

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему
**«Фитохимический анализ некоторых видов растений *Thymus L.* и
получение новой фитосубстанции»**

на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности
6D110400 – «Фармация»

Жұмақановой Бағды Сағынайқызы

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена сравнительному изучению фитохимического состава лекарственного растительного сырья (ЛРС) *Thymus marschallianus* Willd. и *Thymus seravschanicus* Klokov L. и разработке растительных фармацевтических субстанций фармакопейного качества.

Актуальность темы исследования. В настоящее время одной из главных целей для отечественной фармацевтической индустрии является импортозамещение. В рамках Комплексного плана развития фармацевтического производства на 2020-2025 годы основное внимание уделяется созданию производства лекарственных препаратов на основе растений, произрастающих в Республике Казахстан. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), примерно 80 % мирового населения применяют лекарственные препараты растительного происхождения. Эта тенденция объясняется снижением нежелательных эффектов на организм человека, отсутствием физиологической зависимости в процессе длительной терапии подобными препаратами и экономической доступностью.

Для реализации целей и задач направлений развития фармацевтической промышленности необходимо проведение комплексных исследований по рациональному использованию отечественного природного сырья как источника фармакологически активных веществ. В связи с этим интерес представляют исследования химического состава некоторых видов растений рода *Thymus L.* семейства *Lamiaceae*, произрастающих на территории нашей страны в качестве перспективных растительных фармацевтических субстанций.

Во флоре Казахстана представлены 27 видов тимьяна и два из них: *Thymus vulgaris L.* и *Thymus serpyllum L.* входят в Государственную фармакопею Республики Казахстан как лекарственное растительное средство отхаркивающего, противомикробного, обезболивающего действия. Более десяти лекарственных препаратов в своем составе содержат экстракты тимьяна обыкновенного и тимьяна ползучего. Кроме того, экстракты тимьяна также присутствуют в номенклатуре биологически активных добавок, которые применяются в качестве общеукрепляющего, противовоспалительного, успокаивающего средства.

Изучение различных видов *Thymus L.* в качестве потенциальных источников биологически активных веществ представляют собой важную область исследований, особенно с учетом их потенциального применения в

медицине и фармации. Недостаток информации о тимьяне Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd) и тимьяне зеравшанском (*Thymus seravschanicus* Klokov L) как источниках биологически активных соединений означает, что есть много возможностей для дальнейших исследований и расширении номенклатуры лекарственных растений. Для раскрытия потенциала этих видов идентификация и изучение их химического состава, включая анализ их эфирных масел и других биологически активных соединений, а также изучения профиля фармакологической активности является актуальным.

Цель работы - сравнительное фитохимическое изучение травы *Thymus marschallianus* Willd и *Thymus seravschanicus* Klokov L. и разработка растительных фармацевтических субстанций фармакопейного качества на их основе.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить идентификационные параметры и фитохимического состава ЛРС в сравнительном аспекте двух видов рода *Thymus* L.

2. Установить фармацевтико-технологические параметры и провести стандартизацию лекарственного растительного сырья *Th. marschallianus* Willd. и *Th. seravschanicus* Klokov L.;

3. Разработать технологию получения и провести валидацию технологического процесса получения экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*;

4. Изучить безопасность и профиль фармакологической активности экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*;

5. Провести технико-экономическое обоснование получения растительной фармацевтической субстанции.

Объекты исследования: растительное сырье *Th. marschallianus* Willd. и *Th. seravschanicus* Klokov L., экстракты *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*.

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

Научная новизна

Впервые:

- определены диагностические морфолого-анатомические признаки ЛРС *Th. marschallianus* Willd. и *Th. seravschanicus* Klokov L. в сравнительном аспекте, позволяющие проводить идентификацию исследуемых видов;

- изучен химический состав водно-спиртовых экстрактов исследуемых двух видов тимьянов с использованием современных физико-химических методов (ОФ-ВЭЖХ/ФД, ВЭЖХ/ИЭН-ККВ-МС/МС и ГХ-МС). Были проведены сравнительные фитохимические исследования водно-спиртовых экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*. Методы RP-HPLC/PDA и HPLC/ESI-QTOF-MS показали некоторые различия в составе двух экстрактов. HPLC/ESI-QTOF-MS методам идентифицировали в составе *Th. marschallianus* - 21, *Th. seravschanicus* - 15 соединений. В составе водно-спиртового экстракта *Th. marschallianus* выявлены 11 флаваноидов, из них 9 флавонов и 2 флаванон. Среди флавонов идентифицировали лютеолин и их гликозиды,

