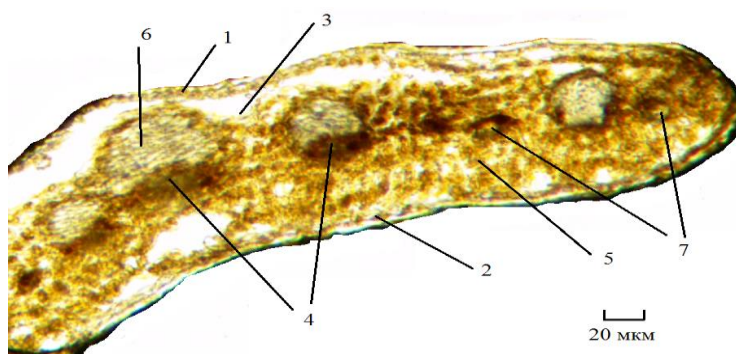
Нижний эпидермис состоит из более мелких клеток, округлой формы с извилистыми стенками. Опушение по поверхности листа не отмечены. Устьица аномоцитного типа, расположены преимущественно на нижней стороне листа (5-6 штук на 1 мм^2). Эфирно-масличные железки крупные, округлой или овальной формы, расположены с обеих сторон листа (1-2 штуки на 1 мм^2), состоят из 8 клеток, расположенных в 2 ряда. Железки приподнимающиеся над поверхностью. Обе поверхности покрыты кутикулой, образующей складки вокруг устьиц и железок.



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

Рисунок 14 – Фрагменты строения верхнего эпидермиса листа тимьяна бритоого. Ув. 10x16

На поперечном срезе лист плоский, дорзо-вентрального типа с четким делением мезофилла на столбчатую и губчатую ткани (рисунок 15).

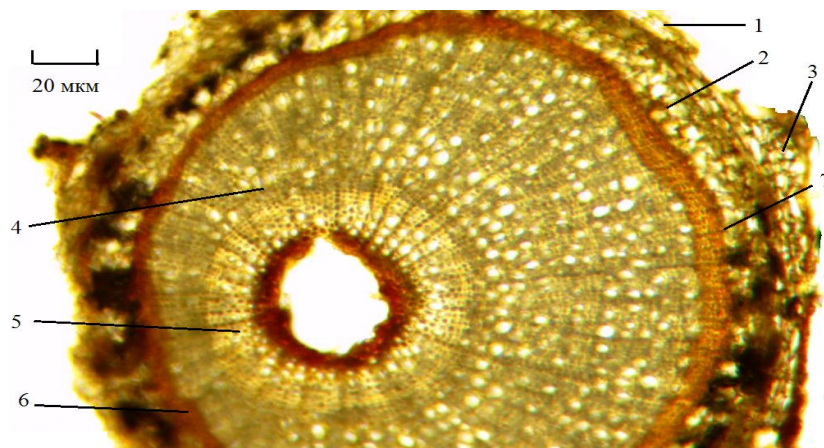


1 – нижний эпидермис, 2 – верхний эпидермис, 3 – губчатый мезофилл, 4 – флоэма, 5 – столбчатый мезофилл, 6 – ксилема, 7 – схизогенные вместилища

Рисунок 15 – Поперечный срез листа тимьяна бритоого. Ув. 10x16

С обеих сторон лист покрыт эпидермисом, клетки которого на срезе имеют округло-прямоугольную форму. Столбчатый мезофилл представлен 1-2 слоями клеток, губчатый – 2 слоями. Проводящая система пучкового типа, соответствует главной и боковым жилкам листа. Пучки коллатеральные, закрытого типа, флоэма снизу, ксилема – сверху. В толще мезофилла расположены темно-окрашенные схизогенные вместилища.

На поперечном срезе стебель тимьяна бритого округлый с плохо выраженными ребрами, с полостью в центральной части (рисунок 16).



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

Рисунок 16 – Поперечный срез стебля тимьяна бритого. Фрагмент. Ув. 10x16

По периферии размещен 1-рядный эпидермис. Под ним залегает коровая паренхима, в углах прерываемая участками механической ткани – колленхимы. Проводящую зону отделяет от коровой зоны 1-слойная эндодерма.

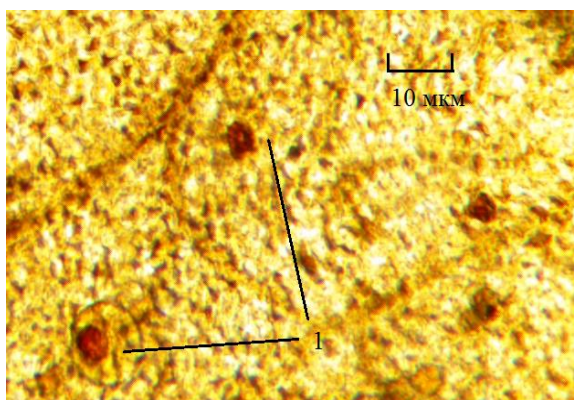
Проводящая система не пучкового типа, состоит из тонкого кольца флоэмы с темно-окрашенными клетками. Ксилема состоит из более светлой первичной ксилемы с мелкими сосудами, вторичная – с крупными сосудами. Ряды ксилемы прерываются лучами сердцевинной паренхимы.

Эпидермис венчика цветка состоит из мелких округлых клеток с тонкими стенками (рисунок 17).

Поверхность покрыта многочисленными эфирно-масличными железками (3-4 штуки на 1 мм²), округлой формы, темно-окрашенные [145].

Диагностические признаки травы тимьяна бритого. Исследуемый вид тимьяна характеризуется ксеромезофитным и ксерофитным типом строения, что выражается в мелкоклеточной эпидерме листа, наличии многочисленных эфирно-масличных железок и кутикулы.

Идентификацию сырья также подтверждали, исходя из химического состава тимьяна бритого в соответствии с требованиями ГФ РК.



1 – эфирно-масличные железки

Рисунок 17 – Эпидермис венчика цветка. Препарат с поверхности. Ув. 10x16

Эфирное масло из воздушно-сухого растительного сырья получали методом перегонки с водяным паром на аппарате Клевенджера. Выход эфирного масла из тимьяна бритого составил $0,60 \pm 0,02\%$, в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Компонентный состав эфирного масла тимьяна бритого определяли методом хромато-масс-спектрологии на газовом хроматографе Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (MSD) по методике описанной выше. Хроматограмма эфирного масла тимьяна бритого приведена на рисунке 18, компонентный состав в таблице 7.

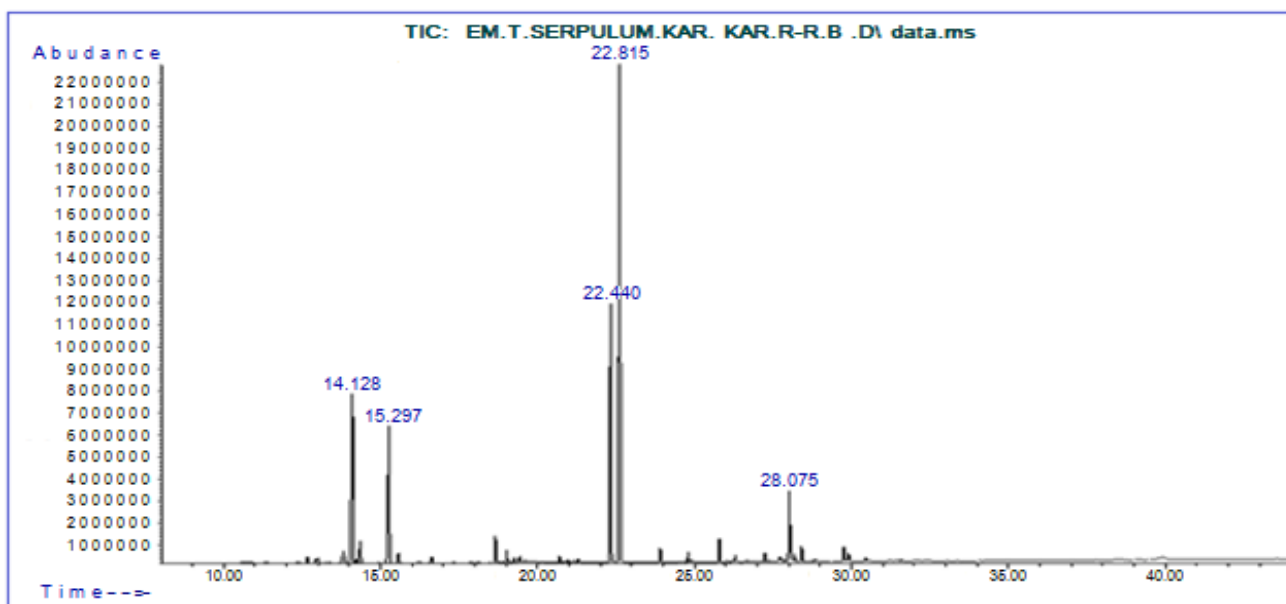


Рисунок 18 - Хроматограмма ГХ-МС эфирного масла тимьяна бритого

В эфирном масле тимьяна бритого идентифицировано 36 компонентов – 96,85%, основными являются *trans*-неролидол (14,55%), *trans*-гераниола ацетат (13,91%), β -линалоол (12,66%), *trans*-гераниол (9,50%), α -терпинеол (8,27%),

1,8-цинеол (5,99%).

Таблица 8 – Компонентный состав эфирного масел тимьяна бритого (*Thymus rasiatus* Клок.)

№ пика	t _R (мин)	^a IR	^A Компонет	Содержание, %
1	10.592	929	α -Туйен	1.06
2	10.801	934	α -Пинен	1.70
3	11.408	948	Камфен	2.23
4	12.360	962	β -Терпинен	1.44
5	12.418	976	β -пинен	2.10
6	13.846	1010	(+)-4-Карен	0.16
7	14.128	1015	O-Цимен	0.58
8	14.229	1023	Лимонен	0.87
9	14.301	1030	1,8-Цинеол	5.99
10	14.957	1037	<i>cis</i> - β -Оцимен	2.29
11	15.297	1057	γ -Терпинен	0.38
12	15.571	1092	<i>cis</i> - β -Терпинеол	0.14
13	16.639	1103	β -Линалоол	12.66
14	18.002	1144	(+)-Камфора	0.46
15	18.233	1155	Оксид нерола	0.17
16	18.659	1161	<i>endo</i> -Борнеол	3.01
17	19.020	1177	(-)-Терпинен-4-ол	0.63
18	19.186	1180	<i>cis</i> -Вербенол	0.05
19	19.431	1189	α -Терпинеол	8.27
20	20.528	1228	<i>cis</i> -Гераниол	3.49
21	20.896	1239	β -Цитраль	1.60
22	21.292	1263	<i>trans</i> -Гераниол	9.50
23	21.740	1270	α -Цитраль	2.62
24	22.180	1286	<i>iso</i> -Борнеола ацетат	0.21
25	22.440	1293	Тимол	0.42
26	24.294	1348	<i>cis</i> -Гераниола ацетат	4.21
27	24.821	1391	<i>trans</i> -Гераниола ацетат	13.91
28	24.900	1404	(-)- β -Бурбонен	0.17
29	25.816	1423	Кариофиллен	0.64
30	27.361	1486	β -Копаен	0.32
31	27.765	1498	γ -Элемен	0.10
32	29.374	1571	(\pm)- <i>trans</i> -Неролидол	14.55
33	29.785	1582	(-)-Спатунеол	0.75
34	29.922	1593	Кариофиллена оксид	0.70
35	31.279	1649	α - <i>epi</i> -Кадинол	0.17
36	31.711	1709	Можжевеловая камфара	0.36
Идентификация (%)				96.85
^A Компоненты указаны в порядке элюирования из колонки HP-5MS;				
^a IR-Идентификация по индексу удерживания и по сравнению масс-спектров.				

Впервые исследовано содержание основных групп БАВ в надземной части тимьяна бритого. 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 9.

Таблица 9 - Содержание основных групп БАВ в траве тимьяна бритого, произрастающего на территории Карагандинского региона

Растительное сырье	Эфирное масло, %	Флавоноиды, %	Фенолкарбоновые кислоты, %	Дубильные вещества, %	Тритерпеновые соединения, %	Водорастворимые полисахариды, %	Пектиновые вещества, %	Аминокислоты, %	Органические кислоты, %
Трава тимьяна бритого	0,60 ±0,02	2,88 ±0,03	1,81 ±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

Таблица 10 – Минеральный состав травы тимьяна бритого, собранной на территории Карагандинского региона

№	Химический элемент	Содержание, %	№	Химический элемент	Содержание, %
1	2	3	4	5	6
1	Алюминий	680,90	23	Мышьяк 1	<5
2	Барий	252,84	24	Никель 1	<10
3	Бериллий	1,10	25	Ниобий	<5
4	Бор 2	28,56	26	Олово	<1
5	Ванадий 1	<5	27	Платина	<10
6	Висмут	<1	28	Свинец	23,45
7	Вольфрам	<2	29	Серебро	<0,10
8	Галлий	<3	30	Скандий	<1
9	Гафний	<5	31	Стронций 2	77,56
10	Германий	<3	32	Сурьма	<5
11	Железо 1	1245,51	33	Таллий	<10
12	Золото	<10	34	Тантал	<10
13	Индий	<5	35	Теллур	<20
14	Иттербий	<0,50	36	Титан	108,91
15	Иттрий	3,16	37	Торий	<2
16	Кадмий	<3	38	Уран	<500
17	Кобальт 1	<1	39	Фосфор 1	861,88
18	Лантан	<5	40	Хром 1	29,41
19	Литий 1	1,83	41	Цинк 1	75,20
20	Марганец 1	242,96	42	Церий	<20
21	Медь 1	18,73	43	Цирконий	2,39
22	Молибден 1	<1,50			

Минеральный состав травы тимьяна бритого изучали методом испарения

с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан). Полученные результаты представлены в таблице 10.

Определение радионуклидов (Cs, Sr) в исследуемом образце растительного сырья проводилось радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан). По результатам анализа установлено, что содержание радионуклидов (Cs, Sr) в траве тимьяна бритого соответствует требованиям ГФ РК (таблица 11).

Таблица 11 - Результаты определения радионуклидов в траве тимьяна бритого

Наименование растительного сырья	Содержание Sr-137, Бк/кг		Содержание Sr-90, Бк/кг	
	Норма по нормативным документам	Фактические данные	Норма по нормативным документам	Фактические данные
Трава тимьяна бритого	200 Бк/кг	12 Бк/кг	100 Бк/кг	< 15 Бк/кг

По результатам товароведческого анализа трава тимьяна бритого соответствуют требованиям ГФ РК (таблица 13).

Таблица 12 - Показатели микробиологической чистоты травы тимьяна бритого

Наименование микроорганизмов	Требование НД	Результаты				
		Серия 180716	Серия 190716	Серия 200716	Серия 210716	Серия 220716
Общее число аэробных бактерий, КОЕ/г	Не более 10^7	$6,2 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$
Общее число грибов, КОЕ/г	Не более 10^5	42	32	35	36	32
E.Coli в 1 г	Отсутствие	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 13 - Результаты товароведческого анализа травы тимьяна бритого

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота
180716	1,40	5,55	5,28	2,30	соответствует
190716	1,40	5,54	5,23	2,34	соответствует
200716	1,01	5,59	5,27	2,30	соответствует
210716	1,02	5,40	5,64	2,60	соответствует
220716	1,04	5,40	5,41	2,40	соответствует

Тимьян бритый произрастает на каменистых склонах и расщелинах скал. Растет в горах Улытау, Бектауата, Ортау, Кызылтау, Чингистау. В горах Бектауата площадь промышленноценных зарослей тимьяна бритого составляет 29,8 га, урожайность сырья изменяется от 0,8 до 2,2 ц/га. Эксплуатационный запас составил 37,0 ц, объем возможных заготовок сырья оценен в 14,8 ц.

Таким образом, впервые проведено фармакогностическое изучение эндемичного вида тимьяна бритого, охарактеризованы внешние и микроскопические признаки, приведены результаты товароведческого анализа. Установлено наличие основных групп БАВ терпеноидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот, минеральных элементов, количество которых обосновывает возможность ее применения в фармации и медицине [146].

3.3 Идентификация растительного сырья тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Клок.)

Ареал распространения: каменистые склоны, у подножья скал и на гранитах, подгорной равнине. Встречается в горах Бектауата.

Жизненная форма тимьяна пустынного выглядит, как многолетний полукустарничек, высотой от 2 до 5 см высотой, стволы могут быть как тонкие, так и толстоватые, по верхушкам плодущие и стелющиеся. Размер цветоносных ветвей 1,5-4 см высотой, окрас лиловатый, ветви негустоопушенные, только на молодых ветвях наблюдается довольно густое опушение короткими, вниз отогнутыми волосками. Соцветие плотно-головчатого строения, иногда с отставленной нижней мутовкой. Размер цветков может достигать 1 см. Строение околоцветника данного вида тимьяна зигоморфное, сростнолепестное, количество лепестков – 5. Форма чашечки узкоколо-кольчатая, длина от (3) 4 до 4,5 мм, окрас темно-фиолетовый, на верхней губе зубчики ланцетные, туповатые, по краю без ресничек, но иногда встречаются щетинки. Листорасположение супротивное, размещение листьев тимьяна по длине стебля, тип листьев – простые, пластинчатые, членение отсутствует. В большинстве своем листья продолговато-эллиптической, реже продолговато-яйцевидной или обратно-яйцевидной формы, короткочерешковые, длина варьируется от 2,5 до 11 мм, шириной 1-3 мм, редкие реснички до 1,5 мм длиной наблюдаются по краям в нижней части листовой пластины; боковые жилки не сильно выдающиеся, их число 2-4 пар; точечные железки неясные, пластинок листьев края гладкие, листья бесплодных побегов часто кособокие. Цвет венчики данного вида тимьяна розово-фиолетовый, неяркий, длиной 6—7 мм. Тип плодиков сухой орешек. Цветение наблюдается в июне месяце (рисунок 19).

Основополагающим этапом стандартизации цельного сырья является определение подлинности по внешним и микроскопическим характеристикам.

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично измельченные верхние части стеблей с цветками и листьями.



Рисунок 19 - Тимьян пустынный

Растение имеет длину в 2-5 см, стволы толстые и коротковатые, плодущими на верхушке и стелющимися, только на верхушках восходящими бесплодными побегами (рисунок 20).

Цветоносные ветви 1,5-4 см высотой, лилового цвета, негусто или густо опушенные с короткими, вниз отогнутыми волосками. Листья короткочерешковые, типичная форма продолговато-эллиптическая, реже продолговатояйцевидной или обратно-яйцевидной формы, (2,5-11 мм длина и 1-3 мм ширина), по краю книзу имеются редкие реснички до 1,5 мм в длину (рисунок 20). Растение характеризуется не сильно выдающимися боковыми жилками, точечные железки неясные, листья бесплодных побегов нередко кособокие. Число боковых жилок 2-4 пары, при этом соцветие плотно-головчатое, реже с отставленной нижней мутовкой.

