ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Старчак Юлия Анатольевна

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН (THYMUS L.) КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОПРЕПАРАТОВ

Специальность: 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
д.ф.н., проф. В.Н. Бубенчикова

Курск - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ…….. 5
ГЛАВА 1 РАСТЕНИЯ РОДА ТИМЬЯН КАК ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ …… 18
1.1Ботаническая характеристика растений рода тимьян флоры средней полосы России …… 18
1.2 Химический состав растений рода Тимьян флоры средней полосы России…… 25
1.2.1 Эфирное масло…….……. 25
1.2.2 Фенольные соединения…… 41
1.2.3 Другие классы природных соединений…….. 48
1.3 Применение растений рода Тимьян флоры средней полосы России в научной и народной медицине…….. 51
1.4 Технология получения жидкого экстракта тимьяна ползучего и его стандартизация……. 65
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ…….. 72
2.1Характеристика объектов исследования……. 72
2.2 Фитохимический анализ…….. 75
2.2.1 Исследование эфирного масла……. 75
2.2.2 Исследование жирнокислотного состава…… 77
2.2.2.1Приготовление водно-спиртовых извлечений и разделение природных соединений……. 77
2.2.2.2 Качественное определение фенольных соединений…… 78
2.2.2.3 Идентификация соединений фенольной природы…….. 81
2.2.2.4 Исследование фенольных соединений методом ВЭЖХ…… 83
2.2.2.5 Приготовление водных извлечений……. 84
2.2.2.6 Исследование дубильных веществ……. 85
2.2.3 Исследование тритерпеновых соединений…… 86
2.2.4 Исследование жирнокислотного состава…… 87
2.2.5 Исследование углеводов…….. 88
2.2.5.1 Качественное определение свободных и связанных сахаров…… 88
2.2.5.2 Выделение полисахаридных комплексов……. 89
2.2.5.3 Кислотный гидролиз…….. 90
2.2.5.4 Хроматографический анализ……. 90
2.2.5.5 Количественное изучение моносахаридного состава……. 91
2.2.5.6 Определение количественного содержания функциональных групп пектиновых веществ…… 92
2.2.6 Исследование аминокислотного состава…….. 93
2.2.7 Изучение органических кислот …….. 94
2.2.8 Исследование минерального состава…….. 96
2.3 Фармакологические и токсикологические методы исследования……. 96

2.3.1 Изучение острой токсичности…… 97
2.3.2 Изучение отхаркивающего действия…….. 97
2.3.3 Изучение противовоспалительной активности…… 98
2.3.4 Изучение ангиопротекторного действия…… 99
2.3.5 Изучение антибактериальной активности……. 100
2.3.6 Изучение антиоксидантной активности…… 101
2.4 Методик стандартизации сырья…….. 102
2.5 Исследование технологических характеристик лекарственного растительного сырья…… 103
2.6 Статистическая обработка данных…… 104
ГЛАВА 3 ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН…….. 105
3.1 Эфирное масло…… 106
3.2 Исследование фенольных соединений …… 116
3.2.1 Исследование фенольных соединений методами газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии…….. 117
3.2.2 Выделение фенольных соединений…….. 124
3.2.3 Идентификация выделенных фенольных соединений…… 130
3.3 Тритерпеновые соединения……..... 164
3.3.1 Качественное и количественное изучение тритерпеновых соединений……..... 164
3.3.2 Выдление и исследование тритерпеновых соединений……..... 166
3.4 Исследовани жирнокислотного состава ……... 169
3.5 Изучение углеводных производных…….. 175
3.5.1 Результаты исследования свободных сахаров…….. 175
3.5.2 Результаты определениясвязанных сахаров (гликозидов)……. 176
3.5.3 Результаты определения полисахаридов……. 176
3.5.4 Выделение полисахаридных комплексов……. 176
3.5.5 Результаты исследования выделенных полисахаридных комплексов…… 178
3.6 Аминокислотный состав……..... 183
3.7 Исследование органических кислот…… 187
3.7.1 Исследование органических кислот методом ГЖХ……..... 187
3.7.2 Количественное определение органических кислот……. 188
3.8 Изучение минерального состава растений рода тимьян…….. 188
ГЛАВА 4 МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН ……...…….. 196
4.1 Морфологические исследования……. 197
4.2 Изучение микродиагностически признаков сырья…… 214
ГЛАВА 5 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН …...…… 302
5.1 Стандартизация сырья растений рода тимьян в соответствии с содержанием флавоноидов …… 303

5.2 Установление числовых показателей…… 318
5.3 Изучение возможности стандартизации растений рода тимьян по содержанию суммы гидрооксикоричных кислот ……. 331
5.4 Разработка фармакопейых статей на растительное сырье тимьянов…… 347
ГЛАВА 6 ИССЛЕДОВАНИЕФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ……..... 354
6.1 Определение острой токсичности настоев из растений рода тимьян…… 354
6.2 Отхаркивающее действие настоевиз растений рода тимьян…… 356
6.3 Изучение противовоспалительной активности растений рода тимьян…… 358
6.4 Изучение влияниянастоев на проницаемость капилляров……..... 361
6.5 Изучение антиоксидантной активности растений рода тимьян…….. 363
6.6 Изучение антибактериальной активности настоев и эфирного масла полученных из растений рода тимьян……..... 365
6.7 Совершенствование технологии жидкого экстракта чабреца……..... 371
6.7.1 Изучение технологических характеристик сырья и разработка жидкого экстракта вакуум-фильтрационным способом……..... 372
6.7.2 Стандартизация жидкого экстракта тимьяна ползучего…… 379
6.7.3. Сравнительное изучение отхаркивающей активности жидкого экстракта тимьяна ползучего, полученного различными методами……. 382
6.8 Способ получения олеаноловой кислоты из травы тимьяна Палласа…… 383
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…… 387
ВЫВОДЫ …… 392
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…….. 396
ПРИЛОЖЕНИЯ…… 433
Приложение №1 Акт внедрения в работу ООО Фирма «Здоровье» «Методика качественного обнаружения эфирного масла методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»…….. 434
Приложение №2 Акт внедрения в работу ООО Фирма «Здоровье» «Методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»……. 435
Приложение №3 Акт внедрения в работу Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волгоградского государственного медицинского университета» «Методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»……. 436
Приложение №4 Акт внедрения в работу ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинского государственного университета им.К.Л.Хетагурова» «Методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье

«Чабреца трава»…….. 437
Приложение №5 Акт внедрения в работу ООО Фирма «Здоровье» «Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца ползучего…… 438
Приложение №6 Проект нормативного документа «Тимьяна Маршалла трава»…… 439
Приложение №7 Фармакопейная статья ГФ XIII издания «Чабреца трава» ……. 454
Приложение №8 Инструкция по сбору и сушке травы чабреца (тимьяна ползучего)…… 468

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из важнейших задач современной фармацевтической науки является изыскание эффективных лекарственных средств на основе природных соединений. При этом особое значение придавалось изучению дикорастущих лекарственных растений и использованию их как в виде лекарственного растительного сырья, так и для получения лекарственных препаратов.

Вместе с тем сокращение запасов лекарственного растительного сырья приводит к необходимости расширения сырьевой базы официнальных лекарственных растений за счет дополнительных растительных источников и комплексного их использования.

С этой точки зрения несомненный интерес представляют растения рода тимьян *(Thymus)* семейства яснотковые *(Lamiaceae).*

В России официнальными растениями из рода тимьян являются два вида: тимьян ползучий (чабрец) *Thymus serpyllum L.* и тимьян обыкновенный *Thymus vulgaris L.*, которые рекомендованы к применению в качестве отхаркивающего, противомикробного, анальгетического средства. Жидкий экстракт, полученный из тимьяна ползучего и тимьяна обыкновенного входит в состав препарата «Пертуссин», а жидкий экстракт травы тимьяна ползучего является составной частью препарата «Бронхипрет». Кроме того, жидкий экстракт травы чабреца входит в состав комплексного препарата «Пассифит», используемого в качестве седативного средства.

Родина тимьяна обыкновенного - страны Средиземноморья, где он произрастает в диком виде. Основным ареалом тимьяна ползучего (чабреца) является регион Европейской части России, однако, ресурсы его на данной территории сильно истощены. В настоящее время на территории областей средней полосы России чабрец произрастает единично, но наряду с ним на

этих территориях распространены около 7-8 близких видов, основными из которых являются тимьян меловой, тимьян Маршалла, тимьян Палласа, тимьян блошиный.

Заготовители сырья чабреца, как правило, не различают виды тимьянов, поэтому сырье чабреца может быть представлено и другими видами, а также их сочетанием в различных соотношениях. В то же время использование близких к тимьяну ползучему видов в качестве источника сырья до настоящего времени не установлено, они не разрешены к официнальному применению. Поэтому не вызывает сомнения актуальность изучения близких видов.

Существовавшая нормативная документация на траву чабреца качество сырья рекомендовала определять только по содержанию экстрактивных веществ, в ней отсутствовали методы качественного и количественного определения действующих веществ. В связи с чем, является актуальным разработка новых подходов к стандартизации сырья чабреца с целью создания современной документации.

Необходимо отметить, что в ГФ XI издания подлинность травы чабреца при микроскопическом исследовании устанавливается только по листьям, в то время как современные требования предусматривают определение микроскопических признаков для всех частей сырья, представляющих собой траву. Поэтому практический интерес представляло проведение морфолого-анатомических исследований, т.к. они, прежде всего, позволят определить диагностическую характеристику отдельных видов, а так же подлинность сырья растений рода тимьян.

Не менее важным является совершенствования технологии получения жидкого экстракта и оптимизации методик его анализа.

Степень разработанности проблемы. Среди растений рода тимьян большое количество исследований как отечественных, так и зарубежных авторов было посвящено изучению эфирного масла, (Банаева Ю.А,

Ткачев А.В., Трошин Д.А., Сур С.В., Калинкина Г.И., Березуцкий М.А., Дембицкий А.Д., Дурнова Н.А., Моцкуте Д., Фуклева Л.А., Зарубина Л.А., Кузьменко А.Н., Аветисян Р.Г., Бузук А.Г., Касумов Ф.Ю., Пупыкина К.А., Jia H.L., Sharatz E., Hörsteron H., Groendahl E.A., Senatore F., Stahl-Biskup E. и др.). Однако, имеющиеся в литературе данные показывают, что качественный состав и количественное содержание его компонентов могут изменяться как внутри видов, в зависимости от места произрастания, освещенности, времени сбора, так и между различными видами. Кроме того, у ряда растений рода тимьян: (тимьяна мелового, тимьяна Черняева) состав и содержание эфирного масла практически не изучены. В растениях рода тимьян изучены и фенольные соединения, в основном отечественными учеными: Литвиненко В.И., Алексеевой Л.И., Пупыкиной К.А., Буданцевым А.Л., Медведевым Ю.В., Куркиным В.А., Фуклевой Л.А., Поповой Н.В., Марковой О.М., Тихоновым В.Н., Kulisic T., Osinska E. и др. Наиболее изученными в отношении фенольных соединений оказались тимьян ползучий, тимьян двуликий тимьян Маршалла, тимьян блошиный. В них были определены фенолокислоты и оксикоричные кислоты, среди которых наиболее часто встречается розмариновая кислота; а также флавоноидные соединения, среди которых преобладают флавоны. Согласно литературным данным стандартизацию растений рода тимьян многие ученые предлагали проводить по содержанию флавоноидов, но в качестве стандартного образца ими предложены различные флавоноидные соединения: кверцетин (Алексеева Л.И.), рутин (Марахова А.И), лютеолин (Маркова О.М.).

В литературе описываются исследования, посвященные изучению тритерпеновых соединений тимьяна ползучего и тимьяна двуликого (Симонян А.В., Багдаа Д.). В тимьяне ползучем изучен комплекс минеральных элементов, в семенах найдено жирное масло (Кузьменко А.Н.). Отдельные минеральные элементы найдены и в тимьяне Маршалла

(Пупыкина К.А., Калошина Н.А.). Другие же классы биологически активных веществ в данных растениях практически не изучены.

В доступной литературе найдены лишь единичные, и то спорные, данные по морфолого-анатомическому изучению растений данного рода. Фармакологическая активность видов тимьяна флоры средней полосы России также изучена недостаточно. Качество сырья тимьяна ползучего оценивалось только по содержанию экстрактивных веществ. Разработке методов стандартизации лекарственного растительного сырья посвящены работы отечественных авторов: Куркина В.А., Самылиной И.А., Сорокиной А.А., Сокольской Т.А и др. Требует совершенствования и технология жидкого экстракта тимьяна ползучего, так при существующей технологии растительное сырье истощается лишь на 50% (Зыкова Н.А., Алаева Н.А.).

Цель и задачи. Целью исследования явилось фармакогностическое изучение растений рода тимьян, с целью экспериментально-теоретического обоснования их использования для получения фитопрепаратов.

Для решения поставленных целей были обозначены следующие задачи:

1. Обобщить современные данные по распространенности, сырьевым ресурсам, изучению химического состава, фармакологическим исследованиям тимьянов, широко распространенных во флоре средней полосы России;
2. Провести сравнительное исследование биологически активных веществ растений рода тимьян;
3. Выделить и изучить эфирное масло, установить основные компоненты эфирного масла;
4. Провести выделение и идентификацию фенольных соединений;
5. Провести изучение тритерпеновых соединений, выделить основные компоненты и установить их структуру;
6. Провести сравнительное морфолого-анатомическое изучение исследуемых видов с целью установления диагностических признаков сырья;

7. Разработать показатели качества и методики количественного анализа для исследуемых видов сырья тимьянов, а также разработать нормативную документацию на растительное лекарственное сырье тимьяна ползучего и перспективные виды;

8. Провести фармакологические исследования настоев и фитокомплексов, полученных из изучаемых растений;

9. Совершенствовать технологию получения жидкого экстракта чабреца, провести его стандартизацию;

10.Выявить дополнительные источники сырья тимьяна ползучего за счет внедрения близкородственных видов.

Научная новизна. Проведенные исследования позволили теоретически обосновать и экспериментально подтвердить возможность практического использования изученных растений рода тимьян наряду с официнальным видом – тимьяном ползучим (чабрецом), что позволит расширить номенклатуру растительного сырья из числа близкородственных к чабрецу видов.

Проведено выделение эфирного масла из растений рода тимьян, выход которого составил от 0,15% (тимьян двуликий) до 1,72% (тимьян Маршалла). С помощью метода газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и использованием данных библиотеки масс-спектров NIST05 и WILLEY 2007 исследован компонентный состав эфирного масла и идентифицировано 109 соединений. В результате исследованные растения по содержанию эфирного масла разделились на 6 хемотипов: 1-α-терпинеола; 2-неролидола, карвакрола, 3-карвакрола, кариофиллена, тимола, метилкарвакрола; 4-карвакрола, борнеола, тимола, β-бисаболена; 5-цитраля; 6-тимола, карвакрола. Компонентный состав эфирного масла тимьяна мелового, тимьяна Черняева исследован впервые.

Впервые методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии изучен жирнокислотный состав травы растений рода тимьян, при этом

идентифицировано 20 жирных кислот. Установлено, что среди насыщенных кислот преобладают пальмитиновая и бегеновая кислоты; ненасыщенные кислоты представлены преимущественно линолевой, линоленовой, арахидоновой и олеиновой кислотами.

Проведено сравнительное исследование тритерпеновых соединений методом тонкослойной хроматографии. Сравнением с достоверными образцами в исследуемых видах сырья идентифицированы урсоловая и олеаноловая кислоты. Урсоловая кислота найдена в 6 видах: тимьяне меловом, тимьяне ползучем, тимьяне блошином, тимьяне Маршалла, тимьяне двуликом, тимьяне Черняева, а олеаноловая кислота в 5 видах: тимьяне Палласа, тимьяне меловом, тимьяне ползучем, тимьяне Маршалла и тимьяне Черняева. Тритерпеновые сапонины определенны количественно, их содержание колебалось от 0,40% до 4,60%. Проведено выделение и установление структуры урсоловой и олеаноловой кислот. В большинстве видов исследуемых тимьянов тритерпеновые соединения изучены впервые.

С использованием различных методов хроматографии (тонкослойной, бумажной, ВЭЖХ, газожидкостной хромато-масс-спектрометрии) идентифицировано 27 фенольных соединений, из них 7 фенолокислот и 5 оксикоричных ксилот, 3 кумарина, 12 флавоноидных соединений. Большинство фенольных соединений в исследуемых растениях идентифицировано впервые. Проведены выделение в индивидуальном состоянии и идентификация 20 веществ фенольной природы. Среди выделенных фенольных соединений идентифицированы фенолокислоты: ванилиновая, n-оксибензойная, галловая; оксикоричные кислоты: кофейная, феруловая, n-кумаровая, розмариновая. Флавоноидные соединения представлены флавонами, их агликонами и монозидами. Выделенные агликоны разделились на два ряда: В-незамещенные: байкалеин (5,6,7-триоксифлавон) и В-замещенные. В-замещенные флавоны по структурным особенностям варьируют от 4'-замещенных

(5,7,4'-триоксифлавон или апигенин) до 3', 4'-замещенных (5,7,3',4' тетраоксифлавон или лютеолин). При дополнительных замещениях в этих соединениях окси- и метокси- группами образуются ряды производных апигенина: скутеллареина (6-оксиапигенина), изоскутеллареина (8-оксиапигенина), акацетина (5,7-диокси, 4'-метоксифлавона) и производных лютеолина: норнепетина (6-оксилютеолина), гиполеатина (8-оксилютеолина), хризоэриола (5,7,4'-триокси, 3'-метоксифлавона), диосметина (5,7,3'-триокси, 4'-метоксифлавона). Флавоновые гликозиды представлены 7-О-моногликозидами: цинарозидом, космоссиином, скутелларином.

Установлено, что хемотоксономическими маркерами растений рода тимьян среди оксикоричных кислот является розмариновая кислота, среди флавонов – цинарозид (лютеолин-7-О-глюкозид), что можно использовать для целей стандартизации.

Впервые изучены углеводные комплексы, в составе которых обнаружены как свободные, так и связанные сахара. Проведено выделение водорастворимых полисахаридных комплексов и пектиновых веществ. Изучен их качественный и количественный состав. Впервые исследован состав аминокислот и органических кислот растений рода тимьян. В исследуемых растениях установлено наличие 19 минеральных элементов.

Впервые проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование 7 видов тимьянов, выявлены морфологически и микродиагностические признаки, позволяющие проводить диагностику сырья морфологически близких видов.

Впервые проведен фармакологический скрининг 6 видов тимьянов в сравнении с тимьяном ползучим. Впервые установлено наличие отхаркивающей, противовоспалительной, ангиопротекторной активностей. Изучена антибактериальная активность настоев и эфирного масла, полученных из исследуемых растений. Экспериментально установлена

антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений. Наиболее выраженная антиоксидантная активность проявляется у извлечений, полученных с помощью спирта этилового 70% и 50%.

Результаты изучения химического состава явились основанием для разработки унифицированной методики качественного и количественного определения флавоноидов в сырье тимьяна ползучего и других видах, а также в жидком экстракте в перерасчете на доминирующий флавоноид - цинарозид. Впервые предложена спектрофотометрическая методика определения гидроксикоричных кислот в перерасчете на розмариновую кислоту для растений рода тимьян.

Усовершенствована технология получения жидкого экстракта тимьяна ползучего с использованием вакуум-фильтрационного способа экстрагирования.

Научная новизна исследований защищена патентом: «Способ получения олеаноловой кислоты» (№ 2538213).

Таким образом, теоретически обоснована и экспериментально подтверждена возможность расширения сырьевой базы тимьянов и создание на их основе фитопрепаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведения химического анализа, фармакологических, технологических исследований показывают перспективу внедрения в официнальную медицину растительного сырья изученных видов тимьяна наряду с тимьяном ползучим, что приведет к расширению номенклатуры растительного сырья за счет применения близкородственных видов.

Результаты проведенного фитохимического анализа расширят сведения о химическом составе растений рода тимьян.

Разработана и апробирована спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов в перерасчете на цинарозид и суммы

гидроксикоричных кислот в перерасчете на розмариновую кислоту. Установлены валидационные характеристики разработанных методик.

Проведена стандартизация цельного, измельченного и порошкованного сырья травы тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла.

Результаты морфолого-анатомических исследований позволили установить макроскопические и микродиагностические признаки, которые в дальнейшем рекомендованы для определения подлинности измельченного и порошкованного сырья чабреца, включенные в проект ФС «Чабреца трава».

Внедрение в практику. Проведенные исследования позволили разработать и утвердить:

- фармакопейную статью «Чабреца трава», включенную в Государственную фармакопею России XIII издания;

- «Инструкцию по сбору и сушке травы чабреца (тимьяна ползучего)», рассмотренную и утвержденную комиссией по стандартизации ВИЛАР;

- разработан проект нормативного докумена «Тимьяна Маршалла трава», который согласован и апробирован на ООО Фирма «Здоровье».

Разработанные в результате проведенных исследований методики апробированы и внедрены в работу ООО Фирма «Здоровье»: «Методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава», «Методика качественного обнаружения эфирного масла методом ТСХ в сырье «Чабреца трава», «Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца».

Фрагменты настоящего диссертационного исследования находят применение в научной и учебной работе кафедры фармакогнозии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», фармацевтического факультета «Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова».

Научные исследования, проведенные в ходе выполнения диссертационной работы, включены в монографию В.Н. Бубенчиковой, Ю.А. Старчак «Тимьяны флоры Центрального Черноземья».

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является поиск и анализ литературных данных на основе филогенетического родства по выбору объектов исследования, требующих расширения сырьевой базы; изученность их химического состава и фармакологических свойств, применения в народной медицине, ресурсная база; постановка целей и задач по экспериментальному обоснованию их практического использования, изучение химического состава и фармакологических свойств, стандартизация сырья, разработка нормативной документации на растительное сырье, обобщение материалов в виде выводов, определяющих теоретическое и практическое значение диссертационной работы.

При выполнении фармакогностического исследования применяли физико-химические (УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, газожидкостная хромато-масс-спектрометрия), химические, фармакологические, макро- и микроскопические, а также статистические методы анализа.

Положения, выносимые на защиту:

- теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение расширения ресурсной базы тимьянов для получения фитопрепаратов;

- результаты исследования состава биологически активных веществ 7 видов тимьяна;

- результаты изучения фенольных соединений и тритерпеновых соединений, методы их выделения и идентификации;

- результаты сравнительного морфолого-анатомического изучения тимьянов флоры средней полосы России;

- результаты фармакологических исследований;

- результаты разработки методик анализа, характеристик качества сырья тимьянов;

- результаты совершенствования технологии жидкого экстракта тимьяна ползучего.

Степень достоверности. Научные положения, выводы диссертационной работы основываются на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, что подтверждается большим количеством таблиц, рисунков, схем хроматограмм. Все результаты исследований обработаны статистически в соответствии с требованиями ГФ XI с помощью программы «Microsoft Excel». Различия между группами считались статистически значимыми при P 0,05. Разработанные методики количественного определения валидированы.

Апробация результатов. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики», посвященная 45-летию фармацевтического факультета КГМУ (27 октября 2011 г., КГМУ, г. Курск); III, IV международных научно-практических конференциях «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (г. Владикавказ, 2012 г., 2013 г.); II Международном конгрессе «Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации» (7-10 июня 2012 г., г. Москва); II международной научно-практической конференции «Современные проблемы медико-биологической и фармацевтической промышленности. Развитие инновационного и кадрового потенциала Пензенской области» (9-10 ноября 2012 г., г. Пенза); XX, XXI XXII, XXIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2013 г., 2014 г., 2015 г., 2016 г.); VIII, IX Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные

аспекты» г. Москва 2012 г., 2015 г.); международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (25-26 июня 2015 г., г. Минск).

Связь темы исследований с планом научных работ. Диссертационная работа выполнена по плану научно-исследовательских работ государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» по теме «Изучение лекарственных областей Центральной России и вопросы их рационального использования» (номер государственной регистрации № 01201460860).

Публикации. По результатам диссертационной работы были опубликована 61 работа, в том числе 23 статьи в журналах перечня ВАК Министерства образования и науки РФ; 1 патент РФ на изобретение «Способ получения олеаноловой кислоты» №2538213, опубл. 10.01.15., Бюл. №1, 1 монография «Тимьяны флоры Центрального Черноземья». Опубликована 1 фармакопейная статья «Чабреца трава» в Государственной фармакопеи РФ XIII издания.

Личный вклад автора. Автором лично выбраны объекты исследования, направление исследований, поставлены цели и задачи исследования. Автором проведен научно-информационный поиск, проведены экспериментальные исследования. В сборе и обобщении полученных результатов доля автора является определяющей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02-фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пунктам 3, 5, 6, 7.

Работа представляет итог исследований, выполненных автором в сотрудничестве с кафедрой общей и фармацевтической химии Орловского государственного университета, кафедрами фармакогнозии и ботаники, микробиологии, вирусологии и иммунологии, НИИ экологической медицины Курского государственного медицинского университета,

Национальным фармацевтическим университетом Министерства охраны здоровья Украины, а также в сотрудничестве с центром контроля качества и сертификации лекарственных средств центра обеспечения медицинской техникой и имуществом министерства обороны Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), четыре главы экспериментальных исследований, заключение, выводы, список литературы, приложения. Диссертация размещена на 470 страницах печатного текста, где имеется 75 таблиц, 234 рисунка. Список литературы содержит 349 литературных источников, 63 из них иностранных авторов.

ГЛАВА 1 РАСТЕНИЯ РОДА ТИМЬЯН КАК ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

1.1Ботаническая характеристика растений рода тимьян флоры средней полосы России

Род тимьян - *Thymus L.* – принадлежит к семейству Яснотковые (*Lamiaceae*) и включает несколько сотен видов, распространённых почти по всей Евразии (кроме тропиков), в Северной Африке, на Канарских островах и доходящих на Северо-западе до Гренландии [267].

Род *Thymus L.* – один из наиболее крупных в семействе Lamiaceae. Во флоре СССР он представлен 136 видами [267].

В областях Средней полосы России произрастает 7-8 видов тимьянов [266, 268], относящееся к 2 секциям и 4 подсекциям:

Секция 1 Camptodromi A. Kern.

Подсекция 1 Isolepides
Тимьян Палласа
Тимьян меловой

Подсекция 2 Serpylla
Тимьян ползучий

Секция 2 Marginati A. Kern.

Подсекция 1 Marginate
Тимьян блошиный

Подсекция 2 Verticillati
Тимьян Маршалла
Тимьян двуликий
Тимьян Черняева

Жизненная форма растений рода тимьян - полукустарнички, с лежачими или восходящими, одеревеневшими стеблями (стволиками) и прямостоящими или приподнимающими травянистыми цветоносными ветвями, часто с лежачими бесплодными побегами, заканчивающими ползучими стволиками или отходящими сбоку от стволиков, реже без них. Листья весьма разнообразные по форме, величине и характеру жилкования, черешковые или реже сидячие, цельнокрайние или иногда зазубренные (постоянный признак у некоторых дальневосточных видов), по краю почти всегда, по крайней мере у основания, с ресничками. Прицветные листья сходные со стеблевыми или резко от них отличающиеся (в секции Subbracteatae Klok.), прицветники мелкие, линейно-ланцетные. Соцветие головчатое или удлинённое и прерванное, цветки в ложных мутовках.

Чашечка с цилиндрической или колокольной трубкой с 10(13) жилками; нижняя губа до основания двураздельная, с узкими яйцевидными, всегда реснитчатыми долями; верхняя - широкая, отклоненная, до $^1/_3$ – $^1/_2$ трёхлопастная, с ланцетными или треугольными зубчиками, по краю реснитчатыми или покрытыми мелкими щетинками, реже гладкими; зев чашечки при основании отгиба ограничен венцом из прямых щетинистых волосков. Венчик с короткой или более удлинённой трубкой и двугубым отгибом, лиловый, розовый или белый; верхняя губа на верхушке выемчатая, нижняя трёхлопастная, отклонённая. Тычинки в числе четырех, прямостоящие, от основания расходящиеся; пыльники двугнёздные, с довольно широким связником, столбик с шиловидными лопастями; плодики (орешки) эллипсоидальные или почти шаровидные [267].

Секция 1 *Camptodromi A. Kern.* Подсекция 1 *Isolepides:*

Тимьян Палласа (*Thymus Pallasianus H. Braun*) - многолетний полукустарничек, с толстоватыми стволиками, заканчивающимися плодущими побегами, и с довольно короткими, немногочисленными стелющимися бесплодными побегами, отходящими от стволиков.

Цветоносные ветви достигают 5-20 см высоты, густо олиственные, часто разветвленные и имеющие укороченные веточки в пазухах листьев, опушены под соцветием короткими, прижатыми вниз волосками. Листья безчерешковые, узколинейно-лопатчатые, (6)8-12(16) мм длиной, (0,5)0,75-1,5(2) мм шириной, наибольшая ширина отмечена у верхушки; по краю до середины или немного выше реснитчатые; поверхность листьев голая с мало заметными жилками, покрытая точечными желёзками. Цветки собраны в головчатое, компактное соцветие. Чашечка лиловая, узко-колокольчатая, 3,5-4мм длиной. Зубчики верхней губы чашечки имеют остро треугольную форму, почти одинаковые, их узкоплёнчатый край голый или реже мелко- щетинистой, без ресничек. Венчик ярко-лиловый, около 7 мм длиной, с короткой трубкой. Плод - ценобий. Плодики-орешки, имеющие коротко эллипсоидальную форму и прижатое основание (похожие на лимончик), до 1,25 мм длиной; поверхность плодиков мелко ямчатая [267].

Распространён в Европейской части России, Предкавказье и Северном Дагестане [267].

В Средней России встречается в чернозёмной полосе [153].

Произрастает на приречных песках [153, 267].

Тимьян меловой (*Thymus cretaceous Klok. et Shost.*) – многолетний полукустарничек с лежачими, но не укореняющимися, неправильно разветвлёнными стволиками, которые заканчиваются плодущим побегом; стелющиеся бесплодные побеги отходят от стволиков; цветоносные ветви 2-10 см высотой, опушённые под соцветием очень коротким волнистыми волосками. Листья черешковые, продолговато-эллиптические, 5-10 мм длиной, 1-2 (2,25) мм шириной, по краю у основания или в нижней четверти слабо реснитчатые. Поверхность листьев голая с малозаметными жилками и точечными железками, толстоватые; самые нижние листья на ветвях, с закруглённо ромбической пластиной и почти равным ей по длине черешком. Цветки собраны в головчатое, компактное соцветие; чашечка лиловатая,

имеет трубчато-колокольчатую форму и узкую трубку, 3,25 – 4 мм длиной. Зубчики верхней губы чашечки треугольные, туповатые, с голым краем без ресничек, редко с мелкими щетинками. Венчик около 7 мм длиной, лиловый, довольно яркий. Плод – ценобий. Плодики – орешки коротко эллипсоидальные, около 0, 75 мм длиной [267].

Распространён в Европейской части России [267].

В Средней России встречается в Белгородской, Воронежской, Курской, Липецкой областях [153].

Произрастает на меловых и скальных обнажениях [Флора, Маевский].

Подсекция 2 Serpylla:

Тимьян ползучий, чабрец, или Богородская трава (*Thymus serpyllum L.*) – полукустарничек высотой 2-10 см с прямостоячими или приподнимающими опушёнными под соцветием цветоносными побегами, отходящими от деревянистых ползучих укореняющихся стволиков, которые всегда оканчиваются лежачим бесплодным побегом; обычно образует дернинки. Листья тонкие, мягкие, с хорошо заметными жилками, линейные или эллиптические, длиной 6-10 мм и шириной 1,5-3 мм, с малозаметными точечными желёзками, с черешками, по краю до середины длиннореснитчатыми. Верхушечные листья у соцветия эллиптические, с угловатыми краями. Цветки собраны в головчатые соцветия. Цветоножки значительно короче чашечки, коротко волосистые. Чашечка узкоколокольчатая длиной 4-4,5 мм, густо опушенная. Три зубца верхней губы чашечки мелкие (средний более крупный), остротреугольные, отогнутые, реснитчатые по краям. Венчик яркий, розово-фиолетовый, редко белый. Плод – ценобий. Орешки коротко эллипсоидальные, гладкие, черно-бурые, длиной около 0,6 мм [267].

Европейско-сибирский вид. В России распространён в Европейской части, Западной Сибири, Забайкалье [153, 267].

В Средней России встречается во всех областях нечернозёмной полосы, южнее очень редко [153].

Растёт в сосняках, на их опушках, полянах, в степях, на песках, каменистых склонах [153, 267].

Секция 2 *Marginati A. Kern*. Подсекция 1 *Marginati*:

Тимьян блошиный (*Thymus pulegioides L.*) – многолетний полукустарничек, высотой 5-30 см. Стволики толстоватые, короткие, заканчивающиеся плодущим побегом. Цветоносные стебли восходящие, четырехгранные, опушённые только по рёбрам. Листья эллиптические или яйцевидные, с клиновидным основанием, короткочерешковые, при основании по краю реснитчатые; листья голые, желёзки мало заметные. Соцветие чаще головчатое, вытягивающееся к концу цветения, с 2-7 раздвинутыми сложными мутовками или прерванное. Чашечка лиловая, широко колокольчатая, во время цветения 3-3,5 мм длиной, при плодах до 4,5 мм длиной. Зубчики верхней губы чашечки остро треугольные, по краям реснитчатые. Венчик 4-6 мм длины, с удлинённой трубкой, снаружи почти голый, лиловый. Плод – ценобий. Орешки коротко эллипсоидальные 0,6-0,8 мм длиной, около 0,5 мм шириной [267].

Распространён в Европейской части России [267].

В Средней России встречается во всех областях [153].

Произрастает на лесных полянах, опушках, берегах рек, травянистых склонах, суходольных лугах, среди болот [153, 267].

Подсекция 2 *Verticillati:*

Тимьян Маршалла (*Thymus Marshallianus Willd.*) - многолетний полукустарничек, деревянистые стволики короткие или нередко почти неразвитые; бесплодные побеги приподнимающиеся у основания или прямостоячие; цветоносные ветви 12-37 см, обыкновенно около 25 см высотой, под соцветием опушённые длинными отстоящими волосками, в нижней части с коротким, вниз отогнутым опушением. Листья сидячие,

продолговато эллиптические, (12,5)15-24 (30) мм длиной, 2,5-5(7,5) мм шириной, с клиновидным основанием и несколько заострённой верхушкой, листья светло-зеленые, тонкие, имеющие малозаметные боковые жилки; край листьев лишь у основания с редкими ресничками; поверхность голая иногда негусто волосистая (*f. Hirsutus Klok.et Shost.)*; желёзки расположены часто, но мелкие и мало заметные. Соцветия обыкновенно удлинённые, до 15(18) см, и прерванные, с расставленными кольцами до 7 или в большем количестве, длина цветоножки равна чашечке; цветоножки волосистые. Чашечка колокольчатая, при цветках (2)2,25-2,75(3) мм, около 2,5 мм длиной, при плодах 3-3,5 мм длиной, имеющая короткую волосистую трубочку. Зубчики верхней губы чашечки имеют остроугольную форму, почти одинаковые, край их длиннореснитчатый. Венчик воронковидный, около 5 мм длиной, имеющий мало заметную трубку, бледно-лилового цвета. Плод – ценобий. Плодики - орешки, шаровидной формы, 0,5-0,7 мм в диаметре, почти черные [267].

Распространён в южной полосе Европейской части России, в Предкавказье, в лесостепной и степной зонах Западной Сибири [266, 267].

В Средней России встречается во всех областях чернозёмной полосы [153].

Произрастает на лугах, в степях, степных склонах, опушках и полянах, степных дубравах, реже каменистых обнажениях [153, 267].

Тимьян двуликий (*Thymus dimorphus Klok. et Shost.* – гибрид *Thymus marschallianus * Thymus cretaceus*) – полукустарничек, образующий довольно густые дерновинки. Стволики заканчиваются плодущим побегом, бесплодные побеги отходят от стволиков и непосредственно от корневища, лежачие до 30 см длины. Цветоносные побеги 5-23 см высотой, приподнимающиеся или восходящие, лишь под соцветием опушены густыми длинными оттопыренными волосками, ниже густо опушены короткими, вниз прижатыми волосками. Листья короткочерешковые, почти сидячие; форма

листьев ланцетная или продолговато-эллиптическая, 7(10)-17(20) мм длиной, 1,5-3 мм шириной, реснитчатые у основания, на верхушке тупые. Пластинка листа тёмно-зелёная, голая с несколько завёрнутыми вниз краями; точечные желёзки нечастые, но крупные, хорошо заметные. Соцветие удлинённо-головчатое или прерванное, коротко волосистое, иногда с примесью железистых волосков. Цветки в полумутовках. Чашечка 3,5-4,5 мм длиной, трубчато-колокольчатая с удлинённой волосистой трубкой. Зубчики верхней губы чашечки ланцетные, острые, край их длиннореснитчатый. Венчик 5-7 мм длины с узкой трубкой, розово-лиловый. Плод - ценобий. Орешки эллипсоидальные, 0,75-1 мм длины, чёрные [267].

Распространён в Европейской части России, Предкавказье [267].

В Средней полосе встречается в Белгородской, Воронежской, Курской, Липецкой, Тульской областях [153].

Наиболее крупные популяции известны в Липецке, в долине реки Дона и низовьях его притоков, где произрастают как гололистные, так и опушённые формы [153].

Произрастает по слабо задёрненным каменистым степям, щебнистым склонам долин и балок [153, 267].

Тимьян Черняева (*Thymus Czhernjajevii Klok. et Shost.* – гибрид *Thymus marschallianus * Thymus pallasianus*) – полукустарничек 10-20 см высотой. Стволики заканчиваются плодущими побегами, бесплодные побеги отходят от стволиков, восходящие или полегающие, обыкновенно короче плодущих. Цветоносные побеги 7-15(20) см высотой, приподнимающиеся или прямостоячие, опушены до основания густыми оттопыренными волосками. Листья почти сидячие; форма листьев ланцетная, продолговатая, с клиновидным основанием и тупой или закруглённой верхушкой; листья в нижней трети (или до середины) имеют реснички по краю, 10-14 мм длиной, 1,5-3 мм шириной, голые или слабо волосистые. Пластинка листа кожистая, плотная, с точечными желёзками. Нижние листья широкоэллиптические,

длинночерешковые, мелкие. В пазухах листьев развиты укороченные побеги. Соцветие удлинённое, обыкновенно прерванное. Цветки в полумутовках, чашечка 3-4мм длиной, колокольчатая, с короткой трубкой, зубчики верхней губы треугольно-ланцетные, острые по краю длиннореснитчатые. Венчик лиловый. Плод - ценобий. Плодики – орешки коротко эллиптические, около 0,75 мм длиной [267].

Распространён в Европейской части России [267].

В Средней России встречается в Воронежской, Курской, Липецкой, Тамбовской областях [153].

Произрастает по борам, задернённым супесям, в смешанных лесах [153, 267].

Как видно из приведенного обзора отдельные виды тимьянов легко образуют гибриды, при этом появляется большое количество переходных форм. При налегании ареалов отдельных видов тимьянов образуются устойчивые формы, имеющие гибридогенное происхождение и статус вида. В областях Центральной России это тимьян двуликий, тимьян Черняева, тимьян Леви [153].

Существование гибридов имеет важное значение для фармации, так как они могут использоваться для расширения сырьевой базы наравне с официнальными видами и увеличения номенклатуры лекарственного растительного сырья за счет близкородственных видов.

1.2Химический состав растений рода Тимьян флоры средней полосы России

1.2.1 Эфирное масло

Растения рода Тимьян известны, прежде всего, как источники эфирного масла. Наиболее полно из растений рода, произрастающих во флоре

Центрального Черноземья оно изучено у официнального вида – тимьяна ползучего (чабреца) (таблица 1).

Таблица 1 – Эфирное масло растений рода Тимьян флоры Центрального Черноземья

Часть растения	Выделенные соединения	Литература
1	2	3
Тимьян ползучий (Thymus serpyllum L.)		
Надземная часть	Эфирное масло, до 4,4%: • Трициклен • α-туйон • β-туйон • α-пинен • β-пиненкамфен • сабинен • сабинилацетат • цис-сабиненгидрат • транс-сабиненгидрат • цис-сабинол • транс-сабинол • 1-октен-3-ол • β-мирцен • α-фелландрен • бициклосесквифелландрен • 3-карен • α-терпинен • γ-терпинен • терпинолен • n-цимол • лимонен • 1,8-цинеол • транс-β-оцимен • цис-β-оцимен • аллооцимен • цис-β-терпинеол • транс-β-терпинеол • α-терпинеол • линалоол • линолилацетат • оксид цис-линалоола • цис-n-мент-2-ен-1-ол • пинокарвеол • камфора • борнеол • изоборнеол	22, 36, 206, 208, 239, 254, 272, 328

	• м-мент-1-ен-8-ол • терпинеол-4 • терпинилацетат • метиловый эфир тимола • пулегон • метиловый эфир карвакрола • цис-цитраль • цитронеллол • цитронеллаль • цитронеллилацетат • гераниол • геранилацетат • геранилбутират • гераниаль • транс-цитраль • 1-деканол борнилацетат • изоборнилацетат • тимол • карвакрол • эвкалиптол • α-копаен • β-бурбонен • β-элемен • γ-элемен • δ-элемен • кариофиллен • оксид кариофиллена • гумулен • эпоксид гумулена • аллоаромадендрин • γ-мууролен • α-мууролен • Т-муурол • цис-муурол-5-ен-4-β-ол • гермакрен-Д • бициклогермакрен • β-бизаболен • кадина-1,4-диен • γ-кадиен • α-кадинен • δ-кадинен • эндо -1-бурбоненол • цис-α-бизаболене • бизаболол • α-бизаболол • β-бизаболол • транс-неролидол	

	• гермакрадиенол • гермакрен В • гермакрен -Д-4-ол • β-гермакрен Д-4-ол • гермакрен Д • бициклогермакрен • спатуленол • кариофиллен-α-оксид • виридифлорол • ледол • дегидрооплопанон • Т-кадинол • эпи-α-кадинол • β-кадинол • α-кадинол • оплопанон • карвеолнерол • неролидол • нераль • карвон • цис-дигидрокарвон • фарнезен • цингиберен • α-кубебен • α-иланген • италицен • цис-α-бергамотен • β-гурьюнен • α-гвайен • цис-β-гвайен • транс-β-гвайен • селина-3,7(11)-диен • 1,10-эпикубенол • γ-эудесмол • хедикариол • α-фарнезол • α-санталлол • вербенол • цис-вербенол • транс-вербенол • элемол	
Тимьян Маршалла (Thymus Marshallianus Willd.)		
Надземная часть	Эфирное масло, до 0,8%: • тимол • метиловый эфир тимола • карвакрол	89, 94, 208, 239, 240, 294

	• α-пинен • β-пинен • камфен • сабинен • транс-сабиненгидрат • цис-сабиненгидрат • n-цимол • изоборнеол • эндо-борнеол • борнеол • борнилацетат • Δ-карен • β-мирцен • α-терпинен • γ-терпинен • лимонен • 1,8-цинеол • n-цимен • β-кариофиллен • оксид кариофиллена • β-бисаболен • бисаболол • линалоол • линалилацетат • камфора • терпиненол-4 • α-терпинеол • гераниол • гераниаль • геранилацетат • неролидол • фенхон • α-туйон • цитронеллаль • нераль • нерол • карвеол • карвон • α-фелландрен • транс-β-оцимен • эвкалиптол • пинокарвон • пулегон • α-копаен • β-бурбонен • β-кубебен • аромадендрен	

	• аллоаромадендрен • гермакрен Д • леден • α-мууролен • кадинен • α-хамигрен • спатуленол • n-пентен-8-ол • ацетил тимол; • 2-хлоро-4,6-ди (2-тиазолил)пирилидин • γ-мууролен; • леден; • β-кадинен; • δ-кадинен; • гумулен	
Листья, почки	• сабинен • n-цимол • мирцен • кариофиллен • терпинолен • ментен • кадинен • α-пинен • фенхон • камфен • ментанмирцен • α-фелландрен • α-терпинен • цинеол • β-фелландрен • γ-терпинен • туйон • цитронеллаль • линалоол • терпиненол • линалилацетат • нерал • нерол • неролидол • нерилацетат • борнеол • гераниол • геранилацетат • линалилпропионат • терпинилацетат • линалилвалерианат	336

Тимьян блошиный (Thymus pulegioides L.)		
Надземная часть	Эфирное масло: • β-терпинен • γ-терпинен • α-пинен • β-пинен • п-цимол • камфен • линалоол • линалилацетат • β-кариофиллен • нераль (цис-цитраль) • гераниаль (транс-цитраль) • цитранеллол • нерол • нераль • гераниол • β-бизаболен • тимол • карвакрол • фарнезол • Δ-карен • мирцен • лимонен • β-фелландрен • цис-сабиненгидрат • α-терпинеол • терпен-4-ол • гермакрен-Д-4-ол • аромадендрен • цимен • 3-октанон	167, 208, 269, 305, 343
Листья, цветки	Эфирное масло: • γ-терпинен • β-цемен • тимол • карвакрол и др.	337
Тимьян Палласа (Thymus Pallasianus H. Braun)		
Надземная часть	Эфирное масло: • α-терпиненил ацетат • *цис*-α-терпинеол • камфора • линалоол • *транс*-α-терпинеол • z-муролен • E-цитраль • гераниол	40, 94, 101

	• геранил ацетат • нерол • *транс*-карвеол • тимол • карвакрол • кариофиллена оксид • неролидол • хедикариол • спатуленол • τ-кадинол • ледена оксид	
Тимьян меловой (Thymus cretaceous Klok. et Shost.)		
Надземная часть	Эфирное масло	40, 101
Тимьян двуликий (Thymus dimorphus Klok. et Shost.)		
	Эфирное масло • карвакрол • γ-терпинен • 1,8-цинеол • *p*-цимен • β-мирцен	343

Трошиным Д.А. с соавторами было проведено выделение эфирного масла из травы чабреца и установлены его физико-химические свойства. Полученное ими эфирное масло имело удельный вес около 0,9, показатель преломления от 1,490 до 1,515, цвет от светло-желтого до интенсивно-оранжевого, с характерным запахом, указывающим на наличие тимола и карвакрола [254].

Количество эфирного масла в тимьяне ползучем находится в диапазоне от 0,47% до 4,40% (22, 206, 207, 208, 269). Основными компонентами эфирного масла чабрецов являются тимол и карвакрол [239]. Содержание фенолов, определённое методом ГЖХ в различных образцах тимьяна ползучего составило: тимола 0,212-1,013%, карвакрола 0,086-1,403%, суммы фенолов 0,374-1,615%, причём в одних образцах преобладает тимол, в других карвакрол [80].

Исследуя компонентный состав летучей фракции ацетонитрильных вытяжек растительного сырья, применяемого для лечения органов дыхания А.Н. Кузьменко с соавторами для каждого из видов сырья, входящего в сбор предложила набор веществ-маркеров, позволяющих стандартизовать растительное сырье и сбор на его основе методом газо-жидкостной хроматографии. Для летучей фракции чабреца в качестве специфических соединений предложены γ-элемент, d-гермакрен, эудесма-5,11 (13)-диен-8,12-олид, относящиеся к терпеноидам. Из других классов соединений идентифицировали линалоол, L-цитраль, цис-неролидол, циклогексадекан, которые также могут выступать в роли «маркеров» конкретного вида растительного сырья – трава чабреца [107].

При исследовании тимьяна ползучего с лимонным ароматом, выращенного в Центральном Сибирском ботаническом саду, было выделено и изучено эфирное масло по фазам вегетации. Полученное эфирное масло представляло собой жидкость зеленовато-желтого цвета с приятным запахом и вкусом. Были определены константы эфирного масла и его компонентный состав. В составе эфирного масла обнаружено 37 соединений, из которых идентифицировано 16: мирцен, n-цимен, лимонен, γ-терпинен, терпинен, камфора, борнеол, терпинеол-4, гераниол, цитронеллол, тимол, карвакрол, β-кариофиллен, ε-кадиен, α-муролен, β-бисаболен. Основным компонентом исследованного масла был гераниол (60,32%), а характерные для эфирных масел растений рода тимьян – тимол (1,21%) и карвакрол (0,40%) содержались в незначительном количестве. Изучение содержания эфирного масла по фазам вегетации показало, что максимальное количество масла накапливается в фазу цветения (0,80%), в фазу бутонизации его количество составляет 0,12 % [272].

Исследование химического состава эфирного масла чабреца, произрастающего в различных районах Алтая показало, что выход масла из надземных частей в фазу цветения растений составил 0,5-1,0%, при этом не

выявлено какой-либо зависимости содержания эфирного масла от высоты над уровнем моря. В образцах исследуемого эфирного масла было обнаружено до 80 компонентов. С использованием метода хромато-масс-спектроскопии идентифицировано 64 соединения, составляющих 94-99% от содержания масла. Состав масла менялся в зависимости от образца, однако, все исследованные образцы разделились на 2 группы, которые различались содержанием фенолов (тимола и карвакрола) и неролидола. В одной группе доминирующим компонентом являлся неролидол при очень маленьком количестве тимола и карвакрола. Во второй группе основными компонентами были тимол и карвакрол при одновременном низком содержании неролидола. При этом отмечено, что в исследованных образцах гераниол практически отсутствует. Доминирующими компонентами в монотерпеновой части данных эфирных масел были разные соединения: 1,8-цинеол, цис-β-терпинеол, n-цимол, γ-терпинен [22].

При исследовании эфирного масла тимьяна ползучего флоры Кавказа выявлено два хемотипа : 1 - тимол (76,1 – 81,5%), *p*-цимен, карвакрол, β-кариофиллен, α-терпинеол; и 2 - карвакрол (49,0 – 62,0%), тимол (21,5 – 29,7%), *p*-цимен, β-кариофиллен, α-терпинеол [285].

Украинскими учёными поведено сравнительное газохроматографическое исследование эфирного масла тимьяна ползучего, заготовленного в различных районах Запорожской области. Исследованные образцы масла имели высокое содержание суммы тимола и карвакрола. Содержание и соотношение этих фенолов в исследованных эфирных маслах колеблется, при этом в большинстве преобладает тимол, а в образце из Васильевского района – карвакрол [239].

В эфирном масле тимьяна ползучего, произрастающего в Белоруссии, было обнаружено 18 компонентов, в том числе: α-пинен (4.1%), β-пинен (9.9%), γ-терпинен (21.4%), п-цимол (19.0%), α-терпинеол (6.9%), тимол (9.52%), карвакрол (0.65%) [246].

При проведении оценки химического состава эфирного масла чабреца, из флоры Республики Беларусь было установлено, что основными компонентами его эфирного масла являются: камфен (1,75 – 12,62%), β-мирцен (2,26 – 14,61%), 1,8-цинеол (0 – 23,12%), камфора (4,24 – 27,59%), β-кариофиллен (1,12-22,64%), борнеол (2,02-33,39%) и кариофиллен оксид (3,79 – 28,70%). Доля тимола и карвакрола в составе эфирного масла составляет всего 0 – 3,59% и 0 – 3,69% соответственно [243].

При исследовании эфирного масла тимьяна ползучего из разных районов Азербайджана установлено, что его содержание варьировало от 0,27% до 2,33%. В качественном составе эфирного масла различных образцов наблюдались значительные различия. В изученных образцах эфирного масла суммарное содержание тимола и карвакрола составляло не менее 78,7%. Наибольшее содержание тимола отмечено в эфирном масле растений, собранных в Абовянском районе (81,5%) и в окрестностях г. Камо (76,1%), а в других образцах преобладал карвакрол. Для определения оптимальных сроков сбора травы тимьяна ползучего определяли содержание эфирного масла и основных компонентов в нем в зависимости от фазы развития растений. Показано, что содержание эфирного масла в растениях значительно возрастало в процессе развития растений и достигало максимума в фазу цветения. Что касается содержания основных компонентов, то отмечена тенденция снижения количества тимола в масле в процессе развития растений [285].

Из тимьяна ползучего, произрастающего в Кашмире (Индия), было выделено эфирное масло, выход, которого составил 0.67%. Эфирное масло содержало: п-цимол (22.6%), цингеберен (14.69%), γ-терпинен (10.71%), α-пинен (15.15%), β-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%) [246].

Эфирное масло этого же вида из Куллу (Индия) содержало: γ-терпинен (3.6%), линалоол (3.1%), цитронеллал (0.4%), борнеол (5.6%), карвакрол (5.0%), тимол (64,6%), борнилацетат (5.4%), β-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% [246].

Основными компонентами эфирного масла чабреца флоры Литвы были: 1,8-цинеол (16,3 – 19,0%), β-кариофиллен (9,6 – 11,3%), мирцен (9,7-10,7%), гермакрен-D, камфора.

Эфирное масло чабрецов Венгрии имело высокое содержание карвакрола (39,5 – 45,9%); кроме него в составе эфирного масла идентифицирован тимол, *p*-цимен, линалоол, нерол.

В эфирном масле чабрецов из Пакистана и Китая преобладал тимол: 42,6% и 23,9% соответственно. Кроме тимола в эфирном масле чабреца флоры Пакистана содержались: *p*-цимен, карвакрол, борнеол, терпенен-4-ол, а флоры Китая – 2,4,5-триметилбензиловый спирт (16,9%), *p*-цимен(16,3%), карвакрол (10,6%), о-бутилфенол [243].

Эфирное масло чабреца флоры Финляндии показало наличие 5 хемотипов растений: 1 - 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 - монотерпеновые углеводороды (30%), 1,8-цинеол (26%), β-кариофиллен, гермакрен D, гедикариол; 3 - монотерпеновые углеводороды (27%), 1,8-цинеол (19%), гермакрен D, β-кариофиллен, камфора; 4 - линалоол (21,9-43,8%), линалил ацетат (8,9-17,6%), β-кариофиллен, 1,8-цинеол, камфора; 5 - 1,8-цинеол (17,2-27,6%), мирцен (15,4-22,4%), β-кариофиллен (6,8-19,1%), камфора, линалоол [243].

Тимьян Маршалла часто имеет более широкое распространение, чем тимьян ползучий и заготавливается наряду с тимьяном ползучим по всей территории России, в том числе и в областях Центрального Черноземья.

Эфирное масло тимьяна Маршалла и его компонентный состав также достаточно хорошо изучены. При изучении эфирного масла тимьянов, произрастающих на территории Саратовской области было установлено, что по содержанию эфирного масла трава тимьяна Маршалла (1,15%) превосходит траву тимьяна ползучего (0,23%) [36]. Продолжая исследования эфирного масла тимьяна Маршалла, произрастающего в Саратовской области Н.А. Дурнова с соавторами установила, что выход масла из надземной части составил 0,91%. В составе эфирного масла или было установлено 20 компонентов составляющих 95,82%. Основными компонентами масла были n-цимен (20,99%) и тимол (54,61%) [94].

Сур С.В. с соавторами исследовали 3 вида тимьяна флоры Запорожской области, в том числе и тимьян Маршалла. Эфирное масло было выделено из сырья перегонкой с водяным паром фармакопейным методом, выход масла составил от 0,80% до 3,30%. При газохроматографическом определении эфирное масло из травы тимьяна Маршалла разделилось на 3 группы. Большинство из исследованных эфирных масел имели высокое содержание суммы тимола и карвакрола (36,8-71,4%) и заметный вклад борнеола (1,1-12,6%), при этом также наблюдалось высокое содержание монотерпеновых углеводородов (19,3-44,4%). По содержанию суммы тимола и карвакрола эфирное масло этой группы превосходит эфирное масло близких видов тимьянов из различных регионов России и других стран. Вторая группа эфирных масел имела более низкое (7,0-38,8%) содержание фенолов и в качестве основных компонентов содержали α-терпинеол (14,1-45,9%) и монотерпеновые углеводороды. В 3-ей группе образцы эфирного масла отмечались высоким содержанием гераниола (33,7-70,2%) и геранилацетата (5,5-13,3%), имели небольшое содержание нераля (0,7-6,4%)

и гераниаля (1,7-10,1%), а так же низкое содержание монотерпеновых углеводородов [239].

Было исследовано эфирное масло двух популяций Thymus marschallianus Willd, произрастающих на разных высотах заилийском Алатау. Методом ГЖХ-анализа обнаружено 49 компонентов, из которых идентифицировано 35. Заметных отличий в составе эфирного масла с изменением высоты не обнаружено [89].

Немецкие ученые исследовали состав эфирного масла почек и листьев тимьяна Маршалла. Ими было установлено, что масла этого вида имеют другой состав, чем у других представителей растений рода тимьян. Например, тимол, по данным проведенных исследований, появляется в эфирном масле лишь в исключительных случаях и в небольших количествах. Для этого масла, как правило, характерно наличие 5-6 оксидированных терпеноидов, доля которых в общем составе масла значительно превышает 10%. В листьях эти монотерпены представлены терпеновыми спиртами гераниолом и неролом и их ацетатами: линалилвалерианатом, а так же альдегидами гераниолом и нералом. Гераниол и нерал представляют собой стереоизомерную смесь, носящую название цитраль. Цитраль является типичным компонентом эфирного масла тимьяна Маршалла. В исследуемом эфирном масле в больших количествах были обнаружены сесквитерпены, а именно углеводороды кариофиллен и кадинен, а так же терпеноид неролидол [336].

При исследовании эфирного масла тимьяна Маршалла, произрастающего в Грузии методом газожидкостной хроматографии установлено наличие 8 компонентов, основым из которых является гераниол (30,28%) [116]. Исследование эфирного масла тимьяна Маршалла флоры Казахстана показало наличие в нем *p* -цимена (22,4%), тимола (20%), γ-терпинена (19,3%), β-бисаболен, тимил-метиловый эфир [343].

В различных странах было исследовано и эфирное масло тимьяна блошиного, при этом исследовали как растения, с лимонным запахом, так и без него. В Чехословакии найдены растения, отнесенные по составу эфирных масел к четырем хемотипам: тимола, цитраля, линалилацетата и фенхона [167, 339].

В Словакии были обнаружены пять хемотипов тимьяна блошиного: тимола, карвакрола, цитраля-гераниола, линалоола и фенхона [167, 321, 322]. Основными компонентами эфирного масла из Далматии были гераниол (≈45%) и линалоол (≈29%) [167].

Эфирное масло тимьяна блошиного из Великобритании отнесено к 4 хемотипам: тимола (38,3%), линалоола (68,9%), гераниола (36,4%), корвакрола (28,1%). [258, 343].

В Норвегии, Румынии и Югославии найдены только два хемотипа этого растения: тимола и карвакрола [167].

В Португалии обнаружен только один хемотип эфирного масла тимьяна блошиного – тимола [258].

При исследовании эфирного масла из цветков и листьев тимьяна блошиного, произрастающего в Италии методами газожидкостной хроматографии и масс спектрометрии было идентифицировано 63 компонента. Полученное эфирное масло характеризовалось высоким содержанием γ-терпинена, β-цимена, тимола и карвакрола, их содержание варьирует от 57,3% до 62,5% в зависимости от фазы развития растения. Лучшее время для накопления в нем эфирного масла и фенольных соединений после полного цветения растений [337].

В Литве (окрестности города Вильнюса) все исследованные образцы тимьяна блошиного с лимонным запахом по составу эфирного масла принадлежали к хемотипу цитраля-гераниола. Обобщая данные о составе эфирных масел тимьяна блошиного, авторы, предположили, что существует не менее восьми его хемотипов: тимола, карвакрола, цитраля, цитраля-

гераниола, гераниола, линалоола (линалил ацетата) и фенхона. По меньшей мере два из вышеупомянутых хемотипов имеют запах лимона – хемотипы цитраля-гераниола и цитраля [167].

При исследовании тимьяна блошиного, собранного на территории республики Белорусь были получены эфирные экстракты из травы, листьев и цветков, которые исследовали с помощью метода хромато-масс спектрометрии на газо-жидкостном хроматографе. В исследованных эфирных экстрактах было обнаружено до 100 компонентов, идентифицировано более 20 веществ. Основными компонентами эфирных экстрактов, как в траве, так и в листьях и цветках были карвакрол (17,46%-20,59%), β-кариофиллен (2,88 – 5,24%), β-бисаболен (2,07 – 5,7%), *p*-цимен (1,49 – 7,05%), λ-терпинен (4,61 – 7,74%). При сравнении цветков и листьев последние содержат большие количества β-кариофиллена, λ-терпинена, β-бисаболена и *p*-цимена. Однако по содержанию основного компонента – карвакрола, они практически не отличаются [258].

При продолжении исследований эфирного масла тимьяна блошиного флоры Белоруссии Бузук А.Г. с соавторами выявили 5 хемотипов: 1 – тимол + карвакрол + β-цимен + β-кариофилен; 2 – карвакрол + β-цимен + α-терпинен; 3 – карвакрол + γ-терпинен + β-кариофиллен; 4 – карвакрол + метиловый эфир карвакрола; 5 – карвакрол.

Общей особенностью всех выделенных хемотипов является присутствие в их составе, наряду с перечисленным выше соединениями, значительных количеств β-бисаболена. Что касается представляющих наибольший интерес ароматических компонентов – тимола и карвакрола, то лишь около 25% из всех исследованных образцов содержат оба эти соединения в значительных количествах. Во всех остальных случаях в составе эфирного масла количественно преобладает карвакрол. Данный представляет значительный интерес, поскольку с точки зрения фармакологического действия карвакрол имеет определенные преимущества

по сравнению с тимолом, как в отношении спектра биологической активности, так и меньшей токсичности [258].

Тимьян блошиный отличается большим, по сравнению с чабрецом, накоплением эфирного масла – 0,11-1,4% и 0,12-0,27% соответственно. [69]

Содержание эфирного масла в траве тимьяна блошиного, собранного на Украине составило 3,00±0,25% [269].

Наличие эфирного масла установлено также в траве тимьяна мелового и тимьяна Палласа [40]. Был изучен качественный и количественный состав эфирного масла надземной части тимьяна Палласа, произрастающего в Саратовской области. Выход эфирного масла из надземной части тимьяна Палласа в период цветения составил 1,09%. В составе эфирного масла тимьяна Палласа идентифицировано 19 компонентов, основными из которых были α-терпиненил ацетат (48,5%), транс- α-терпинеол (32,8%), поэтому данное масло отнесли к нефенольному типу [94].

В эфирном масле тимьяна двуликого флоры Украины обнаружены карвакрол (13,1%), γ-терпинен (12,7%), 1,8-цинеол, *p*-цимен, β-цимен [343].

1.2.2 Фенольные соединения

В растениях рода Тимьян изучены фенольные соединения. Фенольные соединения исследуемых видов представлены фенилпропаноидами, флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами и дубильными веществами (таблица 2).

Таблица 2 – Фенольные соединения растений рода Тимьян флоры Центрального Черноземья

Часть растения	Выделенные соединения	Литература
1	2	3

Тимьян ползучий (Thymus serpyllum L.)		
Надземная часть	Фенилпропаноиды: • тимол • карвакрол • метилкарвакрол • изоэвгенол	208, 295, 319
	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная 0,02% • 5-кофеилхинная 0,05% • галловая розмариновая 0,83%	67, 68, 129, 149, 179, 199, 342
	Флавоноиды: 2,86% • апигенин • лютеолин • кверцетин • диосметин • скутеллареин • апигенин-7-глюкозид • апигенин-4'-O-β-D-n-кумароил-глюкозид • диосметин-7-O-β-D-глюкуронид • лютеолин-галактоарабинозид • лютеолин-7-O-β-D-глюкозид • лютеолин-7-O-β-D-диглюкозид • скутеллареин-глюкозил-глюкуронид • скутеллареин-7-O-β-D-глюкозил (-1-4)- α-α-рамнозид • эриоцитрин	6, 206, 342, 343
	Дубильные вещества 3,32%	206
Листья	Флавоноиды: • гесперидин	149
Тимьян Маршалла (Thymus Marshallianus Willd.)		
Надземная часть	Фенилпропаноиды: • тимол • карвакрол	208, 294
	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная • 1-кофеилхинная • 5-кофеилхинная • розмариновая • 1-кофеил-глюкоза • 6-кофеил-глюкоза гаршангин	149, 208, 224
	Антоцианы	208

	Флавоноиды: • лютеолин • апигенин • скутеллареин • космоссиин • цинарозид • апигенин-7-глюкозил-6-кофеат • лютеолин-7-глюкозил-6-кофеат • эридиктиол	149, 208, 227, 343
Тимьян блошиный (Thymus pulegioides L.)		
Надземная часть	Фенилпропаноиды: • тимол • карвакрол	208
	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная • 1-кофеилхинная • 5-0-кофеилхинная • розмариновая • феруловая • n-кумаровая генистовая	7, 68, 149, 208
	Антоцианы	207
	Флавоноиды: • лютеолин • апигенин • скутеллареин • кверцетин • космоссиин • цинарозид • рутин • кемпферол-7-глюкозид • цианидин • цирцилинеол • 8-метоксицирцинеол • цирсимаритин • 5-дезметилнобелитин • 5-дезметилсиненсетин • 6-гидроксилютелин • сидеритофлавон • тимонин • тимусин • ксантомикрол	208, 269, 343
Тимьян меловой (Thymus cretaceous Klok. et Shost.)		
Надземная часть	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная • 1-кофеилхинная • 4-кофеилхинная	149, 208

	• 5-кофеилхинная розмариновая	68
	Антоцианы	149, 207
	Флавоноиды: • апигенин • лютеолин • скутеллареин • лютеолин-7-софорозид • апигенин-7-глюкозил-6-кофеат • лютеолин-7- глюкозил-6-кофеат	149, 208, 226
Тимьян двуликий (Thymus dimorphus Klok.)		
Надземная часть	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная • розмариновая • 1-кофеил-глюкоза • 6-кофеил-глюкоза • гаршангин • 5-кофеилхинная • 1-кофеилхинная	149, 224, 225
	Флавоноиды: • апигенин • лютеолин • скутеллареин • акацетин • космоссиин • цинарозид • апигенин-7-софорозид • лютеолин-7-софорозид • 7-глюкозил-кофеат космоссиина • 7-глюкозил-кофеат цинарозида	149, 226, 227, 343
Тимьян Палласа (Thymus Pallasianus H. Braun.)		
Надземная часть	Фенолкарбоновые кислоты: • кофейная • розмариновая • 5-кофеилхинная • 1-кофеилхинная	149
	Флавоноиды: • лютеолин • скутеллареин	149, 343
	Антоцианы	149
Тимьян Черняева (Thymus Czhernjajevii Klok. et Shost.)		
	Флавоноиды: • апигенин • лютеолин • скутеллареин	343

Основными фенилпропаноидами данных растений являются тимол и карвакрол (таблица 2). При определении тимола и карвакрола методом ГЖХ в траве тимьяна ползучего установлено, что их содержание и соотношение в различных образцах колеблются: тимола от 0,21% до 1,01%, карвакрола от 0,08% до 1,40% [80]. О.М Марковой разработана унифицированная методика спектрофотометрического определения суммы тимола и карвакрола в сырье чабреца. С помощью разработанной методики было определено содержание суммы тимола и карвакрола в образцах травы чабреца, собранных в разных регионах, которое составило от 0,007% до 0,641% [161].

Широко распространенными соединениями в растениях рода тимьян являются производные фенолкарбоновых кислот. В них обнаружены галловая, кофейная, 1-кофеилхинная, 4-кофеилхинная, 5-0-кофеилхинная, феруловая, n-кумаровая, генистовая, розмариновая кислоты и их производные: 1- кофеил-глюкоза, 6-кофеил-глюкоза, гаршангин. Широко распространенными являются кофейная и розмариновая кислоты; кофейная и розмариновая кислоты обнаружены в большинстве исследованных видов (таблица 2). При проведении скрининговых исследований на содержание розмариновой кислоты в листьях 5 видов семейства Lamiaceae установлено её значительное содержание в тимьяне ползучем. При этом отмечено, что содержание розмариновой кислоты увеличивается в период от цветения к плодоношению [236]. Результаты многих исследователей показывают, что розмариновая кислота является доминантным компонентом в растениях рода тимьян [342]. Количественное содержание розмариновой кислоты в растениях рода тимьян флоры Кавказа колеблется от 1,0% до 1,5% [224], а в тимьяне ползучем флоры Украины 2,25% [199]. Содержание розмариновой кислоты в тимьяне ползучем, произрастающем в Республике Коми составляет 25,29 мг/г [7], а в тимьяне ползучем, выращенном в ботаническом институте имени Комарпова от 24500 ppm (период цветения) до 32500 ppm

(период плодоношения) [68]. Разработана методика анализа гидрооксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье, в том числе и в траве тимьяна ползучего, позволяющая проводить качественную и количественную оценку их содержания. В результате установлено, что в траве чабреца содержится 0,05% 5-кофеилхинной кислоты, 0,02% кофейной кислоты и 0,63% розмариновой кислоты [179].

Алексеевой Л.И. с соавторами было определено содержание фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу в пересчете на галловую кислоту в траве интродуцированных в республике Коми популяций тимьяна ползучего. Результаты выражали как эквивалент одного грамма галловой кислоты на 100 г сухой массы. Содержание фенольных соединений в них составляло от 6,64 г/100 г до 9,69 г/100 г [260]. Растения тимьяна ползучего интродуцированные в подзону средней тайги республики Коми, по содержанию фенольных соединений близки к растениям тимьяна ползучего, произрастающего в Японии – 6,11 г/100г [260, 287] и в Хорватии – 7,3 г/100г [260, 315], но значительно беднее образцов из Португалии, у которых содержание фенольных соединений достигает 36,8 г/100г [260, 288].

Группа флавоноидов в растениях рода тимьян представлена производными флавонов, флавонолов и антоцианов (таблица 2). Широко встречаются флавоновые агликоны: лютеолин, апигенин и их гликозиды: цинарозид и космоссиин. Изучение структурных особенностей флавоновых гликозидов позволило установить, что они являются 0-монозидами. Углеводные заместители в них найдены в 7-положении и представлены глюкозой и галактозой у лютеолина и апигенина и глюкуроновой кислотой у скутелляреина. Апигенин и лютеолин встречаются и в виде метиловых эфиров акацетина (4'-метоксиапигенина) и диосметина (4'-метоксилютеолина). Среди флавонов найден также скутелляреин (5,6,7,4'-татраоксифлавон) и его гликозид скутеллярин.

В некоторых видах рода Thymus L., произрастающих на Кавказе, выделены и идентифицированы 7-софорозид апигенина, 7-софорозид лютеолина, 7-(глюкозил-6-кофеат)-апигенина и 7-(глюкозил-6-кофеат)-лютеолина (таблица 2).

В другую группу флавоноидов тимьяна отнесены флавоноловые производные: кверцетин и его биозид рутин, а так же 7-глюкозид кемпферола (таблица 2).

Наиболее богата флавоноидами надземная часть тимьяна блошиного и тимьяна ползучего (таблица 2).

Спектрофотометрическое определение флавоноидов в траве тимьяна ползучего, интродуцированного в республике Коми, в пересчете на кверцетин показало, что содержание флавоноидов при экстракции 70%-метиловым спиртом колеблется от 0,99 г/100г до 1,64 г/100г. Эти значения ниже, чем содержание флавоноидов в тимьяне ползучем, произрастающем в Хорватии – 5,1 г/100г [260, 315] и выше, чем в растениях, произрастающих в Польше 0,53-0,79 г/100г [260, 326].

При определении суммы флавоноидов в сырье тимьяна ползучего, флоры Сибири, установлено, что его содержание составляет 0,74% [251].

При интродукции в Башкортостане содержание флавоноидов в чабреце, найденное спектрофотометрическим методом составляет 2,86% [206].

Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в различных образцах, собранных в течение 5 лет, в разных регионах (Иркутская область, Ставропольский край, Краснодарский край, Прибалтика, Украина) показало, что их содержание колеблется от 0,77% до 1,50% [161].

Была также разработана спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов в траве тимьяна ползучего в перерасчете на рутин. Их содержание составило 1,37%. Разработанная методика была

адаптирована для анализа флавоноидов в настое и жидком экстракте. Содержание флавоноидов в жидком экстракте составило 0,11% [180].

Содержание флавоноидов определено и в других видах рода тимьян. Так, для тимьяна Маршалла, произрастающего в Сибири, показано, что содержание флавоноидов в нем составляет 5,6-12,8 мг/г [6, 252].

Одной из групп фенольных соединений, которые издавна интересуют ученых в растениях рода тимьян, являются дубильные вещества. В траве тимьяна ползучего содержание дубильных веществ составляет 3,32% (таблица 2).

1.2.3 Другие классы природных соединений

Из других классов природных соединений в исследуемых видах тимьяна изучались тритерпеновые соединения (таблица 3).

Таблица 3 – Другие классы природных соединений растений рода тимьян

Часть растения	Выделенные соединения	Литература
1	2	3
Тимьян ползучий (Thymus serpyllum L.)		
Надземная часть	Тритерпеноиды: • урсоловая кислота • олеаноловая кислота • дигидроурсоловая кислота • 3-β-гидроксиоман-12-ен-28-овая кислота	19, 208, 221, 223
	Бензол и его производные: • 1-метил-3-(1-метилэтил) бензол • 1-метокси-4-метил-2-(1-метил) бензол	208, 340
	• 2-метил-5-(1-метилэтенил) фенол	
	Стероиды: • Ситостерина-3-0-β-D-глюкопиранозид	208, 290

	Аскорбиновая кислота 0,14%	206
	Каротиноиды 0,11%	206
	Алифатические углеводороды: • н-гептадекан • н-нонадекан • н-генэйкозан • 7,11-диметил-1,6,10-додекатриен • 2-гептенол • 3-октанол • 1-октен-3-ол • 1-деканол • 1-додеканол • 3-октанон • 27-кетотриаконтанол	208
	Высшие жирные кислоты: • 3-кетопентатриаконтановая	208
	Макроэлементы: • Калий – 26,1 • Кальций – 12,2 • Магний – 3,9 • Железо – 0,95 Микроэлементы: • Марганец – 0,31 • Медь – 0,48 • Цинк – 0,48 • Кобальт – 0,12 • Молибден – 64,0 • Хром – 0,1 • Алюминий – 0,66 • Барий – 0,58 • Ванадий – 0,35 • Селен – 7,1 • Никель – 0,2 • Стронций – 0,36 • Свинец – 0,13 • Бор – 108,4	206
Семена	Жирное масло 33,6% Жирные кислоты: • пальмитиновая (2,6%) • стеариновая (2,3%) • олеиновая (11,4%) • линолевая (20,9%) • линоленовая (62,1%)	107
Тимьян Маршалла (Thymus Marshallianus Willd.)		
Надземная часть	Бензол и его производные:	208, 294

	• 2-метокси-4-метил-1-(1-тилэтенил) бензол	
	Ароматические соединения: • 1,2,3,4,4a,5,6,8a-октадигидро-7-тил-4-метилен-1-(метилэтил)-4a,8aα)-нафталин	208
	Серосодержащие соединения: • 3-бензилсульфонил-2,6,6-иметилбицикло (3.1.1) гептан	208
	Алифатические углеводороды: • амиловый спирт • 1-нонен-3-ол • 3-октанол • 1-октен-3-ол • (E)-2-гексеналь • н-нонаналь • 3-октанон	208
	Жирные кислоты и их производные: • бутановая кислота • ундекановая килота метиловый эфир бутановой кислоты	208, 240, 294
	Минеральные элементы: • медь • марганец • алюминий	110
Тимьян двуликий (Thymus dimorphus Klok.)		
Надземная часть	Тритерпеноиды: • урсоловая кислота • олеаноловая кислота	221, 222

Тритерпеновые соединения представлены урсоловой, олеаноловой, дигидроурсоловой и 3-β-гидроксиоман-12-ен-20-овой кислотой (таблица 3).

Симоняном А.В. с соавторами разработана методика количественного определения терпеноидов в траве дикорастущих видов тимьяна на основе изучения УФ-спектров поглощения пентациклических терпеноидов в кислоте серной концентрированной. В результате установлено, что в траве тимьяна двуликого содержание нейтральных тритерпеноидов составляет 2,16%, а тритерпеновых кислот 3,96%, а в траве тимьяна ползучего 1,62% и 2,96% соответственно [222].

В тимьяне ползучем изучались и стероиды, среди них выделен и идентифицирован ситостерина-3-0-β-D-глюкопиранозид.

Для растений рода тимьян характерно также наличие алифатических углеводородов, серосодержащих соединений, производных бензола, высших жирных кислот.

Среди других классов природных соединений в траве тимьяна ползучего найдены органические кислоты, в том числе аскорбиновая кислота, минеральные элементы, аминокислоты, каротиноиды. Содержание аскорбиновой кислоты составляет 0,14%, каротиноидов 0,11% [206].

Тимьян ползучий накапливает в достаточном количестве цинк и его можно рекомендовать для коррекции недостатка цинка в организме. [206].

В тимьяне Маршалла установлено наличие минеральных элементов: меди, марганца, алюминия (таблица 3).

1.3 Применение растений рода Тимьян флоры средней полосы России в научной и народной медицине

Из растений рода тимьян в научной медицине России применяются 2 вида – тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris L.*) и тимьян ползучий (*Thymus serpyllum L.*).

Тимьян обыкновенный – средиземноморский вид, в России культивируется в Краснодарском крае [132]. Трава тимьяна обыкновенного разрешена к применению в качестве противомикробного, антисептического, противогрибкового, отхаркивающего, обволакивающего, спазмолитического, снижающего газообразование в кишечнике средства [84, 164]. Тимьян ползучий применяется в научной медицине в качестве отхаркивающего, противомикробного и анальгетического средства [84, 164].

Жидкий экстракт травы тимьяна ползучего и тимьяна обыкновенного являются составной частью препарата «Пертуссин», который применяется в качестве отхаркивающего и противокашлевого средства [132, 164], для лечения бронхита и других воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей [133, 249].

Жидкий экстракт травы чабреца является составной частью комплексного препарата «Бронхипрет», который выпускается в форме оральных капель, сиропа и таблеток. В 100 г капель бронхипрета находится 50 г жидкого экстракта травы чабреца, а в 100 г сиропа – 15 г экстракта. Препарат «Бронхипрет» эффективен при лечении острого бронхита у взрослых и детей, а также при обострении хронической бронхолегочной патологии [98, 249, 312]. Отмечено, что эфирное масло и флавоноиды, содержащиеся в траве чабреца оказывают бронхоспазмолитическое и секретолитическое действие, а эфирное масло обладает антибактериальной активностью [249].

Трава тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла усиливают секрецию бронхиальных желез, что наряду с расширением мелких бронхов дает хороший отхаркивающий эффект, что может быть использовано для лечения острых и хронических воспалительных процессов в бронхолегочной системе, а также при коклюше [28, 172, 249].

На базе Пятигорской фармацевтической академии из травы чабреца методом полифракционной экстракции разработан новый препарат, содержащий сумму эфирного масла, тритерпеновых кислот (урсоловой, олеаноловой) и максимальное количество фенольных соединений, содержащихся в сырье. Установлено противокашлевое и более выраженное отхаркивающее действие разработанного экстракта в сравнении с жидким экстрактом чабреца, вырабатываемом на 30% спирте этиловом [102].

Продолжая технологические исследования Пятигорские ученые разработали технологию сиропа на основе фитокомплексов эвкалипта, душицы и чабреца отхаркивающего действия для детской практики [209].

Отхаркивающая активность выявлена так же у травы тимьяна Маршалла и тимьяна Палласа [90].

Жидкий экстракт травы чабреца входит в состав комплексного препарата «Пассифит» используемого в качестве седативного средства [164].

Седативное действие выявлено и для травы тимьяна Маршалла [90].

Экспериментально доказано, что введение в комплексное лечение бронхиальной астмы травы чабреца в сочетании с другими растениями оказывает положительное влияние на гематологические показатели: понижение количества лейкоцитов, эозинофилов, относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов и повышение относительного количества лимфоцитов и моноцитов в периферической крови больных. Под влиянием фитотерапии произошла нормализация СДЧ+Т-клеток, которые из слизистой бронхов переходят в периферическую кровь. Применение фитотерапии показало ее высокую клиническую эффективность: прекращение или урежение приступов удушья, улучшение показателей функции внешнего дыхания, значительное снижение суточных доз бронхолитиков, увеличение сроков ремиссий с 3,3 до 7,7 месяцев, уменьшение числа госпитализаций с 2,9 до 0,5 в год [217].

В ряде литературных источников приводятся данные об антимикробной активности растений рода тимьян. Наличие антимикробной активности установлено у эфирных масел тимьяна ползучего, тимьяна мелового, тимьяна блошиного, тимьяна Маршалла, тимьяна Палласа [90, 101].

Наиболее выражен бактерицидный эффект был у эфирных масел тимьяна мелового и тимьяна Палласа [40, 101].

Антимикробная активность эфирных масел тимьянов коррелирует с содержанием в них фенольных соединений [101]. Обращает на себя внимание то, что эфирное масло тимьяна ползучего вызывало задержку роста гемолитического стрептококка в концентрации 62мкг/мл [101].

У тимьяна ползучего антимикробную активность наряду с эфирным маслом проявляет экстракт [90, 101]. Невысокую антибактериальную активность оказывает бензохинон-карвакрол, полученный из травы тимьяна ползучего [192].

При исследовании антимикробных свойств растений Сибирской флоры Калинкиной Г.И. с соавторами было проведено исследование антимикробной активности in vitro методом двухкратных серийных разведений эфирного масла тимьяна Маршалла. Наиболее чувствительными к нему оказались стафилококк золотистый и стрептококк гемолитический, эфирное масло задерживало рост данных микроорганизмов в концентрации 62,5 мкг/мл. Исследуемое эфирное масло задерживало рост таких микроорганизмов, как синегнойная палочка и клебсиелла пневмонийная в концентрации 500-1000 мкг/мл [286]. Авторами был сделан вывод, что на основе тимьяна Маршалла возможна дальнейшая разработка антибактериальных средств.

Была изучена антимикробная активность эфирного масла у тимьяна ползучего лимонной формы, выращенного в сибирском ботаническом саду, методом серийных разведений in vitro. Результаты исследования антимикробных свойств эфирного масла показали, что наибольшую активность оно проявляет в отношении Staphylococcus aureus в концентрации 500 мкг/мл. В отношении других, взятых для исследования микроорганизмов эфирное масло было не активно [272].

Противомикробный эффект препаратов тимьяна сочетается с их дезодорирующим действием, поэтому наряду с приемом внутрь их используют для полоскания полости рта и горла при лечении стоматитов, гингивитов, фарингитов и тонзилитов [172, 174].

Тимьян ползучий обладает выраженной фунгицидной активностью как in vitro, так in vitro [133, 228].

Эфирные масла тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла также проявили выраженный антифунгальный эффект в отношении поверхностных дерматофитов [286].

Продолжая исследование тимьяна ползучего, выращенного в сибирском ботаническом саду Калинкина Г.И с соавторами установила ранозаживляющую активность вводно-спиртового экстракта и эфирного масла. Репаративную способность оценивали по заживлению ран у крыс Животным в затылочной области отсекали лоскут округлой формы площадью 130-140 мм^2, кожу удаляли. После операции на рану ежедневно наносили 3% масляный раствор сухого экстракта от водно-спиртового экстракта и 3% масляный раствор эфирного масла. В качестве препарата сравнения использовали широко применяемую для лечения ран 10% цигероловую мазь. Контрольной группе животных наносили касторовое масло. Площадь раневой поверхности измеряли через 5 суток вплоть до окончательной эпитализации. В результате было показано, что эфирное масло стимулирует процесс заживления инфицированных ран на всех стадиях репарационного процесса. Ускорение заживления ран составило 12 суток, т.е. было на уровне препарата сравнения – цигероловой мази. Репаративное действие вводно-спиртового экстракта было практически не выявлено [272].

Ранозаживляющее действие было выявлено так же у травы тимьяна Маршалла и тимьяна блошиного [90].

В Пятигорской фармацевтической академии были проведены исследования по разработке состава мази для лечения инфицированных ран. Действующими компонентами мази являлись полиэкстракт из травы чабреца, содержащий эфирное масло, флавоноиды: лютеолин, апигенин; фенолкарбоновые кислоты (кофейная) и суммарный водорастворимый

препарат из листьев крапивы с условным названием «уртифиллин», содержащий производные хлорофилла, дубильные вещества [139].

При изучении Сибирских видов тимьяна Тихоновым В.Н. исследована противовоспалительная (антиэкссудативная) активность пяти видов тимьяна, в том числе тимьяна Маршалла и тимьяна ползучего. Изучение противовоспалительных свойств сухих экстрактов, полученных из исследуемых видов тимьянов 30% спиртом этиловым проведено на модели острого отека, вызванного субплантарным введением белым крысам - самцам в заднюю конечность 0,1 мм 1% раствора каррагенина. В результате было установлено, что исследуемые виды достоверно угнетают сосудистый компонент воспалительной реакции. При этом, экстракт из травы тимьяна Маршалла (% угнетения через 4 часа составил 28,08%) по экссудативному действию не уступает официнальному виду - тимьяну ползучему (% угнетения - 25,83%) [250].

Экпериментально на модели острой воспалительной реакции, вызванной введением каррагенина, доказана противовоспалительная активность эфирного масла и сухого экстракта тимьяна ползучего, лимонной формы, выращенного в Центральном Сибирском ботаническом саду. Исследованное эфирное масло угнетало каррагениновый отек на 51%, что свидетельствовало о выраженном противовоспалительном действии. Сухой экстракт также обладал противовоспалительной активностью, угнетение отека составило 42% [272].

При действии на кожу и слизистые оболочки эфирное масло чабреца оказывает противовоспалительное и болеутоляющее действие, что делает возможным его использование при заболеваниях переферической нервной системы, в первую очередь при невритах и невралгии [133, 173].

Разработан состав и технология лингвальных таблеток, содержащих хлорофилипта экстракт густой и чабреца экстракт жидкий. Определена их антибактериальная активность. Минимальная бактерицидная концентрация в

отношении Staphylococcus aureus составило 19 мгк/мл в пересчете на хлорофилипт. Проведенные фармакологические исследования показали, что полученные таблетки оказывают антиэкссудативные и противовоспалительное действие. В дозе 100 мг/кг они проявляют выраженный противовоспалительный эффект, сопоставимый с действием таблеток «Фарингосепт» [76].

У растений рода тимьян выявлена антиоксидантная активность, которая обусловлена наличием фенольных соединений (флавоноидов и фенолкарбоновых кислот) [6]. Продолжая изучение уральских видов Thymus Л.И. Алексеева с соавторами провела определение антиоксидантной активности экстрактов, приготовленных на воде, 70% спирте метиловом и 96% спирте метиловом из интродуцированных в республики Коми образцов тимьяна ползучего. Для характеристики антиоксидантной активности ими была исследована реакция со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом, оптическую плотность измеряли спектрофотометрически; используя длину волны 517 нм. В результате показано, что максимальной антиокидантной активностью обладают водные экстракты, показатели у которых варьируют от 0,02 мг/мл до 0,14 мг/мл [260]. Антиоксидантная активность тимьяна ползучего, интродуцированного в подзону средней тайги республики Коми, сравнима со значениями для природных популяций тимьяна ползучего из Португалии, у которых она составляет 0,032 мг/мл [7, 260, 289] и значительно выше, чем у растений, произрастающих в Хорватии – 0,45 мг/мл [7, 260]. В дальнейшем авторами была выявлена зависимость между антиоксидантной активностью и содержанием флавоноидов. Около 50% антиокидантной активности связано с содержанием флавоноидов, что подтвердило литературные данные, что антиокисидантная активность водных экстрактов из растений рода тимьян обусловлена высоким содержанием флавоноидов, таких как лютеолин-7-глюкозид и апигенин-7-глюкозид [315]. Около 37-25% антиоксидантной

активности может быть связано с другими фенольными соединениями, в частности фенолкарбоновыми кислотами [260].

При исследовании тимьяна ползучего, интродуцированного в лесостепную зону Башкирского Предуралья определена его антиоксидантная активность, которую оценивали по его способности in vitro ингибировать аутоокисление адреналина до адренохолина и тем самым предотвратить образование активных форм кислорода. Изменение оптической плотности регистрировали спектрофотометрически при длине волны 480 нм, характерной для поглощения адренохолина. Установлено, что тимьян ползучий проявляет антиоксидантную активность (42,4%) [206].