лютеолин-7-*O*-рутинозиды, лютеолин-7-*O*-глюкозиды, лютеолин-7-*O*-глюкурониды, лютеолин-7-*O*-дипентозиды и лютеолин-7-*O*-(6"-3-гидрокси-3-метилглутарил)-глюкозиды, апигенин и их гликозиды, апигенин-7-*O*-глюкозиды, апигенин-7-*O*-глюкурониды и апигенин-7-*O*-рамноглюкурониды, а так же диосметин глюкурониды. Было подтверждено присутствие эриодиктиола и нарингенина среди флавононов. Водно-спиртовой экстракт *Th. seravschanicus* содержит восемь флавоноидных соединений, шесть из которых являются флавонами: лютеолин-7-*O*-рутинозид, лютеолин-7-*O*-глюкозид, лютеолин-7-*O*-глюкуронид, лютеолин-7-*O*-(6"-3-гидрокси-3-метилглутарил)-глюкозид, апигенин-7-*O*-глюкуронид и диосметин глюкуронид. Были идентифицированы соединения эриодиктиола и нарингенина из группы флавононов. Количественное определение состава экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus* полифенольных соединений проводился методом ОФ-ВЭЖХ/ФД. Среди фенольных кислот у *Th. marschallianus* выявлено преобладание протокатеховой кислоты ($2,08 \pm 0,01$ мг/г сухого экстракта), в *Th. seravschanicus* доминировали розмариновая ($3,33 \pm 0,01$ мг/г сухого экстракта) и протокатеховая кислоты ($3,06 \pm 0,01$ мг/г сухого экстракта). В составе *Th. seravschanicus* установлено значительно более высокое содержание флавоноидов, чем в *Th. marschallianus*. В целом содержание большинства соединений у *Th. seravschanicus* было в три раза выше, чем у *Th. marschallianus*. Общее содержание полифенолов (ТРС) было показано в пересчете на галловую кислоту (GAE), этот показатель было несколько выше в *Th. seravschanicus* ($228,83 \pm 39,44$ мг GAE/г) по сравнению с *Th. marschallianus* ($186,01 \pm 16,11$ мг GAE/г);

- был проведен анализ летучих соединений гексановых фракции экстрактов обоих видов тимьяна методом ГХ-МС и идентифицированы в составе *Th. seravschanicus* – 14 и *Th. seravschanicus*-15 соединений. Оба вида характеризовались наличием двух монотерпеновых спиртов: тимола и карвакрола. Летучая фракция *Th. marschallianus* отличалась наличием нескольких сесквитерпеноидов (β -бисаболен, спатуленол, виридифлорол) и эвгенола (фенилпропаноиды). Летучие фракции *Th. seravschanicus* состояли, в основном из монотерпеноидов. Помимо указанного тимола и карвакрола, было подтверждено присутствие *p*-цимола, лимонена, карвона и тимохинона. В двух экстрактах гексановые фракции характеризовались наличием жирных кислот и их эфиров. *Th. marschallianus* в летучей фракции были обнаружены гексадекановая, линолевая, линоленовая кислоты и их этиловые эфиры. В летучей фракции *Th. seravschanicus* все метиловые эфиры жирных кислот были идентифицированы;

- исследованы профиль фармакологической активности, установлено, что оба изученных вида обладают безопасностью и имеют определенный уровень биологической активности. Оба экстракта показали схожие антиоксидантные свойства с точки зрения активности удаления DPPH: EC₅₀ показывает для *Th. marschallianus* - $24,23 \pm 0,29$ г/мл и для *Th. seravschanicus*- $21,47 \pm 1,63$ г/мл. Антиоксидантная активность двух экстрактов, определяемая АП (индекс антиоксидантной активности): для *Th. marschallianus* - $2,45 \pm 0,03$ и *Th.*

seravschanicus - $2,78 \pm 0,21$. Чувствительность водно-спиртового экстракта *Th. seravschanicus* (МИК=0,625-10 мг/мл) к стандартным штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий был выше, чем *Th. marschallianus* (МИК = 2,5-10 мг/мл). Следует отметить, что водно-спиртовый экстракт *T. seravschanicus* показал высокую активность против *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (МИК = 0,625 мг/мл), для *Th. marschallianus* показатель МИК против данного вида микроорганизма составляло 2,5 мг/мл. Было обнаружено, что оба экстракта проявляют одинаковую активность в отношении стандартных штамм дрожжевых грибов рода *Candida* (МИК = 5 мг/мл), при этом фунгицидная активность МФК/МИК экстрактов варьировалась в интервале 2 – 4;

- разработан новый способ получения экстрактов из сырья *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*, позволяющий получить экстракты с максимальным высвобождением биологически активных веществ в масштабе опытно-промышленного производства на ТОО «Fitoleum», г. Есик, Республика Казахстан;

- получены растительные фармацевтические субстанции фармакопейного качества и проведено технико-экономическое обоснование.