Чашечка узкоколокольчатой формы, длина до 3-4,5 мм, окрас темно-фиолетовый, зубчики верхней губы ланцетные, туповатые, по краю отсутствуют реснички, но иногда прослеживаются щетинки (рисунок 21). Тип плодиков сухой орешек. Венчик имеет длину в 6-7 мм, цвет его розово-фиолетовый, неяркий.



Рисунок 20 – Стебель воздушно-сухого сырья тимьяна пустынного:
а – волоски



Рисунок 21 – Лист воздушно-сухого сырья тимьяна пустынного:
а – железки, б – волоски

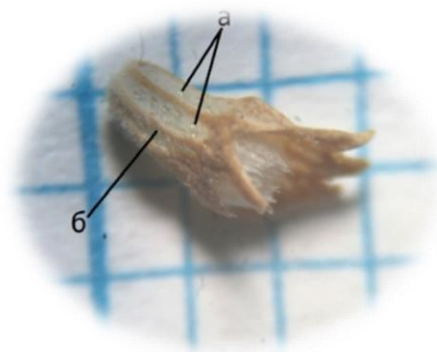
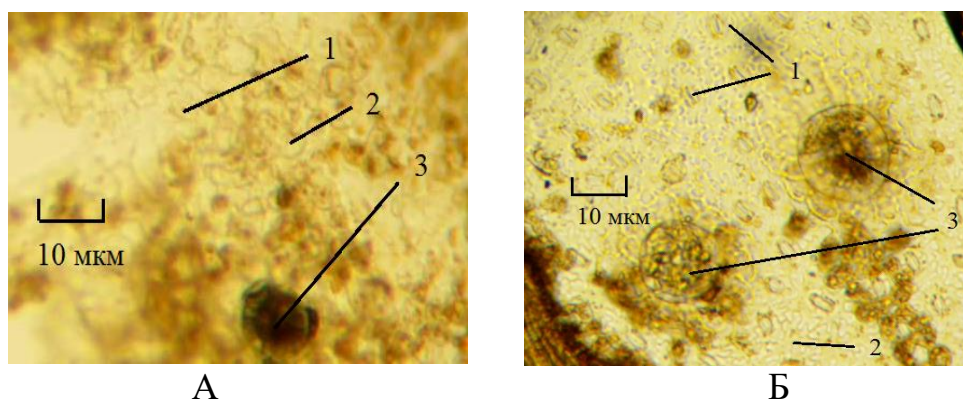


Рисунок 22 – Чашечка воздушно-сухого сырья тимьяна пустынного:
а – железки, б – волоски

Измельченное сырье. Кусочки стеблей до 0,5-1 см утолщенной формы, жестких листьев от зеленого до серовато-зеленого цвета. Желтые цветки, собранные в плотные головки, проходящие сквозь сито диаметром 8 мм.

Идентификация. Микроскопию препарата проводят в соответствии с ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

Эпидермис листа тимьяна пустынного с обеих сторон состоит из извилистых клеток с утолщенными стенками и слоем кутикулы. Устьица многочисленные, мелкие, аномоцитного типа, размещены с обеих сторон листа, но обильно – на нижней. Трихомы не выражены. Эфирно-маслические железки крупные, округлой формы, темно-окрашенные, приподнимаются над поверхностью (рисунок 23). Железки состоят из 8 клеток, расположенных в 2 ряда. Численность железок – 1-2 штуки на 1 мм².



А – верхний эпидермис, Б – нижний эпидермис с приподнимающейся железкой,
1 – устьице, 2 – основные клетки эпидермиса, 3 – эфирно-маслическая железка

Рисунок 23 – Фрагменты строения верхнего эпидермиса листа тимьяна пустынного. Ув. 10x16

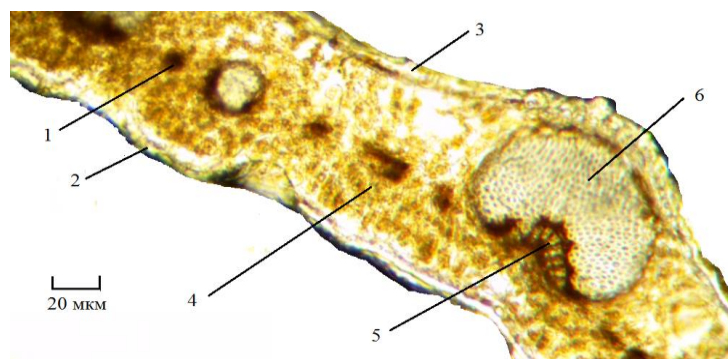
На поперечном срезе лист плоский, палисадного типа – столбчатый мезофилл расположен с обеих сторон листа, губчатый – практически не

выражен (рисунок 23).

С обеих сторон лист покрыт 1-слойным эпидермисом. Мезофилл не дифференцирован на отдельные ткани, в толще листа размещены схизогенные вместилища.

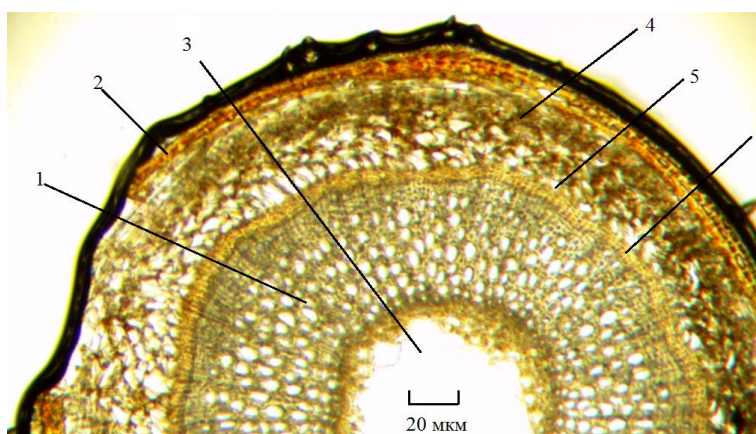
Проводящая система пучкового типа, пучки – коллатеральные, закрытого типа – ксилема снизу, флоэма – сверху.

Стебель на поперечном срезе округлый, ребра выражены слабо, внутри полый (рисунок 24).



1 – схизогенные вместилища, 2 – верхний эпидермис, 3 – нижний эпидермис,
4 – столбчатый мезофилл, 5 – флоэма, 6 – ксилема

Рисунок 24 – Поперечный срез листа тимьяна пустынного. Ув. 10x16



1 – ксилема, 2 – эпидермис, 3 – полость, 4 – хлоренхима, 5 – эндодерма,
6 – флоэма

Рисунок 25 – Поперечный срез стебля тимьяна пустынного.
Фрагмент. Ув. 10x16

Стебель по периферии покрыт 1-слойным эпидермисом, под которым

залегает 2-4 слоя хлоренхимы. Коровая зона отделена от проводящей части – 1-слойной эндодермой. Проводящая система не пучкового, кольцевого типа. Слой флоэмы небольшой по размеру, состоит из мелких клеток. Ксилема образует большое кольцо с крупными просветами и сердцевинными лучами. Центральная паренхима отмирает, и у взрослых стеблей формируется полость.

В ходе исследования было установлено, что исследуемый вид тимьяна обладает ксеромезофитным и ксерофитным типом строения, которое выражается в мелкоклеточной эпидерме листа, наличии многочисленных крупных эфирно-масличных железок округлой или овальной формы, устьица характеризуются аномоцитным типом, расположены преимущественно на нижней стороне листа [147, 148].

Диагностические признаки сырья тимьяна пустынного. Клетки нижнего эпидермиса листа округлой или овальной формы в очертании с извилистыми стенками. Устьица многочисленные, аномоцитного типа. Эфирно-масличные железки крупные, округлой формы, 1-клеточные трихомы. Клетки верхнего эпидермиса более прозенхимной формы со слабо извилистыми стенками. Устьица редкие, железки – многочисленные, также приподнимающиеся над поверхностью. Трихомы не обнаружены.

Идентификацию сырья также подтверждали, исходя из химического состава тимьяна пустынного в соответствии с требованиями ГФ РК.

Эфирное масло из воздушно-сухого растительного сырья получали методом перегонки с водяным паром на аппарате Клевенджера. Выход эфирного масла из тимьяна пустынного составил $0,30 \pm 0,03\%$, в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Компонентный состав эфирного масла тимьяна пустынного определяли методом хромато-масс-спектропии на газовом хроматографе Agilent GC System 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (MSD) по методике описанной выше. Хроматограмма эфирного масла тимьяна пустынного приведена на рисунке 26, компонентный состав в таблице 14.

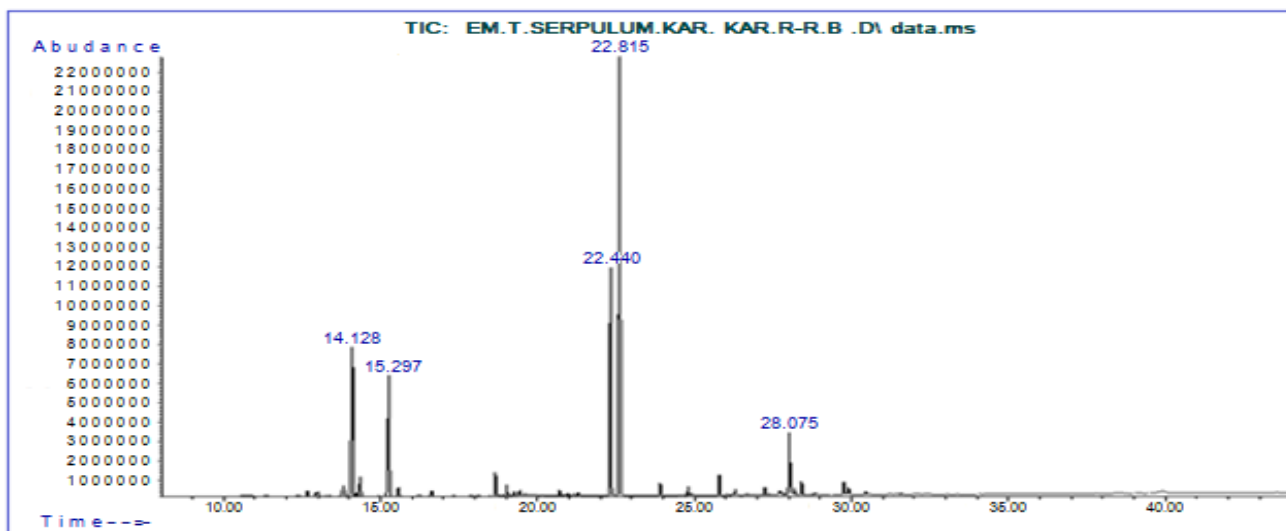


Рисунок 26 - Хроматограмма ГХ-МС эфирного масла тимьяна пустынного

Таблица 14 – Компонентный состав эфирного масел тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.)

№ пика	t _R (мин)	^a IR	^A Компонет	Содержание, %
1	10.801	934	α -Пинен	1.21
2	11.408	948	Камфен	2.16
3	12.360	976	β -Терпинен	1.30
4	12.584	979	1-Октен-3-ол	0.52
5	13.017	992	β -Мирцен	3.66
6	13.846	1010	(+)-4-Карен	0.42
7	14.128	1015	O-Цимен	3.97
8	14.229	1023	Лимонен	0.83
9	14.301	1030	1,8-Цинеол	10.46
10	14.957	1037	<i>cis</i> - β -Оцимен	1.46
11	15.297	1057	γ -Терпинен	0.95
12	15.571	1080	<i>cis</i> - β -Терпинеол	0.10
13	16.639	1103	β -Линалоол	25.94
14	18.002	1144	(+)-Камфора	1.28
15	18.659	1161	<i>endo</i> -Борнеол	5.67
16	19.020	1177	(-)-Терпинен-4-ол	1.39
17	19.431	1189	α -Терпинеол	12.27
18	20.528	1228	<i>cis</i> -Гераниол	1.24
19	20.701	1235	Метилвый эфир тимола	1.18
20	20.896	1239	β -Цитраль	1.31
21	22.180	1286	<i>iso</i> -Борнил ацетат	0.21
22	22.440	1293	Тимол	1.48
23	24.287	1344	(<i>R</i>)-Лавандулил ацетат	0.33
24	24.900	1404	(-)- β -Бурбонен	0.37
25	25.816	1423	Кариофиллен	2.32
26	26.675	1454	Гумулен	0.22
27	27.361	1486	β -Копаен	0.40
28	27.765	1498	γ -Элемен	0.31
29	29.374	1571	(\pm)- <i>trans</i> -Неролидол	7.17
30	29.785	1582	(-)-Спатунеол	1.30
31	29.922	1593	Кариофиллена оксид	2.24
32	31.279	1649	α - <i>epi</i> -Кадинол	0.20
33	31.711	1709	Можжевеловая камфора	1.47
Идентификация (%)				95.34
^A Компоненты указаны в порядке элюирования из колонки HP-5MS;				
^a IR:Идентификация по индексу удерживания и по сравнению масс-спектров.				

В эфирном масле тимьяна пустынного идентифицировано 33 компонента – 95,34%, основными являются β -линалоол (25,94%), α -терпинеол (12,27%), 1,8-цинеол (10,46%), *trans*-неролидол (7,17%), *endo*-борнеол (5,67%).

Нами впервые проведено изучение основных групп БАВ надземной части тимьяна пустынного. 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 15.

Минеральный состав травы тимьяна пустынного изучали методом испарения с применением эмиссионного спектрального анализа в испытательной лаборатории «ЭкоНус» (г. Караганда, Казахстан). Полученные результаты представлены в таблице 16.

Таблица 15 - Содержание основных групп БАВ в траве тимьяна пустынного, произрастающего на территории Карагандинского региона

Растительное сырье	Эфирное масло, %	Флавоноиды, %	Фенолкарбоновые кислоты, %	Дубильные вещества, %	Тритерпеновые соединения, %	Водорастворимые полисахариды, %	Пектиновые вещества, %	Аминокислоты, %	Органические кислоты, %
Трава тимьяна пустынного	0,30 ±0,03	2,89 ±0,04	1,06 ±0,05	12,00 ±0,28	2,40 ±0,12	5,82 ±0,14	16,74 ±0,34	0,92 ±0,03	5,54 ±0,21

Таблица 16 – Минеральный состав травы тимьяна пустынного, собранной на территории Карагандинского региона

№	Химический элемент	Содержание, %	№	Химический элемент	Содержание, %
1	2	3	4	5	6
1	Алюминий	618,00	23	Мышьяк 1	<5
2	Барий	450,52	24	Никель 1	<10
3	Бериллий	<0,80	25	Ниобий	<5
4	Бор 2	21,09	26	Олово	<1
5	Ванадий 1	<5	27	Платина	<10
6	Висмут	<1	28	Свинец	<10
7	Вольфрам	<2	29	Серебро	<0,10
8	Галлий	<3	30	Скандий	<1
9	Гафний	<5	31	Стронций 2	71,13
10	Германий	<3	32	Сурьма	<5
11	Железо 1	1013,74	33	Таллий	<10
12	Золото	<10	34	Тантал	<10
13	Индий	<5	35	Теллур	<20
14	Иттербий	<0,50	36	Титан	110,72
15	Иттрий	<3	37	Торий	<2
16	Кадмий	<3	38	Уран	<500
17	Кобальт 1	<1	39	Фосфор 1	905,92
18	Лантан	<5	40	Хром 1	28,45
19	Литий 1	<1	41	Цинк 1	47,62

По результатам анализа установлено, что содержание радионуклидов (Cs, Sr) в траве тимьяна пустынного соответствует требованиям ГФ РК (таблица 17).

Таблица 17 - Результаты определения радионуклидов в траве тимьяна пустынного

Наименование растительного сырья	Содержание Sr-137, Бк/кг		Содержание Sr-90, Бк/кг	
	Норма по нормативным документам	Фактические данные	Норма по нормативным документам	Фактические данные
Трава тимьяна пустынного	200 Бк/кг	12 Бк/кг	100 Бк/кг	< 15 Бк/кг

По результатам товароведческого анализа трава тимьяна пустынного соответствуют требованиям ГФ РК (таблица 19).

Таблица 18 - Показатели микробиологической чистоты травы тимьяна пустынного

Наименование микроорганизмов	Требование НД	Результаты				
		Серия 180716	Серия 190716	Серия 200716	Серия 210716	Серия 220716
Общее число аэробных бактерий, КОЕ/г	Не более 10^7	$5,2 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	$5,7 \times 10^2$
Общее число грибов, КОЕ/г	Не более 10^5	32	31	28	36	33
Е.Coli в 1 г	Отсутствие	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 19 - Результаты товароведческого анализа травы тимьяна пустынного

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота
280716	0,70	6,62	5,76	2,70	соответствует
290716	0,90	6,67	5,83	2,86	соответствует
300716	0,70	6,92	5,78	2,89	соответствует
010816	0,80	7,10	5,63	2,88	соответствует
020816	0,90	6,81	5,87	2,89	соответствует

Тимьян пустынный произрастает на каменистых склонах, у подножья скал и на гранитах, подгорной равнине. Встречается в горах Бектаутата. Площадь промышленно-ценных зарослей тимьяна пустынного составляет 21,5 га,

урожайность сырья изменяется от 0,6 до 1,9 ц/га. Эксплуатационный запас составил 31,0 ц, объем возможных заготовок сырья оценен в 10,3 ц.

Таким образом, впервые проведено фармакогностический анализ эндемичного вида тимьяна пустынного, описаны внешние и микроскопические признаки, представлены результаты товароведческого анализа. Установлено наличие основных групп БАВ терпеноидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот, минеральных элементов, количество которых обуславливает перспективы ее применения в фармации и медицине [148].

3.4 Стандартизация лекарственного растительного сырья тимьяна частолистого

Тимьян частолистый (*Thymus crebrifolius* Клок.) является перспективным источником не только эфирного масла, но и полифенольных соединений. Разработку показателей качества травы тимьяна частолистого проводили на 5 сериях опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК и Ф ЕАЭС. Результаты приведены в таблице 17.

Внешние признаки. Цельное сырье. Полукустарник высотой 4-10 см с лежащими одревесневшими стеблями и приподнимающимися травянистыми цветущими 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.

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

Идентификация. Микроскопию препаратов осуществляют согласно ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья».

Диагностические признаки тимьяна частолистого: 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.