Были также изучены антиоксидантные свойства эфирного масла тимьяна ползучего, произрастающего в окрестностях Степанакерта Нагорно-Карабахской республики. Антиоксидантное действие эфирного масла определяли на модельной реакции инициированного азо-диизобуторинитрилом окисления кумола, в интервале температур 333-348 ^{0}C. Опыты по окислению кумола проводили на газометрической установке с автоматическим регулированием давления. Установлено, что эфирное масло тимьяна ползучего обладает довольно значительным антиоксидантным действием. Установлено содержание антиоксидантов в 1г масла ($1{,}43*10^{-3}$ моль/л). При хранении масла в течение трех лет при комнатной температуре содержание экстрактивных веществ уменьшается в 100 раз. Поэтому с целью увеличения срока хранения и антиоксидантных свойств эфирного масла, его необходимо хранить при минусовых температурах [15].

Антиоксидантная активность была изучена и у чабреца флоры южной Хорватии [342]. При исследовании антиоксидантной активности в качестве объектов исследования авторами были выбраны эфирное масло и водное извлечение из травы чабреца. Эфирное масло получали методом перегонки в аппарате Клевенджера, для получения настоя 15 г травы чабреца заливали 150 мл кипящей воды дистиллированной и экстрагировали в течение 30

минут. Антиоксидантную активность изучали по способности к окислению липопротеидов низкой плотности, степень окисления контролировали спектрофотометрическим методом. При этом установлено, что водный настой оказывает более сильный антиоксидантный эффект по сравнению с эфирным маслом [342].

Пятигорскими учеными разработан регламент получения тритерпенового комплекса из отходов производства экстракта чабреца, основанного на методе избирательной экстракции тритерпеноидов с последующей их очисткой. Изучена активность комплекса, его токсичность и влияние на ряд основных показателей обмена веществ. Определение острой и хронической токсичности на разных видах животных (кроликах, собаках, белых мышах) показало малую токсичность исследуемого вещества, что согласовалось с характером сдвигов в белковом обмене и отсутствием сдвигов в большинстве обменных процессов. Результаты разностороннего изучения влияния исследуемого вещества на здоровых животных позволили авторам сделать заключение, что, во-первых, оно по характеру своего влияния напоминает действие адаптивных гормонов коры надпочечников, повышая энергетические возможности организма, во-вторых, способно воздействовать на обмен холестерина в печени. Такое заключение послужило авторам достаточным основанием для проведения дальнейших экспериментов, позволивших выявить лечебные свойства и механизм действия комплекса в условиях экспериментального атеросклероза [197].

При введении препарата в дозе 10 мг/кг с кормом кроликам при одновременном скармливании им холестерина (200мг/кг) в течение 60 дней в конце опыта была отмечена существенная, статистически достоверная разница в содержании холестерина (-57,96%) и β-липопротеидов крови (-39,85%) и в соотношении холестерин/фосфолипиды (-40,86%) по сравнению с содержанием этих показателей у контрольных кроликов, получавших только холестерин. Таким образом, было установлено, что

введение препарата задерживало развитие экспериментального атеросклероза у кроликов [108, 197].

Исследование Головиной Т.Н. с соавторами показали, что под влиянием приема препарата из чабреца заметно возрастали энергетические ресурсы как в соматических, так и в гладких мышцах. Этим в определенной мере можно объяснить тонизирующий и стимулирующий эффект тритерпеновых соединений. Полученные результаты позволили предположить, что применение препарата чабреца может оказаться полезным в кардиологической и акушерской практике для повышения функциональной способности мышц сердца и матки [74].

В эксперименте показано, что сумма тритерпеноидов из отхода производства экстракта тимьяна ползучего обладает гепатопротекторными свойствами, она нормализует содержание общих липидов, β-липопротеидов, триглициридов, холестерина [212].

Тимьян и его препараты снижают тонус и замедляют перистальтику желудка и кишечника, ликвидируют спастическое состояние гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, в том числе при экспериментально вызванных спазмах медикаментозного генеза (ацетилхолин) [249]. В эксперименте установлено протективное действие экстрактов из травы тимьяна ползучего на ульцеообразование при стрессовых язвах гастродуоденальной зоны у крыс, обусловленных иммобилизацией животных в течение 24 часов [249]. Препараты из травы чабреца замедляют в эксперименте пассаж пищи в желудке и тонком кишечнике вследствие уменьшения моторики этих органов [249].

Имеется опыт применения тимьяна ползучего при алкоголизме [130].

Возможно использование тимола в качестве антигельминтного средства при анкилостомидозе и некаторозе [234].

Тимьян ползучий в сочетании с другими растениями используется в качестве средства для лечения псориаза. Предложенное средство дает

стойкий клинический эффект у больных с различными формами псориаза, сокращает сроки проводимого лечения, удлиняет ремиссию заболевания и не обладает побочными действиями [188].

В народной медицине с глубокой древности тимьян ползучий (чабрец) находит применение. Упоминание о нем встречается в сочинениях Плутарха и Аристотеля. В Древней Греции он считался символом трудолюбия. В Элладе в античные времена была гора Химетос, полностью покрытая зарослями чабреца, с которого пчелы собирали мед, считавшийся целебным [249].

В Средневековой армянской гериатрии чабрец применяли при атеросклерозе мозга, бронхите, катаракте [207].

В народной медицине чабрец применяется, прежде всего, для лечения простудных заболеваний. Он способствует усилению бронхиальной секреции и вследствие этого более быстрой эвакуации мокроты [173, 234] и с этой целью его рекомендуют в виде настоя и отвара при бронхите, коклюше, длительном кашле [133, 134]. Настои обычно применяют по 1 столовой ложке 3-4 раза в день перед едой; при бронхиальной астме, а также выраженном кашле и коклюше доза настоя может быть повышена до 50 и даже 100 мл 3 раза в день [228, 249].

Отвар травы чабреца обладает болеутоляющим действием и с этой целью используется при невралгиях, радикулитах, плексите, ишиасе, различных болях в животе и кишечнике, головной боли [28, 133, 207, 249]. С этой же целью используется эфирное масло, особенно при невритах, невралгиях, инсульте [133, 173, 207].

Народная медицина рекомендует ванны, припарки и компрессы из травы чабреца в качестве обезболивающего средства при ушибах, суставном ревматизме, миозитах, полиартрите, радикулитах, невритах [173, 249].

С этой же целью используют мазь из сгущенного отвара на подсолнечном масле (1:3 и 1:4) [37].

Чабрец находит применение для лечения кожных заболеваний, особенно при гнойных ранах и длительно незаживающих трофических язвах с наличием гнойного отделяемого. Для этого их промывают отваром травы чабреца с последующем наложением повязок с экстрактом из цветущей травы [173, 174, 249]. При кожных сыпях применяют ванны из травы [37], особенно в детской практике [284].

Настой и отвар травы чабреца рекомендуют при лихорадке, эмфиземе и актиномикозе легких [207].

В литературе имеются данные об использовании чабреца при плохом пищеварении, вздутии живота, метеоризме, в качестве средства улучшающего пищеварения [249], а также при неприятном запахе изо рта [284]. Чабрец оказывает благоприятное действие на больных, страдающих гиперацидными гастритами и спастическими дискинезиями кишечника, сопровождающиеся упорным метеоризмом [284].

Отвар травы чабреца принимают внутрь при раке желудка [284].

Чабрец в сочетании с другими травами рекомендуют при хронических заболеваниях печени и желчевыводящих путей [249].

В народной медицине траву чабреца в виде настоя широко применяют для полоскания рта, горла при ангинах, пародонтите, стоматитах, гингивитах, хронических тонзиллитах [284], а также для лечения отитов [207].

Чабрец известен также как действенное средство от запоя, которое вызывает безразличие к алкоголю и уменьшает тягу к спиртному. Для этого используют отвар из травы растения, который принимают по 50 мл 2 раза в день или по 100 мл один раз в день в течение 2-4 недель или 150-200г отвара единоразово. При этом больному дают нюхать из стакана спиртное, у которого через 15-30 минут появляются позывы на рвоту. В это время ему разрешается выпить 10-15 мл алкогольного напитка. После чего у больного появляется рвота, небольшие рези в желудке, потоотделение, учащается пульс. Такое лечение проводят ежедневно в течение 7-10 дней [249, 284].

Фитопрепараты из травы чабреца рекомендуются при повышенной эмоциональной лабильности, раздражительности, бессоннице, нервных расстройствах, в том числе и детской практике [249, 284], а также в качестве лактогенного средства [207].

Настой и отвар находит применение в качестве антигельминтного средства при солитере и власоглаве [207].

Настой травы употребляют при половой слабости, а в смеси с другими растениями чабрец используется при аденоме простаты, простатитах, раннем семяизвержении [284].

Чабрец в форме настоя нашел применение при геморроидальных и маточных кровотечениях [284], при гинекологических заболеваниях [207].

Наружно траву чабреца употребляют в качестве средства ароматерапии, для приема ароматических ванн при ожирении и других нарушениях обменных процессов [249].

Порошок из сухой травы чабреца используется как нюхательное средство при обмороках [284].

В народной медицине настой травы чабреца применяется для мытья головы от перхоти [284], скрофулезе, дерматомикозе [207].

Чабрец в сочетании с другими растениями оказывает витаминное и укрепляющее действие на организм, особенно при сильной умственной усталости, гипертонии [37, 284].

В народе существует поверье, что чабрец в подушке, на которой рекомендуется спать, приносит здоровье и долголетие [37].

В странах Западной Европы чабрец находит применение для лечения нервных болезней, головной боли, в качестве вяжущего средства, а эфирное масло, полученное из него – для лечения острых респираторных заболеваний [207].

В Болгарии тимьян ползучий употребляется как хорошее успокаивающее средство при различных видах кашля: при хроническом

бронхите, бронхиальной астме, коклюше, при воспалении легких со слизистой мокротой, при хроническом катаре желудка, спазмах и коликах желудка, при нарушении пищеварения, метеоризме, язве двенадцатиперстной кишки, при отсутствии аппетита. Применяют настой из 5 чайных ложек измельченной травы на стакан кипятка (суточная доза), настой пить холодным, глотками [37].

Во Франции трава чабреца используется как антиспазматическое, ранозаживляющее, восстанавливающее эпителизацию тканей средство, особенно при ожогах кислотами. Настой чабреца предупреждает запор у грудных детей. При ревматизме Леклерк рекомендует ванны из травы чабреца, травы розмарина, травы лаванды, чайной соды, которые особенно полезны ослабленным и больным суставным ревматизмом детям [37]. Отвар растения применяют при чесотке [207].

В Польше трава применяется как бактерицидное и противовоспалительное средство для лечения воспалительных заболеваний почек, печени и т.д. [37].

В Индо-тибетской медицине чабрец находит применение для лечения ожогов кожи, в Индийской – гастритов, заболеваний печени [207].

В Монгольской медицине чабрец применяется как отхаркивающее средство при заболеваниях верхних дыхательных путей, при лечении лихорадки [207].

В Тибетской медицине используют тимьян ползучий при детских инфекциях, хронических лимфаденитах, сибирской язве, кожных болезнях, а также как ранозаживляющее средство [207].

В Пакистане чабрец известен как антигельминтное средство [207].

В народной медицине наряду с тимьяном ползучим заготавливается и используется аналогично тимьян Маршалла [207].

В народной медицине настой из травы тимьяна Маршалла рекомендуют при зубной боли, стоматите, отвар на молоке для лечения острых респираторных инфекций, аменореи [207].

На Алтае настой из травы применяют при лихорадке, головной боли [207]; в Среднем Поволжье – как отхаркивающее средство при острых респираторных инфекциях и коклюше [207].

В Киргизии тимьян Маршалла находит применение как болеутоляющее средство при радикулите и ишиасе, седативное и спазмолитическое в качестве наружного средства для компрессов, ароматических ванн, примочек [207].

В Болгарии тимьян Маршалла известен как ранозаживляющее средство, его отвар применяется при неприятном запахе изо рта, а также для лечения рака желудка [207].

1.4 Технология получения жидкого экстракта тимьяна ползучего и его стандартизация

Жидкий экстракт тимьяна ползучего (чабреца) в основном производится на фармацевтических фабриках. Технология, получившая применение на производстве, заключается в получении жидкого экстракта чабреца методом реперколяции с законченным циклом в батарее из трех диффузоров в соотношении 1:1 с использованием 30% спирта этилового и с содержанием глицерина 10% по отношению к растительному сырью. Глицерин снимает поверхностное натяжение, улучшает смачиваемость сырья, проникновение экстракта в клетки сырья чабреца. Однако объем жидкой фазы, при соотношении фаз 1:1, а также высокая порозность сырья не дают возможности проводить экстрагирование сырья чабреца таким

образом, при котором бы число ступеней экстракции соответствовало числу диффузоров [4].

В связи с чем, для получения жидкого экстракта чабреца был предложен метод реперколяции в модификации ЦАНИИ, который и до настоящего время применяется на производстве. Согласно этого метода, растительное сырье чабреца, помещенное в батарею из трех диффузоров, одновременно экстрагируется только в двух диффузорах [4, 102]. Экстракция из двух ступеней способствует получению экстракта с концентрацией веществ, соответствующей нормативной документации, тем не менее она не обеспечивает полного истощения сырья, извлекая действующие вещества лишь на 47% [4, 102]. Доказано также, что присутствие глицерина в первых порциях экстрагента не способствует извлечению эфирного масла и добавление его является излишним [168].

Ввиду несостоятельности методики, применяемой на производстве, многие исследователи занимались разработкой более эффективной технологии получения жидкого экстракта чабреца. Так, Назаров Б.В. предложил заменить экстрагент, вместо 30% спирта этилового с добавлением глицерина использовать спирт этиловый 70%, так как он позволяет более полно извлекать действующие вещества [168]. Он также предложил экстракцию сырья чабреца проводить быстротекущей реперколяцией, что способствует более полному истощению сырья и сокращению экстракционного процесса более, чем в два раза [168].

В Пятигорском фармацевтическом институте была разработана технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на теории производства жидких экстрактов с максимальным истощением лекарственного растительного сырья за счет увеличения соотношения сырья и экстрагента. Разработанная технология основана на увеличении количества перколяторов до 7 и изменении соотношения сырье: экстрагент (1:1,93), что позволяет наиболее полно экстрагировать сырье чабреца [4]. Немногим

позднее Н.А. Зыковой и И.А. Муравьевым на той же базе была разработана новая ресурсосберегающая технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на увеличении соотношения сырья и экстрагента 1:1,66 и использования батареи из 6 диффузоров, что позволило им увеличить эффективность экстракции до 80%. При этом снижается расход растительного сырья со 100 кг до 60 кг на каждые 100 л жидкого экстракта при сохранении установленных норм качества [102, 181]. Ими же была предложена технология получения полифракционного экстракта чабреца. В качестве экстрагентов были предложены 96% спирт этиловый и вода дистиллированная. При этом первый экстрагент достаточно полно извлекал эфирное масло и сумму тритерпеновых соединений, а второй – сумму фенольных соединений. При изучении оптимальных условий экстракции установили преимущество дробного использования экстрагента при производстве полифракционного экстракта в четыре ступени [102].

В ряде стран Европы (Польше, Германии и других) находят применение препараты, близкие по составу к препарату «Пертуссин», в состав которых входят жидкий экстракт чабреца. В качестве экстрагента для его приготовления используют спирт этиловый 70% [102].

Продолжая исследование технологии жидкого экстракта Алаева-Зыкова Н.А. и Пшуков Ю.Г. разработали ресурсосберегающую технологию получения жидкого экстракта, основанную на использовании при экстрагировании батареи из 6 диффузоров пятью ступенями при соотношении фаз 1:1,992. Проведенная ими сравнительная оценка качества жидких экстрактов полученными разработанным и промышленным способами показало их равноценность [5].

Однако, данные методики не нашли применения в производстве, т.к. они чаще всего являются многоступенчатыми и трудоемкими, что мешает их внедрению на фармацевтические фабрики [102].

Не менее важным вопросом остается стандартизация жидкого экстракта. Изначально оценку качества травы проводили по содержанию эфирного масла, в частности, суммы тимола и карвакрола. Так, Назаров Б.В. при разработке жидкого экстракта чабреца предложил устанавливать его качество по содержанию эфирного масла, а именно фенольной фракции (карвакрола, тимола), содержащейся в нем. Им была разработана методика определения тимола и карвакрола йодо- и броматометрическим методом [168].

Зыкова Н.А. предложила оценивать качество жидкого экстракта чабреца по сумме фенольных соединений фотоэлектроколориметрическим методом [102], содержание которых должно быть не менее 6,8%. При продолжении исследований по совершенствованию анализа жидкого экстракта ряд ученых Пятигорской фармацевтической академии предложили проводить стандартизацию жидкого экстракта чабреца по содержанию в них различных групп биологически активных веществ суммы тимола и карвакрола, флавоноидов, фенольных соединений и сухого остатка [181]. Сумму тимола и карвакрола определяли с использованием производной спектрофотомерии. Обоснована возможность применения второй производной УФ-спектра для спектрофотометрического определения тимола и карвакрола [161]; сумму фенольных соединений было предложено определять по собственному поглощению оксикоричных кислот и флавоноидов в перерасчете на кофейную кислоту, сумму флавоноидов – методом дифференциальной спектрофотомерии по образованию комплексов с алюминия хлоридом. Позднее Марковой О.М. была разработана методика количественного определения тимола и карвакрола методом ГЖХ и показана возможность их количественного определения при неполном определении пиков [181]. Однако, оценку качества жидкого экстракта авторы предлагают в конечном итоге проводить по содержанию флавоноидов, т.к. содержание эфирного масла и особенно его фенольной фракции варьирует в широких

пределах в зависимости от фазы вегетации, места и условий произрастания [181]. При разработке методики количественного определения флавоноидов авторами изучены оптимальные условия экстракции и дифференциальные УФ-спектры комплексов, образующихся после реакции с алюминия хлоридом. Расчет содержания предложено проводить в пересчете на лютеолин [161]. Данная методика определения качества жидкого экстракта чабреца используется и в настоящее время, например в ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм». Стандартизацию жидкого экстракта чабреца согласно фармакопейной статьи предприятия проводят по содержанию суммы флавоноидов в перерасчете на лютеолин и по содержанию тимола. Содержание флавоноидов в нем должно быть не менее 0,1 %, содержание тимола не менее 0,01%.

Подлинность экстракта устанавливают методами тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил» по содержанию флавоноидов в сравнении со стандартным образцом лютеолина и по содержанию тимола в сравнении с образцом тимола.

Выводы по главе 1

1. Обобщение и анализ литературных данных показали, что официнальный вид тимьян ползучий (чабрец) в областях средней полосы России встречается единично. В то же время во флоре данного региона широко распространены 7-8 видов, основные из которых тимьян Маршалла, тимьян блошиный, тимьян меловой, тимьян Палласа, тимьян двуликий, тимьян Черняева и, которые не разрешены к применению в официнальной медицине. Однако, при заготовке сырья чабреца заготовители как правило не различают

виды, поэтому в сырье чабреца могут быть и другие виды, произрастающие в регионе.

2. Химический состав тимьянов Средней полосы России изучен недостаточно. Наиболее полно, и то не для всех видов, изучены эфирное масло и фенольные соединения. Проведенные исследования эфирного масла показали, что качественный состав и количественное содержание его компонентов могут изменяться как внутри видов, в зависимости от места произрастания, освещенности, времени сбора, так и между различными видами. Все вышесказанное показывает перспективность изучения химического состава растений рода тимьян, в том числе и эфирного масла. Фармакологическая активность видов тимьян флоры средней полосы европейской части России изучена не достаточно. Не показана возможность их использования в научной медицине наряду с тимьяном ползучим.
3. В доступной литературе не найдены данные по морфолого-анатомическому изучению растений рода тимьян, не разработана диагностика видов, в ГФ XI микродиагностические признаки приведены только для листа тимьяна ползучего.
4. Требования к качеству лекарственного растительного сырья обусловливают необходимость совершенствования его стандартизации. Качество сырья чабреца ГФ XI издания рекомендует определять только по содержанию экстрактивных веществ, что не удовлетворяет современным требованиям, т.к. в статье на данный вид сырья отсутствуют методики качественного и количественного определения основных групп биологически активных веществ. Нормативная документация должна распространяться не только на цельное и измельченное сырье, но и на порошок, применяемый для приготовления лекарственных средств, что должно быть учтено в

разделах «Внешние признаки», «Микроскопия», «Числовые показатели».

5. Анализ литературных данных по производству жидкого экстракта чабреца показал, что промышленный способ его получения основан на перколяции в батареи из 3-х диффузоров при соотношении фаз 1:1, в качестве экстракта используется 30% спирт этиловый с содержанием глицерина 10%. Однако при такой технологии растительное сырье чабреца истощается лишь на 50%. Несмотря на проводимые исследования по разработке более совершенных технологий жидкого экстракта, все предложенные технологии не нашли применения в производстве и до настоящего времени используется именно метод ускоренной дробной мацерации в модификации ЦАНИИ. Стандартизация жидкого экстракта проводится по содержанию тимола и суммы флавоноидов в перерасчете на лютеолин. Однако, в сырье и экстракте чабреца среди флавоноидов преобладает цинарозид (гликозид лютеолина). В связи, с чем совершенствование технологии жидкого экстракта и его стандартизации являются актуальными.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования и их характеристика

Объектами наших исследований явилось сырье растений рода тимьян флоры средней полосы России: трава тимьяна Палласа (*Thymus Pallasianus H. Braun)*, тимьяна мелового (*Thymus cretaceous Klok. et Shost.*), тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum L.*), тимьяна блошиного (*Thymus pulegioides L.*), тимьяна Маршалла (*Thymus Marshallianus Willd.*), тимьяна двуликого (*Thymus dimorphus Klok. et Shost.*), тимьяна Черняева (*Thymus Czhernjajevii Klok. et Shost.*), а также трава чабреца, выпускаемая ООО Фирма «Здоровье».

Лекарственное сырье растений рода тимьян представлено смесью тонких стеблей, листьев и цветков.

Сырье заготавливалось в течение 2009-2015 годов в областях средней полосы России в фазу цветения растений: Курской, Белгородской, Орловской, Брянской, Воронежской. Далее сырье подвергали воздушно-теневой сушке.

Упаковку и последующее хранение сырья проводили согласно нормативным документам, разработанным для травы тимьяна ползучего [83], при этом соблюдались следующие условия, а именно, помещения для хранения сырья было выбрано в соответствии с требованиями, т.е. оно хорошо вентилируемое, сухое, защищено от попадания прямых лучей солнца, температура хранения сырья равна комнатной, а также соблюдались нормы для отсутствия амбарных вредителей.

Объектами фармакологических скрининговых исследований были выбраны настои травы тимьяна ползучего, тимьяна Палласа, тимьяна мелового, тимьяна блошиного, тимьяна Маршалла, тимьяна двуликого,

тимьяна Черняева, которые готовили согласно XI-изданию государственной фармакопеи [83], а так же эфирное масло, полученное из растений рода тимьян. Для изучения антиоксидантной активности готовили водно-спиртовые растворы.

Рисунок 1 – Тимьян ползучий *Thymus serpyllum L.* (Брянская область, Навлинский район, опушка леса, июль 2015, фото автора)

Рисунок 2 – Тимьян Палласа *Thymus Pallasianus H. Braun* (Воронежская область, окрестности г. Лиски, холм, июль 2014, фото автора)

Рисунок 3 – Тимьян меловой *Thymus cretaceous Klok. et Shost.* (Белгородская область, Новооскольский район, левобережье реки Оскол, меловые склоны, июль 2015, фото автора)

Рисунок 4 – Тимьян блошиный *Thymus pulegioides L.*
(Брянская область, ПГТ Погар, на опушке леса, июнь 2015, фото автора)

Рисунок 5– Тимьян Маршалла *Thymus Marshallianus Willd.*
(Орловская область, Покровский район, июнь 2014, фото автора)

Рисунок 6 – Тимьян двуликий *Thymus dimorphus Klok. et Shost.*
(Курская область, Беловский район, июнь 2014, фото автора)

Рисунок 7 – Тимьян Черняева *Thymus Czhernjajevii Klok. et Shost.* (Курская область, Горшеченский район, восточнее села Бекетово, июль 2014, фото автора)

2.2 Фитохимический анализ

При проведении фитохимического исследования в изучаемых растениях были изучены следующие группы веществ: эфирное масло, соединения фенольные природы (флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, фенолокислоты и оксикоричные кислоты), тритерпеновые соединения, жирные кислоты, углеводные производные, органические и аминокислоты кислоты, минеральные элементы.

Изучение наличия выше перечисленных соединений, относящихся к группе природных было проведено в водно-спиртовых, водных, хлороформных, гексановых извлечениях. Для приготовления изучаемых фракций брали от 0,5 г до 20,0 г сырья. Качественный анализ осуществляли с применением качественных специфических реакций и хроматографического анализа.

2.2.1 Анализ эфирного масла

Определение количественного состава эфирного масла

В основе количественного определения эфирного масла лежал метод, включенный в XI-издание государственной фармакопеи, согласно которому

измеряется объем полученного эфирного масла после перегонки его с водяным паром. [83]. Определение проводили в пяти повторностях.

Исследование эфирного масла методом газо-жидкостной-хромато-масс-спектрометрии

Анализ эфирного масла проводили в виале «Agilent» на 20,0 мл, в которую помещали по 0,5-5,0 г измельченного высушенного сырья растений рода тимьян, прибавляли тридекан в качестве внутреннего стандарта из расчета 50 мкг на навеску сырья, далее приливали 10,0 мл воды очищенной, присоединяли к холодильнику с воздушным охлаждением и нагревали в песчаной бане с регулируемым подогревом в течение 2-х часов. При проведении отгонки происходило конденсирование летучих веществ на поверхности в обратном холодильнике с внутренней стороны. После того как произойдет охлаждение системы, образовавшиеся сконденсированые вещества помещали в виалу объемом на 10,0 мл путем смывания их 3,0 мл особо чистого пентана. Далее осуществляли продувку (100 мл/мин) особо чистым азотом для концентрирования смыва до остаточного объема извлечения 10 мкл, которое затем извлекали хроматографическим шприцом. Далее пробу концентрировали в самом шприце до объема 2 мкл. Пробу в хроматографическую колонку вводили в режиме splitless, т.е. без деления потока, что позволяет при введении пробы избежать потерю на деление и увеличить чувствительность метода исследования.

Компонентный состав эфирного масла исследовали на приборе - хроматограф Agilent Technology 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 N. Условия при которых проводили анализ газожидкостным методом хроматографии, заключались в следующем: использовали колонку с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 30 м, тип колонки - капиллярная ДВ-5; скорость газа-носителя-гелия 1,2 мл/мин в течение 0,2 минут; температура

детектора и испарителя 250ºС, термостат с температурой нагрева 50ºС с программированием 3º/мин до 220ºС.

Компонентный состав эфирных масел устанавливали путем идентификации в сравнении масс-спектров веществ, которые входят в состав исследуемых эфирных масел, полученных при хроматографировании с данными библиотеки масс-спектров NIST05 и WILEY 2007, сочетая их с программами для идентификации AMDIS и NIST.

Содержание компонентов эфирных масел рассчитывали, используя метод внутреннего стандарта [277]. Определение проводили в трех повторностях.

2.2.2 Исследование фенольных соединений

2.2.2.1 Приготовление водно-спиртовых извлечений и разделение природных соединений

Для изучения фенольных соединений брали по 5,0 г сухого сырья изучаемых растений, которое подвергали измельчению до 1-2 мм и далее экстрагировали спиртом этиловым 70% 3 раза по 30 минут. Извлечения, полученные в ходе экстрагирования объединяли, подвергали упариванию под вакуумом до водного остатка, проводили охлаждение с последующим фильтрованием для отделения хлорофилла. Водные извлечения экстрагировали органическими растворителями: хлороформом, этилацетатом, бутанолом. Полученные хлороформное, этилацетатное и бутанольное извлечения упаривали до смолообразного остатка в вакууме и

далее проводили с ними качественные реакции и хроматографический анализ.

2.2.2.2 Качественное определение фенольных соединений

Кумарины

Кумарины исследовали в хлороформных фракциях, для этого проводили хроматографирование в системе растворителей: бензол-этилацетат (2:1) на пластинках "Sorbfil", в тонком слое сорбента и дальнейшей обработкой хроматограмм специфическими реактивами (спиртовый раствор натрия гидроксида 10%, пары аммиака), далее хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки специфическими реактивами [124]. Идентификацию веществ проводили сравнением со стандартными образцами.

Фенолкарбоновые кислоты

Этилацетатную фракцию исследовали на наличие фенолкарбоновых кислот. Проводили определение методом бумажной хроматографии этилацетатной фракции в системе растворителей: растворы кислоты уксусной 2% и 5%, хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки специфическими реактивами, в качестве которых выступали спиртовой раствор железа хлорида окисного 1% и пары аммиака. [12, 87, 136, 261]. Идентификацию веществ проводили сравнением со стандартными образцами.

Исследование фенолкарбоновых кислот методом ВЭЖХ

Исследование фенолкарбонорвых кислот проводили методом газо–жидкостной хроматографии по методике для определения жирных кислот [293]. При исследовании 50,0 мг измельчённого воздушно - сухого сырья

растений рода тимьян помещали в виалы «Agilent» на 2,0 мл, приливали 50,0 мкг внутреннего стандарта (тридекана в гексане) и 1,0 мл Supelco 3-3033, BCl_3 14% в спирте метиловом, которые являются метилирующим агентом. Полученную смесь выдерживали в течении 8 часов в закрытой, герметичной виале при температуре 65°С. При этом метилируются как свободные органические так и фенолкарбоновые кислоты. Полученную смесь разбавляли водой очищенной, в количестве 1,0 мл, после сливания ее с растительного сырья. Далее хлористым метиленом проводили извлечение метиловых эфиров фенолкарбоновых кислот, с последующим их хроматографированием на газо– жидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс–спектрометрическим детектором 5973N. Для анализа использованы: капиллярная INNOWAX хроматографическая колонка с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 30 м; скорость газа–носителя – гелия 1,2 мл/мин., объём пробы – 2 мкл.; скорость ввода пробы 1,2 мл/мин в течении 0,2 минут; температура термостата должна программироваться от 50°С до 250°С и скорость составлять 4°С/мин; при этом температура нагревателя ввода пробы составляет 250°С. Идентификацию фенолкарбоновых кислот осуществляли путём сравнения с заведомыми образцами метиловых эфиров и данными библиотекой масс – спектров NIST05 и WILLEY 2007, сочетания их с программами для идентификации AMDIS и NIST. Концентрации индивидуальных фенолкарбоновых кислот рассчитывали методом внутреннего стандарта [11, 293]. Определение проводили в трех повторностях.

Флавоноиды

Наличие флавоноидных соединений устанавливали в бутанольных и этилацетатных фракциях, а также водных остатках извлечений из исследуемых растений с использованием общепринятых качественных реакций:

- цианидиновой (к исследуемым извлечениям приливали концентрированную кислоту хлористоводородную и магниевую стружку) [23, 163, 302, 304];
- цианидиновой по Брианту [87, 292, 302]: первоначально проводили цианидиновую реакцию (восстановление исследуемого вещества водородом), а далее к реакционной смеси прибавляли равное количество воды очищенной и 1 мл октанола, затем взбалтывали. Если в ходе реакции наблюдается окрашивание октанольного слоя, это свидетельствует о наличии флавоноидных веществ агликоновой природы;
- с раствором алюминия хлорида 2% [163, 204, 301, 304];
- с раствором натрия гидроксида 10% [163, 204, 301, 304];
- со свинца ацетатом взаимодействуют флавоноиды, содержащие О-диоксигруппу в кольце [79, 242, 301];
- с борно-цитратным реактивом взаимодействуют 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы [141, 270, 301];
- с жидкостью Фелинга при нагревании гидролизаты флавоноидных гликозидов образуют осадки кирпично-красного цвета [73, 242, 301].

Для исследования флавоноидных соединений нами была также применена хроматография на бумаге и в тонких слоях сорбента.

Для проведения хроматографического анализа фенольных соединений использовали бумагу "Фильтрак" FN-1, FN-5, FN-12; для тонкослойной хроматографии пластинки «Sorbfil» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, ЗАО Сорбполимер, Россия) и полиамидный сорбент [29, 347].

Методами восходящей, одномерной, двумерной и многомерной нисходящей хроматографии проводили изучение соединений фенольной природы. Для хроматографирования применяли системы растворителей: бензол- кислота уксусная-этилацетат (50:1:50); кислота уксусная в различных концентрациях (2%, 5%, 15%; 30%), н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2),

хлороформ-формамид. Хроматографические системы готовили с применением растворителей следующей квалификации: ч.д.а. или х.ч, при этом учитывали, что обозначенные цифрами соотношения растворителей, взяты с учетом объемных единицах. Для проявления хроматограмм использовали специфические реактивы (натрия гидроксид спиртовый раствор, циркония оксихлорид метанольный раствор 2%, пары аммиака [25, 115, 163, 204, 301]. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами. В качестве стандартных образцов соединений фенольной природы использовали вещества производства Sigma, Fluka, Acros, «Фитопанацея», Aldrich.

2.2.2.3 Идентификация соединений фенольной природы

Для установления структуры соединений фенольной природы применяли дифференциальную УФ-спектрофотометрию. УФ-спектры фенольных соединений показывают, что различные группы этих соединений легко отличимы друг от друга [146, 159, 301, 308].

Записи УФ-спектров проводили на спектрофотометре СФ-2000 в области спектра от 200 нм до 600 нм, используя кюветы толщина слоя, которых равна10 мм.

Растворителем для фенольных соединений выступали безводные спирты этиловый и метиловый.

УФ-спектры поглощения получали при применении комплексообразующих и ионизирующих реагентов: метанольный раствор натрия гидроксида 10%, метанольный раствор циркония оксихлорида 2%, натрия ацетат безводный, кислоту борную в спирте метиловом в присутствии натрия ацетата.

Для элюатов с хроматограмм и растворов, полученных из кристаллических веществ (0,02 - 0,03 г вещества в 100 мл спирта метилового) записывали дифференциальные спектры.

ИК-спектрометрия. Для фенольных соединений (0,002-0,003 г) записывали также инфракрасные спектры на приборе Alpha Sample Compartment RT-DLa TIS HR 0,9 фирмы Bruker.

Температуру плавления фенолокислот и оксикоричных кислот, флавоноидов определяли на приборе MP 70 Melting Point System, фирмы Mettler Toledo.

Доказательство строения фенольных соединений проводили с использованием химических превращений: кислотного, щелочного, ферментативного гидролиза, щелочного расщепления, ацетилирования, метилирования и др. [301, 320, 338].

Кислотный гидролиз применяли для исследования состава гликозидов. Его проводили в растворе кислоты хлористоводородной 10% и кислоты уксусной 50%-ной в течение 2-4 часов [147].

Щелочной гидролиз: проводили в водном растворе калия гидроксида 0,5% в течение 3 часов [144].

Щелочное расщепление применяли для установления структуры флавоноидов с выделением оксибензойных кислот и фенолов.

При проведении щелочного расщепления использовали расплав натрия гидроксида и нагревали на песчаной бане или масляной бане в течение 5-10 минут, соблюдая температуру около 180-250 ^{0}С [144, 304]. При щелочном расщеплении флавоноидов незамещенных по С-6 и С-8, получали флороглюцин, а из кислотной фракции 6-замещенных флавоноидов - протокатеховую, п-оксибензойную и др. кислоты [304].

Ацетилирование проводили для определения количества оксигрупп в агликонах, для выяснения реакционной способности этих групп в

зависимости от положения [24]. Для ацетилирования использовали свежеперегнанный ангидрид уксусный в присутствии кислоты серной [24].

Метилирование проводили для определения места присоединения углеводного компонента и для получения производных, имеющих четкие температуры плавления. Для проведения метилирования использовали диметилсульфат в среде ацетона в присутствии калия карбоната [25].

Щелочное расщепление оксикоричных кислот проводили в присутствии калия гидроксида, к которому прибавляли три капли воды при температуре 230 - 240°C [91].

2.2.2.4 Исследование фенольных соединений методом ВЭЖХ

Для детального изучения состава и содержания фенольных соединений применяли метод ВЭЖХ [41, 125].

Исследование фенольных соединений проводили с измельченным сырьем, проходящим сквозь сито диаметр отверстия, которого равен 2 мм (ГОСТ 214-83). 1,0 г исследуемого сырья переносили в колбу объемом на 100 мл, приливали 50 мл экстрагента, в частности, спирта этилового 70%, далее колбу плотно присоединяли к обратному холодильнику и проводили нагревание в течение 2 часов на кипящей водяной бане, учитывая время с момента закипания водно-спиртовой смеси в колбе. Далее смесь охлаждали, проводили фильтрование путем переноса извлечения в мерную колбу на 100 мл и недостающий объем восполняли добавлением спирта этилового 70% до метки. Параллельно готовили 0,05% растворы стандартных образцов фенольных соединений в спирте этиловом. Рабочие растворы стандартных образцов готовили из известных веществ производства Sigma, Fluka, Acros, «Фитопанацея», Aldrich и метиловый спирт (ос. ч.)

Полученные извлечения (1 мл) пропускали через сорбент (1 г октадецилсиликагеля с размером частиц 10 мкм). Элюирование проводили 70% спиртом этиловым для получения элюата объемом равным 10 мл. Полученные элюаты анализировали на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы Shimadzu LC 20 Prominence. В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 3.0×150 мм Macherey-Nagel, заполненная обращено-фазовым сорбентом Nucleosis C18 AB зернистостью 3 мкм и пористостью 100A. Объем пробы 2 мкл, детектирование проводили при длинах волн 254 нм, 280 нм, 330 нм, 360 нм с частотой сканирования 3 Гц. Элюировали в градиентном режиме возрастания доли растворам B (смесь ацетонитрил : спирт метиловый : вода очищенная + хлорная кислота в соотношении 40:40:20, pH 2,5) в смеси с раствором A (водный раствор хлорной кислоты pH 1,8) от 0% до 100% при температуре 30^0C, продолжительность анализа 80 минут. Идентификацию пиков проводили по сопоставлению УФ спектров со спектрами из базы данных и по времени выхода в соответствии со стандартными образцами. Массовую концентрацию определяли по градуированной характеристике стандартных образцов с использованием программы LC Solutions (Shimadzu). Исследование проводили в трех повторностях.

2.2.2.5 Приготовление водных извлечений

Измельченное сырье видов рода тимьян, в количестве 5,0 г, заливали 50,0 мл водой очищенной в колбе, объем которой равен 100,0 мл, далее проводили нагревание в течение 1 часа, перед чем колбу соединяли с обратным холодильником. Сырье, после фильтрования извлечения, повторно заливали 50,0 мл воды и повторяли операцию. По истечению трехкратной

экстракции проводили объединение водных извлечений, их упаривание до 25,0 мл под вакуумом и использовали для дальнейшего определения дубильных веществ, углеводов, аминокислот, тритерпеновых соединений.

2.2.2.6 Исследование дубильных веществ

Проведение качественного анализа

Дубильные вещества определяли в водных извлечениях с помощью следующих качественных реакций:

- к водным извлечениям, взятых в объеме 1,0 мл по каплям прибавляли раствор желатины 1% свежеприготовленный и кислоты хлористоводородной 10% раствор в равных количествах [86, 92, 141];
- к водным извлечениям, взятых в объеме 5,0 мл, прибавляли 2,0-3,0 мл кислоты хлористоводородной и формальдегида [86, 92, 141];
- к водным извлечениям, взятых в объеме 5,0 мл, прибавляли 1,0-2,0 мл раствора воды бромной 0,5% [86, 92, 141];
- к водным извлечениям, взятых в объеме 2,0 мл, прибавляли раствор железо - аммонийных квасцов 1% [86, 92, 141].

Проведение количественного анализа

Дубильные вещества, содержащиеся в видах рода тимьян, количественно определяли перманганатометрическим методом по методике, включенной в XI издание государственной фармакопеи [83]. Для этого навески измельченного сырья (около 2,0 г – точно отвешенные) помещали в конические колбы объемом на 500,0 мл, приливали 250,0 мл кипящей воды очищенной и кипятили на плитке с обратными холодильниками в течение 30 минут. Затем извлечения охлаждали, 10,0 мл из них процеживали в колбы конические объемом на 250,0 мл. Далее по 25,0 мл приготовленных

извлечений переносили в колбы конические объемом на 750,0 мл, добавляли 500,0 мл воды очищенной, раствор индигосульфокислоты в объеме 25,0 мл и проводили титрование раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до появления окрашивания золотисто-желтого цвета. В аналогичных условиях проводили контрольный опыт. Количественное определение проводили в пяти повторностях.

2.2.3 Исследование тритерпеновых соединений

Определение качественного состава

Тритерпеновые соединения изучали с применением качественных реакций путем определения их в бутанольных фракциях водно-спиртовых и водных извлечениях, для этого проводили анализ:

- с раствором холестерина 1%;
- реакцией Розенталя;
- реакцией Фонтан-Канделя (в две пробирки в одной из которых находиться 5 мл 0,1 (моль/л) раствора кислоты хлористоводородной, а в другой 5 мл 0,1(моль/л) раствора натрия гидроксида приливают 2-3 капли водного извлечения и сильно встряхивают). О природе сапонинов судили по интенсивности пены и ее объему [141].

Наличие тритерпеновых соединений подтверждали методом хроматографии в тонком слое сорбента, используя пластинки «Sorbfil» и систему растворителей: хлороформ-этилацетат (5:1); в качестве проявителя выступал раствор кислоты серной 20% [88, 141, 265]. Идентификацию веществ проводили сравнением с известными образцами.

Количественное содержание

Тритерпеновые соединения количественно определяли методом фотоэлектроколориметрии, в основе которого положена реакции с

концентрированной кислотой серной и измерением в последующем оптической плотности [9, 120]. Определение проводили в пяти повторностях.

2.2.4 Исследование жирнокислотного состава

Анализ жирнокислотного состава травы растений рода тимьян проводили методом газо–жидкостной хроматографии [293]. При исследовании 50,0 мг измельчённого воздушно - сухого сырья переносили в виалу «Agilent» на 2,0 мл, приливали 50,0 мкг внутреннего стандарта, в качестве которого выступал тридекан в гексане и далее приливали 1,0 мл метилирующего агента (BCl_3 14% в спирте метиловом, Supelco 3-3033). Смесь оставляли на 8 часов в герметично закрытой виале при температуре 65°С. При этом из растительного сырья происходит полное извлечение жирного масла, наблюдается его гидролиз, в ходе которого образуются жирные кислоты и наступает процесс одновременного их метилирования. Далее полученную смесь осторожно сливали с растительного сырья и разбавляли 1,0 мл воды очищенной. Далее метиловые эфиры жирных кислот извлекали хлористым метиленом, и подвергали хроматографированию с применением газо–жидкостного хроматографа Agilent Technologies 6890 с масс–спектрометрическим детектором 5973N. Для анализа использованы: колонка с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 30 м, тип колонки - капиллярная INNOWAX; скорость газа-носителя-гелия 1,2 мл/мин, объём пробы – 2 мкл, которую вводили в течении 0,2 минут со скоростью 1,2 мл/мин, при этом температура термостата должна программироваться от 50°С до 250°С и скорость составлять 4°С/мин, при этом температура нагревателя ввода пробы 250°С. Идентификацию жирных кислот осуществляли путём сравнения с заведомыми образцами метиловых эфиров,

и данными библиотеки масс – спектров NIST05 и WILLEY 2007, сочетания их с программами для идентификации AMDIS и NIST. Содержания индивидуальных жирных кислот рассчитывали методом внутреннего стандарта [11, 293]. Определение проводили в трех повторностях.

2.2.5 Исследование углеводов

2.2.5.1 Качественное определение свободных и связанных сахаров

Определение свободных сахаров проводили в водных извлечениях, для этого проделывали реакцию Бертрана и о наличии свободных сахаров судили по образованию осадков кирпично-красного цвета меди оксида I, при нагревании смеси состоящей из реактива Фелинга и водных извлечений из исследуемых растений, взятых в равных объемах [141, 245], а также методом бумажной хроматографии, используя системы растворителей н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3) и н-бутанол-кислота уксусная-вода (2:7:1) [62, 274] и достоверные образцы сахаров. Проявителем хроматограмм выступал раствор анилин-фталата.

Связанные сахара

а) гликозиды определяли в водных извлечениях при этом проводили качественные реакции с раствором а-нафтола 20% и жидкостью Фелинга [100, 141];

б) наличие полисахаридов доказывали по выпадению рыхлых осадков путем прибавления спирта этилового 96% в трехкратном объеме к водным концентрированным извлечениям [244].

2.2.5.2 Выделение полисахаридных комплексов

Водорастворимые полисахаридные комплексы получали из воздушно-сухого шрота сырья после проведения экстракции фенольных соединений спиртом этиловым 70% [42, 43, 67].

0,2 кг шрота воздушно-сухого подвергали экстрагированию, в течение 2 часов, при нагревании до 95°С горячей водой 1:20 постоянно перемешивая. Полисахариды экстрагировали еще дважды в соотношении 1:10 каждый раз в течение часа. Далее растительный материал подвергали центрифугированию, после объединения, водные извлечения, упаривали до 1/5 первоначального объема. Для проведения дополнительной очистки водных извлечений от фенольных соединений их пропускали через сорбент полиамида на воронке Бюхнера. Сорбент промывали водой очищенной небольшими порциями, которые затем присоединяли к общей массе элюатов. Затем полисахариды из водных извлечений осаждали, прибавляли трехкратный объем спирта этилового 96%. Полисахариды выпадали в виде осадка, который отфильтровывали, с последующем промыванием спиртом этиловым, ацетоном и дальнейшем высушиванием.

Из шрота сырья, оставшегося после выделения полисахаридов, получали пектиновые вещества. К остатку сырья приливали смесь 0,5%-ных растворов аммония оксалата и кислоты щавелевой (1:1) в соотношении 1:20 и экстрагировали при 80-85^{0}С в течение 2.5 часов. Извлечение получали еще дважды в соотношении 1:10. Объединенные извлечения концентрировали, диализовали, центрифугировали и осаждали спиртом этиловым 95% (1:5) [106]. При этом выпадали осадки пектиновых веществ, которые в дальнейшем отфильтровывали, промывали спиртом этиловым, с последующим высушиванием. Определение проводили в пяти повторностях.

2.2.5.3 Кислотный гидролиз

Мономерный состав полисахаридов и пектиновых веществ определяли после проведения кислотного гидролиза кислотой серной [42, 244, 256].

Навески полисахаридных комплексов (0,05 г) помещали в ампулы, приливали 2,5 мл раствора кислоты серной (1 моль/л), ампулы запаивали и их содержимое гидролизовали 6 часов для полисахаридов при температуре 100-105°С и 20-24 часа для пектиновых веществ, при указанной выше температуре. Содержимое ампул помещали в стаканчики, ампулы промывали водой очищенной в объеме 5,0 мл, проводили нейтрализацию по универсальному индикатору до нейтральной реакции, применяя бария карбонат. Содержимое стаканчика фильтровали через фильтры, которые промывали водой очищенной до получения объема фильтратов 10,0 мл. К полученным фильтратам для осаждения полисахаридов прибавляли 3 объема спирта этилового 96% в случае водорастворимых полисахаридов и 5 объемов в случае пектиновых веществ. Содержимое тщательно перемешивали и оставляли на 1-2 часа. Выпавшие осадки отфильтровывали. С полученными фильтратами на водяной бане производили упаривания до объема равного около 0,5 мл (раствор А). Деспергирование осадков бариевых солей уроновых кислот проводили с фильтров 2,5 мл воды очищенной, добавляли катионит КУ-2 (H^{+}) до pH 3-4 по универсальному индикатору. После чего полученные растворы фильтровали, затем упаривали до 0,5 мл (раствор Б).

2.2.5.4 Хроматографический анализ

Анализ углеводов проводили на хроматографической бумаге «Фильтрак» FN1. Нейтральные моносахариды изучали методом нисходящей

хроматографии в системе н.бутанол-пиридин-вода (6:4:3) [170, 191, 218, 244, 245], а кислые моносахариды восходящей хроматографией в системе: этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная-вода (18:3:1:4) [64, 244, 245, 278]. Определение проводили в пяти повторностях.

2.2.5.5 Количественное изучение моносахаридного состава

Содержание моносахаров в гидролизатах пектиновых веществ, а также в полисахаридных комплексах определяли денситометрически после проведения хроматографии в тонком слое сорбента [42, 64]. К точной навеске (0,05 г) полисахаридных комплексов приливали 5,0 мл раствора кислоты серной (1 моль/л) и гидролизовали 6 часов в случае ВРПС, 24 часа при изучении пектиновых веществ на водяной бане при нагревании. Полученные гидролизаты подвергали нейтрализации путем добавления бария карбоната, далее осуществляли фильтрования осадков. Фильтраты концентрировали до 1,0 мл и приливали спирт этиловый 96% в объеме 10,0 мл. Для осаждения отделяли полученные осадки бариевых солей уроновых кислот, затем спиртом этиловым 80% проводили их промывания. Водно-спиртовые фильтраты объединяли и подпаривали досуха в вакууме. Полученные сухие остатки (сумма нейтральных моносахаридов), растворяли в воде, переносили количественно в мерные колбы объемом на 5,0 мл и восполняли недостающий объем тем же растворителем до 5,0 мл. Диспергирование осадков бариевых солей уроновых кислот с фильтров проводили водой очищенной 2,5 мл, прибавляли при этом катионит КУ-2 (H^+) до pH среды 3-4 по универсальному индикатору. Растворы фильтровали и далее подпаривали в вакууме досуха. Сухие остатки (сумма кислых моносахаридов), растворяли в воде очищенной, переносили количественно в

мерные колбы объемом на 5,0 мл и восполняли недостающий объем тем же растворителем до 5,0 мл. На пластинку «Sorbfil» (ПТСХ-П-А) наносили микропипеткой по 0,025 мл приготовленных растворов и растворы кислых и нейтральных моносахаридов. Образцы моносахаридов были отнесены к категории ЧДА, которые были дополнительно 3 раза перекристаллизованы водно-спиртовыми растворами и высушены. Хроматографирование проводили в системе растворителей, состоящей из н.бутанол - кислота уксусная - вода взятых в соотношении 3:1:1. После хроматографированния хроматограммы сушили на воздухе 2 часа, затем их проявляли анилиндифениламинофосфатным реактивом. Обработанные хроматограммы выдерживали на воздухе 20 минут, затем помещали на 10 минут в термостат. Моносахариды проявлялись в виде синих, голубовато-зеленых и коричневых пятен на бесцветном фоне. Содержание сахаров определяли на денситометре ERi фирмы "Карл Цейес Йена" (Германия). Определение проводили в пяти повторностях.

2.2.5.6 Определение количественного содержания функциональных групп пектиновых веществ

Изучение пектиновых веществ, в частности их функциональных групп (метоксилированных карбоксильных, свободных карбоксильных, метоксильных групп, общее количество карбоксильных) проводили методом титриметрии [42, 103].

2.2.6 Исследование аминокислотного состава

Для качественного обнаружения аминокислот использовали водные извлечения с которыми проводили нингидриную реакцию, а также анализировали их состав методом хроматографии на бумаге [152, 186, 265, 273].

Хроматографический анализ полученных извлечений (0,03-0,05 мл) проводили на бумаге "Фильтрак" N1, предназначенной для хроматографирования в системе растворителей н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2) в сравнении с достоверными образцами аминокислот. Высушивания хроматограмм проводили на воздухе, далее их подвергали обработке спиртовым раствором нингидрина 0,2%, высушивали и выдерживали при 100-105° С в сушильном шкафу в течение нескольких минут. О наличие аминокислот судили по проявлению их в виде пятен красно-фиолетового цвета [163, 186].

На втором этапе был изучен качественный и количественный состав аминокислот, который определяли на аминокислотном анализаторе марки ААА-339 (Чехия). Сырье изучаемых растений подвергали экстракции горячей водой, с последующим фильтрованием полученных извлечений и упариванием до сухого остатка в вакууме. Свободные аминокислоты определяли в сухих остатках (точные навески), которые растворяли в натриево-цитратном буфере (pH 2,2), доводили объемы растворов до 10 мл и анализировали на аминокислотном анализаторе. Исследование аминокислотного состава осуществляли в стандартных условиях, которые как правило используются для разделения гидролизатов белков.

Количественную оценку проводили по (автоматически) площади пиков аминокислот, идентифицированных в ходе исследования. Каждую идентифицированную аминокислоту определяли количественно в аликвоте в

наномолях и нанограммах, использованной при анализе. Затем проводили расчет количественного содержания свободных аминокислот, которые были обнаружены в ходе исследования, выражая их значение в мг% [10, 186].

Для определения аминокислот, находящихся в связанном состоянии проводили кислотный гидролиз. Для этого брали точные навески сухих остатков водных извлечений, переносили в ампулы, приливали раствор кислоты хлористоводородной (6 моль/л). Запаянные ампулы, помещали в сушильный шкаф при температуре 105-110^0 С на 24 часа. Полученные гидролизаты отфильтровывали. Далее горячей водой очищенной промывали остатки на фильтрах до нейтральной реакции (по универсальному индикатору). Фильтраты помещали на водяную баню и упаривали до густой консистенции, далее прибавляли воду очищенную (20,0 мл) продолжая упаривание до прекращения выделения паров кислоты хлористоводородной. По окончанию процесса упаривания к остаткам приливали 10,0 мл буферного раствора (pH 2,2), фильтровали, анализировали на аминокислотном анализаторе.

2.2.7 Изучение органических кислот

Исследование органических кислот методом газо-жидкостной-хромато-масс-спектрометрии

Исследование органических кислот проводили методом газо – жидкостной хроматографии по методике, используемой для определения жирных и фенолкарбоновых кислот кислот [293]. Для проведения анализа измельчённое воздушно - сухое сырье растений рода тимьян, в количестве 50,0 мг помещали в виалу «Agilent» на 2,0 мл, прибавляли 50,0 мкг внутреннего стандарта (тридекана в гексане) и 1,0 мл Supelco 3-3033, BCl_3

14% в спирте метиловом, которые выступали в роли метилирующего агента. Полученную смесь выдерживали в течении 8 часов в закрытой, герметичной виале при температуре 65°С. При этом метилируются как свободные органические так и фенолкарбоновые кислоты. Полученную смесь разбавляли водой очищенной, в количестве 1,0 мл, после сливания ее с растительного сырья. Далее хлористым метиленом проводили извлечение метиловых эфиров фенолкарбоновых кислот, с последующим их хроматографированием на газо– жидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс–спектрометрическим детектором 5973N. Для анализа использованы: капиллярная INNOWAX хроматографическая колонка с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 30 м; скорость газа–носителя – гелия 1,2 мл/мин., объём пробы – 2 мкл.; скорость ввода пробы 1,2 мл/мин в течении 0,2 минут; температура термостата должна программироваться от 50°С до 250°С и скорость составлять 4°С/мин; при этом температура нагревателя ввода пробы составляет 250°С. Идентификацию органических кислот осуществляли путём сравнения с заведомыми образцами метиловых эфиров и данными библиотекой масс – спектров NIST05 и WILLEY 2007, сочетания их с программами для идентификации AMDIS и NIST. Концентрации индивидуальных органических кислот рассчитывали методом внутреннего стандарта [11, 293]. В качестве образцов органических кислот использованы вещества производства Fluka, Acros, Sigma, Aldrich. Определение проводили в трех повторностях.

Количественное определение органических кислот

Количественное содержание свободных органических кислот определяли титриметрическим методом согласно методики XI издания государственной фармакопеи [83].

Расчет содержания органических кислот проводили в пересчете на кислоту яблочную и выражали в %. Определение проводили в пяти повторностях.

2.2.8 Исследование минерального состава

Минеральный состав видов рода тимьян изучали методом испарения с прмнением эмиссионного спектрального анализа в лаборатории спектрального анализа ЦИЛ ФГУП «Кавказ геолсъемки» [72, 143, 152, 202].

Анализируемые пробы растительного сырья предварительно высушивали, подвергали измельчению и далее помещали в муфельную печь для озоления в течение 2 ч. Образовавшуюся золу помещали в эксикатор для охлаждения, далее проводили взвешивание ее на аналитических весах и в последующем анализировали на спектрографе ДФС-8-1. Расчет содержания отдельных элементов в золе определяли с погрешностью не более 2% на спектрограммах.

2.3 Фармакологические и токсикологические методы исследования

Исследования фармакологической активности выполнены на 48 белых половозрелых крысах массой 180-220 г обоего пола; 8 кроликах обоего пола породы Шиншилла массой 2000 – 2500 г; 192 мышах обоего пола массой 18-20 г; 54 лягушках вида Rana Temporarea. Животные содержались в стандартных условиях в виварии (Приказ МЗ № 1179 от 10.10.83 г.). Эксперименты проводили в соответствии с принятыми документами (Приказ №708 Н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»). Эвтаназия животных осуществлялась с помощью метода мгновенной декапитации, с применением легкого эфирного наркоза. Животных разделяли на группы по принципу рандомизации. Все животные содержались в идентичных условиях.

Кроме того, при проведении микробиологических исследований использовали штаммы условно-патогенных бактерий.

2.3.1 Изучение острой токсичности

Острую токсичность $ЛД_{50}$ определяли по общепринятому методу [210, 281].

В эксперименте использовали мышей обоего пола массой 18,0-20,0 г. Экспериментальные группы были сформированы из 6 животных. Настои готовили в концентрации 1:10 из травы изучаемых растений рода тимьян. Фитопрепараты вводили в диапазоне доз 2,0 г/кг – 5,0 г/кг (в пересчете на сухое сырье) однократно внутрибрюшинно в объемах от 0,2 мл до 1,0 мл. В течение 24 часов вели наблюдение за общим состоянием подопытных животных и их поведением. 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.

2.3.2 Исследование отхаркивающей активности

Отхаркивающее действие исследовали на модели изучения моторной функции мерцательного эпителия пищевода лягушек [85]. При этом лягушек закрепляли на корковой пластинке брюшком вверх. Наносили настои сырья растений рода тимьян, которые готовили в концентрации 1:10, на кончик

языка в объеме равном 0,1 мл. В качестве препарата сравнения служил настой официнального вида - травы тимьяна ползучего.

Регистрацию движения ресничек мерцательного эпителия проводили с использованием шелковой нити длинной 15,0 мм, которую помещали у основания языка, по истечению 30 секунд после нанесения изучаемых настоев. Фиксировали время, в течение которого происходило заглатывание нити. При этом отмечали время, пошедшее на движение нити на расстоянии 10,0 мм без настоя (контроль) и после нанесения исследуемого настоя. Учитывая, что разные животные имеют значительный разброс скоростей движения мерцательного эпителия, нами был использован коэффициент ускорения (КУ), который рассчитывали как отношение скорости, полученной после нанесения исследуемого настоя к исходной скорости [85].

2.3.3 Изучение противовоспалительной активности

Оценку противовоспалительной активности проводили, изучая влияние испытуемых настоев на процессы экссудации и пролиферации.

Антиэкссудативную активность исследовали на мышах обоего пола массой 18,0-20,0 г. Острое асептическое воспаление конечности животных вызывали субплантарным введением 0,1 мл раствора формалина 2,5 % [210]. Мышам опытных групп вводили внутрижелудочно исследуемые настои в следующем временном интервале: за 2 часа до введения формалина и через 5 часов, 18 часов после его введения. Настои, вводимые в ходе эксперимента в дозе 1000 мг/кг (в пересчете на сухое сырье) в объеме равном 10,0 мл/кг, готовили в соотношении 1:10. Мыши контрольной группы получали воду очищенную аналогично мышам опытной группы. Препаратом сравнения служил настой травы тимьяна ползучего (официнального вида). После

прохождения 24 часов от введения раствора формалина оценивали антиэкссудативный эффект, для чего отрезали задние лапки у животных на уровне тарзокрурального сустава, а затем определяли разницу в массе отечной и неотечной лапок.

Влияние исследуемых настоев на **пролиферативные процессы воспаления** изучали используя модель «ватной гранулемы» [210]. Для этого имплантировали стерильные ватные шарики массой 25,0 мг в область спины под кожу. Эксперименты проводили на белых крысах массой 180,0-200,0 г. Крысам опытных групп вводили внутрижелудочно исследуемые настои в течение 7 дней два раза в сутки. Настои готовили в концентрация 1:10 и вводили в дозе 1000,0 мг/кг (в пересчете на сухое сырье) в объеме равном 10,0 мл/кг. Крысам контрольной группы аналогично вводили воду очищенную. Препаратом сравнения служил настой травы чабреца (официнального вида). По прошествии 7 дней эксперимента ватный шарик с образовавшейся грануляционной тканью извлекали с последующем его высушиванием до постоянной массы. Определяли разницу между массой влажной и массой сухой гранулемы, для определения массы образовавшейся фиброзно-грануляционной ткани.

2.3.4 Изучение ангиопротекторного действия

Ангиопротекторное действие изучали на кроликах – альбиносах вес которых составлял от 2,0 кг до 2,5 кг, используя модель локальной воспалительной реакции, индуцированной ксилолом [177, 178]. Индикаторами проницаемости сосудов служил трипановой сини 1% раствор (на физиологическом растворе). Раствор трипановой сини (2,0 мл/кг) вводили в ушную краевую вену кролика. Кроликам опытных групп вводили

внутрижелудочно исследуемые настои 1 раз в сутки в течение 7 дней. Настои (1:10) вводили в объеме равном 10,0 мл/кг, в дозе 1000 мг/кг (в пересчете на сухое сырье). Кроликам контрольной группы вводили аналогично воду очищенную в эквиобъемном количестве. Препаратом сравнения служил настой травы тимьяна ползучего. Показателями нарушения проницаемости капилляров явилось время появления сине-окрашенных пятен на коже, а также их диаметр. Влияние исследуемых настоев на проницаемость капилляров выражали по разнице между временем проявления пятен окрашивания до введения настоев и временем проявления пятен окрашивания после их введения, а также учитывали их диаметр, который выражали в см.

2.3.5 Изучение антибактериальной активности

Антибактериальную активность изучали у настоев и эфирного масла, полученных из травы растений рода тимьян.

Антимикробную активность исследуемых настоев и эфирного масла определяли нанесением их на питательную среду с дальнейшим посевом микроорганизмов на поверхность агара [71, 205, 210, 241]. Для исследования использовали следующие штаммы микроорганизмов: Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus; грибы рода Candida; Escherichia coli; Bacillus cereus; Proteus vulgaris. Микробная нагрузка составляла 100 млн. микробных тел в 1,0 мл.

При изучении антимикробной активности из полученных настоев и выделенного эфирного масла готовили серию разведений в различной концентрации в стерильном питательном агаре остуженном до 50 ^{0}С. После перемешивания содержимое разведений разливали в стерильные чашки

Петри и выдерживали при комнатной температуре для застывания. После этого чашки делили на сектора. Каждый сектор засеивали взвесью суточных культур, применяя штриховой метод, содержащих 100 млн. микробных тел в 1,0 мл. В качестве контроля выступали посевы тех же бактерий в питательных средах, не содержащих исследуемых настоев и эфирного масла. Посевы выдерживали в термостате при температуре +37 ^{0}С, 24 часа и 48 часов (для грибов рода Candida). После этого просматривали интенсивность роста колоний микроорганизмов (сильный рост, слабый рост) или отсутствие роста.

2.3.6 Изучение антиоксидантной активности

Определение антиоксидантной активности травы растений рода тимьян проводили методом, основанным на взаимодействии между калия перманганатом и веществами восстанавливающего характера, содержащимися в растительном сырье тимьянов [14, 189].

Для приготовления водных и вводно-спиртовых извлечений из травы растений рода тимьян использовали фармакопейную методику приготовления настоя в соотношении 1:10 и 15 минут нагревали на кипящей водяной бане, 45 минут охлаждали [83].

Для исследования антиоксидантной активности в химический стакан помещали 8,0 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды очищенной, приливали 1,0 мл раствора кислоты серной 20% и 1,0 мл раствора калия перманганата 0,05 н. Содержимое перемешивали и титровали полученными водными и водно-спиртовыми извлечениями из травы растений рода тимьян до исчезновения розовой окраски. Расчет показателя антиоксидантной активности, которому соответствует концентрация

биологически активных веществ восстанавливающего характера проводили в пересчете на цинарозид, рутин и кверцетин.

2.4 Методики стандартизации сырья

Методы отбора проб для анализа

Пробы для проведения товароведческого анализа сырья растений рода тимьян отбирали в соответствии с ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб» [183].

Морфологические и анатомические исследования

Для морфологических, анатомических исследований использовали свежее, высушенное и фиксированное (смесью спирта и глицерина) растительное сырье, заготовленное в течение 2009-2015 гг. в областях средней полосы России.

Микропрепараты для проведения анатомического исследования готовили согласно ГФ XI [83].

Изучение микропрепаратов проводили с помощью микроскопа «Биолам». Фотографию микропрепаратов проводили на приборе МФН-10 У 4.2, а также используя цифровую насадку. Обработку фотоснимкиов осуществляли на компьютере с использованием программы *«AdobePhotoshop 7.0».*

Установление числовых показателей, регламентирующих качества сырья

Числовые показатели, такие как зола общая и зола нерастворимая в растворе кислоты хлористоводородной 10%, влажность, содержание экстрактивных веществ, содержание примесей определяли по методикам XI издания Государственной фармакопеи [83].

Определение суммы флавоноидов, суммы гидроксикоричных кислот проводили по разработанным и валидированым нами методикам.

Определение микробиологической чистоты сырья

Микробиологическую чистоту определяли согласно статье ГФ XI «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» [82] и Изменению №3 от 19.06.03 г. (категория 4А - для лекарственного растительного сырья, подвергающегося термической обработке для приготовления лекарственной формы) [105].

Установления сроков хранения сырья

Срок годности сырья устанавливали в условиях лаборатории на образцах, которые подвергали хранению в сухом помещении, которое хорошо проветриваемом и защищенно от попадания прямых солнечных лучей, в бумажных мешках по ГОСТ 17768-90.

Каждые полгода в образцах определяли содержание суммы флавоноидов по разработанной нами методике. Числовые показатели определяли по методикам ГФ XI [83] в высушенном растительном материале в 5 повторностях.

2.5 Исследование технологических характеристик лекарственного растительного сырья

Определение измельченности сырья проводили, используя ситовой анализ [83].

Насыпную массу определяли по методике Пономарева В.Д. [198]. Сырье уплотняли на устройстве для вибрационного уплотнения порошков 545 Р–АК-3 до достижения постоянного объема. Насыпную массу определяли по формуле:

$$\gamma = \frac{m}{V_0}$$, где

γ – насыпная масса, г/см^3;

m – масса сырья, г;

V_0 – объем, занимаемый сырьем, см^3.

Опрределение оптимального соотношения «сырье : экстрагент» проводили, используя необходимую величину «зеркала» экстрагента (слой экстрагента не менее 3 мм) над поверхностью сырья [263].

Внешний вид, вкус и запах жидкого экстракта определяли органолептически [83].

Содержание тяжелых металлов в жидком экстракте определяли по методике ГФ XI издания [83].

2.6 Статистическая обработка данных

Результаты экспериментальных исследований обработаны статистически с применением общепринятых методов для малой выборки с определением средней величины (M) и средней арифметической ошибки (m) [83, 271]. Достоверность результатов (P) была оценена с помощью критерия Манна-Уитни [219]. Различие считали достоверными при вероятности 95 % ($P \leq 0,05$). Обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 7,0.

ГЛАВА 3 ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН

Как показано в литературном обзоре, растения рода тимьян во флоре средней полосы России представлены 7-8 видами, принадлежащими к 2 секциям; широко распространенными среди которых являются тимьян Маршалла, тимьян блошиный, тимьян меловой, тимьян Палласа, а официнальный вид - тимьян ползучий (чабрец) встречается лишь в некоторых областях и в ограниченных количествах. Произрастают так же два гибридных вида: тимьян двуликий и тимьян Черняева. Заготовители сырья чабреца обычно не различают виды между собой, поэтому сырье может быть представлено и другими видами, широко произрастающими в указанном регионе или их различным сочетанием. Однако, возможность использования других видов в качестве источника сырья тимьяна ползучего (чабреца) до настоящего времени не определена, их химический состав изучен недостаточно, сведения о содержании в них биологически активных веществ носят фрагментарный характер. В связи с этим актуальным является изучение химического состава растений рода тимьян флоры средней полосы России с целью обоснования использования их в научной медицине.

Для изучения химического состава растений рода тимьян нами выбраны эфирное масло, фенольные соединения, тритерпеновые соединения, полисахаридные комплексы, минеральные элементы, аминокислоты, карбоновые кислоты, т.к. именно они по многочисленным данным литературы являются основными химическими составляющими растений рода тимьян и обуславливают различные виды их фармакологического действия: отхаркивающего, противовоспалительного, антиоксидантного, седативного, мембраностабилизирующего, антимикробного и других (таблица 4). Кроме того, некоторые из них в растениях рода тимьян практически не изучены.

В связи с чем нами, с помощью общепринятых методов, представленных в главе 2 изучен состав различных групп биологически активных веществ 7 видов растений рода тимьян флоры средней полосы России, которые представлены таблице 4.

Таблица 4 – Состав биологически активных веществ растений рода тимьян

Виды тимьянов	Эфирное масло	Тимол	Кумарины	Фенолокислоты	Флавоноиды	Дубильные вещества	Тритерпеновые соединения	Свободные сахара	Полисахариды	Аминокислоты	Органические кислоты
Секция 1 Camptodromi A. Kern.											
Подсекция 1 Isolepides											
Тимьян Палласа	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Тимьян меловой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Подсекция 2 Serpylla											
Тимьян ползучий	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Секция 2 Marginati A. Kern.											
Подсекция 1 Marginate											
Тимьян блошиный	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Подсекция 2 Verticillati											
Тимьян Маршалла	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Тимьян двуликий	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Тимьян Черняева	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.1 Эфирное масло

Для растений рода тимьян характерна высокая вариабельность компонентного состава эфирного масла [97] (Приложение №1). Колебания в количественном содержании компонентов широко варьируют как внутри

видов, в зависимости от места произрастания, освещенности, времени сбора, так и между различными видами.

Выделение и изучение эфирного масла

Для получения эфирного масла, сырье изученных растений подвергали гидродистилляции в соответствии с методом 2 ГФ XI издания, содержание масла определяли в 50,0 г измельченного сырья, время перегонки 3 часа [83].

Полученное таким образом эфирное масло пропускали через слой натрия сульфата безводного для удаления остатков воды. Эфирное масло исследованных растений представляло собой легко подвижную жидкость от светло-желтого до желто-зеленого цвета, горьковатого вкуса с характерным ароматным запахом. Выход эфирного масла составил от 0,15±0,01% до 1,72±0,04% (таблица 5).

Таблица 5 - Содержание основных групп БАВ в растениях рода тимьян

Виды тимьянов	Эфирное масло, %,	Флавоноиды, %	Фенолкарбоновые кислоты, %	Дубильные вещества, %	Тритерпеновые соединения, %	Водорастворимые полисахариды, %	Пектиновые вещества	Аминокислоты,* мг/100 г	Органические кислоты
Секция 1 Camptodromi A. Kern.									
Подсекция 1 Isolepides									
Тимьян Палласа	0,22± 0,58	1,24±0, 0,05	6,80± 0, 80	14,70 ±0,59	0,91± 0,03	4,64± 0,12	14,01 ±0,31	0,95	6,15± 0,16
Тимьян меловой	0,29± 0,01	1,43± 0,06	4,22± 0,13	13,70 ±0,59	2,40± 0,11	7,58± 0,18	8,96± 0,20	0,74	5,77± 0,15
Подсекция 2 Serpylla									
Тимьян ползучий	0,56± 0,02	0,98± 0,04	4,86± 0,19	16,02 ±0,72	1,85± 0,06	5,55± 0,17	10,25 ±0,22	0,58	11,15 ±0,49
Секция 2 Marginati A. Kern.									
Подсекция 1 Marginate									
Тимьян	0,57±	2,43±	8,23±	22,68	1,29±	5,80±	10,60	0,70	6,56±

блошиный	0,02	0,08	0,23	±0,30	0,06	0,18	±0,35		0,24
Подсекция 2 Verticillati									
Тимьян Маршалла	1,72± 0,04	1,56± 0,04	4,51± 0,17	14,00 ±0,34	2,10± 0,10	5,65± 0,16	17,78 ±0,38	0,97	5,80± 0,24
Тимьян двуликий	0,15± 0,01	0,86± 0,04	2,62± 0,09	12,04 ±0,20	4,62± 0,23	4,52± 0,14	8,21± 0,37	0,94	9,75± 0,14
Тимьян Черняева	0,29± 0,02	1,33± 0,05	4,97± 0,16	12,37 ±0,22	0,52± 0,02	3,10± 0,12	11,25 ±0,33	0,96	5,77± 0,21

*Аминокислотный состав определен в трех повторностях

Качественный состав эфирного масла изучали с помощьью метода газо-жидкостной хроматографии – на хроматографе – Agillent Technology 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973N, (раздел 2.2.1).

Исследование проводили в трех повторностях.

Результаты представлены в таблице 6, на рисунках 8-14.

Таблица 6 - Компонентный состав эфирного масла растений рода тимьян, мг/кг

№ п/п	Наименование веществ, содержащихся в эфирном масле	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1.	1,3,8-пара-ментатрен	8,1	-	-	-	-	-	-
2.	α-терпинен	3,9	-	14,36	-	-	47,56	15,91
3.	α -терпинеол	3756,9	633,0	3381, 06	-	-	-	-
4.	δ-терпинеол	-	185,6	-	-	-	-	-
5.	терпинен-4-ол	-	462,3	-	63,1	-	-	-
6.	γ-терпинен	-	-	4,73	44,2	79,3	-	-
7.	пара-цимен	3,9	58,2	-	-	42,3	-	-
8.	лимонен	37,2	-	50,26	-	-	1,75	3,62
9.	линалоол	43,2	709,8	2285, 74	256,3	236,1	131,39	1,02
10.	камфора	86,9	266,4	61,36	-	-	10,79	-
11.	транс-карвеол	88,7	-	-	-	-	-	-
12.	карвон	114,2	-	-	-	-	-	-
13.	борнилацетат	46,9	-	-	-	-	-	-
14.	борнеол	-	-	338,4 8	1859, 3	2521, 0	5,61	-
15.	тимол	18,4	2366,5	828,0 4	2033, 9	2195, 3	-	744,11
16.	метилтимол	-	-	-	113,4	76,1	-	-
17.	транс-2-деценаль	13,5	-	-	-	-	-	-
18.	нерилацетат	8,6	-	12,95	-	-	13,58	9,08
19.	неролидол	475,6	25603,3	254,33	-	-	-	76,30

20.	геранилацетат	15,6	-	321,90	-	-	46,44	-
21.	гераниол	-	-	578,87	-	-	62,10	29,52
22.	геранил пропионат	-	-	-	-	-	25,77	-
23.	β-бурбонен	77,2	559,7	42,79	159,6	120,7	8,37	-
24.	бурбонанол	22,3	-	-	-	-	-	-
25.	4-метил-2-(3-метил-2-бутенил) фурон	-	-	-	-	-	8,91	-
26.	β –элемен	18,6	60,7	-	-	-	-	-
27.	β –кубебен	9,4	-	-	157,5	333,8	-	-
28.	α –кубебен	-	70,8	10,20	-	74,3	-	-
29.	α –кариофиллен	12,6	511,6	-	6385,1	1540,9	3,60	-
30.	кариофиленоксид	-	-	8,00	943,8	408,3	110,24	489,70
31.	транс-кариофилен	-	-	136,17	-	-	13,93	34,47
32.	гермакрен D	182,2	179,1	108,62	752,2	341,6	8,78	27,46
33.	гермакрен B	-	-	93,93	-	-	15,28	6,68
34.	бициклогермакрен	13,9	-	-	457,6	-	-	-
35.	α –фарнезен	30,3	-	24,23	-	-	-	4,67
36.	фарнезол	12,1	-	75,81	-	-	150,28	21,89
37.	гексагидрофарнезилацетат	14,5	-	-	48,0	44,8	-	-
38.	сальвиаль-4(14)-ен – 1 – он	23,9	-	-	-	-	-	-
39.	цис-3-гексен-1-ол	-	240,4	-	-	114,9	-	-
40.	1-октен-3-ол	-	529,8	-	1648,3	741,3	8,68	-
41.	1,8-цинеол	-	1269,3	12,68	-	216,1	-	-
42.	Z-цитраль	-	-	-	-	-	368,43	-
43.	E-цитраль	-	-	-	-	-	444,13	-
44.	транс-сабиненгидрат	-	555,1	-	545,5	635,6	-	-
45.	2,3,3-триметиол-3-циклопентен-альдегид	-	111,5	-	-	-	-	-
46.	метилкарвакрол	-	306,3	-	2153,6	256,9	-	-
47.	дец-1-ен	-	-	-	-	-	8,31	-
48.	карвакрол	-	11238,5	487,78	41025,4	389800,9	23,22	1032,39
49.	эвгенол	-	401,9	-	1085,9	609,7	-	3,79
50.	гумулен	-	48,2	4,17	369,7	-	-	2,39
51.	аромадендрен	-	147,4	-	-	-	6,35	2,67
52.	β –бисаболен	-	278,8	336,52	3812,5	2559,7	92,56	119,68
53.	цис- α –бисаболен	-	-	-	143,0	368,3	-	-
54.	виридифлорол	-	1089,8	-	-	-	-	-
55.	α –аморфен	-	-	-	496,6	-	-	8,05
56.	α –мууролен	-	-	-	169,8	153,7	-	8,94

57.	γ-кадинен	-	-	-	166,2	156,6	-	-
58.	δ-кадинен	-	-	10,95	949,3	620,7	-	30,64
59.	спатуенол	-	-	611,27	640,6	698,1	50,23	51,32
60.	изоспатуенол	-	-	37,21	-	-	7,65	-
61.	β-мирцен	-	-	39,31	-	-	13,82	-
62.	транс-оцимен	-	-	14,04	-	-	1,04	0,21
63.	цис-оцимен	-	-	27,26	-	-	2,78	1,26
64.	β-ионон	-	-	-	-	-	0,84	-
65.	вигарол β	-	-	-	-	-	6,95	-
66.	фитол	-	-	7,48	-	-	2,50	2,62
67.	пентакозан	-	28,8	2,12	21,7	40,0	0,67	7,63
68.	гептакозан	-	35,9	5,66	12,7	48,6	4,39	4,72
69.	сквален	-	304,4	167,95	189,8	357,4	26,24	321,37
70.	нонакозан	-	73,5	12,42	23,5	87,2	8,11	10,07
71.	трикозан	-	-	3,16	-	-	1,36	9,84
72.	тетракозан	-	-	-	-	-	2,85	-
73.	гексакозан	-	-	4,79	-	-	48,23	6,75
74.	бензальдегид	-	-	-	-	-	-	1,52
75.	транс-линалоол оксид	-	-	80,66	-	-	6,32	0,48
76.	цис- линалоол оксид	-	-	27,41	-	-	-	1,09
77.	изо-борнеол	-	-	-	-	-	-	11,63
78.	n-кумен-8-ол	-	-	-	-	-	-	7,05
79.	деканаль	-	-	-	-	-	-	3,79
80.	нераль	-	-	1041,87	-	-	-	8,60
81.	нерол	-	-	432,32	-	-	-	22,46
82.	гераниаль	-	-	1137,01	-	-	-	11,16
83.	дека-2,4-диеналь	-	-	-	-	-	-	4,53
84.	α - терпенил ацетат	167,0	-	1160,93	-	-	-	7,88
85.	ундек-2-еналь	-	-	-	-	-	-	5,21
86.	гермакрен D-4-ол	-	-	-	-	-	-	11,89
87.	α -бисаболен	-	-	40,34	-	-	-	30,14
88.	γ -гурьюнен	-	-	17,78	-	-	-	27,04
89.	ледол	-	-	-	-	-	-	9,86
90.	аромадендренэпоксид	-	-	-	-	-	-	23,58
91.	кубенол	-	-	-	-	-	-	37,29
92.	δ -кадинол	-	-	-	-	-	-	148,43
93.	α - кадинол	-	-	5,95	-	-	-	277,83
94.	муорол	-	-	17,43	-	-	-	81,62
95.	аромадендреноксид	-	-	5,18	-	-	-	15,02
96.	транс- α-бисаболенэпоксид	-	-	8,17	-	-	-	75,61
97.	изоаромадендренэпоксид	-	-	9,87	-	-	-	77,22

98.	цис- α-бисаболенэпоксид	-	-	33,84	-	-	-	39,63
99.	кумол	-	-	3,74	-	-	-	-
100.	α -терпинолен	5,1	-	22,19	-	-	-	-
101.	лимонен оксид	-	-	19,66	-	-	-	-
102.	нерол оксид	-	-	26,82	-	-	-	-
103.	эндоборнилацетат	-	-	53,84	-	-	-	-
104.	хризантенон	-	-	5,33	-	-	-	-
105.	вербенон	-	-	30,53	-	-	-	-
106.	зингеберен	-	-	6,64	-	-	-	-
107.	сесквифеландрен	-	-	12,39	-	-	-	-
108.	ланцеол	-	-	52,22	-	-	-	-
109.	леден оксид	-	-	33,62	-	-	-	-

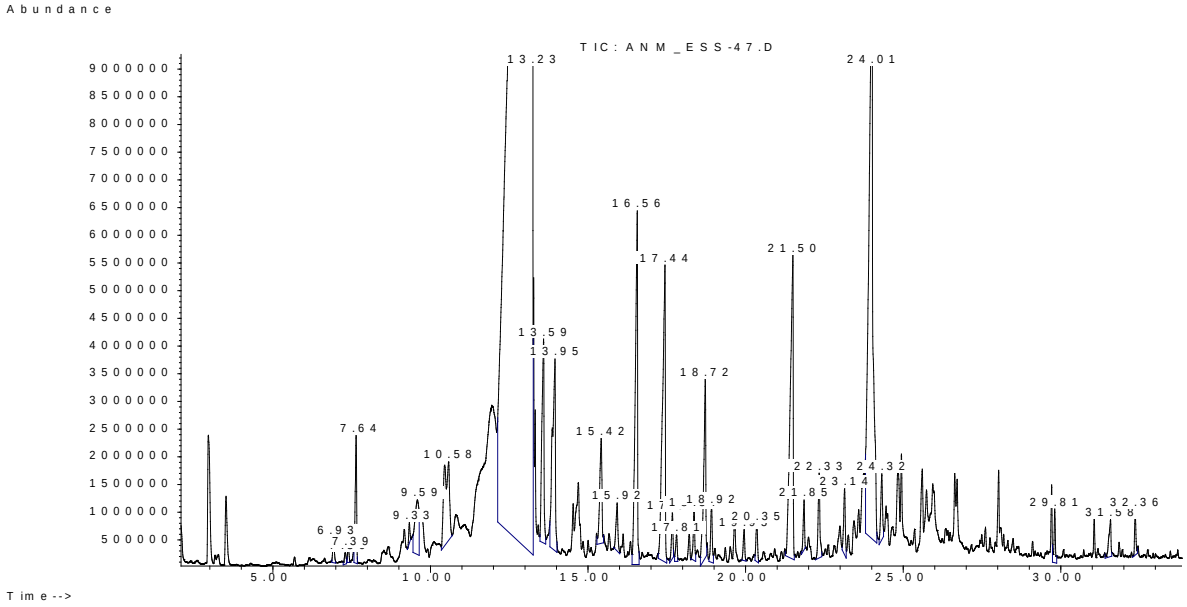


Рисунок 8 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного из масла травы тимьяна Палласа

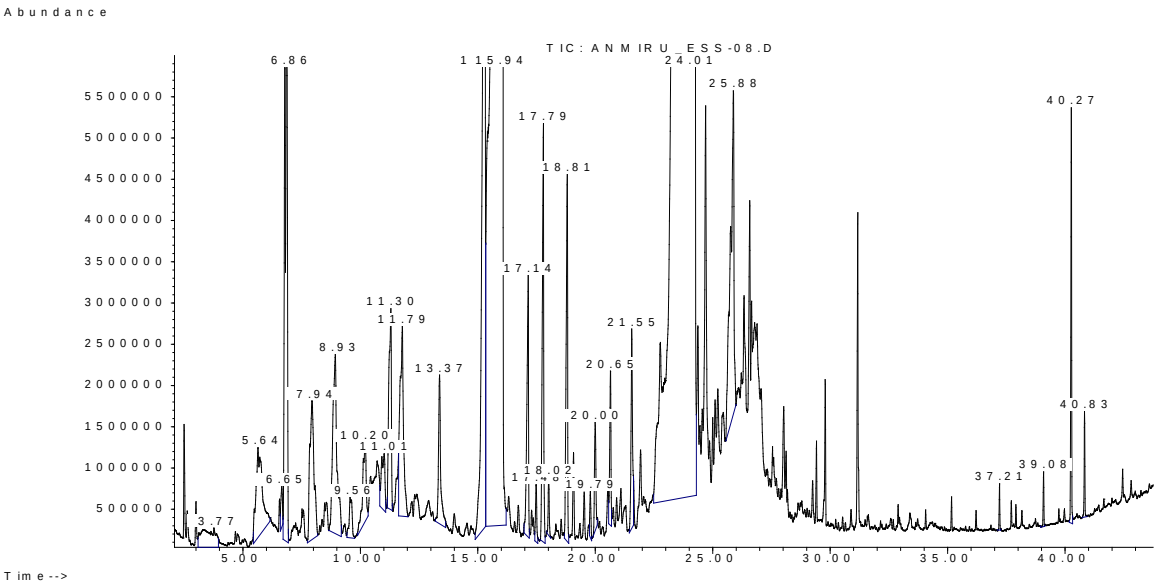


Рисунок 9 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна мелового

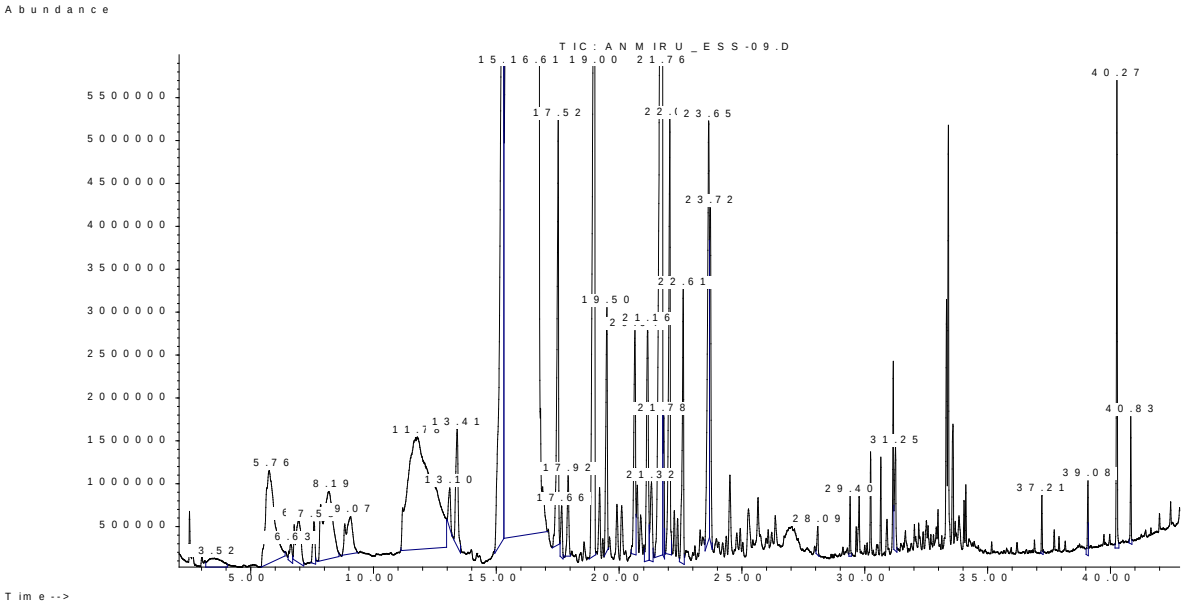


Рисунок 10 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна Маршалла

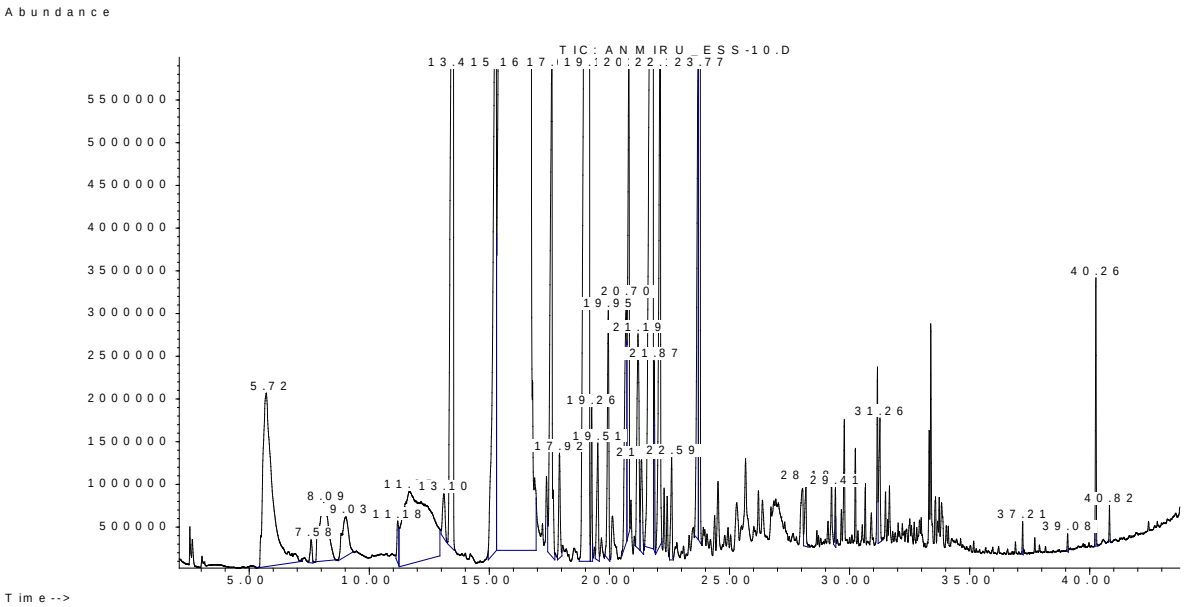


Рисунок 11 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна блошиного

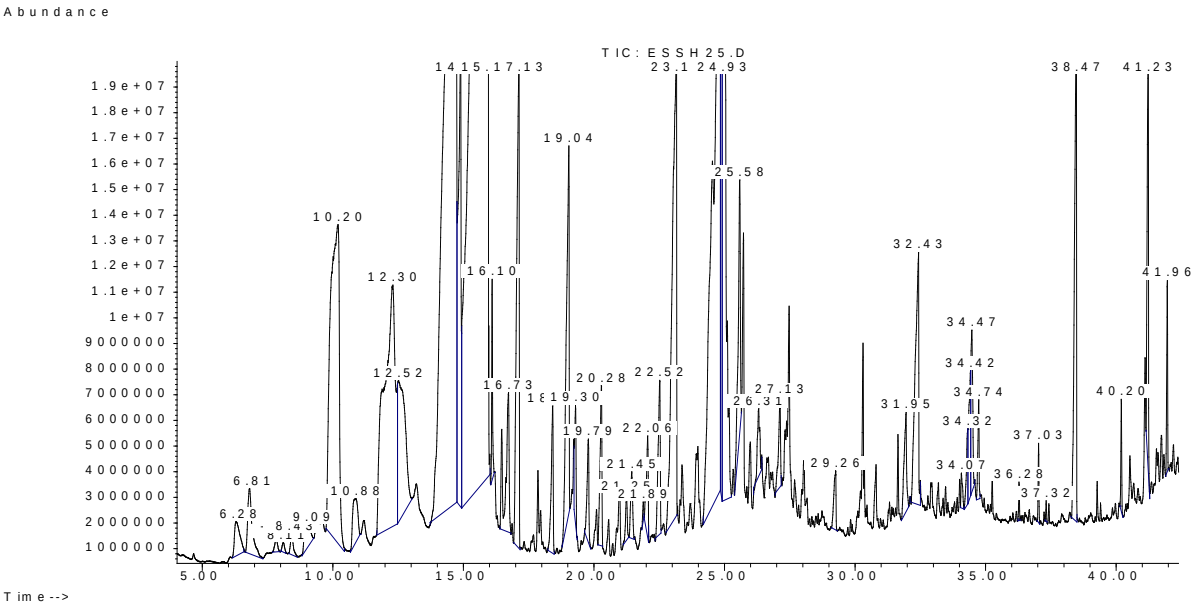


Рисунок 12 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна двуликого

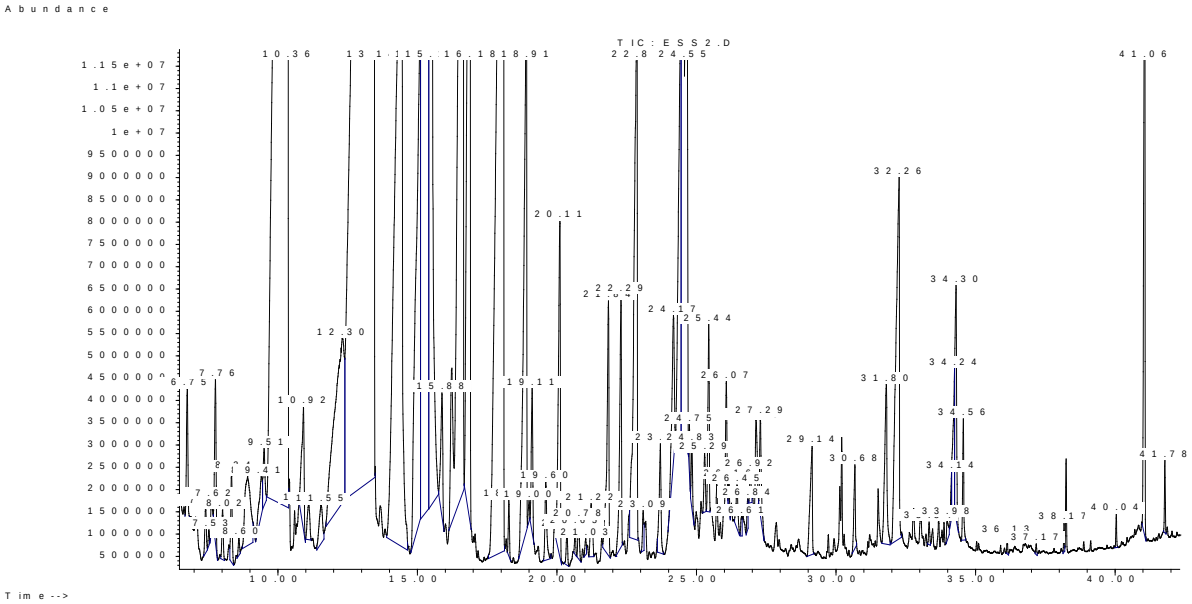


Рисунок 13 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна ползучего

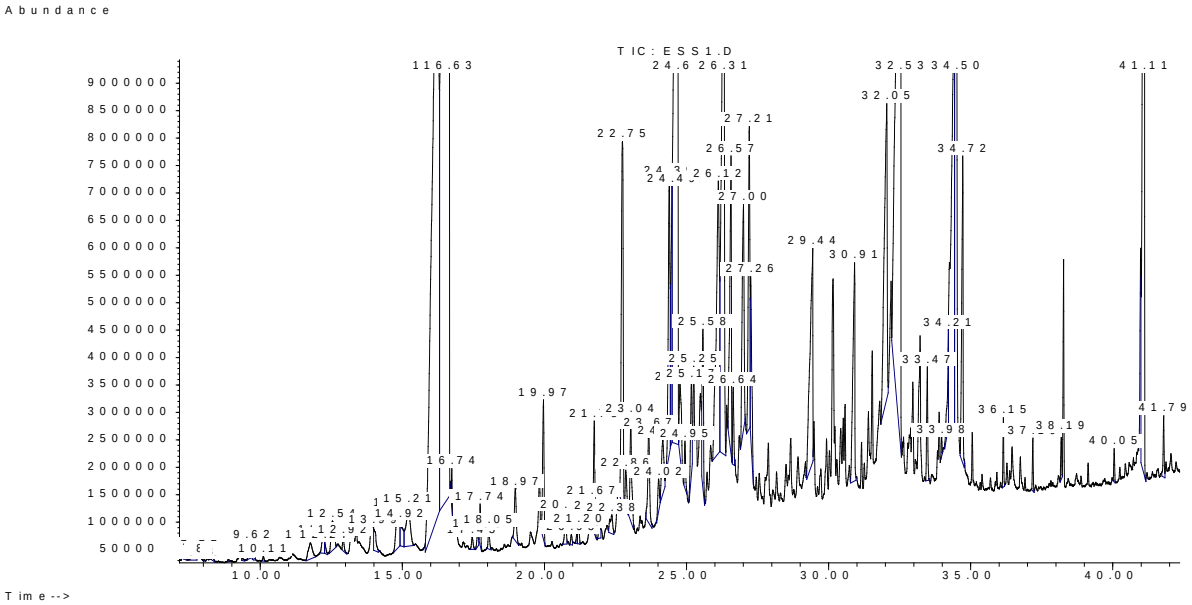


Рисунок 14 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа эфирного масла из травы тимьяна Черняева

Результаты исследования эфирного масла растений рода тимьян показало, что содержание эфирного масла в них колеблется от 0,15 % (тимьян двуликий) до 1,72 % (тимьян Маршалла). Согласно литературным данным основными компонентами эфирного масла растений рода тимьян являются тимол и карвакрол [глава 1, раздел 1.2.1]. Однако выделены

эфирные масла, преобладающими компонентами которых являются α – терпинеол, гераниол, цитраль, линалоол, фенхон, цитраль-гераниол. Установлено не менее 10 хемотипов эфирного масла тимьянов, содержание которого сильно варьирует в зависимости от высоты над уровнем моря, места произрастания, места обитания, фазы развития и др., что подтверждается и нашими исследованиями. В составе эфирных масел исследованных тимьянов обнаружено не менее 100 соединений. Среди идентифицированных компонентов эфирных масел много одинаковых соединений. Все исследованные масла разделились на несколько групп. В эфирном масле травы тимьяна Палласа и тимьяна ползучего доминирующим компонентом является α – терпинеол (3756,9 мг/кг и 3381,06 мг/кг соответственно), а характерный для тимьянов тимол в эфирном масле тимьяна Палласа содержится в незначительных количествах, а в эфирном масле тимьяна ползучего его содержание составляет 828,04 мг/кг. Что касается карвакрола, то в эфирном масле тимьяна Палласа он отсутствует, а в эфирном масле тимьяна ползучего его содержание составляет 487,78 мг/кг. В эфирном масле тимьяна ползучего в значительных количествах также содержался линалоол (2285,74 мг/кг). Основным компонентом эфирного масла тимьяна мелового является неролидол, при значительных количествах тимола и карвакрола. В эфирном масле тимьяна блошиного и тимьяна Маршалла преобладает карвакрол, при значительных количествах β–кариофиллена, тимола, метилкарвакрола в тимьяне блошином и борнеола, тимола, β –бисаболена в тимьяне Маршалла. Эфирное масло тимьяна двуликого содержало доминирующие количества Z-цитраля и Е-цитраля при значительном количестве линалоола, отсутствии тимола и незначительном содержании карвакрола. В эфирном масле тимьяна Черняева преобладали тимол и карвакрол [54, 55]. Таким образом, исследованные эфирные масла можно разделить на несколько хемотипов: 1- α – терпинеола (тимьян Палласа, тимьян ползучий); 2- неролидола, карвакрола, тимола (тимьян меловой);

3- карвакрола, кариофиллена, тимола, метилкарвакрола (тимьян блошиный); 4- карвакрола, борнеола, тимола, β –бисаболена (тимьян Маршалла); 5- цитраля (тимьян двуликий); 6 – тимола, карвакрола (тимьян Черняева).