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

Результаты комплексного фармакогностического исследования ЛРС *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus* в сравнительном аспекте;

Результаты экспериментального обоснования разработки оптимальной технологии получения растительных фармацевтических субстанций на основе ЛРС *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus* с максимальным выходом БАВ;

Результаты исследований химического состава экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus* в сравнительном аспекте;

Результаты исследований безопасности и профиля фармакологической активности водно-спиртовых экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*;

Трансфер технологии и валидационная оценка опытно-промышленного производства экстрактов *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*;

Технико-экономическое обоснование производства фитосубстанции *Th. seravschanicus*.

Практическая значимость исследования:

Расширение фармакопейных видов тимьяна для введения в медицинскую практику здравоохранения Республики Казахстан.

Разработаны и внедрены технологические инструкции по сбору и заготовке сырья, произведены опытно-промышленные серии в фармацевтической компании ТОО «Fitoleum» г. Есик, Республика Казахстан, (Нормативный документ «Тимьян маршалла трава» от 21.05.2018 года и Нормативный документ «Тимьян зеравшанский трава» от 21.05.2018 года);

Разработан способ получения растительной фармацевтической субстанции из *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus*, позволяющий выделить биологически активные вещества с максимальным выходом на предприятии

ТОО «Fitoleum» в опытно-промышленном масштабе (Акт внедрение от 08.10.2018 года);

Разработаны и утверждены технологические регламенты на получение и производство растительных фармацевтических субстанций из *Th. marschallianus* и *Th. seravschanicus* на ТОО «Fitoleum», г. Есик, Республика Казахстан, проведена валидация технологического процесса производства (Приложения М и Н);

Разработана способ экстракции с активностью в отношении грамотрицательных бактерий *Helicobacter pylori*, приоритет проведенных исследований защищен патентом на полезную модель № 6830 «Способ получения экстракта из тимьяна», зарегистрированным в Государственном реестре полезных моделей РК 04.02.2022 года (Приложение П) и авторским свидетельством №41427 от 21.12.2023 года (Приложение Р);

Результаты исследования антибактериальной, противогрибковой и антиоксидантной активности водно-спиртовых экстрактов *Thymus seravschanicus* и *Thymus marschallianus* были внедрены в научно-образовательный процесс кафедры фармацевтической микробиологии Медицинского университета г. Люблин (Польша), результаты фармакогностического изучения данных видов ЛРС внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники Школы фармации КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова (Акты внедрения, Приложения С и Т) .

Личный вклад автора

Все результаты диссертационного исследования получены автором самостоятельно и являются личным вкладом докторанта в фармацевтическую науку.

Достоверность результатов, основных положений, выносимых на защиту, выводов и заключений, сформулированных в диссертационной работе обоснована значительным объемом экспериментального материала, полностью подтверждаются результатами собственных исследований, проведенных в лабораторных и производственных условиях, с использованием современных приборов и точных методов измерений, а также сопоставлением с литературными данными.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены и опубликованы в материалах международных конференций: Международной научно-практической конференции «Современные методы коррекции угревой болезни и других проблем кожи в косметологической практике» (г. Харьков, Украина, 2018 г.); VII научно-практической конференция с международным участием «Приоритеты фармации и стоматологии – от теории к практике» (г. Алматы, Казахстан, 2019 г.); Международной конференции «Современная наука. Управление и стандарты научных исследований» (Прага, Чехия, 2020 г.);

Сведения о публикациях

По результатам исследований опубликовано 9 научных работ, в том числе: статья в международном рецензируемом научном журнале, входящем в базу данных Scopus и Web of Science Core Collection – 1; статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК - 4; тезисы и статьи на международных научно-практических конференциях (Украина, Кыргызстан, Казахстан) - 4; патент на полезную модель – 1, авторская свидетельство на установление фармакологического профиля – 1.

Связь задач исследований с планом научных программ

Диссертационная работа выполнена по направлению развития фармацевтической промышленности, реализации Комплексного плана развития фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы, а также в рамках инициативного проекта НАО «КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова» «Изучение этнофармацевтической флоры Казахстана» №0115РК0245 от 10.07.2015 г.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 44 таблиц, 48 рисунков, список литературы, включающий 163 источников, а также 18 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвященного материалам и методам исследования, трех разделов собственных исследований, выводов и заключения.