Таблица 20 - Контроль качества лекарственного растительного сырья «Тимьян частолистый трава»

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Трава тимьяна частолистого / Серия				
			230716	240716	250716	260716	270716
1	2	3	4	5	6	7	8
Идентификация: А. Внешние признаки	А. Ф ЕАЭС 2.1.8.17 ГФ РК, т.1, с.565	А. Соответствие морфологическим признакам при просмотре невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
В. Микроскопия	В. Ф ЕАЭС 2.1.8.17 ГФ РК, т.1, 2.8.3.	В. Соответствие анатомическим признакам при просмотре под микроскопом с увеличением (не менее 40х).	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
С. - цинарозид	С. ТСХ ГФ РК I, Т. 2, 2.2.27	С. Rf около 0,45 (кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат 15:15:70).	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
Посторонние примеси: - пожелтевшие, побуревшие и почерневшие части растения - органические примеси - минеральные примеси	Ф ЕАЭС 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2.	Не более 1.0%.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
		Не более 0.5%.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
		Не более 0.5%.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Потеря в массе при высушивании	Ф ЕАЭС 2.1.2.31 ГФ РК I, Т. 1, 2.2.32	Не более 10.0%	6,62	6,67	6,92	7,10	6,81

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7	8
Общая зола	Ф ЕАЭС 2.1.4.16 ГФ РК I, Т. 1, 2.4.16	Не более 10.0%	5,76	5,83	5,78	5,63	5,87
Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной	Ф ЕАЭС 2.1.8.1 ГФ РК I, т 1, 2.5.12	Не более 3.0 %	2,70	2,86	2,89	2,88	2,89
Микробиологическая чистота	Ф ЕАЭС 2.3.1.4 ГФ РК I, т. 1, 5.1.4 Категория 3; 2.6.12 и 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>Escherichia coli</i> в 1.0 г и <i>Salmonella</i> в 10.0 г.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Радионуклиды:	В соответствии с НД	Сырье должно выдерживать требованиям СанПиН №4.01.071.03.	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет	соот-ет
Тяжелые металлы	Ф ЕАЭС 2.1.4.21 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
Количественное определение суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид	УФ-спектрофотометрия; ГФ РК I, т. 1, 2.2.29	Не менее 2,0 %	3,20	3,24	3,18	3,22	3,10

Идентификацию травы тимьяна частолистого также проводили реакцией на присутствие в сырье флавоноидов. Сумму флавоноидов из растительного сырья получали экстракцией 70% этанолом 3-хкратно. 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 т. I, 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) по методике [106, 114]:

Раствор А. Около 1,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в колбу объемом 250 мл со шлифом, приливают 100 мл 70% спирта этилового и экстрагируют на водяной бане в течение 1 часа. Извлечения отфильтровывают через бумажный фильтр и получают раствор А.

Раствор Б. В мерную колбу объемом 25 мл приливают 2,5 мл раствора А, затем 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 70% спирте этиловом и через 10 мин - 1 мл 3 % раствора кислоты уксусной, доводят объем раствора 70% спиртом этиловом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин.

Через 30 мин измеряют на спектрофотометре оптическую плотность раствора Б при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения состоит из 2,5 мл раствора А, 1 мл 3% раствора кислоты уксусной, в мерной колбе вместимостью 25 мл доводят до метки 70% спиртом этиловым.

Содержание суммы флавоноидов, в абсолютно сухом сырье, в пересчете на цинарозид, 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 A - 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, %.

В соответствии с требованиями Приказа МЗ 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» нами была исследована стабильность и определены сроки хранения растительного сырья тимьяна частолистого методом долгосрочного испытания. Стабильность лекарственного растительного сырья тимьяна частолистого изучена при хранении в условиях: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность воздуха не более $60 \pm 5\%$. На хранение заложены 3 серии травы тимьяна частолистого (таблицы 21-23). Существенных изменений определяемых показателей качества не наблюдалось.

Периодичность контроля серии составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 мес, для показателя качества микробиологическая чистота – 24 мес. Значительных изменений контролируемых параметров качества не наблюдалось. При хранении существенных изменений показателей качества не установлено. Определен срок хранения травы тимьяна частолистого - 2 года.

Таким образом, разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава» и проведена его стандартизация. Нами предложена стандартизация травы тимьяна частолистого по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид (Приложение В).

Выводы по главе 3

1. Впервые проведено фармакогностическое изучение эндемичных видов флоры Казахстана тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьяна бритого (*Thymus rasitatus* Klok.) и тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.), описаны внешние характеристики и микроскопические признаки, представлены результаты товароведческого анализа.

2. По результатам комплексного изучения содержания различных классов биологически активных веществ, впервые установлено, что трава тимьяна частолистого, трава тимьяна бритого и трава тимьяна пустынного содержат значительное количество 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, определяют перспективность их использования в фармации и медицине.

3. Полученные результаты могут быть использованы для стандартизации травы тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Клок.), травы тимьяна бритого (*Thymus rasitatus* Клок.) и травы тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Клок.).

4. Разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава» и проведена его стандартизация. Нами предложена стандартизация травы тимьяна частолистого по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на цинарозид. Определен срок хранения травы тимьяна частолистого - 2 года.

Таблица 21 - Результаты испытаний стабильности растительного сырья травы тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), серия 1

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2016 г Дата окончания испытания: 07.2018 г Серия: 01 230716										
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 crebrifolius</i> Klok. Запах сильный лимонный, вкус специфический.	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	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 %	5,26	5,27	5,27	5,27	5,27	5,27	5,26
- 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 %	7,1	7,2	7,1	7,0	7,0	7,1	7,1
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,28	6,31	6,29	6,30	6,30	6,29	6,29
Количественное определение: -		В соответствии с НД	не менее 2%	3,2	3,1	3,2	3,2	3,0	3,1	3,1
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	ГФ РК, т.1, 2.6.12 и ГФ РК, т.2, 2.6.13	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

Таблица 22 - Результаты испытаний стабильности растительного сырья травы тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), серия 2

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2016 г Дата окончания испытания: 07.2018 г Серия: 02 230716										
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 crebrifolius</i> Klok. Запах сильный лимонный, вкус специфический.	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	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 %	5,29	5,30	5,28	5,27	5,27	5,27	5,26
- органические примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
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 %	7,2	7,2	7,1	7,0	7,1	7,1	7,1
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,27	6,28	6,29	6,29	6,28	6,29	6,29
Количественное определение: -		В соответствии с НД	не менее 2%	3,1	3,2	3,2	3,2	3,0	3,1	3,1
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	ГФ РК, т.1, 2.6.12 и ГФ РК, т.2, 2.6.13	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

Таблица 23 - Результаты испытаний стабильности растительного сырья травы тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), серия 3

Упаковка: двухслойные мешки из крафт-бумаги Дата начала испытания: 07.2016 г Дата окончания испытания: 07.2018 г Серия: 03 230716										
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 crebrifolius</i> Klok. Запах сильный лимонный, вкус специфический.	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	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	5,27	5,29	5,28	5,29	5,29	5,29
- органические примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
минеральные примеси		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не более 1.0%	0,44	0,43	0,43	0,44	0,43	0,45	0,44
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32	не более 10.0 %	7,3	7,2	7,1	7,1	7,0	7,1	7,2
Общая зола		ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16	не более 8.0%	6,32	6,31	6,28	6,30	6,30	6,28	6,30
Количественное определение: -		В соответствии с НД	не менее 2%	3,4	3,3	3,4	3,4	3,2	3,2	3,2
Микробиологическая чистота		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13	ГФ РК, т.1, 2.6.12 и ГФ РК, т.2, 2.6.13	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

4.1 Способ получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного с использованием ультразвука

Нами впервые для извлечения суммы экстрактивных веществ из травы тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного, произрастающих в природе Центрального Казахстана, применена ультразвуковая экстракция.

Экстракцию проводили в условиях эффективных для получения суммы полифенольных соединений из лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) [107, 108].

Нами впервые проведена двукратная экстракция воздушно-сухого сырья (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли) ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 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, объединили и упарили экстрагент на ротормном испарителе при температуре 50°C до густого экстракта, затем из густого экстракта тимьяна частолистого остаточный растворитель выпаривают на водяной бане при температуре 70°C. Получают сухой экстракт тимьяна частолистого. Полученные результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Условия экстракции и выходы суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного

Наименование сырья	Условия экстракции	Выход суммы экстрактивных веществ, %
Трава тимьяна частолистого	экстрагент – 70 % этанол, 40 кГц	5,76±0,05
Трава тимьяна бритого	экстрагент – 70 % этанол, 40 кГц	5,40±0,12
Трава тимьяна пустынного	экстрагент – 70 % этанол, 40 кГц	3,20±0,07

Проведенные исследования показывают, что двукратная экстракция воздушно-сухого сырья ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 70% этанолом при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, в течение 30 минут обеспечивает сравнительно высокий выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого - 5,76%, выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна бритого немного ниже - 5,40%, самый низкий выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна пустынного - 3,20%.

Таким образом, разработан способ получения сухого экстракта из тимьяна частолистого, 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 [149].

4.2 Исследование химического состава полифенольных соединений сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Для анализа полифенольных соединений сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS).

Анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» (Agilent Technologies, США). 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. Сухие 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 сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного и масс-спектры для идентифицированных соединений в режиме отрицательной ионизации перечислены в таблице 25. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 27-29.

Таблица 25 - Идентификация и содержание фенольных соединений в сухих экстрактах тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Номер пика	Время удерживания (мин)	M-H ⁻ (m/z)	Идентифицированные компоненты	Содержание (мг/г на массу экстракта)		
				Сухой экстракт тимьяна частолистого	Сухой экстракт тимьяна бритого	Сухой экстракт тимьяна пустынного
1	3.928	179	Кофейная кислота	-	0.11	0.34
2	4.932	169	Галловая кислота	3.41	4.97	4.96
3	12.485	353	Хлорогеновая кислота	0.82	0.46	0.19
4	13.089	289	Катехин	1.27	1.20	1.16
5	13.945	289	Эпикатехин	9.98	9.30	9.28
6	14.112	609	Рутин	3.43	2.96	2.31
7	14.600	447	Цинарозид	109.00	79.06	92.00
8	16.299	193	Феруловая кислота	0.04	1.80	2.06
9	16.986	359	Розмариновая кислота	30.98	30.16	26.59
10	17.448	317	Мирицетин	6.15	-	4.12
11	22.303	301	Кверцетин	-	-	0.91
12	25.267	271	Нарингенин	24.84	7.30	9.44
13	27.350	269	Апигенин	-	0.53	1.03
14	28.350	285	Лютеолин	0.10	0.60	0.15
15	28.806	285	Кемпферол	0.60	-	-

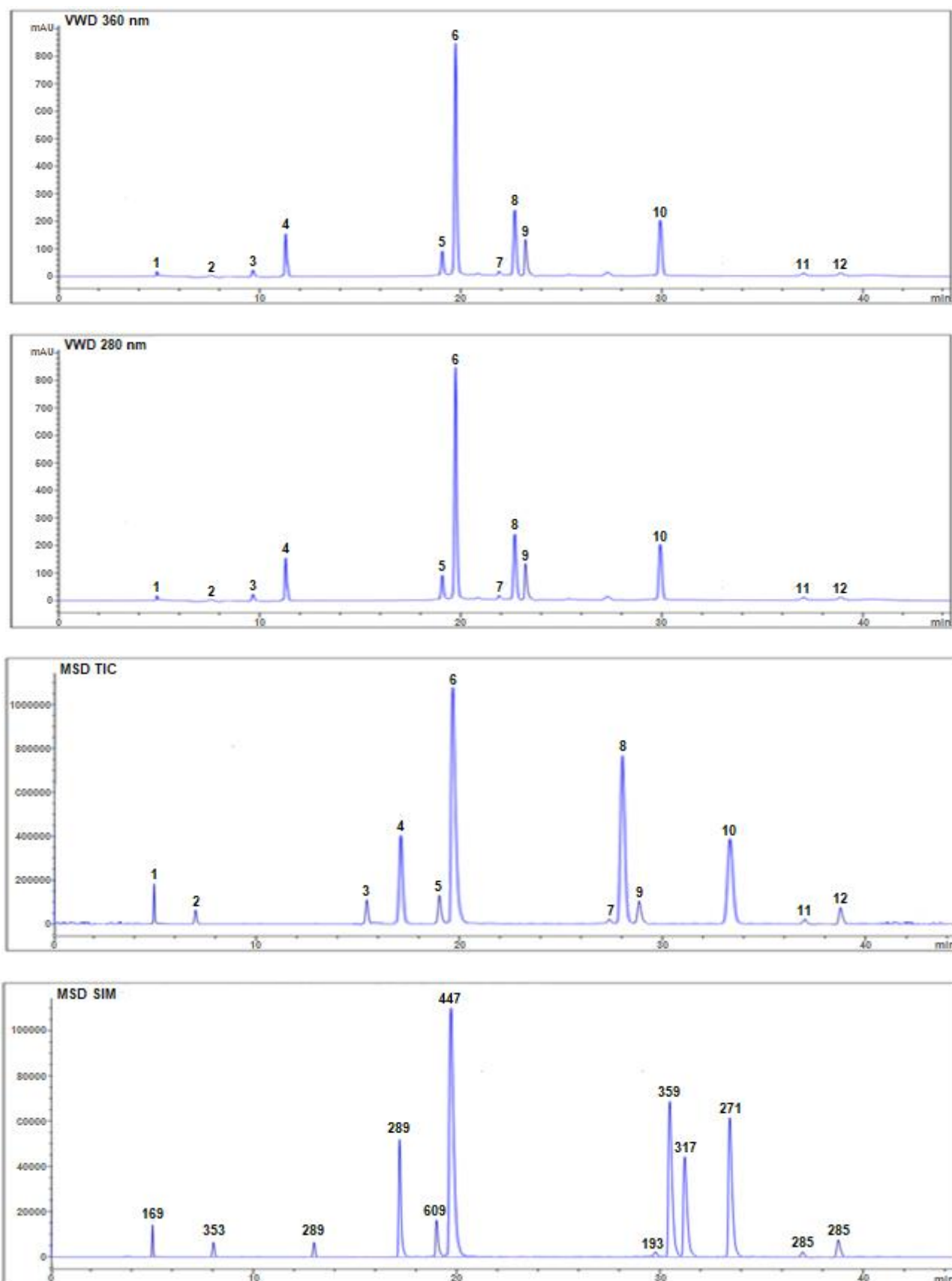


Рисунок 27 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС: суммарная ионная хроматограмма (TIC) и идентифицированных фенольных соединений (SIM) сухого экстракта тимьяна частолистого

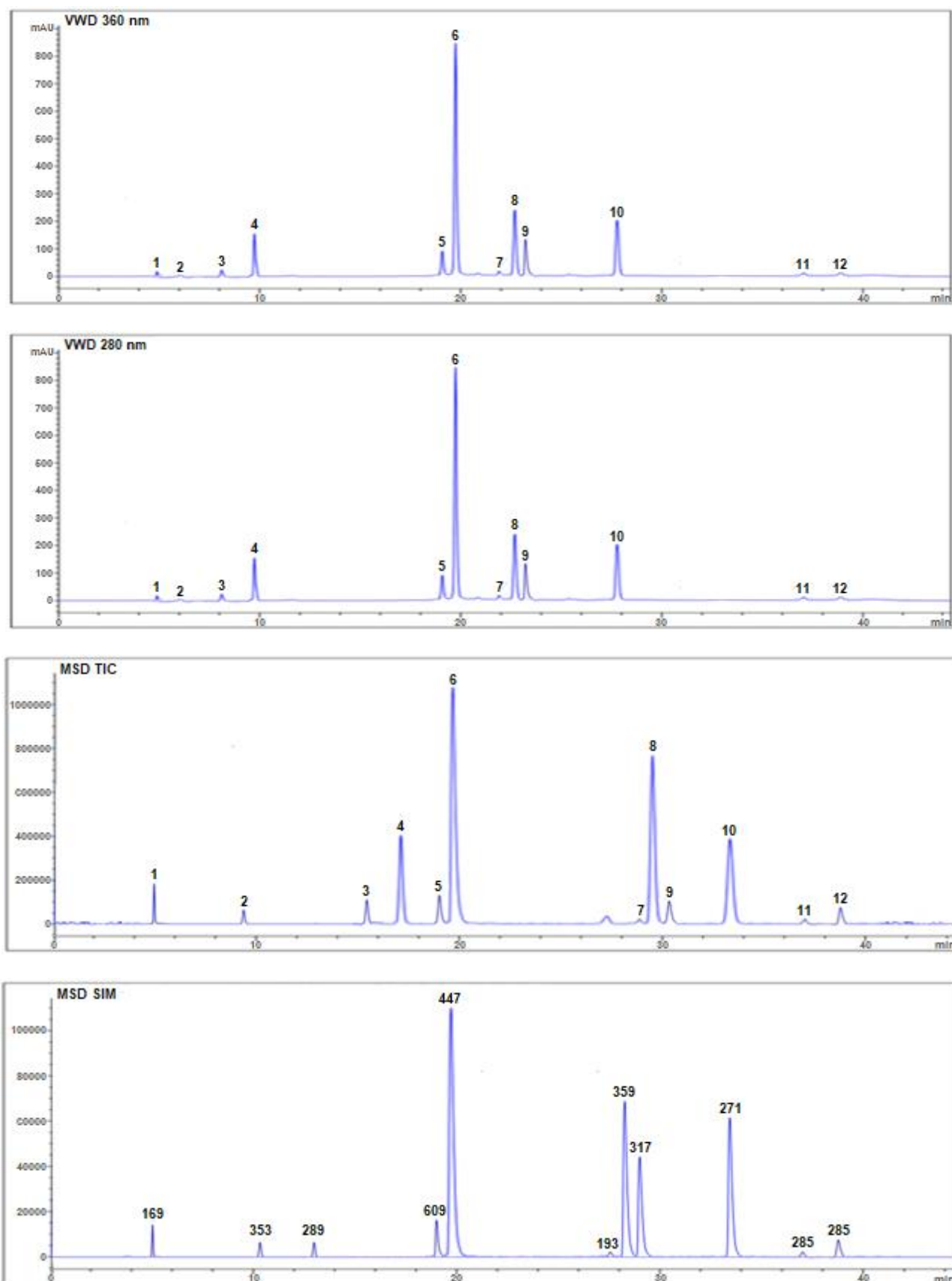


Рисунок 28 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС: суммарная ионная хроматограмма (TIC) и идентифицированных фенольных соединений (SIM) сухого экстракта тимьяна бритого