3.2 Исследование фенольных соединений

По многочисленным литературным данным фенольные соединения наряду с эфирными маслами являются одной из групп действующих растений рода тимьян [глава 1].

Проведенный общий фитохимический анализ растений рода тимьян показал наличие различных групп фенольных соединений (таблица 4): фенилпропаноидов, кумаринов, фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, дубильных веществ.

Методами хроматографии на бумаге и в тонких слоях сорбента в водно-спиртовых извлечениях в сравнении со стандартными образцами и известными соединениями были идентифицированы: кумарины – эскулетин (Sigma), скополетин (Sigma), умбеллиферон (Sigma); фенолкарбоновые кислоты: розмариновая (Sigma), феруловая (Acros), кофейная (Fluka); из флавоноидов: цинарозид (Фитопанацея), космоссиин (Sigma-Aldrich), скутелляреин (Sigma), скутеллярин (таблица 7).

Таблица 7 - Качественный состав фенольных соединений травы растений рода тимьян

Растение рода тимьян	Хроматографический анализ		
	Кумарины	Фенолкарбоновые кислоты	Флавоноиды
Тимьян Палласа		Феруловая Розмариновая Кофейная	Лютеолин-7-глюкозид Скутеллярин
Тимьян меловой	Скополетин	Кофейная Розмариновая Феруловая	Лютеолин-7-глюкозид Апигенин-7-глюкозид

Тимьян ползучий	Скополетин Умбеллиферон	Розмариновая Кофейная Феруловая	Лютеолин-7-глюкозид Скутеллярин
Тимьян блошиный	-	Кофейная Розмариновая Феруловая	Лютеолин-7-глюкозид Апигенин-7-глюкозид
Тимьян Маршалла	-	Кофейная Розмариновая Феруловая	Лютеолин-7-глюкозид Скутелляреин Скутелларин
Тимьян двуликий	Эскулетин Скополетин Умбеллиферон	Феруловая Кофейная Розмариновая	Лютеолин-7-глюкозид Скутелляреин
Тимьян Черняева	Умбеллиферон	Кофейная Феруловая Розмариновая	Лютеолин-7-глюкозид

Во всех исследованных видах рода тимьян преобладают из кислот: розмариновая кислота, из флавоноидов – цинарозид (лютеолин-7-глюкозид).

3.2.1 Исследование фенольных соединений методами газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии

В настоящее время высокоэффективная жидкостная хроматография и газожидкостная хромато-масс спектрометрия – широко используется в изучении состава биологически активных веществ лекарственного растительного сырья. При расшифровке ВЖХ-хроматограмм и установлении структуры, основными критериями были: время удерживания веществ, УФ-спектры соответствующих пиков и сравнение их с достоверными образцами веществ и данными литературы. Идентификацию фенолкарбоновых кислот при изучении методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии проводили путем сравнения с заведомыми образцами метиловых эфиров кислот и использованием библиотеки масс-спектров.

При исследовании фенольных соединений методами высокоэффективной жидкостной (рисунки 15-21) и газожидкостной хроматографий установлено наличие 23 соединений фенольной природы из

Таблица 8 - Состав фенольных соединений исследуемых видов тимьянов, определенный методами ВЭЖХ, ГЖХ

№ п/п	Наименование вещества	Содержание мг/кг						
		Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
1	Розмариновая кислота	3016,04	10202,46	2246,23	14351,74	5740,66	2343,40	7885,55*
2	Кофейная кислота	52,67	74,41	77,86	80,18	58,39	93,86	197,85*
3	Ванилиновая кислота	23,70*	61,92*	323,56*	538,11*	173,20*	88,38*	246,43*
4	n-оксибензойная кислота		11,83*	83,68*	43,01*	43,20*	16,61*	96,72*
5	Сиреневая кислота	15,80*	35,78*	90,12*	315,82*	134,63*	90,55*	143,83*
6	n-кумаровая кислота			85,62*	260,09	40,15*		116,66*
7	Гентизиновая кислота		19,74*	65,24*	92,47*	97,17*	28,00*	89,97*
8	Феруловая кислота	85,10*	150,59*	326,53*	274,69	303,10*	240,90*	546,25*
9	Изоферуловая кислота	45,88*		59,86*				
10	Фенилуксусная кислота	10,10*	7,60*	31,93*	23,81*	21,50*	3,36*	30,74*
11	Салициловая кислота	35,20*	60,13*	199,60*	252,23*	194,63*	96,10*	214,24*
12	Галловая кислота	129,58*		248,20				155,82*
13	Лютеолин		1020,67		1564,59			
14	Скутелляреин						218,47	
15	Изоскутелляреин						70,56*	
16	Диосметин				897,08*			
17	Норнепетин		1494,24*			203,62*	105,96*	

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*
18	Гиполеатин		+			280,68*		
19	Акацетин						504,54	
20*	Хризоэриол					195,86*		
21 -	Лютеолин-7-глюкозид	1209,71*	586,39*	1050,64	1564,59	964,97	834,93	657,55*
22	Апигенин-7-глюкозид		1061,23*		700,87			
23	Скутелларин	19,01*		64,85*		195,86*		

тмечены вещества, идентифицированные в исследуемых растениях впервые

них 7 фенолокислот, 5 оксикоричных кислот, 11 флавоноидных соединений (таблица 8).

В траве тимьяна Палласа определено 11 фенольных веществ, из них впервые 9: 5 фенолокислот, 2 оксикоричные кислоты, 2 флавоноида; в траве тимьяна мелового определено - 13 (10 из них впервые: 6 фенолокислот, 1 оксикоричная кислота, 3 флавоноидных соединения); в траве тимьяна ползучего определено - 14 (10 из них впервые: 6 фенолокислот, 3 оксикоричные кислоты, 1 флавоноид); в траве тимьяна блошиного определено - 14 (7 из них впервые: 6 фенолокислот и 1 флавоноид); в траве тимьяна Маршалла определено - 15 (12 – впервые: 6 фенолокислот, 2 оксикоричные кислоты, 4 флавоноида); в траве тимьяна двуликого определено - 14 (10 – впервые: 6 фенолокислот, 2 оксикоричные кислоты, 2 флавоноида); в траве тимьяна Черняева определено - 12 (12 – впервые: 7 фенолокислот, 4 оксикоричные кислоты, 1 флавоноид).

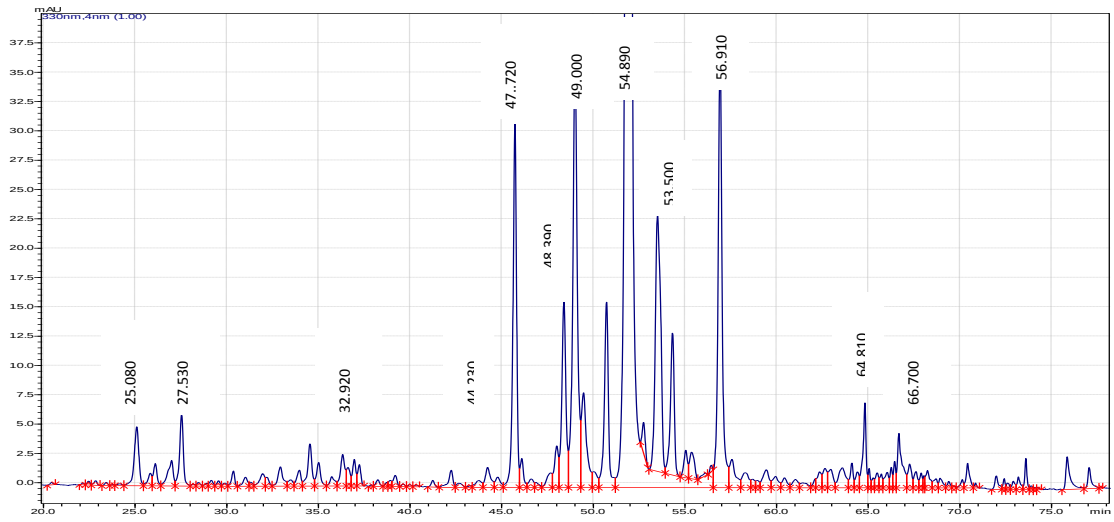


Рисунок 15 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна мелового

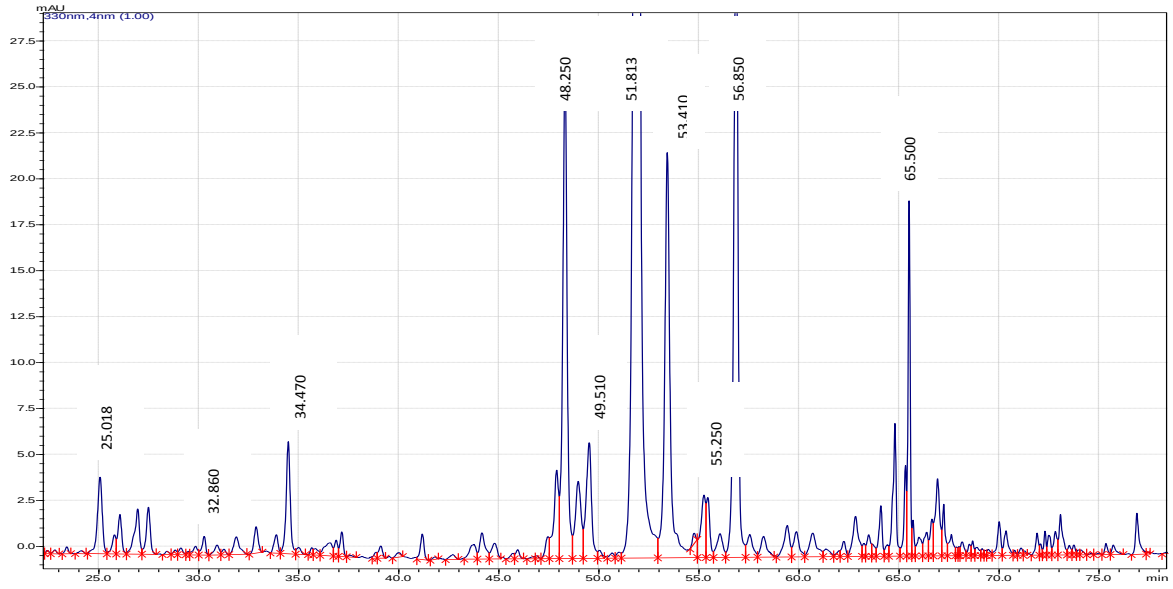


Рисунок 16 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна Маршалла

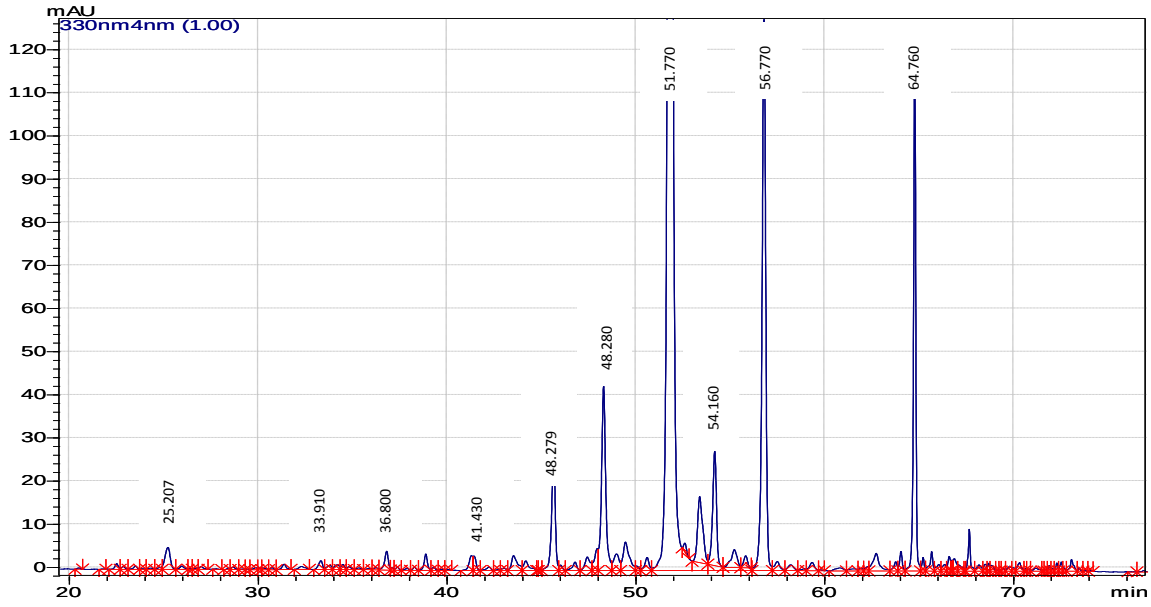


Рисунок 17 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна блошиного

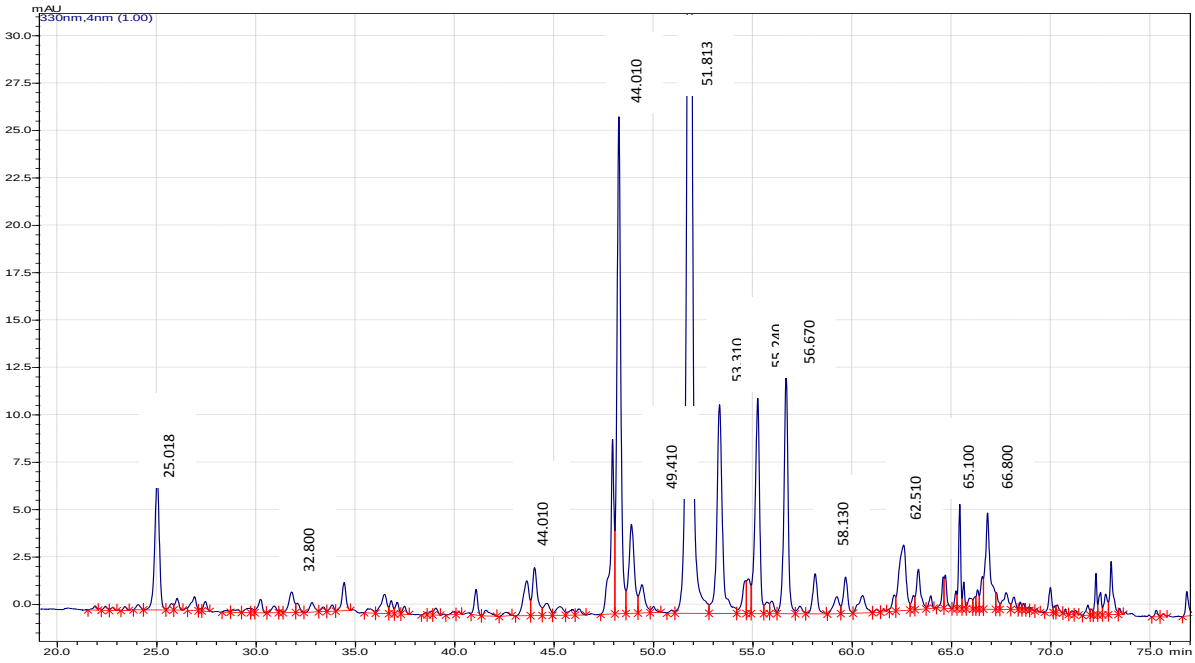


Рисунок 18 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна двуликого

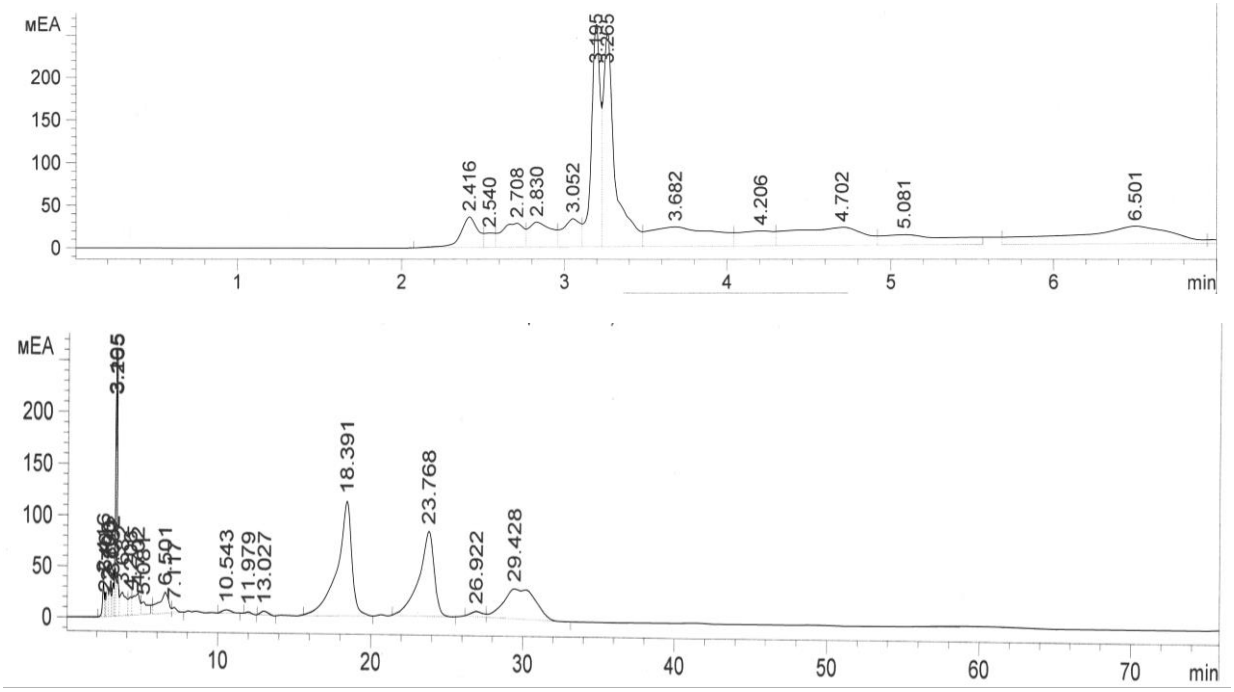


Рисунок 19 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна Палласа

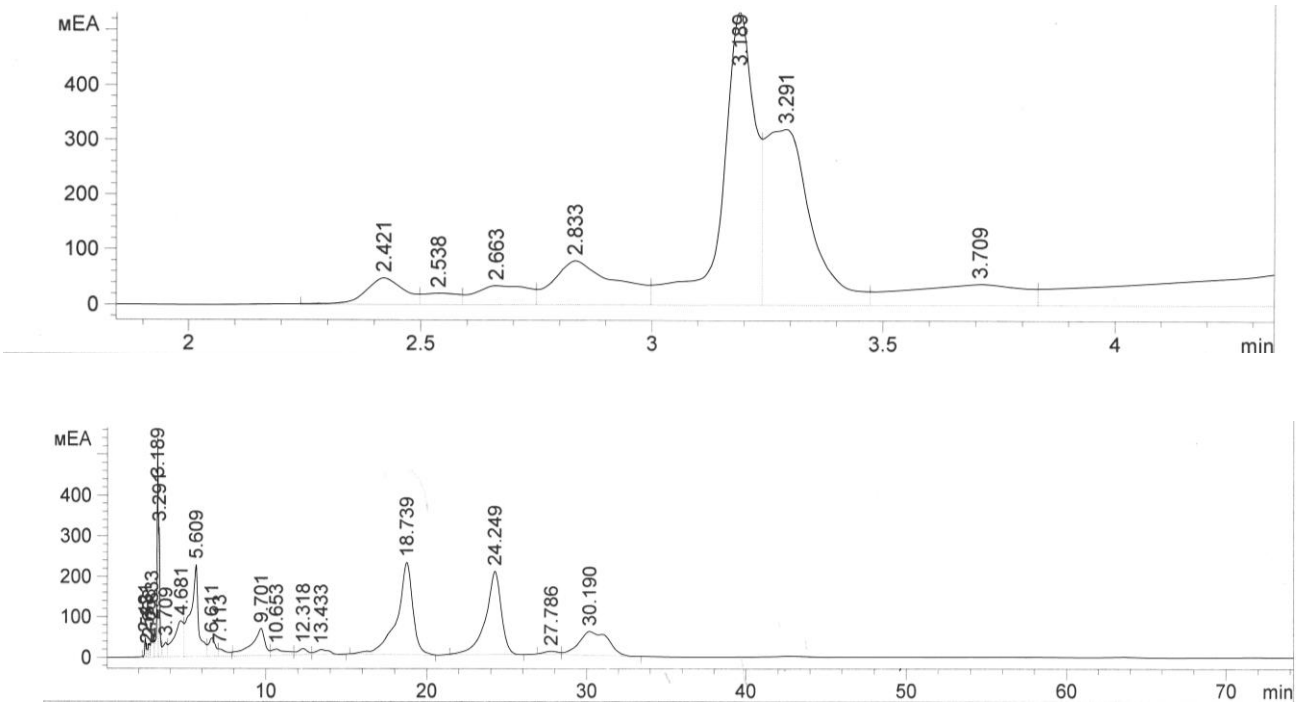


Рисунок 20 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна ползучего

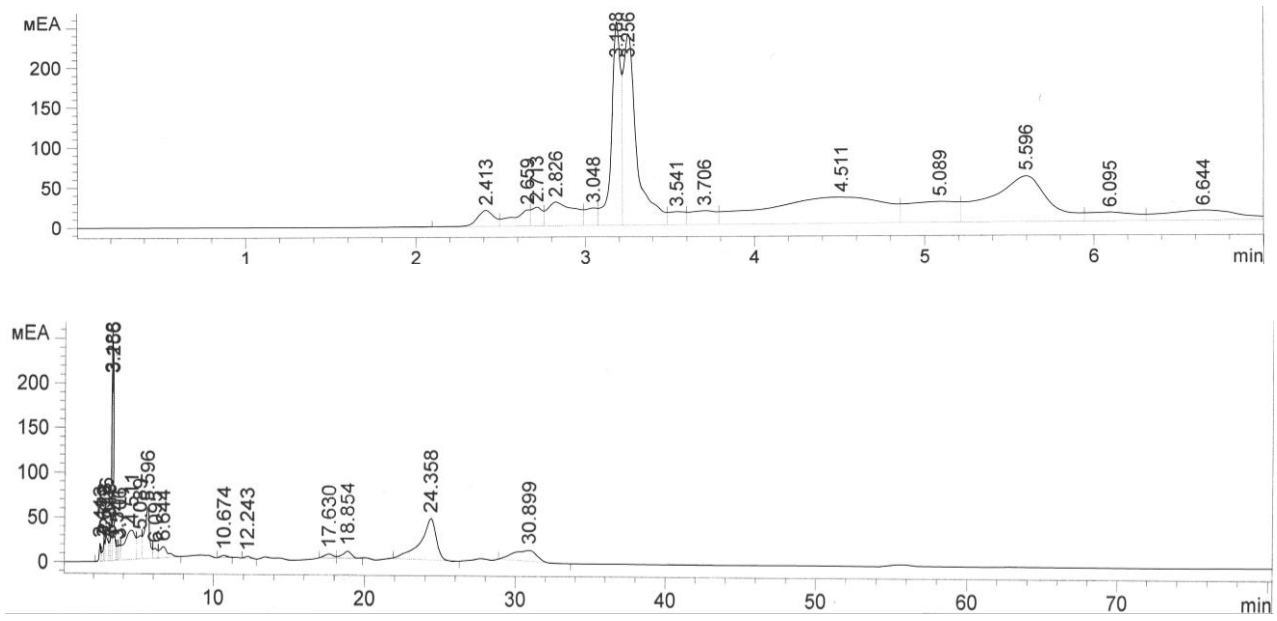


Рисунок 21 – Хроматограмма результатов ВЭЖХ анализа фенольных соединений сырья тимьяна Черняева

Методами высокоэффективной и газожидкостной хроматографии определено содержание фенольных веществ в исследуемых видах тимьянов. Подтверждены результаты хроматографического анализа, что из оксикоричных кислот во всех видах преобладает розмариновая кислота. Ее содержание варьирует от 2343,40 мг/кг (тимьян двуликий) до 14351,74 мг/кг (тимьян блошиный). Среди флавоноидов преобладает цинарозид (лютеолин-7-глюкозид) содержание, которого колеблется от 586,39 мг/кг (тимьян меловой) до 1564,59 мг/кг (тимьян блошиный). Данные соединения являются маркерами растений рода тимьян и их можно использовать для целей количественного анализа.

3.2.2 Выделение фенольных соединений

С целью подтверждения хроматографического анализа были выделены и исследованы фенольные соединения. Препаративно фенольные соединения выделяли из высушенного растительного сырья (трава), измельченного в порошок вальцеванием с размером частиц менее 1 мм. Для экстрагирования и выделения фенольных веществ перерабатывали от 100,0 г до 1,0 кг сырья растений рода тимьян. Экстракцию сырья проводили спиртом 96%, водно-спиртовыми смесями и водой очищенной.

Выделение флавоноидных агликонов до и после проведения кислотного гидролиза

Выделение флавоноидных агликонов до гидролиза проводили на примере травы тимьяна блошиного. Экстракцию флавоноидных агликонов проводили методом фильтрационной экстракции спиртом этиловым 70% из тонкоизмельченного высушенного сырья (300,0 г). Получали 1,8 л извлечения. Полученное водно-спиртовое извлечение упаривали до водного остатка, охлаждали, фильтровали. Очищенное водное извлечение обрабатывали 6-ти

кратно равными объемами диэтилового эфира. Полученное эфирное извлечение упаривали досуха и использовали для выделения флавоноидных агликонов. После проведения хроматографии на бумаге в сухом остатке эфирного извлечения были обнаружены вещества 3.10, 3.11, 3.17. Для выделения индивидуальных веществ использовали колоночную хроматографию на полиамидном сорбенте (колонка 2х30 см, полиамидный сорбент в виде суспензии в спирте изопропиловом.

Для этого сухой остаток эфирной фракции (0,36 г) растворяли в 40 мл спирта изопропилового и наносили на подготовленную колонку с полиамидным сорбентом. После того, как раствор осадка войдет в колонку, в колонку добавляли изопропиловый спирт, которым промывали колонку, собирая фракции по 50 мл. В полученных фракциях анализировали состав флавоноидов хроматографией на бумаге, которая была импрегнирована формамидом, в системе растворителей: бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1). Во фракциях 7-16 содержались вещества 3.21, 3.20, фракции 17-23 - вещество 3.20, фракции 23-36 - смесь веществ 3.20 и 3.11, фракции 37-45 - смесь веществ 3.11, 3.17.

Фракции, в которых содержались индивидуальные вещества (17-23), объединяли, упаривали в вакууме и кристаллизовали из спирта этилового 50%. В результате получали вещество 3.20 (86 мг).

Смесь веществ 3.20 и 3.11, 3.11 и 3.17 разделяли, используя повторную хроматографию на колонке с полиамидным сорбентом. Элюэнтом служил хлороформ и смесь хлороформа со спиртом, при увеличении концентрации последнего. В итоге выделили вещества 3.11 (137 мг), 3.17 (98 мг).

Очищенное водное извлечение после отделения агликонов подвергали гидролизу кислотой хлористоводородной 10% в кислоте уксусной 50% в течение 2-х часов. Полученные агликоны из гидролизатов извлекали эфиром диэтиловым. Эфирное извлечение упаривали досуха и использовали для выделения агликонов после кислотного гидролиза.

В составе сухого остатка эфирного извлечения из травы тимьяна блошиного хроматографией на бумаге в системе растворителей бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1), были найдены вещества 3.10 и 3.11. Для их выделения сухой остаток эфирной фракции растворяли в 30 мл спирта метилового, смешивали с 10,0 г полиамидного сорбента, далее сорбент высушивали на воздухе при температуре 22-25^{0}С. Для разделения флавоноидных агликонов, полученных после кислотного гидролиза использовали полиамидный сорбент (колонка 2х40 см, суспензия полиамида в хлороформе). Сумму агликонов разделяли, используя смесь хлороформ-спирт этиловый (9:1, 8:2), при этом выделили вещество 3.11 (118 мг) из фракций 5-12 и вещество 3.10 (56 мг) из фракций 16-21.

Выделение оксикоричных кислот и флавоноидных моногликозидов

Для выделения и разделения оксикоричных кислот и флавоноидных гликозидов проводили экстракцию растительного сырья тимьяна двуликого (500 г) 70% спиртом этиловым методом фильтрационной экстракции. Полученное водно-спиртовое извлечение (3,0 л) упаривали до водного остатка, фильтровали для удаления хлорофилла и обрабатывали 6 раз равными объемами этилацетата. Объединенные этилацетатные извлечения упаривали под вакуумом до смолообразного остатка. К полученному остатку приливали минимальное количество спирта метилового при нагревании для растворения. Полученный раствор быстро охлаждали и смешивали при перемешивании с избытком эфира диэтилового, при этом выпадал осадок, в составе которого хроматографически обнаружены вещества 3.13, 3.17, 3.19, 3.21.

Осадок отделяли и использовали для выделения агликонов и флавоноидных моногликозидов. Разделение обнаруженных веществ осадка проводили хроматографией на колонках с полиамидным сорбентом (диаметр колонки 2,5 смх40 см; суспензия полиамида в спирте этиловом). Полиамидный сорбент смешивали со спиртом этиловым 96% и вносили полученную

Рисунок 22 – А – Выделение фенольных соединений и полисахаридов (схема) из травы тимьяна блошиного

Рисунок 22 – Б – Выделение фенольных соединений и полисахаридов (схема) из травы тимьяна двуликого

суспензию в колонку. Далее брали 20 мл спирта этилового 70%, растворяли в нем осадок этилацетатной фракции и полученный раствор смешивали с полиамидным сорбентом (10 г), который высушивали на воздухе. Высушенный с осадком полиамидный сорбент смешивали со спиртом этиловым 96% и вносили в виде суспензии в подготовленную колонку. Колонку промывали спиртом этиловым 96% и далее спирто-водными смесями (5%, 10% и т.д.). Собирали фракции по 50 мл. Состав флавоноидов в полученных фракциях анализировали, используя хроматографию на бумаге в системе растворителей: кислота уксусная 15% и бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1) на бумаге, импрегнированной формамидом. Фракции 23-57 содержали смесь веществ 3.12 и 3.13, фракции 61-69 вещество 3.20. Фракции 61-69 объединяли, упаривали и кристаллизовали из спирта этилового 96%. В результате выделили вещество 3.20 (43 мг). Фракции 23-57, содержащие вещества 3.12 и 3.13 объединяли и использовали для хроматографии на бумаге в системе растворителей кислота уксусная 30%. Пятна веществ 3.12 и 3.13 вырезали, проводили их элюированием спиртом этиловым 90% и упаривали до минимального объема. В итоге препаративно выделили вещества 3.12 и 3.13.

Эфирно-метанольный раствор, содержащий вещества 3.06, 3.07, 3.08, использовали для выделения оксикоричных кислот. Для этого упаривали под вакуумом при комнатной температуре для удаления эфира до образования сиропообразного остатка. Полученный остаток смешивали с силикагелем и наносили на подготовленную хроматографическую колонку с силикагелем в хлороформе (высота колонки 50 см, диаметр 4 см). Элюирование вели смесью хлороформ-спирт этиловый 96% в соотношении 90:10, 80:20, собирая фракции по 50 мл. Анализ полученных фракций проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil в системе растворителей: хлороформ-спирт метиловый-вода очищенная (26:14:3). Фракции 7-18 содержали вещество 3.06, фракции 19-26 смесь веществ 3.06 и 3.07, а начиная с 27 фракции в элюатах появляется вещество 3.09 с примесями веществ 3.06, 3.07.

Фракции 7-18, содержащие вещество 3.06, объединяли, упариваи кристаллизовали из этилового спирта. Получали вещество 3.06 (24 мг). Фракции 27-43 также объединяли, упаривали до сухого остатка, в котором хроматографически было установлено, что основную массу остатка составляет вещество 3.09 с примесью веществ 3.06 и 3.07. Для получения вещества 3.09 сухой остаток растворяли в теплой воде очищенной и приготовленный раствор помещали в подготовленную колонку (диаметр 2 см, высота 40 см, сорбент сефадекс LH-90 в воде). Колонку промывали водой очищенной, собирая водные элюаты. Водные элюаты объединяли, упаривали при 60^0С под вакуумом до сухого остатка в результате получали вещество 3.09 (74 мг).

Вещество 3.07 было выделено препаративно из фракций 19-26 с использованием метода хроматографии на бумаге в системе растворителей 2% кислоты уксусной. Пятна вещества 3.07 вырезали, элюировали спиртом этиловым 70%, упаривали досуха и остатки кристаллизовали из спирта этилового.

Выделение скутеллярина

Выделение скутеллярина проводили из 100,0 г измельченной травы тимьяна Маршалла, экстрагировали сырье на кипящей водяной бане. В качестве экстрагента использовали горячую воду очищенную. Полученное водное извлечение оставляли на 24 часа, фильтровали, упаривали до небольшого объема и подкисляли кислотой хлористоводородной 18%, при этом выпадал осадок вещества 3.22 (скутеллярин) с примесью вещества 3.20. Вещество 3.22 очищали от примеси методом бумажной хроматографии в системе растворителей кислота уксусная 30%. В итоге препаративно получали вещество 3.22 (73 мг).

3.2.3 Идентификация выделенных фенольных соединений

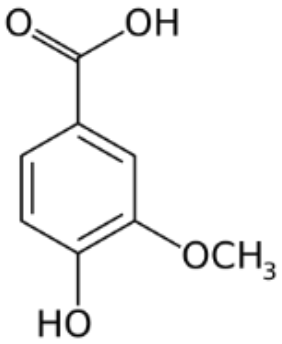
Идентификацию выделенных фенольных соединений проводили, используя данные химических превращений (кислотный, щелочной,

ферментативный гидролизы, ацетилирование, щелочное расщепление, метилирование, дезметилирование), результаты исследования дифференциальной УФ-спектроскопии, ИК-спектров, а также сравнением со стандартными и известными образцами исследуемых соединений [глава 2, раздел 2.2.2.3].

В результате была установлена структура 20 фенольных веществ.

Вещество 3.03 – белый кристаллический порошок, имеющий приятный запах. Т.пл. 210-212^0 С (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.03 показывает максимум поглощения при длине волны 290 и 260 нм. В УФ-спектре вещества 3.03 при взаимодействии с натрия гидроксидом отсутствует гипсохромный сдвиг в длинноволновой области, что говорит о том, что в молекуле данного соединения имеется гидроксильная группа.



$C_8H_8O_4$

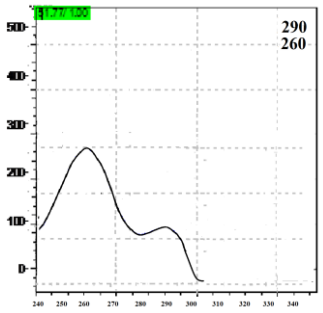


Рисунок 23 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.03

ИК-спектр вещества 3.03 демонстрирует полосы поглощения в области 3790 см$^{-1}$ (спиртовый гидроксил), в области 2910 см$^{-1}$ (метоксильная группа), в области 1600 см$^{-1}$ (бензольное кольцо), полосу поглощения в области 950 см$^{-1}$ (тризамещенное бензольное кольцо).

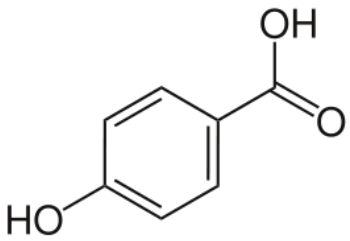
В результате щелочной деструкции вещества 3.03 образуется протокатеховая кислота.

При сравнении вещества 3.03 с известным образцом ванилиновой кислоты установлена их идентичность. Проведенные исследования позволили

охарактеризовать вещество ***3.03 как 3-метокси-4-оксибензойную или ванилиновую кислоту*** [1].

Вещество 3.04 **–**кристаллический порошок белого цвета.Т.пл. 209-211^0 С (таблица 9).

УФ спектр вещества 3.04 показывает максимум поглощения в области 255 нм, что характерно для бензойных кислот.



$C_7H_6O_3$

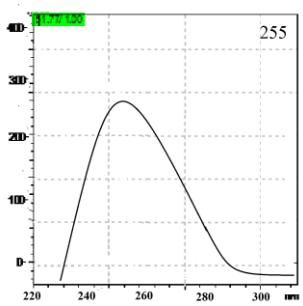


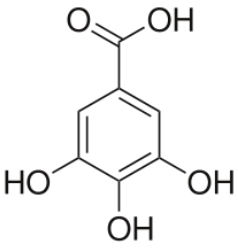
Рисунок 24 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.04

ИК-спектр вещества 3.04 демонстрирует полосы поглощения при 860см$^{-1}$, 840 см$^{-1}$, 775 см$^{-1}$, что свидетельствует о пара замещении в бензольном кольце.

Результаты сопоставления физико-химических констант, УФ, ИК-спектров вещества 3.04, с известным образцом n-оксибензойной кислоты, позволили охарактеризовать вещество ***3.04 как n-оксибензойную кислоту*** [1].

Вещество 3.05 – аморфный порошок, имеющий темно-желтую окраску. Т. пл. 254-256^{0}С (таблица 9). При взаимодействии с 1% железа хлорида (III) раствором вещество 3.05 дает синюю окраску, что характерно для кислоты галловой и ее эфиров [27].

УФ-спектр соединения показывает максимум поглощения в области 272 нм.



$C_7H_6O_5$

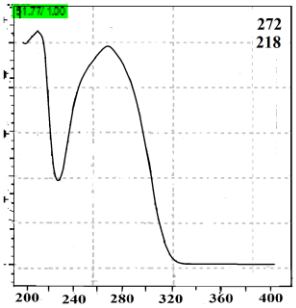


Рисунок 25 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.05

ИК-спектр вещества 3.05 демонстрирует полосы поглощения при 3400-3300 $см^{-1}$, характерные для фенольных оксигрупп, 1623, 1548, 1456 $см^{-1}$, характеризующие бензольное кольцо, 1710 $см^{-1}$ (C=O, COOH группы). Представленный ИК-спектр позволяет отнести вещество 3.05 к оксибензойным кислотам.

Для идентификации вещества 3.05 получали производное его метилового эфира. Полученный метиловый эфир кислоты по физико-химическим свойствам, хроматогрфическим характеристикам показал полную идентичность с достоверным образцом метилового эфира галловой кислоты. Его температура плавления составила 156-157ºС. Полученный метиловый эфир при добавлении 1% раствора железа хлорида (III) образует окрашивание синего цвета. После хроматографирования (пластинки «Sorbfil») данное соединение проявляется реактивом, в состав которого входят анилин и ксилоза, что свидетельствует об отсутствии в данном веществе свободной карбоксильной группы.

При расщеплении вещества 3.05 в автоклаве получали продукт деструкции, который по физико-химическим свойствам, результатам хроматографического исследования был охарактеризован как пирогаллол.

В результате смешения соединения 3.05 с кислотой галловой не наблюдали депрессии температуры плавления. Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.05 как триоксибензойную или галловую кислоту*** [43, 137].

Таблица 9 - Характеристика выделенных фенольных соединений

Номер соединения	Наименование соединения	Общая формула соединений	Т пл., ˚С	Молекулярная масса	Окраска соединений в УФ-свете			Величина Rf в различных системах растворителей	Источники выделения
					До проявления	После проявления			
						С раствором циркония оксихлорида	+аммиак		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ФЕНОЛОКИСЛОТЫ									
3.03	Ванилиновая *(3-метокси-4-оксибензойная)*	$C_8H_8O_4$	210-212	168	-	-	-	0,46Б; 0,24В; 0,80Д	Тимьян блошиный, тимьян Черняева
3.04	n-оксибензойная	$C_7H_6O_3$	209-211	138	-	-	-	0,72Б; 0,87В; 0,91Д	Тимьян Черняева
3.05	Галловая *(3,4,5-триоксибензойная)*	$C_7H_6O_5$	254-256	170	темная	синяя	-	0,62А; 0,89Д; 0,80Б	Тимьян ползучий
ОКСИКОРИЧНЫЕ КИСЛОТЫ									
3.06	Кофейная *(3,4-диоксикоричная)*	$C_9H_8O_4$	193-195	184	светло-голубая	голубая	голубая	0,82А; 0,41Б; 0,26В	Тимьян Черняева, тимьян двуликий
3.07	Феруловая *(4-окси-3-метокси-коричная)*	$C_{10}H_{10}O_4$	167-169	194	голубовато-фиолетовая	голубая	ярко-голубая	0,83А; 0,55Б; 0,33В	Тимьян Черняева, тимьян Маршалла, тимьян двуликий

3.08	n-кумаровая (n-оксикоричная)	$C_9H_8O_3$	212-214	164	-	-	фиолетовая	0,90Д; 0,47В; 0,60Б	Тимьян блошиный
3.09	Розмариновая (сложный эфир кофейной и α-оксигидрокофейной)	$C_{18}H_{16}O_8$	-	360	голубая	голубая	голубовато-зеленая	0,42В; 0,89Д	Тимьян блошиный, тимьян меловой, тимьян Маршалла, тимьян двуликий
ФЛАВОНОИДЫ (АГЛИКОНЫ)									
3.10	Апигенин *(5,7,4´-триоксифлавон)*	$C_{15}H_{10}O_5$	340-345	270	темная	темно-желтая	желто-зеленая	0,82А; 0,18Г	Тимьян блошиный, тимьян ползучий
3.11	Лютеолин *(5,7, 3´-4´-тетраоксифлавон)*	$C_{15}H_{10}O_6$	328-330	286	темная	темно-желтая	желто-оранжевая	0,90Д; 0,22Г	Тимьян блошиный, тимьян ползучий
3.12	Скутеллареин (*5,6,7,4'-тетраоксифлавон*)	$C_{15}H_{10}O_6$	348-350	286	темная	желто-коричневая	-	0,20Б; 0,65А; 0,82 Е	Тимьян двуликий, тимьян Маршалла
3.13	Изоскутеллареин (*5,7,8,4'-тетраоксифлавон*)	$C_{15}H_{10}O_6$	298-300	286	темная	темная	темная	0,22Б; 0,68А	Тимьян двуликий
3.14	Норнепетин (*5,6,7,3',4'-пентаоксифлавон*)	$C_{15}H_{10}O_7$	335-340	270	темная	темная	темная	0,15 Ж	Тимьян меловой

3.15	Гиполеатин (*5,7,8,3′,4′-пентаоксифлавон)*	$C_{15}H_{10}O_7$	287-291	270	темная	темная	темная	0,17 Ж	Тимьян Маршалла
3.16	Акацетин (*5,7-диокси,4′-метоксифлавон*)	$C_{16}H_{12}O_5$	268-270	284	темная	темная	-	0,92 Д; 0,06 Б	Тимьян двуликий
3.17	Диосметин (*5,7,3′-триокси-4′-метоксифлавон*)	$C_{16}H_{12}O_6$	255-257	300	темно-коричневая	желтая	желтая	0,05Б	Тимьян блошиный
3.18	Хризоэриол (*5,7,4′-триокси, 3′-метоксифлавон)*	$C_{16}H_{12}O_6$	331-332	300	темная	желтая	-	0,83Д	Тимьян Маршалла
3.19	Байкалеин (*5,6,7-триоксифлавон*)	$C_{15}H_{10}O_5$	260-262	270	темная	темная	темная	0,75 Ж	Тимьян Маршалла
ФЛАВОНОИДЫ (ГЛИКОЗИДЫ)									
3.20	Цинарозид (*лютеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид*)	$C_{12}H_{20}O_{11}$	256-258	448	темно-коричневая	темно-желтая	желто-оранжевая	0,24 Г	Тимьян блошиный, тимьян ползучий
3.21	Космоссиин (*апигенин-7-0-β-D-глюкопиранозид*)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	225-227	432	темно-коричневая	темно-желтая	желто-зеленая	0,61 Г	Тимьян меловой
3.22	Скутеллярин (*скутеллареин-7-глюкуронид*)	$C_{21}H_{18}O_{12}$	200 разр.	462	темно-коричневая	темная	темная	0,12 Б	Тимьян Маршалла

***Примечание*:** Системы растворителей, используемые для хроматографирования:

А – н. бутанол- кислота уксусная -вода (4:1:2) - БХ;
Б – 15% раствор кислоты уксусной - БХ;
В – 2% раствор кислоты уксусной - БХ;
Г – 30% раствор кислоты уксусной - БХ;
Д – н.бутанол- кислота уксусная -вода (4:1:5) – БХ;
Е – этилацетат-муравьиная кислота-вода (10:2:3) – БХ;
Ж – бензол-этилацетат-уксусная кислота (50:50:1) – БХ (бумага импрегнирована формамидом).

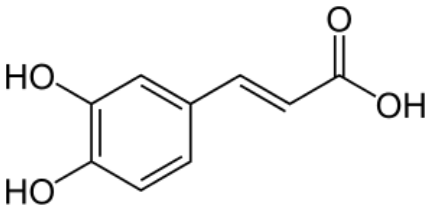
Оксикоричные кислоты

Вещества 3.06, 3.07, 3.08, 3.09 по качественным цветным реакциям и окраске флуоресценции в УФ-свете после хроматографирования были отнесены производным кислоты коричной (таблица 9) [91].

УФ-спектры (таблица 10) исследуемых веществ также подтвердили предположение, что данные соединения являются производными кислоты коричной, т.к. их максимумы поглощения находятся при длине волны 228-245 нм и 287-327 нм.

Вещество 3.06 – порошок светло-желтого цвета. Т. пл. 193-195°С (таблица 9).

УФ-спектр (таблица 10) исследуемого соединения позволил отнести его к кислоте оксикоричной, т.к. в нем имеются максимумы поглощения в области 325, 299 плечо и 245 нм.



$C_9H_8O_4$

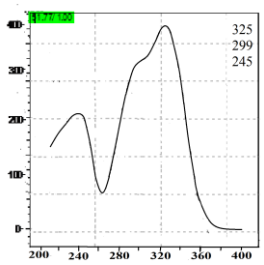


Рисунок 26 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.06

Таблица 10 - Дифференциальная спектроскопия выделенных оксикоричных кислот в УФ-области, нм

Номер и название соединения	Растворы соединений в 96% спирте этиловом	Натрия ацетат	Циркония оксихлорид	Натрия гидроксид	Кислота борная и натрия ацетат
3.06 Кофейная кислота (3,4-диоксикоричная)	325 299 пл. 245	310 - -	360 - -	360 - -	320 - -
3.07 Феруловая кислота (4-окси, 3-метоксикоричная)	320 296 пл. 235	306 - -	- - -	320 - -	345 - -

3.08 п-кумаровая кислота (п-оксикоричная)	310 228	- - -	- - -	330	-
3.09 Розмариновая кислота (сложный эфир кофейной и L-окси-гидрокофейная кислота)	327 287 245	360	370	390	360

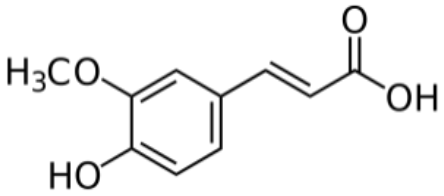
В УФ-спектре вещества 3.06 наблюдался батохромный сдвиг на 35 нм при взаимодействии с натрия гидроксидом в спирте этиловом, что говорит о наличии оксигруппы в молекуле данного вещества. При взаимодействии с раствором циркония оксихлорида происходит батохромный сдвиг максимума поглощения длинноволновой полосы на 35 нм, что свидетельствует о наличии в структуре вещества 3,4-диоксигруппировки [91].

При щелочном плавлении вещества 3.06 происходит образование 3,4-диоксибензойной кислоты, что подтверждает наличие в структуре вещества 3.06 3,4-диоксигруппировки.

Сравнение физико-химических свойств вещества 3.06 со стандартным образцом кислоты кофейной (Fluka) показали их идентичность, на основании чего вещество **3.06** ***охарактеризовано как 3,4-диоксикоричная или кофейная кислота*** [39, 43].

Вещество 3.07 – кристаллический порошок розоватого цвета. Т. пл. 167-169^{0}С (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.07 (таблица 10) имеет максимумы поглощения при длине волны 320, 296 пл, 235 нм, характеризующие оксикоричные кислоты [91]. При взаимодействии с натрия ацетатом наблюдается гипсохромный сдвиг длинноволновой полосы на 14 нм, что объясняется ионизацией натрия ацетатом карбоксильной группы вещества 3.07, что приводит к уменьшению вклада карбоксильной группы в резонанс системы, что и вызывает гипсохромный сдвиг. По данным молекулярной массы исследуемого вещества определили одну метоксильную группу.



$C_{10}H_{10}O_4$

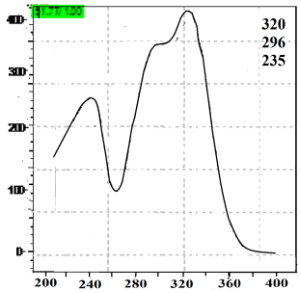
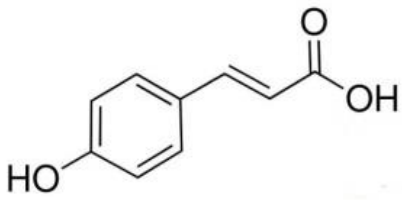


Рисунок 27 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.07

При щелочном плавлении вещества 3.07 образуется кислота ванилиновая [Драник, 1967]. Результаты сравнения физико-химических свойств вещества 3.07 и стандартного образца кислоты феруловой (Acros) показали на их идентичность. Проведенные исследования позволили установить, что вещество **3.07 является *4-окси, 3-метоксикоричной или феруловой кислотой*** [39, 43].

Вещество 3.08 – бесцветное кристаллическое вещество. Т.пл. 212-214 ^{0}C (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.08 имеет максимумы поглощения при длине волны 310, 228 нм (таблица 10). Батохромный сдвиг максимума поглощения длинноволновой полосы на 20 нм при взаимодействии с натрия гидроксидом свидетельствует о присутствии свободной гидроксикоричной группы в данном соединении.



$C_9H_8O_3$

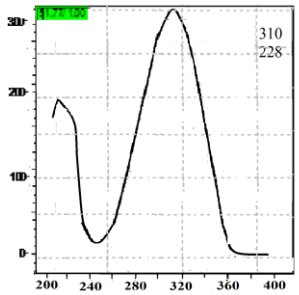


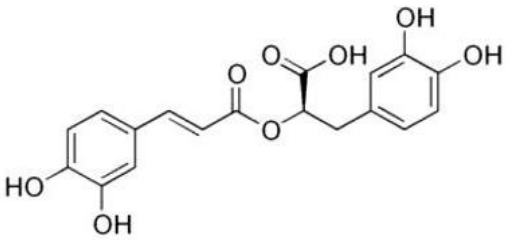
Рисунок 28 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.08

В ИК – спектре наблюдается полоса поглощения при 1310 см$^{-1}$ (ароматическое кольцо), а полосы поглощения в области 1640 см$^{-1}$ и 1705 см$^{-1}$ свидетельствуют о наличии коричного фрагмента в молекуле вещества 3.08.

При щелочной деструкции вещества 3.08 образуется n-оксибензойная кислота. При ацетилировании образуется моноацетат. Результаты сравнения физико-химических свойств вещества 3.08 и известного образца n-кумаровой кислоты показали их идентичность. Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.08 как n-кумаровую или n-оксикоричную кислоту*** [39, 201].

Вещество 3.09 – аморфное вещество светло-желтого цвета (таблица 9).

В УФ – спектре вещества 3.09 (таблица 10) наблюдаются максимумы поглощения при длинах волны 327, 287, 245 нм, имеющие почти равную интенсивность. При взаимодействии с натрия ацетатом вещество 3.09 проявляет батохромию максимума длинноволновой полосы на 33 нм, а с натрия гидроксидом на 63 нм, что свидетельствует об ионизации фенольных оксигрупп при этерификации карбоксильной группы коричной кислоты.



$C_{18}H_{16}O_8$

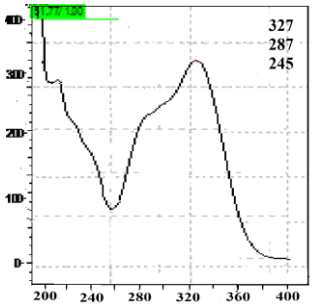


Рисунок 29 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.09

При щелочном гидролизе вещества 3.09 образуется кофейная кислота. При омылении вещества 3.09 раствором бария гидроксида получили L-оксигидрокофейную кислоту.

Для ИК-спектра вещества 3.09 характерны полосы поглощения в области 3375-3300 $см^{-1}$ (гидроксильные группы). 2950-2850 (алифатические С-Н), 1742 (карбонильная группа карбоксила), 1710 (карбонильная группа), 1625, 1600, 1520 (ароматические С-Н) и 810 $см^{-1}$ (1,2,4-порядок замещения в бензольном кольце).

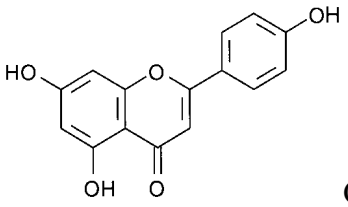
Результаты сравнения физико-химических свойств (таблица 9), вещества 3.09 и стандартного образца розмариновой кислоты (Sigma) показали их идентичность. Проведенные исследования позволили установить, что вещество **3.09** ***является сложным эфиром кофейной и L-оксидигидрокофейной кислот или розмариновой кислотой*** [201, 213].

Флавоноиды (агликоны)

На основании положительной цианидиновой реакции по Брианту (окрашивание слоя октанола в розовый цвет) вещества 3.10-3.19 отнесены к агликонам флавоноидов [204, 304].

Вещество 3.10 – мелкие игольчатые кристаллы, имеющие бледно-желтый цвет. Т. пл. 340-345˚С (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.10 показывает максимумы поглощения в области 265, 340 нм (таблица 11). При взаимодействии с натрия ацетатом наблюдается батохромный сдвиг максимума длинноволновой полосы на 40 нм, что указывает на свободную оксигруппу у С-7 (таблица 11).



$C_{15}H_{10}O_5$

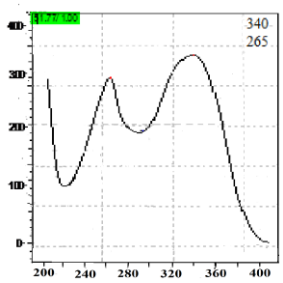


Рисунок 30– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.10

Таблица 11 – Результаты дифференциальной УФ-спектроскопии флавоновых агликонов, нм

Номер и название соединения	Растворы соединений в спирте метиловом	Натрия ацетат	Циркония оксихлорид	Натрия гидроксид	Кислота борная и натрия ацетат	Циркония оксихлорид и кислота лимонная
3.10 Апигенин	340 265	380 –	405 –	395 –	375 –	340 –
3.11 Лютеолин	350 265 пл 255	390 - -	415 – –	405 – –	385 – –	353 – –
3.12	335	385	385	385	375	-

Скутеллареин	285					
3.13 Изоскутеллареин	325 пл 305 280	335	360	385	355	
3.14 Норнепетин	340 285 пл 245	385	390	385	390	
3.15 Гиполеатин	345 285 пл 255	390	430	-	420	
3.16 Акацетин	325 303пл 270	360	385	360	-	327
3.17 Диосметин	345 267 257	365	390	397	345	
3.18 Хризоэриол	350 265 255	395	400	405	-	350
3.19 Байкалеин	325 275	375	365	370	365	

Результаты реакции с диазотированной кислотой сульфаниловой подтверждают наличие свободной оксигруппы у С-7. Взаимодействие с натрия гидроксидом в спирте метиловом дает батохромию длинноволновой полосы на 55 нм, что указывает на присутствие оксигруппы у С-4'. При взаимодействии с циркония оксихлоридом происходит батохромный сдвиг I полосы на 65 нм, а дальнейшее прибавление кислоты лимонной разрушает этот комплекс, что показывает свободную оксигруппу в положении С-5 [148]. Проведенные исследования позволили предположить, что вещество 3.10 является 5,7,4'-триоксифлавоном.

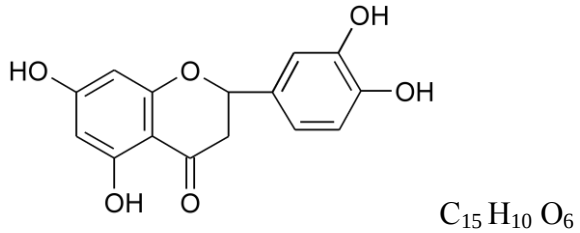
ИК-спектр вещества 3.10 показывает наличие полос поглощения, характерных для фенольных оксигрупп (3500-3200 $см^{-1}$), для карбонильной группы γ-пирона (1650 $см^{-1}$), для колебаний ароматических колец (1610, 1570, 1550, 1510 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

При щелочном расщеплении вещества 3.10 образуется флороглюцин и n-оксибензойная кислота. Ацетилирование и метилирование вещества 3.10 приводило к образованию триацетата и триметилового эфира. При смешении

вещества 3.10 и достоверного образца апигенина не происходило депрессии температуры плавления. Проведенное исследование позволили охарактеризовать вещество ***3.10 как 5,7,4'-триоксифлавон или апигенин*** [43, 150].

Вещество 3.11 – кристаллический порошок бледно-желтого цвета. Т.пл. 328-330 °С (таблица 9).

Спектральные исследования вещества 3.11 показали, что в данном соединении в коротковолновой области максимум находится в области 255 нм и плечо при 265 нм, что говорит о замещении в В-кольце в положениях С-3' и С-4' , второй максимум находится при длине волны 350 нм [148]. Батохромия максимума длинноволновой полосы на 40 нм при взаимодействии с натрия ацетатом говорит о наличии свободной оксигруппы у С-7 (таблица 11). Натрия гидроксид в метиловом спирте дает батохромный сдвиг на 55 нм, что характеризует свободную оксигруппу у С-4' [148]. Батохромный сдвиг на 35 нм в присутствии кислоты борной и натрия ацетата показывает наличие диоксигруппировки у С-3' и С-4' [148]. Оксигруппа у С-5 обнаруживается на основании батохромного сдвига на 65 нм при взаимодействии с циркония оксихлоридом. При добавлении кислоты лимонной происходит разрушение образовавшегося комплекса [148]. Проведенные исследования позволили предположить, что вещество 3.11 может быть 5,7,3', 4' – тетраоксифлавоном.



$C_{15}H_{10}O_6$

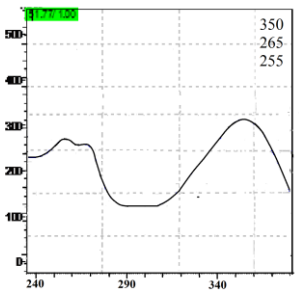


Рисунок 31– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.11

ИК-спектр вещества 3.11 имеет полосы поглощения характеризующие фенольные оксигруппы (3500-3200 $см^{-1}$), карбонильные группы γ-пирона (1665 $см^{-1}$), колебания ароматических колец (1610, 1560, 1510 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

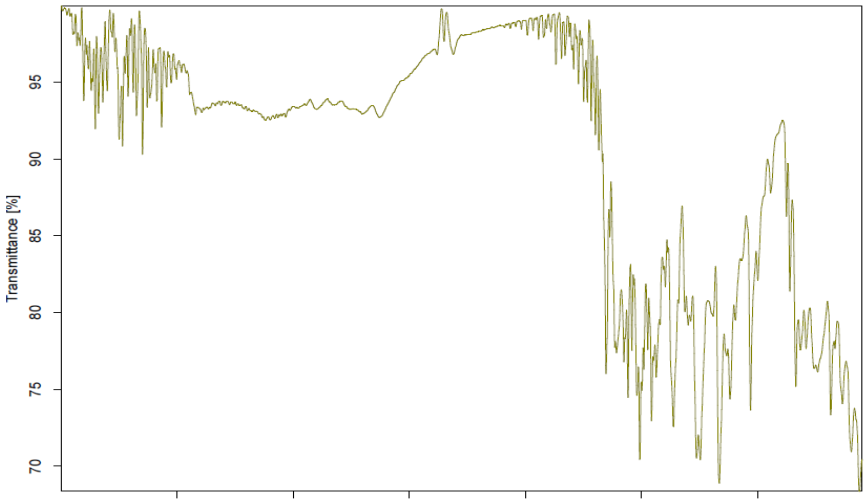


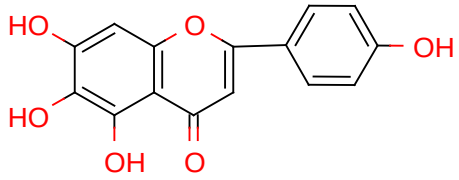
Рисунок 32 - ИК-спектр вещества 3.11

В продуктах щелочного расщепления вещества 3.11 найдены флороглюцин и прокатеховая кислота. Ацетильные и метильные производные вещества 3.11 полностью совпали с физико-химическими свойствами аналогичных производных лютеолина. При смешении веществ 3.11 и стандартного образца лютеолина (Фитопанацея) не происходило депрессии температуры плавления. Проведенное исследование позволили охарактеризовать вещество ***3.11 как 5, 7, 3', 4' – тетраоксифлавон или лютеолин*** [43].

Вещество 3.12 - кристаллический порошок светло-желтого цвета Т.пл. 348-350 ^{0}C (таблица 9).

УФ спектр вещества 3.12 показывает максимумы поглощения при длине волны 335 и 285 нм (таблица 11). Батохромия максимума длинноволновой полосы на 50 нм при взаимодействии с натрия ацетатом указывает на свободную оксигруппу в положении С-7. В УФ-спектре метанольного раствора вещества 3.12 максимумы коротковолновой и длинноволновой полос были почти равной интенсивности, что характеризует соединения, имеющие свободную оксигруппу в 7 положении. Результаты реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой подтверждают присутствие свободной оксигруппы у С-7. Свободная оксигруппа у С-4'

обнаруживается на основании батохромного сдвига максимума длинноволновой полосы на 50 нм при взаимодействии с натрия гидроксидом в спирте метиловом. Взаимодействие с циркония оксихлоридом приводит к батохромному сдвигу на 50 нм, что характеризует свободную оксигруппу у С-5 [148].



$C_{15}H_{10}O_6$

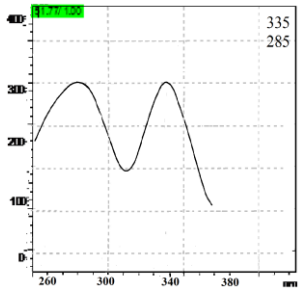


Рисунок 33– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.12

Свободная 6-оксигруппа в веществе 3.12 обнаруживается по дифференциальному УФ-спектру цирконильного комплекса на фоне 5-оксифлавоноидов. Батохромный сдвиг комплекса с борной кислотой и натрия ацетатом, свидетельствует о наличии 6,7-диоксигруппы [148].

В ИК-спектре вещества 3.12 имеет полосы поглощения, характеризующие фенольные оксигруппы (3500-3100 $см^{-1}$), С=С карбонильную группу γ-пирона (1665 $см^{-1}$), колебания ароматических колец (1610, 1560, 1510 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

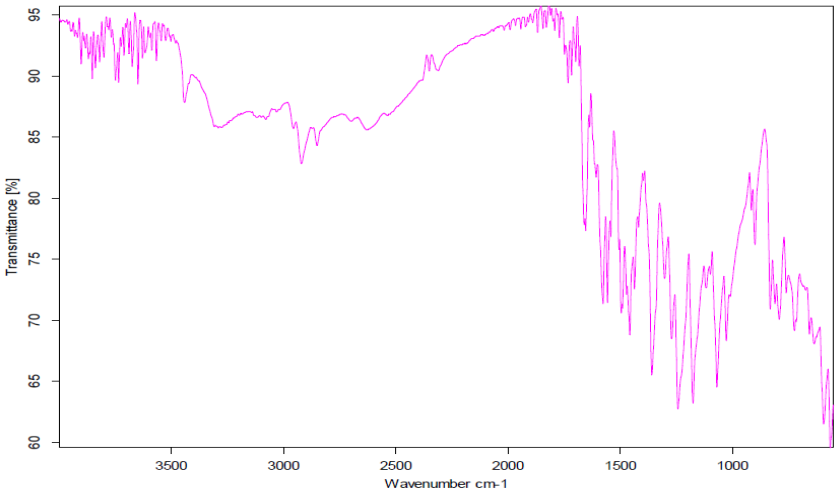


Рисунок 34 - ИК спектр вещества 3.12

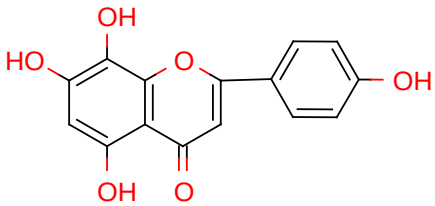
При щелочном расщеплении вещества 3.12 идентифицирована n-оксибензойная кислота. Ацетилирование вещества 3.12 приводило к образованию тетраацетата.

При смешении вещества 3.12 и известного образца скутелареина не наблюдалось депрессии температуры плавления.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.12 как 5,6,7,4 ' – тетраоксифлавон или скутеллареин*** [1, 201].

Вещество 3.13 – кристаллический порошок желто-оранжевого цвета. Т. пл. 340-342^{0}С (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.13 имеет максимумы поглощения при длине волны 280, 305, 325 пл. нм (таблица 11). Свободная оксигруппа у С-7 обнаруживается на основании батохромного сдвига максимума длинноволновой полосы на 30 нм при взаимодействии с натрия ацетатом. Результаты реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой подтверждают наличии свободной гидроксильной группы у С-7. Свободная оксигруппа у С-4' обнаруживается на основании батохромного сдвига максимума длинноволновой полосы на 80 нм при взаимодействии с натрия гидроксидом в спирте метиловом. Свободная оксигруппа у С-5 выявлена батохромным сдвигом длинноволновой полосы на 55 нм, при взаимодействии с циркония оксихлоридом. Батохромия длинноволновой полосы на 50 нм, при взаимодействии с раствором натрия ацетата с борной кислотой объясняет наличие свободных ортодиоксигрупп у С-7 и С-8 [148].



$C_{15}H_{10}O_6$

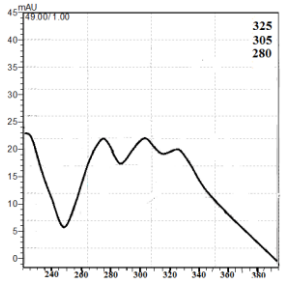


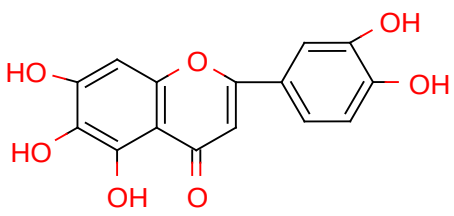
Рисунок 35– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.13

В ИК-спектре вещества 3.13 отмечены полосы поглощения, характеризующие фенольные оксигруппы (3320 $см^{-1}$), карбонильную группу γ – пирона (1670 $см^{-1}$) , колебание ароматических колец (1610, 1590, 1510 $см^{-1}$), паразамещение ароматического кольца (840 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

При щелочном расщеплении вещества 3.13 образуется флороглюцин и n-оксибензойная кислота. Ацетильные и метильные производные вещества 3.13 совпадали по физико-химическим свойствам с аналогичными производными изоскутеллареина. При смешивании вещества 3.13 и известного образца изоскутеллареина не наблюдалось депрессии температуры плавления. В результате установили, что вещество ***3.13 является 5,7,8,4' – тетраоксифлавоном или изоскутеллареином*** [150, 201].

Вещество 3.14 – белый аморфный порошок с желтоватым оттенком. Т.пл. 335-340 ^{0}C (таблица 9).

Вещество 3.14 в коротковолновой области УФ-спектра имеет четкий максимум (245 нм) и плечо (285 нм), свидетельствующие, что в В-кольце имеется замещение у С-3' и С-4' (таблица 11). Диоксигруппировка у С-3' и С-4' обнаруживается по батохромному сдвигу на 55 нм, в присутствии борной кислоты и натрия ацетата. Величина батохромного сдвига цирконильного комплекса вещества 3.14 в УФ-спектре достигает 55 нм, что характерно для 6-замещенных флавонов [148].



$C_{15}H_{10}O_7$

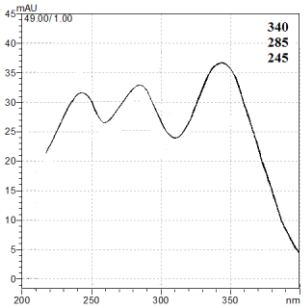


Рисунок 36– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.14

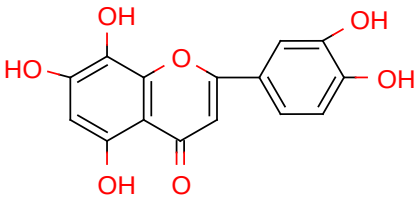
Положительная проба Гиббса (с хлоримидом 2,6-дибромбензохинона) свидетельствует о том, что протон у С-8 в исследуемом флавоне незамещен. В

продуктах щелочного расщепления вещества 3.14 с достоверными образцами идентифицировали протокатеховую кислоту. При ацетилировании вещества 3.14 образуется пентаацетат.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.14 как 5,6,7,3',4'-пентаоксифлавон или норнепетин*** [150].

Вещество 3.15 - аморфное вещество желтого цвета. Т.пл. 287-291 ^{0}C (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.15 демонстрирует максимумы поглощения в области 345, 255 нм и плечо при длине волны 285 нм (таблица 11). Расстояние между пиками А и В составляет 90 нм, что характерно до 8-оксифлавонов [148].



$C_{15}H_{10}O_7$

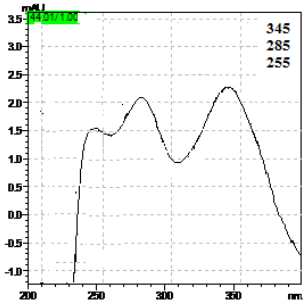


Рисунок 37– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.15

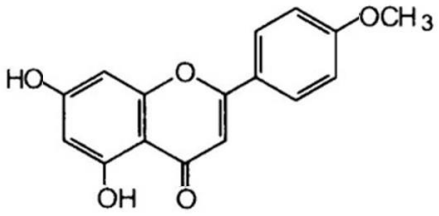
8-оксигруппа, дополнительная к 7-оксигруппе обнаруживается на основании батохромного сдвига в УФ-спектре на 75 нм, в присутствии борной кислоты и натрия ацетата [148].

Характерной особенностью 8-оксифлавонов является их изомерное превращение в кислой среде в 6-оксиизомеры. Нами эта реакция проведена относительно 6- и 8-замещенных флавонов и показано, что изомеризация идет только в направлении от 8-окси к 6-оксиизомеру [150].

При ацетилировании вещества 3.15 образуется пентаацетат. Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.15 как 5, 7, 8, 3',4'-пентаоксифлавон или гиполеатин*** [150].

Вещество 3.16 –кристаллический порошок белого цвета. Т.пл. 268-270 ^{0}C (таблица 9).

УФ спектр вещества 3.16 имеет максимум поглощения при длине волны 325, 303 плечо и 270 нм (таблица 11). На основе батохромного сдвига максимума длинноволновой полосы на 35 нм при взаимодействии с натрия ацетатом установлено наличие свободной оксигруппы в положении С-7. Результаты реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой также подтверждают свободную гидроксильную группу у С-7. Батохромный сдвиг на 60 нм при взаимодействии с циркония оксихлоридом, характеризует свободную оксигруппу у С-5. Полученный комплекс разрушается при добавлении лимонной кислоты [148].



$C_{16}H_{12}O_5$

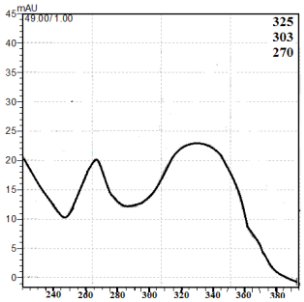


Рисунок 38– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.16

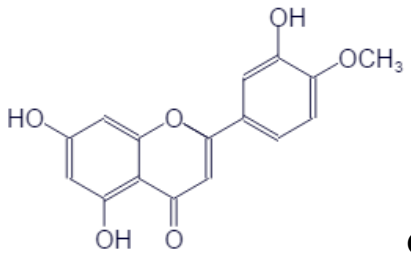
Флавоноидная природа вещества 3.16 подтверждается ИК-спектрами, которые имеют полосы поглощения, характеризующие фенольные оксигруппы (3500-3100 $см^{-1}$), С=О γ-пирона (1665-1655 $см^{-1}$) С=С ароматического кольца (1625-1440 $см^{-1}$), метоксильную группу (2845-2945 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

При щелочном расщеплении вещества 3.16 получили флороглюцин и n-метоксибензойную кислоту. Ацетилировании приводило к образованию диацетата. При дезметилировании вещества 3.16 получали апигенин.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.16 как 5,7, диокси 4 ' – метоксифлавон или акацетин*** [213].

Вещество 3.17 - мелкие бледно-желтые кристаллы. Т. пл. 255-257 ^{0}С (таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.17 показывает максимумы поглощения в области 257, 267, 345 нм (таблица 11). Наличие двух максимумов поглощения в коротковолновой области свидетельствует о гидроксилировании кольца В, чаще всего в положении 3', 4'. Батохромный сдвиг в длинноволновой области спектра отсутствует при добавлении натрия ацетата и борной кислоты, что говорит о том, что одна из гидроксильных групп либо отсутствует в положениях С-3' или С-4' или замещена метоксильной группой. Батохромный сдвиг максимума длинноволновой полосы при взаимодействии с натрия ацетатом на 20 нм говорит о наличии гидроксильной группы в 7 положении. Батохромный сдвиг максимума длинноволновой полосы с циркония оксихлоридом на 45 нм говорит о свободной оксигруппе у С-5 [148].



$C_{16}H_{12}O_6$

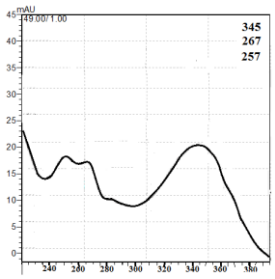


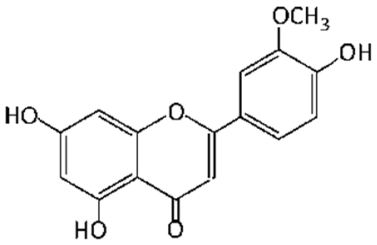
Рисунок 39– Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.17

ИК–спектр вещества 3.17 показывает полосы поглощения, характерные для фенольных ОН-групп (3340 $см^{-1}$), карбоксила γ-пиронового цикла (1660 $см^{-1}$), 1510, 1568, сопряженных С=С-связей (1600-1615 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

При щелочной деструкции вещества 3.17 образовалась изованилиновая кислота и флороглюцин. При ацетилировании получали триацетат. При деметилировании вещества 3.17 получали лютеолин. При смешивании вещества 3.17 и известного образца диосметина не наблюдали депрессии температуры плавления. Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.17 как 5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксифлавон или диосметин*** [1].

Вещество 3.18 – кристаллы светло-желтого цвета. Т.пл. 331-332 °С таблица 9).

УФ-спектр вещества 3.18 демонстрирует максимумы поглощения в области 255, 265, 350 нм (таблица 11). На основании батохромного сдвига максимума длинноволновой полосы на 45 нм при взаимодействии с натрия ацетатом установлена свободная оксигруппа у С-7, а батохромного сдвига на 55 нм с натрия гидроксидом свободная 4′ - гидроксильная группа. При взаимодействии с циркония оксихлоридом наблюдается батохромный сдвиг максимума длинноволновой полосы на 50 нм, что показывает свободную оксигруппу у С-5. Данный комплекс при прибавлении кислоты лимонной разрушается [148].



$C_{16}H_{12}O_6$

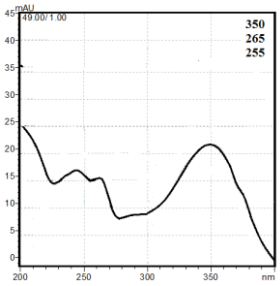


Рисунок 40 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.18

Метоксильная группа в положении С-3 обнаружена на основании отсутствия батохромного сдвига при взаимодействии с кислотой борной и натрия ацетатом [148].

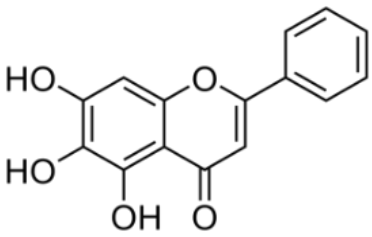
ИК-спектр вещества 3.18 имеет полосы поглощения, характерные для фенольных оксигрупп (3400-3520 $см^{-1}$), карбонильной группы γ-пирона (1650 $см^{-1}$), колебаний ароматических колец (1610, 1560, 1510 $см^{-1}$), метоксильных групп (2845-2945 $см^{-1}$) [34, 35].

При щелочном расщеплении вещества 3.18 идентифицированы флороглюцин и изованилиновая кислота. При ацетилировании вещества 3.18 получали его триацетат.

При дезметилировании вещества 3.18 получали лютеолин. Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.18 как 5,7, 4′- триокси, 3′- метоксифлавон или хризоэриол*** [43, 213].

Вещество 3.19 – кристаллический порошок светло-желтого цвета. Т.пл. 260-262 °С (таблица 9).