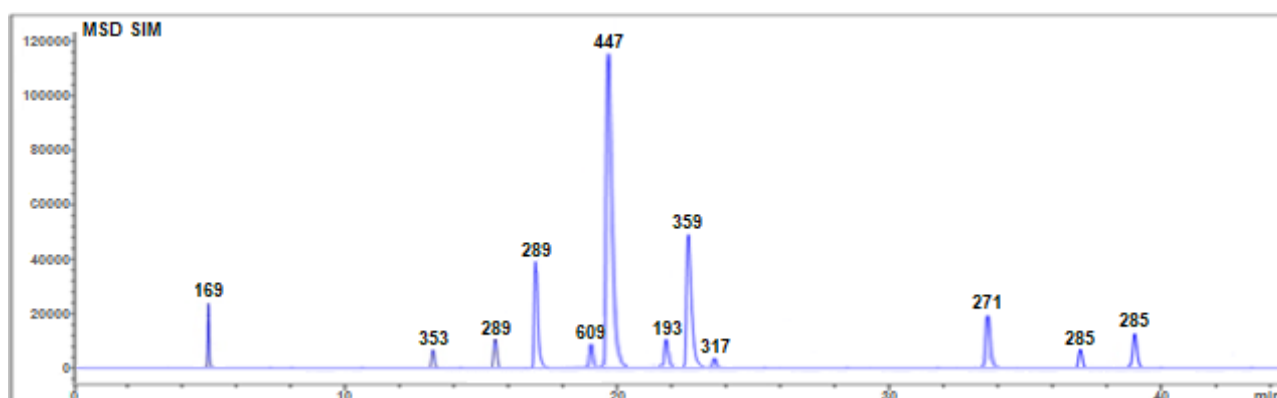
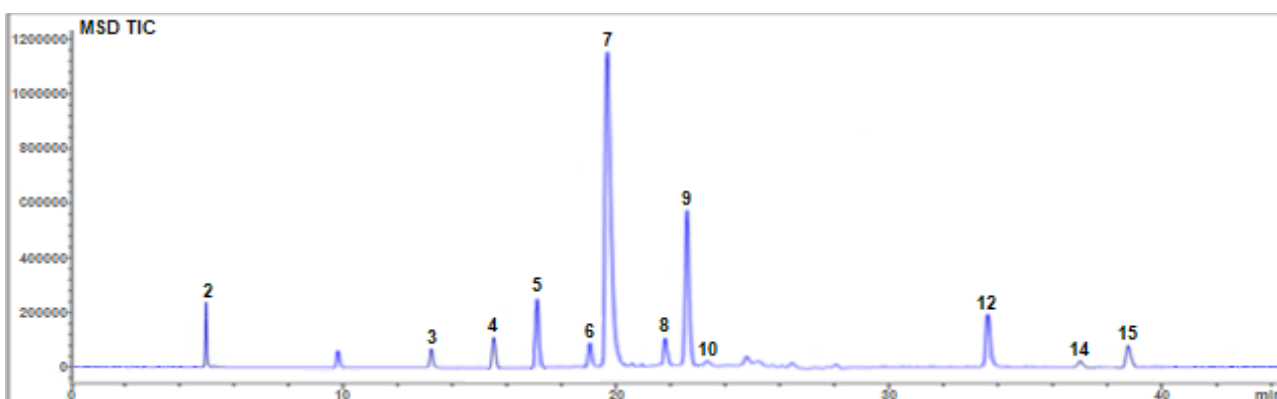
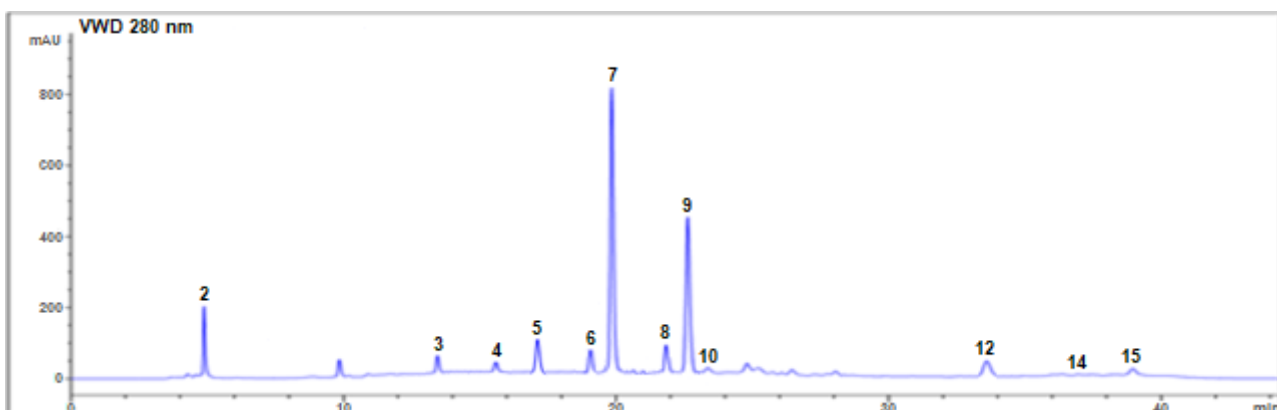
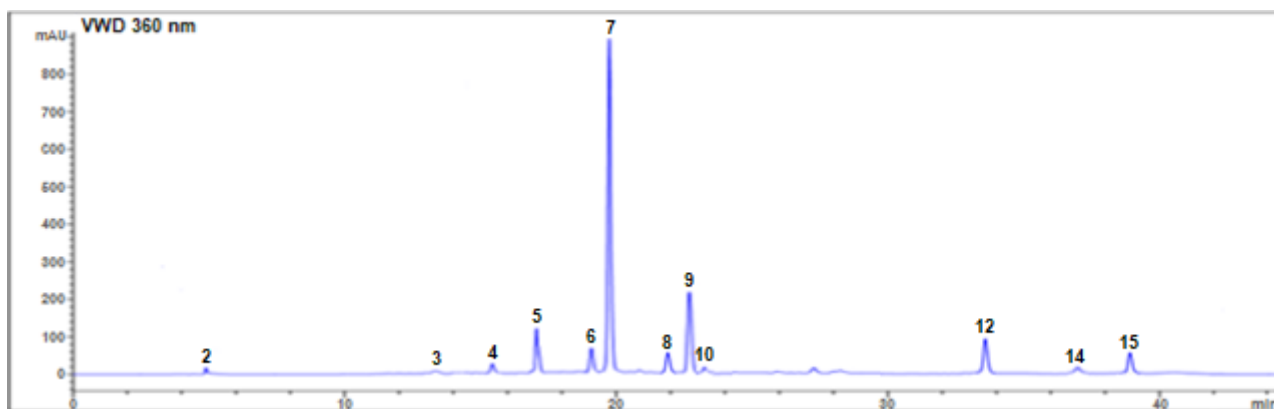


Рисунок 29 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС: суммарная ионная хроматограмма (TIC) и идентифицированных фенольных соединений (SIM) сухого экстракта тимьяна пустынного

В сухом экстракте тимьяна частолистого идентифицировано и количественно определено 12 фенольных соединений. Флавоноиды, идентифицированные в исследуемом экстракте, принадлежат к группам флаванолы (катехин, эпикатехин), флавоны (цинарозид, лютеолин), флавонолы (рутин, мирицетин, кемпферол), флаванон (нарингенин). Доминирующими фенольными соединениями являются цинарозид (109,00 мг/г), розмариновая кислота (30,98 мг/г), нарингенин (24,84 мг/г), эпикатехин (9,98 мг/г), мирицетин (6,15 мг/г) и галловая кислота (3,41 мг/г).

В сухом экстракте тимьяна бритого идентифицировано и количественно определено 12 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, семь - флавоноиды. Доминирующими полифенольными соединениями являются цинарозид (79,06 мг/г), розмариновая кислота (30,16 мг/г), эпикатехин (9,30 мг/г), нарингенин (7,30 мг/г) и галловая кислота (4,97 мг/г).

В сухом экстракте тимьяна пустынного идентифицировано и количественно определено 14 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, девять - флавоноиды. Основными компонентами являются цинарозид (92,00 мг/г), розмариновая кислота (26,59 мг/г), нарингенин (9,44 мг/г), эпикатехин (9,28 мг/г), галловая кислота (4,96 мг/г) и мирицетин (4,12 мг/г).

Впервые исследован химический состав фенольных соединений сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено от 12 до 14 фенольных соединений. У полученных экстрактов обнаружены сходство и различия по качественному составу фенольных соединений, также 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.

4.3 Технология получения сухого экстракта из тимьяна частолистого

Впервые разработана технология получения и организован выпуск опытных партий сухого экстракта тимьяна частолистого.

Технология состоит из двух этапов:

Этап 1 - получение густого экстракта. Воздушно-сухое сырье тимьяна частолистого (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 частолистого фильтруют через бумажный фильтр. В ротормном испарителе проводится упаривание экстрагента при температуре 50°C, получают густой экстракт тимьяна частолистого.

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

На рисунке 30 представлена аппаратная схема получения сухого экстракта тимьяна частолистого.

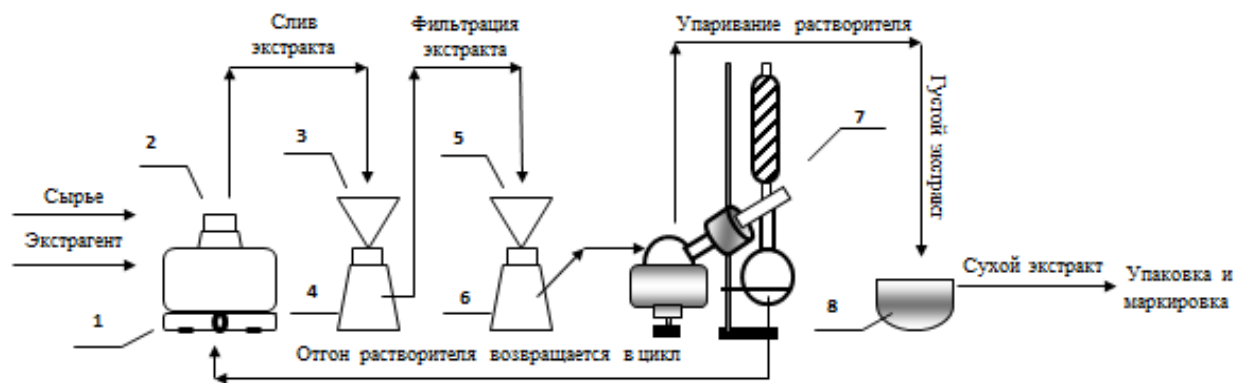


Рисунок 30 - Аппаратурная схема получения сухого экстракта тимьяна частолистого

Таким образом, разработана, апробирована и внедрена технология получения сухого экстракта тимьяна частолистого с применением ультразвука.

4.4 Стандартизация субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

В соответствии с требованиями ГФ РК, Ф ЕАЭС и Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ-20 от 16 февраля 2021 года «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств» были определены критерии качества и допустимые нормы показателей сухого экстракта тимьяна частолистого: описание, идентификация, тяжелые металлы, потеря массы при высушивании, микробиологическая чистота, количественное определение, упаковка, маркировка, транспортирование, условия хранения, срок хранения, а также основное фармакологическое действие (таблица 31).

Для контроля качества, разработан проект НД на субстанцию «Тимьяна частолистого экстракт сухой» и проведена стандартизация 5 серий опытной партии.

В соответствии с требованиями Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств» исследования стабильности субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого проведено методом долгосрочного испытания.

Таблица 26 - Спецификация качества субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Масса темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	Визуально
Растворимость	Легко растворим в 70% этаноле <i>P</i> , диметилсульфоксиде <i>P</i> . Частично растворим в 96% этаноле <i>P</i> , воде очищенной <i>P</i> . Практически не растворим в воде хлороформе <i>P</i> , этилацетате <i>P</i> .	ГФ РК, Т. 1, 1.4
Идентификация: - флавоноиды - цинарозид	К 20 мг субстанции, растворенной в 2 мл 70% спирта этилового, прибавляют 5-7 капель кислоты хлороводородной конц., 0,01 г металлического магния или цинка, подогревают на водяной бане, появляется оранжевое окрашивание (флавоноиды). На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.	Качественная реакция ТСХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.27
Потеря в массе при высушивании	Не более 5,0 %	Ф ЕАЭС 2.1.8.16 ГФ РК, Т. 1, 2.5.12
Тяжелые металлы	Не более 0,01 %	Ф ЕАЭС 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Не более 0.5 %	ГХ, ГФ РК, Т. 1, 2.2.28
Микробиологическая чистота	- Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов: не более 10^5 бактерий и не более 10^2 грибов в грамме или миллилитре. - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> (1 г или 1 мл) (2.6.13).	Ф ЕАЭС 2.3.1.4 ГФ РК, Т. 1, 5.1.4 Категория 3; 2.6.12 и 2.6.13
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид	Не менее 9,0 %.	УФ-спектрофотометрия; ГФ РК, т. 1, 2.2.29

Продолжение таблицы 26

1	2	3
Упаковка	По 1 г в стеклянные флаконы из темного стекла (ГФ РК, т.1, 3.2.1).	ГФ РК т.1, 3.2.1 ГФ РК т.1, 3.2.2
Маркировка	На этикетке флакона соответствующего СТ РК 226-200 на казахском и русском языках указывают страну производителя, форму товара, адрес, массу, условия хранения, дату изготовления и срок хранения.	В соответствии с НД РК
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е.	В соответствии с НД РК
Хранение	В защищенном от света месте, температурный режим не выше 25 ⁰ С	В соответствии с НД РК
Срок хранения	2 года	В соответствии с НД РК
Фармакологическое действие	Антимикробное	В соответствии с НД РК

При исследовании стабильности методом долгосрочного испытания растительного сырья (2 года) при температуре (25±5)°С и относительной влажности (60±5)% качественные и количественные показатели, микробиологическая чистота находились в установленных пределах. Существенных изменений определяемых показателей качества не наблюдалось. Результаты испытания стабильности сухого экстракта тимьяна частолистого представлены в таблицах 27-29. Периодичность контроля серии составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 мес., для показателя качества микробиологическая чистота – 24 мес. Значительных изменений контролируемых параметров качества не наблюдалось. На хранение были заложены 3 серии опытных образцов субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого.

На основании полученных результатов установлен срок хранения субстанции тимьяна частолистого экстракт сухой 2 года (таблица 26).

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

Таблица 27 - Изучение стабильности субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой», серия 1

Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластмассовыми крышками Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 01.2020 г Серия: 01 010917											
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, 2.8.8.	Густая масса темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	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 На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	
- цинарозид											
Количественное определение:		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не менее 9.0 %	9,46	9,45	9,44	9,41	9,35	9,31	9,26	
суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид											
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.8.16 ГФ РК, т.1, 2.8.17	не более 25.0 %	4,1	4,2	4,1	3,6	3,4	3,3	3,1	
Тяжелые металлы		ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А	не более 0.01%	0,004 %	0,004 %	0,003 %	0,003 %	0,002 %	0,003 %	0,002 %	
Микробиологическая чистота	ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК, т.1, 5.1.4. ГФ РК, т.1, 2.6.12 ГФ РК, т.1, 2.6.13	Общее число аэробных бактерий – не более 10 ⁵ , общее число грибов – не более 10 ² . Отсутствие <i>Escherichia Coli</i> , в 1 г.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.		

Таблица 28 - Изучение стабильности субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой», серия 2

Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластмассовыми крышками Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 01.2020 г Серия: 02 020917											
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, 2.8.8.	Густая масса темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	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 На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	
- цинарозид											
Количественное определение:		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не менее 9.0 %	9,36	9,41	9,44	9,42	9,38	9,35	9,28	
суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид											
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.8.16 ГФ РК, т.1, 2.8.17	не более 25.0 %	4,1	4,0	4,0	3,8	3,6	3,3	3,2	
Тяжелые металлы		ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А	не более 0.01%	0,005 %	0,004 %	0,003 %	0,003 %	0,004 %	0,003 %	0,004 %	
Микробиологическая чистота	ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК, т.1, 5.1.4. ГФ РК, т.1, 2.6.12 ГФ РК, т.1, 2.6.13	Общее число аэробных бактерий – не более 10 ⁵ , общее число грибов – не более 10 ² . Отсутствие <i>Escherichia Coli</i> , в 1 г.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.		

Таблица 29 - Изучение стабильности субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой», серия 3

Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластмассовыми крышками Дата начала испытания: 07.2017 г Дата окончания испытания: 01.2020 г Серия: 03 030917										
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, 2.8.8.	Густая масса темно-зеленого цвета со специфическим запахом.	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 На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаружиться пятно желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
- цинарозид										
Количественное определение:		ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2	не менее 9.0 %	9,48	9,47	9,45	9,42	9,38	9,37	9,29
суммы флавоноидов, в пересчете цинарозид		ЕАЭС Ф 2.1.8.16 ГФ РК, т.1, 2.8.17	не более 25.0 %	4,6	4,4	4,5	3,7	3,8	3,4	3,2
Потеря в массе при высушивании		ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А	не более 0.01%	0,005 %	0,003 %	0,004 %	0,003 %	0,003 %	0,003 %	0,002 %
Тяжелые металлы		ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК, т.1, 5.1.4. ГФ РК, т.1, 2.6.12 ГФ РК, т.1, 2.6.13	Общее число аэробных бактерий – не более 10 ⁵ , общее число грибов – не более 10 ² . Отсутствие <i>Escherichia Coli</i> , в 1 г.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
Микробиологическая чистота										

4.5 Разработка лабораторного регламента на получение субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

На основе полученных результатов разработан и утвержден лабораторный регламент на получение сухого экстракта тимьяна частолистого (Приложение Д).

Наименование продукта: Сухой экстракт тимьяна частолистого.

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. Густая масса 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 сухого экстракта тимьяна частолистого проводят методом УФ-спектрофотометрии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.29).

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. 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.

Срок годности. 2 года.

Химические превращения при получении сухого экстракта тимьяна частолистого отсутствуют, поэтому химическая схема производства не приводится.

Исходным сырьем для получения субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого является воздушно-сухое растительное сырье тимьяна частолистого. Технологическая схема получения сухого экстракта тимьяна частолистого представлена на рисунке 31.

Аппаратурная схема получения сухого экстракта тимьяна частолистого приведена на рисунке 30.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР 1. Подготовка материалов

ВР 1.1 Сушка травы тимьяна частолистого

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

ВР 1.2 Измельчение сырья тимьяна частолистого

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

ВР 1.3 Просевка сырья тимьяна частолистого

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

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

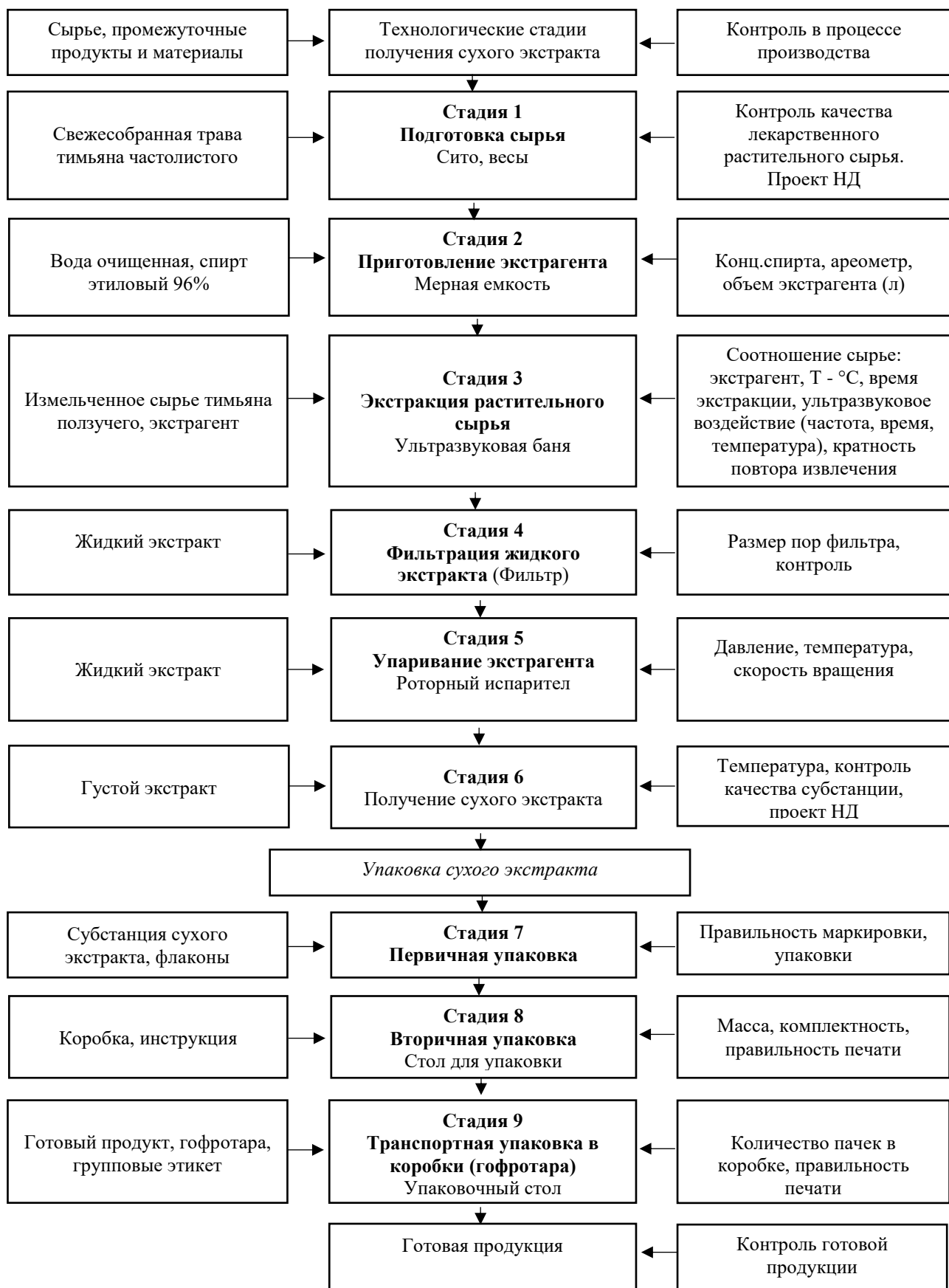


Рисунок 31 - Технологическая схема получения субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна частолистого передается на ВР 1.4.

ВР 1.4 Определение массы сырья

Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна частолистого взвешивают на весах электронных АУ120 по 80,0 г. Сухое измельченное просеянное сырье тимьяна частолистого определенной массы передается на ТП 1.1.

ВР 1.5 Приготовление экстрагента

В две бутылки объемом по 1 литру приливают по 897,56 г 96 %-ного этанола и 480 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

80,0 г травы тимьяна частолистого загружают в емкость и заливают экстрагент – смесь спирт этиловый:вода (7:3) в количестве 1377,56 г, соотношение массы сырья и массы растворителя 1:20.

ТП 1.2 Экстракция сырья

Экстракцию сырья тимьяна частолистого 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 частолистого 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 сухого экстракта тимьяна частолистого составляет 5,76 %, в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Количественное определение. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ РК I, Т. 1, 2.2.28).

Полученный сухой экстракт тимьяна частолистого передают на ТП 2.2.

ТП 2.2 Взвешивание сухого экстракта

Полученный сухой экстракт тимьяна частолистого взвешивают по 1,0 г.

Таблица 30 - 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. Объём 2,8 л. Диапазон контролируемых температур от 30 до 80 ⁰ С. 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	LABTEX ИР-1 ЛТ. Россия. Объём испарительной колбы 1000 мл. Диапазон скорости вращения 20 - 280 об/минуту. Диапазон контролируемых температур от 25 до 180 ⁰ С. 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

Таблица 31 - Параметры режима и безопасности процесса получения сухого экстракта тимьяна частолистого

Наименование стадии, операции	Наименование и позиция аппарата	Наименование элемента операции (работы)	Параметры технологического процесса					
			Наименование, единицы	Значение				
				Технологическая норма		Предельно безопасное	Предельно допустимое	Критичес- кое
				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	-	-

Таблица 32 - Материальный баланс получения сухого экстракта тимьяна частолистого

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 частолистого		Воздушно-сухое сырье тимьяна частолистого	130,78
Сырье тимьяна частолистого	392,34	Потери влаги	261,56
Итого	392,34	Итого	392,34
ВР 1.2 Измельчение травы тимьяна частолистого		Измельченное воздушно-сухое сырье тимьяна частолистого	87,18
Воздушно-сухое сырье тимьяна частолистого	130,78	Потери	43,60
Итого	130,78	Итого	130,78
ВР 1.3 Просевка сырья		Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна частолистого	81,12
Измельченное воздушно-сухое сырье тимьяна частолистого	87,18	Потери	6,06
Итого	87,18	Итого	87,18
ВР 1.4 Определение массы сырья		Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна частолистого определенной массы	81,12
Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна частолистого	81,12	Потери	1,12
Итого	81,12		80,00

Продолжение таблицы 32

1	2	3	4
ВР 1.5 Приготовление экстрагента Этиловый спирт Вода очищенная	1795,12 960,00	Смесь этанол–вода (7:3)	2755,12
Итого	2755,12	Итого	2755,12
ТП 1. Получение жидкого экстракта			
ТП 1.1 Загрузка сырья и экстрагента Измельченное воздушно-сухое просеянное сырье тимьяна частолистого определенной массы Экстрагент	80,00 2755,12	Растительное сырье тимьяна ползучего и экстрагент в емкости для экстрагирования	2835,12
Итого	2835,12	Итого	2835,12
ТП 1.2 Экстракция сырья Растительное сырье тимьяна частолистого и экстрагент в емкости для экстрагирования	2835,12	Объединенный жидкий экстракт, Шрот Потери экстрагента	2503,88 68,0 263,24
Итого	2835,12	Итого	2835,12
ТП 1.3 Фильтрация жидкого экстракта Объединенный жидкий экстракт	2503,88	Фильтрат жидкого экстракта Отходы фильтрации	2491,88 12,00
Итого	2503,88	Итого	2503,88
ТП 1.4 Упаривание экстрагента Жидкий экстракт	2491,88	Густой экстракт Отгон экстрагента Потери экстрагента	14,26 2217,36 260,26
Итого	2491,88	Итого	2491,88

Продолжение таблицы 32

1	2	3	4
ТП 2. Получение сухого экстракта			
ТП 2.1 Упаривание остаточного растворителя Густой экстракт	14,26	Сухой экстракт тимьяна частолистого Потери влаги	4,61 9,65
Итого	14,26	Итого	14,26
ТП 2.2 Взвешивание сухого экстракта Сухой экстракт тимьяна частолистого	4,61	Сухой экстракт тимьяна частолистого Потери	4,51 0,10
Итого	4,61	Итого	4,61

Таблица 33 - Перечень важнейших контрольных точек производства сухого экстракта тимьяна частолистого

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 частолистого	Сырье тимьяна частолистого	Количественное суммы флавоноидов	Не менее 2,0 %	УФ-спектрофотометр	ЛКП НИЦ МУК
ВР 1.4 Определение массы сырья	Сырье тимьяна частолистого	Масса	80,0 г	Весовой (весы электронные)	Инженер в производственном журнале
ВР 1.5 Приготовление экстрагента	Этиловый спирт Вода очищенная	Масса	897,56 г 480,00 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. Надписи на упаковочном листе соответствуют ГОСТ 17768-90Е. Маркировка тары транспортной по ГОСТу 14192-96. Затем упаковки с сухим экстрактом тимьяна частолистого передают на склад.

Таким образом, разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого (ЛР-005491-МК-05-21).

Технология получения субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого апробирована и внедрена на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК», организован выпуск опытных партий (Приложение Е).

Выводы по главе 4

1. Впервые проведена двукратная экстракция воздушно-сухого сырья ультразвуком, измельченного до размера 2-3 мм, 70% этанолом при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, в течение 30 минут обеспечивает сравнительно высокий выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна частолистого - 5,76%, выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна бритого немного ниже - 5,40%, самый низкий выход суммы экстрактивных веществ из тимьяна пустынного - 3,20%.

2. Впервые исследован химический состав фенольных соединений сухих экстрактов тимьяна частолистого, т. бритого и т. пустынного методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено от 12 до 14 фенольных соединений. У полученных сухих экстрактов обнаружены сходство и различия по качественному составу фенольных соединений, также 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. Разработана, апробирована и внедрена технология получения сухого экстракта тимьяна частолистого с применением ультразвука.

4. Разработана спецификация качества и проведена стандартизация субстанции тимьяна частолистого экстракт сухой, разработан проект НД.

Установлен срок хранения субстанции тимьяна частолистого экстракт сухой 2 года.

5. Разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого (ЛР-005491-МК-05-21).

6. Технология получения субстанции сухого экстракта тимьяна частолистого апробирована и внедрена на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК», организован выпуск опытных партий (Приложение Е).

5 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ ТИМЬЯНА ЧАСТОЛИСТОГО, Т. БРИТОГО И Т. ПУСТЫННИКА

5.1 Изучение антимикробной активности экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Результаты изучения антимикробной и противогрибковой активности сухих экстрактов и эфирных масел растительного сырья тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного представлены в таблицах 34-37.

Таблица 34 - Антимикробная активность сухого экстракта тимьяна частолистого методом микроразведений

Микроорганизмы	МИК (мг/мл)	МБК (мг/мл)	МБК / МИК отношение
Грамм-положительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	1.25	2.5	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	0.625	1.25	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	0.313	0.313	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	1.25	2.5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.625	1.25	2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	1.25	1.25	1
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	10	2
Грамм-отрицательные бактерии			
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	5	1
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	5	5	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	1.25	1.25	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	2.5	2.5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	5	1
Грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	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	2.5	10	4

Таблица 35 - Антимикробная активность сухого экстракта тимьяна бритого методом микроразведений

Микроорганизмы	МИК (мг/мл)	МБК (мг/мл)	МБК / МИК отношение
1	2	3	4
Грамм-положительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2.5	2.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	5	5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	2.5	2.5	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	2.5	5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	10	10	1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	2.5	2.5	1

<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	10	2
Грамм-отрицательные бактерии			
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	10	2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	10	10	1
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	1.25	1.25	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	10	2
Грибы			
<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	10	10	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10	2

Таблица 36 - Антимикробная активность сухого экстракта тимьяна пустынного методом микроразведений

Микроорганизмы	МИК (мг/мл)	МБК (мг/мл)	МБК / МИК отношение
Грамм-положительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2.5	5	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	5	5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1.25	5	4
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	2.5	5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	5	10	2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	5	10	2
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	20	20	1
Грамм-отрицательные бактерии			
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	10	2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	5	10	2
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	1.25	1.25	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	10	2
Грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC102231	5	10	2
<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

Таблица 37 - Антимикробная активность против *Helicobacter pylori* сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Образец	МИК (мг/мл)	МБК (мг/мл)	МБК / МИК отношение
Сухой экстракт тимьяна частолистого	0,0313	0,250	8
Сухой экстракт тимьяна бритого	0,0195	0,250	13
Сухой экстракт тимьяна пустынного	1,25	1,25	1

Таким образом, в результате проведенного биоскрининга впервые установлено, что сухой экстракт тимьяна частолистого, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 6 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), вызывает задержку роста 2 штаммов грибов *Candida albicans*, *Candida krusi*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

Сухой экстракт тимьяна бритого, обладает выраженной антимикробной активностью в отношении 3 штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

Сухой экстракт тимьяна пустынного, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культур 4 штаммов грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

5.2 Изучение отхаркивающей активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Результаты изучения отхаркивающей активности сухих экстрактов частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного представлены в таблице 38.

Экспериментально установлено, что сухой экстракт бритого и эфирное масла тимьяна пустынного обладают отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С.

Таблица 38 - Результаты изучения отхаркивающей активности сухих экстрактов частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Образец	Увеличение двигательной активности, %	Коэффициент ускорения (КУ)
Сухой экстракт тимьяна частолистого	33,1	0,72
Сухой экстракт тимьяна бритого	41,25	0,64
Сухой экстракт тимьяна пустынного	6,8	0,92
Контроль Бронхикум С	52,5	0,66

Таким образом, сухой экстракт тимьяна бритого и эфирное масло тимьяна пустынного являются перспективными субстанциями для разработки отечественных лекарственных средств отхаркивающего действия.

5.3 Изучение мутагенной активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

В таблице 39 представлены результаты изучения мутагенной активности сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного.

Таблица 39 - Мутагенная активность сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного

Влияние на рост штамма количество КОЕ на чашку	Наименование							
	Salmonella typhimurium TA 100				Salmonella typhimurium 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
ЭТЧ Этанольный экстракт тимьяна частолистого	7±1	6±1	8±1	15±1	6±1	7±1	5±1	15±1
ЭТБ Этанольный экстракт тимьяна бритого	7±1	5±1	9±1	13±1	7±1		9±1	16±1
ЭТП Этанольный экстракт тимьяна пустынного	7±1	6±1	7±1	14±1	4±1		6±1	14±1

Учет генных мутаций (тест Эймса) считали полуколичественным методом, и мутагенную активность засчитывали по кратности превышения

числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования.

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

Установлено, что сухих экстрактов тимьяна частолистного, тимьяна бритого и тимьяна пустынного не вызывали статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертантов, воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки. Исходя из полученных результатов не выявлено мутагенного эффекта.

5.4 Определение острой токсичности сухого экстракта тимьяна частолистного

Исследование острой токсичности образцов проводили по методике, представленной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [150].

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 внутрижелудочно (с помощью зонда). Парентеральное - внутривенно. Каждая группа состояла из 5 животных, всего исследовано 70 мышей и 45 крыс.

Сухой экстракт тимьяна частолистного 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 сухого экстракта тимьяна частолистного 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг).

Острая токсичность УЭТП при энтеральном введении мышам

После внутрижелудочного введения сухого экстракта тимьяна частолистного 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 мышей 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 сухого экстракта тимьяна ползучего 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Расположение органов брюшной и грудной полости мышей не нарушено и анатомически правильно.

Таким образом, изучение острой токсичности сухого экстракта тимьяна частолистного 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 сухого экстракта тимьяна частолистного 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Острая токсичность УЭТП при энтеральном введении крысам

После внутрижелудочного введения сухого экстракта тимьяна частолистного 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 сухого экстракта тимьяна частолистного 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Острая токсичность УЭТП при парентеральном введении крысам

После внутрибрюшинного введения сухого экстракта тимьяна частолистного 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 сухого экстракта тимьяна частолистного 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

Таким образом, на основании полученных данных в соответствии с приказом от 4 февраля 2021 года № КР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик» сухой экстракт тимьяна частолистного отнесен по классификации к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности). LD₅₀ в опытах не была установлена, так как введение максимально технически достижимой концентрации сухого экстракта тимьяна частолистного 5 г в 5 мл ДМСО (16,7 г/кг), гибели животных не вызывало.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. Впервые проведено фармакогностическое изучение тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Клок.), тимьяна бритого (*Th. rasitatus* Клок.) и тимьяна пустынного (*Th. eremita* Клок.). По результатам комплексного изучения содержания различных классов биологически активных веществ установлено, что трава тимьяна частолистого, трава тимьяна бритого и трава тимьяна пустынного содержат значительное количество 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, определяют перспективность их использования в фармации и медицине. На основе фармакогностического исследования и результатов товароведческого анализа тимьяна частолистого разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава».

2. Разработан способ и технология получения суммы экстрактивных веществ тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного с применением ультразвука. Нароботаны сухие экстракты для изучения химического состава и биологических свойств.

3. Впервые проведено изучение флавоноидов и фенольных кислот сухих экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного с применением ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. В сухом экстракте тимьяна частолистого идентифицировано и количественно определено 12 фенольных соединений, четыре из них фенольные кислоты, восемь – флавоноиды, в ультразвуковом экстракте тимьяна бритого установлено 12 фенольных соединений, пять из них фенольные кислоты, семь – флавоноиды, в сухом экстракте тимьяна пустынного определено 14 фенольных соединений, пять из них фенольные кислоты, девять - флавоноиды. У полученных экстрактов обнаружены отличия, как по качественному составу фенольных соединений, так и по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов.

4. В результате проведенного биоскрининга впервые установлено, что сухой экстракт тимьяна частолистого, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 6 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), вызывает задержку роста 2 штаммов грибов *Candida albicans*, *Candida krusi*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*. Сухой экстракт тимьяна бритого, обладает выраженной антимикробной активностью в отношении 3 штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Streptococcus pneumoniae*, вызывает задержку роста культур *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*), 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*, и обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*. Сухой экстракт тимьяна пустынного, проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 1 штамма грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*), вызывает задержку роста культур 4 штаммов грамположительных бактерий (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), но обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

5. С учетом выхода экстракта и биологических свойств, в качестве субстанции перспективной для разработки отечественных лекарственных средств широкого спектра антимикробного действия, в том числе *Helicobacter pylori*, рекомендуется сухой экстракт тимьяна частолистого; по результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, установлено, что субстанция «Тимьяна частолистого экстракт сухой» относится к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности).

6. Разработан проект НД и проведена стандартизация субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой». Разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой» (ЛР-005491-МК-05-21). На базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК» организован выпуск опытных партий субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой» для фармакологического исследования.

Оценка полноты решения поставленных задач. Поставленные задачи по фармакогностическому изучению тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.), тимьяна бритого (*Th. rasitatus* Klok.) и тимьяна пустынного (*Th. eremita* Klok.); разработке способа и технологии получения суммы экстрактивных веществ тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного с применением ультразвука; проведению комплексного изучения различных классов биологически активных веществ ультразвуковых экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного; изучению биологических свойств экстрактов тимьяна частолистого, тимьяна бритого и тимьяна пустынного, производству отбора образцов обладающих выраженным биологическим действием для разработки эффективных отечественных лекарственных средств; разработке нормативных документов, в виде проектов НД на лекарственное растительное сырье и субстанцию «Тимьяна частолистого экстракт сухой», лабораторного регламента на получение субстанции, выполнены полностью.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов. По результатам сравнительного фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья тимьяна частолистого, 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 частолистый трава». Разработан новый способ и технология получения сухого 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 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. Сухие 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 экстракта тимьяна ползучего 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. Полученные результаты имеют высокую технико-экономическую эффективность, поскольку, разработана технология получения субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой», которая характеризуется значительным сокращением продолжительности процесса, проведением экстракции при комнатной температуре и возможностью применения для экстрагирования нетоксичных растворителей. Разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян частолистый трава», нормативные документы на субстанцию «Тимьяна частолистого экстракт сухой», в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. По материалам диссертации получен 1 патент РК, опубликованы 4 статьи в журналах, рекомендованных КОКСОН, 1 статья в зарубежном научном издании, входящем в базы данных Scopus Q3, и тезисы 9 докладов, из них тезисы 7 докладов в материалах международных конференций.