Характер УФ-спектра метанольного раствора вещества 3.19 позволяет отнести его к 5,7-диоксифлавонам. УФ-спектр имеет интенсивный максимум поглощения в области 275 нм, а длинноволновый максимум выражен слабо, что говорит о том, что вещество 3.19 является В-незамещенным (таблица 11). Батохромный сдвиг максимума I полосы на 50 нм при взаимодействии с натрия ацетатом обнаруживает свободную оксигруппу у С-7. С натрия гидроксидом в метиловом спирте у вещества 3.19 проявляется гипсохромный сдвиг по сравнению с батохромным сдвигом, вызванным натрия ацетатом, что обусловлено легкостью окисления виценальной триоксигруппировки в щелочной среде. Батохромный сдвиг на 40 нм при взаимодействии с циркония гидроксихлоридом выявляет свободную 5-оксигруппу. Свободная оксигруппа в 6 положении, дополнительная к 7-оксигруппе обнаруживается в УФ-спектре борного комплекса, ионизированного натрия ацетатом, а также по дифференциальному УФ-спектру цирконильного комплекса на фоне комплекса 5-оксифлавоноидов. 6-оксифлавоноиды отличаются также небольшим расстоянием между максимумами А и В, которое равно 50 нм. Таким образом, установлена 6,7-диоксигруппировка в веществе 3.19 [148].



$C_{15}H_{10}O_5$

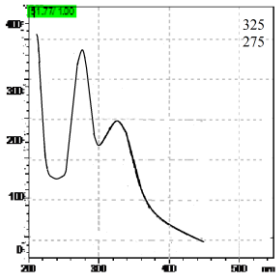


Рисунок 41 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.19

ИК-спектр вещества 3.19 показывает полосы поглощения, характерные для фенольных оксигрупп (3500-3100 $см^{-1}$), С=0 γ-пирона (1665-1655 $см^{-1}$), С=С ароматического кольца (1625-1440 $см^{-1}$), В-незамещенное кольцо (726-680 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

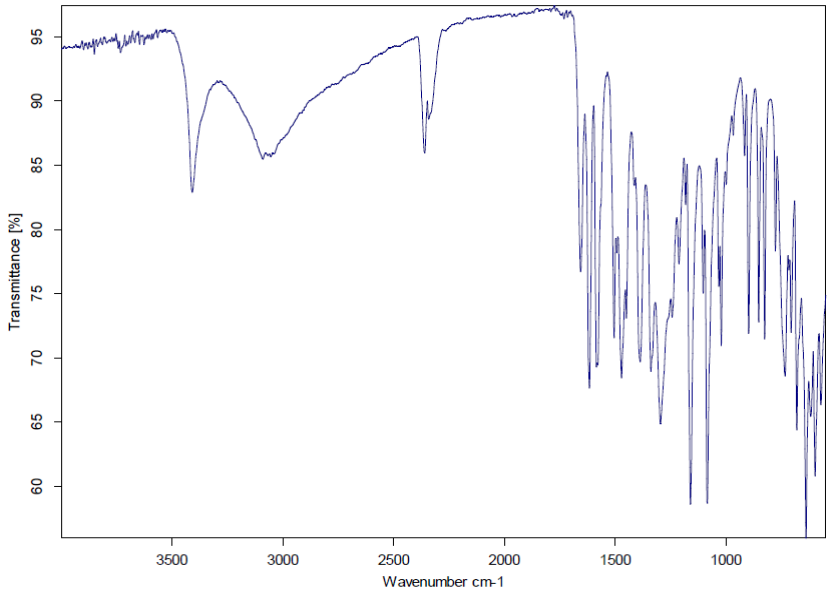


Рисунок 42 - ИК - спектр вещества 3.19

При щелочном плавлении вещества 3.19 идентифицировали бензойную кислоту, а фенол, образующийся из А кольца вероятно разрушается. При ацетилировании получали триацетат.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.19 как 5,6,7-триоксифлавон или байкалеин*** [1, 150].

Флавоноидные гликозиды

Вещества 3.20-3.22 отнесены к флавоноидным гликозидам на основании положительной цианидиновой реакции и при этом образуются красные пигменты, которые не переходят в слой октанола. Восстановление жидкости Фелинга происходит только после проведения предварительного гидролиза [141, 292, 304].

Вещества 3.20-3.22 отнесены к моногликозидам флавоноидов на основании данных молекулярной массы (таблица 9), количественного соотношения агликона (61,3) и сахарного компонента, а также соотношения в УФ-спектрах интенсивностей поглощения максимумов длинноволновой полосы гликозида и агликона (60%) [145, 148, 159].

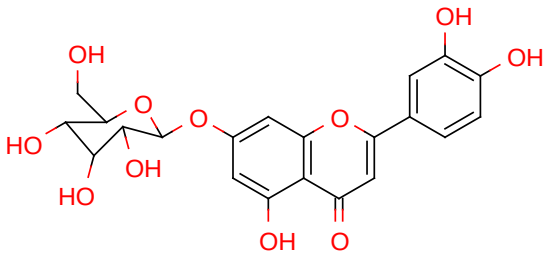
Вещество 3.20 – кристаллический порошок светло-желтого цвета. Т.пл. 256-258°С (таблица 9).

Таблица 12 - УФ-спектральная характеристика О-гликозидов флавоноидов, нм

Номер и название соединения	Растворы соединений в спирте метиловом	Натрия ацетат	Циркония оксихлорид	Натрия гидроксид	Кислота борная и натрия ацетат	Циркония оксихлорид и кислота лимонная
1	2	3	4	5	6	7
3.20 Цинарозид	350 266 255	352 – –	396 – –	410 – –	372 – –	360 – –
3.21 Космоссиин	335 270	–	380	400	–	
3.22 Скутеллярин	335 285	–	375	375	–	

После проведения кислотного гидролиза 10% кислотой хлористоводородной в 50% кислоте уксусной, в течение 2 часов был получен и идентифицирован агликон лютеолин (вещество 3.11) и D – глюкоза.

УФ-спектр вещества 3.20 характеризуется максимумами поглощения в области 255, 266 и 350 нм (таблица 12). Спектральными исследованиями в УФ-области спектра и качественными реакциями установили, что в веществе 3.20 имеются свободные оксигруппы в 5, 3′, 4′- положениях, а углеводный компонент присоединяется по С-7 (отсутствие батохромного сдвига с натрия ацетатом) [148].



$C_{12}H_{20}O_{11}$

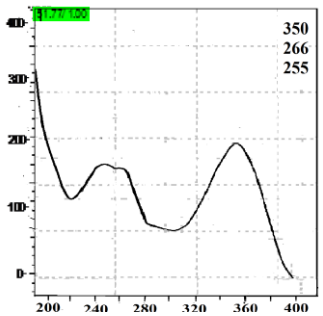


Рисунок 43 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.20

ИК-спектр вещества 3.20 показывает полосы поглощения, характерные для спиртовых оксигрупп углеводов (3430 $см^{-1}$), карбонильной группы γ-пирона (1660 $см^{-1}$), колебаний ароматических колец (1600-1450 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

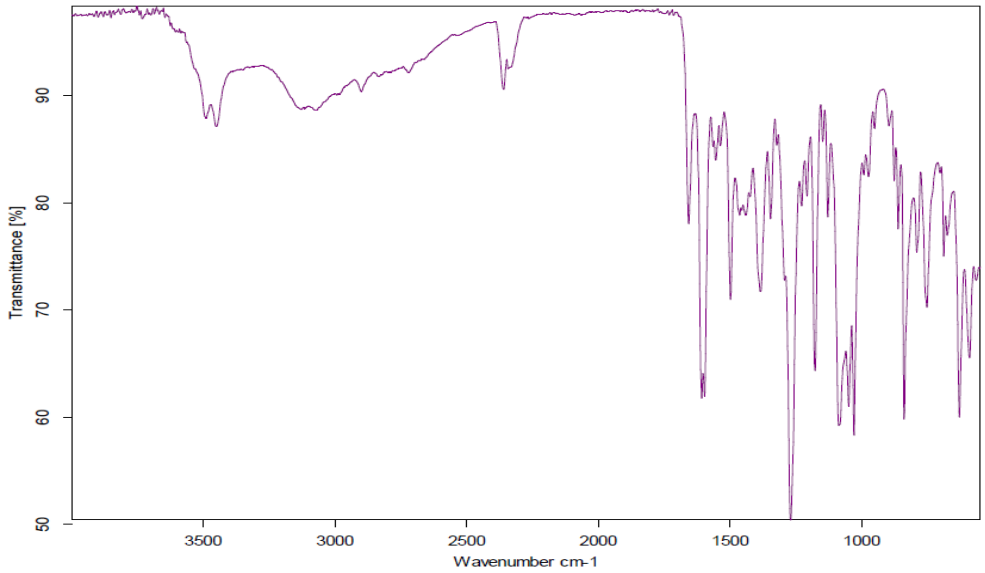


Рисунок 44 - ИК спектр вещества 3.20

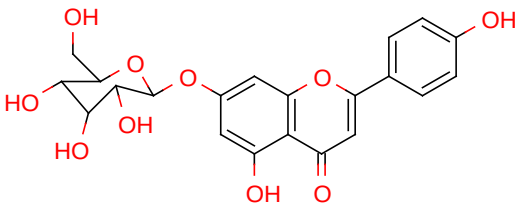
Метод дифференциальной спектроскопии в ИК-области показал наличие трех полос поглощения, подтверждающих пиранозную форму сахара (1100-1010 $см^{-1}$), а полоса при частоте 890 $см^{-1}$ указывает на β-гликозидную связь - пиранозидов [34, 35, 233]. При смешении вещества 3.20 и стандартного образца цинарозида (Фитопанацея) не наблюдали депрессии температуры плавления.

Проведенные исследования позволили вещество охарактеризовать вещество ***3.20 как лютеолин–7–О–β–D–глюкопиранозид или цинарозид*** [43, 150].

Вещество 3.21 - мелкий кристаллический порошок желтовато-белого цвета. Т.пл. 225-227 ^{0}С (таблица 9).

При проведении кислотного гидролиза кислотой хлористоводородной 10% в кислоте уксусной 50% в течении 2-х часов был получен и идентифицирован агликон апигенин (вещество 3.10) и D-глюкоза.

УФ-спектр вещества 3.21 демонстрирует максимумы поглощения в области 335 и 270 нм (таблица 12). Спектральными исследованиями в УФ-области спектра установлено, что в веществе 3.21 имеются свободные оксигруппы в 5,4′-положениях, а углеводный заместитель присоединяется у С-7 (отсутствие батохромного сдвига с натрия ацетатом) [148].



$C_{21}H_{20}O_{10}$

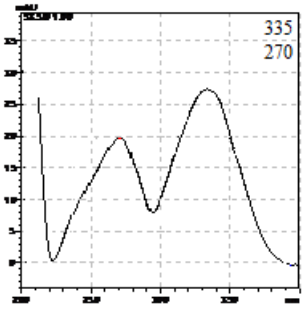


Рисунок 45 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.21

Флавоноидная природа вещества 3.21 подтверждается ИК-спектром, имеющим полосы поглощения, характерные для спиртовых оксигрупп углеводов (3400-3300 $см^{-1}$), фенольных оксигрупп (2900 $см^{-1}$), карбонильной группы γ-пирона (1660 $см^{-1}$), валентных колебаний ароматических колец (1610-1430 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

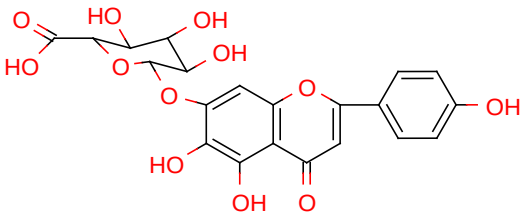
Метод дифференциального анализа в ИК области спектра показал наличие трех полос поглощения, характеризующих пиранозную форму глюкозы (1100-1010 $см^{-1}$), а полоса поглощения при 890 см $см^{-1}$ характеризует β-гликозидную связь пиранозидов [34, 35, 233].

Проба смешения вещества 3.21 и известного образца космоссиина не давала депрессии температуры плавления.

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.21 как апигенин -7-О-β-D-глюкопиранозид или космоссиин*** [201].

Вещество 3.22 – кристаллический порошок желтоватого цвета. Т.пл. 225-227 ^{0}С (таблица 9).

УФ-спектр вещества демонтирует максимумы поглощения в области 285 и 335 нм (таблица 12). Отсутствие батохромного сдвига вещества 3.22 с натрия ацетатом позволило предположить, что углеводный заместитель присоединяется по положению С-7 [148].



$C_{21}H_{18}O_{12}$

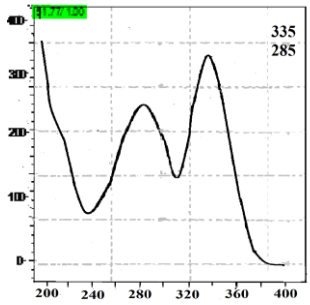


Рисунок 46 – Структурная формула и УФ – спектр вещества 3.22

Флавоноидная природа вещества 3.22 подтверждается ИК-спектром, имеющим полосы поглощения, характерные для спиртовых оксигрупп углеводов (3400-3300 $см^{-1}$), фенольных оксигрупп (2900 $см^{-1}$), карбонильной группы γ-пирона (1660 $см^{-1}$), валентных колебаний ароматических колец (1610-1430 $см^{-1}$) [34, 35, 233].

Метод дифференциального анализа в ИК области спектра показал наличие трех полос поглощения, характеризующих пиранозную форму сахара (1100-1010 $см^{-1}$), а полоса поглощения при 890 $см^{-1}$ характеризует β-гликозидную связь пиранозидов [34, 35, 233].

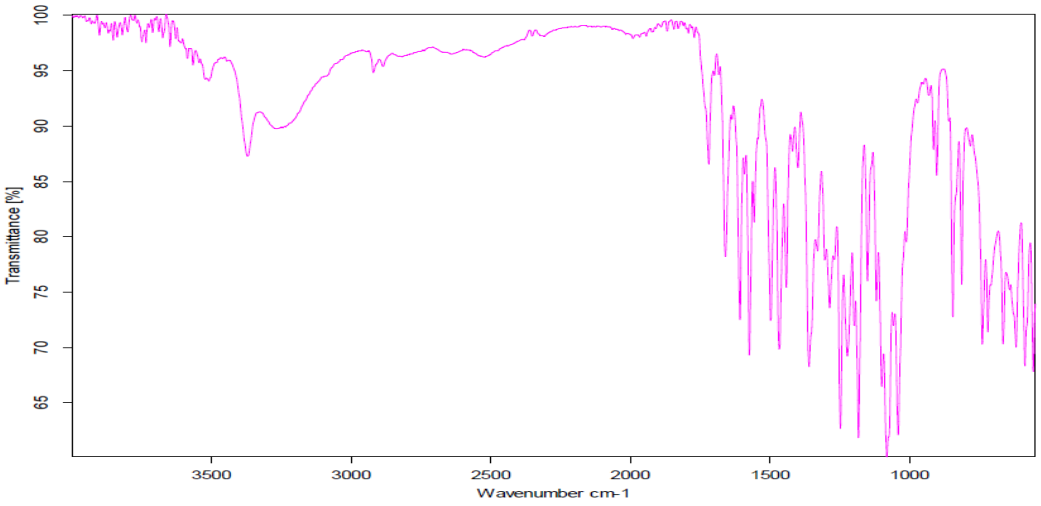


Рисунок 47 - ИК спектр вещества 3.22

Положение углеводного заместителя устанавливали проведением его метилирования с последующим кислотным гидролизом и идентификацией продуктов реакции. Подтвердили, что углеводный заместитель присоединяется

в положении С-7, его идентификацию проводили с помощью качественной реакции на уроновую кислоту (к водной суспензии прибавляли 2-3 капли 1% раствора γ-нафтола и наслаивали 2-3 мл концентрированной кислоты серной, на границе слоев образовывалось красное окрашивание, переходящее в зеленое). Для выделения и идентификации глюкуроновой кислоты использовали глюкуронидозу свежих корней шлемника байкальского, с последующей сравнительной хроматографией на бумаге в системе растворителей н. бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2); в качестве проявителя выступал анилингидрофталат. Вещество легко расщеплялось β-глюкуронидозой, что свидетельствует о β-глюкопиранозном характере углеводного остатка [150].

Проведенные исследования позволили охарактеризовать вещество ***3.22 как скутеллареин-7-О-β-D-глюкуронид или скутелларин*** [1].

Дубильные вещества

Качественный анализ

При проведении качественных реакций на дубильные вещества образовывалось помутнение в реакции со свежеприготовленным раствором желатина 1% и раствором кислоты хлористоводородной 10%; реакция с раствором формальдегида и кислоты хлористоводородной приводила к образованию кирпично-красных осадков; реакция с бромной водой давала образование осадка; с раствором железоаммонийных квасцов 1% наблюдали образование черно-зеленого окрашивания. Результаты качественных реакций позволили установить в сырье исследуемых растений преимущественное наличие дубильных веществ конденсированной группы.

Количественный анализ

Содержание дубильных веществ, определенное фармакопейным перманганатометрическим методом [83] показало, что содержание их в траве растений рода тимьян колеблется от 12,04±0,20% (тимьян двуликий) до 22,68±0,30% (тимьян блошиный) (таблица 13). Однако, фармакопейный метод не позволяет объективно оценивать содержание дубильных веществ в

лекарственном растительном сырье, особенно при содержании около 10% и менее, так как значительно возрастает ошибка за счёт способности калия перманганата окислять и другие биологически активные вещества, содержащиеся в траве растений рода тимьян и относящиеся по химическому строению к различным классам биологически активных веществ. На точность результатов влияет также пересчётный коэффициент, различный для разных групп фенольных соединений и растений, нечёткий переход окраски при титровании, степень разведения титруемых растворов и т.д. Поэтому для объективной оценки качества сырья растений рода тимьян по содержанию дубильных веществ нами использован и комплексонометрический метод [81, 140]. Выбор этого метода обоснован тем, что он позволяет проводить определение дубильных веществ в присутствии полифенольных и других сопутствующих веществ. Данный метод основан на способности дубильных веществ осаждаться солями тяжёлых металлов. Он заключается в том, что дубильные вещества осаждаются цинка аммиачным раствором, далее осадок выделяется центрифугированием, комплекс цинк – дубильные вещества разрушается кислотой с последующим титрованием выделившихся катионов цинка раствором трилона Б в присутствии индикатора ксиленового оранжевого [81].

Определение оптимальных условий экстракции дубильных веществ проводили на одном образце тимьяна Маршалла, как наиболее распространённого в областях Средней полосы Европейской части России в сравнении двумя методами: перманганатометрическим и комплексонометрическим.

При этом изучены следующие стадии: экстрагирование суммы дубильных веществ, очистка полученного комплекса цинк-дубильные вещества.

При проведении количественного анализа природных биологически активных веществ, в том числе и дубильных веществ наиболее важной продолжительной стадией является процесс экстрагирования. Процесс

экстракции определяется целым рядом факторов, в частности измельченностью сырья, температурой экстракции, временем экстракции, типом растворителя, соотношением сырьё-растворитель [198].

Изучение влияния степени измельчённости сырья на количественную экстракцию дубильных веществ показало, что максимальное извлечение дубильных веществ из травы тимьяна ползучего достигается при степени измельчения сырья 2,0 мм (таблица 13).

Таблица 13 - Зависимость выхода дубильных веществ от величины измельчённости травы тимьяна Маршалла

Степень измельчённости сырья, мм	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
1	8,33	12,59
2	**13,62**	**15,04**
3	8,19	10,68

Литературные данные показывают, что для экстракции дубильных веществ чаще всего в качестве экстрагента применяется кипящая вода очищенная и водно - спиртовые растворы [81, 83]. Для звлечения суммы дубильных веществ, были проведены исследования по выбору оптимального экстрагента.

Таблица 14 - Влияние экстрагента на полноту экстракции дубильных веществ из травы тимьяна Маршалла

Экстрагент	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
Спирт этиловый 90%	4,47	9,53
Спирт этиловый 70%	6,53	12,03
Спирт этиловый 50%	12,09	13,33
Спирт этиловый 40%	**13,62**	**15,04**
Спирт этиловый 30%	12,85	14,01
Спирт этиловый 20%	12,63	13,67
Вода очищенная	11,20	12,50

По результатам проведенных исследований (таблица 14) установлено, что лучшим экстрагентом для дубильных веществ может служить спирт этиловый 40%.

Для экстракции дубильных веществ, применяли экстрагирование до наступления равновесия; при этом экстракцию вели на кипящей водяной бане. Максимальный выход дубильных веществ наблюдался через 45 минут при соотношении сырье-растворитель 2:250 (таблица 15).

Таблица 15 - Влияние времени экстрагирования на полноту извлечения дубильных веществ из травы тимьяна Маршалла

Время экстракции	Содержание суммы дубильных веществ, %	
	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
30 минут	8,39	9,69
45 минут	**13,62**	**15,04**
60 минут	9,34	10,70

Проведенные нами исследования способствовали разработке методики количественного определения дубильных веществ в траве растений рода тимьян.

Методика количественного определения дубильных веществ в траве растений рода тимьян

К 2,0 г (точная навеска) измельчённого до размера частиц 2 мм сырья, помещенного в колбу объемом 250,0 мл, приливают 250,0 мл спирта этилового 40%. Колбу с содержимым взвешивают на весах с погрешностью ±0,01 г, соединяют с обратным холодильником. Далее колбу помещают на кипящую водяную баню и выдерживают 45 минут, при этом встряхивают смесь для смывания частиц сырья со стенок колбы. После окончания экстракции колбу охлаждают при комнатной температуре, взвешивают и доводят массу до первоначальной спиртом этиловым 40%. Полученное извлечение, если возникает необходимость фильтруют, при этом отбрасывают первые 10,0 мл фильтрата.

10,0 мл полученного извлечения приливают в пробирку для центрифугирования объемом 50,0 мл, добавляют 10,0 мл раствора цинка оксида 1% в аммиачном буферном растворе (реактив осаждения), смесь перемешивают стеклянной палочкой, палочку промывают 5,0 мл воды очищенной, которую присоединяют к основной смеси. По прошествии 30 минут содержимое пробирки центрифугируют 5-10 минут, используя частоту вращения 5-6 тысяч об/мин, сливают жидкость, а к осадку в пробирке приливают 20,0 мл раствора аммиака 0,25%, взмучивают и взвесь присоединяют к центрифугируемой смеси. Промывную жидкость после проведения центрифугирования сливают и отбрасывают. Осадок в пробирке промывают 20,0 мл спирта этилового 96%, а далее его растворяют в 3,0 мл раствора кислоты уксусной 30%. Полученный раствор переносят количественно в колбу объемом 250,0 мл, приливают 100,0 мл воды очищенной, далее жидкость нейтрализуют при помощи 25,0 мл раствора натрия гидрокарбоната 5%, приливают 0,5 мл раствора ксиленового оранжевого и проводят титрование трилоном Б 0,01 (моль/л) до перехода окраски раствора с красно-фиолетовой до желтой.

1,0 мл раствора трилона Б 0,01 (моль\л) соответствует 0,0013 г танина.

Для определения содержания дубильных веществ в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) используют формулу:

$$X = \frac{V*k*0{,}0013*250*100*100}{m*10*(100-W)}$$, где

V – объём раствора трилона Б, пошедшего на титрование, в миллилитрах;

K – поправка к титру раствора трилона Б 0,01 (моль/л);

m – навеска сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Примечание: Приготовление реактива осаждения 1,0 г цинка оксида, взвешивают с точностью до 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью

100,0 мл, растворяют в смеси 10,0 мл водного раствора аммиака 25% с 2,5 г аммония хлорида и объем раствора доводят водой очищенной до метки.

Приготовление раствора трилона Б 0,01 (моль/л). 3,9 г трилона Б, взвешенного с точностью до 0,01 г, растворяют в 250,0 мл воды очищенной, фильтруют в мерную колбу вместимостью 1,0 л и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Титр полученного раствора устанавливают по 0,01 (моль/л) раствора цинка.

Разработанной методикой проанализированы различные образцы растений рода тимьян в сравнении с методом перманганатометрии (таблица 16).

Таблица 16 - Содержание дубильных веществ в растениях рода тимьян

Растение, время и место сбора	**Содержание дубильных веществ, %**	
	Пермангонатометрический метод	Комплексонометрический метод
Тимьян Палласа Белгородская обл. 2012 г.	14,70 ±0,59	9,50±0,39
Тимьян меловой Белгородская обл. 2011 г.	13,70±0,59	7,60±0,28
Тимьян ползучий Фирма «Здоровье»,2011	16,02±0,72	11,15±0,48
Тимьян блошиный Брянская обл. 2012 г.	22,68±0,30	9,10±0,10
Тимьян Маршалла Белгородская обл. 2011 г.	14,00±0,34	8,50±0,02
Тимьян двуликий Курская обл. 2013г.	12,04±0,20	6,54±0,15
Тимьян Черняева Курская обл. 2014 г.	12,37±0,22	9,34±0,24

Содержание дубильных веществ, определённое двумя методами показало, что наибольшее содержание дубильных веществ было определено пермангонатометрическим методом (12,04±0,20%-22,68±0,30%), а комплексонометрический метод, по сравнению с пермангонатометрическим даёт результаты почти в 2 раза ниже (6,54±0,15%-11,15±%). Указанное

расхождение результатов анализа двумя методами можно объяснять различной избирательностью этих методов к дубильным веществам в смеси с сопутствующими веществами. Для того, чтобы показать, что комплексонометрический метод является более объективным в определении дубильных веществ по отношению к перманганатометрическому, нами было проведено титрование раствором калия перманганата фильтров травы тимьяна Маршалла, полученных после осаждения и отделения дубильных веществ реактивом осаждения. В результате титрования в фильтрате найдено 3,52 % веществ, не осаждаемых реактивом осаждения. Далее, было интересным исследовать состав центрифугатов после осаждения дубильных веществ в методе комплексонометрии. Получение центрифугаты нейтрализовали кислотой серной до слабокислой реакции и экстрагировали их этилацетатом. Полученные этилацетатные извлечения и исходные извлечения хроматографировали на бумаге и тонких слоях сорбента в различных системах растворителей. Хроматографический анализ подтвердил, что фенольные соединения (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины) остаются в центрифугах и данный метод позволяет определить дубильные вещества в присутствии других фенольных соединений [61].

3.3 Тритерпеновые соединения

3.3.1 Качественное и количественное изучение тритерпеновых соединений

Результаты качественноего изучения

Результаты качественного определения показали наличие сапонинов во всех изучаемых растениях на основании (глава 2, раздел 2.2.3) образования

белого хлопьевидного осадка при добавлении спиртового раствора холестерина 1% к спиртовому раствору смолообразного остатка бутанольной фракции; образования малиново-красного окрашивания при прибавлении раствора ванилина 1% в кислоте хлористоводородной к спиртовому раствору бутанольной фракции. В результате реакции Фонтан-Канделя (наблюдали образование пены, которая была равной по объему и стойкости при добавлении к 2-3 каплям водных извлечений из травы исследуемых растений растворов кислоты хлористоводородной (0,1моль/л) и натрия гидроксида (0,1моль/л) и встряхивании), установили, что сапонины изучаемых растений имеют тритерпеновую природу.

Результаты хроматографического анализа бутанольных фракций водно-спиртовых и водных извлечений на пластинках Sorbfil в системе растворителей: хлороформ-этилацетат (5:1) подтвердили наличие в извлечениях из травы растений рода тимьян тритерпеновых соединений (рисунок 22). Со стандартными образцами (фирма «Фитопанацея») в исследуемых извлечениях идентифицированы урсоловая и олеаноловая кислоты. Урсоловая кислота найдена в 6 видах: тимьяне меловом, тимьяне ползучем, тимьяне блошином, тимьяне Маршалла, тимьяне двуликом, тимьяне Черняева. Олеаноловая кислота в 5 видах: тимьяне Палласа, тимьяне меловом, тимьяне ползучем, тимьяне Маршалла и тимьяне Черняева.

Количественное изучение тритерпеновых соединений

Фотоэлектроколориметрическое определение тритерпеновых сапонинов (глава 2, раздел 2.2.3) позволило установить, что их содержание в траве растений рода тимьян колеблется от 0,52±0,02% до 4,62±0,23%, максимальное количество тритерпеновых сапонинов накапливается в траве тимьяна двуликого (4,62±0,23%), тимьяна мелового (2,40±0,11%) и тимьяна Маршалла (2,10±0,10%) (таблица 5).

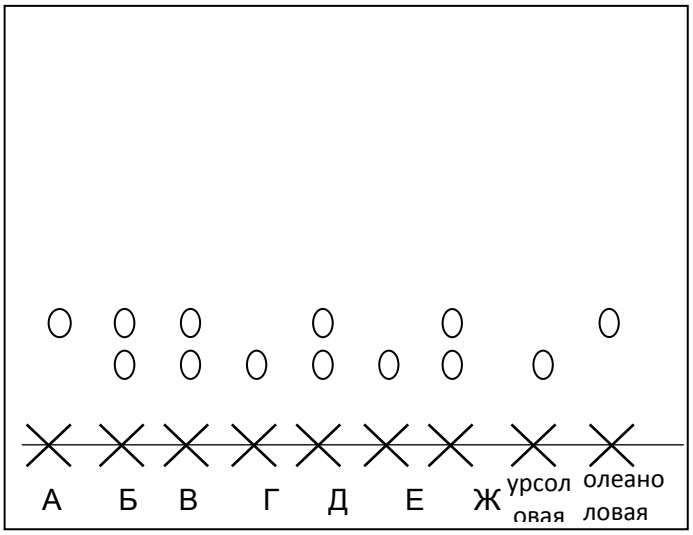


Рисунок 48 - **Схема хроматограммы водно-спиртовых извлечений из травы растений рода тимьян**
А - Т. Палласа
Б – Т. меловой
В – Т. ползучий
Г – Т. блошиный
Д – Т. Маршалла
Е - Т. двуликий
Ж – Т. Черняева
Система растворителей: хлороформ – этилацетат (5:1)

3.3.2 Выделение и исследование тритерпеновых соединений

В связи с тем, что тритерпеновые сапонины растений рода тимьян обладают антисклеротическим действием [223] было интересным провести их выделение. Кроме того, представляло интерес подтвердить результаты хроматографического анализа. Примером выделения тритерпеновых соединений из растений рода тимьян является их выделение из травы тимьяна блошиного.

Воздушно-сухую траву тимьяна блошиного (120,0 г) измельчали до размера частиц 2,0 мм и экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета. Хлороформное извлечение отделяли, упаривали до густого состояния. Далее к густому остатку приливали спирт метиловый для растворения. Полученный метанольный раствор центрифугировали, получали осадок и раствор. Осадок отделяли и многократно перекристаллизовывали из спирта метилового, в результате получили вещество 3.01. Метанольный раствор упаривали в вакууме досуха и многократно обрабатывали горячим спиртом метиловым. Полученные метиловым спиртом извлечения объединяли, упаривали до сухого

остатка, который многократно перекристаллизовывали из спирта метилового. В результате получали вещество 3.02 (рисунок 49).

Вещества 3.01 и 3.02 дают положительные реакции Либермана-Бурхарда, Сальковского, а также реакцию с хлорсульфоновой кислотой [221].

Вещество 3.01 – кристаллический порошок беллого цвета, состава $C_{30}H_{48}O_3$, Т. пл. 280-283^{0}С.

Максимум поглощения УФ-спектра вещества 3.01 находится при длине волны 310 нм (в кислоте серной).

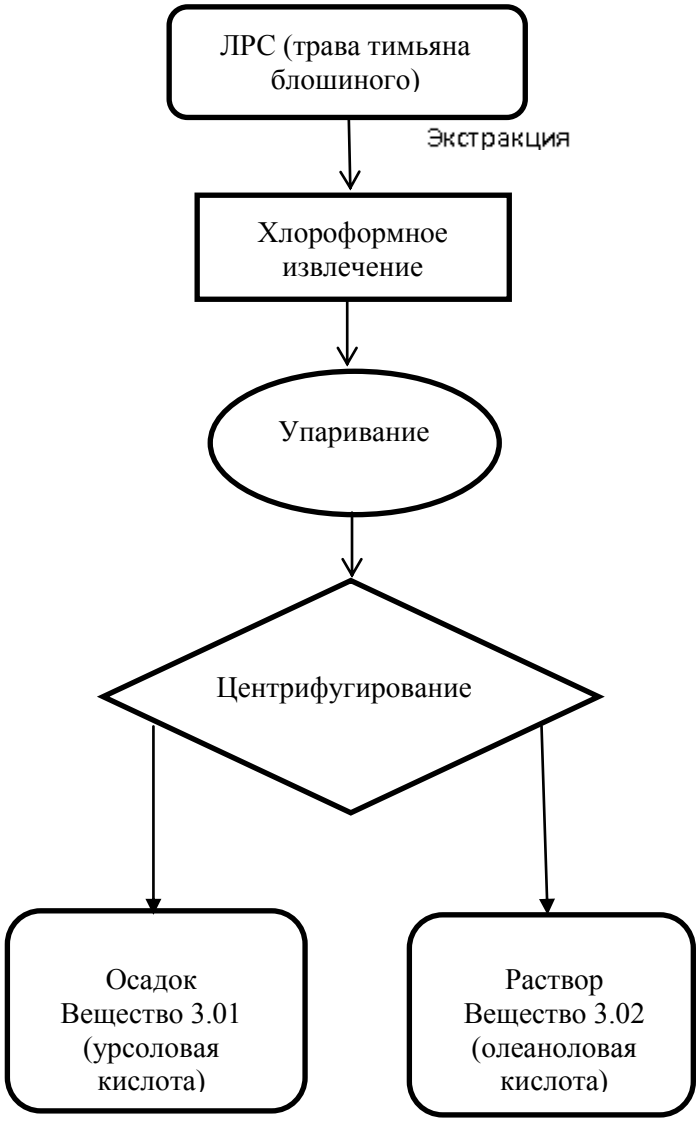


Рисунок 49- Схема выделение урсоловой и олеаноловой кислот из травы тимьяна блошиного

ИК-спектр вещества 3.01 показывает полосу поглощения при 1714 см$^{-1}$ (С=0 кислоты), 662,1284 (цис-тризамещения С=С), 1187,1123, 1090, (ОН), 1253,1284,1315,1386,1455 (CH_3, CH_2, CH), 2870, 2925, 3416 (CH_3, CH_2, CH), 3694 (ОН) (рисунок 50). Продукт ацетилирования вещества 3.01 показал температуру плавления 284-286^{0}С.

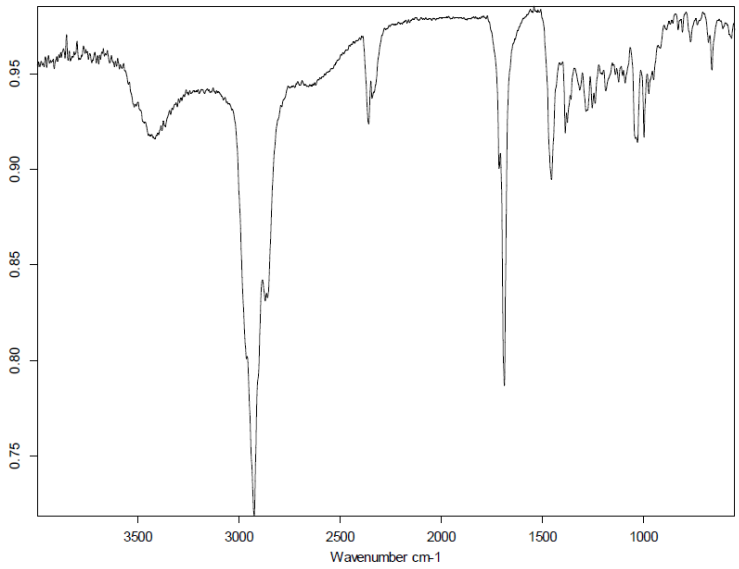


Рисунок 50 – ИК-спектр вещества 3.01

Вещество 3.01 по хроматографической подвижности совпадает с таковой урсоловой кислотой. Таким образом, ***вещество 3.01 было охарактеризовано как урсоловая кислота*** [221].

Вещество 3.02 - белый кристаллический порошок белого цвета, состава $C_{30}H_{48}O_3$. Т. пл. 301-303^{0}С.

Максимум поглощения УФ-спектра вещества 3.02 находится при длине волны 310 нм (в кислоте серной).

В ИК-спектре вещества 3.02 имеется полоса поглощения в области 1714 см $^{-1}$ (С=0 кислоты), а также полосы поглощения при 1689 см $^{-1}$, 1620 см $^{-1}$, 1455 см $^{-1}$, 1385 см $^{-1}$, 1272 см $^{-1}$, 1239 см $^{-1}$, 1212 см $^{-1}$, характерные для олеаноловой кислоты (рисунок 51) [221].

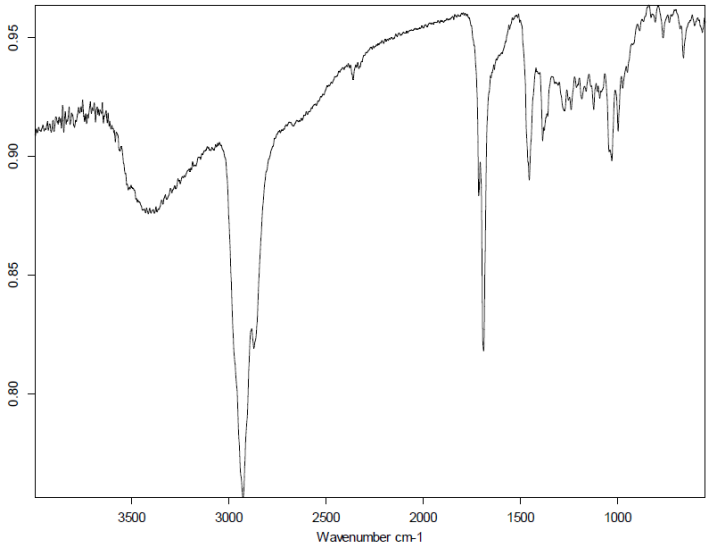


Рисунок 51– ИК-спектр вещества 3.02

Продукт ацетилирования вещества 3.02 показал температуру плавления 260-261^{0}С. Вещество 3.02 по хроматографической подвижности совпадает с таковой олеаноловой кислоты. Таким образом, вещество ***3.02 было охарактеризовано как олеаноловая кислота*** [221].

Урсоловая и олеаноловая из большинства видов выделены впервые: из травы тимьяна Маршалла, тимьяна Палласа, тимьяна блошиного, тимьяна Черняева, тимьяна мелового.

3.4 Исследование жирнокислотного состава

Основой для изучения липофильных веществ, таких как жирные кислоты, послужило то, что их представители, например полиненасыщенные жирные кислоты: линолевая, линоленовая, арахидоновая относятся к незаменимым факторам питания, т.к. в организме они не синтезируется и должны поступать извне. Эти кислоты по своим биологическим свойствам относятся к жизненно необходимым веществам и называются «Витамины F_2». Они нормализуют

холестериновый обмен и таким образом снижают риск развития атеросклероза и сопутствующих ему сердечно-сосудистых заболеваний [193].

Непредельные кислоты: линолевая, линоленовая образуются только в растениях и являются компонентами эссенциальных фосфолипидов [128].

Исследование жирнокислотного состава проводили на хроматографе Agilent Technologies 6890 (глава 2, раздел 2.2.4). Результаты исследования представлены в таблице 17, рисунках 52-58.

Таблица 17 - Жирные кислоты травы растений рода тимьян, мг/кг

№ п/п	Наименование кислоты	Растения рода тимьян						
		Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1.	Капроновая	9,40	7,45	29,85	-	28,09	-	74,57
2.	α - фурановая	-	11,91	-	87,91	30,74	21,87	-
3.	Лауриновая	-	8,00	45,15	45,77	48,42	7,53	61,34
4.	Миристиновая	39,10	189,81	194,24	357,60	123,79	148,48	429,51
5.	Пальмитиновая	769,10	1779,02	4344,75	4287,83	1488,50	766,17	2390,21
6.	Пальмитолеиновая	54,20	62,87	219,11	53,63	64,35	32,45	127,13
7.	Гептадекановая (маргариновая)	16,50	46,24	64,52	50,76	31,62	10,36	40,89
8.	Стеариновая	5,80	172,07	409,20	175,74	132,53	29,11	144,72
9.	Олеиновая	132,00	499,52	803,14	-	252,37	162,55	441,84
10.	Линолевая	282,10	708,90	1695,58	-	434,15	440,34	1171,99
11.	Линоленовая	519,50	678,82	2089,92	-	554,59	620,19	1641,75
12.	Арахидоновая	51,70	370,25	249,89	-	138,56	88,38	166,81
13.	2 - оксипальмитиновая	-	48,95	122,61	135,45	-	58,00	101,38
14.	Бегеновая	-	1084,15	382,17	278,24	167,34	261,46	423,65
15.	Трикозановая	-	60,30	63,98	176,86	-	-	-
16.	Тетракозановая	20,30	256,18	270,50	93,28	177,20	99,88	409,18
17.	Пентадекановая	14,90	-	73,90	-	13,50	5,66	27,23
18.	11-октадеценовая	19,10	-	-	-	-	-	-
19.	Хенейкозановая	62,40	-	-	-	-	-	-
20.	Гексадекадионовая	46,50	-	-	-	-	-	-

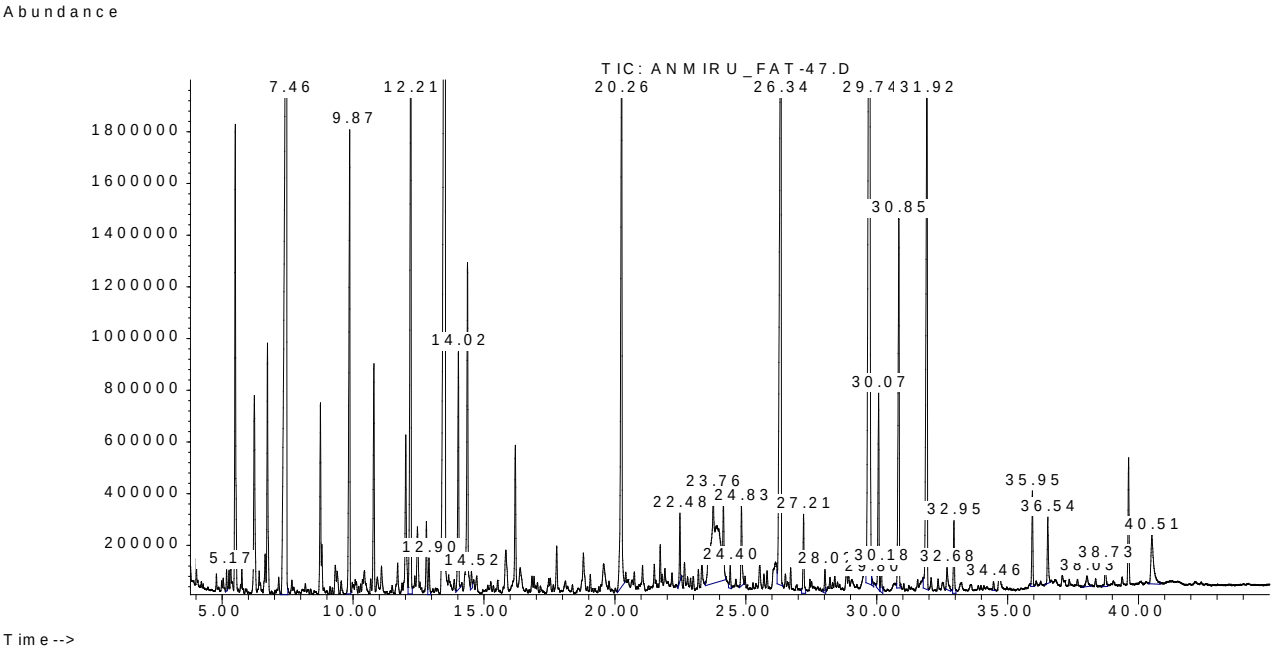


Рисунок 52 – Хроматограмма результатов хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна Палласа

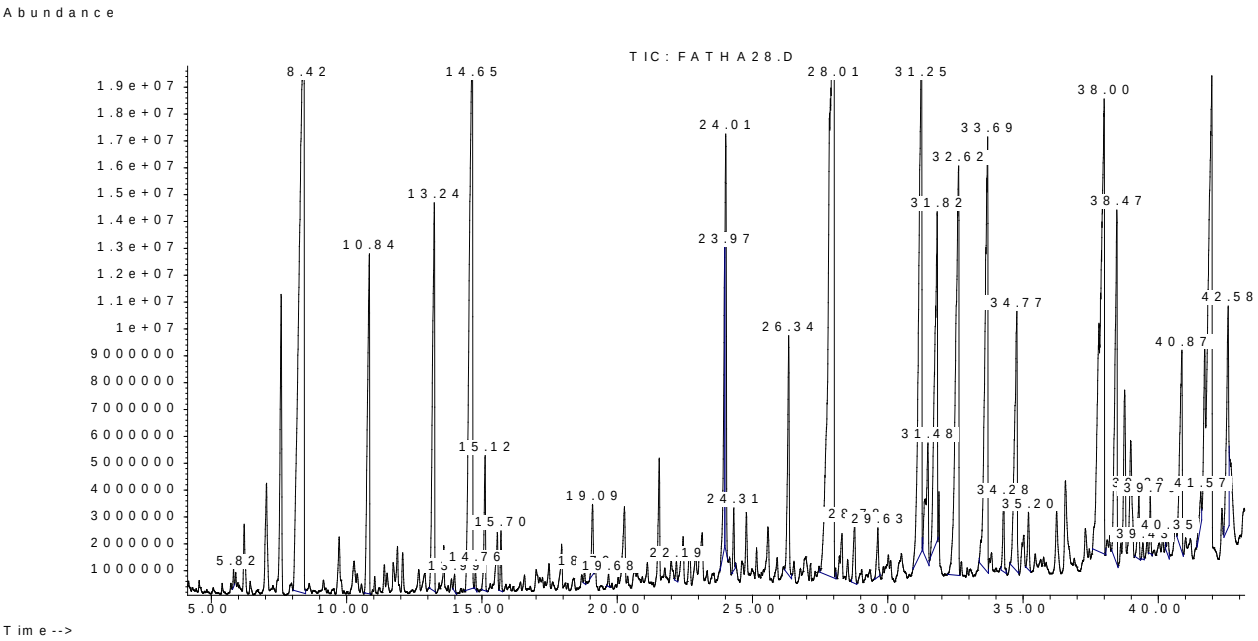


Рисунок 53– Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна мелового

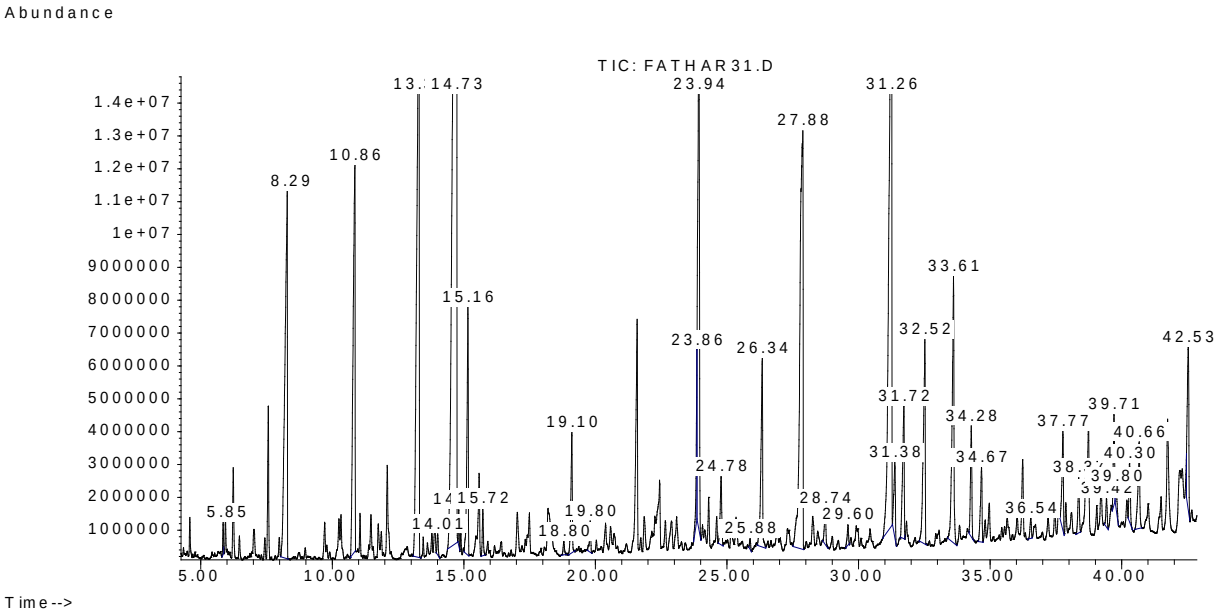


Рисунок 54 – Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна Маршалла

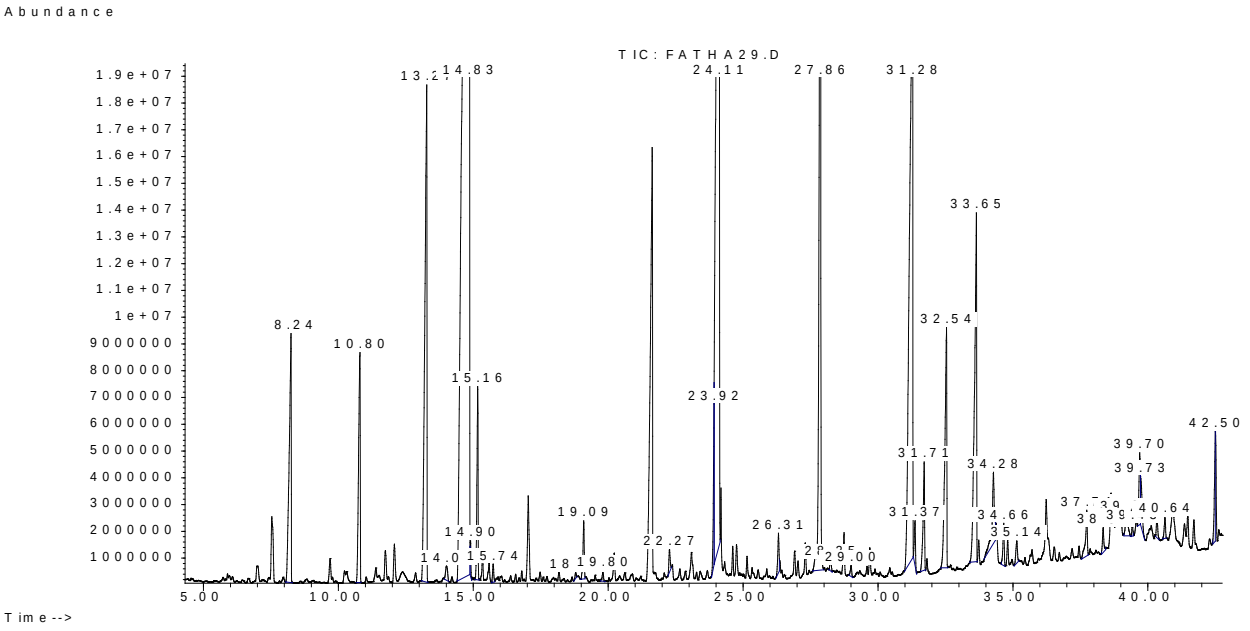


Рисунок 55 – Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна блошиного

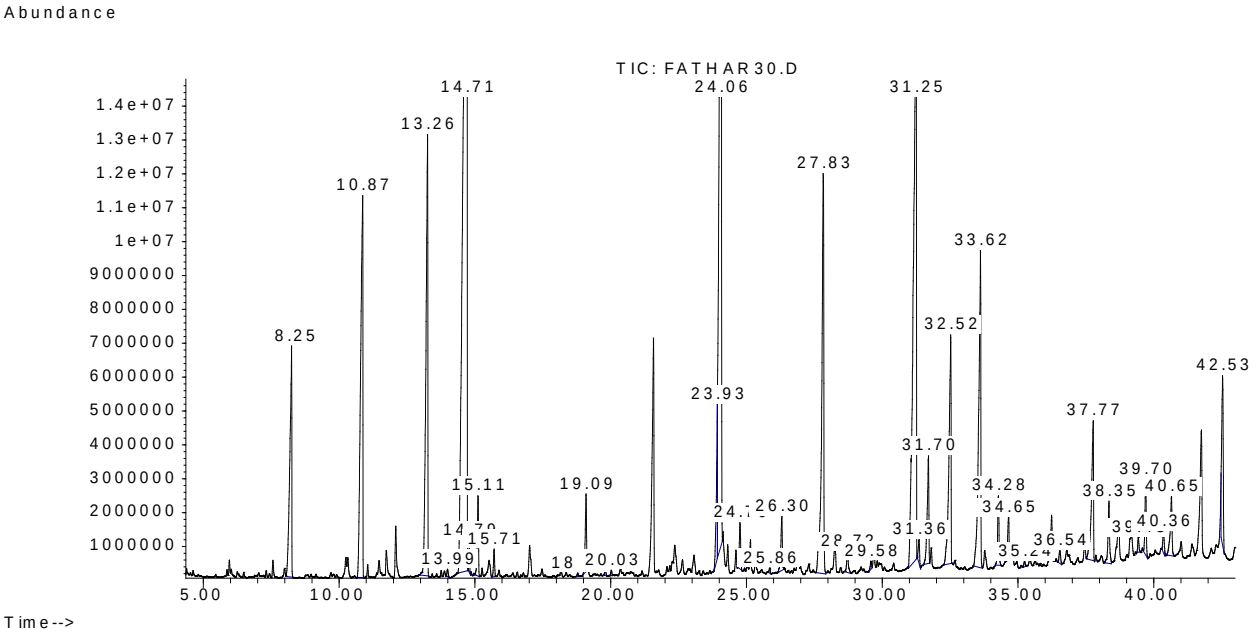


Рисунок 56 – Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна двуликого

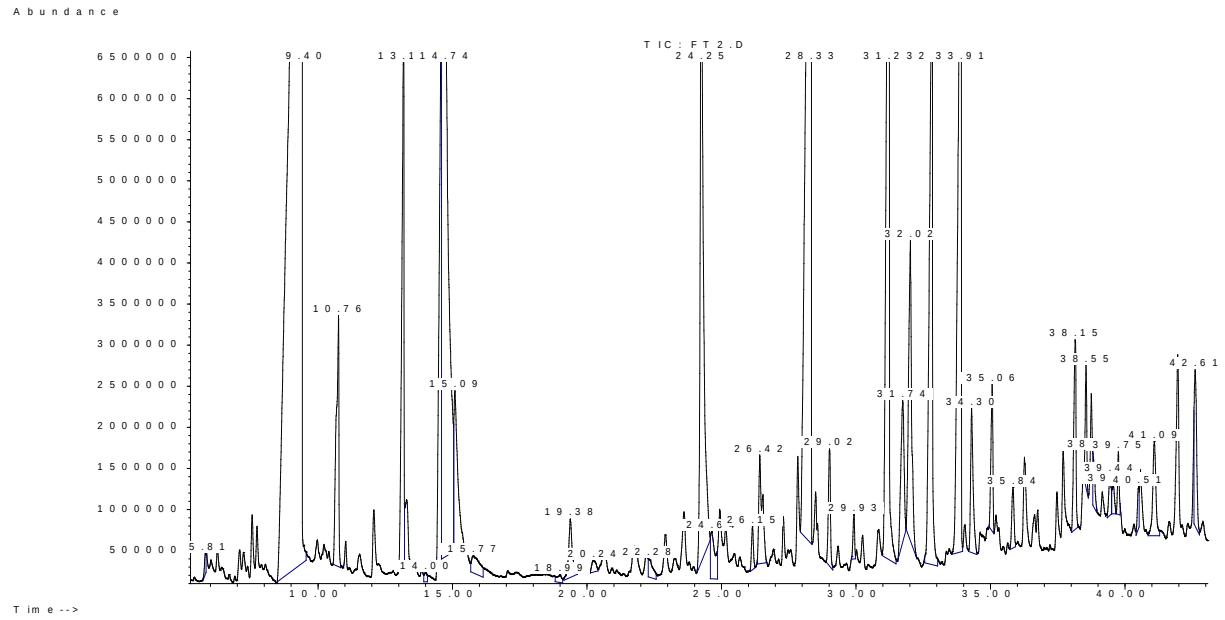


Рисунок 57 – Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна ползучего

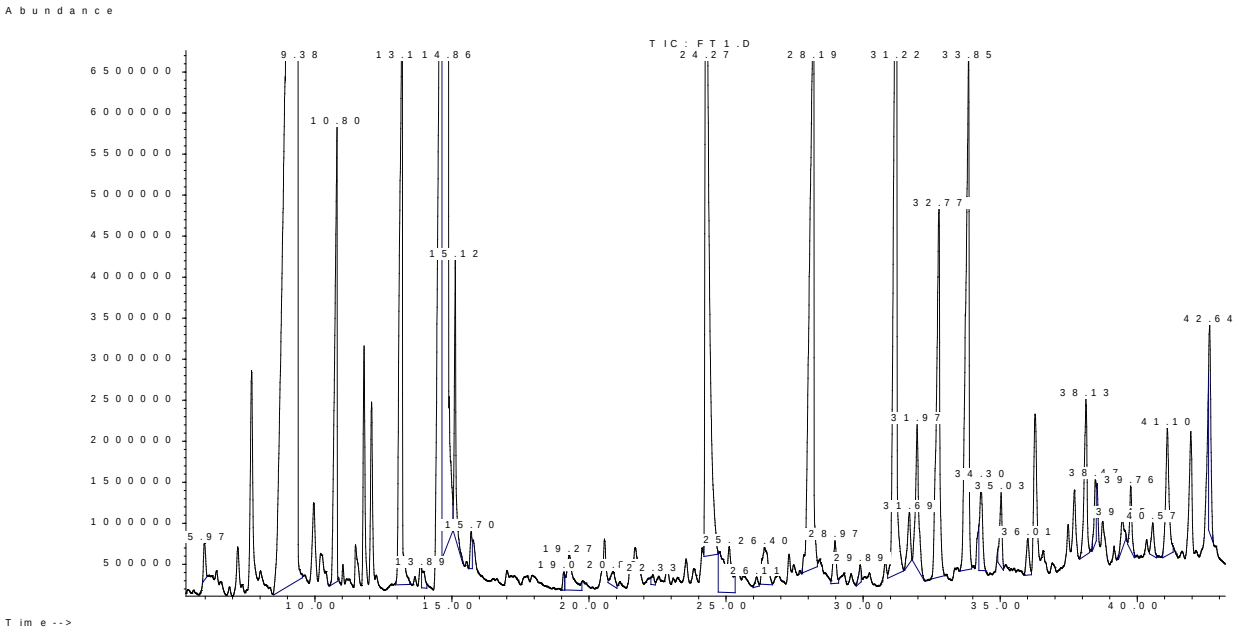


Рисунок 58 – Хроматограмма хромато-масс-спектрального анализа карбоновых кислот сырья тимьяна Черняева

Анализ полученных данных позволил идентифицировать в растениях рода тимьян 20 жирных кислот [47, 56, 58, 160]. Среди насыщенных жирных кислот растений рода тимьян преобладают пальмитиновая и бегеновая кислоты. Пальмитиновая кислота по содержанию превосходит насыщенные кислоты во всех исследованных видах растений рода тимьян, бегеновая в значительных количествах накапливается только в тимьяне меловом, а в тимьяне Палласа она отсутствует. Ненасыщенные кислоты представлены преимущественно линолевой, линоленовой, арахидоновой и олеиновой кислотами. Линолевая кислота преобладает в тимьяне ползучем и тимьяне Черняева, в значительных количествах содержится также в тимьяне меловом, линоленовая в значительном количестве во всех исследованных видах, олеиновая накапливается максимально в тимьяне ползучем, тимьяне меловом и тимьяне Черняева. Арахидоновая кислота максимально накапливается в тимьяне меловом и тимьяне ползучем. Полиненасыщенные жирные кислоты: линолевая,

линоленовая, арахидоновая, по-видимому, вносят определенный вклад в антисклеротическое действие тритерпеновых сапонинов растений рода тимьян.

3.5 Изучение углеводных производных

При изучении углеводных производных были исследованы как свободные сахара, так и сахара, входящие в состав гликозидов и полисахаридов (глава 2, раздел 2.2.1).

3.5.1 Результаты исследования свободных сахаров

Образование кирпично-красного осадка при проведении реакции Бертрана (глава 2, раздел 2.2.5), показывает наличие свободных сахаров, что подтверждается и результатами хроматографического анализа на бумаге (таблице 18).

Таблица 18 – Результаты определения свободных сахаров растений рода тимьян методом хроматографии

Растение	Свободные сахара			
	ксилоза	галактоза	глюкоза	фруктоза
Тимьян Палласа	+	+++	++	-
Тимьян меловой	+	+++	++	-
Тимьян ползучий	+	++	+++	+
Тимьян блошиный	+	+++	++	-
Тимьян Маршалла	+	+++	++	-
Тимьян двуликий	-	++	+++	-
Тимьян Черняева	+	++	+++	+

Примечание: «+» означает присутствие сахара; «-» отсутствие сахара.

3.5.2 Результаты определения связанных сахаров (гликозидов)

Наличие гликозидов было установлено с помощью реакции с реактивом Фелинга № 1 и № 2 и с раствором α-нафтола спиртовым 20% (глава 2, раздел 2.2.5). Образование осадка с реактивом Фелинга, превышающего его объем после проведения гидролиза с использованием раствора кислоты серной 5%, доказывает наличие сахаров в связанном виде (в виде гликозидов). Образование красно-вишневого кольца с α-нафтолом также свидетельствует о наличии сахаров в виде гликозидов. Результаты проведенных реакций позволили установить наличие гликозидов в изучаемых видах тимьяна.

3.5.3 Результаты определения полисахаридов

Для определения полисахаридов использовали концентрированные водные извлечения, к которым прибавляли трехкратный объем спирта этилового 96%, для их осаждения (глава 2, раздел 2.2.5). Выпавшие осадки помещали на воронку Бюхнера, промывали спиртом этиловым 70%, далее 96%, ацетоном, отделяли и высушивали. Полученные осадки растворяли в воде очищенной и проводили с ними реакции с жидкостью Фелинга и меди оксида раствором (глава 2, раздел 2.2.5). Результаты проведенных реакций показали в растениях рода тимьян наличие полисахаридов.

3.5.4 Выделение полисахаридных комплексов

Проведенные качественные реакции показали наличие полисахаридов в исследуемых растениях, в связи с чем было проведено выделение фракций полисахаридов, а далее изучен их качественный и количественный состав. Среди полисахаридов были выделены и изучены водорастворимые полисахаридные комплексы и пектиновые вещества.

Содержание водорастворимых полисахаридных комплексов в исследуемых растениях колебалось от 3,10±0,12 % до 7,58±0,18% (таблица 19) [47, 53, 58, 60, 63].

Таблица 19 - Содержание фракций полисахаридов в траве исследуемых видов тимьянов

Растения рода Тимьян	Фракции полисахаридов, %	
	водорастворимые полисахариды	пектиновый комплекс
Тимьян Палласа	4,64±0,12	14,01±0,31
Тимьян меловой	7,58±0,18	8,96±0,20
Тимьян ползучий	5,55±0,17	10,25±0,22
Тимьян блошиный	5,80±0,18	10,60±0,35
Тимьян Маршалла	5,65±0,16	17,78±0,38
Тимьян двуликий	4,52±0,14	8,21±0,37
Тимьян Черняева	3,10±0,12	11,25±0,33

Полученные водорастворимые полисахаридные комплексы представлены аморфными порошками от светло-бежевого до светло-коричневого цвета, которые растворяются в воде и при этом образуются опалесцирующие растворы. Выделенные водорастворимые полисахариды хорошо растворяются в растворах кислот и щелочей и не растворимы в органических растворителях. Полученные полисахаридные комплексы осаждаются спиртом, ацетоном из водных растворов, а также взаимодействуют с реактивом Фелинга после проведения их кислотного гидролиза. [254, 255].

Содержание пектиновых веществ в траве растений рода тимьян колебалось от 8,21±0,37% до 17,78±0,38% (таблица 19).

Полученные пектиновые вещества представлены аморфными порошками от светло-серого до светло-коричневого цвета. Они хорошо растворимы в воде,

при этом образуются вязкие растворы. Растворы пектиновых веществ в воде осаждаются при добавлении раствора алюминия сульфата 1%, при этом образуются пектаты [64, 142].

3.5.5 Результаты исследования выделенных полисахаридных комплексов Изучение моносахаридного состава выделенных полисахаридных комплексов

Мономерный состав выделенных полисахаридных комплексов определяли с использованием метода хроматографии на бумаге после проведения гидролиза. Для гидролиза использовали кислоту серную [глава 2, раздел 2.4.2], [глава 2, раздел 2.4.3].

Хроматограммы после прохождения в системе растворителей сушили на воздухе в течение 1 часа, далее проявляли их раствором анилингидрофталата, снова высушивали и выдерживали в сушильном шкафу 10-15 минут при температуре 100-105°C. В результате наблюдали появление окрашенных зон. В гидролизатах изучаемых водорастворимых полисахаридных комплексов, методом хроматографии на бумаге установили наличие 7 моносахаридов. В сравнении с известными образцами сахаров были идентифицированы ксилоза, арабиноза, галактоза, рамноза, глюкоза, глюкуроновая и галактуроновая кислоты (рисунки 59, 60). Преобладающими моносахарами по величине и интенсивности окраски пятен на хроматограмме явились арабиноза и галактоза у травы тимьяна мелового, тимьяна Маршалла, тимьяна блошиного и арабиноза и ксилоза у травы тимьяна Палласа.

В гидролизатах полученных пектиновых веществ (ПВ) установили 5-6 моносахаридов. С известными образцами моносахаридов были идентифицированы арабиноза, галактоза, глюкоза, рамноза, ксилоза и

галактуроновая кислота. Установлено, что преобладающим моносахаридом в пектиновых веществах является галактуроновая кислота (рисунки 61, 62).

Определение содержания моносахаридов в полисахаридных комплексах

Количественный моносахаридный состав полисахаридных комплексов определяли денсиометрически в гидролизатах после проведения кислотного гидролиза (таблица 20) [глава 2, раздел 2.4.4].

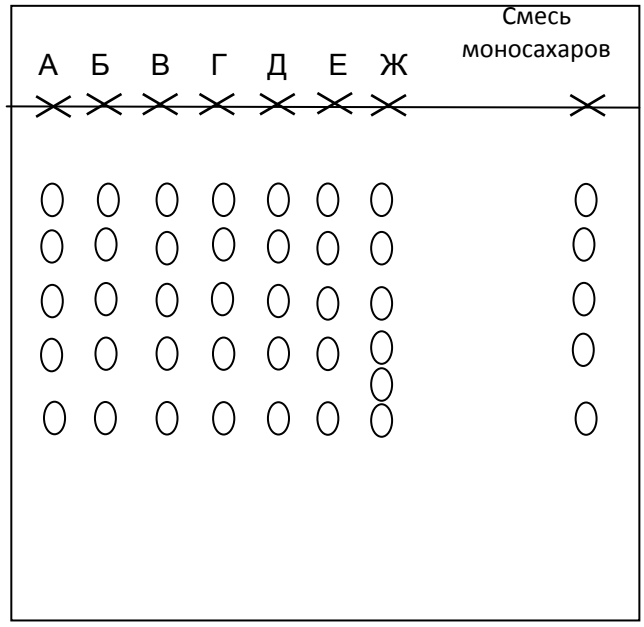


Рисунок 59 - ***Схема хроматограммы продуктов кислотного гидролиза водорастворимых полисахаридов из травы растений рода тимьян***

А – Тимьян Палласа
Б – Тимьян меловой
В – Тимьян ползучий
Г – Тимьян блошиный
Д – Тимьян Маршалла
Е – Тимьян двуликий
Ж – Тимьян Черняева
Система растворителей:
н-бутанол–пиридин–вода (6:4:3)

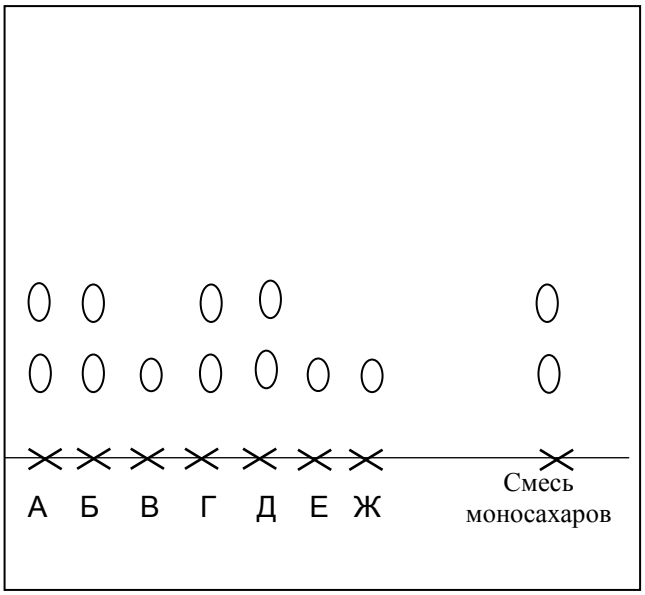


Рисунок 60 - ***Схема хроматограммы продуктов кислотного гидролиза водорастворимых полисахаридов из травы растений рода тимьян***

А –Тимьян Палласа
Б – Тимьян меловой
В – Тимьян ползучий
Г – Тимьян блошиный
Д – Тимьян Маршалла
Е – Тимьян двуликий
Ж – Тимьян Черняева
Система растворителей: этилацетат – кислота уксусная– кислота муравьиная – вода (18:3:1:4)

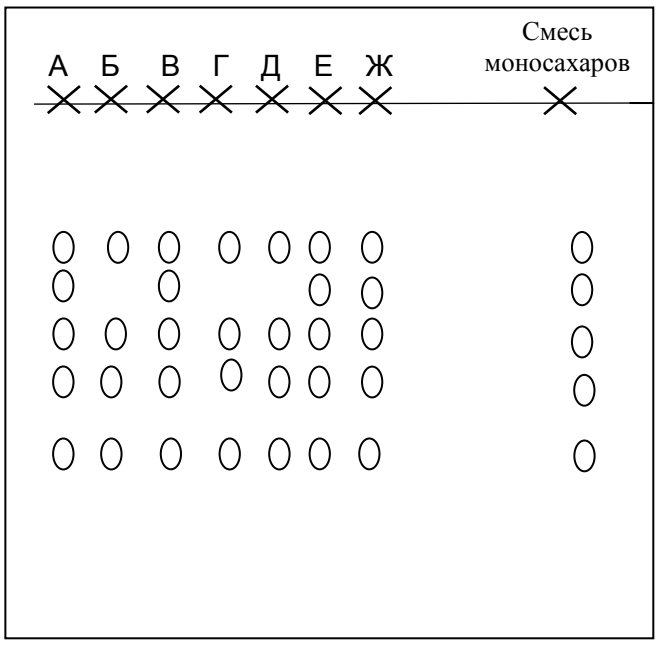


Рисунок 61 - Схема хроматограммы продуктов кислотного гидролиза пектиновых веществ из травы растений рода тимьян
А – Тимьян Палласа
Б – Тимьян меловой
В – Тимьян ползучий
Г – Тимьян блошиный
Д – Тимьян Маршалла
Е – Тимьян двуликий
Ж – Тимьян Черняева
Система растворителей: н-бутанол–пиридин–вода (6:4:3)

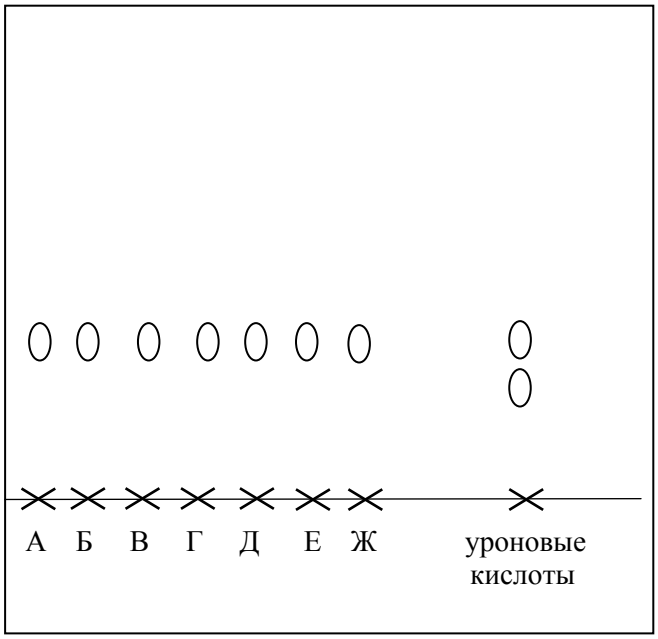


Рисунок 62 - Схема хроматограммы продуктов кислотного гидролиза пектиновых веществ из травы растений рода тимьян
А – Тимьян Палласа
Б – Тимьян меловой
В – Тимьян ползучий
Г – Тимьян блошиный
Д – Тимьян Маршалла
Е – Тимьян двуликий
Ж – Тимьян Черняева
Система растворителей: этилацетат-кислота уксусная-кислота муравьиная-вода(18:3:1:4)

Результаты проведенных исследований показали, что в ВРПС преобладающими моносахарами в траве всех исследуемых тимьянов является – арабиноза (ее содержание колеблется от 7,80±0,31% до 9,10±0,22%), в траве тимьяна Палласа дополнительно ксилоза (12,10±0,11%); в других же видах преобладала галактоза (ее содержание находится в пределах от 4,90±0,12% до 8,30±0,28%). В пектиновых веществах основное содержание составила

Таблица 20 - Содержание состава моносахаридов полисахаридных комплексов из травы растений рода тимьян

Моносахаридный состав, %		**Трава растений рода тимьян**						
		Тимьян Палласа	*Тимьян меловой*	*Тимьян ползучий*	*Тимьян блошиный*	*Тимьян Маршала*	*Тимьян двуликий*	*Тимьян Черняева*
1		2	3	4	5	6	7	8
Водорастворимые полисахариды	Арабиноза	8,62±0,11	8,60±0,30	8,40±0,18	9,10±0,22	7,90±0,23	8,60±0,28	7,80±0,31
	Галактоза	4,90±0,12	7,90±0,35	7,19±0,18	8,30±0,28	6,50±0,25	7,10±0,21	6,90±0,26
	Глюкоза	5,20±0,11	3,90±0,16	2,80±0,07	3,70±0,12	3,10±0,10	3,20±0,08	2,30±0,08
	Ксилоза	12,10±0,11	1,00±0,04	1,30±0,04	1,10±0,04	0,90±0,04	1,60±0,06	1,19±0,04
	Рамноза	0,10±0,003	0,71±0,02	1,10±0,04	0,71±0,03	0,51±0,02	1,19±0,04	0,90±0,04
	Галактуроновая кислота	2,40±0,09	0,90±0,04	-	0,51±0,02	1,20±0,04	-	-
	Глюкуроновая кислота	1,60±0,07	3,60±0,14	3,50±0,08	4,70±0,13	4,30±0,14	3,90±0,09	3,80±0,15
Пектиновые Вещества	Арабиноза	2,10±0,07	4,50±0,19	2,30±0,06	4,30±0,13	4,10±0,19	3,59±0,09	2,70±0,06
	Галактоза	1,60±0,08	3,70±0,12	1,91±0,06	3,90±0,14	2,80±0,12	1,80±0,06	2,41±0,08
	Глюкоза	1,40±0,07	-	1,40±0,05	-	-	1,10±0,04	1,70±0,05
	Ксилоза	0,20±0,007	0,31±0,01	0,10±0,04	0,31±0,01	0,10±0,003	0,40±0,04	0,10±0,04
	Рамноза	0,10±0,004	0,41±0,02	0,60±0,06	0,41±0,02	0,31±0,01	0,50±0,04	0,40±0,04
	Галактуроновая кислота	91,30±0,62	89,30±1,84	89,20±1,80	89,70±1,81	90,10±1,84	87,43±1,92	88,90±2,73

галактуроновая кислота, ее содержание варьирует от 87,43±1,92% (тимьян двуликий) до 91,30±0,62% (тимьян Палласа) (таблица 16).

Изучение содержания функциональных групп у пектиновых веществ

Пектиновые вещества это природные биополимеры полиуронидной природы, для которых характерно наличие различных функциональных групп, оказывающих влияние на свойства пектиновых веществ. Это прежде всего желирующая и комплексообразующая способности [121].

Пектиновые вещества находят применение как детоксиканты при отравлении радиоактивными изотопами, а также солями тяжелых металлов, благодаря их способности к связыванию катионов поливалентных металлов водородом карбоксильных групп [109, 262].

Растворы пектиновых веществ способны образовывать студни [127, 190], на чем основано их применение в фармацевтической промышленности как источников желирующих агентов. Способность к образованию гелей в пектиновых веществах находится в большей зависимости от степени метилирования в карбоксильных группах пектиновых веществ [121, 255].

В связи, с чем нами проведено определение содержания функциональных групп пектиновых веществ с целью обоснования их дальнейшего использования в медицинской практике.

Определение содержания функциональных групп (свободных карбоксильных, метоксилированных карбоксильных, общее количество карбоксильных, а также метокси- групп) было проведено титриметрическим методом [глава 2, раздел 2.4.5], (таблица 21).

Таблица 21- Результаты определения содержания функциональных групп в пектиновых веществах растений рода тимьян

Трава тимьяна	Содержание функциональных групп,%				Степень метоксилированности (λ), %
	Кс	Км	Ко	OCH_3	
1	2	3	4	5	6
Тимьян Палласа	13,75±0,07	1,42±0,06	15,17±0,08	0,97±0,04	9,33±0,39

Тимьян меловой	12,25±0,21	3,20±0,09	15,45±0,22	2,20±0,06	20,73±0,36
Тимьян ползучий	6,83±0,14	5,53±0,12	12,36±0,14	3,81±0,08	44,73±0,90
Тимьян блошиный	10,22±0,39	3,90±0,11	14,11±0,48	2,68±0,08	27,60±0,56
Тимьян Маршалла	19,76±0,49	4,76±0,17	24,51±0,55	3,27±0,12	19,47±0,83
Тимьян двуликий	6,33±0,28	3,28±0,10	9,61±0,37	2,26±0,07	34,12±0,38
Тимьян Черняева	5,98±0,28	2,17±0,10	8,15±0,22	1,49±0,08	26,71±1,97

Проведенные исследования показали, что содержание в изучаемых пектиновых веществах свободных карбоксильных групп составляет от 5,98±0,28% до 19,76±0,49%, метоксилированных карбоксильных групп – от 1,42±0,06% до 5,53±0,12%, метоксильных групп – от 0,97±0,04% до 3,81±0,08%. Пектиновые вещества изученных растений рода тимьян характеризуются невысокой степенью этерификации ($\lambda<50\%$). Содержание же свободных карбоксильных групп свидетельствует об их хорошей способности к комплексообразованию и возможному применению изучаемых пектинов в производстве препаратов, применяемых в качестве детоксикантов.

3.6 Аминокислотный состав

Аминокислоты – это гетерофункциональные соединения, из остатков которых построены белки [193]. Аминокислоты как составные части белков принимают участие в жизненных процессах организма. Так, глутаминовая кислота участвует в углеводном обмене, может использоваться клетками головного мозга для получения энергии [193]. Для аспарагиновой кислоты характерна иммуноактивная активность [152]. Некоторые аминокислоты положительно влияют на инкрецию инсулина, вырабатываемыми клетками поджелудочной железы [280]. Метионин, лейцин активируют обменные

процессы и тем самым стимулируют ослабленную сердечную деятельность. Глицин оказывает выраженное гиполипидемическое действие [152, 297]. Аргинит и глутаминовая кислота характеризуются антиоксидантными, гепатопротекторными, мембраностабилизирующими свойствами. Лизин усиливает неспецифическую резистентность организма, снижает уровень холестерина в крови. Аминокислота цистин является природным антиоксидантом [104]. Аминокислоты принимают участие в процессах возбуждения и торможения, бодрости и сна, агрессии и тревоги, влияют на эмоции, память, поведение, [155, 196], а также на сосудистый тонус [164].

Современная фармацевтическая промышленность применяет много препаратов на основе аминокислот. К ним относятся метионин, гептрал, церебролизин, глутаргин и др. [104] Одним из источников поступления аминокислот в организм человека являются лекарственные растения и препараты на их основе.

Аминокислоты, оказывая широкий спектр фармакологического действия, обладают способностью придавать микроэлементам и другим биологически активным веществам легкоусвояемую форму, фармакологическую безвредность и одновременно потенцировать их эффект, что побудило нас к их изучению.

Образование красно-фиолетового окрашивания при проведении нингидриновой реакции с извлечениями из травы тимьянов показывает наличие в них аминокислот. Результаты хроматографического анализа подтверждали наличие аминокислот в данных растениях. С известными образцами аминокислот в изучаемых видах были идентифицированы аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, глутаминовоя кислота, цистин, лейцин, изолейцин, метионин, лизин, тирозин, треонин, серин, фенилаланин.

Качественный и количественный анализ аминокислотного состава показал, что изученные растения содержат 15 свободных и 18 связанных

Таблица 22 – Результаты определения свободных аминокислот в сырье изучаемых видов, мг/100мг

Растение / Амино-кислота	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1	2	3	4	5	6	7	8
Аланин	0,13	0,12	0,03	0,04	0,16	0,15	0,15
Аргинин	0,09	0,06	0,05	0,06	0,08	0,08	0,08
Аспарагиновая кислота	0,03	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04
Валин*	0,04	0,04	0,03	0,02	0,05	0,05	0,05
Гистидин	0,04	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
Глицин	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04
Цистин	0,21	0,17	0,13	0,12	0,23	0,21	0,22
Лейцин*	0,08	0,06	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08
Лизин*	0,09	0,04	0,06	0,05	0,05	0,05	0,07
Метионин*	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
Изолейцин*	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04
Тирозин	0,03	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04
Треонин*	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04	0,03
Серин	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04
Фенилаланин*	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03
Сумма аминокислот	0,95	0,74	0,58	0,61	0,97	0,94	0,96
Примечание: * - незаменимые аминокислоты							

Таблица 23 – Результаты определения связанных аминокислот в сырье изучаемых видов, мг/100мг

Растение / Амино-кислота	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1	2	3	4	5	6	7	8
Аланин	1,12	0,30	0,12	0,12	0,13	0,15	0,58
Аргинин	0,96	0,65	0,16	0,17	0,25	0,20	0,61
Аспарагиновая кислота	0,32	0,50	0,06	0,07	0,05	0,20	0,19
Валин*	0,28	0,60	0,23	0,22	0,15	0,20	0,21
Гистидин	0,55	0,15	0,05	0,06	0,08	0,35	0,31
Глицин	0,47	0,30	0,14	0,15	0,06	0,20	0,25
Глутаминовая кислота	-	0,50	0,15	0,15	0,08	0,25	-
Пролин	-	0,45	0,46	0,45	0,85	0,25	0,41
Цистин	1,12	-	-	-	-	-	0,91
Цистеин	-	следы	следы	следы	следы	следы	-
Лейцин*	1,11	0,50	0,26	0,27	0,10	0,85	0,61
Изолейцин*	0,71	0,11	0,03	0,04	0,07	0,07	0,39
Лизин*	0,53	0,30	0,08	0,08	0,17	0,10	0,35
Метионин*	0,24	0,15	0,05	0,04	0,05	0,05	0,14
Тирозин	0,37	0,20	0,07	0,08	0,10	0,06	0,21
Треонин*	0,21	0,25	0,04	0,05	0,03	0,10	0,12
Серин	0,15	0,23	0,06	0,05	0,02	0,10	0,01
Фенилаланин*	0,42	0,25	0,14	0,15	0,02	0,13	0,22
Сумма аминокислот	8,56	5,44	2,10	2,15	2,21	3,26	5,52

аминокислот (из которых 7 – незаменимых). Содержание свободных аминокислот в сумме колеблется от 0,58 мг/100мг до 0,97 мг/100мг, при этом их наибольшее содержание отмечено для травы тимьяна Маршалла (0,97 мг/100мг), тимьяна Палласа (0,95 мг/100мг), тимьяна Черняева (0,96 мг/100мг), тимьяна двуликого (0,94 мг/100мг). Содержание связанных аминокислот - от 2,10 мг/100мг до 8,56 мг/100мг, наибольшее их содержание отмечено для травы тимьяна Палласа (8,56 мг/100мг) и травы тимьяна мелового (5,44 мг/100мг). Результаты проведенных исследований показывают, что растения рода тимьян могут быть источником аминокислот, с целью создания на их основе комплексных фитопрепаратов [45, 53, 57, 58, 60].

3.7 Исследование органических кислот

Органические кислоты малотоксичные соединения. Они обладают разнообразными фармакологическими свойствами: улучшают аппетит, регулируют выделение желчи и панкреатического сока [220]; оказывают бактерицидное действие и снижают гнилостные процессы в организме [154]. Лимонная кислота способствует усвоению организмом кальция [70]. Аскорбиновая кислота нормализует липидный обмен при атеросклезозе и других патологиях сердечно-сосудистой системы [17].

Однако, при исследовании лекарственного растительного сырья органическим кислотам, как правило, внимание не уделяется. В связи с вышесказанным было проведено изучение органических кислот.

3.7.1 Исследование органических кислот методом ГЖХ

Исследование качественного состава органических кислот проводили методом газожидкостной хроматографии [глава 2, раздел 2.2.7]. Результаты исследований представлены в таблице 24.

Анализ полученных данных позволил идентифицировать 14 органических кислот. Среди них в растениях рода тимьян преобладают щавелевая кислота, её содержание колебалось от 326,90 мг/кг до 1263,36 мг/кг; малоновая (447,91 мг/кг – 3462,59 мг/кг), яблочная (284,05 мг/кг – 8756,10 мг/кг), лимонная (835,14 мг/кг – 6280,65 мг/кг), левулиновая (86,24 мг/кг – 8041,85 мг/кг) [56].

3.7.2 Количественное определение органических кислот

Количественное содержание органических кислот в растениях рода тимьян, определенное титриметрическим методом в соответствии с ГФ XI издания (глава 2, раздел 2.2.7) составляет от 5,77±0,15% до 11,15±0,49%. Наибольшее содержание установлено в траве тимьяна двуликого (9,75%) и траве тимьяна ползучего (11,15±0,49%).

3.8 Изучение минерального состава растений рода тимьян

Лекарственные растения накапливают минеральные элементы, которые участвуют в различных физиологических и биохимических процессах, и реакциях протекающих в организме. Минеральные элементы в растениях находятся в оптимальных соотношениях, наиболее доступной и усвояемой форме [113, 185, 230, 279].

Таблица 24 – Состав органических кислот растений рода тимьян, мг/кг

№ п/п	Наименование кислоты	Растения рода тимьяна						
		Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1	Щавелевая кислота	326,90	388,32	587,91	1263,36	881,35	800,32	1046,57
2	Малоновая кислота	485,00	447,91	1024,52	3462,59	1603,21	767,02	1679,57
3	Фумаровая кислота	27,00	12,69	23,18	96,00	26,93	7,69	55,36
4	Янтарная кислота	154,30	104,09	567,80	723,10	379,10	92,54	425,72
5	Гептадикарбоновая кислота	-	13,71	-	96,27	-	-	-
6	Яблочная кислота	457,60	284,05	1884,70	8756,10	979,10	1610,16	2696,42
7	Азелаиновая кислота	61,90	216,90	344,64	164,94	378,13	74,86	209,06
8	Лимонная кислота	1127,40	835,14	2337,10	6280,65	1885,16	1533,19	2580,62
9	Гексадикарбоновая кислота	-	415,93	169,81	118,67	89,79	91,23	-
10	Суберовая кислота	-	38,98	-	-	-	-	-
11	Октадикарбоновая кислота	-	38,50	-	-	-	-	-
12	2-окси-3-метил-глютаровая кислота	-	-	73,74	-	-	-	25,61
13	Левулиновая кислота	-	86,24	4619,13	8041,85	3543,81	2719,74	6855,10
14	Бензойная кислота	11,40	36,53	128,17	73,72	59,50	29,05	68,46

Макроэлементы принимают участие в образовании тканей, поддержании осмотического давления. Микроэлементы, как составные части витаминов, гормонов, ферментов активно участвуют в процессах обмена, размножения, тканевого дыхания, обезвреживания токсических веществ. Микроэлементы активно участвуют в процессах окисления-восстановления, оказывают различные виды действия [152, 176, 193, 231].