В целом, научно-методический уровень представленной диссертационной работы соответствует современным аналогам, опубликованным в открытой научной печати.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Единство народа и системные реформы - прочная основа процветания страны: Послание Главы государства народу Казахстана от 1 сентября 2021 года // САПП Республики Казахстан. - 2021. - № 42-43. – 254 с.
- 2 Об утверждении национального проекта «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация»: постановление Правительства Республики Казахстан от 12 октября 2021 года № 725 // САПП Республики Казахстан. - 2021. - № 48-49. – 301 с.
- 3 Об утверждении Комплексного плана по развитию фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы: Распоряжение Премьер-Министра Республики Казахстан от 6 октября 2020. - № 132 -р. [Электронный ресурс] URL: <https://adilet.zan.kz> (дата обращения 21.08.2022)
- 4 Постановление Правительства РК от 31 декабря 2019 года №1050 «Об утверждении Государственной программы индустриально-инновационного развития РК на 2020-2025 годы». baiterek.gov.kz
- 5 Sam S. Importance and effectiveness of herbal medicines // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2019. - Vol.8, №2. - P.354-357
- 6 Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г., Нелина Н.В., Каржаубекова Ж.Ж. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. – Алматы, - 2014. – 200 с.
- 7 Флора Казахстана. Под редакцией Н.В.Павлова - Алма-Ата: Наука, 1961. - Т. VII. – С. 295-296.
- 8 Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г. Лекарственные растения Казахстана. - Алматы: Гылым, - 2012.- 239 с.
- 9 Флора СССР М.-Л., 1957 Т. XXII С. 123-240.
- 10 Флора Центрального Казахстана // Байтенов М.С. Алматы, 2001. Т.1. 280 с.
- 11 Ишмуратова М.Ю., Тлеукенова С.У. К изучению растений семейства губоцветных флоры центрального Казахстана // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.– 2010. – № 11. – С. 22-24.
- 12 Дорошкевич И.Н. Определение емкости рынка лекарственного растительного сырья // Сельское хозяйство - проблемы и перспективы: сб. науч. тр.: в 2 т. - Гродно: Гродн. гос. аграр. ун-т, 2010. - Т. 1: Зоотехния, экономика. - С. 372-379.
- 13 Есболатова Д.Е., Белгижан А.Б., Акылбек А.А., Капсалямова Э.Н. Анализ производства лекарственного растительного сырья в мире // Вестник Казахского Национального медицинского университета, Алматы, 2013. №5. С. 85-88.
- 14 Омарова Б.А., Сермухамедова О.В., Сакипова З.Б., Кесикова А.А., Евтушенко Е.Н., Датхаев У.М. Обзор казахстанского рынка лекарственных средств растительного происхождения // Фармация Казахстана. – 2015. - №6. – С. 7-12.
- 15 Эндемичные виды растений флоры Карагандинской области

(Центральный Казахстан) / М.Ю. Ишмуратова, С.У. Тлеукунова, А.Ш. Додонова и др. Караганда: Изд-во ТОО «Полиграфист», 2016. 109 с.

16 Березуцкий, М.А. Новые данные о распространении и химическом составе видов рода тимьян (*Thymus* L.) флоры Саратовской области // Сборник научных трудов. - 2009.- С. 13-14.

17 Байтенов М.С. Флора Казахстана. Родовой комплекс флоры. Т.2.280 с. Алматы, 2011 «ГЫЛЫМ».

18 Ишмуратова М.Ю., Тлеукунова С.У., Додонова А.Ш., Гаврилькова Е.А. Эндемичные виды растений флоры Карагандинской области (Центральный Казахстан) / Монография. - Караганда: Изд-во ТОО «Полиграфист», 2016. – с. 78-80.

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

20 Пупыкина, К.А. Изучение возможности использования пряно-ароматических и эфиромасличных растений для экопротективной помощи населению // Вестник Оренбургского гос. ун-та. Оренбург, 2009. С.499-502.

21 Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. – СПб: - Товарищество научных изданий: КМК - 2011. - Т.4 - 630с.

22 Paaver U. Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L., growing wild in Estonia // Nat. Prod. Rep. – 2008. – Vol.22. - №2. – P. 108-115.

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

24 H.L. Jia. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. And *Thymus proximus* Serg. // J. Food Sci. - 2010.-Vol. 75. - №1. - P.59-65.

25 Groendahl, E. A new cis-sabinen hydrate chemotype detection in large thyme (*Thymus pulegioides* L.), growing wild in Denmark // J. Essent. Oil. Res. – 2007. - Vol.20. - №1. - P. 40-42.

26 Baser K.H.C., Buchbauer G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. – Abingdon: Francis & Taylor Group, CRC Press. – 2010. - 991 p.

27 Карамова Н.С., Хабибрахманова В.Р., Хассан Г.О.О. Общее содержание фенольных соединений и суммы флавоноидов в гексановой фракции этанольного экстракта *Thymus Capitatus* L. // Материалы XI международного симпозиума. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. - Москва, 2022. - С.109.

28 Атажанова Г.А. Терпеноиды эфирных масел растений. - М.: ICSPF. - 2008. - 288 с.

29 Ebrahimi S.N., Nadian J., Mirjalili M.H. Essential oil composition and

antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages // *Food Chemistry*. - 2008. - Vol. 110. - P. 927-931.

30 Бузук А.Г., Юрченко Р.А., Винарский В.А., Бузук Г.Н. Сравнительный фармакогностический анализ травы чабреца // *Вестник фармации*. Минск, 2011. №3. С.19-24.

31 Березуцкий, М.А. Новые данные о распространении и химическом составе видов рода тимьян (*Thymus* L.) флоры Саратовской области / М.А. Березуцкий, Н.А. Дурнова, А.В. Власова / *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции* // *Сборник научных трудов – Пятигорск*. - 2009.- С. 13-14

32 Пупыкина, К.А. Изучение возможности использования пряно-ароматических и эфиромасличных растений для экопротективной помощи населению / К.А. Пупыкина, Н.В. Кудашкина // *Вестник Оренбургского гос. ун-та*.- 2009.- С.499 -502.

33 Химический состав и фармакологические свойства эфирного масла *Thymus serpyllum* L. s. I., выращиваемого в Центральном Сибирском ботаническом саду СО РАН / Г.И. Калинкина [и др.] // *Растит. ресурсы*. – 2004.- Т.30. - Вып. 3. - С.66-70.

34 Касумов Ф.Ю. Эфиромасличные виды рода *Thymus* L. флоры Кавказа и пути их рационального использования (вопросы ресурсоведения). Баку: Элм, 2011. 404 с.

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

36 Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. And *Thymus proximus* Serg. / H.L. Jia [et al.] // *J. Food Sci.* - 2010.-Vol. 75. - №1. - P.59-65.

37 Машенцева А.А., Казбекова А.Т., Сейтеббетов Т.С. Оптические методы исследования АОА полифенольных соединений и экстрактов на основе растительного сырья *in vitro* и *in vivo* // *Вестник КарГУ*. Караганда, 2009. № 1(53). С. 26- 34.

38 Атажанова Г.А. Изучение компонентного состава эфирных масел растений флоры Казахстана // *Матер. IV Всероссийской конф.: «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья»*. Барнаул, 2009. - С. 207-271.

39 Казбекова А.Т, Атажанова Г.А., Сейтеббетова А.Ж., Адекенов С.М. Антиоксидантная активность эфирных масел тимьяна, распространенного на территории Казахстана // *Матер. XIV междунар. науч. конференции*. - Краснодар, 2014. - С.44.

40 Варданян Л.Р., Айрапетян С.А., Варданян Р.Л., Аветисян А.Э. Антиоксидантное действие эфирного масла тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.). // *Химия растительного сырья*, 2013. № 3. С. 143-148.

41 Атажанова Г. А. Эфирные масла из растений рода *Thymus* L. флоры

Казахстана: химический состав и перспективы применения. // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2018. - 5(329). – С. 45-57.

42 Садырбеков Д.Т., Рязанцев О.Г., Кенесов Б.Н. К составу эфирных масел некоторых тимьянов-эндемиков // Материалы международной научной конференции «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане». - Алматы, 2011. - С. 11-114.

43 Утегенова Г.А., Паллистер К.Б., Войич Ю.М., Озек Г., Озек Т., Кирпотина Л.Н., Щепеткин И.А., Кушнарченко С.В. Антибактериальная активность эфирных масел некоторых видов *Artemisia* и *Thymus* в отношении метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*. // Вестник КАЗНУ Серия биологическая. Алматы, 2017. №2 (71). – С.116-124.

44 Atazhanova Gayane A. Isoprenoid compounds (polyprenols, mono- and sesquiterpenoids of essential oils) of plants of kazakhstan's flora. // Материалы XXIII конференции по изотерпеноидам. - Минск, 2018. - С. 63-65.

45 Казбекова А.Т., Атажанова Г.А., Сейтеметбетова А.Ж., Сейтеметбетов Т.С., Ниязова Р.Е., Адекенов С.М. Взаимосвязь между уровнем полифенолов и антиоксидантной активностью эфирных масел тимьяна, распространенного на территории Казахстана // Материалы докладов VIII международного симпозиума: «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». - Москва, 2012. – С. 75-78.

46 Казбекова А.Т., Тулешова Г.Т., Мукушева Г.К., Сейтеметбетова А.Ж., Адекенов С.М. Биологическая активность экстрактов некоторых растений Казахстана // Ежеквартальный научно-практический журнал «Астана медициналық журналы». – Астана, 2016. № 2 – С. 44-47.

47 Курчатова М.Н., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А. Исследование биологической активности Тимьяна Маршалла методом Мёллер-5 // Тверской медицинский журнал. - 2023. - №1. - С. 190-195.

48 Шереметьева А.С., Напшева А.М., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность *in vivo* водного и спиртового экстрактов *Thymus Marschallianus* Willd // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9, № 6. - С. 476-484.

49 Amarti F., Ajjour M. El, Ghanmi M., Farah A., Khia A., Rahouti M., Chaouch A. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc // Phytothérapie. - 2011. - Vol. 9. – P.149–157.

50 Boubaker–Elandalousi R., Mekni–Toujani M., Diouani M., Gharbi M., Akkari H., B'chir F., Ghram A. Non-cytotoxic *Thymus capitata* extracts prevent Bovine herpesvirus-1 infection in cell cultures // BMC Veterinary Research. - 2014. - Vol. 10. – P. 231.

51 Nikolić G., M.Stojanović N., J.Randjelović P., Manojlović Sn., S.Radulović N. An epidemiological study on herbal product self-medication practice among psychotic outpatients from Serbia: A cross-sectional study // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2018. - Vol. 26. – P. 335-341.

52 Roxo M., Zuzarte M., Gonçalves M.J., Alves-silva J.M., Cavaleiro C., Cruz M.T., Salgueiro L. Antifungal and anti-inflammatory potential of the endangered

- aromatic plant *Thymus albicans* // Scientific Reports. – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 1-12.
- 53 Ch. Lee, S. Lee, H. Lee Acaricidal Effects of *Thymus vulgaris* Leaf-derived Materials and Monoterpene Alcohols against *Dermatophagoides* spp. J. Korean Soc // Appl. Biol. Chem. – 2010. - Vol. 53(2). - P. 170-174.
- 54 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Изучение отхаркивающей активности растений рода Тимьян // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 5. - С. 78-80.
- 55 Губаненко Г.А., Маюрникова Л.А. Перспективы применения тимьяна ползучего в производстве продуктов питания // Ползуновский Вестник. – 2013. - № 4-4. – С. 183-187.
- 56 Алексеева Л.И., Груздев И.В. Полиморфизм эфирных масел тимьянов европейского северо-востока России и Урала // Физиология растений. -2012. - № 6. – С. 771–780.
57. Зеликсон Ю.И. Перспективы рынка дерматологических препаратов // Новая аптека. - 2007. - №4. - С. 77-78.
- 58 Жигжигжапова С.В., Рабжаева А.Н., Звонцов И.В., Раднаева Л.Д. Химический состав эфирного масла тимьяна байкальского *Thymus baicalensis* Serg., произрастающего в Забайкалье. // Химия растительного сырья, 2008. №1. С. 73-76.
- 59 Федянина Е.П., Ефремов А.А., Соколова Л.С. Химический состав эфирного масла тимьяна енисейского // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы IV Всероссийской конференции. Красноярск, 2009. - С. 140-141.
- 60 Кулакова Ю.Ю. Ботанико-ресурсоведческая характеристика рода *Thymus* L. на территории Нижнего Поволжья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.06. – Москва: Всерос. науч.-исслед. ин-т лекарств. и аромат. растений РАСХН, 2011. - 24 с.
- 61 Martins-Gomes C., Steck Ja., Keller Ju., Bunzel M., Nunes F.M., Silva A.M. Molecular characterization of *Thymus capitellatus* extracts and their antioxidant, neuroprotective and anti-proliferative activities // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23, № 23. – С. 15187.
- 62 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. - Vol. 63, № 3. - P. 357-361.
- 63 Ефремов А.А., Зыкова И.Д., Слащинин Д.Г. Компонентный состав и антирадикальная активность отдельных фракций эфирного масла *Thymus jennisseensis* Pjin., произрастающего в красноярском крае // Химия растительного сырья. - 2022. - №2. - С. 113-119.
- 64 Утегенова Г.А., Кушнаренко С.В. Биологическая активность эфирных масел и их компонентов // Журнал «Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан», №4 – 2015 г. – с. 146-153.
- 65 Stakeliene V., Loziene K. Gynodioecy in *Thymus pulegioides* L., *T. serpyllum* L., and their hybrid *T. 3 oblongifolius* Opiz (Lamiaceae): Flower size

dimorphism, female frequency, and effect of environmental factors // *Plant Biosystems*. – 2014. - Vol. 148, № 1. – P. 49-57.

66 Kemper K.J., Gardiner P., Woods Ch. Changes in use of herbs and dietary supplements (HDS) among clinicians enrolled in an online curriculum // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. - 2007. - V.7. - P. 6882-6870.

67 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Исследование эфирного масла тимьяна блошиного // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2014. – № 8-2. – С. 116-118.

68 Элькаиб Х.М., Леонтьев В.Н. Ингибирование роста бактерий рода *Pseudomonas* растительными экстрактами // *Труды БГУ*. – 2015. – Т. 10, ч. 1. – С. 104-106.

69 Кулакова Ю.Ю., Зайко Л.Н., Дмитриев Л.Б. Обзор рода *Thymus* L. на территории Нижнего Поволжья: экология, ресурсы, фитохимия сырья // *Аграрная Россия*. - 2009. - №1. - С. 48-50.

70 Bartolucci F., Domina G. The genus *Thymus* (Lamiaceae) in Sicily // *Plant Biosystems*. – 2015. - Vol.149, № 4. – P. 710-719.

71 Boubaker–Elandalousi R., Mekni–Toujani M., Diouani M., Gharbi M., Akkari H., B’chir F., Ghram A. Non-cytotoxic *Thymus capitata* extracts prevent Bovine herpesvirus-1 infection in cell cultures. // *BMC Veterinary Research*. – 2014. - Vol.10. –P. 231.

72 Nikolić G., M.Stojanović N., J.Randjelović P., Manojlović Sn., S.Radulović N. An epidemiological study on herbal product self-medication practice among psychotic outpatients from Serbia: A cross-sectional study // *Saudi Pharmaceutical Journal*. – 2018. - Vol. 26. – P. 335-341.

73 Amarti F., Ajjouri M. El, Ghanmi M., Farah A., Khia A., Rahouti M., Chaouch A. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l’huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc // *Phytothérapie*. – 2011. - Vol. 9. –P. 149–157.

74 Варданян Л.Р., Айрапетян С.А., Варданян Р.Л., Аветисян А.Э. Антиоксидантное действие эфирного масла тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) // *Химия растительного сырья*. – 2013г. - №3. – С. 143-148.

75 Bektas E., Serdar G., Sokmen M., Sokmen A. Biological activities of extracts and essential oil of *Thymus transcaucasicus* Ronniger // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. - 2016. - Vol.19. - P. 444-453.

76 Бузук А.Г., Юрченко Р.А., Заяц М.Ф., Бузук Г.Н. Фармакогностический анализ травы чабреца – *Serpylli herba* // *Вестник фармации*. Минск, 2010. № 4. С.33-37.

77 Атажанова Г.А. Терпеноиды эфирных масел растений. Распространение, химическая модификация и биологическая активность / Г.А. Атажанова. - М.: ICSPF, 2008. - 288 с.

78 Орынбет П.Ж. Современное состояние химико-фармацевтической промышленности в национальной экономической системе Республики Казахстан // *Вестник университета «Туран»*. - 2020. - №4. - С.258-264.

79 Atazhanova Gayane A. Terpenoids from plant essential oils of the family

Lamiaceae growing in Kazakhstan. // Материалы XXIV конференции по изотерпеноидам. - Польша, 2018. - С. 64-67.

80. Атажанова Г.А. Биологическая активность терпеноидов эфирных масел растений и практические аспекты их применения // Труды международной научно-практической конференции «Терпеноиды: достижения и перспективы применения в области химии, технологии производства и медицины». – Караганда: Карагандинский фармацевтический завод, типография «Гласир», 2018. – 400 с.

81 Садырбеков Д.Т., Рязанцев О.Г., Тихонова Е.В., Кенесов Б.Т., Атажанова Г.А., Адекенов С.М. Компонентный состав эфирных масел рода *Thymus* // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Москва, 2007. - С. 414.

82 Васильев А.С., Калинкина Г.И., Тихонов В.Н. Лекарственные средства растительного происхождения. Справочное пособие. — Томск: СГМУ, 2006. — 122 с.

83 Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., Van Griensven, L.J.L.D. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities // *Molecules*. – 2009. - Vol. 4. –P. 238-249.

84 Lee Ch., Lee S., Lee H. Acaricidal effects of *Thymus vulgaris* Leaf-derived materials and monoterpene alcohols against *dermatophagoides* spp. // *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* – 2010. - Vol. 53(2). –P. 170-174.

85 Santiesteban-López A., Palou E., López-Malo A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol. 102, No. 2. – P. 486 – 497.

86 Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. Mechanism of action of spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* // *J. Food. Prot.* – 2006. – Vol. 69, No. 5. – P. 1046-1055.

87 Nikolic M., Glamoclija J., Ferreira I. C.F.R., Calhella R.C. Fernandes Â., Markovic T., Giweli Markovic D., A., Sokovic M. 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.

88 Properzi A., Angelini P., Bertuzzi G., Venanzoni R. Some Biological Activities of Essential Oils // *Medicinal & Aromatic Plants*. – 2013. – V. 2(5). – P. 1-4.

89 Maksimovic Z., Stojanovic D., Sostaric I., Dajic Z., Ristic M. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. - 2008. - Vol. 88. - P. 2036-2041.