Для макро- и микроэлементов характерна высокая биологическая активность. Так железо является составной частью ферментов, гемоглобина, принимает участие в процессах кроветворения. Кальций способствует выведению из организма солей тяжелых металлов, радионуклидов, проявляет антиоксидантный эффект [230]. Цинк необходим в синтезе белков, в процессах регенерации кожи [257]. Кремний обладает противовоспалительными, регенеративными свойствами [193]. До настоящего времени минеральный состав большинства лекарственных растений не изучен. Данные о минеральном составе лекарственных растений и сырья будут способствовать их дальнейшему использованию в лечении и профилактике заболеваний возникающих при нарушении минерального баланса. С другой стороны растения являются природными сорбентами и накопителями макро- и микроэлементов; они могут концентрировать минеральные элементы, среди которых могут быть и токсичные, и дозы их могут превышать допустимую концентрацию [166, 185]. Поэтому нами была предпринята попытка определения минерального состава исследуемых видов тимьянов.

Содержание макро- и микроэлементов в растениях рода тимьян было проведено методом спектрального анализа (испарения) (глава 2, раздел 2.2.8), (таблица 25, 26).

Таблица 25 – Минеральные элементы исследуемых растений рода тимьян, мг/кг

Химический элемент	Растение, орган						
	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
1	2	3	4	5	6	7	8

Калий*	1620	2340	4110	790	2430	1830	1890
Натрий*	54	235	66	8	245	305	63
Кальций*	430	1250	530	710	1300	975	500
Магний*	160	235	200	235	245	185	250
Фосфор*	92	135	160	67	140	105	210
Медь*	0,21	0,78	0,49	1,2	1,2	1,5	1,60
Цинк*	5,4	7,80	13,20	0,8	16	3,1	12,60
Молибден*	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Марганец*	13,5	39	20	4	40	30	6,3
Железо*	10,8	155	20	24	80	90	28
Кремний**	145	625	400	125	650	490	440
Алюминий	54	78	20	8	80	61	13
Кобальт*	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Никель**	0,054	0,23	0,14	0,08	0,8	0,18	0,12
Стронций**	5,4	7,8	9,90	2,4	8,1	3,1	0,6
Свинец	<0.03	<0.03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Кадмий**	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Мышьяк**	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ртуть	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Примечание: «*» отмечены эссенциальные элементы;
«**» отмечены условно-эссенциальные элементы.

Результаты, приведенные в таблице 25, показали, что в траве растений рода тимьян содержится 19 биоэлементов, среди которых 12 эссенциальных и 4 условно эссенциальных. Содержание биоэлементов распределено в ряды по мере уменьшения их содержания в сырье тимьянов (таблица 26).

Таблица 26 – Содержание минеральных элементов в траве изучаемых тимьянов

Наименование растения	Количество обнаружен-ных элементов	Ряд химических элементов по мере уменьшения их содержания в сырье тимьянов
Тимьян Палласа	19	K>Ca>Mg>Si>P>Na=Al>Mn>Fe>Zn=Sr>Cu>Ni
Тимьян меловой	19	K>Ca>Si>Na=Mg>Fe>P>Al>Mn>Zn=Sr>Cu>Ni
Тимьян ползучий	19	K>Ca>Si>Mg >P>Na>Mn=Fe=Al> Zn>Sr>Cu>Ni>Pb=Mo=Co=Cd=Al=Hg
Тимьян блошиный	19	K>Ca>Mg>Si>P>Fe>Na=Al>Mn>Sr>Cu>Zn>Ni
Тимьян Маршалла	19	K>Ca>Si>Na=Mg>P>Fe=Al>Mn>Zn>Sr>Cu>Ni
Тимьян двуликий	19	K>Ca>Si>Na>Mg>P>Fe>Al>Mn>Zn=Sr>Cu>Ni
Тимьян Черняева	19	K>Ca>Si>Mg >P>Na>Fe>Al >Zn>Mn>Cu>Sr >Ni>Pb=Mo=Co=Cd=As=Hg

Установлено, что кроме K, Ca, Si, Na, Al, Mg, P, накапливающиеся в значительных количествах во многих растениях, трава тимьяна Маршалла, тимьяна мелового, тимьяна двуликого, тимьяна Палласа, тимьяна Черняева накапливают значительные количества железа, цинка, марганца; трава тимьяна блошиного – железа и меди; трава тимьяна ползучего – железа, марганца, алюминия [45, 53, 57, 60].

Полученные данные позволяют отметить, что исследуемые виды растений рода тимьян содержат большой спектр минеральных элементов (в первую очередь эссенциальных) и различные их сочетания. Комплекс минеральных элементов и других биологически активных веществ (фенольных соединений, аминокислот, тритерпеновых соединений, полисахаридов) показывает терапевтическую значимость растений и является основой для создания новых фитопрепаратов комплексного действия и использование изученных растений более полно и комплексно.

В связи с тем, что до настоящего времени не существует предельно допустимых концентраций (ПДК) токсичных для человека микроэлементов для лекарственного растительного сырья, полученные результаты были сравнены с ПДК для чая. Согласно правилам Сан.Пин., наиболее опасными для человека элементами являются свинец, кадмий, мышьяк и ртуть. Анализируя полученные нами результаты можно сделать вывод, что указанные элементы в растениях рода тимьян не являются опасными для человека, т.к. содержание их в изученных растениях не превышает ПДК для чая.

Выводы по главе 3

1. Проведено изучение качественного состава биологически активных веществ растений рода тимьян. В ходе исследования установлено наличие эфирного масла, жирных и органических кислот, тритерпеновых соединений, фенольных соединений, углеводных производных, аминокислот, макро - и микроэлементов.

2. Выход эфирного масла из исследуемых видов тимьяна составил от 0,15%±0,01% до 1,72%±0,04%. Исследование качественного состава эфирного масла методом газо-жидкостной хроматографии позволило идентифицировать более 100 соединений. В результате исследованные эфирные масла разделились на несколько хемотипов: 1 - α-терпениола; 2 - неролидоля, карвакрола, тимола; 3 - карвакрола, кариофиллена, тимола, метилкарвакрола; 4 - карвакрола, борнеола, тимола, β-бисаболена; 5 – цитраля; 6 – тимола, карвакрола.

3. Изучение жирнокислотного состава травы растений рода тимьян показало, что данные растения содержат 20 жирных кислот. Установлено, что среди насыщенных кислот преобладают пальмитиновая и бегеновая кислоты; ненасыщенные кислоты представлены преимущественно линолевой, линоленовой, арахидоновой и олеиновой кислотами.

4. Установлено наличие тритерпеновых соединений, среди которых идентифицированы урсоловая и олеаноловая кислоты. Содержание тритерпеновых сапонинов в растениях рода тимьян колеблется от 0,52%±0,02% до 4,62%±0,23%, максимальное их количество накапливается в траве тимьяна двуликого, тимьяна мелового и тимьяна Маршалла. Проведено выделение урсоловой и олеановой кислот, установлена их структура

5. С помощью разнообразных методов хроматографии (ТСХ, бумажной, ВЭЖХ, газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии) идентифицировано 27 веществ фенольной природы, из них 7 фенолокислот, 5 оксикоричных кислот, 3 кумарина, 12 флавоноидных соединений. Проведено качественное и количественное определения дубильных веществ в растениях рода тимьяна. Установлено, что их содержание, определенное комплексонометрическим методом колеблется от 6,54%±0,15% до 11,15%±0,48% наибольшее их количество накапливается в траве тимьяна ползучего (11,15%±0,48%).

6. Проведено выделение 20 веществ фенольной природы и установлена их структура. Выделенные фенольные соединения представлены

фенолокислотами: ванилиновой, n-оксибензойной, галловой; оксикоричными кислотами: кофейной, феруловой, n-кумаровой, розмариновой; флавоноидными соединениями: апигенином, лютеолином, скутеллареином, изоскутелляреином, норнепетином, гиполеатином, акацетином, диосметином, хризоэриолом, байкалеином, цинарозидом, космоссиином, скутелларином. Большинство фенольных соединений выделены и идентифицированы в исследуемых растениях впервые.

7. Изучены углеводные комплексы, в составе которых обнаружены как свободные, так и связанные сахара. В свободном виде обнаружены ксилоза, глюкоза, галактоза. Связанные сахара представлены гликозидами и полисахаридами. Проведено выделение водорастворимых полисахаридных комплексов, а также пектиновых веществ. Выход полисахаридных комплексов составил: от 3,10%±0,12% до 7,58%±0,18%, ПВ от 8,21%±0,37% до 17,78%±0,38%.

8. Установлен состав моносахаридов, входящих в состав полисахаридных комплексов растений рода тимьян и проведено определение их количественного содержания. В составе водорастворимых полисахаридов преобладают арабиноза от 7,80 % ±0,31% (тимьян Черняева) до 9,10 %±0,29% (тимьян блошиный), галактоза от 4,90%±0,12% (тимьян Палласа) до 8,30%±0,28% (тимьян блошиный); в тимьяне Палласа преобладает ксилоза (12,10 %±0,11%). Основу пектиновых веществ составляет галактуроновая кислота – от 87,43%±1,92% (тимьян двуликий) до 91,30%±0,62% (тимьян Палласа).

9. Определено содержание функциональных групп в исследуемых пектиновых веществах. Свободные карбоксильные группы в количественном содержании колеблятся от 5,98%±0,28% до 19,76 %±0,49%, метоксилированные карбоксильные группы - от 1,42%±0,06% до 5,53%±0,12%, метоксильные группы - от 0,97%±0,04% до 3,81%±0,08. Пектиновые вещества исследованных растений характеризуются невысокой степенью этерификации ($\lambda<50\%$).

10. Аминокислоты представлены аланином, валином, аргинином, аспарагиновой кислотой, гистидином, лейцином, глутаминовой кислотой, глицином, цистином, лизином, метионином, тирозином, фенилаланином, треонином, серином, изолейцином. Суммарное количество свободных аминокислот варьирует от 0,58 мг/100мг до 0,97 мг/100мг, связанных – от 2,10 мг/100мг до 8,56 мг/100мг.

11. В растениях рода тимьян идентифицировано 14 органических кислот. Среди них преобладают щавелевая, малоновая, яблочная, лимонная, левулиновая. Количественное содержание органических кислот колебалось от 5,77%±0,15% до 11,15%±0,49%.

12. Определен минеральный состав травы тимьянов. В изучаемых видах установлено 19 минеральных элементов, среди которых 12 относятся к эссенциальным и 4 к условно эссенциальным.

ГЛАВА 4 МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН

Современные требования к качеству лекарственного растительного сырья предусматривают совершенствование методик определения подлинности официнального вида сырья - тимьяна ползучего по морфолого-анатомическим признакам для цельного сырья и их разработку для измельченного сырья и порошка.

В настоящее время на территории средней полосы России ресурсы тимьяна ползучего истощены. Тем не менее с тимьяном ползучим на данной территории произрастает около 7-8 близких видов. При заготовке сырья чабреца заготовители как правило не различают виды, поэтому в сырье наряду с чабрецом и вместо него могут быть другие виды, широко распространенные в данном регионе и их сочетание в различных соотношениях. Однако, виды тимьяна, распространенные в средней полосе России относятся к различным секциям и подсекциям и естественно различаются по морфологическим и анатомическим признакам. Это приводит к тому, что неофициальные виды далее используются производителями фасованного лекарственного растительного сырья. Для объективной оценки различий между систематически близкими видами необходима разработка методик их диагностики по морфолого-анатомическим признакам. Полученные данные могут быть использованы также для решения теоретических вопросов систематики. Изучение возможности использования в медицинской практике систематически близких видов в свою очередь предполагает исследование их морфолого-анатомических признаков.

Анализ литературных данных показал, что морфологические признаки растений рода тимьян, произрастающих на территории средней полосы России изучены достаточно хорошо с точки зрения ботаники и представлены в ключе –

определителе «Флора средней полосы Европейской части России» [153]. Однако, это не облегчает задачу заготовителям сырья по определению подлинности сырья.

Анатомическая характеристика приводимых видов тимьянов в литературе практически отсутствует, а имеющие сведения фрагментарны и носят спорный характер [112].

В связи с вышесказанным, актуальным является проведение морфолого-анатомических исследований растений рода тимьян как дополнительных источников тимьяна ползучего и возможных примесей к нему.

4.1 Морфологические исследования

Изучение морфологических признаков травы растений рода тимьян (7 видов) проводили по гербарным образцам, свежесобранным растениям и сухом сырье в сравнении с официнальным видом – травой чабреца, и в соответствии со статьей «Herbae» XI - издания государственной фармакопеи (т. 1, глава 2, раздел 2.6).

Морфологически все виды рода тимьян представлены полукустарничками с лежачими или восходящими одревесневшими стеблями и прямостоячими или приподнимающимися травянистыми цветоносными ветвями.

Несмотря на имеющееся сходство, виды рода имеют ряд существенных отличий по характеристике стеблей, листьев, соцветий, строению и опушению чашечки и венчика, что позволяет их использовать для идентификации вида.

Морфологическая характеристика травы тимьяна ползучего согласно ФС «Чабреца трава»

Исследования морфологических признаков сырья официнального вида проведены для цельного, измельченного и порошкованного сырья.

Цельное сырье. Цельные или частично измельченные тонкие стебли, листья и цветки. Стебли четырехгранные, тонкие (до 0,5 см), зеленовато- или желто-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком. Листья короткочерешковые, ланцетные, эллиптические или продолговато-эллиптические, достигающие длины около 15 мм, слабоопушенные или голые с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. По всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев часто видны длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, одиночные или собранные по нескольку штук в полумутовки. Каждый цветок состоит из двугубой чашечки и двугубого венчика. Чашечка длиной около 4 мм, венчик длиной 5-8 мм, тычинок – 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый; чашечки – красновато-коричневый; венчика – синевато-фиолетовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Измельченное сырье. Кусочки тонких стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет стеблей зеленовато- или желтовато-коричневый, иногда с фиолетовым оттенком, листьев - зеленый или серовато-зеленый с желтовато-коричневыми точками (эфиромасличные железки) на поверхности, венчика - сине-фиолетовый, чашечки - красновато-коричневый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Порошок. Кусочки тонких стеблей, листьев, цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет серовато-зеленый или коричневато-зеленый с беловатыми, красно-коричневыми, синевато-фиолетовыми и розовато-фиолетовыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Морфологическая характеристика растений рода тимьян

секции Camptodromi A. Kern.

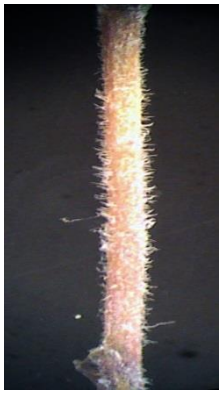
<u>Подсекция 1</u> – Isolepidis: Тимьян Палласа - Thymus Pallasianus H. Braun

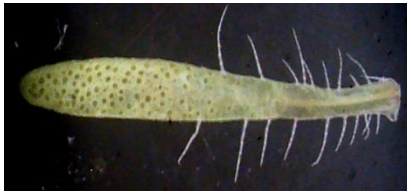
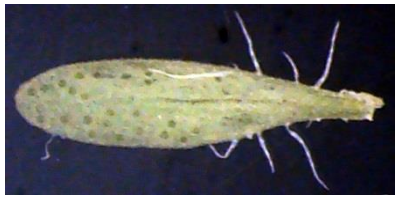
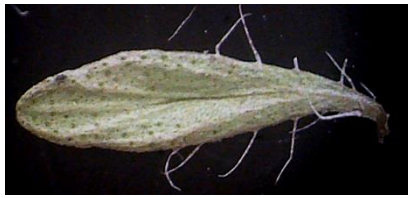
Рисунок 63 – Тимьян Палласа

При рассматривании стеблей под лупой или в стереомикроскоп видно, что они округло или неясно четырехгранные, опушены под соцветием со всех сторон короткими, вниз прижатыми волосками. Листья сидячие, линейные или линейно-лопатчатые, голые, со слабо заметными жилками до 12 мм длиной. По всей поверхности листа встречаются в большом количестве желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки). По краю от основания до середины или немного выше листья реснитчатые. Цветки мелкие, одиночные или собранные по несколько штук в полумутовки, образующие компактное головчатое соцветие. Чашечка узко-колокольчатая, голая, длиной 3,5-4 мм, зубчики верхней губы чашечки остро треугольные, по пленчатому краю без ресничек, реже с мелкими щетинками или голые. Венчик с короткой трубкой, около 7 мм длиной (таблица 27). Цвет листьев – зеленый, чашечки – лиловый, венчика ярко-розовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Таблица 27 - Сравнительная характеристика морфологических признаков растений рода тимьян секции Camptodromi A.Kern.

Диагностические признаки	Подсекция 1 Jsolepides		Подсекция 2 Serpylla
	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий
Поперечное сечение стебля	Округло- или неясно четырехгранный	Цилиндрический или неясно четырехгранный	Цилиндрический или неясно четырехгранный
Характер опушения стебля Верхняя часть	Опушен в верхней части со всех сторон короткими, прижатыми к стеблю волосками; в средней и нижней короткими волосками, перпендикулярно расположенными к стеблю 	Опушен со всех сторон в верхней и средней частях короткими волосками перпендикулярно расположенными к стеблю; в нижней части редкими, перпендикулярно расположенными волосками к стеблю 	Опушен во всех частях со всех сторон волосками, перпендикулярно расположенными к стеблю

Средняя часть Нижняя часть	 	 	
Форма листьев	Линейные или линейно-лопатчатые, плоские	Ланцетные или продолговато-эллиптические	Линейные или узкоэллиптические
Наличие черешка	Черешок отсутствует (листья сидячие)	Имеется короткий черешок	Листья сидячие или имеется очень короткий черешок

Опушение листьев	Голые, по краю реснитчатые до середины или немного выше 	Голые, до середины или у основания с ресничками по краю 	До середины или в нижней трети реснитчатые по краю 
Соцветие	Головчатое, компактное	Головчатое, компактное	Головчатое
Направление роста волосков на цветоножке	Вниз направленные	Перпендикулярны цветоножке или слегка вверх направленные	Перпендикулярны цветоножке или слегка вниз направленные

Форма чашечки	Узко-колокольчатая	Трубчато-колокольчатая	Узко-колокольчатая
Цвет чашечки	Лиловый	Лиловый	Лиловый
Опушение чашечки	Опушена	Голая	Густо опушена
Характеристика зубцов верхней губы чашечки	Остротреугольные, почти одинаковые	Треугольные, туповатые	Три зубца мелкие (средний более крупный), остротреугольные, отогнутые
Опушение верхних зубцов чашечки	По пленчатому краю без ресничек, реже с мелкими щетинками или голые	По краю голые, редко с щетинками, но всегда без ресничек	По краям реснитчатые
Цвет венчика	Ярко розовый	Ярко лиловый	Розово-фиолетовый, ярко-розовый, редко белый

Тимьян меловой - Thymus cretaceous Klok. et Shost.

Рисунок 64 – Тимьян меловой

Стебли цилиндрические или неясно четырехгранные, опушены под соцветием со всех сторон перпендикулярными или слегка вверх направленными волосками. Листья черешковые, ланцетные или продолговато-эллиптические, голые, со слабо заметными жилками, 5-10 мм длиной. Желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки) многочисленные располагаются по всей поверхности листовой пластинки. По краю до середины или у основания листья реснитчатые. Цветки мелкие, одиночные или собраны по несколько штук в полумутовки, образующие компактное головчатое соцветие. Чашечка трубчато-колокольчатая, длиной 3-4 мм, голая. Зубчики верхней губы чашечки треугольные, туповатые, по краю редко с щетинками, голые, но всегда без ресничек. Венчик около 7 мм длиной, с короткой трубкой (таблица 27). Цвет листьев зеленый, чашечки - лиловый, венчика - ярко-лиловый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

<u>Подсекция 2 –</u> Serpylla: Тимьян ползучий - Thymus serpyllum L.

Стебли цилиндрические или неясно четырехгранные, опушены под соцветием волосками, расположенными перпендикулярно цветоножке, или слегка вниз направленными. Листья сидячие или короткочерешковые, эллиптические или продолговато- эллиптические, голые, с хорошо заметными жилками, длиной 6-10 мм. По всей поверхности листа располагаются малозаметные точечные эфиромасличные железки.

Рисунок 65 – Тимьян ползучий

Листья по краю до середины или в нижней трети реснитчатые. Цветки мелкие, собраны в полумутовки по нескольку штук образующие головчатое соцветие или одиночные. Чашечка узко-колокольчатая, густо опушенная, 4-4,5 мм длиной. Три зубца верхней губы чашечки мелкие (средний более крупный), остроугольные, отогнутые, по краям реснитчатые. Венчик длиной 5-8 мм (таблица 27). Цвет листьев зеленый, чашечки - красновато-коричневый, венчика - розовато-фиолетовый, ярко-розовый, редко белый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Морфологическая характеристика растений рода тимьян

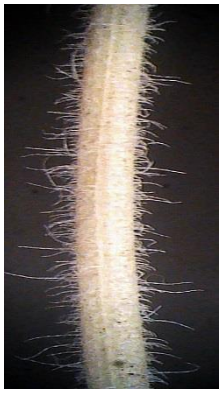
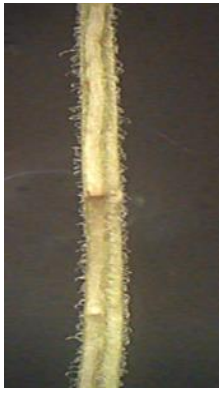
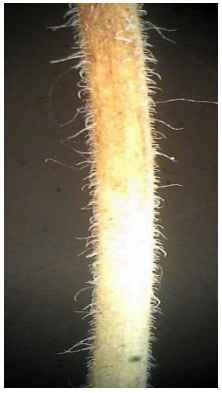
Секции Marginati A. Kern.

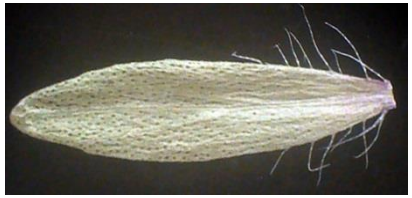
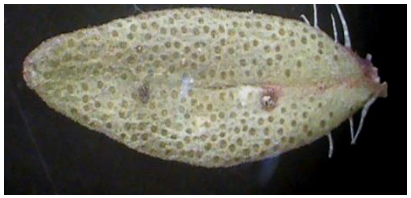
<u>Подсекция 1</u> – Marginate: Тимьян блошиный - Thymus pulegioides L.

Рисунок 66 – Тимьян блошиный

Таблица 28 - Сравнительная характеристика морфологических признаков растений рода тимьян секции Marginati A. Kern.

Диагностические признаки	Подсекция 1 Marginate	Подсекция 2 Verticillati		
	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий (т.Маршалла + т.меловой)	Тимьян Черняева (т.Маршалла + т.Палласа)
Поперечное сечение стебля	Четырехгранный	Округло- или неясно четырехгранный	Округло- или неясно четырехгранный	Округло- или неясно четырехгранный
Характер опушения стебля	Опушен по ребрам в верхней части вниз прижатыми длинными волосками; в средней и нижней частях короткими волосками, перпендикулярно расположенными или слегка вниз направленными, грани голые	Опушен в верхней части длинными перпендикулярно стоящими волосками, в средней длинными вниз направленными волосками, в нижней части с коротким, вниз отогнутым опушением	В верхней части густо опушен оттопыренными длинными волосками, ниже опушен короткими густыми, вниз прижатыми волосками	В верхней и средней частях густо опушен оттопыренными волосками, в нижней части волоски редкие, оттопыренные

Верхняя часть				
Средняя часть				

Нижняя часть				
Форма листьев	Яйцевидные или широкоэллиптические	Ланцетные или линейно-ланцетные	Ланцетные или продолговато-эллиптические	Ланцетные, продолговатые
Наличие черешка	Имеется хорошо выраженный черешок	Почти сидячие	Почти сидячие	Почти сидячие
Опушение листьев	Голые, по краю реснитчатые при основании	Голые или негусто волосистые, по краю лишь у основания с редкими ресничками 	Голые, реснитчатые у основания 	Голые, реснитчатые по краю в нижней трети или до середины

Соцветие	Головчатое или вытянутое, с 2-7 раздвинутыми ложными мутовками или прерванное	Прерывистое, удлиненное с 3-7 расставленными мутовками	Удлиненно-головчатое или прерывистое, коротко-волосистое	Удлиненно-головчатое или прерывистое
Направление волосков на цветоножке	Вниз направленные	Перпендикулярно цветоножке или вниз	Перпендикулярно цветоножке	Перпендикулярно цветоножке или слегка вниз
Форма чашечки	Широкая колокольчатая	Колокольчатая	Трубчато-колокольчатая	Колокольчатая
Цвет чашечки	Пурпуровый	Светло-зеленый, зубцы темно-зеленые, иногда пурпуровые	Лиловый, зубцы пурпуровые	От лиловой до пурпуровой

Опушение чашечки	Опушена	Опушена	Опушена	Опушена
Характеристика зубцов верхней губы чашечки	Остротреугольные	Остротреугольные	Ланцетные, острые	Треугольно-ланцетные, острые
Опушение верхних зубцов чашечки	По краям реснитчатые	Длиннореснитчатые по краю	Длиннореснитчатые по краю	Длиннореснитчатые по краю
Цвет венчика	Лиловый	Бледно-лиловый или светло-розовый	Розово-лиловый	Лиловый

Стебли четырехгранные, опушены только по ребрам, грани голые, под соцветием опушены вниз стоящими волосками. Листья короткочерешковые, яйцевидные или широкоэллиптические, голые с малозаметными железками, при основании по краю слегка реснитчатые, длиной 15-22 мм. Соцветие чаще головчатое, вытягивающееся к концу цветения, с 2-7 раздвинутыми сложными мутовками или прерванное. Чашечка широко-колокольчатая, опушенная, длиной 3-3,5 мм. Зубчики верхней губы чашечки остроугольные, по краям реснитчатые. Венчик с удлиненной трубкой, 4-6 мм длиной, снаружи почти голый (таблица 28). Цвет листьев зеленый, чашечки - пурпуровый, венчика – лиловый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

<u>Подсекция 2</u> - Vertici Mati: Тимьян Маршалла - Thymus Marshallianus Willd.

Рисунок 67 – Тимьян Маршалла

Стебли округло- или неясно четырехгранные, под соцветием опущены длинными перпендикулярно отстоящими волосками или слегка вниз направленными, в нижней части с коротким вниз отогнутым опушением. Листья от ланцетных до линейно-ланцетных, почти сидячие 15-24 мм длиной, по поверхности голые или негусто волосистые со слабо заметными боковыми жилками; по краю лишь у основания с редкими ресничками. По

поверхности листа располагаются малозаметные точечные эфиромасличные железки. Соцветия удлиненные и прерванные с 3-7 расставленными мутовками. Чашечка колокольчатая, длиной 2,25-2,75 мм, опушенная. Зубчики верхней губы чашечки остроугольные, длиннореснитчатые по краю. Венчик воронковидный. Длиной 5 мм, с мало заметной трубкой (таблица 28). Цвет листьев светло-зеленый, чашечки – светло-зеленый, зубцы темно-зеленые, иногда пурпуровые, венчика - бледно-лиловый или светло-розовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Тимьян двуликий - Thymus dimorphus Klok. et Shost.

Рисунок 68 – Тимьян двуликий

Стебли округло- или неясно четырехгранные, под соцветием опушены перпендикулярно отстоящими волосками, ниже - короткими густыми, прижатыми вниз волосками. Листья от ланцетных до продолговато-эллиптических, почти сидячие, длиной 7-17 мм, по поверхности голые, по краю реснитчатые у основания. По поверхности листья располагаются крупные, хорошо заметные, редкие эфиромасличные железки. Соцветие удлиненно-головчатое или прерывистое, коротко волосистое. Чашечка трубчато-колокольчатая, длиной 3,5-4,5 мм, опушенная. Зубчики верхней губы чашечки ланцетные, острые, длиннореснитчатые по краю. Венчик с узкой трубкой, 5-7 мм длины (таблица 28). Цвет листьев темно-зеленый, чашечки - лиловый, венчика розово-лиловый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Тимьян Черняева - Thymus Czhernjajevii Klok. et Shost.

Рисунок 69 – Тимьян Черняева

Стебли округло- или неясно четырехгранные, под соцветием до основания густо опушены волосками, направленными перпендикулярно или слегка вниз. Листья почти сидячие, ланцетные или продолговатые, длиной 10-14 мм, кожистые, по поверхности голые, реснитчатые по краю в нижней трети или до середины. По поверхности листа располагаются точечные эфиромасличные железки. Цветки в полумутовках, собраны в удлиненно-головчатое или прерывистое соцветие. Чашечка колокольчатая, с короткой трубкой, длиной 2,20-2,70 мм. Зубчики чашечки верхней ее губы треугольно-ланцетные, острые, длиннореснитчатые по краю. Венчик 5,0 мм длины (таблица 28). Цвет листьев зеленый, чашечки – от лиловой до пурпуровой, венчика лиловый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Таким образом, анализ морфологических признаков растений рода тимьян флоры средней полосы России показал, что несмотря на то, что изучаемые виды относятся к различным подсекциям, они имеют как общие морфологические признаки, так и отличительные. Морфологическими признаками, имеющими значение для диагностики их сырья являются: для стебля – поперечное сечение стебля, характер опущения стебля; для листа – форма листьев, наличие черешка, опушение листьев; для соцветий – форма соцветия, направление роста волосков на цветоножке; для чашечки: форма

чашечки, цвет, опушение, характер зубцов верхней губы чашечки и их опушение; для венчика – цвет венчика.

4.2 Изучение микродиагностических признаков сырья

Изучение микродиагностических признаков сырья проводили на временных микропрепаратах, приготовленных по методике, включенной в XI – издание государственной фармакопеи с последующей микрофотосъемкой [83].

Микродиагностическая характеристика травы тимьяна ползучего согласно ФС «Чабреца трава»

Цельное, измельченное сырье. При рассмотрении листа с поверхности видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми боковыми стенками; на верхнем эпидермисе и по краю листа иногда заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение клеточных стенок. Устьица имеются на обеих сторонах листа, на нижней стороне их значительно больше; устьица сопровождаются двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфиромасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположенные у основания листа («щетинистые волоски»); выше по краю листа встречаются более мелкие простые двух-, трехклеточные волоски с бородавчатой поверхностью; головчатые волоски очень мелкие с одноклеточной овальной головкой на одноклеточной короткой ножке, встречаются по всей поверхности листа; сосочковидные выросты

эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне и по краю листа.

Клетки эпидермиса стебля прямоугольные, удлиненные, с прямыми или со скошенными концами, с четковидным утолщением клеточных стенок; устьица диацитного типа, расположены в основном по ребрам. Эпидермис опушен простыми, коленчатоизогнутыми двух-, пятиклеточными волосками с бородавчатой кутикулой, головчатыми волосками на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой, реже встречаются сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой кутикулой или слегка бородавчатой; встречаются эфирномасличные железки, включающие в себя 8 выделительных клеток, расположенных радиально.

На эпидермисе черешка располагаются сосочковидные выросты с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой и многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой. Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски трех типов: простые, двух-, пятиклеточные с бородавчатой кутикулой, сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой, головчатые на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой. Эпидермис трубки венчика прямостенный, с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами. В зеве и отгибе венчика эпидермис извилистостенный, с сосочковидными выростами, опушен разнообразными волосками: простыми двух-, четырех-, реже пятиклеточные с бородавчатой кутикулой и головчатыми волосками двух типов: на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой, на двухклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой. На эпидермисе листочков чашечки и венчика встречаются крупные эфирномасличные железки иногда с желто-бурым содержимым, состоящие из радиально расположенных восьми выделительных клеток; в местах

прикрепления эфиромасличных железок клетки эпидермиса образуют розетку (рисунок 70) [49].

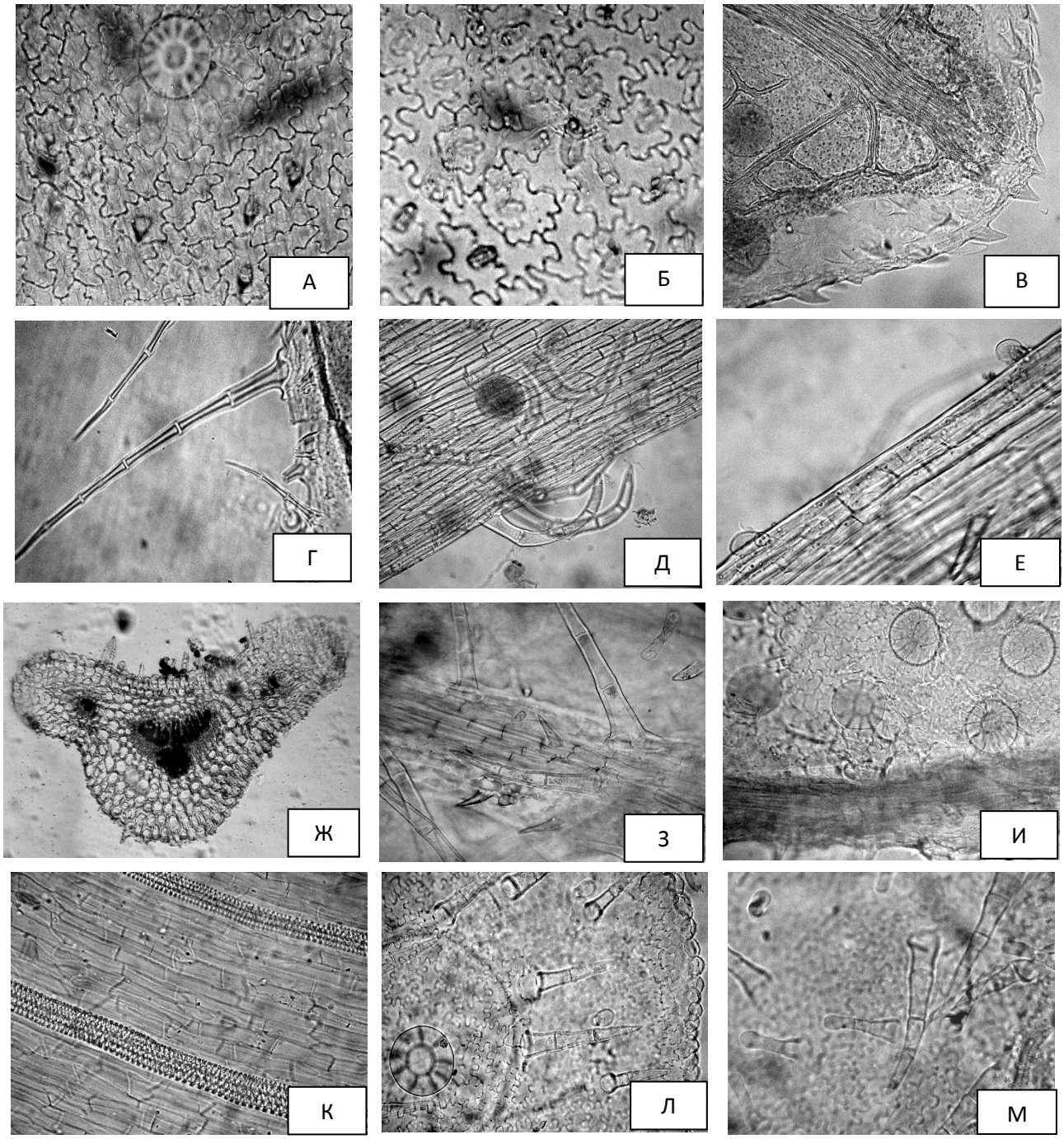


Рисунок 70 - Чабреца трава

А - фрагмент верхнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами, увел. 300×, Б - фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым волоском, устьичным комплексом диацитного типа, увел. 300×, В- фрагмент края листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами, увел. 300×, Г- фрагмент края листа с многоклеточными бородавчатыми и трехклеточными волосками, увел. 300×, Д - фрагмент эпидермиса по стеблю с эфирномасличными железками (вид сверху), многоклеточными простыми волосками, увел. 300×, Е - фрагмент эпидермиса по стеблю с головчатыми волосками, увел. 300×, Ж - поперечный срез черешка листа, увел. 120×, З - фрагмент эпидермиса чашечки с многоклеточными простыми и головчатыми волосками, с сосочковидными выростами, увел. 300×, И – фрагмент эпидермиса чашечки с эфирномасличными железками (вид сверху), увел. 300×, К - фрагмент эпидермиса трубки венчика, увел. 300×, Л - фрагмент эпидермиса отгиба венчика с сосочковидными выростами, головчатыми и простыми многоклеточными волосками, эфирномасличными железками (вид сверху), увел. 300×, М - фрагмент эпидермиса венчика с простыми многоклеточными и головчатыми волосками на двухклеточной ножке, увел. 300×.

Порошок. При рассмотрении препаратов листа видны клетки эпидермиса с извилистыми и иногда четковидно утолщенными боковыми стенками; устьица с двумя околоустьичными клетками, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфиромасличные железки округлые состоят из 8-ми радиально расположенных выделительных клеток, в местах их прикрепления, как правило, клетки эпидермиса образуют розетку. Простые волоски 3-х типов: бородавчатые многоклеточные очень крупные («щетинистые») волоски или их обломки; более мелкие двух-, трехклеточные волоски с бородавчатой поверхностью, часто слегка согнутые в местах сочленения; сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой поверхностью или слегка бородавчатой. Головчатые волоски на одноклеточной короткой ножке с одноклеточной овальной головкой. На обрывках стеблей и частях цветков видны точно такие же трихомы, как и на листьях, за исключением «щетинистых волосков»: на цветках многоклеточные простые волоски имеют более тонкие оболочки и покрыты нежно-бородавчатой кутикулой; волоски головчатые 2-х типов: на одноклеточной или на двуклеточной ножке с одноклеточной головкой [49].

Анатомическая характеристика растений рода тимьян секции Camptodromi A. Kern.

Подсекция 1 – Isolepidis: Тимьян Палласа

Стебель: Округло-четырехгранный стебель в поперечном сечении непучкового типа строения (рисунок 71). Покровная ткань в верхней части стебля эпидермис, а ближе к середине и до основания начинает формироваться перидерма (рисунок 71). В поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и покрыт крупнозубчатой кутикулой формирующей толстый слой (рисунки 72,73). Округло-прямоугольные клетки образуют эпидермис в межреберье, иногда их стенки слегка извилистые или многоугольные. Продольно-удлиненные четковидно утолщенные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их

концы скошены. (рисунок 72). Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата (рисунок 73). По эпидермису встречаются 4 типа волосков:

- простые одноклеточные колпачковидной формы, с бородавчатой толстостенной кутикулой, у основания таких волосков образуется цистолит; иногда они прижатые к поверхности (рисунок 74). Такой тип волосков встречается в основном в межреберье по эпидермису стебля;
- простые одно-трехклеточными с бородавчатой кутикулой толстостенные (рисунок 72);
- простые двух - пятиклеточные волоски со слегка бородавчатой поверхностью, клетки которых заполнены содержимым (рисунок 75);
- головчатые волоски на одноклеточной ножке с пузеревидной головкой, заполненной содержимым (рисунок 76).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 11-15 клетками эпидермиса. Данный тип железок встречается у представителей семейства губоцветные.

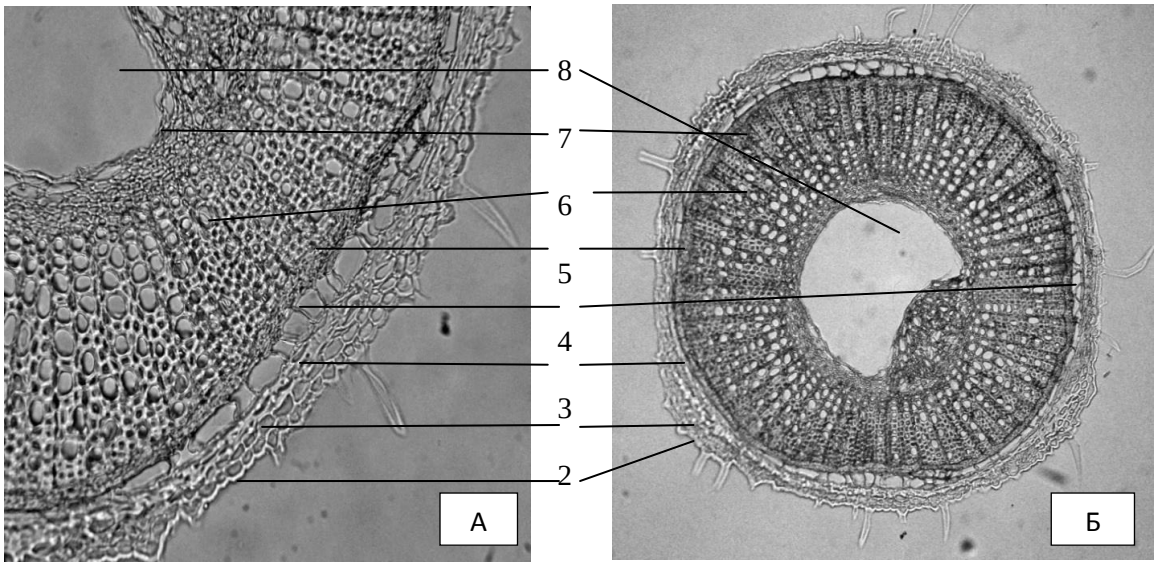


Рисунок 71 - Фрагмент поперечного среза стебля тимьяна Палласа, А – увел. 200х, Б – увел. 80х. 1 – эпидермис; 2 – колленхима; 3 – паренхима коры; 4 – эндодерма; 5 – флоэма; 6 – ксилема; 7 – паренхима сердцевины; 8 – полость

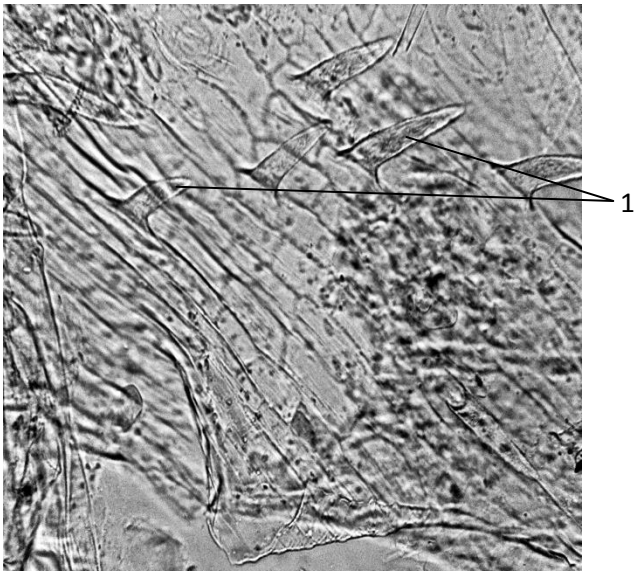


Рисунок 72 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Палласа вдоль ребра, увел.200х.
1 – простой одноклеточный толстостенный волосок с бородавчатой кутикулой

Рисунок 73 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Палласа, увел.200х.
1 – устьице диацитного типа

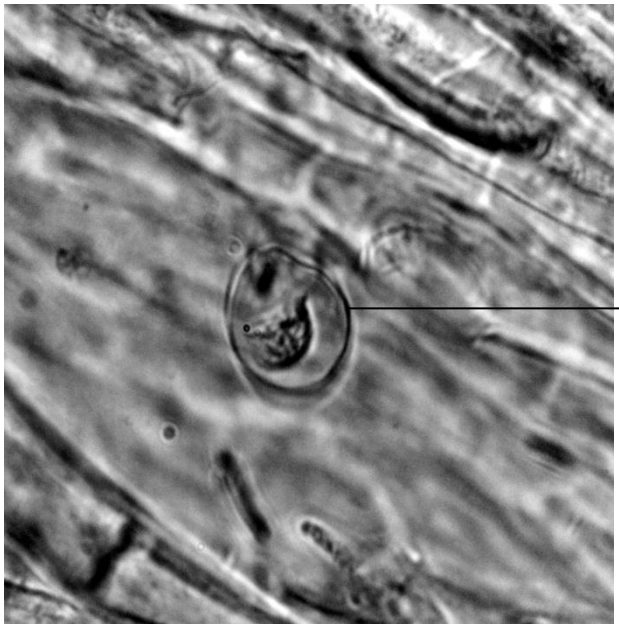


Рисунок 74 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Палласа, увел.200х.
1 - простой одноклеточный колпачковидной формы волосок, с бородавчатой кутикулой, толстостенный, у основания с цистолитом

Рисунок 75 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Палласа, увел.200х.
1 – простой пятиклеточный волосок со слегка бородавчатой поверхностью, клетки которого заполнены содержимым

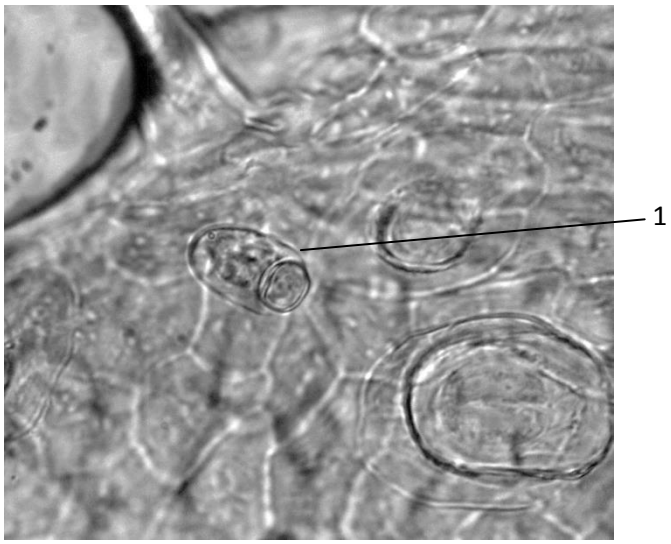


Рисунок 76 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Палласа, увел.200х.
1 - головчатый волосок на одноклеточной ножке с пузеревидной головкой, заполненной содержимым

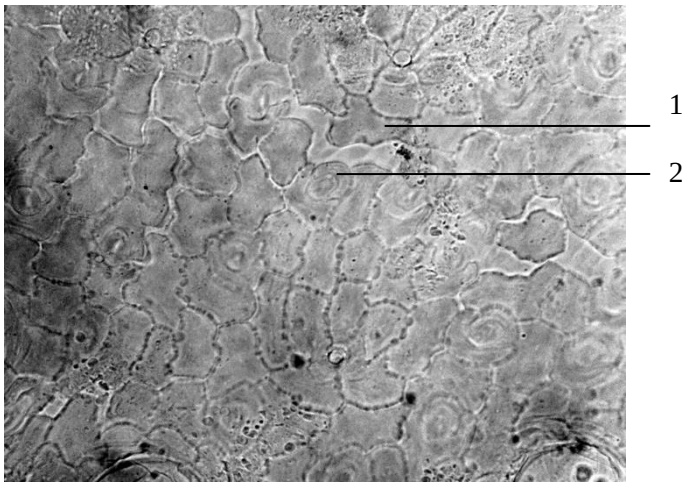


Рисунок 77 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна Палласа, увел.200х.
1 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением, 2 – устьица

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 2-3 слоя залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра (рисунок 71).

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 71).

Лист: Верхний эпидермис листа образован слегка извилистыми клетками или прямостенными с четковидным утолщением. Эпидермис с

нижней стороны листа извилистостенный, с продольной складчатостью кутикулы и с четковидным утолщением клеток. Устьица диацидного типа преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунок 78).

Удлинено прямоугольные клетки эпидермиса образуют край листа в его основания. Продольно удлиненные клетки характерны для жилки листа (рисунки 79,80).

Эпидермис листа опушен волосками различного типа:

- одноклеточными простыми с бородавчатой кутикулой волосками, верхушка которых слегка заостренная, как правило они располагаются под углом к самой поверхности листа (рисунок 82) (встречаются по краю листа);
- простыми трех-семиклеточные волосками, клетки которых сильно утолщены (щетинистые) (рисунок 83) (встречаются по краю листа ближе к его основанию);
- головчатами волосками, которые одноклеточной ножкой и пузыревидной одноклеточной головкой (рисунок 84) (встречаются с обеих сторон листа, по всей поверхности).

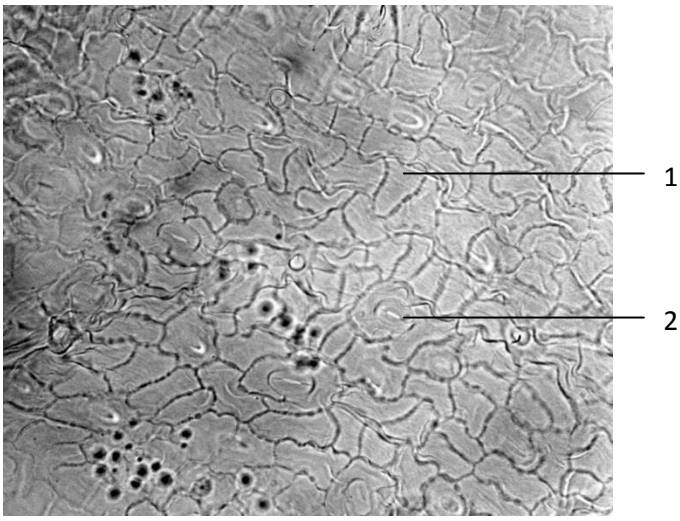


Рисунок 78 - Фрагмент эпидермиса с нижней стороны листа тимьяна Палласа, увел.200х
1 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением и продольной морщинистостью кутикулы, 2 – устьица

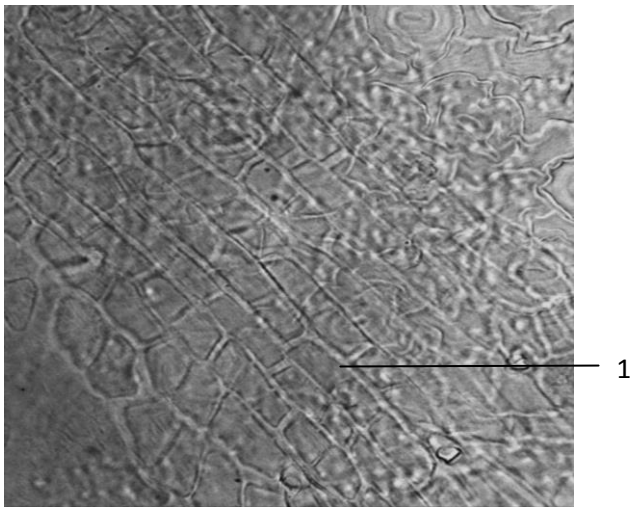


Рисунок 79 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Палласа вдоль жилки, увел.200х
1 – клетки эпидермиса

На обоих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 11-15 клетками, формирующие розетку (рисунок 81).

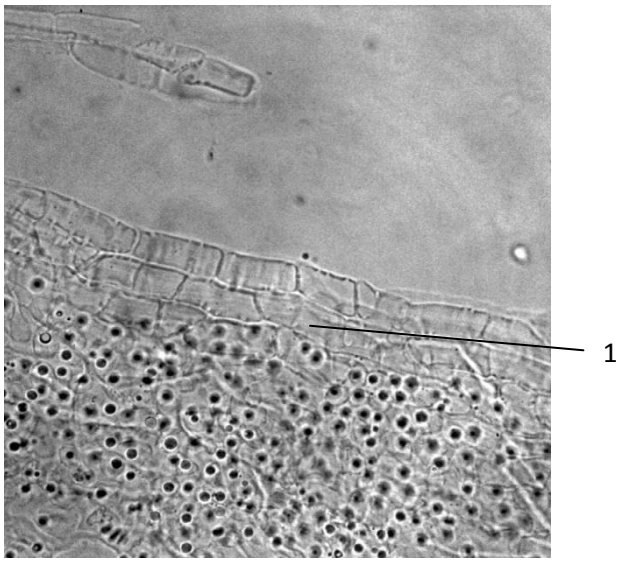


Рисунок 80 - Фрагмент эпидермиса по краю листа тимьяна Палласа, увел.200х
1 – клетки эпидермиса

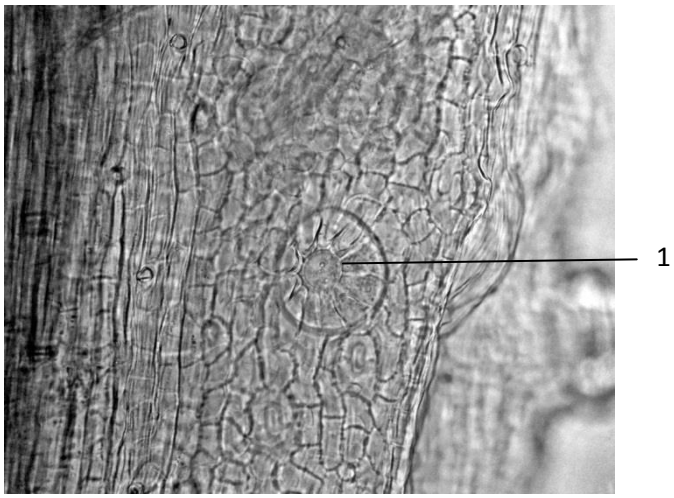


Рисунок 81 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Палласа, увел. 200х
1 – эфиромасличная железка

Венчик: Нижняя, как и верхняя губа покрыты сосочковидным эпидермисом (рисунок 85). Удлиненно прямоугольные эпидермальные клетки образуют трубку венчика, а извилистостенные - зев венчика.

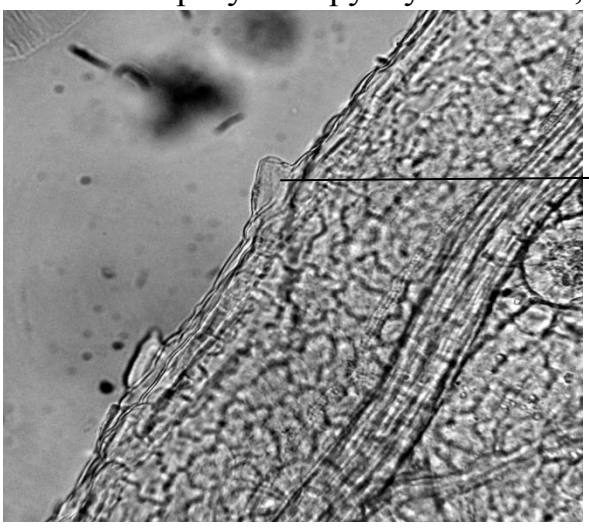


Рисунок 82 - Фрагмент эпидермиса по краю листа тимьяна Палласа, увел. 200х
1 - простой одноклеточный волосок с бородавчатой кутикулой, верхушка которого слегка заостренная

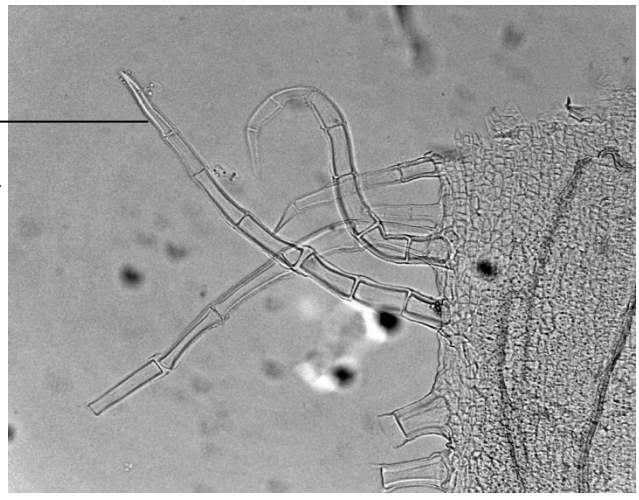


Рисунок 83 - Фрагмент эпидермиса по краю листа ближе к основанию тимьяна Палласа, увел.200х
1 - простой семиклеточный волосок с очень сильно утолщенными клеточными клетками (щетинистый)

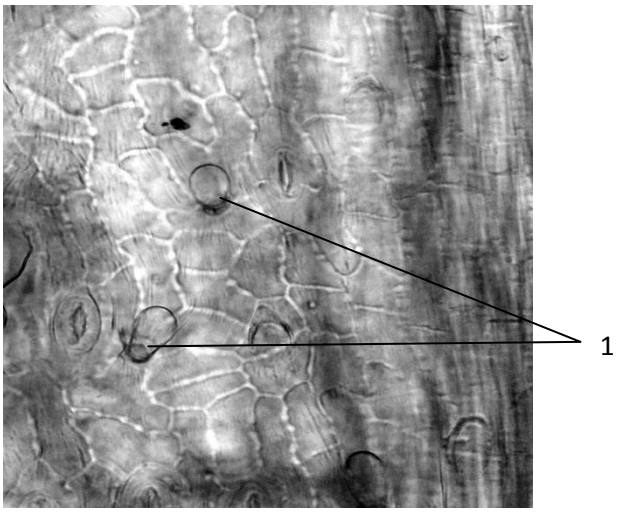


Рисунок 84 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Палласса, увел.200х
1 - головчатые волоски на одноклеточной ножке с пузыревидной одноклеточной головкой

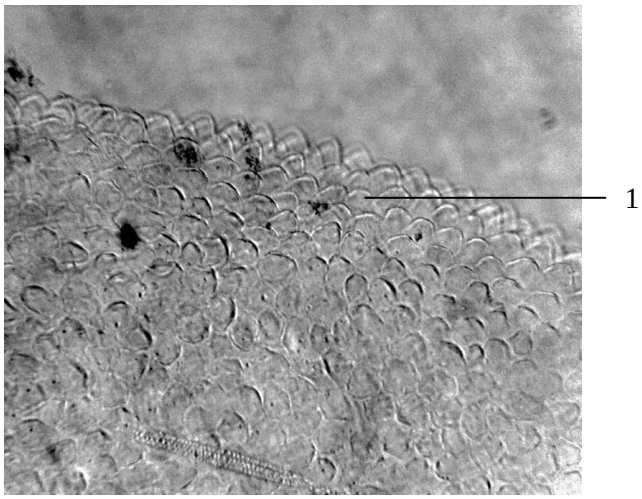


Рисунок 85 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна Палласса, увел.200х
1 – сосочковидный эпидермис

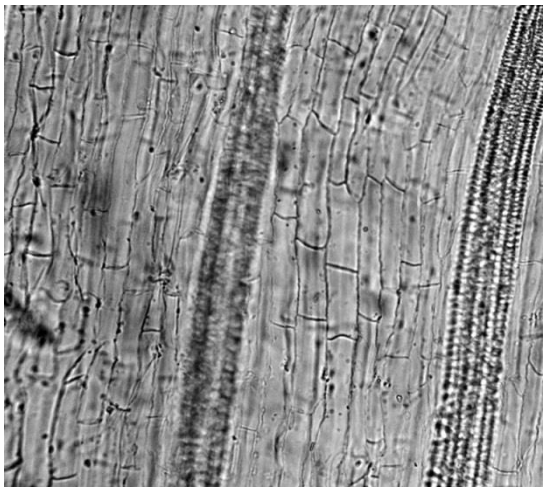


Рисунок 86 - Фрагмент эпидермиса в трубке венчика тимьяна Палласса, увел.200х.

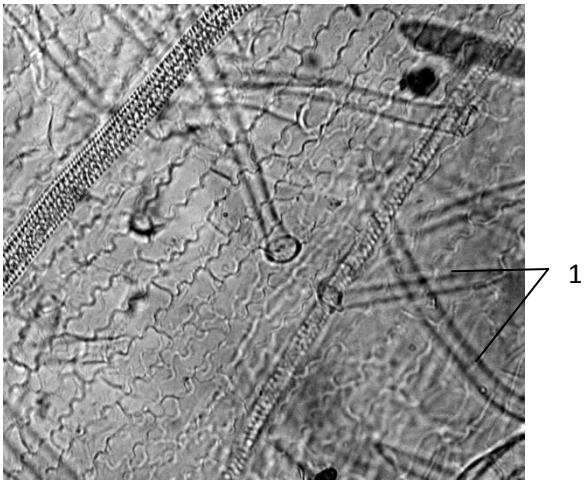


Рисунок 87 - Фрагмент эпидермиса в зеве венчика тимьяна Палласса, увел.200х. 1 – тонкостенные удлиненные многоклеточные волоски

Простые и головчатые волоски неравномерно встречаются на венчике, с преимущественным преобладанием на эпидермисе нижней губы.

Простые волоски трех типов:

- 1 - 2 клеточные бородавчатые, верхушка которых заостренная (рисунок 88);
- 2 – 5 клеточные бородавчатые, верхушка которых заостренная, базальная клетка расширенная (рисунок 89);

- 1 – 4 клеточные тонкостенные со спадающими стенками, в зеве венчика клетки этих волосков сильно удлиняются (в трубке и зеве венчика) (рисунки 89,90).

Головчатые волоски состоят из одноклеточной ножке, на которой располагается одноклеточная округлая или удлиненно-округлая головка (рисунок 89).

Многочисленные эфиромасличные железки, включают в себя восемь выделительных клеток (рисунок 91).

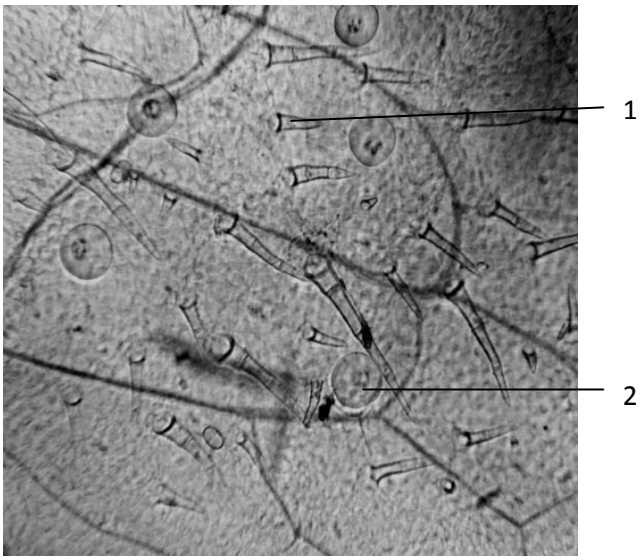


Рисунок 88 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – простой одноклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой, 2 – эфиромасличная железка

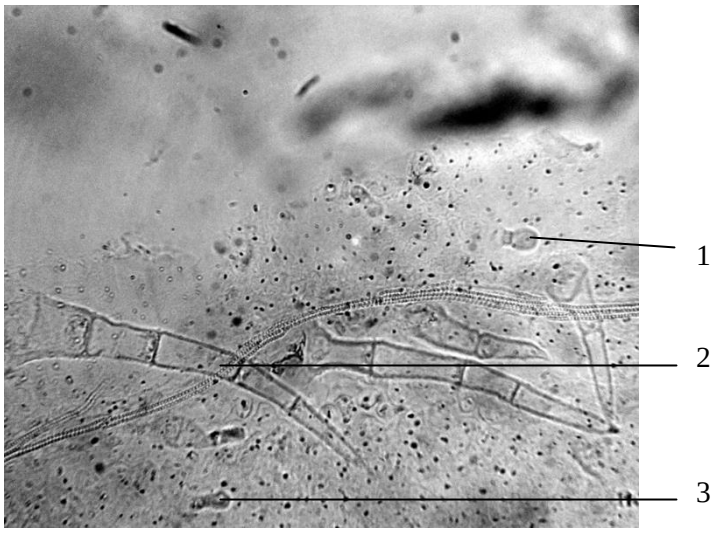


Рисунок 89 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой, 2 – простой слегка бородавчатый пятиклеточный волосок с заостренной верхушкой, 3 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с удлиненно-округлой одноклеточной головкой

Чашечка: Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образуют эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть, а менее извилистостенные - основание чашечки. Устьичный аппарат диацитного типа.

На эпидермисе чашечки встречаются эфиромасличные железки (рисунки 91,92,93).

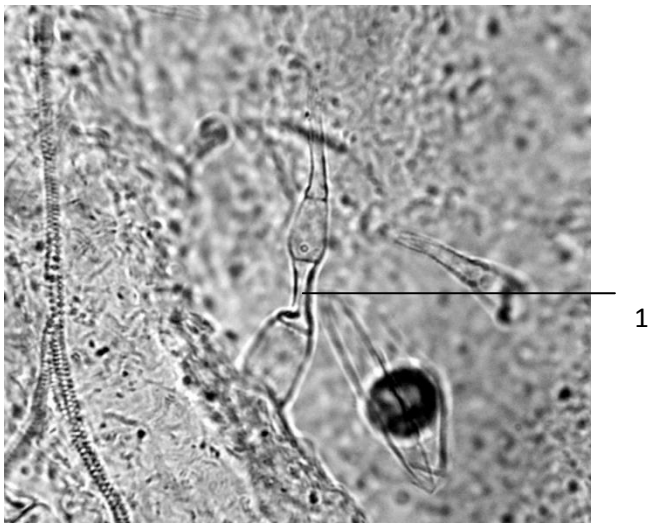


Рисунок 90 - Фрагмент эпидермиса в зеве венчика тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – простой тонкостенный волосок со спадающими стенками

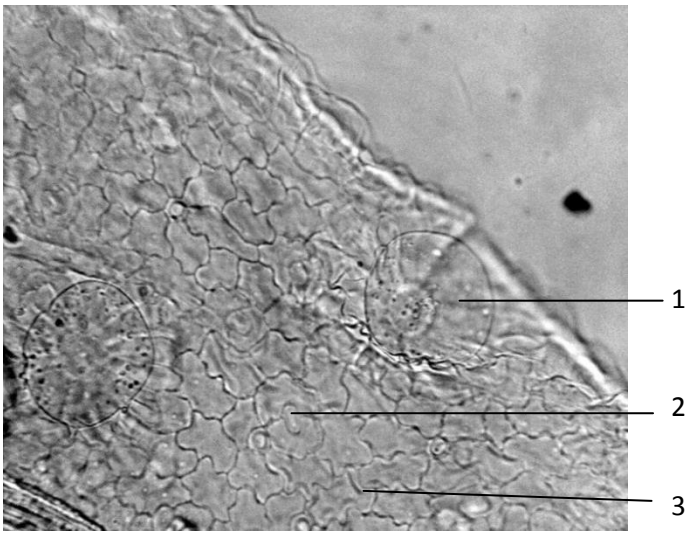


Рисунок 91 - Фрагмент эпидермиса зубцов чашечки тимьяна Палласа, увел.200х
1 – эфиромасличная железка, 2 – устьица диацитного типа, 3 - клетки эпидермиса

Простые многоклеточные остроконечные волоски со слегка морщинистой кутикулой и утолщенными стенками многочисленно встречаются в основании зубцов чашечки, вдоль жилки (рисунок 94).

Зубцы чашечки опушены простыми многоклеточными щетинистыми волоски, клетки которых сильно утолщены (рисунок 95). В зеве чашечки имеются толстостенные длинные многоклеточные бородавчатые волоски с тупой закругленной верхушкой (рисунок 96). В основании и по краю чашечки встречаются сосочковидные выросты клеток эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой.

Наряду с простыми волосками встречаются головчатые волоски, состоящие из одноклеточной ножке, на которой формируется пузыревидная одноклеточная головка (в основании чашечки) (рисунок 92) [44].

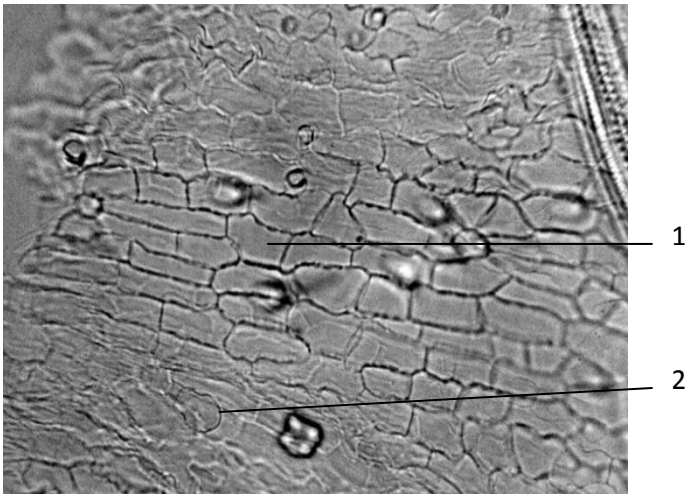


Рисунок 92 - Фрагмент эпидермиса основания чашечки тимьяна Палласа, увел.200х
1 – клетки эпидермиса, 2 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с одноклеточной пузыревидной головкой

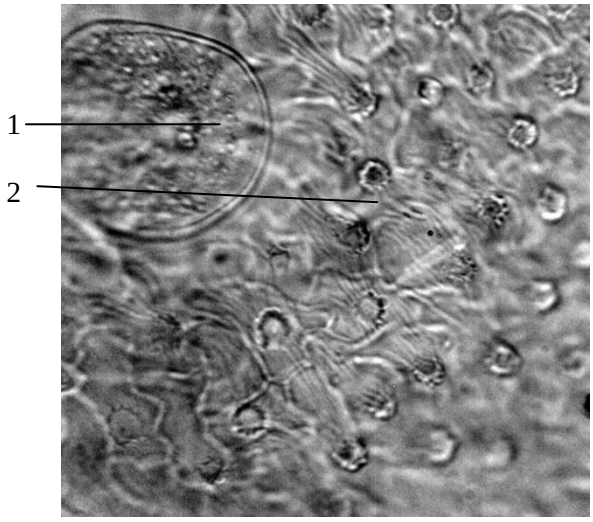


Рисунок 93 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – эфиромасличная железка, 2 – складчатость кутикулы

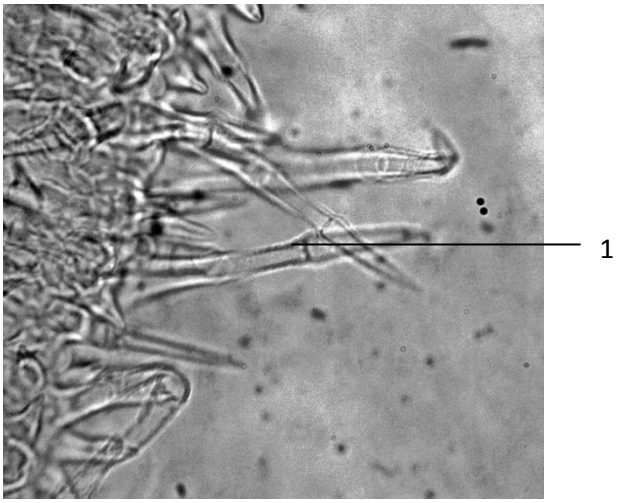


Рисунок 94 - Фрагмент эпидермиса в основании чашечки тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – простой многоклеточный остроконечный волосок со слегка морщинистой кутикулой и утолщенными стенками

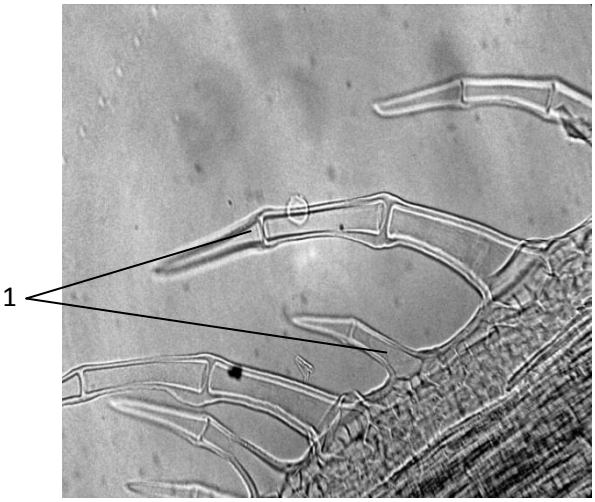


Рисунок 95 - Фрагмент края зубцов чашечки тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – простые многоклеточные щетинистые волоски, клетки которых сильно утолщены

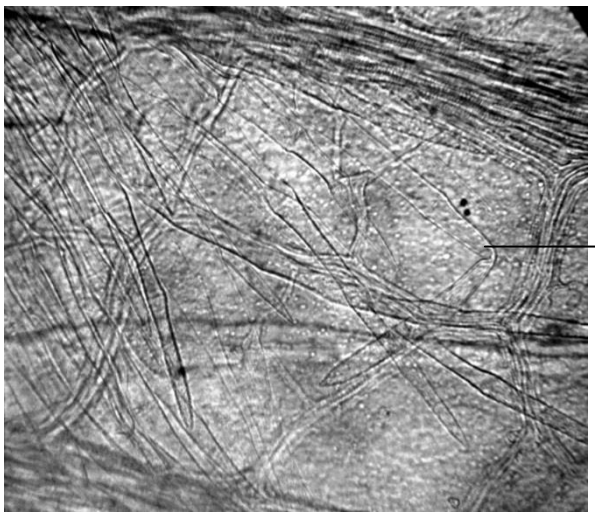


Рисунок 96 - Фрагмент эпидермиса в зеве чашечки тимьяна Палласа, увел.200х. 1 – многоклеточные длинные бородавчатый волосок, с тупой закругленной верхушкой

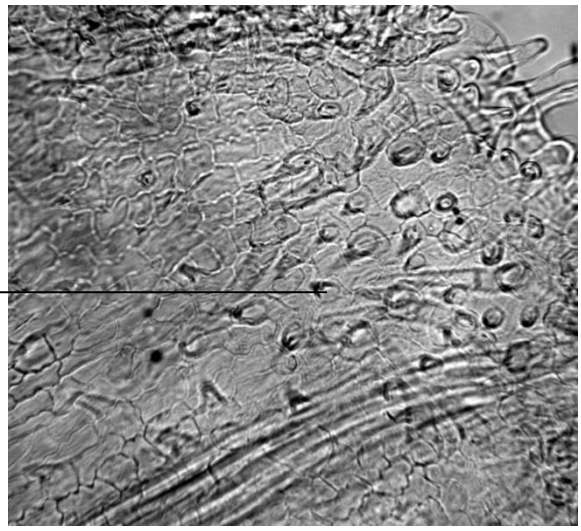


Рисунок 97 - Фрагмент эпидермиса в основании чашечки тимьяна Палласа, увел. 200х. 1 – простой одноклеточный волосок с заостренной верхушкой

Тимьян меловой

Стебель: Округло-четырехгранный стебель в поперечном сечении имеет непучковый тип строения (рисунок 98), покрытый эпидермисом. В поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и покрыт крупнозубчатой кутикулой, формирующей толстый слой. В межреберье, с поверхности, эпидермис обазован округло-прямоугольными или многоугольными клетками с продольной морщинистостью кутикулы и четковидным утолщением клеточной стенки (рисунок 99). Продольно-удлиненные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их концы скошены. (рисунок 100). Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата (рисунок 99). По эпидермису встречаются 3 типа волосков:

- простые толстостенные одноклеточные, с бородавчатой кутикулой (рисунок 101) (на эпиднрмисе в межреберье стебля)

- простые одно-трехклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато изогнутые, расположенные по всей поверхности стебля (рисунок 102);
- головчатые, состоящие из одноклеточной ножке на которой формируется одноклеточная округлая головка (рисунок 101).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя шесть-восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 8-12 клетками эпидермиса. Данный тип железок встречается у представителей семейства губоцветные.

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 2-3 слоя залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены, вытянуты по окружности и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра.

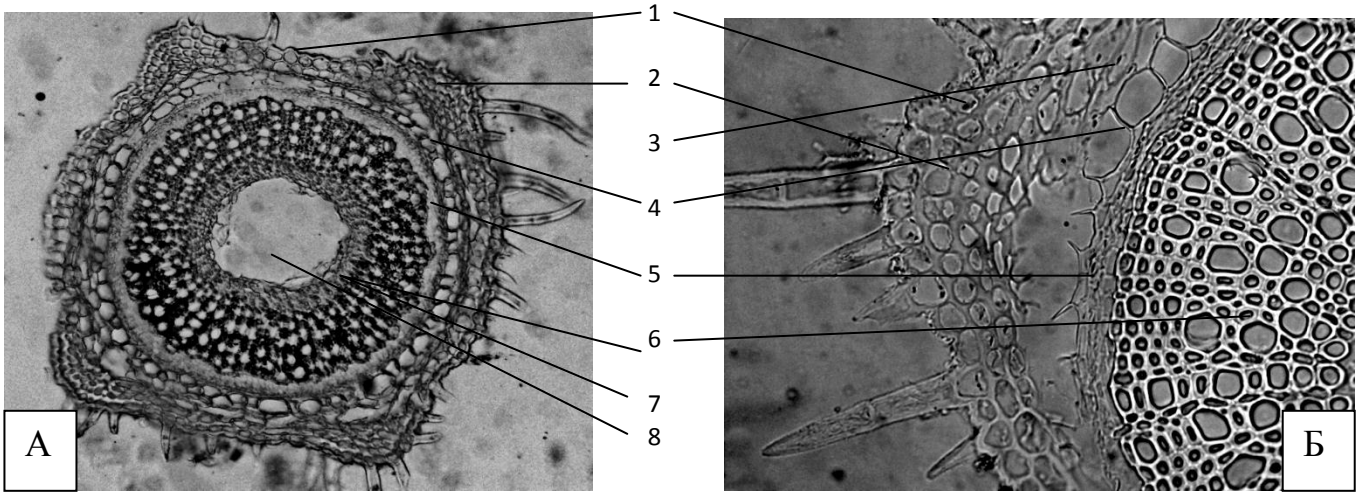


Рисунок 98 - Фрагмент поперечного среза стебля тимьяна мелового, А - увел. 80х, Б - увел. 200х. 1 – эпидермис; 2 – уголковая колленхима; 3 – основная паренхима; 4 – эндодерма; 5- флоэма; 6 – сосуды ксилемы; 7 – паренхима сердцевины; 8 – полость

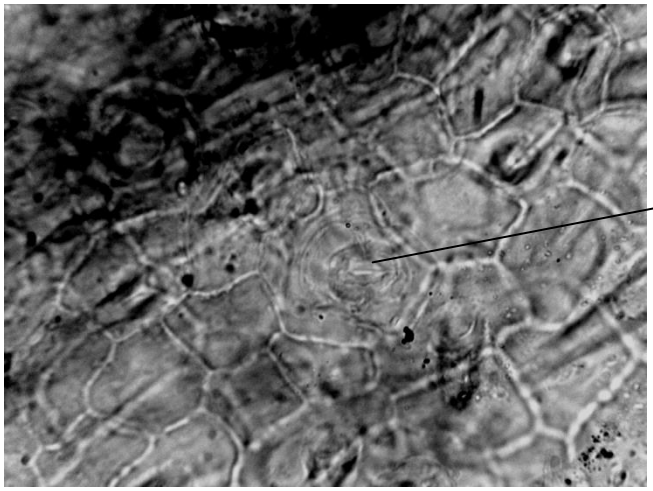


Рисунок 99 - Фрагмент эпидермиса стебля в межреберье тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – устьице диацитного типа

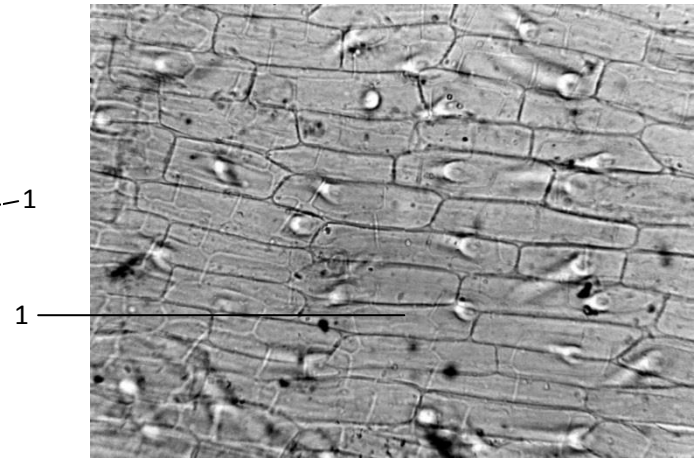


Рисунок 100 - Фрагмент эпидермиса стебля по ребрам тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – удлиненные в продольном направлении клетки, реже со скошенными концами

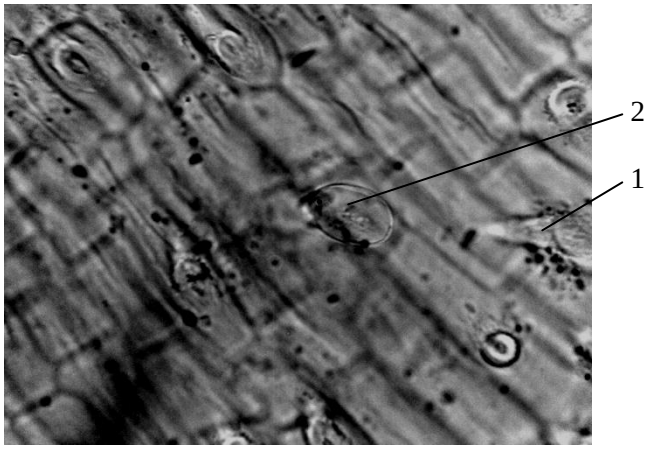


Рисунок 101- Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный толстостенный волосок со слегка бородавчатой кутикулой;
2 – головчатый волосок с округлой головкой и одноклеточной ножкой

Рисунок 102 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой двухклеточный, толстостенный волосок с бородавчатой кутикулой

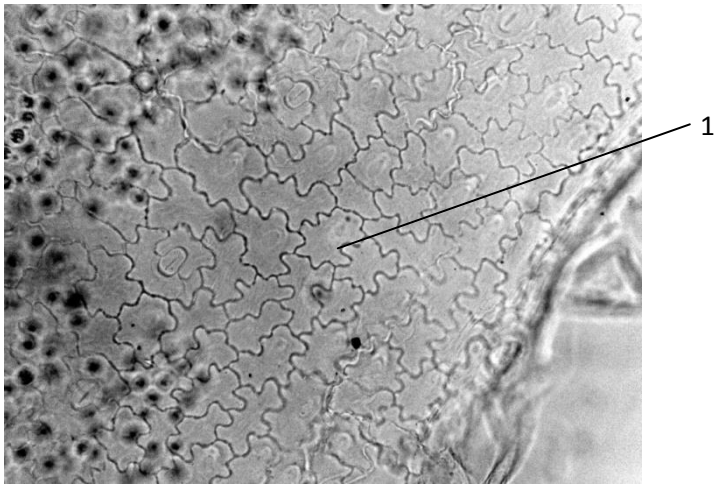


Рисунок 103 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки

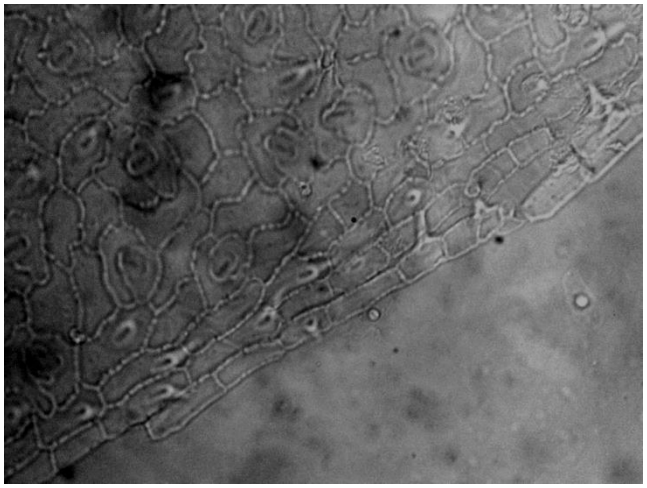


Рисунок 104 - Фрагмент эпидермиса по краю листа тимьяна мелового, увел. 200х.

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 98).

Лист: Верхний эпидермис листа образован извилистыми клетками (рисунок 103). Эпидермис с нижней стороны листа более извилистостенный, с продольной морщинистостью кутикулы (рисунок 105). Устьица диацидного типа преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунок 105).

Удлинено прямоугольные клетки эпидермиса образуют край листа в его основания (рисунок 104). Продольно удлиненные клетки характерны для жилки листа (рисунок 106).

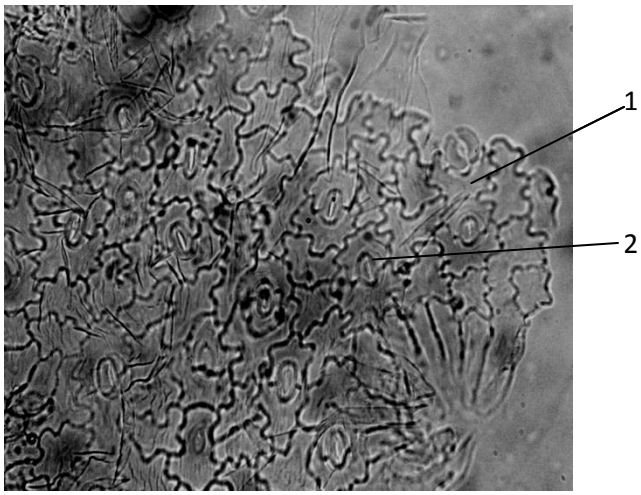


Рисунок 105 - Фрагмент нижнего эпидермиса листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки с продолговатой морщинистостью кутикулы;
2 – устьице диацитного типа

Рисунок 106 - Фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа тимьяна мелового, увел. 200х.

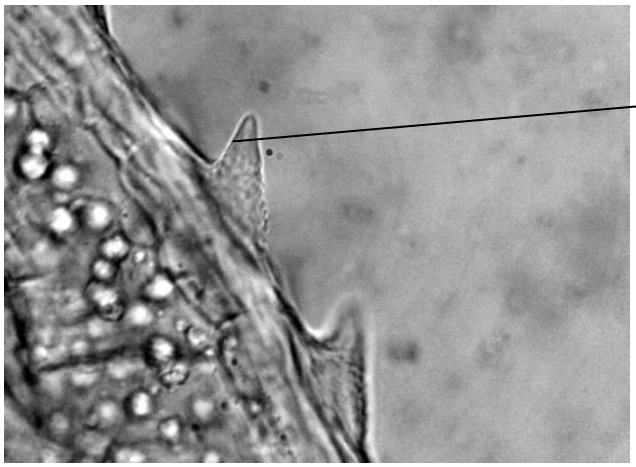


Рисунок 107 - Фрагмент эпидермиса по краю листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой одноклеточный волосок со слегка заостренной верхушкой и бородавчатой кутикулой

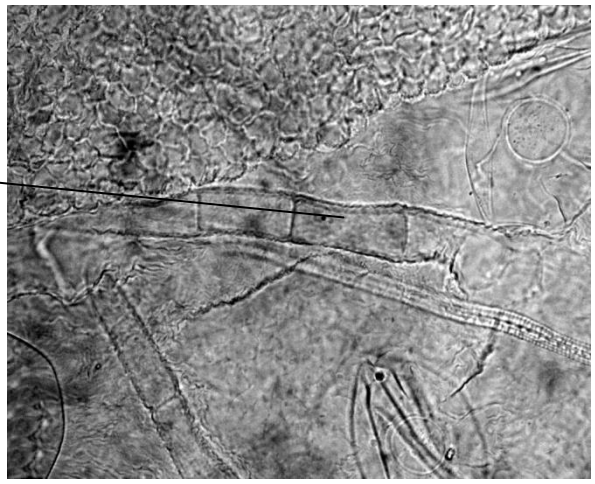


Рисунок 108 - Фрагмент эпидермиса основания листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой четырехклеточный толстостенный волосок с бахромчатой кутикулой

Эпидермис листа опушен волосками различного типа:

- простыми одно-двухклеточными колпачковидными бородавчатыми волосками с заостренной верхушкой и расширенным основанием (встречаются по поверхности эпидермиса листа) (рисунок 109);
- простыми волосками, покрытыми бородавчатой кутикулой, состоящими из одной клетки, верхушка которых слегка заострена. Данный тип волосков прикрепляется к поверхности листа под углом (характерны для края листа) (рисунок 107);
- простыми трех-восьмиклеточными толстостенными волосками с бахромчатой кутикулой (встречаются ближе к основанию листа) (рисунок 108).

На обеих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 8-14 клетками, формирующие розетку (рисунок 110).

Венчик: Эпидермис верхней и нижней губы венчика извилистостенный с сосочковидными выростами (рисунок 111). Удлиненно прямоугольные эпидермальные слегка извилистые клетки образуют трубку венчика (рисунок 112).

Эпидермис венчика опушен волосками различного типа строения. Простые волоски четырех типов: одноклеточные толстостенные со слегка заостренной или тупой верхушкой (встречаются по эпидермису верхней и нижней губы венчика) (рисунок 115); двух-четырехклеточные толстостенные бородавчатые с заостренной верхушкой (рисунок 115); двух-трехклеточные толстостенные бородавчатые с тупой верхушкой (изредка встречаются по эпидермису нижней губы венчика) (рисунок 113); двух-трехклеточные толстостенные со спадающими стенками (встречаются в трубке венчика) (рисунок 114).

Наряду с простыми волосками изредка встречаются головчатые волоски на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой (рисунок 113).

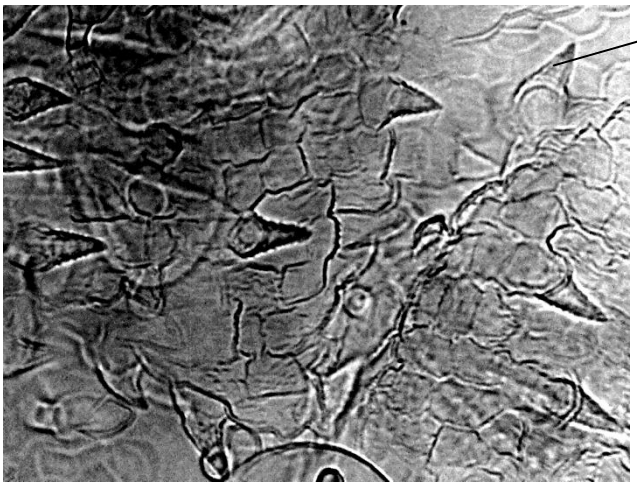


Рисунок 109 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой одноклеточный колпачковидный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенным основанием

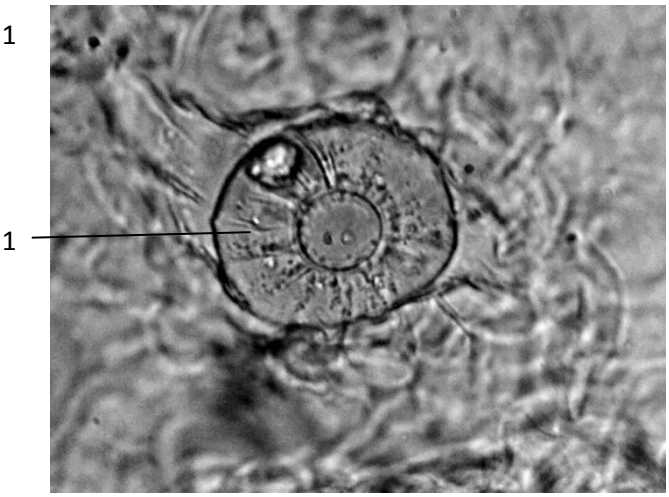


Рисунок 110 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - эфиромасличная железка

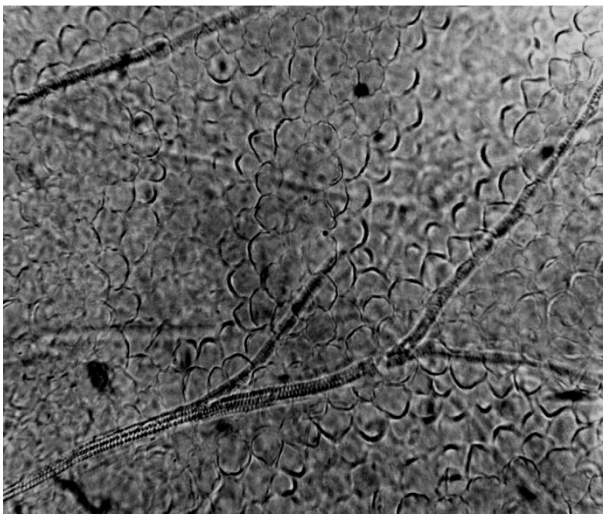


Рисунок 111 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна мелового, увел. 200х.

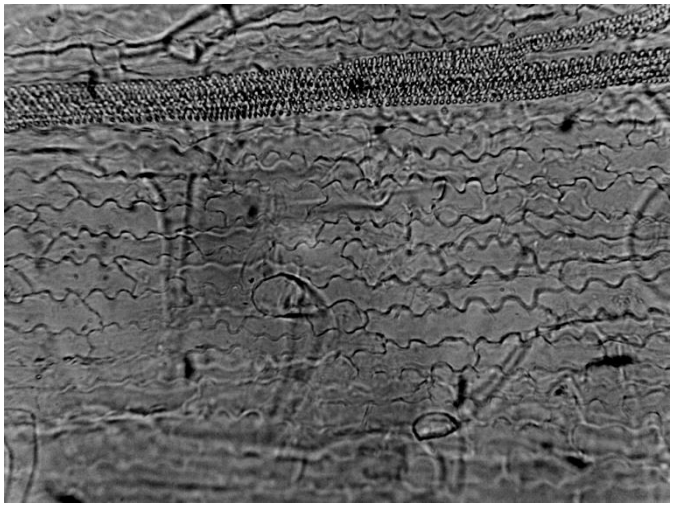


Рисунок 112 - Фрагмент эпидермиса в трубке венчика тимьяна мелового, увел. 200х.

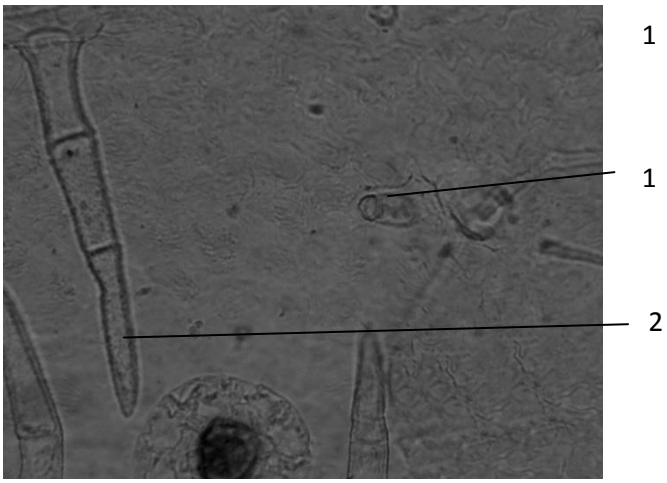


Рисунок 113 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - головчатый волосок на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой;
2 - трехклеточный толстостенный бородавчатый волосок с тупой верхушкой

Рисунок 114 - Фрагмент эпидермиса трубки венчика тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой толстостенный волосок со спадающими стенками

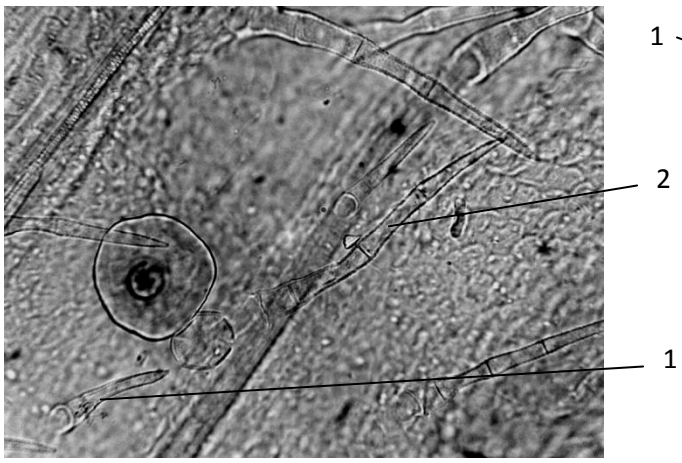


Рисунок 115 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - толстостенный одноклеточный волосок со слегка заостренной верхушкой;
2 - четырехклеточный толстостенный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой

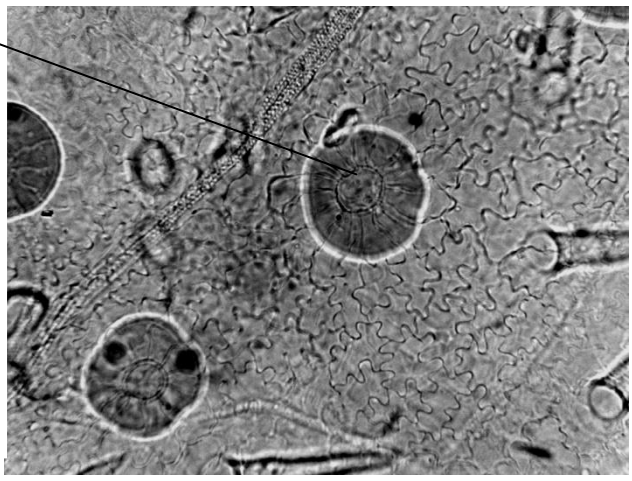


Рисунок 116- Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - эфиромасличная железка

Эфиромасличные железки многочисленные, состоят из десяти-двенадцати выделительных клеток, часто заполненных эфирным маслом (рисунок 116).

Чашечка: Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образуют эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть, где встречаются клетки эпидермиса с четковидным утолщением клеточных стенок (рисунок 117). В основании чашечки клетки эпидермиса менее извилистостенные или прямостенные (рисунок 119). Эфиромасличные железки из 8 выделительных клеток образуются на эпидермисе чашечки (рисунок 117). По краю и в основании зубцов чашечки встречаются простые двух-четырехклеточные толстостенные волоски с бахромчатой кутикулой (рисунок 120).

Эпидермис опушен на протяжении всей длинны чашечки простыми, толстостенными колпачковидными бородавчатыми волосками одноклеточные (рисунок 121). Ближе к основанию чашечки располагаются скопления простых многоклеточных длинных бородавчатых суставных волосков (рисунок 119).

Головчатые волоски, состоящие из одноклеточной ножке, на которой формируется пузыревидная одноклеточная головка расположены в большем количестве на зубцах чашечки (рисунок 121).

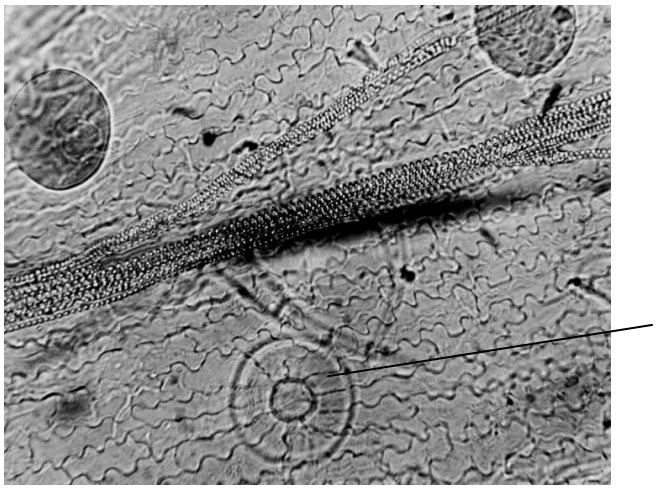


Рисунок 117 - Фрагмент эпидермиса средней части чашечки тимьяна мелового, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка

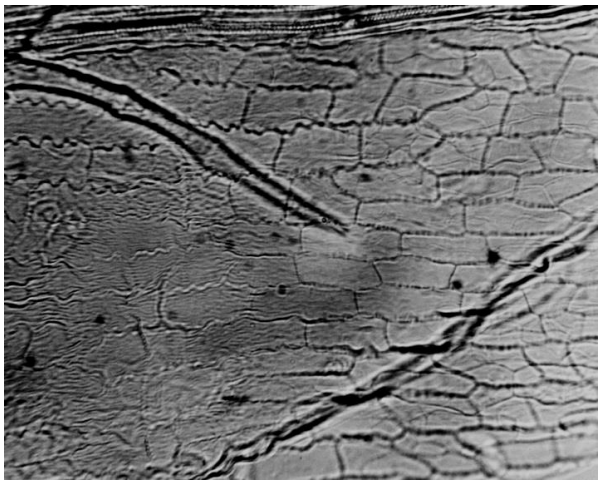


Рисунок 118 - Фрагмент эпидермиса основания чашечки тимьяна мелового, увел. 200х.

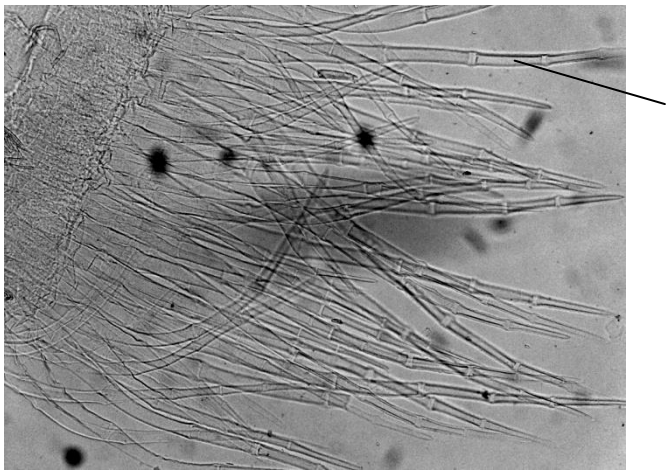


Рисунок 119 - Фрагмент основания чашечки тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - длинный бородавчатый суставной волосок

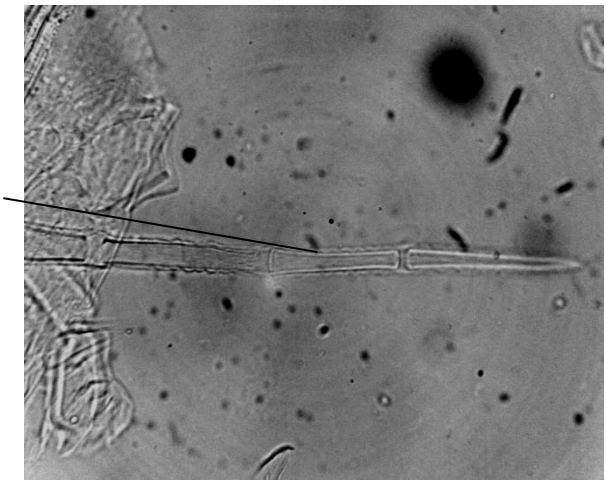


Рисунок 120 - Фрагмент чашечки тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - простой четырехклеточныей толстостенный волосок с бахромчатой кутикулой

Рисунок 121 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна мелового, увел. 200х.
1 - одноклеточный толстостенный колпачковидный бородавчатый волосок;
2 - головчатый волосок на одноклеточной ножке с одноклеточной пузыревидной головкой

Таблица 29 - Сравнительная характеристика микродиагностических признаков растений рода тимьян секции Camptodromi A.Kern.

Диагностические признаки		Подсекция 1 Jsolepides		Подсекция 2 Serpylla
		Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий
Эпидермис стебля	Форма клеток	Прямоугольные	Прямоугольные	Прямоугольные с прямыми или скошенными концами
	Наличие кутикулы	Клетки эпидермиса покрыты крупнозубчатой кутикулой	Клетки эпидермиса покрыты крупнозубчатой кутикулой	
	Форма клеток эпидермиса в межреберье	Округло-прямоугольные, реже со слегка извилистыми клеточными стенками или многоугольные	Округло-прямоугольные или многоугольные с четковидным утолщением клеточной стенки	Округло-прямоугольные с четковидным утолщением клеточной стенки
	Форма клеток на ребрах	Продольно удлиненные, иногда со скошенными концами, четковидными утолщениями клеток	Продольно удлиненные, иногда со скошенными концами	Продольно удлиненные со скошенными или прямыми концами
	Наличие устьиц	Устьичный аппарат диацитного типа	Устьичный аппарат диацитного типа	Устьичный аппарат диацитного типа
	Типы волосков	- Простые одно-, трех-клеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой; - Простые колпачковидные толстостенные, состоящие из одной клетки, покрыты бородавчатой кутикулой у основания которых формируется цистолит, иногда прижаты к поверхности; - Простые двух-, пятиклеточные со слегка бородавчатой поверхностью, клетки которых заполнены зернистым содержимым; - Головчатые на	-Простые одно-трех-клеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, часто коленчато-изогнутые; -Простые одноклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой; -Головчатые на одноклеточной ножке с округлой или овальной одноклеточной головкой	-Простые 2-5-клеточные коленчатоизогнутые с бородавчатой кутикулой; -Головчатые на одноклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой; -Сосочковидные выросты клеток эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой

		одноклеточной ножке с округлой или овальной головкой		
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 11-15 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя шесть-восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток
Лист	Форма клеток верхнего эпидермиса	Прямостенные или слегка извилистые с четковидным утолщением	Извилистостенные	Извилистостенные, со складчатой кутикулой и четковидным утолщением
	Форма клеток нижнего эпидермиса	Извилистостенные с продольной складчатостью кутикулы и с четковидным утолщением клеток	Извилистостенные с продольной складчатостью кутикулы	Извилистостенные
	Наличие устьиц	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа
	Типы волосков	- Простые одноклеточные покрытые бородавчатой кутикулой, верхушка, которых слегка заостренная, направлены к поверхности листа под углом; - Простые трех-, семиклеточные с сильно утолщенными клетками; - Головчатые с округлой одноклеточной головкой на ножке, состоящей из одной клетки.	-Простые одноклеточные со слегка заостренной верхушкой и бородавчатой кутикулой, расположены под углом к поверхности листа; -Простые одно-друх-клеточные колпачковидные, бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенным основанием; -Простые трех-восьми-клеточные толстостенные с бахромчатой кутикулой	-Простые 2-3-клеточные с бородавчатой поверхностью, коленчато изогнутые; -Простые бородавчатые крупные многоклеточные (щетинистые); -Головчатые на короткой ножке, состоящей из одной клетки с округлой одноклеточной головкой; -Сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток

		окружены 11-15 клетками, формирующие розетку	окружены 8-14 клетками, формирующие розетку	
Чашечка	Форма клеток эпидермиса	Извилистостенные покрыты складчатой кутикулой	Извилистостенные покрыты складчатой кутикулой и четковидным утолщением клеток в средней части чашечки	Извилистостенные
	Наличие устьиц	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа
	Типы волосков	- Простые многоклеточные щетинистые суставные с сильно утолщенными клеточными стенками; - Простые многоклеточные остроконечные, со слегка морщинистой кутикулой и утолщенными стенками; - Простые одноклеточные с заостренной верхушкой; - Простые длинные многоклеточные толстостенные бородавчатые с закругленной слегка притупленной верхушкой; -Головчатые с овальной одноклеточной головкой на ножке состоящей из одной клетки	-Простые многоклеточные бородавчатые суставные щетинистые; -Простые одноклеточные толстостенные колпачковидные бородавчатые; -Простые двух-четырех-клеточные толстостенные с бахромчатой кутикулой; -Головчатые с овальной одноклеточной головкой на ножке состоящей из одной клетки	-Простые 2-5-клеточные с бородавчатой кутикулой; -Головчатые на короткой одноклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой; -Сосочковидные выросты эпидермиса со слегка бородавчатой или гладкой кутикулой
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток

	Форма клеток эпидермиса	- В трубке венчика удлиненно прямоугольные; - В зеве венчика – извилистые;	В трубке венчика удлиненно-прямоугольные; Эпидермис верхней и нижней губы извилистостенный с сосочковидными выростами	В трубке венчика прямостенный с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами; В зеве венчика извилистые с сосочковидными выростами
Венчик	Типы волосков	- Простые бородавчатые 2-5 клеточные, верхушка, которых, заостренная и чаще всего расширенная базальная клетка с у основания; - Простые 1-4 клеточные тонкостенные со спадающими стенками; - Простые 1-2 клеточные бородавчатые, верхушка, которых, заостренная; - Головчатые с овально-округлой или округлой одноклеточной головкой на ножке, состоящей из одной клетки; - Сосочковидные выросты клеток эпидермиса	-Простые 2-4-клеточные толстостенные, бородавчатые с заостренной верхушкой; -Простые 2-3-клеточные толстостенные бородавчатые с тупой верхушкой; - Простые 2-3 клеточные толстостенные со спадающимися стенками; -Простые одноклеточные толстостенные со слегка заостренной или тупой верхушкой; -Головчатые с овально-округлой одноклеточной головкой на ножке состоящей из одной клетки; - Сосочковидные выросты эпилермиса	-Простые 2-4, реже 5-клеточные с бородавчатой кутикулой, заостренной верхушкой и расширенной у основания; -Головчатые на короткой одноклеточной ножке с округло-овальной одноклеточной головкой; -Головчатые на двухклеточной ножке с овальной одноклеточной головкой; - Сосочковидные выросты эпилермиса
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя десять-двенадцать радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток

Микродиагностическая характеристика растений рода тимьян Секции Marginati A.Kern.

Подсекция 1 - Marginate: Тимьян блошиный

Стебель: Четырехгранный стебель в поперечном сечении непучкового типа строения (рисунок 122), покрытый эпидермисом. В поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и покрыт крупнозубчатой кутикулой формирующей толстый слой (рисунки 123, 124, 125). С поверхности эпидермиса в межреберье клетки округло-прямоугольные или многоугольные с продольной морщинистостью кутикулы. Продольно-удлиненные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их концы скошены. (рисунок 126). Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата (рисунки 123, 125). По эпидермису встречаются 3 типа волосков:

- простые толстостенные, одноклеточные, покрыты бородавчатой кутикулой (расположены по ребрам эпидермиса стебля) (рисунок 127);
- простые одно-трехклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато изогнутые, расположены чаще всего в ребрах (рисунок 126);
- головчатые с округло-одноклеточной головкой на ножке, состоящей из одной клетки (рисунок 125).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 8-12 клетками эпидермиса (рисунок 124).

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 2-3 слоя залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра.

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 122).

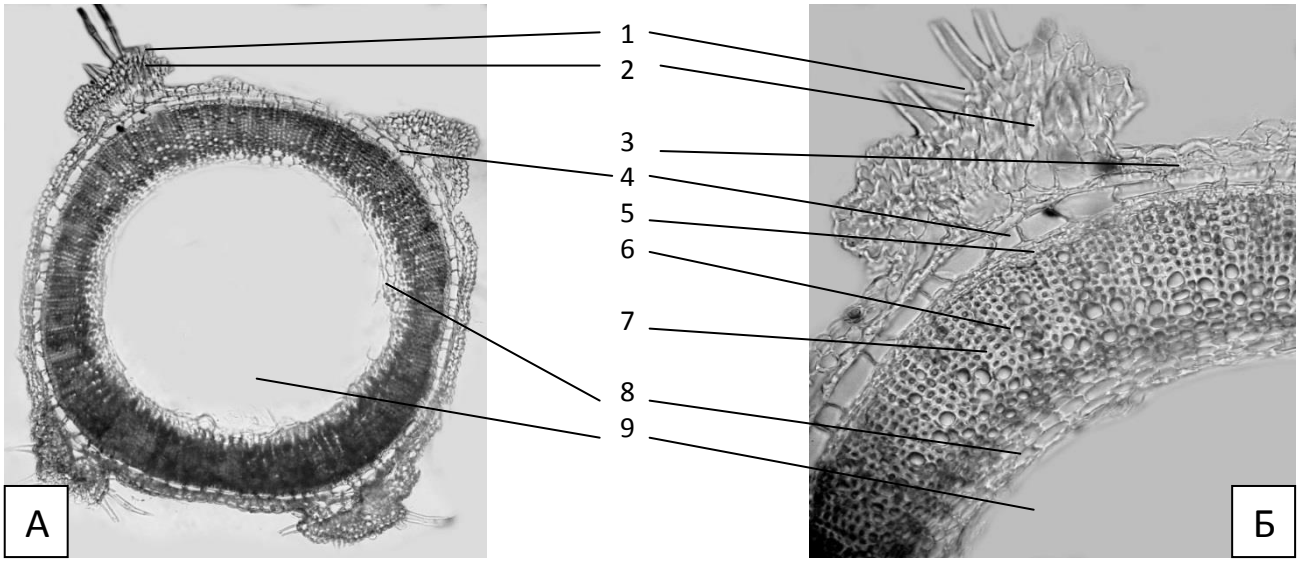


Рисунок 122 - Фрагмент поперечного среза стебля тимьяна блошиного: А - увел. 80х, Б - увел. 200х, 1 – эпидермис; 2 – уголковая колленхима; 3 – основная паренхима; 4 – эндодерма; 5- флоэма; 6 – сосуды ксилемы; 7 – склерефицированная паренхима; 8 – паренхима сердцевины; 9 – полость

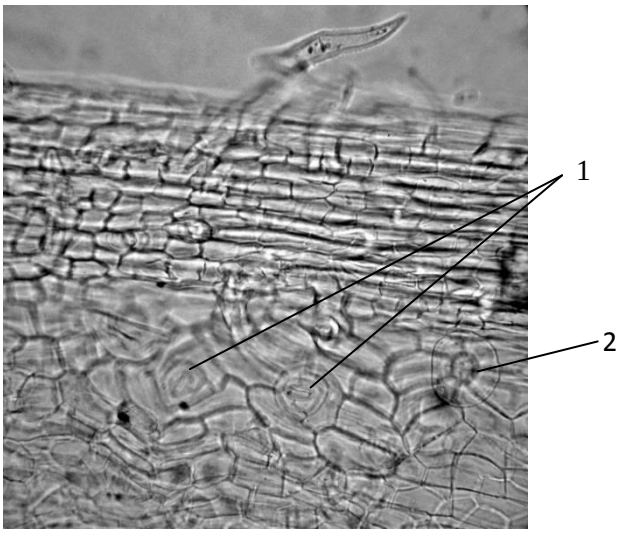


Рисунок 123 - Фрагмент эпидермиса в межреберье стебля тимьяна блошиного, увел. 200х.
1- устьица
2- эфиромасличная железка

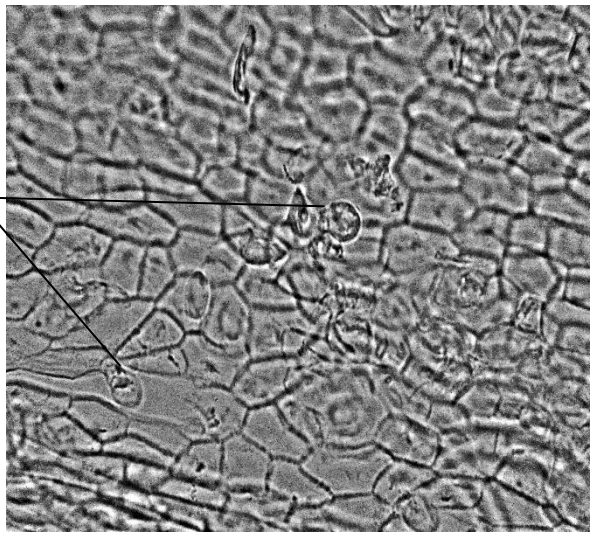


Рисунок 124- Фрагмент эпидермиса в межреберье стебля тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой

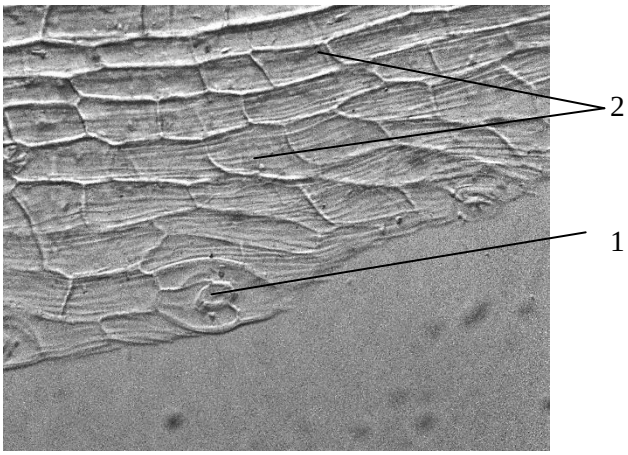
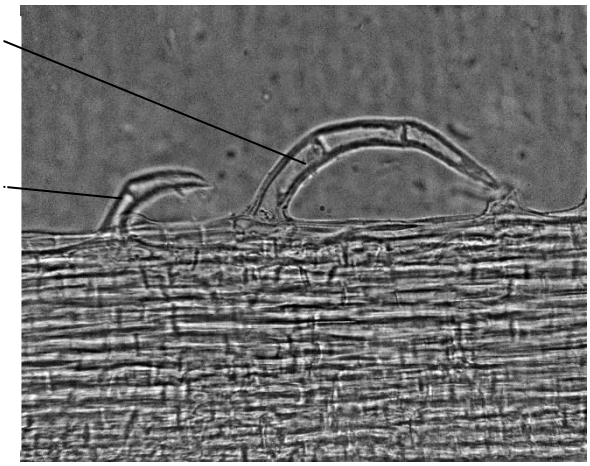


Рисунок 125 - Фрагмент эпидермиса стебля в межреберье тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – устьице диацитного типа
2 – округло-прямоугольные и многоугольные клетки эпидермиса с продольной морщинистостью кутикулы



Риунок 126 - Фрагмент эпидермиса вдоль ребра стебля тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - простой трехклеточный толстостенный с бородавчатой кутикулой, коленчато изогнутый волосок
2 - простой двухклеточный толстостенный с бородавчатой кутикулой, коленчато изогнутый волосок

Лист: Верхний эпидермис листа образован извилистыми клетками (рисунок 130). Эпидермис с нижней стороны листа более извилистостенный, с продольной морщинистостью кутикулы (рисунок 129). Устьица диацитного типа преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунок 129).

Удлинено прямоугольные клетки с сосочковидными выростами эпидермиса образуют край листа в его основании (рисунок 132). Вдоль жилки клетки продольно удлиненные с четковидным утолщением клеточных стенок и продольной морщинистостью кутикулы (рисунок 128).

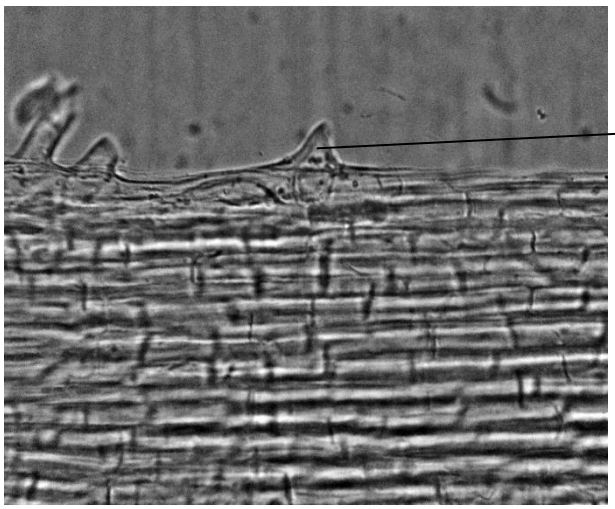


Рисунок 127 - Фрагмент клеток эпидермиса стебля вдоль ребра тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - одноклеточный простой толстостенный волосок, покрытый бородавчатой кутикулой

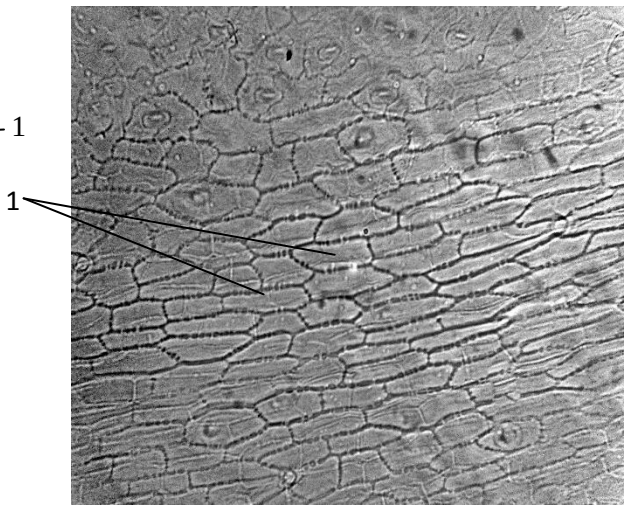


Рисунок 128- Фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – клетки эпидермиса

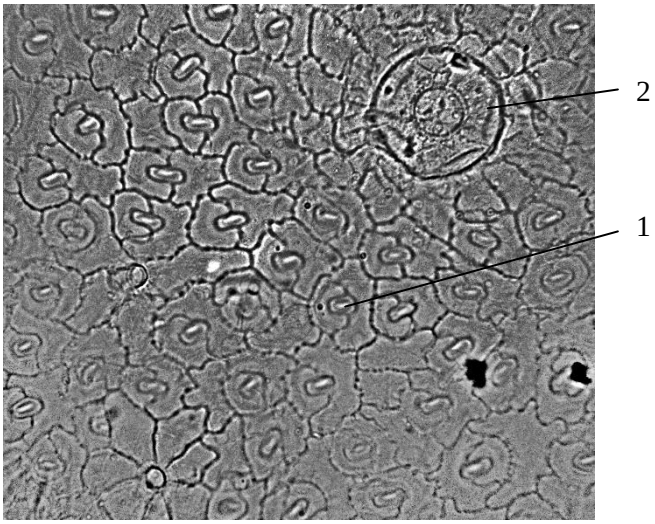


Рисунок 129 - Фрагмент нижнего эпидермиса листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – устьица
2 – эфиромасличная железка

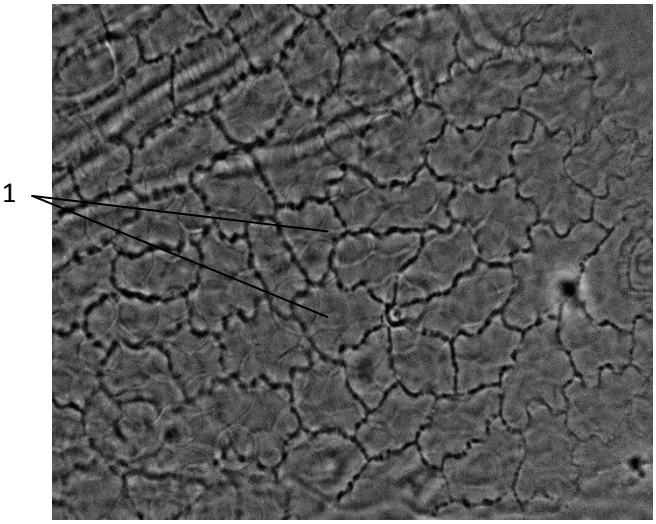


Рисунок 130 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки

Эпидермис листа опушен волосками различного типа:

- простыми одноклеточными колпачковидными бородавчатыми волосками с заостренной верхушкой и расширенным основанием (встречаются по всей поверхности эпидермиса листа) (рисунок 134);
- простыми одноклеточными волосками, покрытые слоем бородавчатой кутикулой, верхушка у которых заострена, расположенные к поверхности листа под углом (встречаются вдоль края листа) (рисунок 132);
- простыми двух - трехклеточными толстостенными волосками с бахромчатой кутикулой (встречаются ближе к основанию листа) (рисунок 131);
- головчатыми волосками с одноклеточной округлой головкой расположенной на ножке состоящей из одной клетки (рисунок 133).

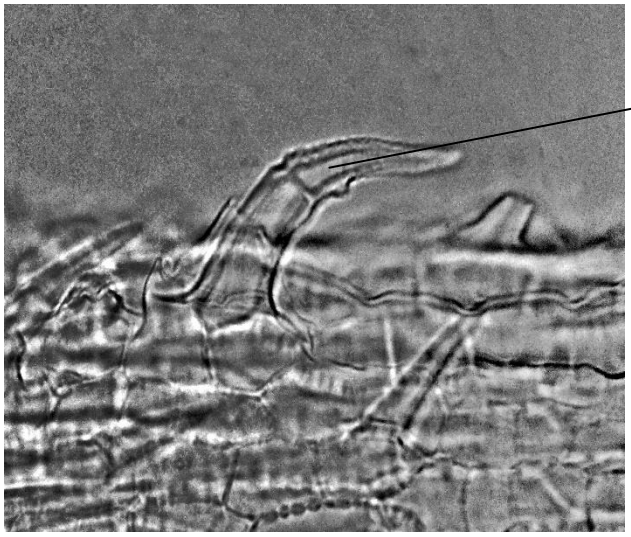


Рисунок 131 - Фрагмент эпидермиса ближе к основанию листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – простой двухклеточный волосок с бахромчатой кутикулой

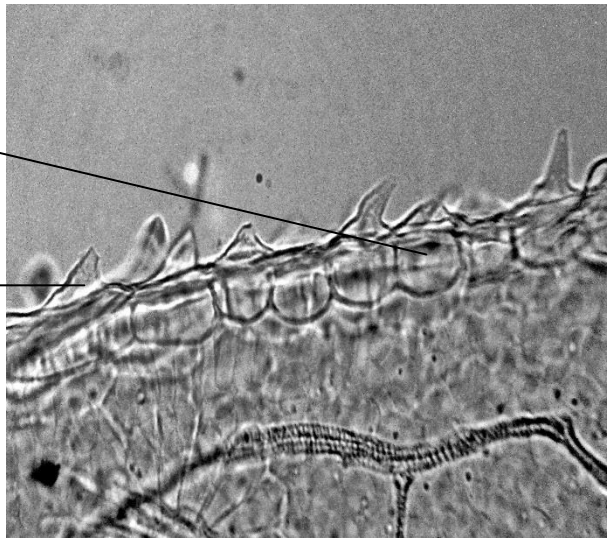


Рисунок 132 - Фрагмент эпидермиса вдоль края листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – удлиненно-прямоугольные клетки эпидермиса;
2 - простой одноклеточный волосок с бородавчатой кутикулой и заостренной верхушкой

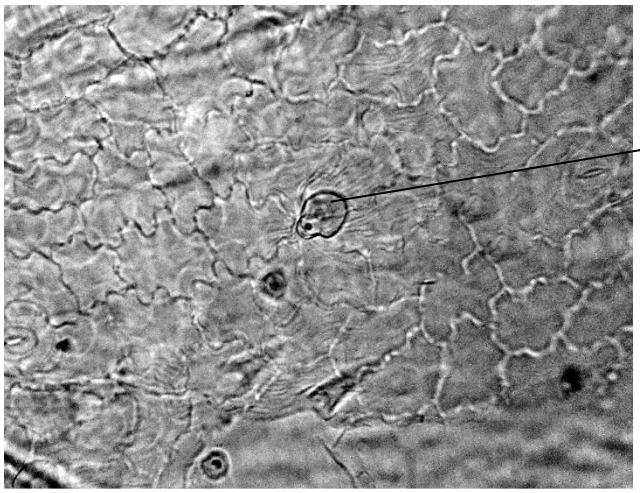


Рисунок 133 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - головчатый волосок на одноклеточной ножке с округлой головкой

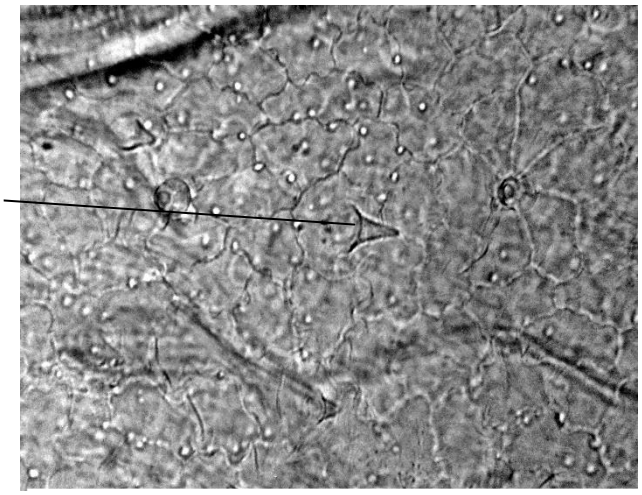


Рисунок 134 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный колпачковидный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенным основанием

На обоих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 8-14 клетками, формирующие розетку (рисунок 129).

Чашечка: Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образуют эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть (рисунок 137), а менее извилистостенные или прямостенные - основание чашечки (рисунок 138). Эфиромасличные железки из 8 выделительных клеток, расположенных радиально встречаются по эпидермису чашечки (рисунки 136, 143).

Многочисленные простые остроконечные двух-четырехклеточные толстостенные волоски, покрытые гладкой кутикулой встречаются в основании зубцов чашечки и приуроченыи к жилке (рисунки 136, 143). Наряду с такими волосками вдоль жилки, по эпидермису, краю чашечки встречаются простые одноклеточные толстостенные бородавчатые колпачковидные волоски (рисунок 140).

Головчатые волоски с пузыревидной одноклеточной головкой на ножке, состоящей из одной клетки, расположены в основании чашечки (рисунок 143).

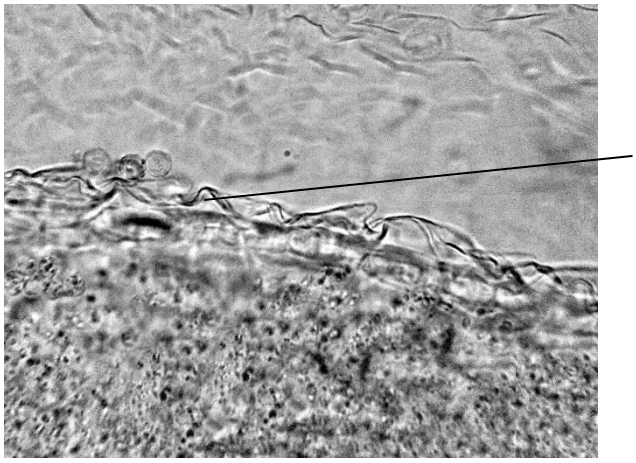


Рисунок 135 - Фрагмент эпидермиса вдоль края листа тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – сосочковидные выросты клеток эпидермиса

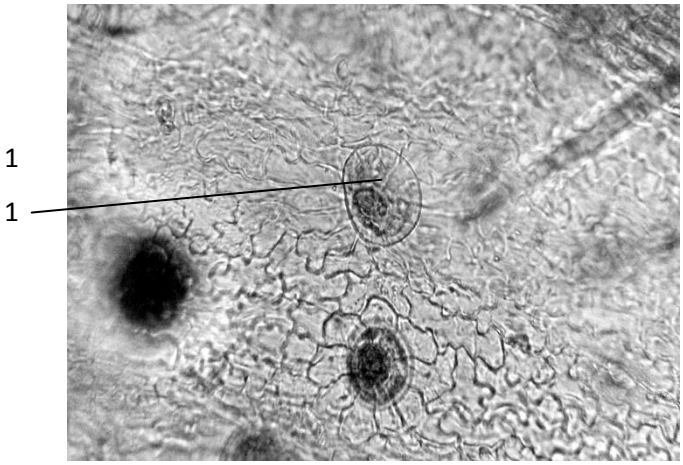


Рисунок 136 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - эфиромасличная железка

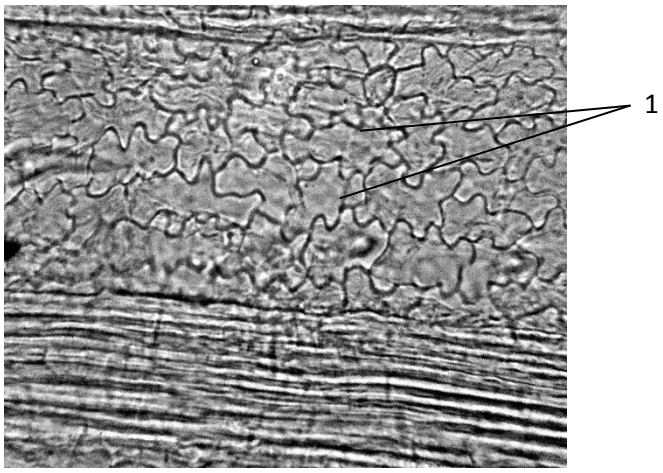


Рисунок 137 - Фрагмент эпидермиса зубцов в средней части чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - извилистостенные клетки эпидермиса со складчатой кутикулой эпидермиса

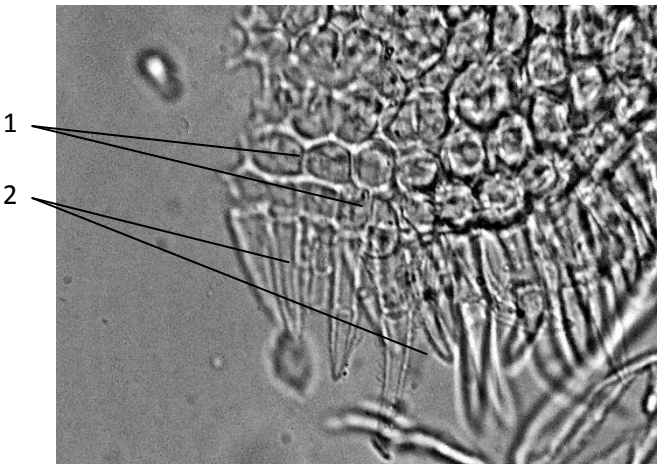


Рисунок 138 - Фрагмент эпидермиса у основания чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – прямостенные клетки эпидермиса;
2 – простые одно-, двухклеточные толстостенные остроконечные волоски с гладкой кутикулой

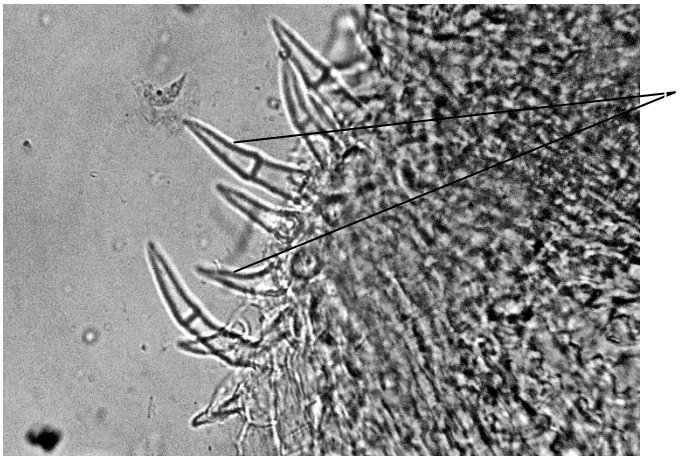


Рисунок 139 - Фрагмент эпидермиса у основания чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - простые одно -, двухклеточные толстостенные остроконечные волоски с гладкой кутикулой

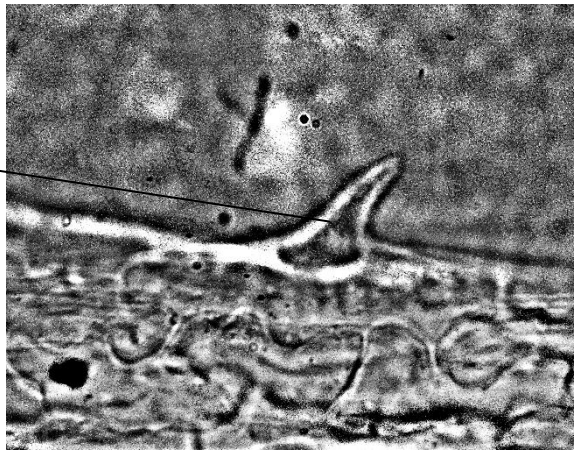


Рисунок 140 - Фрагмент эпидермиса по краю чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - одноклеточный толстостенный бородавчатый волосок

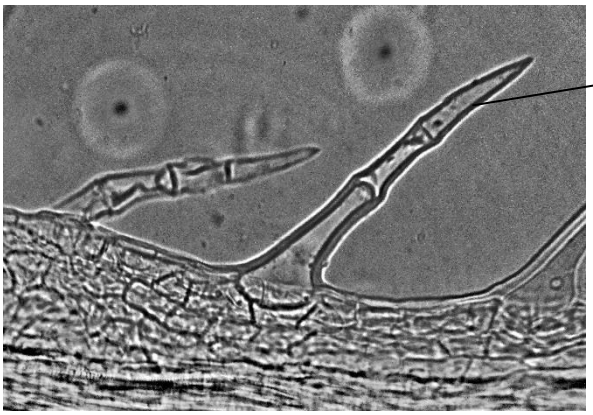


Рисунок 141 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - простой трехклеточный толстостенный остроконечный волосок с гладкой кутикулой

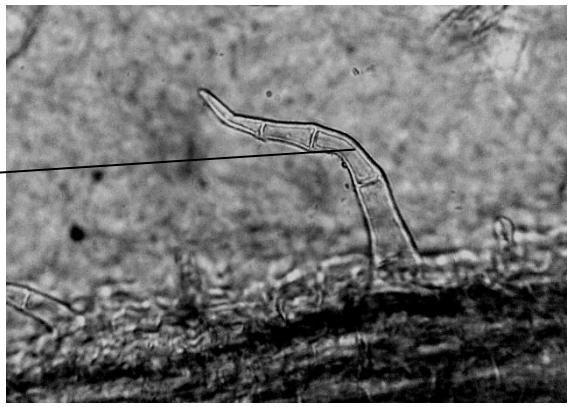


Рисунок 142 - Фрагмент эпидермиса по жилке чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - простой четырехклеточный толстостенный остроконечный волосок с гладкой кутикулой

Венчик: Эпидермис верхней и нижней губы венчика извилистостенный с сосочковидными выростами (рисунки 144, 145). Удлиненно прямоугольные слегка извилистые, эпидермальные клетки образуют трубку венчика (рисунок 148).

Венчика опушен разнообазными волосками. Простые волоски четырех типов: толстостенные одноклеточные бородавчатые со слегка заостренной или тупой верхушкой (изредка встречаются по эпидермису верхней и нижней губы венчика) (рисунок 144); пяти-семиклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой с тупоконечной верхушкой (рисунок 151); двух-пятиклеточные толстостенные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой (рисунок 152); двух-четырехклеточные толстостенные волоски со спадающими стенками, часто перекрученные (встречаются в зеве и трубке венчика) (рисунок 149).

Наряду с простыми волосками встречаются головчатые волоски на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой (рисунок 153).

Многочисленные эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток (рисунки 146, 147, 150).

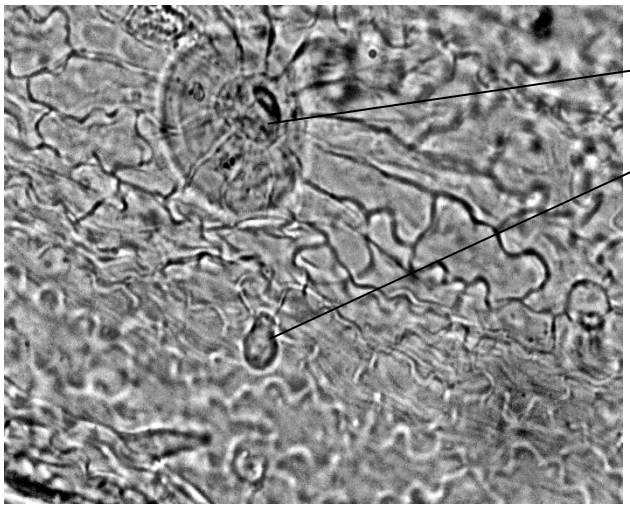


Рисунок 143 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - головчатый волосок на одноклеточной ножке с одноклеточной пузыревидной головкой
2 – эфиромасличная железка

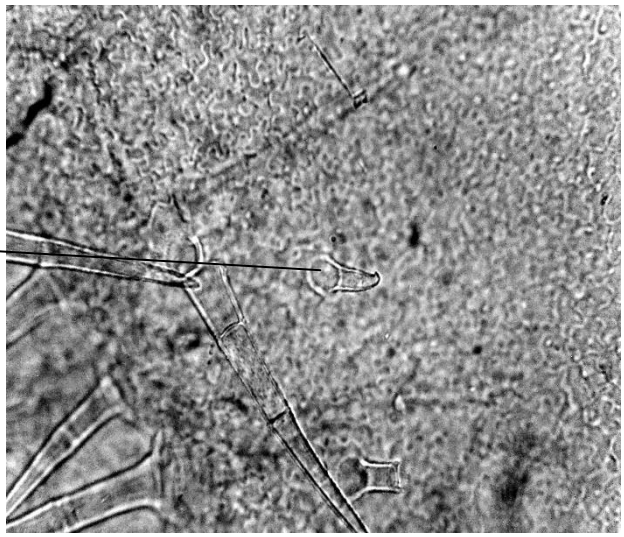


Рисунок 144 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – толстостенный одноклеточный бородавчатый волосок со слегка заостренной или тупой верхушкой

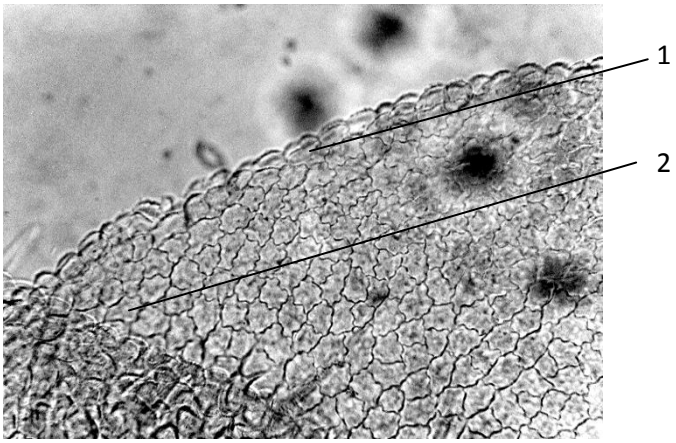


Рисунок 145 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки эпидермиса с сосочковидными выростами
2 – извилистостенные клетки эпидермиса

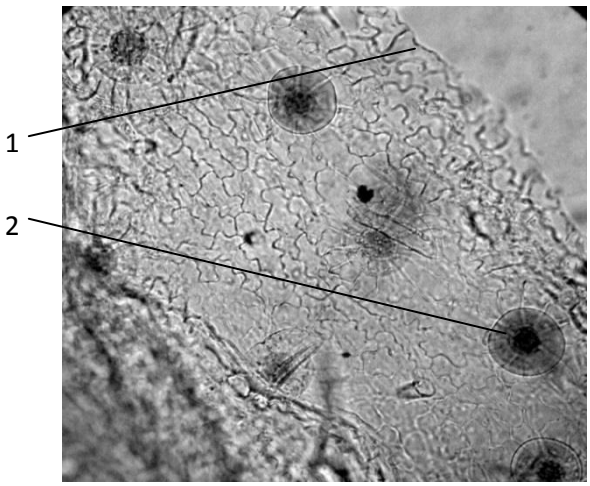


Рисунок 146 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки эпидермиса
2 – эфиромасличная железка

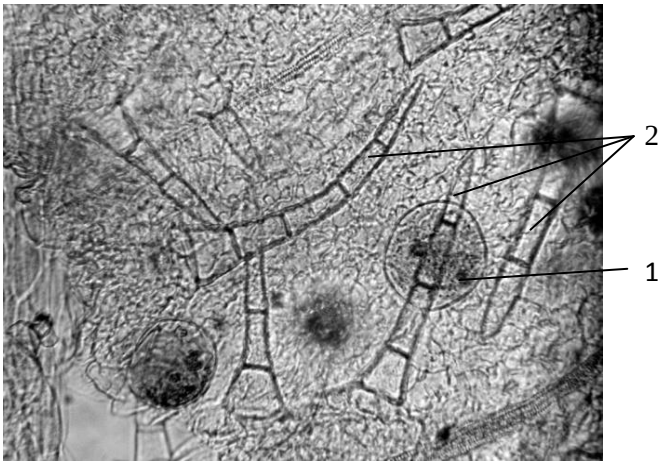


Рисунок 147 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка
2 – простые трех - пятиклеточные толстостенные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой

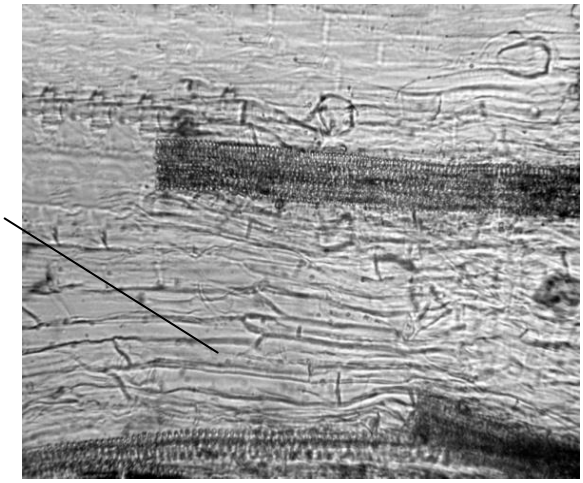


Рисунок 148 - Фрагмент эпидермиса в трубке венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 - клетка эпидермиса удлиненно прямоугольная со слегка извилистыми боковыми стенками

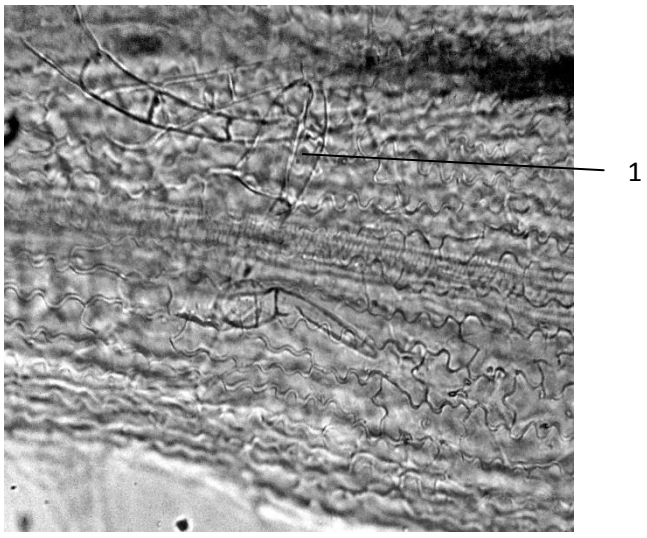


Рисунок 149 - Фрагмент эпидермиса в зеве и трубке венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – простой четырехклеточный толстостенный волосок со спадающими стенками, часто перекрученными

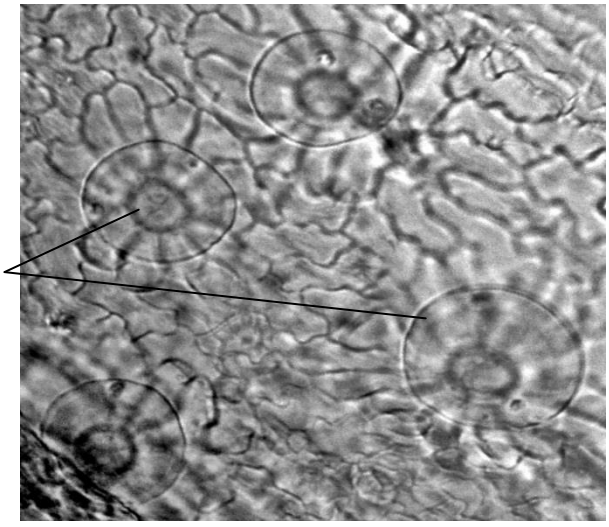


Рисунок 150 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – эфиромасличные железки

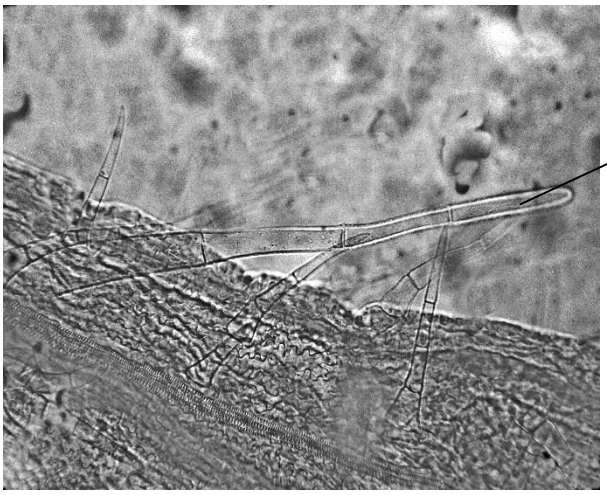


Рисунок 151 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – фрагмент семиклеточного толстостенного волоска с бородавчатой кутикулой с тупоконечной верхушкой

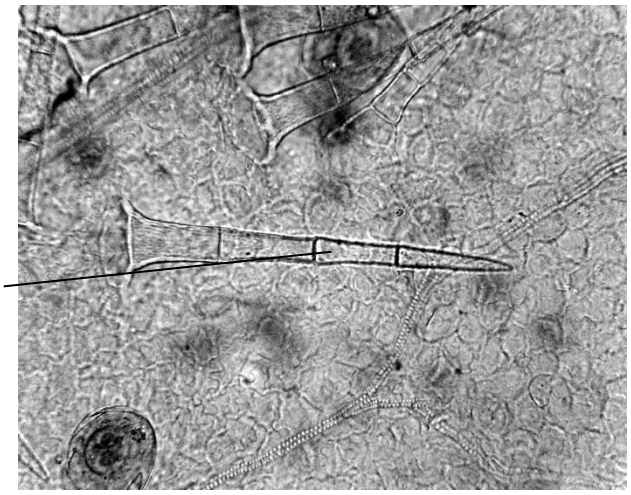


Рисунок 152 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – четырехклеточный толстостенный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и с расширенной у основания базальной клеткой

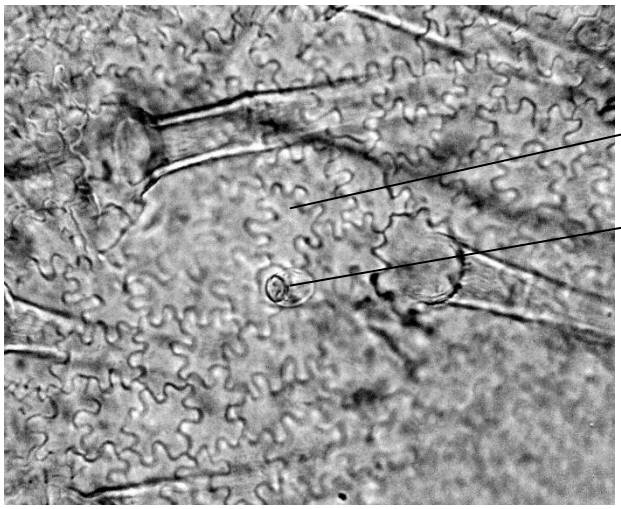


Рисунок 153 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна блошиного, увел. 200х.
1 – извилистостенные клетки эпидермиса
2 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой

Подсекция 2 - Vertici Mati: Тимьян Маршалла

Стебель: Округло-четырехгранный стебель в поперечном сечении непучкового типа строения, покрытый эпидермисом. В поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и покрыт крупнозубчатой кутикулой, формирующей толстый слой. В межреберье, с поверхности, эпидермис образован слегка извилистыми округло-прямоугольными или многоугольными клетками с продольной морщинистостью кутикулы и четковидным утолщением клеточной стенки. Продольно-удлиненные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их концы скошены. Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата (рисунки 154, 155).

По эпидермису встречается 4 типа волосков:

- простые толстостенные колпачковидной формы волоски одноклеточные, покрыты бородавчатой кутикулой, у основания которых образуется цистолит; такие волоски крючковидно изогнутые или прижаты к поверхности (рисунок 156) (в межреберье по эпидермису стебля);
- простые толстостенные одно-двухклеточные, покрыты слегка бородавчатой кутикулой (рисунок 156);
- простые 3-х, 6-клеточные волоски со слегка бородавчатой поверхностью с зернистым содержимым, расположенными в большей степени на ребрах (рисунок 157);
- головчатые волоски, состоящие из пузеревидной головки формирующейся на одноклеточной ножке с (рисунок 155).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 11-15 клетками эпидермиса. Данный тип железок встречается у представителей семейства губоцветные (рисунки 156, 157).

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 2-3 слоя залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра.

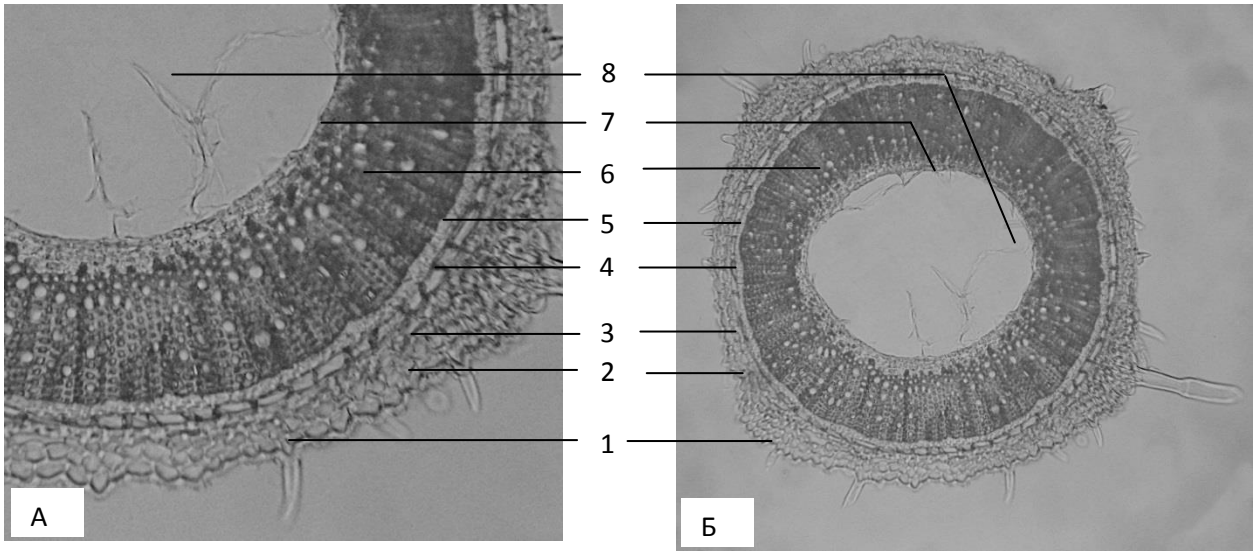


Рисунок 154- Фрагмент стебля тимьяна Маршалла в поперечном сечении, А - увел. 300х, Б - увел. 120х. 1 – эпидермис; 2 – уголковая колленхима; 3 – паренхима коры; 4 – эндодерма; 5- флоэма; 6 – ксилема; 7 – основная паренхима сердцевины; 8 – полость

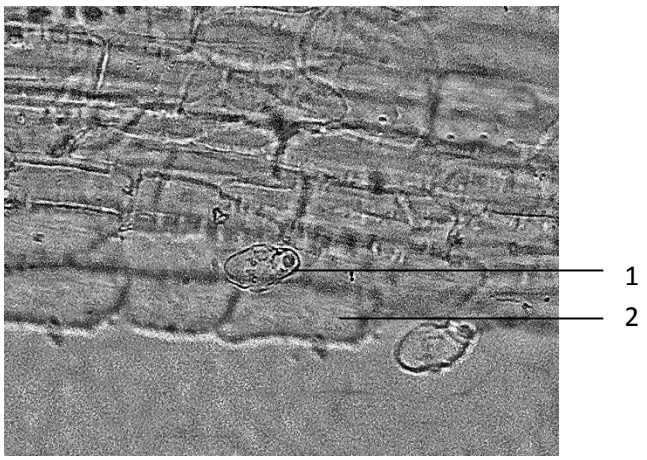


Рисунок 155 - Фрагмент эпидермиса вдоль ребра стебля тимьяна Маршалла, увел. 300х. 1- головчатый волосок с пузыревидной головкой и одноклеточной ножкой; 2 – клетки эпидермиса

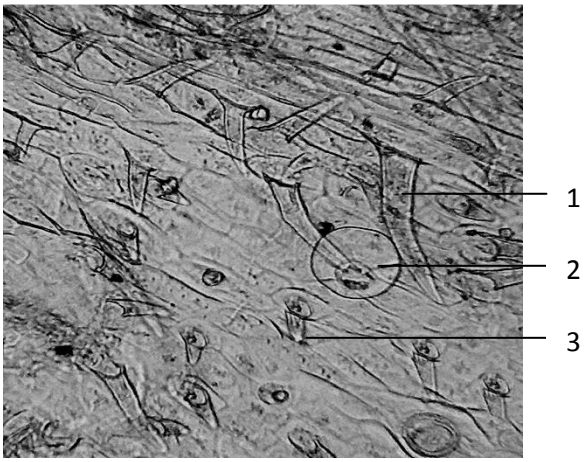


Рисунок 156 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Маршалла в межреберье, увел. 300х. 1 – простой двухклеточный волосок, толстостенный со слегка бородавчатой кутикулой; 2 – эфиромасличная железка (вид сверху); 3 – простой одноклеточный колпачковидный волосок с цистолитом у основания

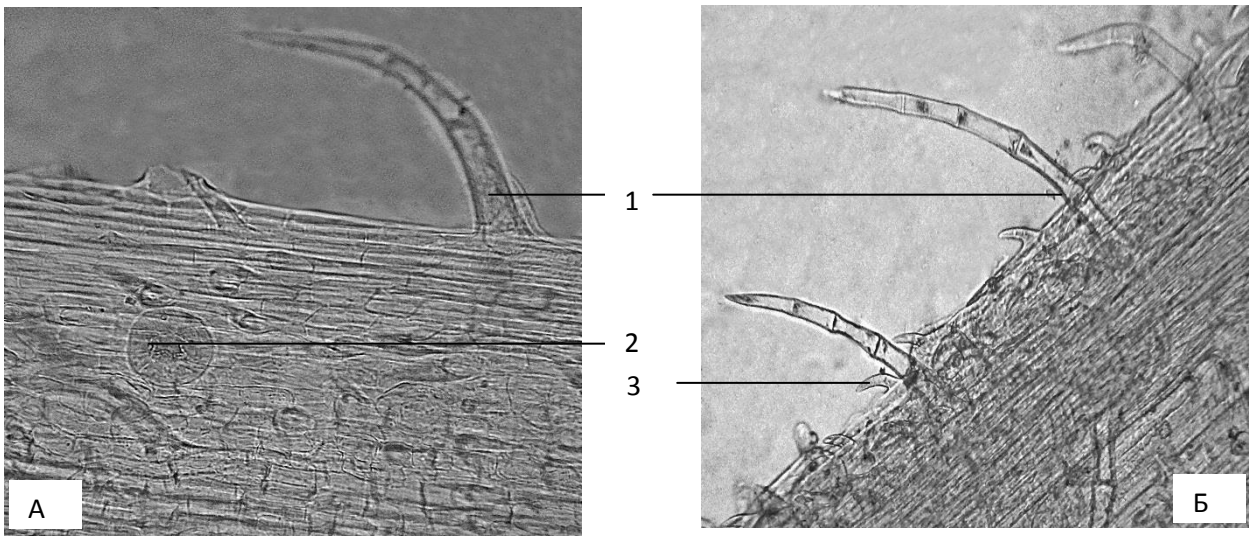


Рисунок 157 - Фрагмент эпидермиса вдоль ребра стебля тимьяна Маршалла. А – увел. 200х, Б – увел. 120х. 1 – простой многоклеточный волосок со слегка бородавчатой поверхностью; 2 – эфиромасличная железка (вид сверху); 3 – простой двухклеточный волосок, толстостенный со слегка бородавчатой поверхностью

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 154).

Лист: Верхний эпидермис листа образован ломаноизвилистыми клетками с четковидным утолщением (рисунок 158). Эпидермис с нижней стороны листа более извилистостенный. Устьица диацитного типа преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунок 159).

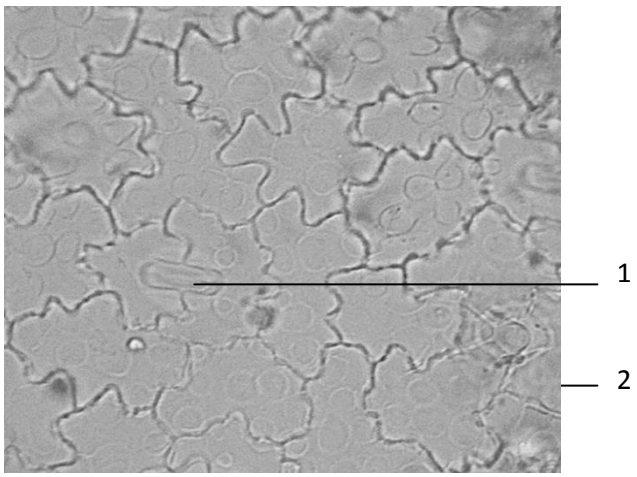


Рисунок 158 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна Маршалла, увел. 600х. 1 – устьичный аппарат диацитного типа; 2 – клетки эпидермиса

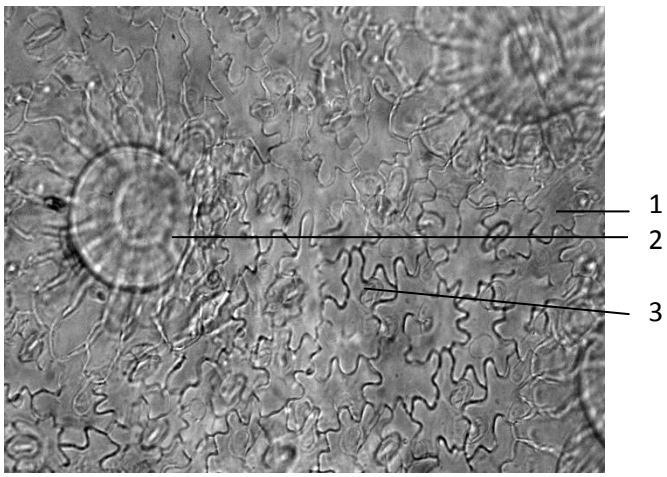


Рисунок 159 - Фрагмент эпидермиса с нижней стороны листа тимьяна Маршалла, увел. 300х. 1 – клетки эпидермиса; 2– эфиромасличная железка (вид сверху); 3 – устьичный аппарат диацитного типа

Удлинено прямоугольные клетки эпидермиса образуют край листа в его основании (рисунок 161). Продольно удлиненные клетки с четковидными утолщениями характерны для жилки листа (рисунок 160).

Эпидермис листа опушен волосками различного типа:

- одноклеточными простыми волосками, покрытыми бородавчатой кутикулой, верхушка которых слегка заострена, расположенными по отношению поверхности листа под углом (рисунок 161) (приурочены к краю листа);
- простыми толстостенными удлиненными одноклеточными волосками, с бородавчатой поверхностью, верхушка которых тонко заострена (рисунок 162) (встречаются у основания листовой пластинки);
- простыми двух-пятиклеточными волосками, стенки которых слегка утолщены и покрыты слабобородавчатой кутикулой (щетинистыми) (рисунок 162) (встречаются у основания листа).

На обоих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам

семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 11-15 клетками, формирующие розетку (рисунок 159).

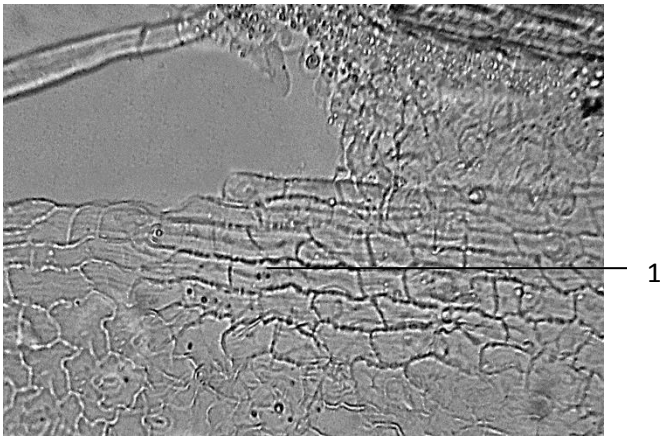


Рисунок 160 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Маршалла по жилке, увел. 300х.
1 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением клеточных стенок

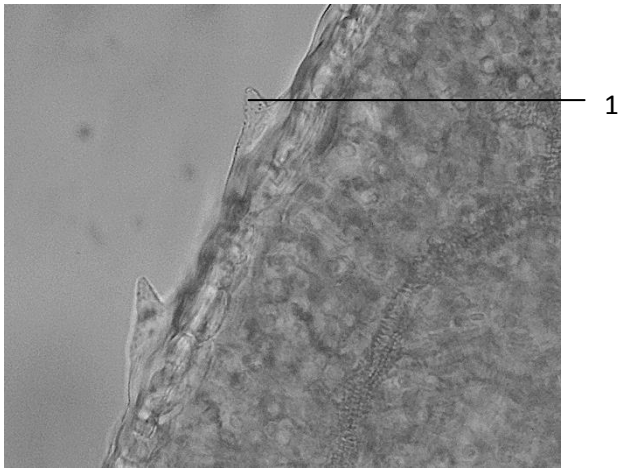


Рисунок 161 - Фрагмент края листа тимьяна Маршалла, увел. 300х. 1 - одноклеточный простой волосок, покрытый бородавчатой кутикулой, верхушка которого слегка заострена

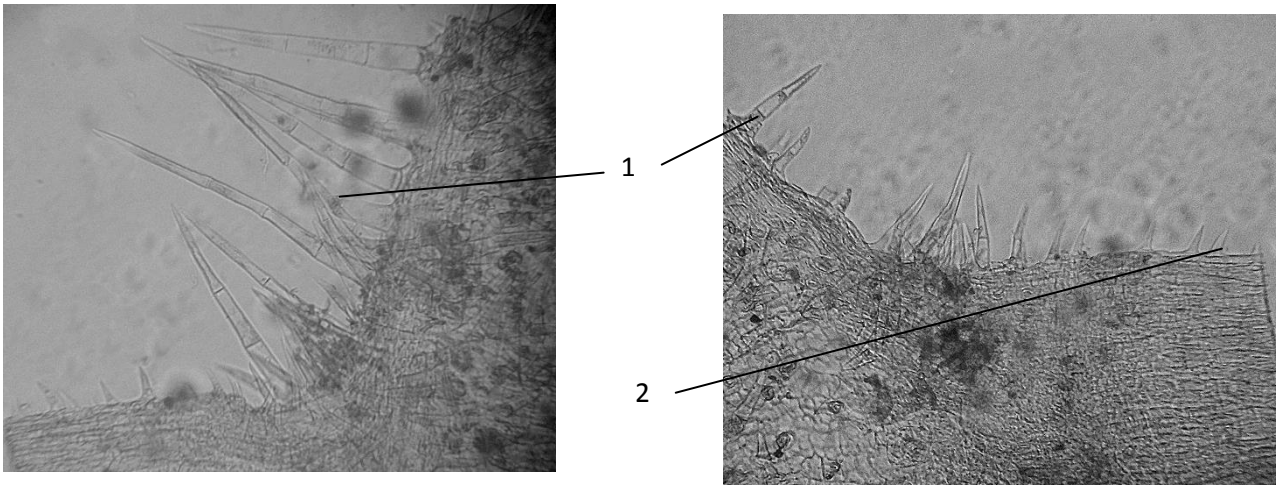


Рисунок 162 - Фрагмент листа тимьяна Маршалла в его основании, увел. 120х; 1 – простой многоклеточный волосок со слегка утолщенными клеточными стенками и слабобородавчатой кутикулой (щетинистый); 2 – простой, толстостенный одноклеточный удлиненный волосок с тонкозаостренной верхушкой и слабобородавчатой поверхностью

Венчик: Нижняя, как и верхняя губа покрыты эпидермисом, образующим сосочковидные выросты (рисунок 164). Удлиненно прямоугольные эпидермальные клетки образуют трубку венчика, где встречаются одиночные многочисленные мелкие кристаллы в виде призм (рисунок 163).

Опушение эпидермиса венчика неравномерное, более опушена нижняя его губа, чем верхняя. Среди многообразия волосков по венчику встречаются: одноклеточные и многоклеточные простые бородавчатые волоски, базальная клетка которых у основания расширена и верхушка заострена (рисунки 165, 167).

Среди головчатых волосков венчика по эпидермису нижней его губы встречаются волоски с одноклеточной удлиненно-округлой головкой, расположенной на одноклеточной ножке, наряду с ними располагаются головчатые волоски с округлой одноклеточной головкой, которая формируется на многоклеточной ножке (рисунок 167).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности венчика, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, (рисунок 165).

Чашечка: Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образуют эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть, а менее извилистостенные - основание чашечки (рисунок 168). Эфиромасличные железки из 8 выделительных клеток, расположенных радиально встречаются по эпидермису чашечки (рисунки 168, 169).

Вдоль жилки и в основании зубцов чашечки располагаются простые толстостенные многочисленные многоклеточные волоски с гладкой кутикулой и острой верхушкой (рисунок 169). По краю зубцов чашечки характерно наличие простых многоклеточных щетинистых волосков, стенки которых сильно утолщены (рисунок 166). В основании чашечки имеются также простые многоклеточные тонкостенные волоски с тупой закругленной верхушкой (рисунок 171). Головчатые волоски располагаются неравномерно, так по

эпидермису основания чашечки встречаются волоски на двухклеточной ножке с одноклеточной головкой, которая в сырье часто обламывается (рисунок 170). А по эпидермису чашечки в средней ее части - на одноклеточной ножке с пузыревидной одноклеточной головкой (рисунок 168) [48].

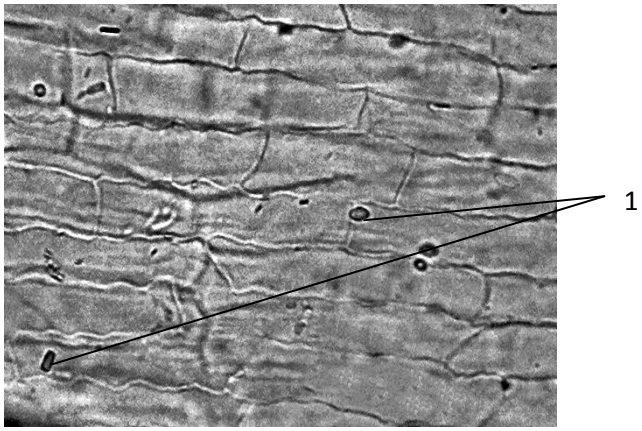


Рисунок 163 - Фрагмент эпидермиса трубки венчика тимьяна Маршалла, увел. 300х.
1 – призматические кристаллы

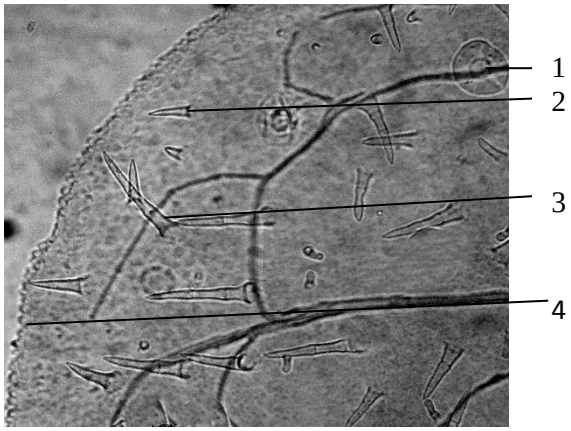


Рисунок 164 – Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна Маршалла, увел. 120х; 1 – эфиромасличная железка; 2 - простой одноклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой; 3 – простой многоклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой; 4 – сосочковидные клетки эпидермиса

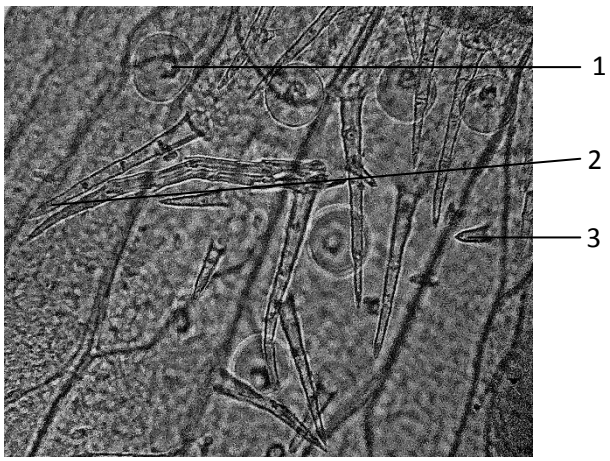


Рисунок 165 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна Маршалла, увел. 120х. 1 – эфиромасличная железка (вид сверху); 2 – простой многоклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой; 3 – простой одноклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой

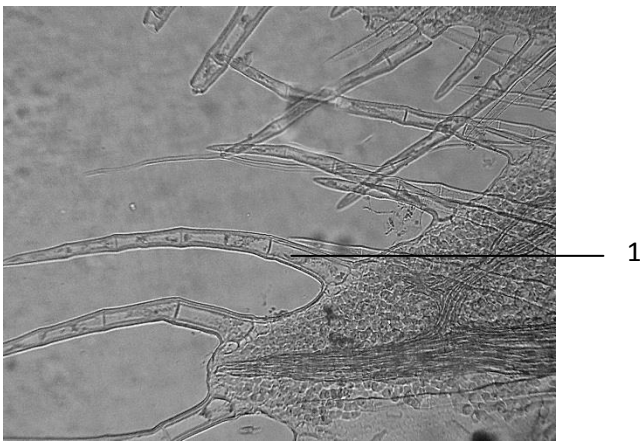


Рисунок 166 - Фрагмент эпидермиса края зубцов чашечки тимьяна Маршалла, увел. 200х. 1 – простой многоклеточный щетинистый волосок с очень сильно утолщенными клеточными стенками

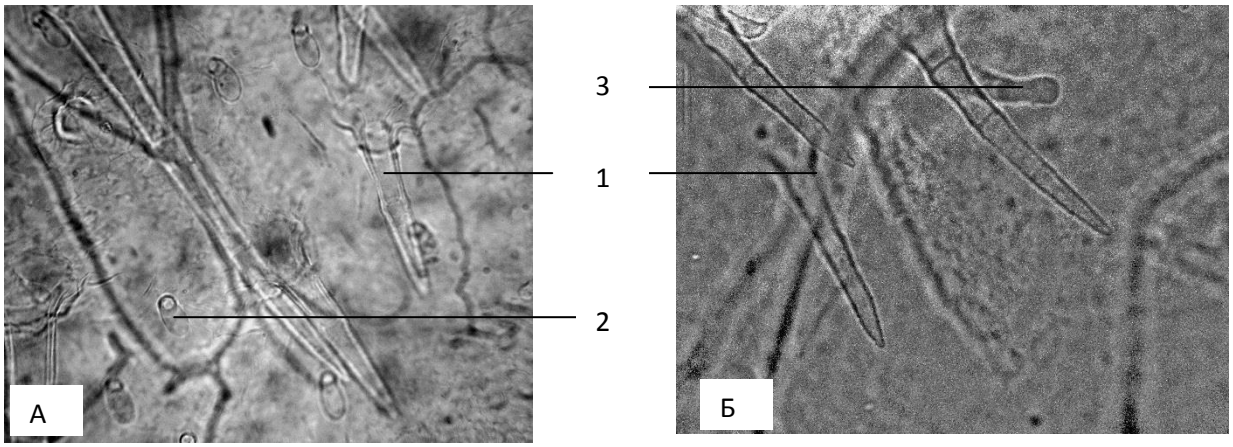


Рисунок 167 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна Маршалла, А – увел. 200х, Б – увел. 300х. 1 –простой многоклеточный бородавчатый волосок базальная клетка которого у основания расширена и верхушка заострена; 2 – головчатый волосок с одноклеточной округлой удлиненной головкой на одноклеточной ножке; 3 – головчатый волосок с округлой одноклеточной головкой и многоклеточной ножкой

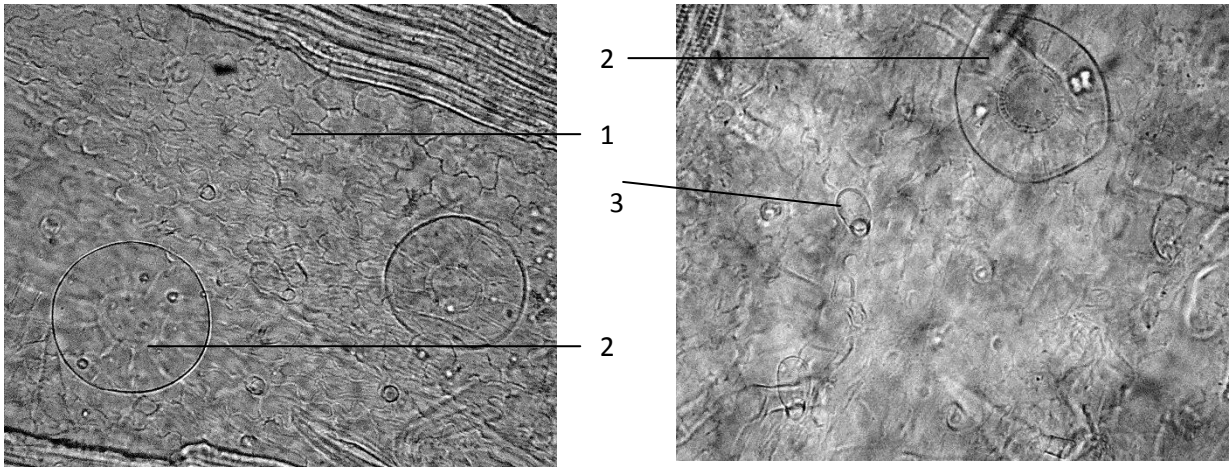


Рисунок 168 - Фрагмент эпидермиса в средней части чашечки тимьяна Маршалла, увел. 300х. 1 – устьица диацитного типа; 2 – эфиромасличная железка (вид сверху); 3 – головчатый волосок с пузыревидной одноклеточной головкой и одноклеточной ножкой

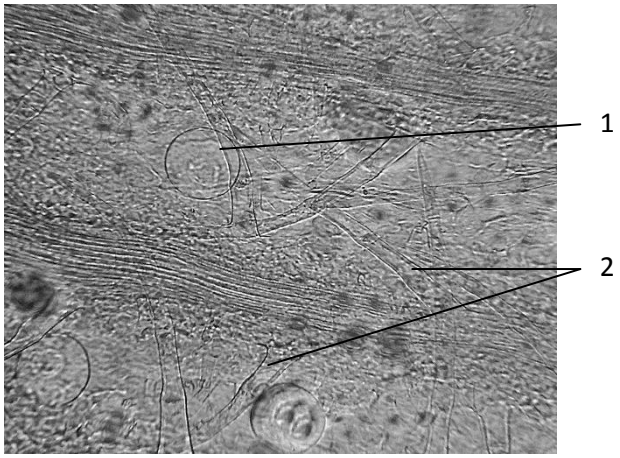


Рисунок 169 - Фрагмент эпидермиса чашечки вдоль жилки тимьяна Маршалла, увел. 120х. 1 - эфиромасличная железка (вид сверху); 2 – простые многоклеточные толстостенные остроконечные волоски с гладкой кутикулой

Рисунок 170 - Фрагмент эпидермиса в основании чашечки тимьяна Маршалла, увел. 200х. 1 - простой многоклеточный толстостенный остроконечный волосок с гладкой кутикулой; 2- фрагмент головчатого волоска на двухклеточной ножке с часто обламывающейся одноклеточной головкой

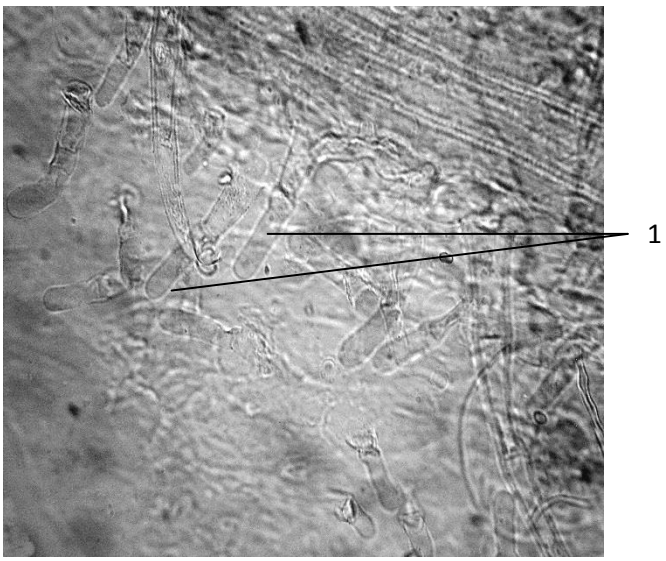


Рисунок 171 - Фрагмент эпидермиса тимьяна Маршалла в основании чашечки, увел. 300х. 1 - простые многоклеточные тонкостенные волоски с тупой закругленной верхушкой

Тимьян двуликий. Округло-четырехгранный стебель в поперечном сечении непучкового типа строения (рисунок 172), покрытый эпидермисом. В поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и

покрыт крупнозубчатой кутикулой, формирующей толстый слой. В межреберье, с поверхности, эпидермис обазован округло-прямоугольными или многоугольными клетками с четковидным утолщением клеточных стенок (рисунок 173). Продольно-удлиненные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их концы скошены (рисунок 173). Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата.