90 Rota M. C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils // *Food Control*. - 2008. - Vol. 19. - P. 681-687.

91 Утегенова Г.А., Паллистер К.Б. , Войич Ю.М., Озек Г. , Озек Т.,

Кирпотина Л.Н., Щепеткин И.А., Кушнаренко С.В. Антибактериальная активность эфирных масел некоторых видов *Artemisia* и *Thymus* в отношении метициллин-резистентного *staphylococcus aureus*. // "Вестник КАЗНУ" Серия биологическая. Алматы, 2017. – №2 (71) С.116-124.

92 Торина А.К., Бисенова Г.Н., Шегебаева А.А., Ибраева А., Рязанцев О., Атажанова Г.А. Антимикробная активность основных компонентов эфирных масел и их некоторых производных // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2014. – №3 (82). – С.54-62.

93 Ахметалимова А.М. Изучение отхаркивающей активности ультразвуковых экстрактов тимьяна бритого и тимьяна пустынного. Матер. междунар. науч. конф.: «Мир науки и молодежь: эра стремительных изменений». – Караганда, 2018. - С.117-118.

94 Торина А.К., Бисенова Г.Н., Шегебаева А.А., Ибраева А., Рязанцев О., Атажанова Г.А. Антимикробная активность основных компонентов эфирных масел и их некоторых производных // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. Нур-Султан, 2014. - №3 (82). – С.54-62.

95 Государственная фармакопея РК. Т. 2. – Алматы: Жибек жолы, 2009. – 804 с.

96 Грудзинская Л.М. Список лекарственных растений Казахстана: Справ. изд. / Л.М. Грудзинская, Н.Г. Гемеджиева. — Алматы: Кредос, 2012. — 139 с.

97 Ахметалимова А.М., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю. Перспективы использования эндемичных представителей рода *Thymus* L. в качестве лекарственного растительного сырья. // Материалы IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», Москва, 2016. - С.35-36.

98 Куприянов А.Н., Хрусталева И.А., Манаков Ю.А., Адекенов С.М. Определитель сосудистых растений Каркаралинского национального парка. – Кемерово: КРЭОО Ирбис, 2009. – 276 с.

99 Атикеева С.Н., Ауельбекова А.К., Шорин С.С., Камиев М. Видовой состав и распространение видов сем. Губоцветных во флоре центрального Казахстана // Вестник КазНУ. Серия экологическая. Алматы, 2012. – №1(33). С.241-246.

100 Глеукунова С.У., Ишмуратова М.Ю., Додонова А.Ш., Гаврилькова Е.А. Итоги изучения распространения эндемичных видов растений на территории акмолинской области // Журнал «Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук». – 2017. - №4-1, – С. 64-68.

101 Akhmetalimova A.M., Ivasenko S.A., Ishmuratova M.Yu. Prospects for the use of endemic representatives of the genus *Thymus* L. as a medicinal plant raw material // Sechenov Bulletin. - 2016. - № 2(24). - P. 35-36.

102 Ишмуратова М.Ю. Дикорастущие хозяйственно-ценные растения гор Улытау / М.Ю. Ишмуратова, В.И. Ивлев, Г.Ж. Мырзалы, А.Н. Матвеев. — Жезказган: Изд-во ЖезУ, 2014. — 72 с.

103 Куприянов А. Н. Флора казахского мелкосопочника. // Матер. XIV междунар. науч. конф. русского ботанического общества: «Ботаника в современном мире». Махачкала, 2018. – С. 149-151.

104 Ишмуратова М.Ю. Эндемичные виды растений флоры Карагандинской области (Центральный Казахстан) / М.Ю. Ишмуратова, С.У. Тлеукенова, А.Ш. Додонова, Е.А. Гаврилькова — Караганда: Полиграфист, 2016. — 109 с.

105 Садырбеков Д.Т., Рязанцев О.Г., Кенесов Б.Н. К составу эфирных масел некоторых тимьянов-эндемиков // Матер. междунар. науч. конф.: «Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане». — Алматы, 2011. — С. 11–114.

106 Akhmetalimova A.M., Orazbaeva 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 КарГУ. Серия биология, медицина, география. Караганда, 2017. - С.15-19.

107 Gavrilkova E.A., Dodonova A.Sh., Tleukenova S.U., Ishmuratova M.Yu., Verzhuk V.G. Using of cryoprotectors for low-temperature storage of seed material of *Thymus rasiatus* // Вестник КарГУ. Серия биология, медицина, география. Караганда, 2017. - С.25-30.

108 Гаврилькова Е.А., Додонова А.Ш., Чупенко Е.В. Криогенное хранение семенного материала *Thymus rasiatus* // Матер. междунар. науч. конф.: «Современное состояние наук о жизни: фундаментальные и прикладные аспекты» — Караганда, 2016. — С. 179–181.

109 Akhmetalimova A.M., Ishmuratova, M.Yu.; Ivasenko, S.A.; Loseva, I.V.; Ludwiczuk, A. Determination of anatomical diagnostic signs of aboveground parts of raw material of *Thymus eremita* Klok. // Вестник КарГУ. Серия биология, медицина, география. Караганда, 2018 . №2(90) - С. 67-71.

110 Ахметалимова А.М., Ишмуратова М.Ю., Ивасенко С.А., Лосева И.В. Анатомическое строение надземных органов *Thymus eremita* Klok // Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых ученых. - Санкт-Петербург, 2018. - С. 35.

111 Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Астана, 2009. - Т. 2. – 802 с. ISBN. 978-601-7152-43-7.

112 Патент РК № 34162 на изобретение от 11.02.2020. Применение сухого экстракта тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.) в качестве антимикробного средства широкого спектра действия // Ахметалимова А.М., Бокаева А.Б., Ивасенко С.А., Ахметова С.Б., Лосева И.В.

113 Оразбаева П.З. Химический состав и биологические свойства ультразвукового экстракта тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, перспективы его применения в медицине. Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD). 6D110400 – Фармация. – Караганда, 2023. – 142 с.

114 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.
115 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.
- 116 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.
- 117 Vidal, справочник лекарственных препаратов Казахстана https://www.vidal.kz/poisk_preparatov/bronchicum-s.htm
118. Старчак Ю.А. Фармакогностическое исследование растений рода *Thymus* (*Thymus* L.) в качестве перспективного источника фитопрепаратов. Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия. - Курск, 2016. - 440 с.
- 119 Ivaskenko S., Zhumabekova A., Ludwiczuk A., Skalicka–Wozniak K., Marchenko A., Ishmuratova M., Poleszak E., Korona-Glowniak I., Akhmetova S., Karilkhan I., Loseva I. Antimicrobial activity and polyphenol profiles of hydroalcoholic extracts of *Thymus rasiatus* Klokov and *Thymus eremita* Klokov // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. - 2021. - V. 9(A). - P. 313-317.
- 120 Ivaskenko 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.
- 121 Государственная фармакопея РФ XIII online, ФС.2.5.0047.15. «Трава тимьяна. *Thymi serpylli herba*». - 2016. - 10 с.
- 122 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.
- 123 Хитева О.О. Изучение некоторых видов ивы, произрастающих на Северном Кавказе: Автореф. дис. канд. фармацевт. наук. – Пятигорск, 2012. – 24 с.
- 124 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.
- 125 Кахраманова С.Д., Боков Д.О., Самылина И.А. Количественное определение полисахаридов в лекарственном растительном сырье. // Фармация. - 2020. - № 69 (8). - С. 5–12.
- 126 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.

127 Государственная фармакопея РФ XIV, ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды *Rosae fructus*». - 2018.

128 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.

129 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с.

130 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.

131 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.

132 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.

133 Государственная фармакопея РФ XIII online, ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» - 2016. - 43 с.

134 Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Изучение отхаркивающей активности растений рода Тимьян // Медицинский вестник Башкортостана. - 2013. - Т. 8, № 5. – С. 78-80.

135 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

136 Ахметалимова А.М., Оразбаева П.З., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю. Morphological analysis of macroscopic diagnostic signs of *Thymus crebrifolius*'s raw material // Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений, сохранения биоразнообразия и рационального использования биоресурсов в аридных условиях: сб. - Актау, 2017 г. – С. 98-100.

137 Ахметалимова А.М., Оразбаева П.З., Ивасенко С.А., Лосева И.В., Ишмуратова М.Ю. Анатомическое строение листа Тимьяна частолистого // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: сб. - Москва, 2017 г. - С.18-21.

138 Атажанова Г.А. Биологическая активность терпеноидов эфирных масел и практические аспекты их применения//Сборник трудов международной научно – практической конференции «Терпеноиды: достижения и перспективы применения в области химии, технологии производства и медицины». – Караганда, 2008. – С. 118 – 121.

139 Бурда Н.Е. Изучение летучей фракции *Piptoporus betulinus* (Fr.) Karst. / В.С.Кисличенко, И.А.Журавель //American Journal of Science and Technologies.

– 2015. – №2 (20). – С. 816 – 821.

140 Кацуба И.К. Исследование летучих веществ листьев и цветков мать – и – мачехи обыкновенной. / В.С.Кисличенко, Е.Н.Новосел // Вестник Таджикского национального университета. – 2013. – №1/3 (110). – С. 179 – 183.

141 Кисличенко В.С. Сравнительный анализ химического состава эфирного масла листьев растений рода *Petroselinum*, культивируемых в Украине. / В.В.Вельма, О.А.Зотикова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. – 2013. – №18 (161), вып. 23. – С. 220 – 224.

142 Ахметалимова А.М., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю. Перспективы использования эндемичных представителей рода *Thymus L.* в качестве лекарственного растительного сырья // Сеченовский вестник. Электронное приложение. - 2016. - № 2(24). - С. 35-36.

143. Ахметалимова А.М., Ивасенко С.А., Ишмуратова М.Ю. Перспективы использования эндемичных представителей рода *Thymus L.* в качестве лекарственного растительного сырья // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине»: сб. - Москва, 2016. - С.35-36.

144 Ахметалимова А.М., Оразбаева П.З., 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 г. - С. 170-172.

145 Ахметалимова А.М., Оразбаева П.З., Ивасенко С.А., Лосева И.В., Ишмуратова М.Ю. Анатомическое строение надземных органов *Thymus rasilatus* Klok // Современная биология. Теоретические, прикладные аспекты и междисциплинарные связи: сб. - Караганда, 2017 г. - С.64-67.

146 Akhmetalimova A.M., Marchenko A.B., Ishmuratova M.Yu., Poleszak E., Ludwiczuk A., Loseva I.V. The study of the chemical composition of *Thymus eremita* Klok. and *Thymus rasilatus* Klok. from the Karaganda region // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan-Series Chemistry and Technology. - 2018. – V.5, №431. - P. 20–25.

147 Akhmetalimova A.M., Ishmuratova, M.Yu.; Ivaskenko, S.A.; Loseva, I.V.; Ludwiczuk, A. Determination of anatomical diagnostic signs of aboveground parts of raw material of *Thymus eremita* Klok // Вестник КарГУ. Серия биология, медицина, география. - 2018. - №2(90) - С. 67-71.

148 Ахметалимова А.М., Ишмуратова М.Ю., Ивасенко С.А., Лосева И.В. Анатомическое строение надземных органов *Thymus eremita* Klok // IV (XII) Международная ботаническая конференция молодых ученых: сб. - Санкт-Петербург, 2018. - С. 35.

149 Касымова Д.Т., Алиева А.Б., Жусеева 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.

150 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005, - 832 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасы БҒМ және ғылым
Министрлігі ғылым Комитетінің
шаруашылық жұрты құқығындағы
Республикалық мемлекеттік кәсіпорны
«Ботаника және фитоинтродукция институты»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И
НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ

Республиканское государственное
предприятие на праве хозяйственного ведения
«Институт ботаники и фитоинтродукции» КН •
Министерства образования и науки Республики
Казахстан

050040, Алматы қ., Тимирязев к., 36 «Д», тел.
8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 36 «Д»,
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

№ 01-04/261

«22» октября 2018 г.

Заключение о видовой принадлежности растительного сырья

На основании анализа представленного Ахметалимовой А.М. сырья лекарственных растений подтверждаем:

1 Образец сырья, собранный 20 июня 2016 года в горах Каркаралинска (49,57407 с.ш., 75,30976 в.д., высота 612 м над уровнем моря) действительно является тимьяном бритым (*Thymus rasitatus* Klok.).

2 Образец сырья, собранный 17 июня 2016 года в горах Улытау (48, 4213 с.ш., 66.5910 в.д., высота - 428 м над уровнем моря), действительно является тимьяном частолистным (*Thymus crebrifolius* Klok.).

3 Образец сырья, собранный 28 июня 2016 года в окрестностях города Балхаш в горах Бектауата (47,2554 с.ш., 74,4738 в.д., высота - 547 м над уровнем моря), действительно является тимьяном пустытника (*Thymus eremita* Klok.).

Генеральный директор, д.б.н.



Ситпаева Г.Т.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Решение Комитета по биоэтике Карагандинского государственного медицинского университета

Заседание № 45
Протокол № 45

Дата (Д/М/Г) 07.06.2018г.
Присвоенный номер 56

Название протокола: «Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода <i>Thymus L.</i> и перспективы их применения в медицине»					
Основной исследователь:		Ахметалимова Айнур Маратовна			
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: **07.06.2018г.**



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

ПРИЛОЖЕНИЕ В

СОГЛАСОВАНО

И.о. Председателя Правления
Ректора НАО «МУК»
А.А. Төрмүхамбетова
« 05 » _____ 2021 г.
М.П.



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского центра
НАО «МУК»
Л.Л. Ахмалтдинова
от « 05 » _____ 2021 г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГУ 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 crebrifolius herba

Жапырақты жебірдің шөбі

Тимьяна частолистого 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

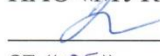
ПРИЛОЖЕНИЕ Г

СОГЛАСОВАНО

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



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского центра
НАО «МУК»
 Л.Л. Ахмалтдинова
от « 05 » _____ 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 crebrifolius extractum siccum

Жапырақты жебірдің құрғақ сығындысы

Тимьяна частолистого 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 Д

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

«05» 08



УТВЕРЖДАЮ

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

Л.Л. Ахмалдинова
«05» 08 2021 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ на получение субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой»

ЛР-005491-МК-05-21

Срок действия регламента до «05» 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

А.М. Жұмабекова

КАРАГАНДА 2021

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

СОГЛАСОВАНО

И.о. Председателя Правления –
Ректора НАО «МУК»
А.А. Турмухамбетова
«06» 08 2021 г.
М.П.



УТВЕРЖДЕН

И.о. Директора Научно-исследовательского
центра НАО «МУК»
Л.Л. Ахмалтдинова
от «06» 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 частолистого экстракт сухой»

(наименование работы)

Разработка включена из докторской (PhD) диссертации на тему:
«Комплексное изучение биологически активных веществ определенных представителей рода *Thymus* L. и перспективы их применения в медицине».

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

(внедрение метода, способа, аппарата в учебном заведении)

Ответственные за внедрение, исполнители:

Сторона 1. Жұмабекова А.М. - 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 частолистого экстракт сухой» для производства отечественных лекарственных средств широкого спектра антимикробного действия, в том числе *Helicobacter pylori*.

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

Предложение учреждения, осуществляющего внедрение:

Внедрить технологию получения субстанции «Тимьяна частолистого экстракт сухой» для производства отечественных лекарственных средств широкого спектра антимикробного действия, в том числе *Helicobacter pylori*, на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК».

Сроки внедрения до 06.08.2024 г.

Преподаватель Школы фармации
НАО «МУК»

А.М. Жұмабекова

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж



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 rasiatus Klok.

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC ratio
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	5	5	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	2.5	2.5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2.5	2.5	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	2.5	5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	10	10	1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	2.5	2.5	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	2.5	10	4
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	10	2
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	5	5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	10	2
<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	10	10	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10	2
Helicobacter pylori ATCC43504			
Plant extract	0.0195	0.250	13
Plant oil	0.0049	0.0625	13

KIEROWNIK
 Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
 z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

 prof. dr hab. Anna Mielim



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 crebrifolius Klok.

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC ratio
Gram-positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	0.625	1.25	2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	1.25	2.5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	0.313	0.313	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	1.25	2.5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	0.625	1.25	2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20	>8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	1.25	1.25	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	1.25	10	8
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	5	10	2
Gram-negative bacteria			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	5	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	2.5	2.5	4
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	1.25	1.25	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	5	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	5	1
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	2.5	10	4
Helicobacter pylori ATCC43504			
Plant extract	0.0313	0.250	8
Plant oil	0.0156	0.0625	4

KIEROWNIK
 Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
 z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

 prof. dr hab. Anna Miało



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 eremita Klok.

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

KIEROWNIK
 Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
 z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

 prof. dr hab. Anna Wajm



«Утверждаю»

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству

А.А. Турмухамбетова

26 03 2018 г.

АКТ

результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории на антибактериальную и противогрибковую активности на базе кафедры микробиологии КГМУ.

Объекты исследований: ультразвуковые экстракты растительного сырья *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus eremita* Klok., *Thymus marschallianus* Willd.

Цель работы: изучение антибактериальной и противогрибковой активности ультразвуковых экстрактов и эфирных масел растительного сырья *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus eremita* Klok., *Thymus marschallianus* Willd., 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 антибактериальную и противогрибковую активности следующих веществ:

УЭТЧ - Ультразвуковой экстракт тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.);

УЭТБ - Ультразвуковой экстракт тимьяна бритого (*Thymus rasitatus* Klok.);

УЭТМ - Ультразвуковой экстракт тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.);

УЭТП - Ультразвуковой экстракт тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.).

Метод тестирования противобактериальной и противогрибковой активности – метод диффузии в агар с тест-культурами: *S. aureus* 6538; *Bacillus subtilis* 6633; *E. Coli* 0524; *Candida albicans* 0475, *Candida albicans* НИЦ.

Для предварительного скрининга наиболее активных образцов была изучена антибактериальная активность образцов методом дисков и методом серийных разведений. Стерильные диски пропитанные дозой образца выкладывали на поверхность засеянной тест-культурой среды соответствующей культивируемому микроорганизму. Определение антибактериальных свойств растворов образцов (1, 10, 20 мг/мл) проводили методом диффузии в агар с использованием лунок (8 мм). В лунки вносили по 0,1 мл изучаемых растворов. Чашки Петри предварительно выдерживали в холодильнике в течение двух часов для диффундирования исследуемого вещества. О наличии антибактериальной активности судили по результатам 3-х независимых экспериментов, по образованию зон отсутствия роста тест-организмов после 24-часового инкубирования. Зону подавления роста диаметром 2 мм по меньшей мере регистрировали как положительный результат.

Стандартом противобактериальной активности выбран антибиотик-бензилпенициллина натриевая соль, аминогликозидный антибиотик гентамицин, противогрибковой активности – нистатин. Концентрации тестируемых препаратов

составляли для антибактериальной активности – 1 мкг, противогрибковой – 1 мкг. Концентрация препаратов сравнения составляла 1 мг/мл. Антимикробную активность образцов оценивали по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметры зон меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антимикробной активности, 10-15 мм - слабая активность, 15-20 мм - умеренно выраженная активность, свыше 20 мм - выраженная. Каждый образец испытывали в трех параллельных опытах.