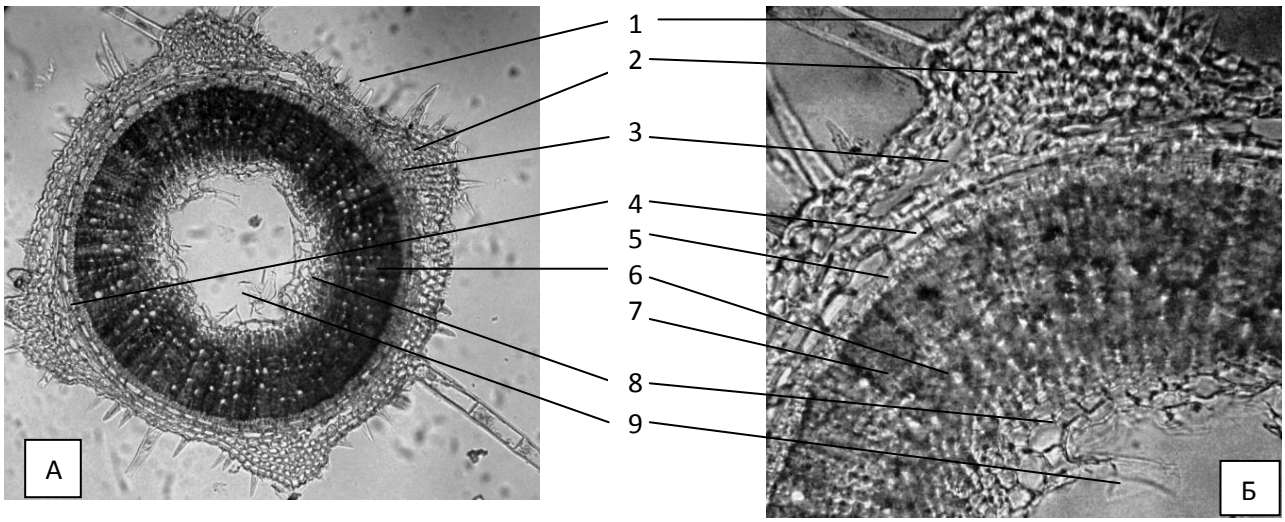


Рисунок 172 - Фрагмент стебля тимьяна двуликого в поперечном сечении, А - увел. 80х, Б - увел. 200х. 1 – эпидермис; 2 – уголковая колленхима; 3 – основная паренхима; 4 – эндодерма; 5- флоэма; 6 – сосуды ксилемы; 7 – склерефицированная паренхима; 8 – паренхима сердцевины; 9 – полость

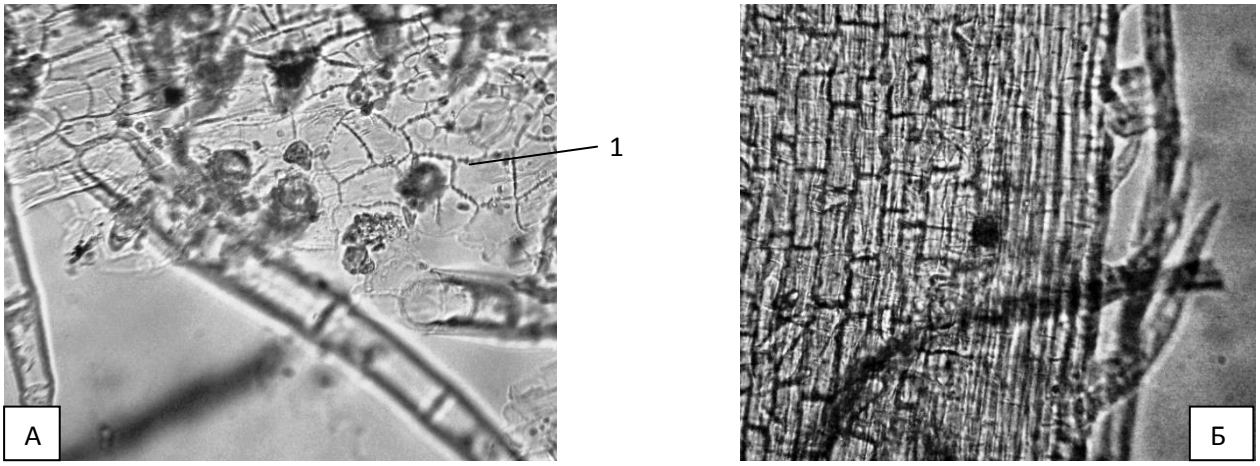


Рисунок 173 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна двуликого, увел. 200х.
А – эпидермис в межреберье, Б – эпидермис вдоль ребер
1 – клетки эпидермиса с четковидным утолщением клеточных стенок

Эпидермис стебля опушен разнообразными волосками:

- простыми колпачковидными толстостенными одноклеточными, покрытыми слегка бородавчатой кутикулой и направленными к поверхности стебля (рисунок 174). Такие волоски встречаются в основном на эпидермисе стебля в межребере;
- простыми двух-трехклеточными толстостенными с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато изогнутыми (рисунок 175);
- простыми 5-9 клеточными волосками со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым (рисунок 176) (расположенны в основном на ребрах);
- головчатыми волосками на 2-3 клеточной ножке с вытянутой головкой и расширенной базальной клеткой (рисунок 177).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 8-12 клетками эпидермиса. Данный тип железок встречается у представителей семейства губоцветные. (рисунок 178).

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 4-5 слоев залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра.

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки

основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 172).

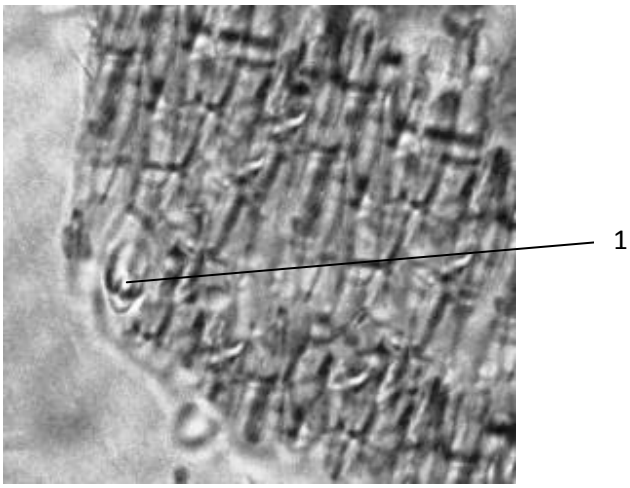


Рисунок 174 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простой колпачковидный одноклеточный толстостенный волосок, покрытый слегка бородавчатой кутикулой

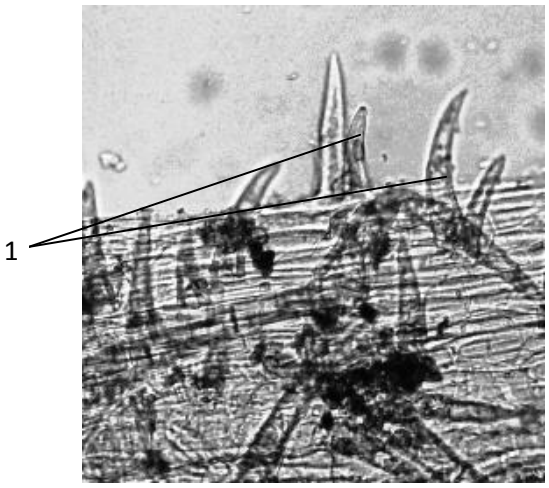


Рисунок 175 - Фрагмент стебля тимьяна двуликого по эпидермису, увел. 200х.
1 – простой двухклеточный толстостенный волосок, с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато-изогнутый

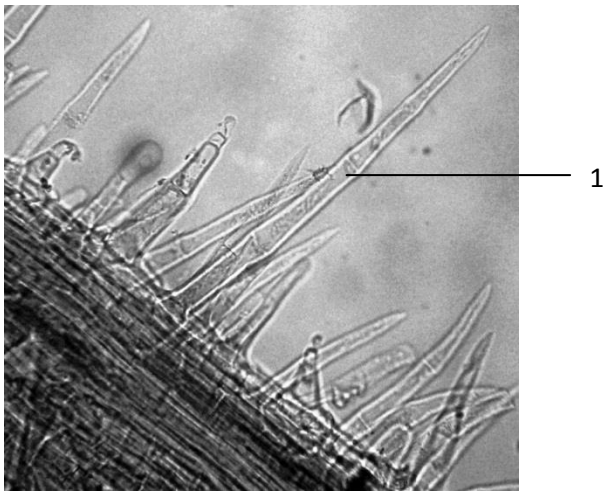


Рисунок 176 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простой пяти клеточный волосок, со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым

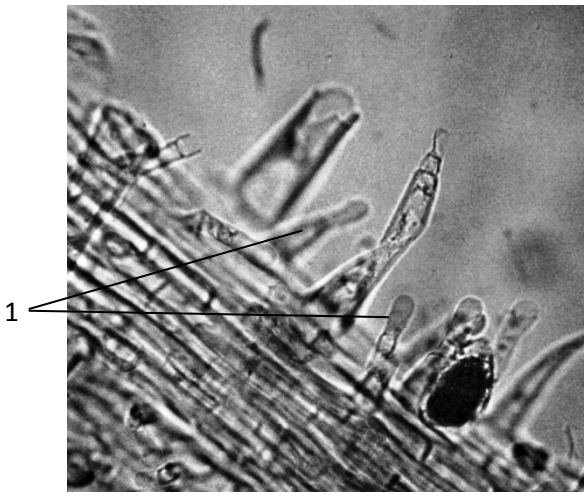


Рисунок 177 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на двух клеточной ножке с вытянутой головкой и расширенной базальной клеткой

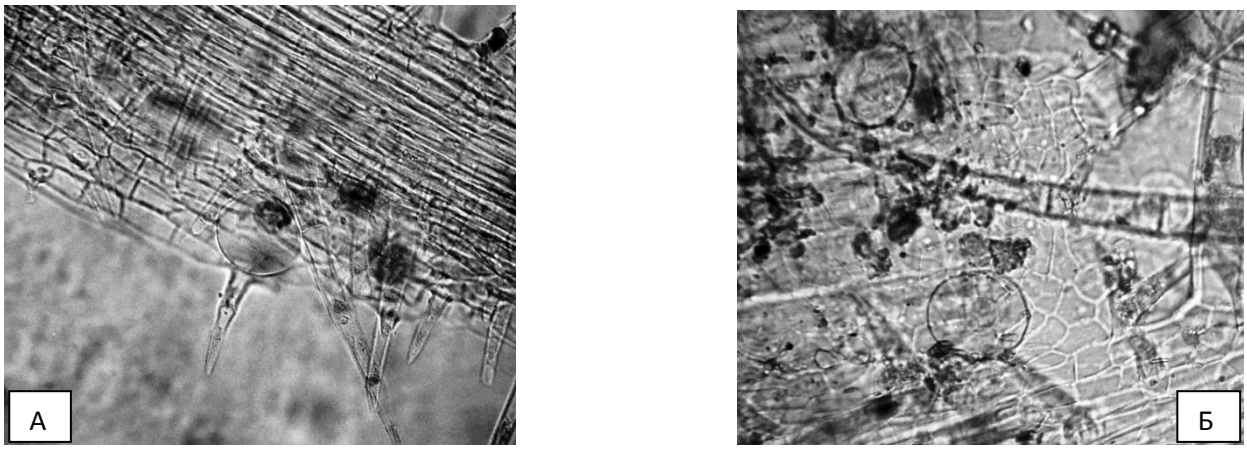


Рисунок 178- Фрагмент стебля тимьяна двуликого по эпидермису, увел. 200х.
А – вид железки с боку, Б – вид железки сверху

Лист. Верхний эпидермис листа образован прямостенными, многоугольными клетками с четковидным утолщением. Эпидермис с нижней стороны листа извилистостенный. Устьица диацитного типа, преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунки 179, 180).

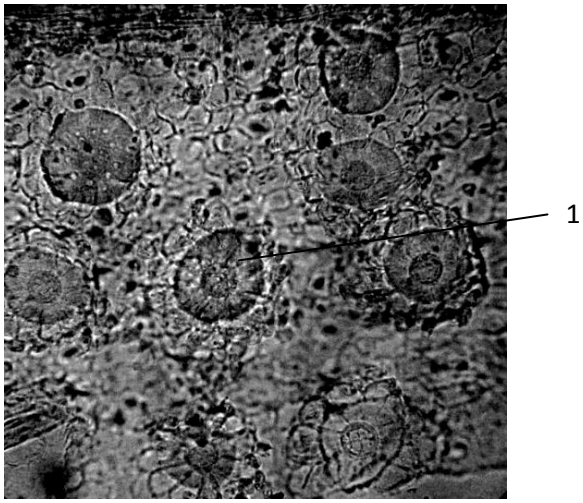


Рисунок 179 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна двуликого, увел. 200х. 1 – эфиромасличная железка

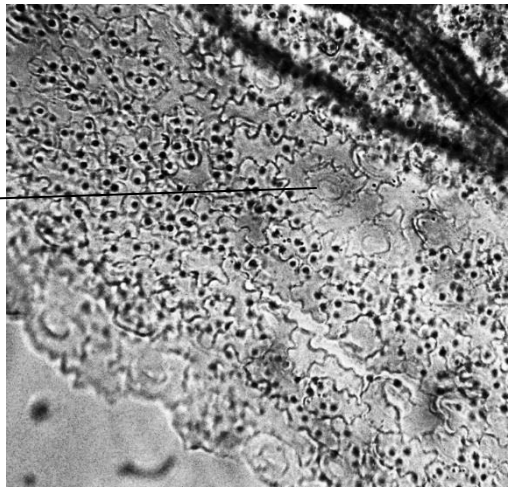


Рисунок 180 - Фрагмент нижнего эпидермиса листа тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – устьица

Удлинено прямоугольные клетки эпидермиса образуют край листа в его основания (рисунки 182, 183). Продольно удлиненные клетки с четковидным

утолщением клеточных стенок и продольной морщинистостью кутикулы характерны для жилки листа (рисунок 181).

Эпидермис листа опушен волосками различного типа:

- простыми одноклеточными, покрытыми бородавчатой кутикулой волосками, верхушка которых слегка заострена, такие волоски расположенными под углом к поверхности листовой пластинки (встречаются вдоль края листа) (рисунок 184);
- простыми двух-трехклеточными, толстостенными волосками с тонко заостренной верхушкой, с бородавчатой поверхностью, коленчатоизогнутыми (встречаются ближе к основанию листа) (рисунок 184);
- простыми четырех-восьмиклеточными волосками, стенки которых слегка утолщенны и покрыты слабобородавчатой кутикулой (щетинистыми) (встречаются у основания листа) (рисунок 185).

На обоих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 8-12 клетками, формирующие розетку (рисунки 179, 181).

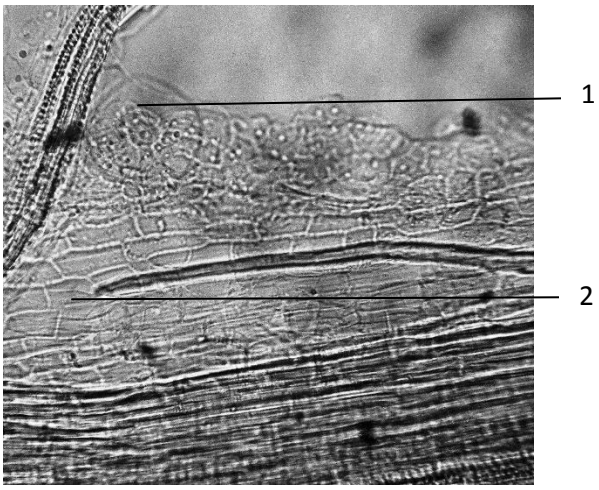


Рисунок 181 - Фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка;
2 – клетки с продольной морщинистостью кутикулы

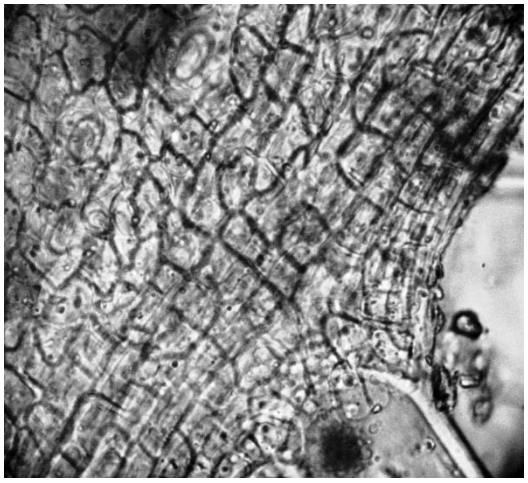


Рисунок 182 - Фрагмент эпидермиса ближе к основанию листа тимьяна двуликого, увел. 200х.

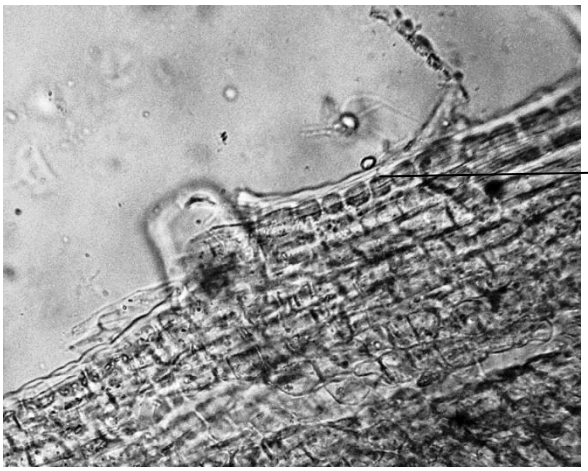


Рисунок 183 - Фрагмент эпидермиса вдоль края листа тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – клетки эпидермиса

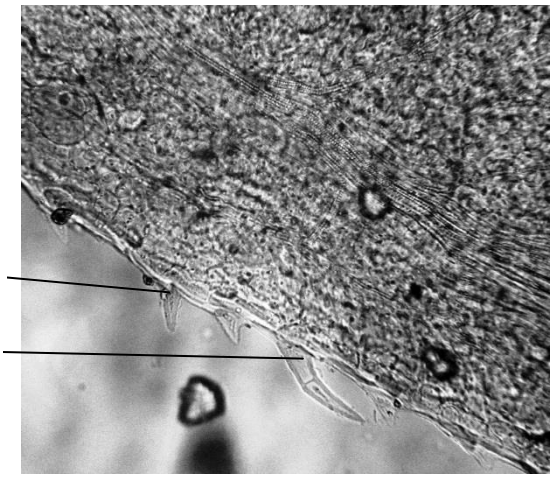


Рисунок 184 - Фрагмент края листа тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный волосок со слегка заостренной верхушкой, бородавчатой кутикулой;
2 – простой двухклеточный толстостенный волосок с тонко заостренной верхушкой, с бородавчатой поверхностью, коленчато-изогнутый

Венчик. Эпидермис верхней и нижней губы венчика извилистостенный с сосочковидными выростами (рисунок 186). Удлиненно прямоугольные, слегка извилистые эпидермальные клетки образуют трубку венчика (рисунок 187).

Опушение эпидермиса венчика неравномерно, более опушенна нижняя его губа, чем верхняя. Среди многообразия волосков по венчику встречаются волоски трех типов: одно-четырехклеточные тонкостенные волоски иногда со спадающими стенками с расширинной у основания базальной клеткой (рисунок 186); двух-четырех клеточные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой (рисунки 188, 190); и одноклеточные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой (рисунок 189).

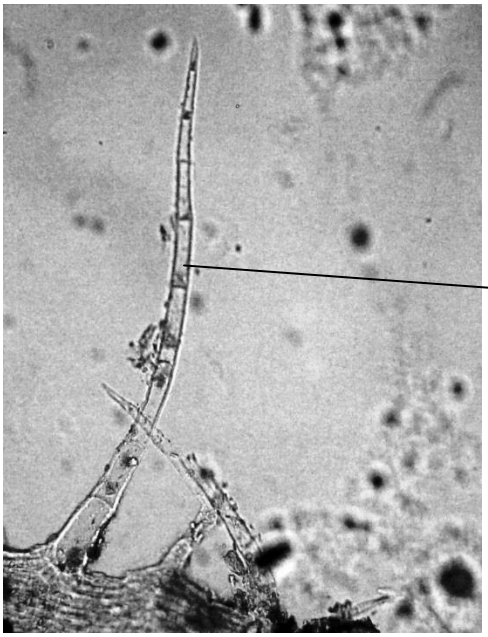


Рисунок 185 - Фрагмент края у основания листа тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простой восьмиклеточный волосок со слегка утолщенными стенками и слабо бородавчатой кутикулой (щетинистый)

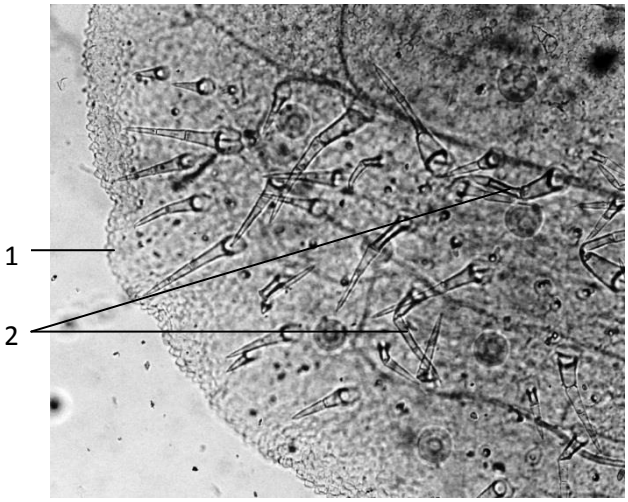


Рисунок 186 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – сосочковидные выросты клеток эпидермиса;
2 – простые трехклеточные тонкостенные волоски со спадающими стенками и расширенной у основания базальной клеткой

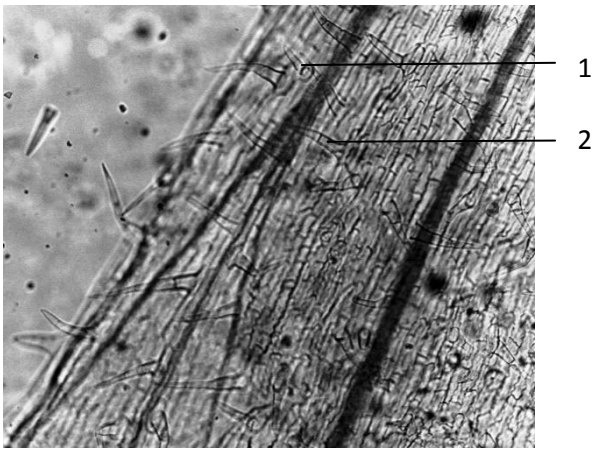


Рисунок 187 - Фрагмент трубки венчика тимьяна двуликого по эпидермису, увел. 200х.
1 – простой тонкостенный одноклеточный волосок с расширенной у основания базальной клеткой;
2 – простой двухклеточный тонкостенный волосок с расширенной у основания базальной клеткой

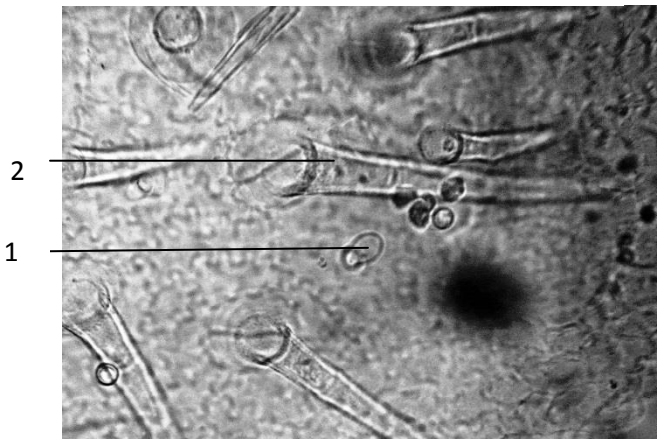


Рисунок 188 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на одноклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой;
2 – простой трехклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой

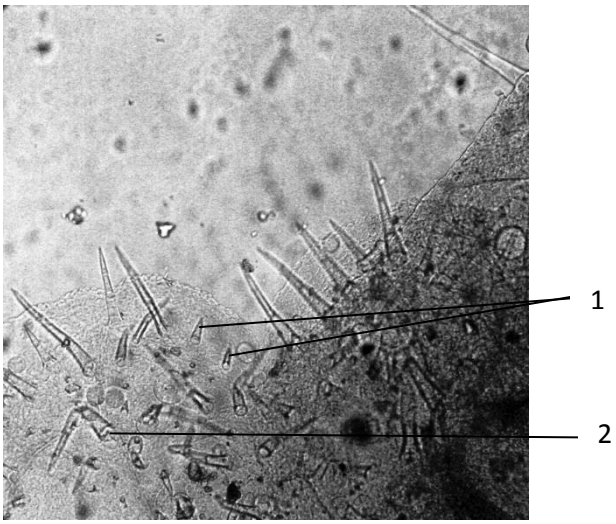


Рисунок 189 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простые одноклеточные колпачковидные волоски;
2 – простой трехклеточный тонкостенный волосок со спадающими стенками и расширенной у основания базальной клеткой

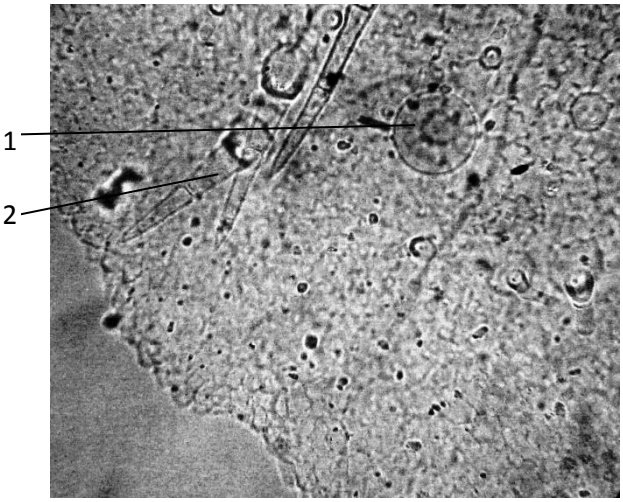


Рисунок 190 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка;
2 – простой двух клеточный бородавчатый волосок, с базальной расширенной клеткой основания и заостренной верхушкой

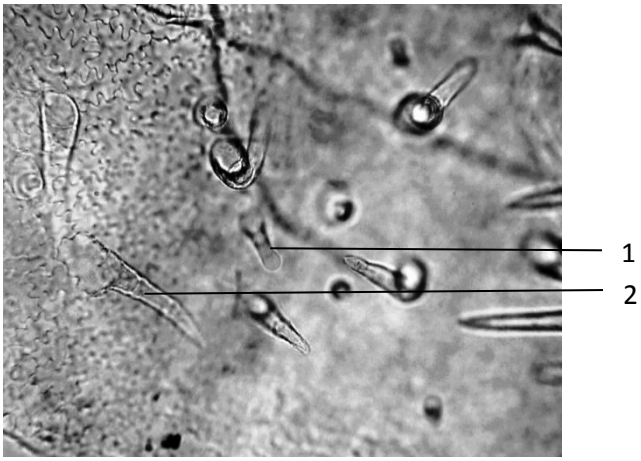


Рисунок 191 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на двух клеточной ножке с одноклеточной округлой головкой;
2 – простой трехклеточный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой

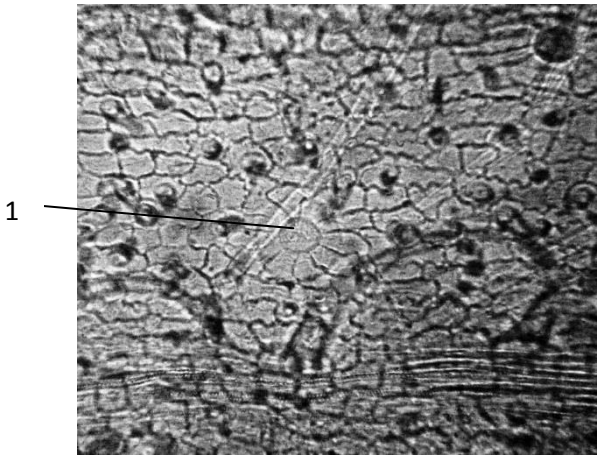


Рисунок 192 - Фрагмент эпидермиса в средней части чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка

Головчатые волоски состоящие из одноклеточной ножки с одноклеточной округлой головкой, чаще всего встречаются по эпидермису венчика нижней губы (рисунок 188). Наряду с такими волосками можно обнаружить головчатые волоски с округлой одноклеточной головкой, но уже на двухклеточной ножке (рисунок 191).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности венчика, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток (рисунок 190).

Чашечка. Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образовывают эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть (рисунки 193), а слегка извилистостенные или прямостенные - основание чашечки (рисунок 194). По эпидермису встречаются устьица диацитного типа (рисунок 193). Эфиромасличные железки из выделительных клеток, расположенных радиально встречаются по эпидермису чашечки (рисунок 192).

Простые многоклеточные толстостенные волоски, покрытые слегка бородавчатой или гладкой кутикулой с отстрой верхушкой конечной клетки многочисленно встречаются по зубцам чашечки вдоль ее жилки и основания (рисунок 199). Щетинистые суставные бородавчатые волоски, клеточные стенки которых сильно утолщенны встречаются по зубцам чашечки, ближе к верхушке (рисунок 196). По краю чашечки располагаются простые толстостенные одноклеточные колпачковидные волоски с бородавчатой кутикулой (рисунок 198) и двух-трех клеточные коленчато-изогнутые толстостенные волоски с бородавчатой поверхностью (рисунок 197).

Головчатые волоски с одноклеточной удлиненно-округлой головкой и двух-трехклеточной ножкой, базальная клетка которых более удлиненная, встречаются в средней части и ближе к основанию чашечки (рисунок 195).

Тимьян Черняева. Округло-четырехгранный стебель в поперечном сечении непучкового типа строения (рисунок 200), покрытый эпидермисом. В

поперечном сечении эпидермис образован клетками прямоугольной формы и покрыт крупнозубчатой кутикулой формирующей толстый слой.

Рисунок 193 - Фрагмент эпидермиса зубцов чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – клетки эпидермиса;
2 –диацитный тип устьиц

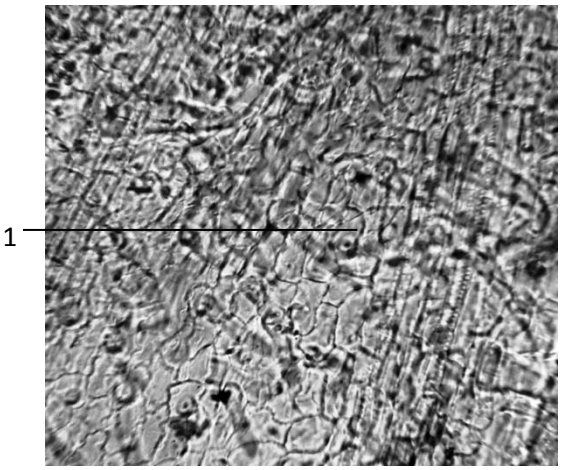


Рисунок 194 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна двуликого в основании, увел. 200х.
1 – клетки эпидермиса

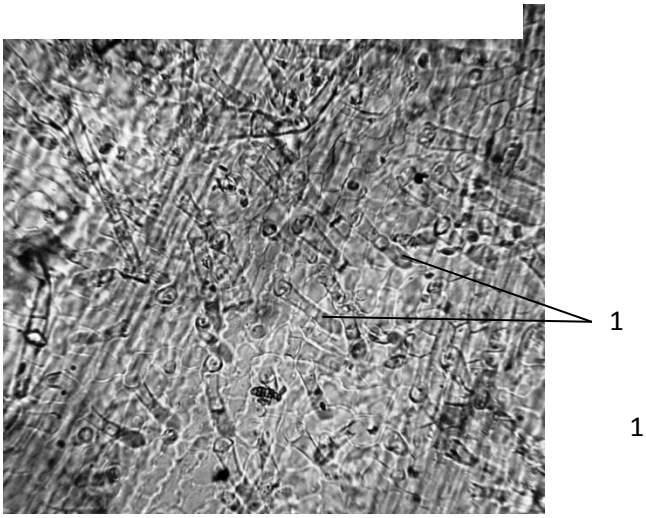


Рисунок 195 - Фрагмент эпидермиса в средней части чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – головчатые волоски с одноклеточной удлиненно-округлой головкой и двух клеточной ножкой, базальная клетка которой более удлиненная

Рисунок 196 - Фрагмент эпидермиса зубцов чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – щетинистые суставные волоски с сильно утолщенными клеточными стенками и бородавчатой кутикулой

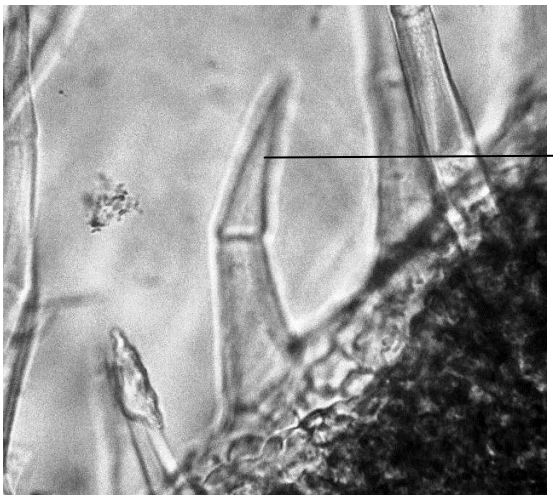


Рисунок 197 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – простой двухклеточный толстостенный волосок с тонко заостренной верхушкой, с бородавчатой поверхностью, коленчато-изогнутый

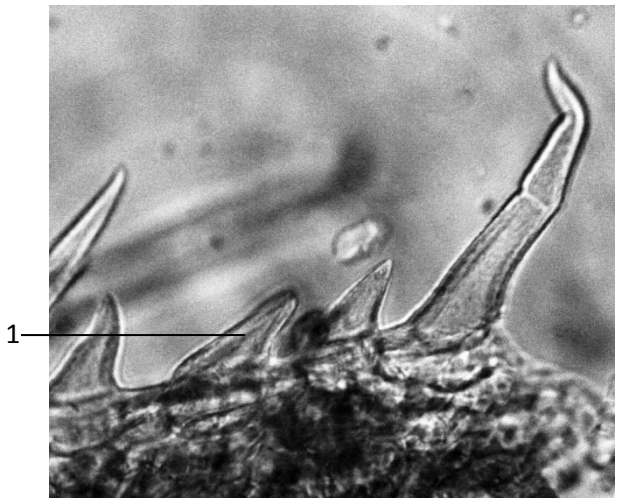


Рисунок 198 - Фрагмент эпидермиса края чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – одноклеточный колпачковидный волосок с бородавчатой кутикулой

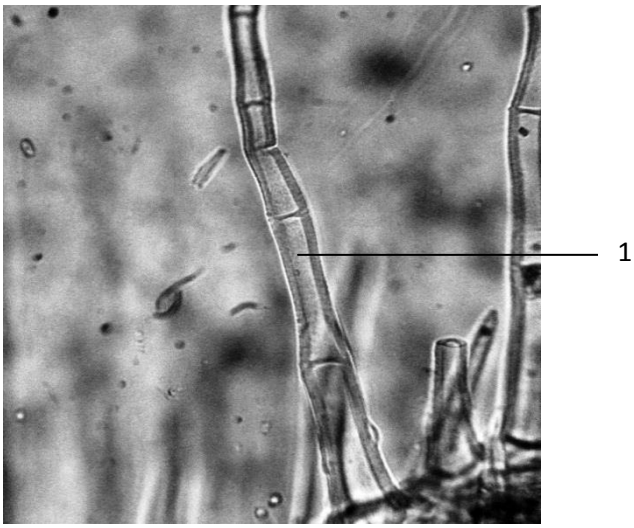


Рисунок 199 - Фрагмент эпидермиса ближе к основанию чашечки тимьяна двуликого, увел. 200х.
1 – многоклеточный толстостенный остроконечный волосок

В межреберье, с поверхности, эпидермис обазован округло-прямоугольными или многоугольными клетками с четковидным утолщением клеточных стенок. Продольно-удлиненные клетки эпидермиса формируются в ребрах стебля, иногда их концы скошены (рисунок 201). Отмечено наличие диацитного типа устьичного аппарата.

Эпидермис опушен разнообраными волосками:

- простыми толстостенными одноклеточными, покрытыми слегка бородавчатой кутикулой (рисунок 203). Наличие данных волосков отмечено в основном по эпидермису стебля в межреберье;
- простыми толстостенными одно-трехклеточными, покрытыми бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато изогнутыми (рисунок 202);
- простыми 4-8 клеточными волосками со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым (расположенны чаще на ребрах) (рисунок 202);
- головчатыми волосками состоящими из двухклеточной ножки с вытянутой головкой (рисунок 205), встречаются в основном в межреберье стебля по эпидермису;
- головчатыми волосками с одноклеточной округлой головкой и одноклеточной ножкой (рисунок 203), встречаются в основном в межреберье эпидермиса стебля.

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности стебля, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, окруженные 8-12 клетками эпидермиса. Данный тип железок встречается у представителей семейства губоцветные (рисунок 204).

Под эпидермисом, а именно в ребрах в 2-3 слоя залегает колленхима, в межреберье она образует один слой. Далее располагается основная паренхима, прозенхимные клетки которой в радиальном направлении чаще всего сдавлены

и образуют один-два слоя. Прямоугольные клетки эндодермы, вытянутые по окружности, входят в состав первичной коры и отделяют ее от центрального цилиндра (рисунок 200).

Флоэма, состоящая из мелких клеток и слаборазвитых механических элементов начинает зону центрального цилиндра, занимая маленький объем.

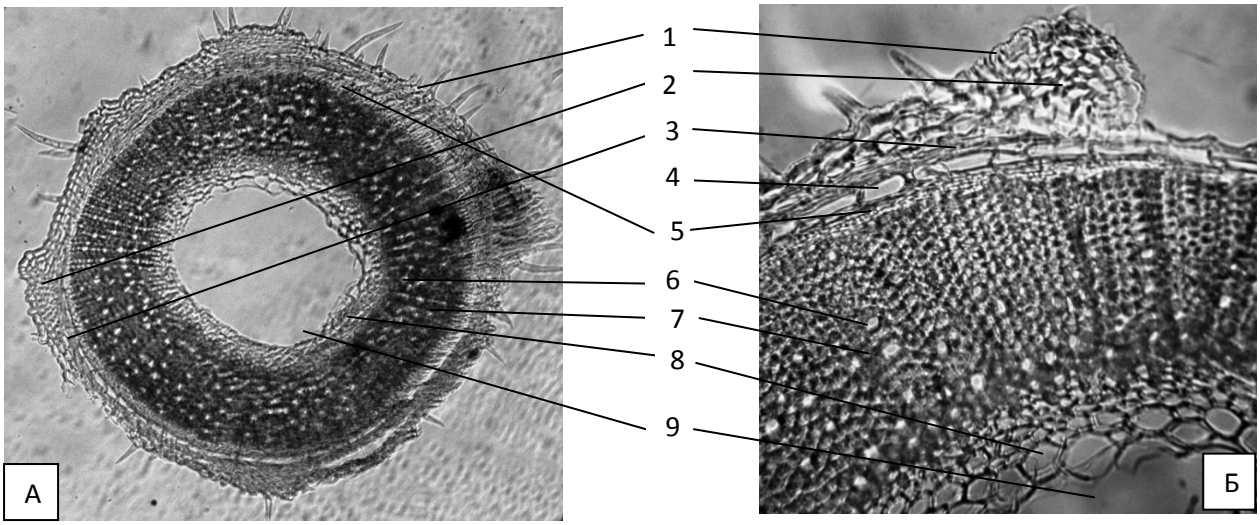


Рисунок 200 - Фрагмент поперечного среза стебля тимьяна Черняева, А - увел. 80х, Б - увел. 200х.
1 – эпидермис; 2 – уголковая колленхима; 3 – основная паренхима; 4 – эндодерма; 5- флоэма; 6 – сосуды ксилемы; 7 – склерефицированная паренхима; 8 – паренхима сердцевины; 9 – полость.

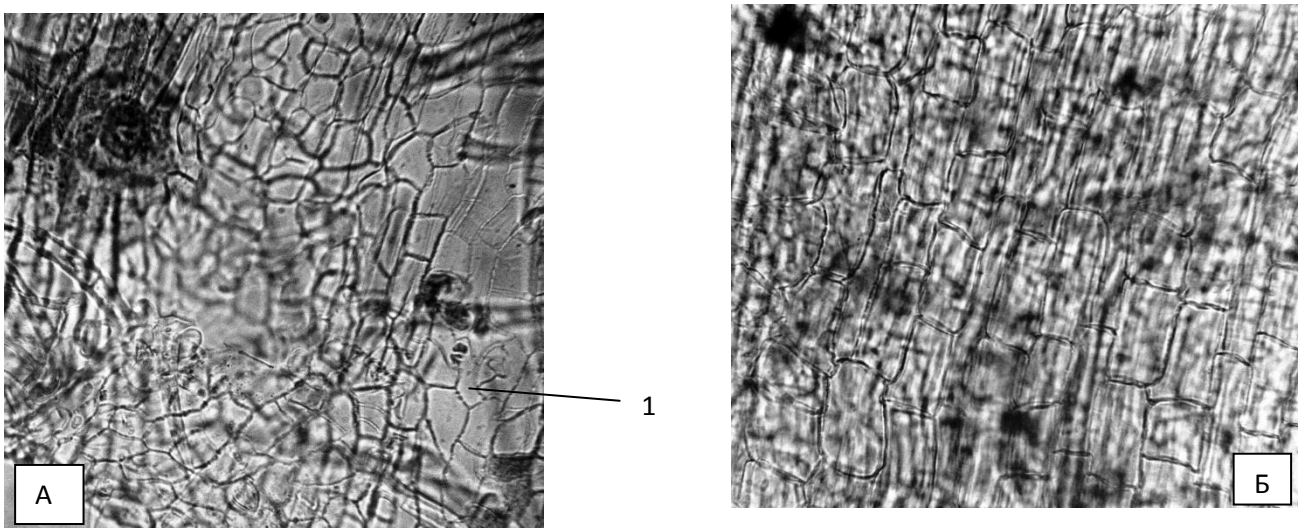


Рисунок 201 – Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Черняева, увел.200х.
А – эпидермис в межреберье, Б – эпидермис вдоль ребер
1 – клетки эпидермиса с четко видным утолщением клеточной стенки

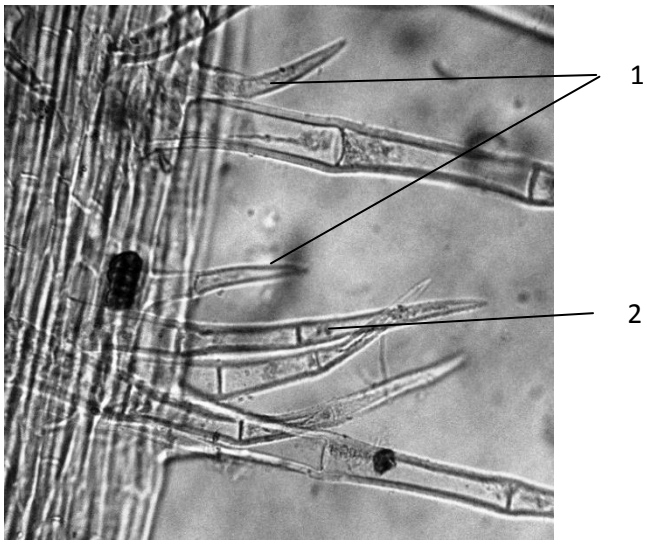


Рисунок 202 - Фрагмент эпидермиса вдоль ребра стебля тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – простой двухклеточный толстостенный волосок, с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато-изогнутый
2 – простой пятиклеточный волосок, со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым

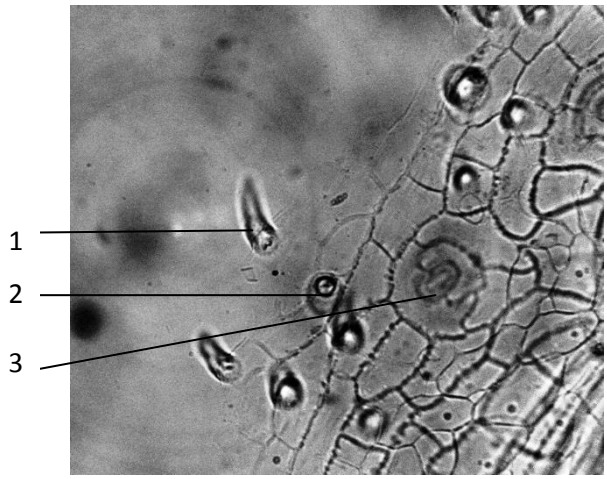


Рисунок 203 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Черняева в межреберье, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный толстостенный волосок со слегка бородавчатой кутикулой
2 – головчатый волосок с округлой головкой на одноклеточной ножке
3 – устьица

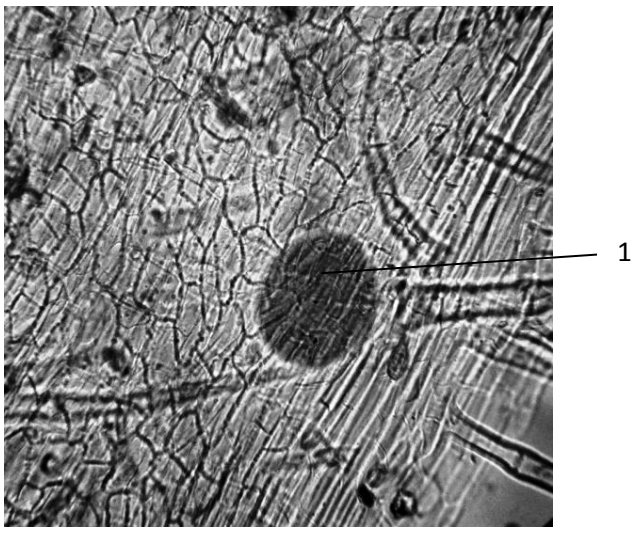


Рисунок 204 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка

Рисунок 205 - Фрагмент эпидермиса стебля тимьяна Черняева в межреберье, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на двух клеточной ножке с вытянутой головкой

Радиальные ряды сосудов ксилемы чередуются со склерифицированной паренхимой и образуют большую часть центрального цилиндра.

В центре стебля формируется большая полость, которая образуется в результате разрушения клеток основной паренхимы. Не разрушенные клетки

основной паренхимы тонкостенные, крупные и сдавлены в радиальном направлении (рисунок 200).

Лист. Верхний эпидермис листа образован извилистостенными клетками. Эпидермис с нижней стороны листа извилистостенный, с продольной складчатостью кутикулы. Устьица диацитного типа, преимущественного встречаются на нижней стороне листа (рисунки 206, 207).

Удлинено прямоугольные клетки эпидермиса образуют край листа в его основании. Продольно удлиненные клетки с четковидным утолщением клеточных стенок и с продольной морщинистостью кутикулы характерны для жилки листа (рисунки 208, 209).

Эпидермис листа опущен волосками различного типа:

- простыми одно-двухклеточными колпачковидными бородавчатыми волосками с заостренной верхушкой и расширенным основанием (встречаются по поверхности эпидермиса листа) (рисунок 210);
- простыми с бородавчатой кутикулой одноклеточными волосками, верхушка которых слегка заострена, расположенными к поверхности листовой пластинки под углом (встречаются по краю листовой пластинки) (рисунок 208);
- простыми трех-восьмиклеточными толстостенными волосками с бахромчатой кутикулой (щетинистыми) (встречаются ближе к основанию листа) (рисунки 208, 211).

На обоих сторонах листа, формируются в большом количестве эфиромасличные железки, по строению относятся к выделительным структурам семейства губоцветных (яснотковых), в местах их прикрепления они окружены 8-14 клетками, формирующие розетку (рисунки 206, 207).

Венчик. Эпидермис верхней и нижней губы венчика извилистостенный с сосочковидными выростами (рисунок 214). Удлиненно прямоугольные или слегка извилистые эпидермальные клетки образуют трубку венчика (рисунки 212, 213, 214).

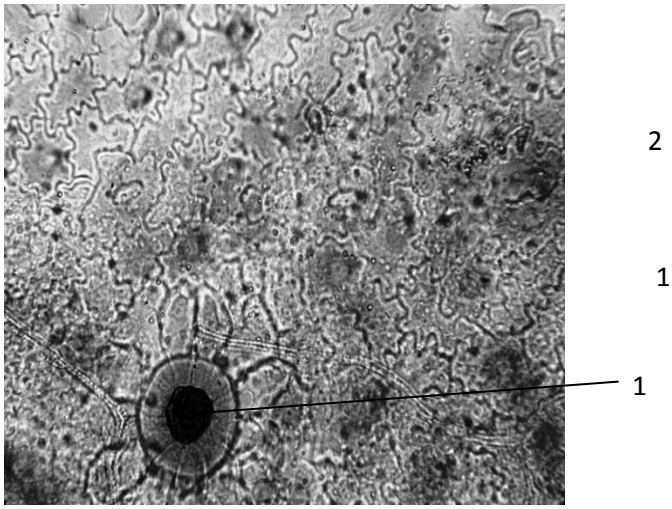


Рисунок 206 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка

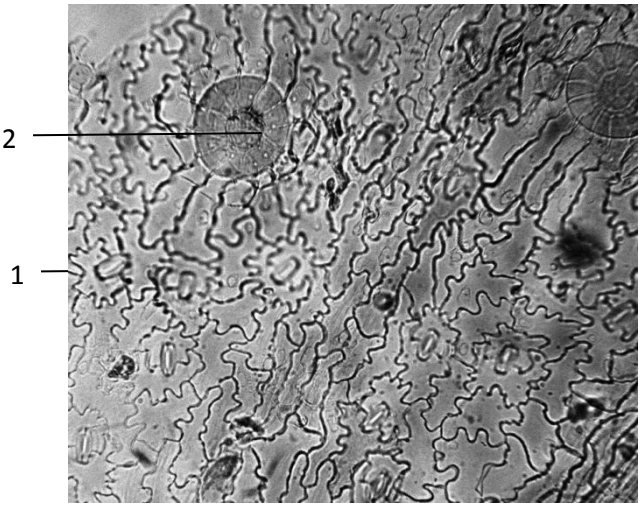


Рисунок 207 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Черняева с нижней стороны листа, увел. 200х.
1 – устьица
2 – эфиромасличная железка

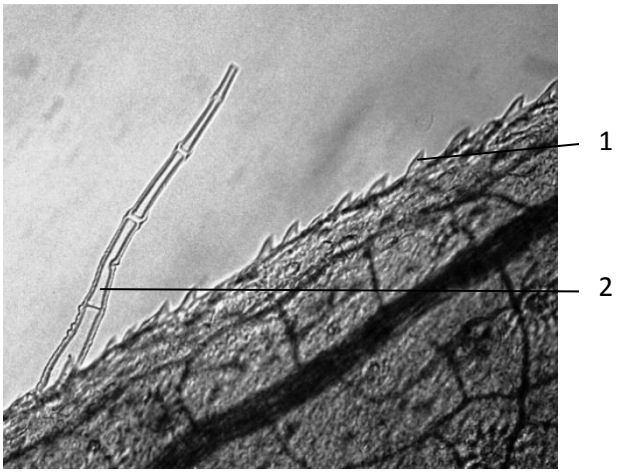


Рисунок 208- Фрагмент эпидермиса края листа тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный волосок со слегка заостренной верхушкой, бородавчатой кутикулой
2 – простой пятиклеточный толстостенный волосок с бахромчатой кутикулой (щетинистый)

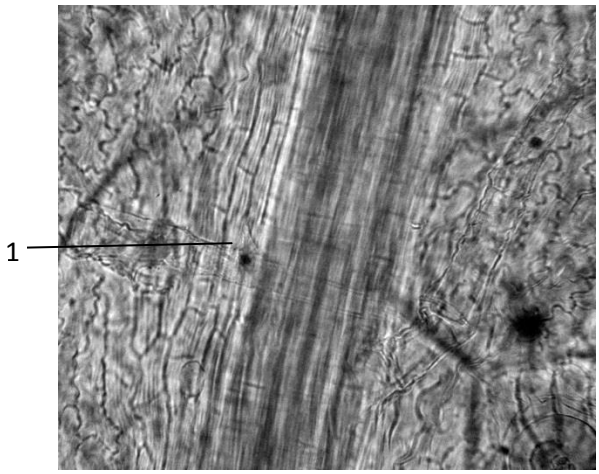


Рисунок 209 - Фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – клетки эпидермиса

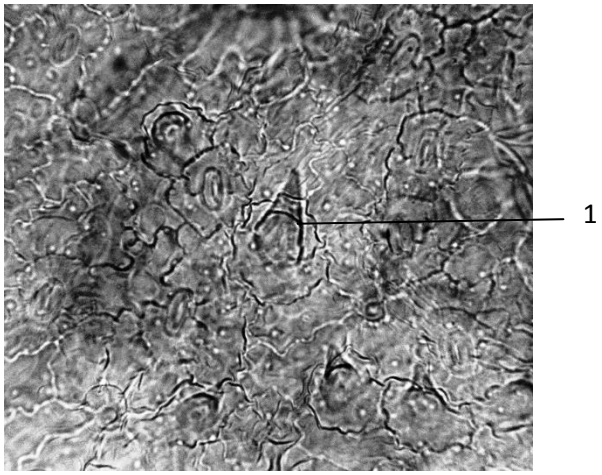


Рисунок 210 - Фрагмент эпидермиса листа тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – простой одноклеточный колпачковидный, бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенным основанием

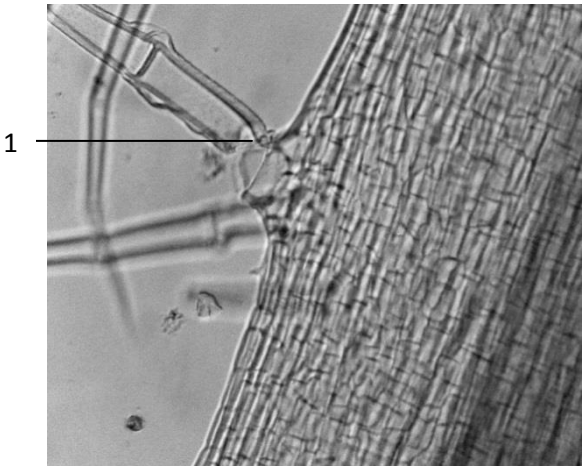


Рисунок 211 - Фрагмент эпидермиса ближе к основанию листа тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – основание простого волоска с бахромчатой кутикулой

Эпидермис венчика опушен простыми и головчатыми волосками. Простые волоски трех типов: тонкостенные одноклеточные со слегка заостренной или тупой верхушкой (встречаются в основании венчика) (рисунок 218); двух-пятиклеточные тонкостенные (рисунок 212); двух-шестиклеточные толстостенные бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой (рисунок 213).

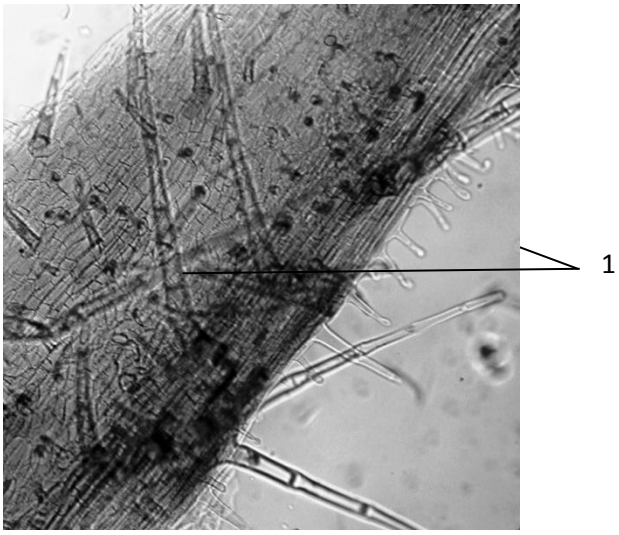


Рисунок 212 - Фрагмент эпидермиса трубки венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – пятиклеточный тонкостенный волосок

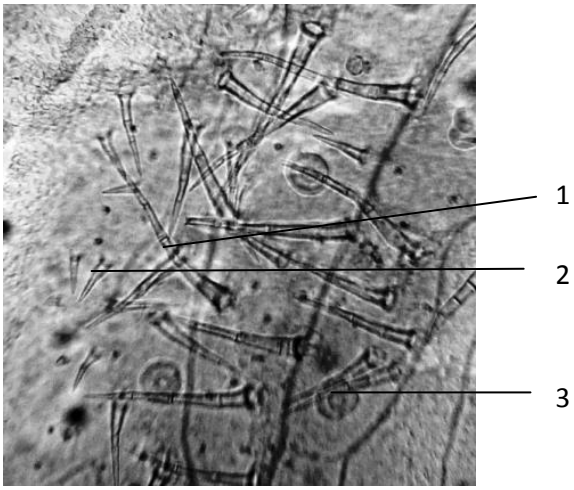


Рисунок 213 - Фрагмент эпидермиса нижней губы венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – пятиклеточный толстостенный бородавчатый волосок с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой;
2 – простой двухклеточный тонкостенный волосок;
3 – эфиромасличная железка

Наряду с простыми волосками встречаются головчатые волоски на двух-трехклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой (рисунок 217).

Эфиромасличные железки в большом количестве равномерно располагаются по поверхности венчика (рисунки 213, 216).

Чашечка. Извилистостенные клетки со складчатой кутикулой образовывают эпидермис зубцов чашечки и среднею ее часть, а менее извилистостенные или прямостенные - основание чашечки (рисунки 219, 220). Эфиромасличные железки равномерно располагаются по поверхности чашечки (рисунок 221).

Двух-пятиклеточные толстостенные с гладкой кутикулой и острой верхушкой простые волоски многочисленны по жилке, основанию зубцов чашечки (рисунки 221, 222). Концы зубцов чашечки опушены щетинистыми суставными волосками, клеточные стенки, которых сильно утолщенны (рисунки 219, 220). Так же ближе к основанию чашечки встречаются одно-двухклеточные остроконечные бородавчатые волоски (рисунок 223).

- Головчатые волоски имеют следующее строение: с одноклеточной овальной (вытянутой) головкой на двух-трехклеточной ножке и с пузыревидной одноклеточной головкой, формирущейся на одноклеточной ножке (рисунки 221, 222).

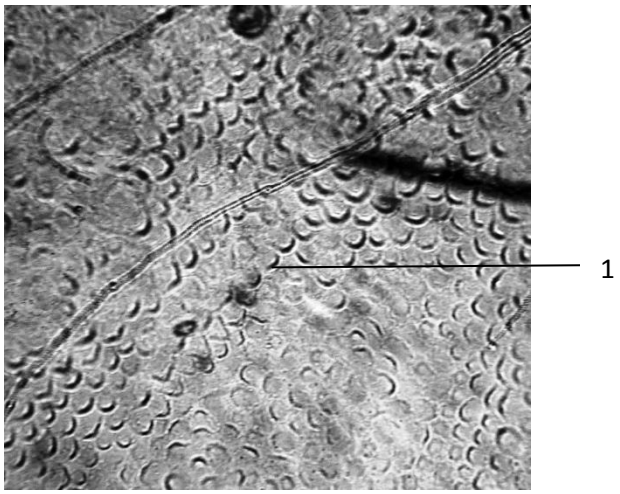


Рисунок 214 - Фрагмент эпидермиса верхней губы венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – сосочковидные выросты клеток эпидермиса

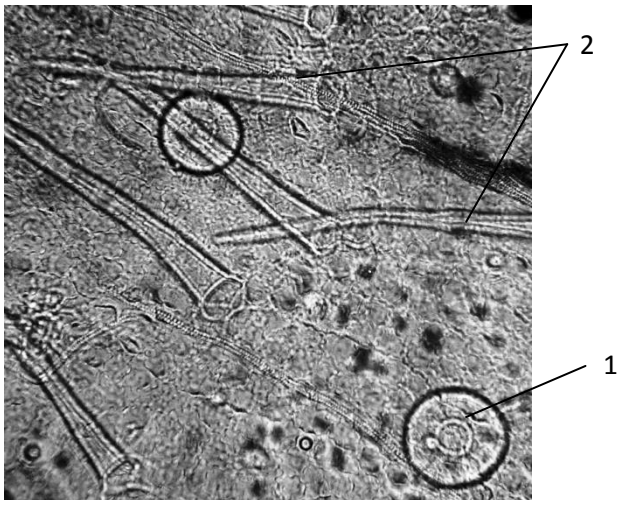


Рисунок 215 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – эфиромасличная железка
2 – пятиклеточные толстостенные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой

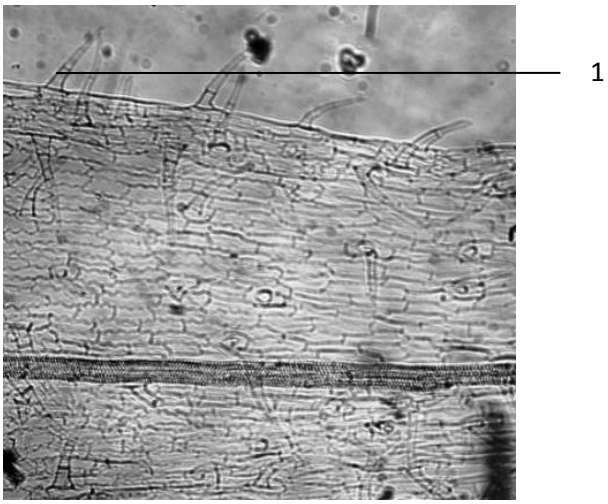


Рисунок 216 - Фрагмент эпидермиса трубки венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – трехклеточный тонкостенный волосок

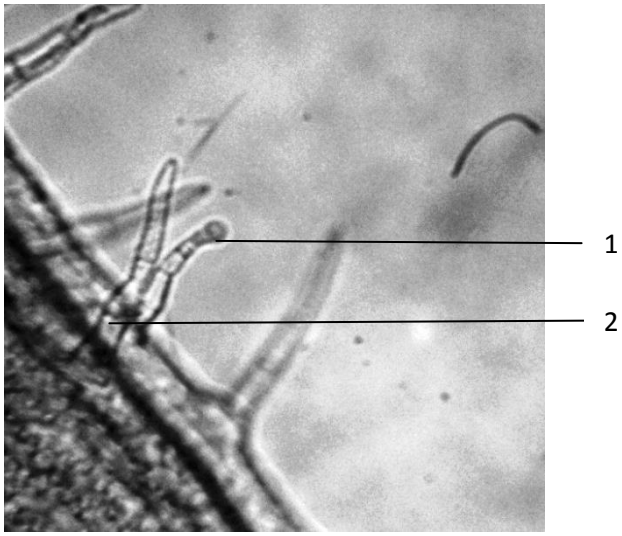


Рисунок 217 - Фрагмент эпидермиса венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – головчатый волосок на трех клеточной ножке с одноклеточной овальной головкой;
2 – трехклеточный толстостенный бородавчатый волосок с расширенной у основания базальной клеткой

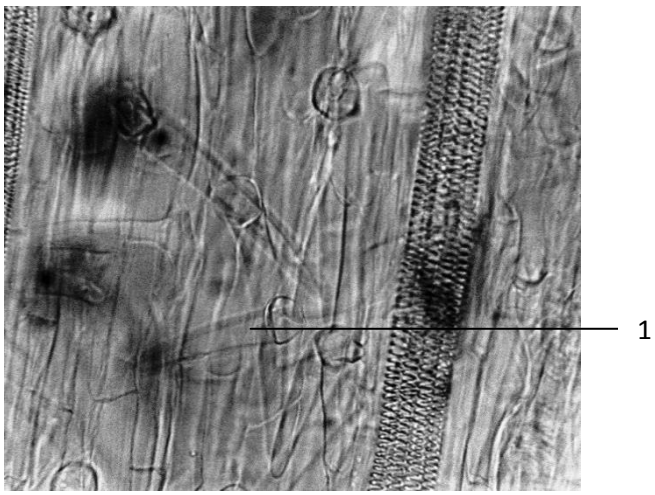


Рисунок 218 - Фрагмент эпидермиса трубки венчика тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – тонкостенный одноклеточный волосок со слегка заостренной верхушкой

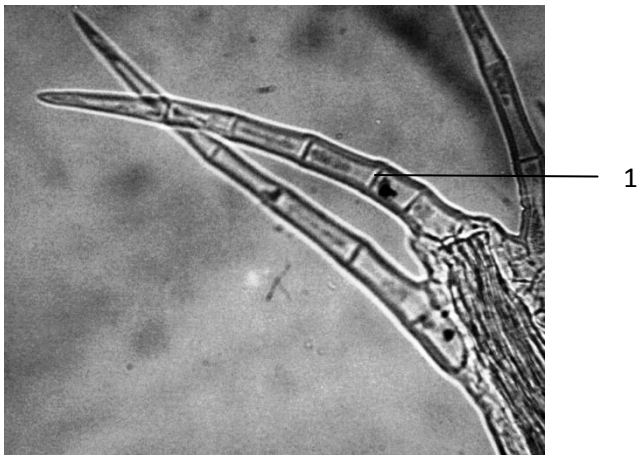


Рисунок 219 - Фрагмент эпидермиса зубцов чашечки тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – щетинистый суставной волосок с сильно утолщенными клеточными стенками

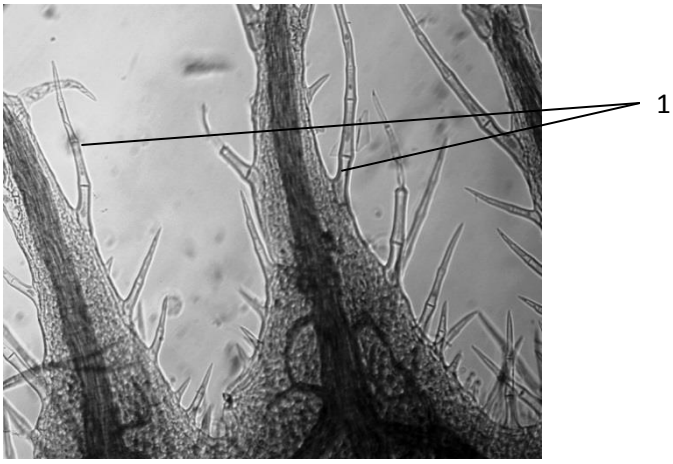


Рисунок 220 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна Черняева, увел. 80х.
1 – щетинистый волосок с сильно утолщенными клеточными стенками

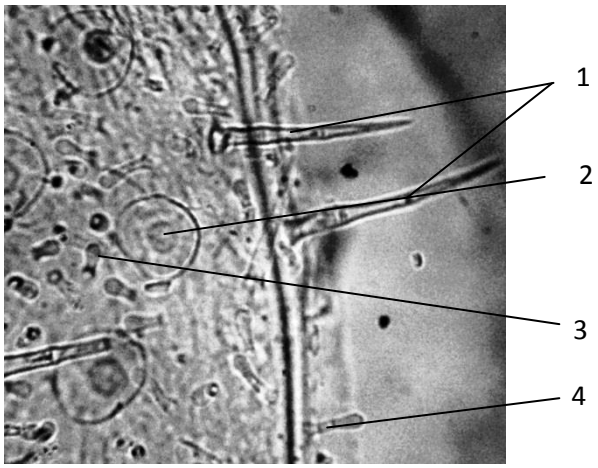


Рисунок 221 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 – трехклеточный толстостенный остроконечный волосок с гладкой кутикулой;
2 – эфиромасличная железка;
3 – головчатый волосок с одноклеточной пузыревидной головкой на одноклеточной ножке;
4 – головчатый волосок с одноклеточной овальной головкой на двухклеточной ножке

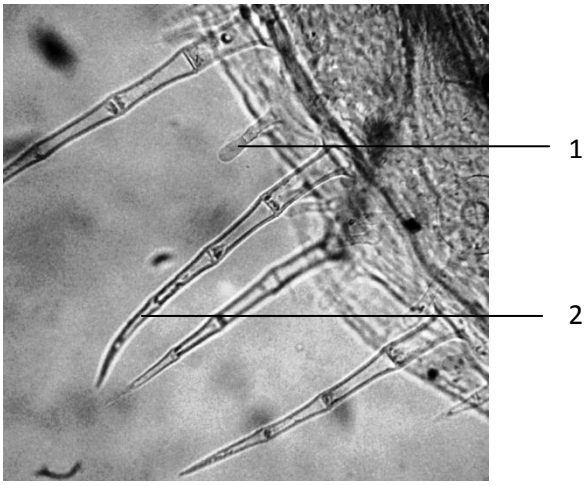


Рисунок 222 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 - головчатый волосок с одноклеточной овальной головкой на двухклеточной ножке;
2 – простой пятиклеточный толстостенный остроконечный волосок с

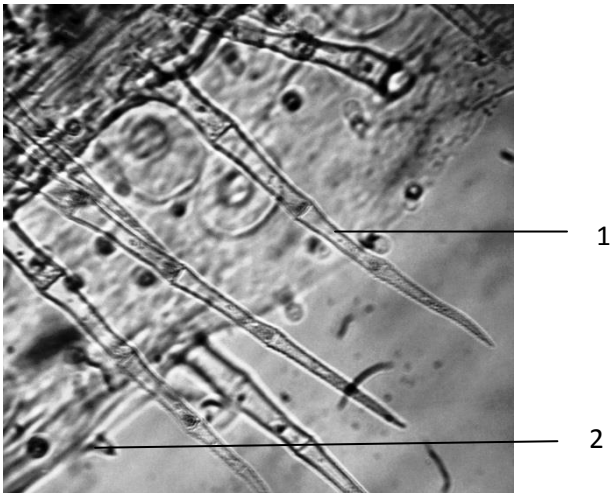


Рисунок 223 - Фрагмент эпидермиса чашечки тимьяна Черняева, увел. 200х.
1 - простой пятиклеточный толстостенный остроконечный волосок с гладкой кутикулой;
2 – одноклеточный остроконечный бородавчатый волосок

Таким образом, сравнительный анализ анатомических признаков позволил выявить микродиагностические признаки для определения подлинности сырья, которыми являются: для стебля, листа, чашечки и венчика – степень опушенности и характер волосков (таблица 31); наличие эфиромасличных железок, кристаллов в трубке венчика (таблицы 29, 30).

Таблица 30 - Сравнительная характеристика микродиагностических признаков растений рода тимьян секции Marginati A. Kern.

Диагностические признаки		Подсекция 1 Marginate	Подсекция 2 Vertici Mati		
		Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
Эпидермис стебля	Форма клеток	Прямоугольные	Прямоугольные	Прямоугольные	Прямоугольные
	Наличие кутикулы	Клетки эпидермиса покрыты крупнозубчатой кутикулой	Клетки эпидермиса покрыты крупнозубчатой кутикулой	Клетки эпиднрмиса покрыты крупнозубчатой кутикулой	Клетки эпидермиса покрыты крупнозубчатой кутикулой
	Форма клеток в межреберье	Округло-прямоугольные или многоугольные	Округло-прямоугольные иногда со слегка извилистыми боковыми стенками или многоугольные	Округло-прямоугольные или многоугольные	Округло-прямоугольные или многоугольные
	Форма клеток на ребрах	Продольно-удлиненные, иногда со скошенными концами	Продольно удлиненные, иногда со скошенными концами	Продольно удлиненные, иногда со скошенными концами	Продольно-удлиненные, иногда со скошенными концами
	Наличие устьиц	Диацитный тип устьиц	Диацитный тип устьиц	Диацитный тип устьиц	Диацитный тип устьиц
	Типы волосков	-Простые одно-трех-клеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, часто коленчато-изогнутые; -Простые одноклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой; -Головчатые на одноклеточной ножке с округлой или овальной одноклеточной головкой	- Простые толстостенные колпачковидной формы волоски, одноклеточные, покрыты бородавчатой кутикулой, у основания которых образуется цистолит; такие волоски крючковидно изогнутые или прижаты к поверхности; -Простые одно-, двухклеточные толстостенные со слегка бородавчатой кутикулой; -Простые 3-5-6- клеточные, со слегка бородавчатой поверхностью с зернистым	- Простые двух-, трехклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато-изогнутые; - Простые колпачковидные толстостенные одноклеточные с бородавчатой кутикулой, прижатые к поверхности; - Простые 5-9-клеточные со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым; - Головчатые на 2-3-клеточной ножке с вытянутой головкой и расширенной базальной	- Простые одно-, трехклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, чаще всего коленчато-изогнутые; - Простые одноклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой; - Простые 4-8-клеточные со слегка бородавчатой поверхностью, с зернистым содержимым; - Головчатые на одноклеточной ножке с округлой или овальной одноклеточной головкой - Головчатые на двухклеточной ножке с вытянутой одноклеточной головкой

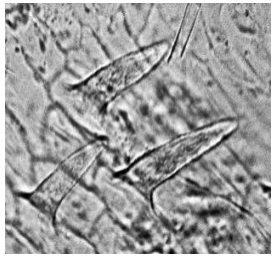
			содержимым; - Головчатые на одноклеточной ножке с округлой головкой	клеткой	
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-12 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 11-15 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-12 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-12 клетками, формирующие розетку
Лист	Форма клеток верхнего эпидермиса	Извилистостенные	Ломанноизвилистостенные с четковидным утолщением	Прямостенные, многоугольные с четковидным утолщением	Извилистостенные
	Форма клеток нижнего эпидермиса	Более извилистостенные, чем клетки верхнего эпидермиса	Извилистостенные	Извилистостенные	Более извилистостенные, чем клетки верхнего эпидермиса
	Наличие устьиц	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа	Диацитный тип устьиц преимущественно встречается на нижней стороне листа
	Типы волосков	-Простые одноклеточные колпачковидные бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенным основанием; -Простые двух-трех-клеточные толстостенные с бахромчатой кутикулой; -Простые одноклеточные бородавчатые волоски, верхушка которых заострена, располагаются к поверхности листа под	- Простые одноклеточные бородавчатые волоски, верхушка которых слегка заострена, располагаются к поверхности листа под углом; - Простые 2-5- клеточные, покрытые слабобородавчатой кутикулой, клеточные стенки которых слегка утолщенны; - Простые толстостенные одноклеточные с заостренной верхушкой и бородавчатой поверхностью	- Простые одноклеточные, покрытые бородавчатой кутикулой со слегка заостренной верхушкой, направлены под углом к поверхности листовой пластинки; - Простые четырех-, восьми клеточные со слегка утолщенными клеточными стенками и слабобородавчатой кутикулой; -Простые двух-, трехклеточные толстостенные с бородавчатой поверхностью	- Простые одноклеточные бородавчатые волоски, верхушка которых слегка заострена, располагаются к поверхности листа под углом; - Простые одно-, двухклеточные колпачковидные бородавчатые волоски с заостренной верхушкой и расширенным основанием; - Простые трех-, восьми клеточные толстостенные волоски с бахромчатой кутикулой

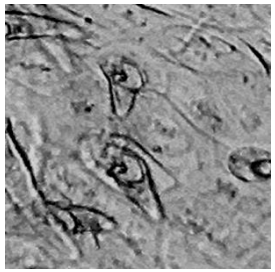
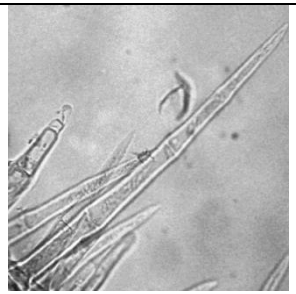
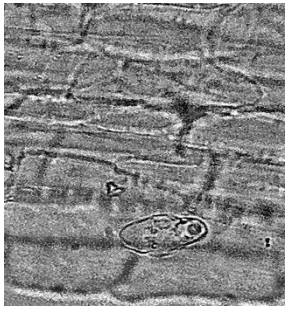
		углом; -Головчатые на одноклеточной ножке с одноклеточной округлой головкой		и тонко заостренной верхушкой, коленчатоизогнутые	
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-14 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 11-15 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-12 клетками, формирующие розетку	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток, в местах их прикрепления они окружены 8-14 клетками, формирующие розетку
Чашечка	Форма клеток эпидермиса	Извилистостенный со складчатой кутикулой	Извилистостенный со складчатой кутикулой	Извилистостенный со складчатой кутикулой	Извилистостенный со складчатой кутикулой
	Наличие устьиц	Устьица диацидного типа	Устьица диацидного типа	Устьица диацидного типа	Устьица диацидного типа
	Типы волосков	-Простые одноклеточные толстостенные бородавчатые колпачковидные; -Простые двух-четырех-клеточные толстостенные остроконечные с гладкой кутикулой; -Головчатые на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой	- Простые многоклеточные щетинистые суставные, клеточные стенки которых сильно утолщенны; - Простые остроконечные многоклеточные олстостенные с гладкой кутикулой; - Простые тонкостенные многоклеточные волоски с тупой закругленной верхушкой; - Головчатые на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой; - Головчатые с одноклеточной головкой и двухклеточной ножкой	- Простые многоклеточные щетинистые суставные с сильно утолщенными клеточными стенками и бородавчатой кутикулой; - Простые одноклеточные колпачковидные толстостенные волоски с бородавчатой кутикулой; - Простые многоклеточные толстостенные остроконечные с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой; - Простые двух-, трехклеточные коленчато-изогнутые толстостенные с бородавчатой поверхностью; - Головчатые на двух-, трехклеточной ножке с одноклеточной овальной	- Простые, многоклеточные щетинистые суставные волоски с сильно утолщенными клеточными стенками; - Простые двух-, пяти клеточные толстостенные остроконечные с гладкой кутикулой; - Простые одно-, двухклеточные остроконечные бородавчатые волоски; - Головчатые с одноклеточной овальной головкой на одноклеточно ножке; - Головчатые с одноклеточной овальной головкой на двух-, трехклеточной ножке

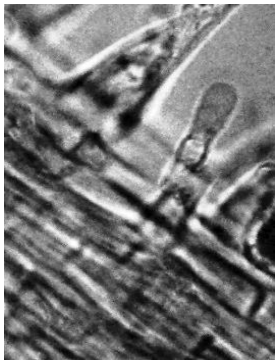
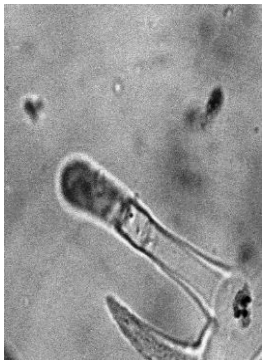
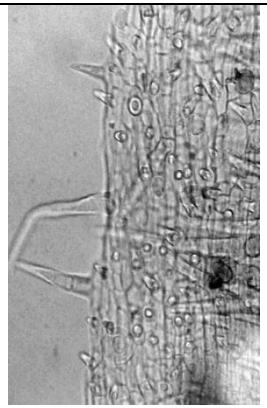
				головкой	
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток
Венчик	Форма клеток эпидермиса	- В трубке венчика удлиненно-прямоугольные со слегка извилистыми боковыми стенками; -Эпидермис верхней и нижней губы извилистостенный с сосочковидными выростами	- В трубке венчика удлиненно-прямоугольные со слегка извилистыми боковыми стенками; - На верхней и нижней губе сосочковидные клетки эпидермиса	- В трубке венчика удлиненно-прямоугольные со слегка извилистыми боковыми стенками; - На верхней и нижней губе эпидермис извилистостенный с сосочковидными выростами	- В трубке венчика удлиненно-прямоугольные со слегка извилистыми боковыми стенками; - На верхней и нижней губе эпидермис извилистостенный с сосочковидными выростами
	Наличие кристаллов		Мелкие одиночные призматические кристаллы (в трубке венчика)		
	Типы волосков	-Простые 2-5-клеточные толстостенные бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой; -Простые 2-4-клеточные толстостенные со спадающимися стенками, часто перекрученные; -Простые 5-7-клеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой и тупоконечной верхушкой; -Простые толстостенные одноклеточные бородавчатые со слегка	- Простые многоклеточные бородавчатые с заостренной верхушкой и с расширенной у основания базальной клеткой; - Простые одноклеточные колпачковидные, бородавчатые с заостренной верхушкой; - Головчатые на одноклеточной ножке с овально-округлой одноклеточной головкой; -Головчатые на многоклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой; - Сосочковидные выросты клеток эпидермиса	- Двух-, четырехклеточные бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой; - Простые одно-, четырех-клеточные тонкостенные с расширенной у основания базальной клеткой, иногда со спадающимися стенками; - Простые одноклеточные бородавчатые, с заостренной верхушкой; - Головчатые на одноклеточной ножке с округло-овальной одноклеточной головкой; - Головчатые на двухклеточной ножке с одноклеточной округлой головкой;	- Простые двух-, шести- клеточные толстостенные бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой; - Простые, одноклеточные тонкостенные волоски со слегка заостренной или тупой верхушкой; - Простые двух-, пяти клеточные тонкостенные волоски; - Головчатые на двух-, трехклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой; - Сосочковидные выросты клеток эпидермиса

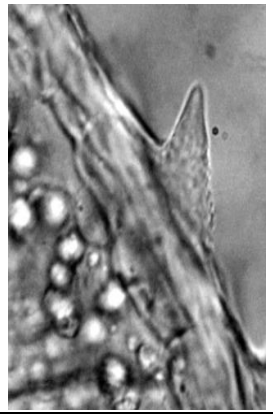
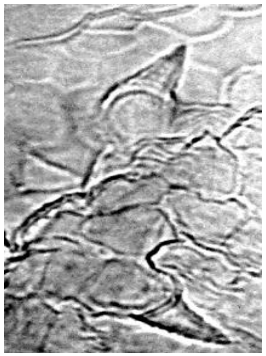
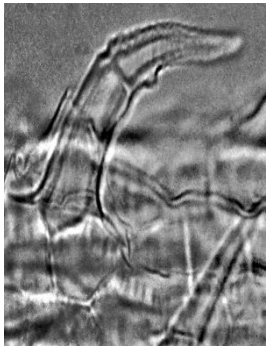
		заостренной или тупой верхушкой; -Головчатые на одноклеточной ножке с одноклеточной овально-округлой головкой; - Сосочковидные выросты клеток эпидермиса		- Сосочковидные выросты клеток эпидермиса	
	Наличие железок	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток	Эфиромасличные железки, включают в себя восемь радиально расходящихся выделительных клеток

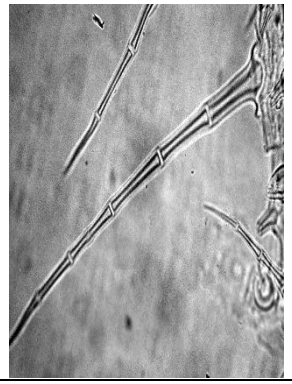
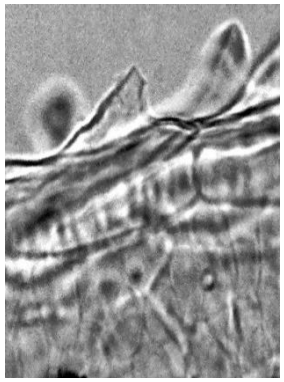
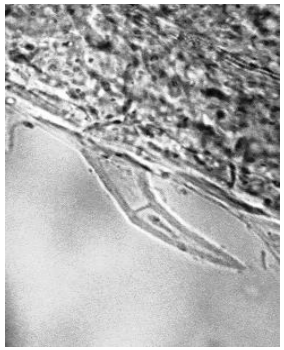
Таблица 31 – Характеристика волосков изученных тимьянов

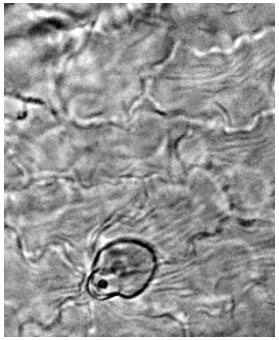
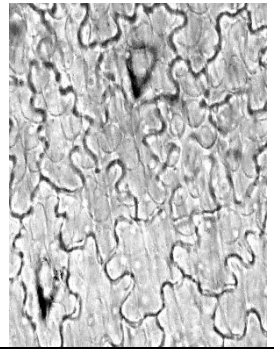
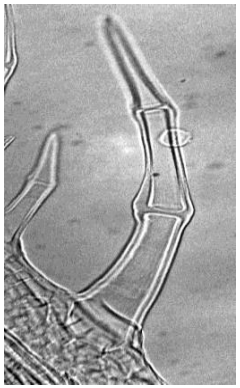
Типы волосков	Растения рода тимьян						
	Тимьян Палласа	Тимьян меловой	Тимьян ползучий	Тимьян блошиный	Тимьян Маршалла	Тимьян двуликий	Тимьян Черняева
Стебель							
Простые одно-трех- или двух-пяти клеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой, часто коленчато-изогнутые	-	+	+	+	-	+	+
Простые одно-, трехклеточные толстостенные с бородавчатой кутикулой 	+	+	-	+	-	-	+

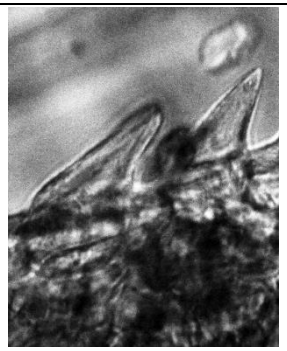
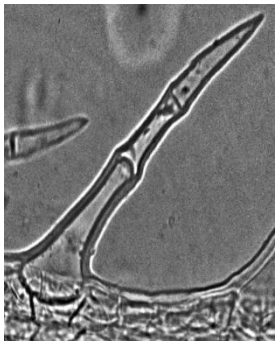
Простые одноклеточные толстостенные, с бородавчатой кутикулой колпачковидной формы, иногда с цистолитом у основания, чаще прижатые к поверхности		+	-	-	-	+	+	-
Простые одно-, двух-клеточные толстостенные со слегка бородавчатой кутикулой		-	-	-	-	+	-	-
Простые двух-пяти или пяти-девяти или четырех-восьми клеточные, со слегка бородавчатой поверхностью с зернистым содержимым		+	-	-	-	+	+	+
Головчатые на одноклеточной ножке с одноклеточной овальной или округлой головкой		+	+	+	+	+	-	+

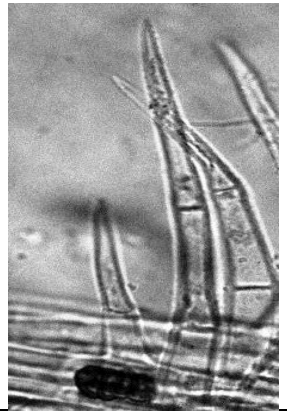
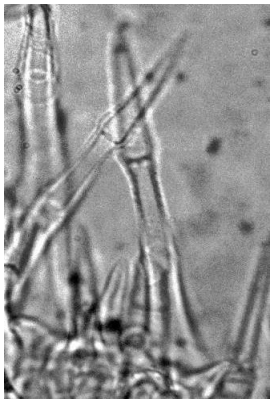
Головчатые на двух-трех клеточной ножке с вытянутой одноклеточной головкой и расширенной базальной клеткой		-	-	-	-	-	+	-
Головчатые на двуклеточной ножке с вытянутой одноклеточной головкой		-	-	-	-	-	-	+
Сосочковидные выросты клеток эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой		-	-	+	-	-	-	-

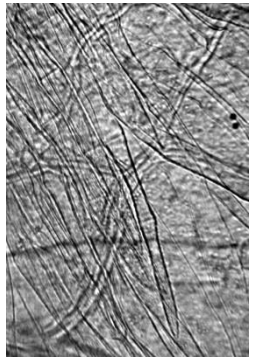
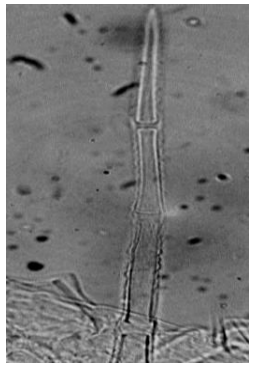
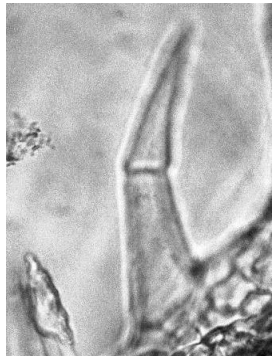
Лист								
Простые одноклеточные со слегка заостренной верхушкой и бородавчатой кутикулой, расположенные под углом к поверхности листа		+	+	-	+	+	+	+
Простые одно-, двух-клеточные колпачковидные, бородавчатые с заостренной верхушкой и расширенным основанием		-	+	-	+	-	-	+
Простые трех-восьми- или двух-трех клеточные толстостенные с бахромчатой кутикулой		-	+	-	+	-	-	-

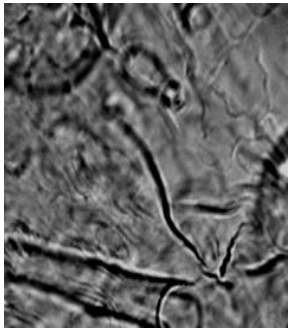
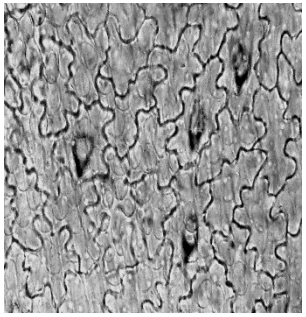
Простые двух-пяти или четырех-восьми- клеточные со слегка утолщенными клеточными стенками, бородавчатые, суставные (щетинистые)		+	-	+	-	+	+	+
Простые одноклеточные толстостенные с заостренной верхушкой и бородавчатой кутикулой		-	-	-	-	+	-	-
Простые двух-трехклеточные толстостенные с тонко заостренной верхушкой с бородавчатой поверхностью, коленчато изогнутые		-	-	+	-	-	+	-

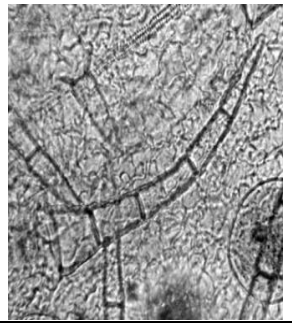
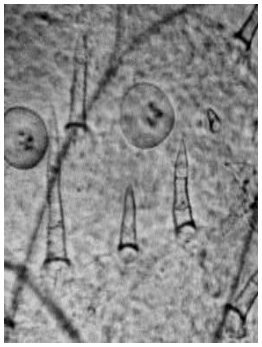
Головчатые на короткой одноклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой		+	-	+	+	-	-	-
Сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые		-	-	+	-	-	-	-
Чашечка								
Простые многоклеточные щетинистые суставные с сильно утолщенными клеточными стенками, иногда с бородавчатой кутикулой		+	+	-	-	+	+	+

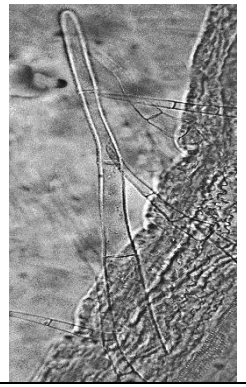
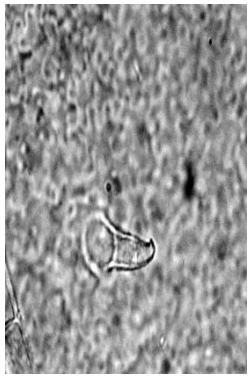
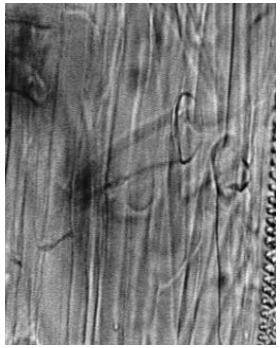
Простые одноклеточные толстостенные бородавчатые колпачковидные		-	+	-	+	-	+	-
Простые двух-четырех- или двух-пяти- клеточные толстостенные остроконечные с гладкой кутикулой		-	-	-	+	+	-	+
Простые тонкостенные многоклеточные волоски с тупой закругленной верхушкой		-	-	-	-	+	-	-

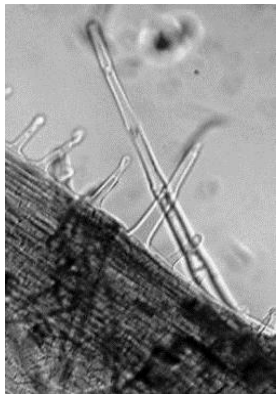
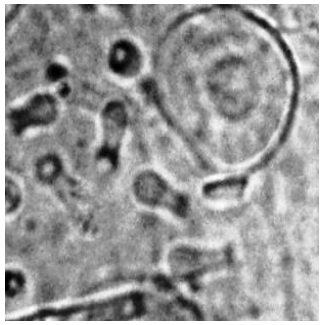
Простые двух-пяти или одно-двух- клеточные остроконечные с бородавчатой кутикулой		-	-	+	-	-	-	+
Простые многоклеточные остроконечные со слегка морщинистой или гладкой кутикулой и утолщенными стенками		+	-	-	-	-	+	-

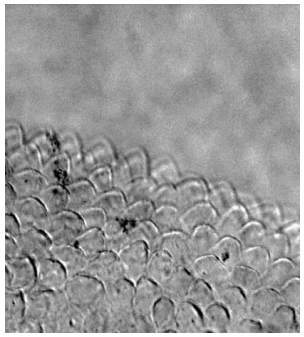
Простые многоклеточные толстостенные длинные бородавчатые с тупой закругленной верхушкой		+	-	-	-	-	-	-
Простые двух-четырех-клеточные толстостенные с бахромчатой кутикулой		-	+	-	-	-	-	-
Простые двух-, трехклеточные коленчато-изогнутые толстостенные с бородавчатой поверхностью		-	-	-	-	-	+	-

Головчатые с одноклеточной овальной головкой на одноклеточной ножке		+	+	+	+	+	-	+
Головчатые на двух-, трехклеточной ножке с одноклеточной овальной головкой		-	-	-	-	+	+	+
Сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой		+	-	+	-	-	-	-

Венчик								
Простые двух-пяти или многоклеточные, бородавчатые с заостренной верхушкой и с чаще всего расширенной у основания базальной клеткой		+	-	+	+	+	+	+
Простые одно-четырех клеточные тонкостенные или толстостенные со спадающими стенками		+	+	-	+	-	+	-
Простые одно-, двух- , или четырех клеточные бородавчатые с заостренной верхушкой		+	+	-	-	+	+	-

Простые двух-трех или пяти-семи- клеточные толстостенные бородавчатые с тупой верхушкой		-	+	-	+	-	-	-
Простые одноклеточные толстостенные со слегка заостренной или тупой верхушкой		-	+	-	+	-	-	-
Простые, одноклеточные тонкостенные волоски со слегка заостренной или тупой верхушкой		-	-	-	-	-	-	+

Простые двух-, пяти клеточные тонкостенные волоски		-	-	-	-	-	-	+
Головчатые на одноклеточной ножке с овально-округлой или округлой одноклеточной головкой		+	+	+	+	+	+	-
Головчатые на многоклеточной ножке с округлой одноклеточной головкой		-	-	+	-	+	+	+

Сосочковидные выросты клеток эпидермиса		+	+	-	+	+	+	+

Выводы по главе 4

1. Установлены морфологические признаки сырья 7 видов тимьянов, произрастающих на территории средней полосы России, позволяющие проводить диагностику сырья морфологически близких видов: это поперечное сечение стебля; характер опушения стебля; форма листьев; наличие черешка; характеристика соцветия; направление волосков на цветоножке; опушение чашечки; характеристика зубцов верхней губы чашечки.
2. Проведенные анатомические исследования позволили выявить микродиагностические признаки сырья, которыми являются опушение стебля, листа, чашечки и венчика простыми и головчатыми волосками. Диагностическое значение имеют также выросты клеток эпидермиса и наличия кристаллов в трубке венчика, наличие и расположение эфиро-масличных железок.