Разведение производили из расчета 1мг вещества на 1мл растворителя. Определяли чувствительность бактерий к данным препаратам диффузионным методом с помощью дисков. Использовали 4 вида бактерий: *Staphylococcus aureus* 1518, *Bacillus subtilis* 6633, *Escherichia coli* BL/Pet32/VPI и *Candida albicans* ATTC 885-653.

Высеивали данные культуры методом газона соответственно на следующих питательных средах: ЖСА, среда Эндо, питательный агар и среда Сабуро. Затем чашки Петри инкубировали в течении суток при 37°С, чашку с агаром Сабуро при 28°С

На чашку Петри с ЖСА агаром вносилось взвесь 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) суточной культуры исследуемого штамма микроорганизма *S. aureus*.

На чашку Петри с мясопептонным агаром (МПА) вносилось взвесь 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) суточной культуры исследуемого штамма микроорганизма *Bacillus subtilis*. Испытуемый образец, спирт этиловый и стерильный физиологический раствор (контроль) в объеме 20 мкл вносились в лунки, и после суточной инкубации в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ измерялись зоны ингибирования роста микроорганизмов. При отсутствии зоны подавления роста считалось, что антимикробная активность отсутствует.

Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки.

Средние числовые значения диаметров зон задержки роста тест-штаммов (мм) указаны в табл. 1

Таблица 1. Антимикробная активность образцов методом диффузии в агар

Шифр (название)	<i>St. aureus</i> 1518. (мм)	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> 6633 (мм)	<i>E. coli</i> <i>BL/Pet32/VPI</i> (мм)	<i>Ps.aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Candida</i> <i>albicans</i> ATCC 885-653 (мм)
эфирное масло тимьяна бритого (<i>Thymus rasiatus</i> Klok.)	19±1	32±1	22±1	17±1	19±1
эфирное масло тимьяна частолистого (<i>Thymus crebrifolius</i> Klok.)	17±1	12±1	15±1	17±1	18±1
эфирное масло тимьяна пустынного (<i>Thymus eremita</i> Klok.)	17±1	12±1	18±1	12±1	20±1
эфирное масло тимьяна ползучего (<i>Thymus serpyllum</i>)	22±1	10±1	21±1	11±1	18±1
эфирное масло тимьяна ползучего (<i>Thymus serpyllum</i>) (окр. Каркаралинск)	23±1	19±1	18±1	12±1	18±1
эфирное масло тимьяна Маршалла (<i>Thymus marschallianus</i>)	22±1	18±1	21±1	12±1	18±1
МЭТЧ (Метанольный экстракт тимьяна частолистого)	17±1	12±1	21±1	12±1	18±1
МЭТБ (Метанольный экстракт тимьяна бритого)	18±1	12±1	21±1	11±1	18±1
МЭТМ (Метанольный экстракт тимьяна Маршалла)	17±1	12±1	14±1	12±1	16±1

МЭТП(метанольный экстракт тимьяна пустынного)	21±1	16±1	21±1	10±1	12±1
МЭТП-1 (Метанольный экстракт тимьяна ползучего (п. Корнеевка))	22±1	16±1	21±1	11±1	15±1
МЭТП-2 (Метанольный экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск))	14±1	18±1	15±1	11±1	15±1
Гентамицин	22±1	19±1	21±1		
Бензилпенициллина натриевая соль	14±1	16±1	13±1		-
Линкомицина гидрохлорид	24±1	22±1	21±1		-
Нистатин					18±1

Примечание: "-" - зона задержки роста отсутствует. Диаметры задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивают как отсутствие антимикробной активности, 10-15 - слабая активность, 15-20 умеренно выраженная активность, свыше 20 - выраженная.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна бритого (*Thymus rasiatus* Klok.)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,0005	0,0005	0,0005	0,002	0,002

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002; 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандиды изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высеv производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна бритого (*Thymus rasiatus* Klok.) проявило бактерицидное действие при концентрации 0,0005 мг/мл в отношении грамположительной бактерии *S. aureus*, что позволяет сделать рекомендации использования данного эфирного масла при заболеваниях верхних дыхательных путей, при внутрибольничных инфекциях. Диаметр зон задержки роста тест-штамма выше, чем у препарата сравнения - бензилпенициллина натриевой солью.

Также эфирное масло проявило бактерицидное действие при концентрации 0,0005 мг/мл в отношении *B.subtilis* и *E. coli*, при концентрации 0,002 мг/мл в отношении *Ps.aerugiosa* и *Candida albicans*. Диаметр зон задержки роста тест-штамма - *B.subtilis* выше, чем у препарата сравнения - линкомицина гидрохлорида, что говорит о высокой активности в отношении грамположительных спорообразующих бактерий. Диаметр зон задержки роста тест-штамма - *E. coli* выше, чем у препаратов сравнения - линкомицина гидрохлорида и гентамицина. В целом, эфирное масло тимьяна бритого (*Thymus rasiatus* Klok.) может быть рекомендовано, как средство широкого антимикробного спектра действия в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и гриба рода *Candida*.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,002	0,002	0,002	0,002	0,0005

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002; 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандиды изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высев производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.) проявило бактерицидное действие при концентрации 0,002 мг/мл в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов - *S. aureus*, *B.subtilis*, *E. coli* и *Ps.aerugiosa*. Более активным маслом оказалось в отношении гриба *Candida albicans*, бактерицидное действие при 0,0005 мг/мл. Диаметр зон задержки роста тест-штаммов - *S. aureus*, *B.subtilis*, *E. coli* выше, чем у препарата сравнения - бензилпенициллина натриевой солью.

В отношении гриба рода *Candida* образец проявил одинаковую активность при задержке роста культуры, как и препарат сравнения - нистатин.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,0005	0,002	0,00025	0,0005	0,001

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002; 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандиды изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высеив производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна пустынного (*Thymus eremita* Klok.) проявило бактерицидное действие при концентрации 0,00025 мг/мл в отношении грамотрицательного микроорганизма - *E. coli*, поэтому не рекомендуется назначение данного эфирного масла внутрь, так как это может привести к нарушению внутренней микрофлоры человека. При концентрации 0,002 мг/мл бактерицидный эффект наблюдается в отношении *B.subtilis*, при концентрации 0,002 мг/мл в отношении *S. aureus* и *Ps.aerugiosa*. В отношении гриба рода *Candida* образец проявил выраженную активность при задержке роста культуры, препаратом сравнения выступал нистатин.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,00025	0,002	0,0005	0,002	0,0005

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002; 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандиды изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высеив производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением

образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*) проявило Таким образом, мы имеем довольно перспективное в плане биологической активности вещество с выраженной антимикробной активностью в отношении грам положительных и грамотрицательных микроорганизмов и гриба рода *Candida*.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*) (окр. Каркаралинск)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,000125	0,00025	0,0005	0,002	0,0005

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002; 0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандида изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высев производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum*) (окр. Каркаралинск) проявило Таким образом, мы имеем довольно перспективное в плане биологической активности вещество с выраженной антимикробной активностью в отношении грам положительных и грамотрицательных микроорганизмов и гриба рода *Candida*.

Таблица. Антимикробная активность образцов методом серийных разведений эфирного масла тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus*)

Наименование образца	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aerugiosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>
минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)	0,000125	0,00025	0,00025	0,002	0,00025

Образцы разводили в 96%-м этиловом спирте 1:1. Посев бактериальных тест культур проводили в пробирки с жидкой питательной средой, содержащие концентрации 0,002;

0,001; 0,0005; 0,00025; 0,000125 мг/мл исследуемых образцов, приготовив суточную культуру изучаемых тест штаммов вносили в количестве 100 мкл.

Параллельно проводили контроль без внесения образца. Для определения жизнеспособности бактерий и гриба рода кандиды изучаемые образцы вносили в концентрациях 0,002; 0,001; 0,0005 мг/мл и 0,00025. Контрольный высеv производили из всех полученных разведений на плотные питательные среды. Посевы с добавлением образцов ставили на инкубацию при температуре 36°C в течение суток. Параллельно проводился контрольный посев без внесения образцов.

Вывод: Эфирное масло тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus*) проявило бактерицидное действие при концентрации 0,000125 мг/мл в отношении грамположительной бактерии *S. aureus*, что позволяет сделать рекомендации использования данного эфирного масла при заболеваниях верхних дыхательных путей, при внутрибольничных инфекциях. Диаметр зон задержки роста тест-штаммов - *S. aureus*, *B.subtilis*, *E. coli* примерно одинаков, как у препаратов сравнения - линкомицина гидрохлорида и гентамицина, и выше, чем у бензилпенициллина натриевой соли.

Определение влияния метанольных экстрактов на биологическую активность тест штаммов

Наименование образца	S. aureus	B.subtilis	E. coli	Ps.aeruginosa ATCC 9027	Candida albicans
	минимальная бактерицидная концентрация препарата (мг/мл)				
МЭТЧ Метанольный экстракт тимьяна частолистого	0,0005	0,002	0,00025	0,002	0,0005
МЭТБ Метанольный экстракт тимьяна бритого	0,0005	0,002	0,00025	0,002	0,0005
МЭТМ Метанольный экстракт тимьяна Маршалла	0,0005	0,002	0,002	0,002	0,0005
МЭТП70%-ный метанольный экстракт тимьяна пустынного	0,00025	0,0005	0,00025	0,002	0,002
МЭТП-1	0,000125	0,00025	0,00025	0,002	0,0005

Метанольный экстракт тимьяна ползучего (п. Корне					
МЭТП-2 Метанольный экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск)	0,00025	0,0005	0,0005	0,002	0,00025

Вывод: Таким образом, мы имеем довольно перспективное в плане биологической активности вещество с выраженной антимикробной активностью в отношении грам положительных и грамотрицательных микроорганизмов и гриба рода *Candida*.

Все исследуемые образцы активны в отношении *S.aureus*, причем по бактерицидному эффекту эфирные масла некоторых образцов достоверно превосходят препарат сравнения

Заключение. В результате исследования потенциала антибактериальной и противогрибковой активностей установлено, что практически все исследованные образцы в той или иной степени тормозят рост тестовых культур *in vitro*.

Таким образом, результаты скрининга позволяют выделить соединения с наибольшим потенциалом противобактериальной и противогрибковой активности.



«Утверждаю»

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству

А.А. Турмухамбетова А.А. Турмухамбетова

«21» 03 2018 г.

АКТ

результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории на острую токсичность на базе кафедры микробиологии КГМУ

Объекты исследований: сухие экстракты растительного сырья тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok).

Цель работы: изучение острой токсичности экстракта растительного сырья *Thymus crebrifolius* Klok., переданного 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 острой токсичности следующих веществ:

-Сухой экстракт тимьяна частолистого.

«Утверждаю»



Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству

А.А. Турмухамбетова 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: спиртовые экстракты и эфирные масла растительного сырья *Thymus marschallianus Willd.*, *Thymus serpyllum L.*, *Thymus crebrifolius Klok.*, *Thymus rasitatus Klok.*, *Thymus eremita Klok.*

Цель работы: изучить мутагенную активность спиртовых экстрактов и эфирных масел растительного сырья *Thymus marschallianus Willd.*, *Thymus serpyllum L.*, *Thymus crebrifolius Klok.*, *Thymus rasitatus Klok.*, *Thymus eremita Klok.* 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 произведено исследование мутагенной активности следующих фармакологических веществ:

- Эфирное масло тимьяна частолистого;
- Эфирное масло тимьяна бритого;
- Эфирное масло тимьяна Маршалла;
- Эфирное масло тимьяна пустынного;
- Эфирное масло тимьяна ползучего (п. Корнеевка);
- Эфирное масло тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск);
- Метанольный экстракт тимьяна частолистого;
- Метанольный экстракт тимьяна бритого;
- Метанольный экстракт тимьяна Маршалла;
- Метанольный экстракт тимьяна пустынного;
- Метанольный экстракт тимьяна ползучего (п. Корнеевка);
- Метанольный экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск).

Целью данного исследования явилось выявление способности 6 образцов эфирных масел тимьяна и 6 экстрактов тимьяна 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 (polA), 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 ауксотрофности по гистидину.

Использовали питательные среды и растворы: мясopептонный 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 полубогащенный 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 полубогащенный 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 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
	<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 вариантов негативного контроля (культуры, обработанные только растворителем). В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (100 мкг/чашку) [1].

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 эфирного масла тимьяна частолистого, тимьяна бритого, тимьяна Маршалла, тимьяна пустынного, тимьяна ползучего (п. Корнеевка) и тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск) и их метанольных экстрактов

Наименование Влияние на рост штамма количество КОЕ на чашку	Salmonella typhimurium TA 100				Salmonella typhimurium 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
ЭМ Тимьяна бритого	6±1	7±1	10±1	14±1	9±1	6±1	6±1	16±1
ЭМ тимьян частолистый	7±1	8±1	4±1	13±1	9±1	7±1	8±1	10±1
ЭМ тимьяна ползучего (п. Корнеевка)	6±1	5±1	9±1	11±1	9±1	6±1	7	12
ЭМ тимьяна пустынного	5±1	7±1	6	15±1	7±1	6±1	9	11
ЭМ масло тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск)	7±1	9±1	9±1	16±1	8±1		9±1	11
ЭМ тимьян Маршалла	6±1	8±1	7±1	14±1	10±1		6±1	9±1
МЭТЧ Метанольный экстракт тимьяна частолистого;	7±1	6±1	8±1	15±1	6±1	7±1	5±1	15±1
МЭТБ Метанольный экстракт тимьяна бритого;	7±1	5±1	9±1	13±1	7±1		9±1	16±1
МЭТМ Метанольный экстракт тимьяна Маршалла;	6±1	6±1	7±1	15±1	5±1	6±1	7±1	15±1
МЭТП Метанольный экстракт тимьяна пустынного;	7±1	6±1	7±1	14±1	4±1		6±1	14±1
МЭТП-1 Метанольный экстракт тимьяна ползучего (п. Корнеевка);	8±1	7±1	8±1	16±1	5±1	7±1	8±1	15±1

МЭТП-2 Метанольный экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск).	6±1	6±1	8±1	14±1	7±1	5±1	9±1	14±1
--	-----	-----	-----	------	-----	-----	-----	------

Учет генных мутаций (тест Эймса) считали полуколичественным методом, и мутагенную активность засчитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 2003].

Результаты исследования мутагенной активности образцов приведены в таблице 2.

В результате проведенного эксперимента выявлено, что число колоний-ревертантов в ПМАС с концентрациями ЭМ 10γ/чашка, ЭМ 100γ/чашка не превышало числа колоний-ревертантов 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 (п. Корнеевка) и тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск) 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 эфирных масел и метанольных 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. Эфирные масла тимьяна не вызывали статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертантов, воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки. 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 ревертантов в опыте по сравнению с контролем. Получены результаты, показавшие, что количество ревертантов 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.

Выводы.

Установлено, что спиртовые экстракты и эфирные масла растительного сырья *Thymus marschallianus* Willd., *Thymus serpyllum* L., *Thymus crebrifolius*

Klok., *Thymus rasitatus Klok.*, *Thymus eremita Klok.* не вызывали статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертантов, 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.



«Утверждаю»

Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству

А.А. Турмухамбетова

21.03.2018 г.

АКТ

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

Объекты исследований: спиртовые экстракты и эфирные масла растительного сырья *Thymus marschallianus* Willd., *Thymus serpyllum* L., *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus eremita* Klok.

Цель работы: изучить отхаркивающую активность спиртовых экстрактов и эфирных масел растительного сырья *Thymus marschallianus* Willd., *Thymus serpyllum* L., *Thymus crebrifolius* Klok., *Thymus rasitatus* Klok., *Thymus eremita* Klok. 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 произведено исследование отхаркивающей активности следующих фармакологических веществ:

- Эфирное масло тимьяна частолистого;
- Эфирное масло тимьяна бритого;
- Эфирное масло тимьяна Маршалла;
- Эфирное масло тимьяна пустынного;
- Эфирное масло тимьяна ползучего (п. Корнеевка);
- Эфирное масло тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск);
- Метанольный экстракт тимьяна частолистого;
- Метанольный экстракт тимьяна бритого;
- Метанольный экстракт тимьяна Маршалла;
- Метанольный экстракт тимьяна пустынного;
- Метанольный экстракт тимьяна ползучего (п. Корнеевка);
- Метанольный экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск).

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 заглывание 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)
Сухой экстракт тимьяна бритого	41,25	0,64
Сухой экстракт тимьяна пустынного	6,8	0,92
Сухой экстракт тимьяна частолистого	33,1	0,72
Сухой экстракт тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск)	49	0,67
Сухой экстракт тимьяна ползучего (п. Корнеевка)	40	0,71
Сухой экстракт тимьяна Маршалла	0,96	1,25
Эфирное масло тимьяна частолистого	8,75	0,88
Эфирное масло тимьяна бритого	9,4	0,912
Эфирное масло тимьяна пустынного	33,25	0,72
Эфирное масло тимьяна ползучего (окр. Каркаралинск)	45	0,69
Эфирное масло тимьяна ползучего (п. Корнеевка)	25	0,80
Эфирное масло тимьяна Маршалла	135	0,44
Контроль Бронхикум С	52,5	0,66

Экспериментально установлено, что сухой экстракт тимьяна ползучего, бритого и эфирные масла тимьяна пустынного и Маршалла обладают отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С.

Таким образом, ультразвуковой экстракт тимьяна бритого и ползучего, эфирное масло тимьяна Маршалла являются перспективными субстанциями для разработки отечественных лекарственных средств отхаркивающего действия.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 34162

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION



(21) 2018/0531.1

(22) 31.07.2018

Қазақстан Республикасы Өнертабыстары мемлекеттік тізілімінде тіркеу күні /
Дата регистрации в Государственном реестре изобретений Республики
Казakhstan / Date of the registration in the State Register of Inventions of the
Republic of Kazakhstan: 11.02.2020

(54) Кең спектрлі әсер ететін микробқа қарсы құрал ретінде жапырақты жебір (*Thymus crebrifolius* Klok.) құрғақ
экстрактының қолдануы
Применение сухого экстракта тимьяна частолистого (*Thymus crebrifolius* Klok.) в качестве антимикробного
средства широкого спектра действия
Use of dry thyme extract (*Thymus crebrifolius* Klok.) as a broad spectrum antimicrobial agent

(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) Ахметалимова Айнур Маратовна (KZ)	Akhmetalimova Ainur Maratovna (KZ)
Бокаева Асемгуль Бакытжановна (KZ)	Bokayeva Assemgul Bakytzhanovna (KZ)
Ивасенко Светлана Александровна (KZ)	Ivassenko Svetlana Alexandrovna (KZ)
Ахметова Сауле Балтабаевна (KZ)	Akhmetova Saule Baltabayevna (KZ)
Лосева Ирина Викторовна (KZ)	Losseva Irina Viktorovna (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed by EDS

Н. Әбілқайыров
Н. Абулкайров
N. Abulkairov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директорының м.а.
И.о. директора РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Executive director of RSE «National institute of intellectual property»