ГЛАВА 5 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН

В современном мире все более возрастают требования, предъявляемые к качеству лекарственного растительного сырья, что делает необходимым совершенствование его стандартизации [3, 21, 215, 216, 237, 238]. ФС «Трава чабреца», включенная в ГФ XI издания, не отвечает требованиям времени, которые предъявляются к нормативной документации на лекарственное растительное сырье. Это связано с тем, что она не содержит методик качественного и количественного определения действующих веществ, что в свою очередь не позволяет оценивать качество сырья чабреца. Качество сырья тимьяна ползучего статья Государственной фармакопеи XI издания оценивала только по содержанию экстрактивных веществ [83]. Согласно требованиям ОСТ 91500.05. 001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения», в нормативную документацию должны включаться определение подлинности и показателей качества не только для цельного и измельченного сырья, но и для порошка, который используется для изготовления лекарственных средств. Цельное, измельченное сырьё и порошок должны быть включены в разделы «Внешние признаки», «Микроскопия», «Числовые показатели».

В связи с чем, нами была предпринята попытка приведения к современным требованиям фармакопейной статьи «Трава чабреца». Проведенные нами исследования, а также данные литературы показали, что основными группами биологически активных веществ травы тимьянов наряду с эфирным маслом, являются фенольные соединения (флавоноиды и гидроксикоричные кислоты), поэтому стандартизация сырья была осуществлена по содержанию флавоноидов и показана возможность использования для этой цели и гидроксикоричных кислот.

5.1 Стандартизация сырья растений рода тимьян в соответствии с содержанием флавоноидов

Качественное определение флавоноидов в чабреце трава

Для определения подлинности лекарственного растительного сырья используют качественные реакции, а также методы хроматографии, в частности хроматографию в тонком слое сорбента. Метод хроматографии в тонком слое сорбента при использовании его для анализа лекарственного растительного сырья, характеризуется рядом преимуществ: селективностью, высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, устойчивостью хроматограмм к действию агрессивных проявителей и др. [26, 131]. В связи с чем, за основу метода обнаружения флавоноидов в сырье чабреца нами был применен метод тонкослойной хроматографии.

Для качественного определения флавоноидов были использованы пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ). Первоначально разделение суммы флавоноидов в траве чабреца проводили в 12 системах растворителей, наиболее часто используемых для этих целей: кислота уксусная–вода - спирт бутиловый (5:10:85), бензол-спирт этиловый (95:5), ацетон – бензол (1:4), бензол-спирт метиловый-ацетон (8:2:10), хлороформ-спирт метиловый (8:2), спирт этиловый-вода (3:2), спирт этиловый-хлороформ (1:1), этилацетат-спирт этиловый-толуол (4:2:2), хлороформ–спирт метиловый (3:1), хлороформ–спирт метиловый-вода очищенная (26:14:3), кислота уксусная–вода очищенная-этилацетат (2:1:10), кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70) [26]. Наилучшее разделение суммы флавоноидов в траве чабреца наблюдается в системе растворителей: кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70). Для нанесения на хроматограмму было использовано водно-спиртовое извлечение, приготовленное для определения количественного содержания суммы флавоноидов. Водно-спиртовое извлечение наносили в различных объемах от 0,01мл до 0,05 мл. На хроматограмме наилучшее

разделение веществ происходит при использовании объема 0,02 мл извлечения. В качестве образца сравнения был использован стандартный образец цинарозида 0,1% раствор [20, 131].

Методика качественного обнаружения флавоноидов в траве чабреца

На стартовую линию хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) 7,5 х 15 мм наносят 20 мкл (0,02 мл) полученного извлечения из травы чабреца (см. раздел "Количественное определение флавоноидов"), 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 должна обнаруживаться желтая зона.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции стандартного образца цинарозида и 3 зоны адсорбции желтого цвета ниже (рисунок 224, Приложение №2, №3, №4).

Допускается наличие других зон адсорбции .

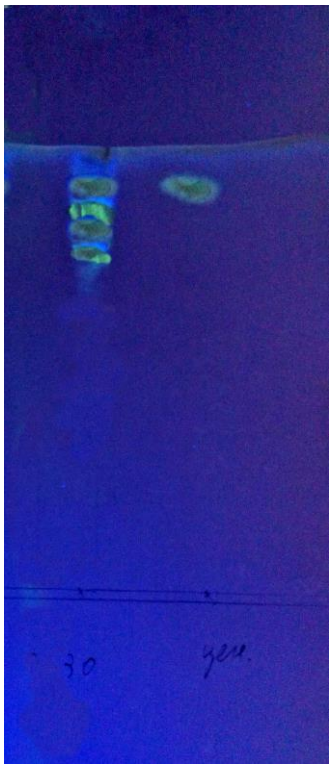


Рисунок 224 - **Рисунок хроматограммы водно-спиртового извлечения из травы чабреца**
Система растворителей: кислота муравьиная-вода очищенная-этилацетат (15:15:70)
(фото автора)

При проведении валидации методики оценивали специфичность хроматографической системы. Специфичность методики заключалась в совпадении результатов хроматографических исследований основных зон между собой для разных образцов сырья, заготовка которых проводилась в течение нескольких лет и соответствию описанию методики.

Были исследованы 5 образцов сырья чабреца (таблица 43). Критерий приемлемости методики выражался в совпадении зон адсорбции разных образцов сырья чабреца и соответствие данных зон описанию методики. Хроматографические зоны исследуемых образцов сырья чабреца были одинаковыми по основной зоне и совпадали с описанием методики. Разработанная методика дает возможность четко дифференцировать зоны в изучаемых видах сырья, которые соответствуют по цвету стандартному образцу - раствору цинарозида, а также, расстоянию пройденному пятну от линии старта.

Количественный анализ флавоноидов в сырье растений рода тимьян

Определение содержания флавоноидов в лекарственном растительном сырье проводят различными методами: весовыми, флюорометрическими,

объемными, полярографическими, фотоколориметрическими, спектрофотометрическими [32, 33, 118, 301]. Наиболее распространенным среди них является комбинированный метод, сочетающий определение флавоноидов методом спектрофотометрии в УФ-области спектра с методом хроматографии на бумаге [29, 145, 275] или в тонких слоях сорбента [29]. Для определения флавоноидов в видимой области спектра с помощью спектрофотометрии и фотоэлектроколориметрии используют реакцию с хромогенными реактивами [30, 145, 162, 301]. Широко распространенной для этих целей является реакция комплексообразования с алюминия хлоридом [31, 33, 43, 78].

Для анализа травы тимьяна ползучего нами была разработана методика определения суммы флавоноидов с использованием спектрофотометрии. Данная методика основана на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом с использованием дифференциального спектрофотометрического метода определения оптической плотности полученных комплексов. Благодаря этому приему можно проводить спектрофотометрирование полученного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом непосредственно в извлечении из сырья, не применяя дополнительных стадий очистки [33, 78, 232, 283, 298].

К основным этапам для разработки методик количественного анализа относятся:

- Изучение процесса экстрагирования;
- Сравнение спектров поглощения полученных извлечений из сырья без алюминия хлорида и после использования реакции с алюминия хлоридом, что позволяет определить степень влияния на спектральные характеристики сопутствующих веществ;
- Изучение оптимальных параметров реакции комплексообразования.

Важной стадией в процессе количественного анализа флавоноидов является экстракция.

На процесс экстрагирования флавоноидов из растительного сырья влияет измельченность сырья, время экстрагирования, температура экстракции, экстрагент, применяемый для экстракции, соотношение сырье-экстрагент.

Измельченность сырья – важный фактор, влияющий на экстрагирование флавоноидов из растительного сырья. В литературе в качестве оптимальных значений степени измельченности приводится степень измельчения 0,5-2 мм [198]. Результаты выхода флавоноидов в зависимости от степени измельченности лекарственного растительного сырья показаны в таблице 32.

Таблица 32 – Выход суммы флавоноидов в зависимости от степени измельченности сырья

Степень измельченности сырья тимьяна ползучего	Содержание флавоноидов в траве тимьяна ползучего, %
1 мм	1,59±0,04
2 мм	1,88±0,07
3 мм	1,71±0,04

Флавоноиды максимально экстрагируются из травы тимьяна ползучего при степени измельченности сырья 2 мм.

В литературе имеются данные, что экстрагирование флавоноидов из лекарственного растительного сырья проводится с использованием водно-спиртовых растворов. При изучении оптимального экстрагента для извлечения флавоноидов нами использованы: вода очищенная, спирт этиловый 96% и водно-спиртовые растворы (таблица 33).

Таблица 33 – Результаты выбора экстрагента для извлечения флавоноидов из сырья тимьяна ползучего

Наименование экстрагента	Сумма флавоноидов
Вода очищенная	1,68±0,06
Спирт этиловый 30%	1,76±0,06
Спирт этиловый 50%	1,80±0,05
Спирт этиловый 70%	1,91±0,04
Спирт этиловый 96%	0,52±0,02

Проведенные исследования позволили выбрать оптимальный экстрагент, который обеспечивает максимальный выход флавоноидов из травы тимьяна ползучего, это спирт этиловый 70%.

В литературе описаны различные виды экстракции для извлечения флавоноидов, такие как экстрагирование с использованием аппарата Сокслета, экстрагирование кипящими спиртами различной концентрации 50-95%. Нами было применено экстрагирование до наступления равновесия. [198] При изучении динамики экстрагирования флавоноидов из измельченного сырья чабреца при использовании в качестве экстрагента спирта 70% и соотношении сырье-экстрагент 1:100 установили, что максимальный выход флавоноидов наблюдается через 60 минут с дальнейшим наступлением равновесия (таблица 34).

Таблица 34 – Результаты определения времени экстрагирования флавоноидов из травы тимьяна ползучего

Время экстрагирования, мин	Содержание суммы флавоноидов, %
30	1,71±0,04
45	1,69±0,05
60	1,91±0,04
75	1,80±0,04

В основе спектрофотометрического определения флавоноидов лежат различные реакции, но чаще всего используются реакции образования комплексов с циркония хлорокисью и алюминия хлоридом [31, 32, 253]. В качестве комплексообразователя нами был использован алюминия хлорид. Алюминия хлорид относится к доступным реактивам, он хорошо растворяется в спиртах и воде очищенной.

При разработке оптимальных условий образования комплексов с алюминия хлоридом установлено, что наилучшие результаты достигаются при использовании 5 мл раствора алюминия хлорида 5%, что мы и использовали в дальнейших исследованиях (таблицы 35, 36).

Таблица 35 - Влияние концентрации алюминия хлорида на содержание флавоноидных соединений

Концентрация алюминия хлорида раствора, %	Сумма флавоноидов, %
1	1,33±0,05
2	1,37±0,05
3	1,38±0,05
4	1,40±0,06
5	1,53±0,03

Таблица 36 - Влияние объема алюминия хлорида 5% раствора на содержание флавоноидных соединений

Алюминия хлорид раствор, мл	Сумма флавоноидов, %
1	1,02±0,03
2	1,32±0,04
3	1,41±0,05
4	1,53±0,03
5	1,64±0,05

Для выявления максимума поглощения для спектрофотометрического определения нами были изучены спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы тимьяна ползучего (рисунок 224) с 5% раствором алюминия хлорида. Полученный спектр поглощения показал, это изучаемое извлечение с алюминия хлоридом имеет максимум поглощения при длине волны 395 нм. В данной области спектра не наблюдается влияния сопутствующих веществ (фенольных и других органических), содержащихся в извлечении из сырья чабреца.

Исследование химического состава травы растений рода тимьян, представленного в главе 3 позволило установить в ней наличие гликозидов апигенина, лютеолина и преобладающим среди них является цинарозид. Сравнение спектров поглощения водно-спиртовых извлечений из сырья тимьяна ползучего (чабреца) с алюминия хлоридом и цинарозида с алюминия хлоридом показало, что они совпадают, поэтому в качестве стандартного образца нами выбран цинарозид (рисунок 225).

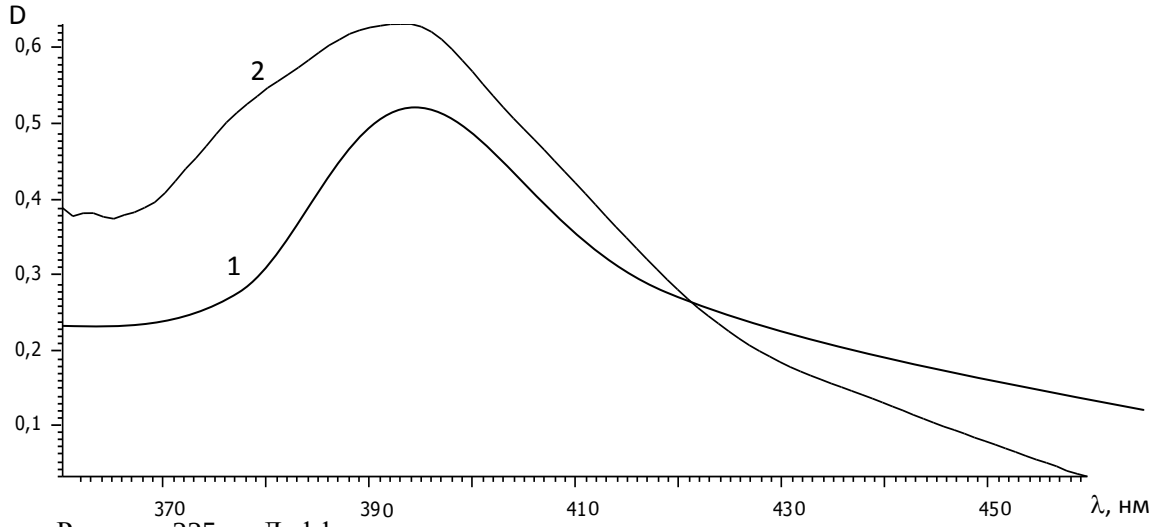


Рисунок 225 - Дифференциальные спектры поглощения водно-спиртого извлечения из травы тимьяна ползучего с алюминия хлоридом (1) и цинарозида с алюминия хлоридом (2) в видимой области спектра

При измерении оптической плотности применен вариант дифференциальной спектрофотометрии, при котором для сравнения было использовано исходное извлечение без добавления раствора алюминия хлорида. В результате чего было исключено влияние сопутствующих веществ, содержащихся в исследуемом извлечении и оптическая плотность которых находится в области максимума поглощения данного извлечения [78, 123, 283]. Для улучшения воспроизводимости результатов, к анализируемым пробам прибавляли кислоту уксусную для переведения флавоноидов в недиссоциированную форму. При изучении устойчивости окрашивания извлечений из сырья чабреца, которое образуется в результате реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, установлено, что оно наступает через 30 минут анализа и является устойчивым в течение 2-х часов. Это время являетя достаточным для проведения количественного анализа флавоноидов (таблица 37).

Таблица 37 – Определение устойчивости окраски водно-спиртового извлечения из сырья тимьяна ползучего с алюминия хлоридом

Время проведения реакции, минуты	Оптическая плотность, λ_{max}=395 нм
20	0,489

30	0,550
60	0,550
90	0,550
120	0,550

В результате проведенных исследований была разработана методика определения суммы флавоноидов в пересчете на цмнарозид.

Методика спектрофотометрического определения флавоноидов

Выделенную аналитическую пробу сырья чабреца измельчают и просевают сквозь сито с размером отверстий 2,0 мм. Точную навеску (около 1,0 г) подготовленного сырья помещают в колбу вместимостью 250,0 мл, приливают 100,0 мл спирта этилового 70%, далее взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу соединяют с обратным холодильником, помещают в кипящую водяную баню и нагревают в течение 60 минут, колбу периодически встряхивают для смывания частиц сырья со стенок колбы. По истечении времени содержимое колбы охлаждают искусственно, взвешивают и если есть необходимость до первоначальной массы доводят спиртом этиловым 70%. Полученное извлечение фильтруют через бумажный складчатый фильтр, при этом отбрасывают первые 10,0 мл фильтрата.

В мерную колбу объемом 25,0 мл, помещают 2,5 мл полученного извлечения, приливают 5,0 мл раствора алюминия хлорида 5% в спирте этиловом 70%, выдерживают 10 минут и далее приливают 1,0 мл раствора кислоты уксусной 3%. Объем полученного раствора доводят спиртом этиловым 70% до метки и оставляют на 30 минут. Далее проводят измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10,0 мм при длине волны 395 нм.

В качестве раствора сравнения выступает раствор, состоящий из 2,5 мл исходного извлечения, 1,0 мл раствора кислоты уксусной 3% и доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25,0 мл (Приложение №5).

Содержание суммы флавоноидов в процентах (Х) рассчитывают по формуле в пересчете на цинарозид:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{345 \times V \times m \times (100-W)}$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 395 нм;

345 – удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте этиловом 70%;

V – количество извлечения, в мл;

m – масса навески сырья, в граммах;

W – влажность сырья, %

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения флавоноидов

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения флавоноидов были определены по показателям: линейности, диапазону пользования, повторяемости, воспроизводимости и правильности.

Для определения линейности использовали 6 уровней концентраций. Первоначально был приготовлен раствор стандартного образца цинарозида (0,05%), а далее его разбавляли с получением растворов различных концентраций, для чего в мерные колбы объемом 25,0 мл брали по 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 исходного стандартного образца цинарозида, приливали в каждую колбу по 5,0 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 70%, оставляли на 10 минут и далее приливали 1,0 мл 3% раствора кислоты уксусной; содержимое колб перемешивали и доводили спиртом этиловым 70% объем раствора до метки и еще раз перемешивали. По истечении 30 минут была измерена оптическая плотность полученных растворов цинарозида на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10,0 мм в области максимума поглощения (395 нм). Градуировочный график цинарозида представлен на рисунке 226.

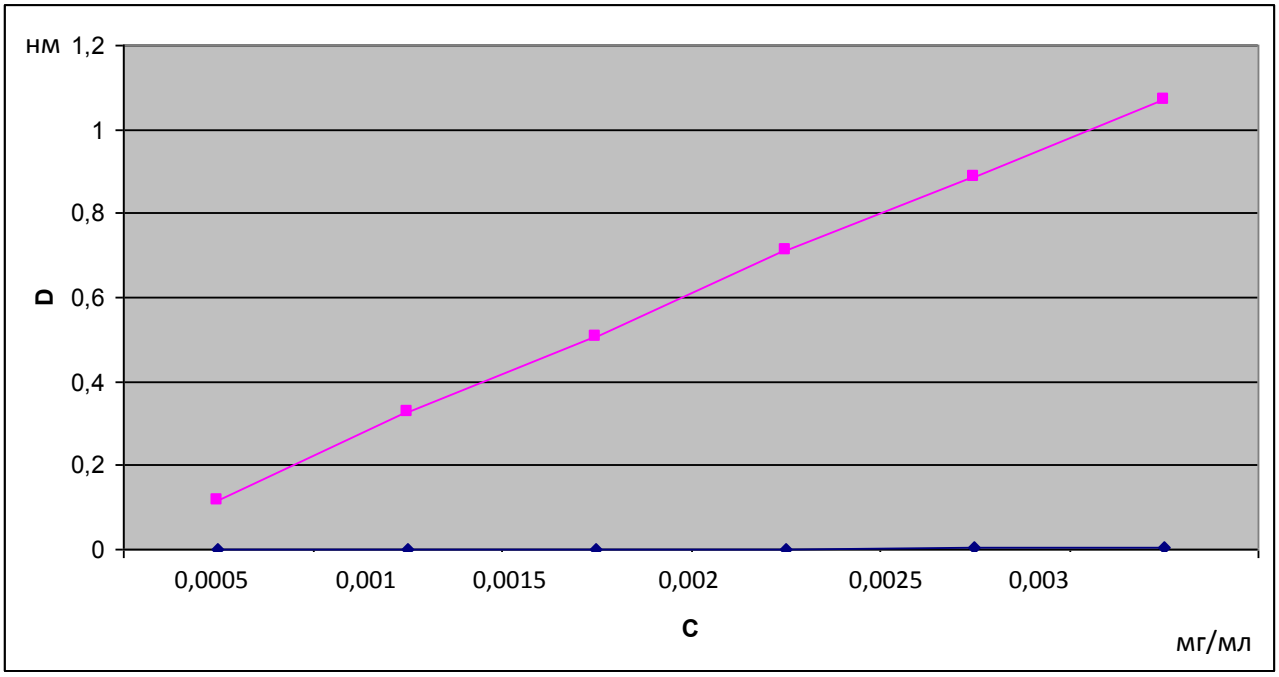


Рисунок 226 - Зависимость оптической плотности приготовленных растворов от концентрации цинарозида

Критерий приемлемости линейности выражается коэффициентом корреляции. Если величина коэффициента корреляции близка к единице, то полученные данные можно отобразить в виде прямой линии (рисунок 226).

Таблица 38 - Статистическая обработка результатов исследований, полученных при изучении линейности методики

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	R
4	0,00175	0,603017	378,7029	-0,05971	0,999614

При статистической обработке данных установлен коэффициент корреляции, который составил 0,999614, что близко к единице (таблица 38). В связи с чем разработанная спектрофотометрическая методика может быть использована для анализа флавоноидных соединений травы тимьяна ползучего в пересчете на цинарозид в указанном диапазоне концентраций.

Проверку диапазона использования методики проводили следующим образом: получали водно-спиртовые извлечения различной концентрации, для чего брали различные навески сырья чабреца 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 г и из них готовили извлечения на спирте этиловом 70% по разработанной нами методике. В мерные колбы объемом 25,0 мл приливали полученне извлечения по 2,5 мл,

далее прибавляли по 5,0 мл алюминия хлорида 5% раствора в спирте этиловом 70%, содержимое колб перемешивали и объем раствора доводили до метки спиртом этиловым 70% и еще раз перемешивали. По истечении 30 минут измеряли на спектрофотометре оптическую плотность полученных растворов при длине волны 395 нм, в кювете с толщиной слоя 10,0 мм на фоне исходного извлечения без алюминия хлорида.

Зависимость оптической плотности растворов (Y) от массы навески сырья (X) приведена на рисунке 227 и выражается уравнением Y=A+BX, где A – -0,01758, B – 0,536, коэффициент корреляции R=0,998032.

Результаты проведенных исследований позволили установить, что зависимость оптической плотности раствора (от 0,3 до 0,7) от концентрации в диапазонах исследуемых концентраций является линейной (рисунок 227).

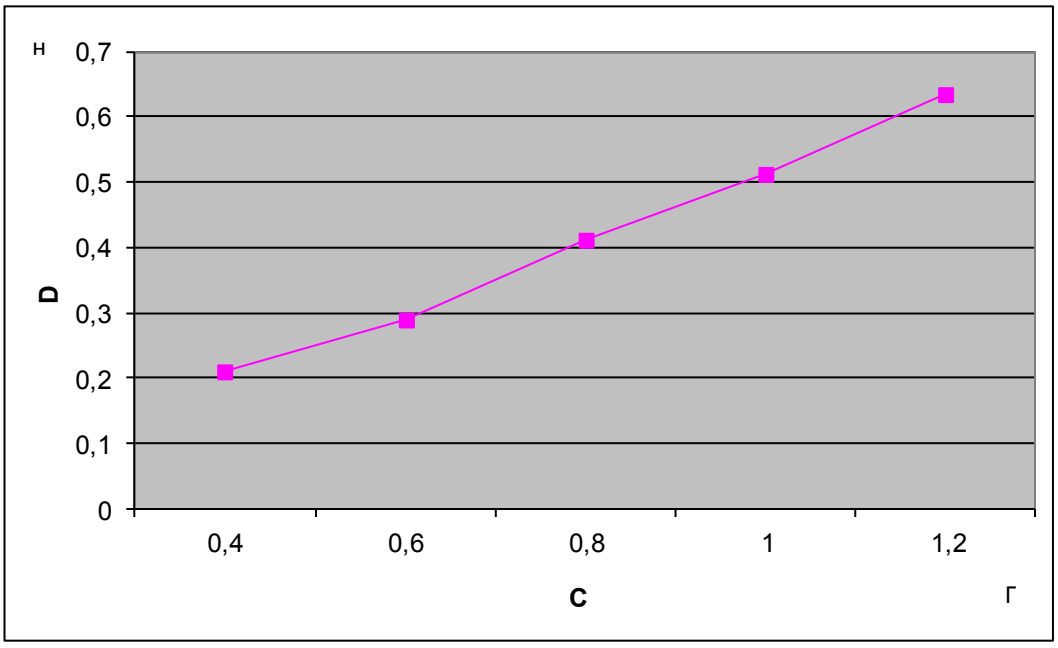


Рисунок 227 - График зависимости оптической плотности извлечения травы тимьяна ползучего от концентрации

Кроме того, найденное значение коэффициента A (-0,01758) свидетельствует о статистически незначимом вкладе других фенольных соединений, содержащихся в сырье и полученном извлечении, в содержание флавоноидов, что позволяет сделать вывод что разработанная методика достаточно специфична.

Для определения повторяемости методики брали один образец сырья и проводили исследование в 6 повторностях. Определяли величину относительного стандартного отклонения, которая не должна превышать 10%. Эта величина составила 4,43% (таблица 39).

Таблица 39 - Результаты определения флавоноидов в траве тимьяна ползучего с использованием дифференциальной спектрофотометрии

№п/п	Содержание флавоноидов, %	Метрологическая характеристика
1	1,34	$X_{ср.}$=1,350
2	1,39	S_x^2=0,000590
3	1,38	$Sx_{ср}$=0,0242
4	1,35	ΔX=0,06
5	1,33	$E_{отн}$=4,43%
6	1,34	$X_{ср}\pm\Delta X_{ср}$=1,35±0,06

Для определения воспроизводимости методики брали 3 образца сырья и исследовали в трех повторностях двумя исследователями (таблица 40). Определяли величину относительного стандартного отклонения, которая не должна превышать 15%.

Таблица 40 – Результаты определения воспроизводимости разработанной методики

Повторность	Содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид в сырье тимьяна ползучего, %			
	Аналитик 1	Сырье 1	Сырье 2	Сырье 3
1		1,37	0,98	1,39
2		1,34	0,96	1,45
3		1,31	0,97	1,41
4	Аналитик 2	1,33	0,99	1,44
5		1,35	0,96	1,42
6		1,36	0,98	1,41
Среднее значение		1,34	0,97	1,42
Относительное стандартное отклонение, (RSD%)		4,20	3,35	3,97

Проведенные нами исследования показали, что данная величина не превышает 4,20%, что свидетельствует о том, что разработанная методика воспроизводима в указанных условиях.

При определении правильности методики устанавливали содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид в извлечениях, полученных при добавлении определенного количества 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл стандартного раствора цинарозида к полученному нами извлечению для получения различных концентраций. Критерием приемлемости методики является величина среднего процента восстановления при применении растворов определенных концентраций, скорректированная на 100%. Средняя величина критерия приемлемости определяется рамками 100±5%. [95].

Таблица 41 – Результаты определения правильности методики (эксперименты с добавками цинарозида)

№ п/п	Содержание флавоноидов мг, в пересчете на цинарозид	Добавлено ГСО цинарозида, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Полученная ошибка, %	Статистические характеристики
1	0,375	0,125	0,500	0,493	98,60	$X_{ср}$ =100,48
2	0,375	0,125	0,500	0,491	98,20	S^2 = 3,327654
3	0,375	0,125	0,500	0,513	102,60	S = 1,81012
4	0,375	0,250	0,625	0,623	99,68	Δ x = 4,18
5	0,375	0,250	0,625	0,637	101,92	$E_{отн}$ = 4,16%
6	0,375	0,250	0,625	0,645	103,20	
7	0,375	0,375	0,750	0,751	100,13	
8	0,375	0,375	0,750	0,742	98,93	
9	0,375	0,375	0,750	0,758	101,07	
Средняя ошибка 100,48%						

Проведенные исследования показали, что процент восстановления в разработанной методике варьирует от 98,20% до 103,20%, при этом средняя величина его составила 100,48%.

Как видно из данных, приведенных в таблице 41 в разработанной методике отсутствует систематическая ошибка, относительная ошибка при доверительной вероятности 95% не превышает 4,16%.

Результаты проведенных исследований позволили установить, что разработанная спектрофотометрическая методика достаточно воспроизводима, линейна в исследуемом диапазоне концентраций, непродолжительна по

времени выполнения, доступна, для ее выполнения не требуется дорогостоящих реактивов [59].

Разработанную методику использовали для анализа 5 партий сырья тимьяна ползучего, а также травы всех изучаемых видов тимьянов (таблицы 42-45).

Таблица 42 - Определение флавоноидов в траве исследуемых видов тимьяна (n=5)

Наименование тимьяна	Место и год заготовки сырья тимьяна	Метрологические характеристики методики				
		$\bar{x}$,%	S_x^2	$S_{\bar{x}}$	Δx	$E_{отн.}$
1	2	3	4	5	6	7
Тимьян Палласа	Воронежская обл., 2012	1,24	0,00037	0,01924	0,05	4,03
	Белгородская обл., 2012	1,01	0,00017	0,01304	0,04	3,96
Тимьян меловой	Белгородская обл., 2011	1,43	0,00043	0,02074	0,06	4,20
	Воронежская обл., 2011	1,12	0,00037	0,01924	0,05	4,46
Тимьян ползучий	ООО Фирма «Здоровье»	0,98	0,00025	0,015811	0,04	4,49
Тимьян блошиный	Брянская обл., 2012	2,43	0,00082	0,02864	0,08	3,29
	Курская обл., 2012	2,10	0,00035	0,01871	0,05	2,38
Тимьян Маршалла	Орловская обл., 2011	1,11	0,00017	0,01304	0,04	3,60
	Орловская обл., 2012	1,56	0,0005	0,02236	0,06	3,85
	Белгородская обл., 2011	1,16	0,00022	0,01483	0,04	3,45
	Курская обл., 2013	1,49	0,00013	0,0114	0,03	2,01

Тимьян двуликий	Курская обл., 2013	0,81	0,00015	0,012247	0,03	4,20
	Курская обл., 2014	0,86	0,00025	0,01581	0,04	4,65
Тимьян Черняева	Курская обл., 2014	1,33	0,00037	0,01924	0,05	3,76

Приведенные результаты показали, что содержание флавоноидов в траве тимьяна ползучего варьирует от 0,94% до 1,64% (таблицы 43-45). В связи с чем была установлена норма содержания суммы флавоноидов в траве чабреца не менее 0,9%. В траве же других исследованных растений (таблица 42) содержание флавоноидов колеблется от 0,81% до 2,43%. Наибольшее содержание флавоноидов отмечено у тимьяна блошиного. Все исследуемые растения рода тимьян удовлетворяют требования ФС «Чабреца трава» по содержанию флавоноидов, кроме тимьяна двуликого, у которого содержание колеблется от 0,81% до 0,86%, что тоже близко к требованиям фармакопейной статьи на траву чабреца.

5.2 Установление числовых показателей

В нормативную документацию на растительное сырье обязательно входит раздел «Числовые показатели» (содержание экстрактивных веществ, влаги, золы общей и не растворимой в 10% растворе кислоты,

Таблица 43 - Результаты определения числовых показателей травы чабреца (цельное сырье)

N п/п	Место и дата сбора сырья	Фаза вегетации	Масса партии, кг	Дата анализа	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой,%	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов, %	Влажность %	Зола, %		Кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, %	Измельченных частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 3 мм, %	Органической примеси, %	Минеральной примеси %	Радионуклиды, Бк/кг
									Общая %	Нерастворимая в 10% HCl, %					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Цветение	1,8	I-2012	22,51	21,45	1,34	7,75	5,46	3,72	8,35	4,20	0,95	0,62	136,29
2	Белгородская обл., окр. г.Белгорода, VII-2006	Цветение	2,0	I-2012	24,08	23,62	1,42	10,60	10,21	4,36	9,18	3,18	0,73	0,54	118,40
3	ЗАО фирма «Здоровье» VII-2006	Цветение	2,5	I-2012	20,83	19,93	0,98	9,86	11,38	3,84	7,23	4,45	0,90	0,68	143,52

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
4	Курская область, окр. г. Железно-горска, VII-2006	Цве-тение	1,9	I-2012	18,97	18,46	0,94	12,18	7,94	3,29	6,15	3,82	0,86	0,70	89,14
5	Курская область, окр. г. Курча-това, VII-2006	Цве-тение	1,7	I-2012	27,41	26,53	1,64	11,24	6,98	3,38	8,63	4,18	0,71	0,64	121,35

Примечание: сырье хранилось в лаборатории в хорошо проветриваемом помещении,
в мешках из бумаги по ГОСТ 17768-90 в защищенном от света месте.

Таблица 44 - Результаты определения числовых показателей травы чабреца (измельченное сырье)

N п/п	Место и дата сбора сырья	Фаза вегетации	Масса партии, кг	Дата анализа	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой, %	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов, %	Влажность %	Зола, %		Кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, %	Органической примеси %	Минеральной примеси %	Частиц, не проходящих с/ сито 5мм, %	Частиц проходящих с/ сито 0,18мм, %	Радионуклиды, Бк/к
									Общая %	Нерастворимая в 10% HCl, %						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Цветение	1,8	I-2012	22,58	21,51	1,33	7,77	5,47	3,69	8,36	0,93	0,64	6,59	6,98	136,32
2	Белгородская область, г.Белгород, VII-2006	Цветение	2,0	I-2012	24,06	23,58	1,39	10,63	10,22	4,37	9,16	0,75	0,56	8,94	5,64	118,21

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
3	ЗАО фирма «Здоро-вье» VII-2006	Цве-тение	2,5	I-2012	20,85	19,97	0,97	9,88	11,34	3,86	7,25	0,89	0,65	9,13	6,32	143,66
4	Курская область, окр. г. Железно-горска, VII-2006	Цве-тение	1,9	I-2012	18,93	18,41	0,92	12,24	7,91	3,24	6,14	0,85	0,71	7,86	5,63	89,11
5	Курская область, окр. г. Курча-това, VII-2006	Цве-тение	1,7	I-2012	27,39	26,59	1,63	11,18	6,95	3,32	8,64	0,73	0,62	8,43	9,18	121,32

Примечание: сырье хранилось в лаборатории в хорошо проветриваемом помещении, в мешках из бумаги по ГОСТ 17768-90 в условиях лаборатории, в защищенном от света месте.

Таблица 45 - Результаты определения числовых показателей травы чабреца (порошкованное сырье)

N п/п	Место и дата сбора сырья	Фаза вегетации	Масса партии, кг	Дата анализа	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой, %	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов, %	Влажность %	Зола, %		Частиц, не проходящих сквозь сито 2мм, %	Частиц, проходящих сквозь сито 0,25мм, %	Радионуклиды, Бк/к
									Общая %	Нерастворимая в 10% HCl, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Цветение	1,8	I-2012	22,56	21,47	1,34	7,78	5,49	3,68	7,32	6,95	136,31
2	Белгородская область, окр. г.Белгорода, VII-2006	Цветение	2,0	I-2012	24,05	23,66	1,38	10,64	10,23	4,39	9,16	7,23	118,38
3	ЗАО фирма «Здоровье» VII-2006	Цветение	2,5	I-2012	20,84	19,95	*0,97*	*9,86*	*11,32*	*3,85*	*6,98*	7,48	143,58
4	Курская область, окр. г. Железногорска VII-2006	Цветение	1,9	I-2012	18,91	18,43	*0,93*	*12,21*	*7,92*	*3,25*	*6,87*	9,28	89,16

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
5	Курская область, окр. г. Курчатова, VII-2006	Цве-тение	1,7	I-2012	27,36	26,51	1,62	11,17	6,94	3,31	8,76	7,65	121,34

Примечание: сырье хранилось в лаборатории в хорошо проветриваемом помещении, по ГОСТ 17768-90, в мешках из бумаги, в защищенном от света месте.

Таблица 46 - Изучение стабильности травы чабреца при хранении (цельное сырье)

Номер Пробы и партии	Поставщик	Место и дата сбора сырья	Вид упаковки (тары) и условия хранения	Дата первичного анализа и переконтроля	Определение числовых показателей				Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой, %	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов, %	Продолжительность хранения, годы	Примечание
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, %					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Собственный сбор	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	7,75 7,72 7,76 7,74 7,75 7,73	5,46 5,41 5,43 5,45 5,48 5,47	3,72 3,71 3,74 3,70 3,73 3,75	8,35 8,37 8,32 8,36 8,35 8,31	22,51 22,49 22,50 22,47 22,50 22,51	21,45 21,47 21,44 21,46 21,45 21,46	1,34 1,32 1,31 1,33 1,35 1,34	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
2	Собственный сбор	Белгородская область г. Белгород, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	10,60 10,58 10,61 10,59 10,58 10,60	10,21 10,22 10,21 10,23 10,21 10,25	4,36 4,37 4,35 4,36 4,31 4,38	9,18 9,21 9,16 9,23 9,20 9,24	24,08 24,06 24,10 24,09 24,11 24,15	23,62 23,64 23,61 23,65 23,64 23,63	1,42 1,45 1,43 1,41 1,44 1,40	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
3	ЗАО фирма «Здоровье»	VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	9,86 9,83 9,85 9,87 9,84 9,81	11,38 11,37 11,35 11,39 11,33 11,38	3,84 3,83 3,86 3,81 3,82 3,85	7,23 7,21 7,26 7,24 7,25 7,20	20,83 20,81 20,84 20,86 20,80 20,82	19,93 19,94 19,91 19,93 19,95 19,92	0,98 0,97 0,96 0,97 0,98 0,95	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4	Собственный сбор	Курская обл.,окр г.Железногорска, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	12,18 12,17 12,22 12,20 12,16 12,17	7,94 7,92 7,95 7,93 7,94 7,96	3,29 3,27 3,30 3,28 3,26 3,29	6,15 6,13 6,17 6,14 6,15 6,14	18,97 18,93 18,95 18,94 18,96 18,97	18,46 18,47 18,44 18,43 18,45 18,47	0,94 0,92 0,93 0,95 0,93 0,92	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
5	Собственный сбор	Курская обл., окр. г. Курчатова, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	11,24 11,25 11,23 11,26 11,24 11,21	6,98 6,95 6,93 6,96 6,97 6,92	3,38 3,39 3,41 3,37 3,39 3,40	8,63 8,65 8,60 8,61 8,64 8,62	27,41 27,39 27,43 27,36 27,40 27,42	26,53 26,51 26,54 26,53 26,55 26,53	1,64 1,61 1,65 1,63 1,61 1,64	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

Примечание: сырье хранили в лаборатории в хорошо проветриваемом помещении,
в мешках из бумаги по ГОСТ 17768-90, в защищенном от света месте.

Таблица 47 - Изучение стабильности травы чабреца при хранении (измельченное сырье)

Номер пробы и пар-тии	Поставщик	Место и дата сбора сырья	Вид упаковки (тары) и условия хранения	Дата первичного анализа и переконтроля	Определение числовых показателей				Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой, %	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов,%	Продол жительность хранения, годы	Примечание
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Кусочков стеблей толщиной более 0,5 мм, %					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Собственный сбор	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	7,77 7,74 7,76 7,73 7,75 7,78	5,47 5,43 5,45 5.48 5,47 5,49	3,69 3,71 3,68 3,70 3,67 3,69	8,36 8,37 8,33 8,35 8,34 8,33	22,58 22,54 22,57 22,59 22.58 22,53	21,51 21,49 21,50 21,53 21,52 21,50	1,33 1,34 1,35 1,33 1,35 1,34	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
2	Собственный сбор	Белгородская область г. Белгород, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	10,63 10,65 10,68 10.66 10,64 10,67	10.22 10.25 10,23 10.26 10.24 10,27	4,37 4,35 4,31 4,38 4,40 4,36	9,16 9,17 9,19 9,21 9,18 9,17	24,06 24,08 24,03 24,09 24,07 24,05	23,58 23,55 23,57 23,58 23,54 23,56	1,39 1,36 1,37 1,41 1,40 1,36	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
3	ЗАО фирма «Здоровье»	VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	9,88 9,85 9,84 9,87 9,86 9,85	11,34 11,37 11,39 11,36 11,35 11,38	3,86 3,89 3,87 3,85 3,84 3,91	7,25 7,23 7,26 7,29 7,25 7,24	20,85 20,83 20,81 20,86 20,84 20,82	19,97 19,95 19,98 19,96 19,98 19,95	0,97 0,93 0,98 0,95 0,94 0,97	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4	Соб- стве нный сбор	Курская обл.,окр г.Желез- ногорск а, VII-2006	Бумаж- ный ме- шок в соответ ствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	12,24 12,25 12,29 12,21 12,26 12,28	7,91 7,95 7,94 7,92 7,94 7,93	3,24 3,21 3,24 3,26 3,25 3,24	6,14 6,17 6,15 6,17 6,18 6,14	18,93 18,95 18,97 18,91 18,94 18,94	18,41 18,39 18,40 18,39 18,43 18,40	0,92 0,90 0,95 0,94 0,91 0,93	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
5	Соб- стве нный сбор	Курская обл., окр. г. Курча- това, VII-2006	Бумаж- ный ме- шок в соответ ствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	11,18 11,19 11,17 11,21 11,20 11,19	6,95 6,97 6,93 6,91 6,98 6,95	3,32 3,35 3,34 3,36 3,30 3,31	8,64 8,67 8,63 8,69 8,62 8,65	27,39 27,40 27,44 27,36 27,38 27,40	26,59 26,60 26,58 26,59 26,57 26,60	1,63 1,67 1,64 1,61 1,65 1,63	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

Примечание: сырье хранили в лаборатории, в хорошо проветриваемом помещении, в мешках из бумаги по ГОСТ 17768-90, в защищенном от света месте.

Таблица 48 - Изучение стабильности травы чабреца при хранении (порошкованное сырье)

Номер пробы и партии	Поставщик	Место и дата сбора сырья	Вид упаковки (тары) и условия хранения	Дата первичного анализа и переконтроля	Определение числовых показателей			Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых водой, %	Содержание экстрактивных в-в, извлекаемых спиртом 30%	Содержание суммы флавоноидов, %	Продолжительность хранения, годы	Примечание
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% HCl, %					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Собственный сбор	Курская область, окр. г. Курска, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	7,78 7,74 7,79 7,75 7,76 7,73	5,49 5,51 5,47 5,50 5,48 5,47	3,68 3,70 3,69 3,68 3,72 3,70	22,56 22,59 22,53 22,56 22,55 22,53	21,47 21,49 21,46 21,48 21,50 21,48	1,34 1,36 1.33 1,35 1,38 1,34	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
2	Собственный сбор	Белгородская область г. Белгород, VII-2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	10,64 10,65 10,63 10.61 10.62 10,64	10,23 10,21 10,25 10,24 10,23 10,21	4,39 4,37 4,36 4,38 4,40 4,39	24,05 24,07 24,09 24,05 24,03 24,05	26,66 26,63 26,67 26,64 26,65 26,66	1,38 1,41 1.40 1,37 1,38 1,35	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
3	ЗАО фирма «Здоровье»	VII - 2006	Бумажный мешок в соответствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	9,86 9,89 9,85 9,87 9,84 9,89	11,32 11,35 11,36 11,31 11,29 11,30	3,85 3,83 3,86 3,84 3,85 3,83	20,84 20,83 20,86 20,81 20,84 20,85	19,95 19,93 19,97 19,95 19,94 19,98	0,97 0,96 0,98 0,95 0,94 0,96	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4	Соб- стве нный сбор	Курская обл.,окр г.Желез ного- рска, VII- 2006	Бумаж- ный ме- шок в соответ ствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	12,21 12,19 12,20 12.23 12,20 12,21	7,92 7,90 7.93 7,91 7,94 7,90	3,25 3,24 3,26 3,23 3,25 3,24	18,91 18,89 18,92 18,90 18,91 18,93	18,43 18,41 18,42 18,44 18,45 18,43	0,93 0,95 0,91 0,93 0,94 0,95	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен
5	Соб- стве нный сбор	Курская обл., окр. г. Курча- това, VII- 2006	Бумаж- ный ме- шок в соответ ствии с ГОСТ	20.01.12 07.07.12 26.01.13 18.07.13 21.01.14 20.07.14	11,17 11,19 11,16 11,17 11,19 11,21	6,94 6,92 6.95 6,93 6,96 6,93	3,31 3,30 3,32 3,35 3,33 3,34	27,36 27,34 27,37 27.35 27,34 27,32	26,51 26,49 26,50 26,52 26,48 26,51	1,62 1,64 1,65 1,63 1,60 1,64	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	Годен годен годен годен годен годен

Примечание: сырье хранили в лаборатории в хорошо проветриваемом помещении, в мешках из бумаги по ГОСТ 17768-90, в защищенном от света месте.

хлористоводородной, примесей), что побудило нас к их разработке. Числовые показатели определяли по методикам ГФ XI издания [83], в качестве объектов исследования использовали цельное, измельчённое и порошкованное сырье тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла. Полученные результаты приведены в таблицах 43-45, 61.

При изучении сроков годности сырья тимьяна ползучего установлено (таблицы 46, 47, 48), что при его хранении, при температуре 18-20°С в сухом проветриваемом помещении в течение 2,5 лет не наблюдается изменений в содержании суммы флавоноидов и экстрактивных веществ, что позволило нам оставить прежний срок годности сырья чабреца 2 года.

5.3 Изучение возможности стандартизации растений рода тимьян по содержанию суммы гидрооксикоричных кислот

Ранее в наших исследованиях в изучаемых растениях были идентифицированы гидроксикоричные кислоты. Среди них наиболее часто встречаются кофейная и розмариновая кислоты, причем в довольно значительных количествах [68, 200, 224, 327]. Гидроксикоричные кислоты проявляют высокую антиоксидантную активность, оказывают противовирусное, антибактериальное, противогрибковое, гипогликемическое, гепатопротекторное, противоопухолевое действия, обладают иммуномоделирующими и антиаллергическими свойствами. [68, 117, 138].

Терапевтический эффект растений рода тимьян обусловлен комплексом фенольных соединений (флавоноидов, гидроксикоричных кислот) и терпеноидов. Некоторые авторы считают, что комплекс терпеноидов и производных кофейной и розмариновой кислот усиливают кровообращение,

поэтому влияют на память человека и оказывают нейротропный эффект. Розмариновая и кофейная кислоты обладают антидепрессивной активностью у мышей в тесте вынужденного плавания [171, 296, 333, 334].

Зарубежные фармакопеи для многих видов сырья семейства Яснотковые (розмарин, мелисса и др.) используют розмариновую кислоту в качестве идентифицированного и количественного критерия качества лекарственного растительного сырья [299, 300]. Поэтому представляло интерес показать возможность стандартизации сырья растений рода тимьян по содержанию суммы гидроксикоричных кислот.

Разработку методики качественного и количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот проводили на сырье тимьяна Маршалла, как наиболее часто встречающегося в областях средней полосы России [153].

Качественное определение

Для качественного определения гидроксикоричных кислот использовали метод хроматографии в тонких слоях сорбента.

Для получения извлечения около 0,5 г измельченного сырья с размером частиц, 2 мм, помещенного в круглодонную колбу объемом 250 мл, приливают 100 мл спирта этилового 50%, помещают на водяную баню и нагревают на кипящей бане 75 минут. После нагревания колбу охлаждают, фильтруют и используют для качественного анализа гидроксикоричных кислот методом тонкослойной хроматографии.

Для качественного определения гидроксикоричных кислот использовали пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ), для чего на линию старта аналитической пластинки «Sorbfil» размером 7,5х15 см наносят 20 мкл (0,02 мл) полученного водно-спиртового извлечения из травы тимьна Маршалла и рядом 5 мкл (0,005 мл) стандартного образца розмариновой кислоты. Пластинку высушивают на воздухе 5 минут и помещают в насыщенную камеру с стистемой растворителей: хлороформ - спирт метиловой - вода очищенная –

(26:14:3).

После прохождения фронта растворителя до конца пластинки, ее вынимают и помещают в вытяжной шкаф для высушивания. Далее хроматограмму анализируют в УФ-свете, используя длину волны 360 нм.

На хроматограмме стандартного образца розмариновой кислоты должна обнаруживаться ярко-голубая зона.

На хроматограмме иследуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета на уровне зоны адсорбции розмариновой кислоты и дополнительно 2 зоны адсорбции голубого цвета и 1 желтого цвета (рисунок 228).

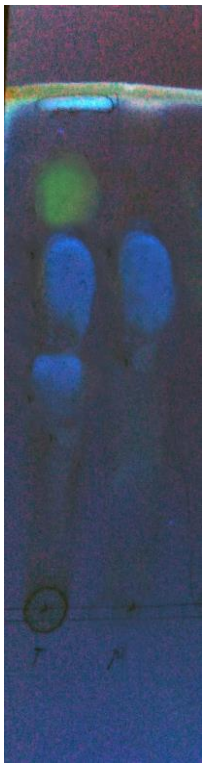


Рисунок 228 - **Рисунок хроматограммы водно-спиртового извлечения из травы тимьяна Маршалла** Система растворителей: хлороформ - спирт метиловой - вода очищенная – (26:14:3) (фото автора)

Количественное определение

На первом этапе разработки методики количественного определения гидроксикоричных кислот нами изучен спектр поглощения спирто-водного извлечения из травы тимьяна Маршалла в сравнении с УФ-спектром кислоты розмариновой, как наиболее часто встречающийся в растениях рода тимьян. Согласно полученным данным максимум поглощения исследуемого извлечения находится в области 325-330 нм, в этой же области находится и максимумум

поглощения розмариновой кислоты (рисунок 229), что позволяет сделать вывод о том, что характер кривой поглощения спирто-водного извлечения из травы тимьяна Маршалла определяется в основном гидрооксикоричными кислотами и использовать длину волны λ=328 нм для спектрофотометрического определения суммы гидрооксикоричных кислот в пересчете на розмариновую кислоту.

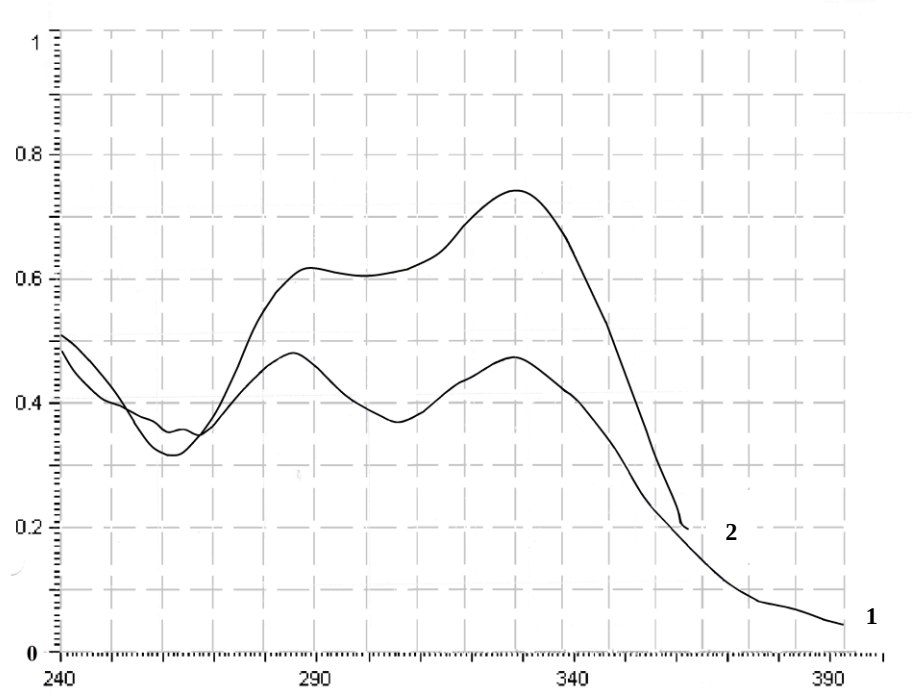


Рисунок 229 - УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из травы тимьяна Маршалла (1) и спиртового раствора розмариновой кислоты (2)

В основу количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот положен метод прямой спектрофотометрии [99, 117].

Для гармонизации требований с Европейской фармакопеей нами также использован метод дифференциальной спектрофотометрии, который широко применяется для стандартизации сырья растений семейства Яснотковые и основан на модифицированной реакции фенольных соединений с реактивом Фолина [300].

Важное условие точности результатов – полная экстракция

гидрооксикоричных кислот из сырья. Основные характеристики - это измельченность сырья, время экстракции, температурный режим экстракции, используемый растворитель, соотношение сырье-экстрагент [65, 66, 198].

Изучение влияния степени измельчения на выход гидрооксикоричных кислот приведено в таблице 49.

Таблица 49 - Влияние степени измельченности травы тимьяна Маршалла на полноту экстракции гидрооксикоричных кислот

Степень измельченности, мм	Содержание суммы гидрооксикоричных кислот, %	
	Метод прямой спектрофотометрии	Метод дифференциальной спектрофотометрии
1	4,34±0,09	1,15±0,03
2	5,35±0,09	3,81±0,07
3	4,64±0,11	2,11±0,06

Результаты проведенных исследований показали, что максимальное количество гидрооксикоричных кислот из травы тимьяна Маршалла происходит при степени измельченности 2 мм.

При разработке методики анализа для экстракции гидрооксикоричных кислот нами использованы спирт этиловый, водно-спиртовые растворы (таблица 50).

Таблица 50 – Результаты определения концентрации спирта этилового для экстракции суммы гидрооксикоричных кислот из травы тимьяна Маршалла

Концентрация этилового спирта,%	Содержание суммы гидрооксикоричных кислот,%	
	Метод прямой спектрофотометрии	Метод дифференциальной спектрофотометрии
30	5,32±0,11	2,61±0,08
50	5,34±0,11	3,81±0,07
70	5,05±0,13	2,76±0,10
96	1,97±0,08	1,09±0,05

Из приведенных в таблице 50 данных следует, что полнота экстракции суммы гидрооксикоричных кислот из травы тимьяна Маршалла наблюдается при использовании спирта этилового 50%.

Извлечение гидрооксикоричных кислот из сырья тимьяна Маршалла проводили экстракцией до наступления равновесия [198]. Исследование динамики экстрагирования гидрооксикоричных кислот из измельченного сырья тимьяна проводили кипящим спиртом этиловым 50%, используя соотношение сырье-растворитель 1:100. При этом максимальное извлечение гидрооксикоричных кислот из травы тимьяна происходит по истечении 75 минут (таблица 51).

Таблица 51 - Изучение времени экстракции суммы гидрооксикоричных кислот из травы тимьяна Маршалла

Время экстракции, мин	Содержание суммы гидрооксикоричных кислот,%	
	Метод прямой спектрофотометрии	Метод дифференциальной спектрофотометрии
30	4,70±0,10	1,19±0,05
45	4,67±0,11	2,59±3,47
60	5,01±0,14	3,03±0,08
75	5,34±0,12	3,81±0,06
90	5,39±0,13	3,80±0,06

Для определения количественного содержания суммы гидрооксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла нами предложено использовать в качестве стандартного образца розмариновую кислоту. Расчет содержания суммы гидрооксикоричных кислот в сырье вели с применением удельного показателя поглощения розмариновой кислоты в спирте этиловом 50% при длине волны 328 нм, который равен 500, а для варианта дифференциальной спектрофотометрии использовали длину волны 505 нм и удельный показатель розмариновой кислоты с реактивом Фолина, который равен 400.

Проведенные исследования послужили основой для разработки методики спектрофотометрического определения гидрооксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла методами прямой и дифференциальной спектрофотометрии.

Методики количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот методом прямой и дифференциальной спектрофотометрии

К 0,5 г (точная навеска) измельченного до размера частиц 2 мм сырья, помещенного в плоскодонную колбу объемом 200,0 мл, приливают 100,0 мл спирта этилового 50%, взвешивают на технических весах с погрешностью ±0,01. Колбу подсоединяют к обратному холодильнику и ведут экстракцию, нагревая на водяной бане 75 минут. После нагревания колбу охлаждают и взвешивают, в случае необходимости восполняют первоначальную массу спиртом этиловым 50%. Полученное извлечение фильтруют, первые 10,0 мл фильтрата отбрасывают.

Для определения суммы гидроксикоричных кислот в варианте прямой спектрофотометрии берут 2,0 мл исследуемого извлечения, вносят в мерную колбу на 25,0 мл и доводят объем спиртом этиловым 50% до метки. Оптическую плотность разбавленного извлечения измеряют, используя длину волны 328 нм и кювету с толщиной слоя 10,0 мм.

Раствором сравнения служит спирт этиловый 50%.

Определение суммы гидроксикоричных кислот вели в пересчете на розмариновую кислоту. Для вычисления использовали формулу с применением удельного показателя поглощения розмариновой кислоты:

$$X = \frac{D \times A \times B \times 100}{E^{1\%}_{1см} \times m \times b \times (100-W)}$$, где

D – оптическая плотность исследуемого извлечения;

A – объем мерной колбы, используемой для сбора извлечения, мл;

B – объем мерной колбы, используемой для разведения и анализа, мл;

b – объем извлечения, взятый для разведения и анализа, мл;

$E^{1\%}_{1см}$ – удельный показатель поглощения кислоты розмариновой, равный 500;

m – масса навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для определения суммы гидроксикоричных кислот в варианте дифференциальной спектрофотометрии 1,0 мл полученного извлечения наливают в мерную колбу на 10,0 мл, приливают 2,0 мл кислоты хлористоводородной раствора 0,5 М; 2,0 мл раствора, состоящего из: 10,0 г натрия нитрита и 10,0 г натрия молибдата, растворенных в 100,0 мл воды очищенной; 2,0 мл 10% раствора натрия гидроксида и полученную смесь доводят водой очищенной до 10,0 мл. Оптическую плотность приготовленного раствора измеряют, используя длину волны 505 нм и кювету с толщиной слоя 10,0 мм.

Раствором сравнения служил раствор, который содержал 1,0 мл исследуемого извлечения, 2,0 мл кислоты хлористоводородной раствора 0,5 М, 2,0 мл разведенного раствора натрия гидроксида и доведенный до 10,0 мл водой очищенной в мерной колбе.

Сумму гидроксикоричных кислот рассчитывали в пересчете на розмариновую кислоту по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 10 \times 100}{E^{1\%}_{1см} \times a \times b \times (100-W)}$$, где

D – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 505 нм;

100 – объем полученного извлечения из сырья тимьяна, мл;

10 – объем мерной колбы, взятый для анализа, мл;

b – объем извлечения, взятый для разведения и анализа, мл;

$E^{1\%}_{1см}$ – удельный показатель поглощения розмариновой кислоты с реактивом Фолина при длине волны 505 нм;

a – масса навески сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в варианте прямой спектрофотометрии

Валидацию предложенной методики определения содержания гидроксикоричных кислот проводили, используя показатели: диапазон использования, повторяемость, воспроизводимость и правильность [77].

Диапазон использования разработанной методики устанавливали путем получения извлечений из навесок сырья тимьяна Маршалла массой 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 и 0,8 г (точные навески). Навески сырья заливали 100,0 мл спирта этилового 50% и получали извлечения по разработанной нами методике. По 2,0 мл исследуемых извлечений вносили в мерные колбы на 25,0 мл и доливали до 25,0 мл спиртом этиловым 50%. Оптическую плотность исследуемых извлечений измеряли, используя длину волны 328 нм и кювету с толщиной слоя 10,0 мм. Раствором сравнения служил спирт этиловый 50%.

При этом определяли коэффициент корреляции, величина которого должна быть близка к единице, тогда сумма данных описывается прямой линией (рисунок 230, таблица 52).

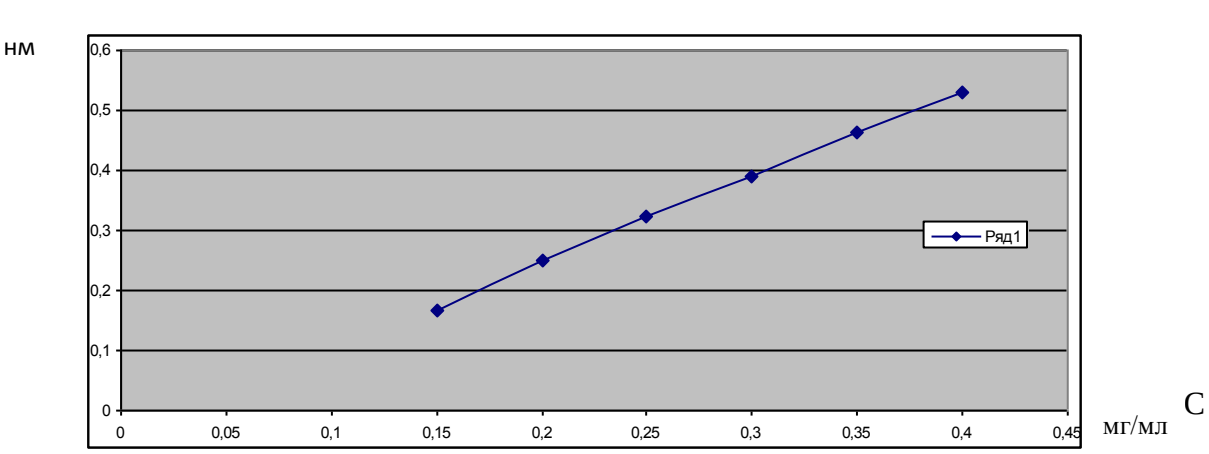


Рисунок 230 - Зависимость оптической плотности исследуемых извлечений из травы тимьяна Маршалла от массы навески

Таблица 52 – Статистическая обработка результатов, полученных при изучении диапазона использования предложенной методики

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	A	R
4	0.2750	0.3546	1.4414	-0.04174	0.99939

Полученный коэффициент корреляции 0,99939, что соответствует требованиям.

Проведенные исследования позволили установить, что в диапазоне измеряемых концентраций (начиная с оптической плотности 0,25) зависимость содержания гидрооксикоричных кислот от массы навески сырья тимьянов имеет линейный характер (рисунок 197, таблица 52).

Повторяемость методики была определена одним исследователем на одном образце сырья тимьяна в шести повторностях.

Таблица 53 - Содержание суммы гидрооксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла

№п/п	Содержание гидроксикоричных кислот, %	Метрологические характеристики разработанной методики
1	5,32	$x_{ср}$= 5,35
2	5,34	S_x^2= 0,00622
3	5,39	S $x_{ср}$= 0,0784
4	5,43	Δx= 0,20
5	5,40	$E_{отн}$= 3,74
6	5,21	$x_{ср} \pm \Delta x_{ср}$=5,35±0,20

Определенная величина относительного стандартного отклонения, которая составила 3,74%, говорит о том, что разработанная методика прецизиозна в условиях повторяемости (таблица 53).

Воспроизводимость разработанной методики была выполнена 2 сотрудниками кафедры на 3 образцах сырья тимьяна в 3 повторностях (таблица 54).

Таблица 54 – Результаты определения воспроизводимости разработанной методики

Повторность	Аналитик	Содержание гидроксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла,%		
		Сырье №1	Сырье №2	Сырье №3
1	1	4,51	5,32	5,10
2	1	4,43	5,34	4,93
3	1	4,49	5,39	5,06
4	2	4,59	5,43	4,92
5	2	4,55	5,40	5,01
6	2	4,40	5,21	5,08
Среднее значение		4,50	5,35	5,02
Относительное стандартное отклонение, (RSD%)		4,00	3,74	3,99

Результаты проведенных исследований показали, что величина относительного стандартного отклонения не превышает 4 % (а не должна превышать 15%). Соответственно, методика в указанных условиях воспроизводима.

При определении правильности методики устанавливали содержание гидроксикоричных кислот в растворах, которые получали при добавлении к изучаемому извлечению раствора кислоты розмариновой стандартного для того, чтобы получить концентрации 115%, 130%, 145%. При этом средний процент восстановления, скорректированный на 100%, должен варьировать в пределах 100±5%.

Таблица 55 – Результаты определения правильности разработанной методики (опыты с добавками)

№ п/п	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту розмариновую, мг	Добавлено стандартного образца кислоты розмариновой, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %	Статистические характеристики
1	0,398	0,02	0,418	0,426	101,91	$X_{среднее}$= 100,78 Sx^2 = 4,36369 Sx = 2,08894 ΔX = 4,83 $E_{отн}$ = 4,79%
2	0,398	0,02	0,418	0,430	102,87	
3	0,398	0,02	0,418	0,416	99,52	
4	0,398	0,04	0,438	0,432	98,63	
5	0,398	0,04	0,438	0,443	101,14	
6	0,398	0,04	0,438	0,449	102,51	
7	0,398	0,06	0,458	0,473	103,28	

8	0,398	0,06	0,458	0,445	97,16	
9	0,398	0,06	0,458	0,459	100,02	
Значение средней ошибки 100,78%						

В разработанной нами методике определенный процент восстановления варьирует от 97,16% до 103,28% (таблица 55). Средняя величина процента восстановления составила 100,78%. Относительная ошибка с 95% вероятностью не превышает 4,79%.

Валидация методики количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот в варианте дифференциальной спектрофотометрии

Валидацию разработанной методики определения суммы гидрооксикоричных кислот в варианте дифференциальной спектрофотометрии проводили по тем же показателям: линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности [77].

Для установления линейности предложенной методики готовили водно-спиртовые извлечения из различных навесок сырья тимьяна Маршалла массой 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 и 0,8 г (точные навески). Навески сырья заливали 100 мл спирта этилового 50% и получали извлечения по разработанной нами методике. По 1,0 мл исследуемых извлечений переносили в мерные колбы на 10 мл, приливали по 2,0 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,5 М, 2,0 мл раствора, приготовленного следующим образом: 10,0 г натрия нитрита и 10,0 г натрия молибдата, растворенных в 100,0 мл воды очищенной, вносили также 2,0 мл натрия гидроксида 10% раствора и к полученнойю смеси приливали воды очищенной до 10,0 мл. Измеряли оптическую плотность исследуемого раствора при длине волны 505 нм и в кювете с толщиной слоя 10,0 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий 1,0 мл исходного извлечения, 2,0 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,5 М, 2,0 мл разведенного натрия гидроксида и доведенной в мерной колбе на 10,0 мл до метки водой очищенной.

Зависимость оптической плотности растворов (Y) от концентрации сырья (X) приведена на рисунке 231 и выражается уравнением Y=A+BX, где A – -0,0054, B – 1,141693, коэффициент корреляции R=0,999877.

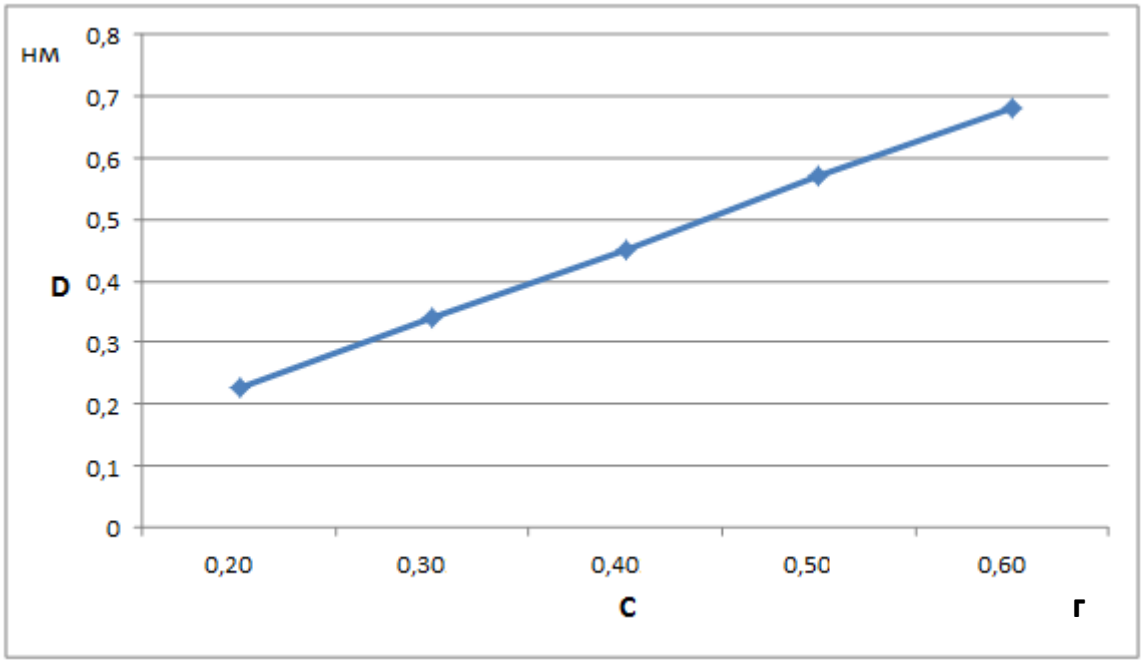


Рисунок 231- График зависимости оптической плотности извлечений из травы тимьяна Маршалла от концентрации розмариновой кислоты

Таблица 56 - Статистическая обработка данных, которые получены при изучении линейной зависимости вида y=bx+a

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	A	R
4	0,334617	0,377533	1,141693	-0.0054	0.999877

Проведенные исследования позволили установить, что в диапазоне исследуемых концентраций зависимость оптической плотности (от 0,3 до 0,7) от концентрации имеет линейный характер (рисунок 231).

Кроме того, найденное значение коэффициента A (-0,0054) (таблица 56) свидетельствует о статистически незначимом влиянии остальных фенольных соединений, содержащихся в сырье и полученном извлечении, в содержание гидрооксикоричных кислот, что позволяет сделать вывод о том, что разработанная методика достаточно специфична.

При определении повторяемости методики изучение проводил один

исследователь, был использован один образец сырья и исследование проводили в 6 повторностях.

Таблица 57 - Содержание суммы гидрооксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла

№п/п	Содержание суммы гидроксикоричных кислот, %	Метрологические характеристики методики
1	3,92	$x_{ср}$= 3,86
2	3,99	S_x^2= 0,004976
3	3,79	S $x_{ср}$= 0,0987927
4	3,93	Δx= 0,25
5	3,75	$E_{отн}$= 6,58%
6	3,78	$x_{ср}$±Δ $x_{ср}$=3,86±0,25

Определенная величина относительного стандартного отклонения, составила 6,58%, что подтверждает то, что методика в условиях повторяемости прецизионна (таблица 57).

Воспроизводимость методики определяли 2 сотрудника кафедры, которые проводили исследование на 3 образцах сырья в 3 повторностях (таблица 58).

При этом величина относительного стандартного отклонения (RSD), не должна превышать 15%.

Таблица 58 – Результаты определения воспроизводимости методики

Повторность исследований	Аналитик	Содержание гидрооксикоричных кислот в траве тимьяна Маршалла,%		
		Сырье №1	Сырье №2	Сырье №3
1	1	3,92	3,47	4,05
2	1	3,99	3,44	4,11
3	1	3,79	3,48	3,92
4	2	3,93	3,22	4,20
5	2	3,75	3,48	3,96
6	2	3,78	3,44	4,07
Среднее значение		3,86	3,42	4,05
Относительное стандартное отклонение, (RSD%)		6,58	7,54	6,42

Проведенные исследования позволили установить стандартное

отклонение в разработанной методике, которое не превышает 7,54%, что подверждает то, что разработанная методика в условиях воспроизводимости прецизионна.

Определение правильности методики проводили при измерении содержания суммы гидроксикоричных кислот в извлечениях, к которым добавлено необходимое количество раствора кислоты розмариновой стандартного для создания различных концентраций. При этом средний процент восстановления должен быть, скорректирован на 100%, средняя величина обычно колеблется в диапазоне 100±5%.

Таблица 59 – Результаты определения правильности разработанной методики (опыты с добавками)

№ п/п	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту розмариновую, мг	Добавлено стандартного образца кислоты розмариновой, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Ошибка, %	Статистические характеристики
1	0,176	0,02	0,196	0,202	103,06	$X_{среднее}$= 100,76 Sx^2 = 4,49807 Sx = 2,12087 Δ X = 4,9 $E_{отн}$ = 4,86%
2	0,176	0,02	0,196	0,201	102,55	
3	0,176	0,02	0,196	0,203	103,57	
4	0,176	0,04	0,216	0,218	100,93	
5	0,176	0,04	0,216	0,215	99,54	
6	0,176	0,04	0,216	0,220	101,85	
7	0,176	0,06	0,236	0,231	97,88	
8	0,176	0,06	0,236	0,234	99,15	
9	0,176	0,06	0,236	0,232	98,31	
Средняя ошибка 100,76%						

Разработанная методика показала процент восстановления от 97,88% до 103,57% (таблица 59), средняя величина его составила 100,76%. Относительная ошибка определения с 95% вероятностью не превышает 4,86%.

Таким образом, было установлено, что разработанные методики спектрофотометрического определения суммы гидрооксикоричных кислот в вариантах прямой и дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на розмариновую кислоту могут быть использованы для определения

гидроксикоричных кислот в сырье тимьянов, так как установлено, что разработанные методики легко воспроизводимы, доступны, занимают небольшое количество рабочего времени, для их проведения не требуется дорогостоящих реактивов.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в сырье растений рода тимьян

Для установления возможности использования разработанных методик спектрофотометрического определения суммы гидроксикоричных кислот методами прямой и дифференциальной спектрофотометрии по разработанным методикам проанализированы образцы травы тимьяна Маршалла и других видов растений рода тимьян, заготовленных в Курской, Воронежской, Брянской, Орловской областях в различные годы (таблица 60).

Таблица 60 - Содержание суммы гидрооксикоричных кислот в сырье растений рода тимьян

Наименование растений	Место и год заготовки сырья	Содержание суммы гидроксикоричных кислот, %	
		Метод прямой спектрофотометрии	Метод дифференциальной спектрофотометрии
Тимьян Палласа	Воронежская обл., 2012	7,11±0,27	2,76±0,07
	Белгородская обл., 2012	6,80±0,18	3,40±0,10
Тимьян меловой	Белгородская обл., 2011	6,23±0,13	4,01±0,12
	Воронежская обл., 2011	4,22±0,13	3,09±0,09
Тимьян ползучий	ООО Фирма «Здоровье»	4,86±0,19	2,26±0,09
Тимьян блошиный	Брянская обл., 2012	10,83±0,34	6,34±0,13
	Курская обл., 2012	8,23±0,23	7,84±0,26
Тимьян Маршалла	Орловская обл., 2011	5,26±0,19	3,27±0,11
	Орловская обл., 2012	5,03±0,12	3,52±0,13

	Белгородская обл., 2011	4,51±0,17	3,81±0,06
	Курская обл., 2013	5,08±0,16	3,92±0,10
Тимьян двуликий	Курская обл., 2013	3,27±0,002	1,04±0,04
	Курская обл., 2014	2,62±0,09	1,80±0,06
Тимьян Черняева	Курская обл., 2014	4,97±0,16	3,26±0,12

Проведенное определение количественного содержания суммы гидрооксикоричных кислот в траве растений рода тимьян двумя методами: прямой спектрофотометрии и дифференциальной спектрофотометрии (таблица 60) показало, что максимальное количество суммы гидрооксикоричных кислот наблюдается при использовании метода прямой спектрофотометрии и составляет от 2,62% до 10,83%; методом дифференциальной спектрофотометрии определено от 1,04% до 7,84% суммы гидрооксикоричных кислот. Недостаток первого метода заключается в невысокой избирательности и точности методики, так как в этой области спектра способны поглощать и другие фенольные соединения, содержащиеся в растениях рода тимьян, в частности флавоноиды, что приводит к получению завышенных результатов.

Таким образом полученные результаты позволяют сделать вывод о рациональности количественного определения суммы гидрооксикоричных кислот методом дифференциальной спектрофотометрии, предложенным европейской фармакопеей.

Наибольшее содержание гидроксикоричных кислот накапливается в траве тимьяна блошиного (6,34%-7,84%).

5.4 Разработка фармакопейных статей на растительное сырье тимьянов

Проведенные исследования по содержанию флавоноидов, числовых показателей, сроков годности сырья, позволили разработать характеристики подлинности и качества сырья тимьянов, а также установить их нормативы (таблица 61).

Показатели для измельченного сырья и порошка тимьяна ползучего разработаны впервые.

Впервые был разработан и ряд новых показателей для цельного сырья тимьяна ползучего.

Определено содержание радионуклидов [182].

Впервые разработан и проект нормативного документа «Тимьяна Маршалла трава».

Таблица 61 – Характеристики и показатели качества на сырье «Чабреца трава», включенного в ФС ГФ XIII издания и сырье «Тимьяна Маршалла трава», включенного в проект нормативного документа (Приложение № 6, №7)

Разделы разработанных фармакопейных статей	ФС 60 ГФ XI «Трава чабреца»	ФС «Чабреца трава», ГФ XIII издания	Проект нормативного документа «Тимьяна Маршалла трава»
1	2	3	4
Раздел «Внешние признаки»	Определены только для цельного сырья	Включены определения для: 1. Цельного сырья **2. Измельченного сырья** **3. Порошка**	Включены определения для: 1. Цельного сырья **2. Измельченного сырья** **3. Порошка**
Раздел «Микроскопия»	Определены только для цельного сырья	Включены определения для: 1. Цельного сырья **2. Измельченного сырья** **3. Порошка**	Включены определения для: 1. Цельного сырья **2. Измельченного сырья** **3. Порошка**
Раздел «Хроматография»	Раздел отсутствует	**Включен раздел «Тонкослойная хроматография» на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ)**	**Включен раздел «Тонкослойная хроматография» на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ)**

Раздел «Числовые показатели»	Цельное сырье: экстрактивных веществ, извлекаемых 30% спиртом не менее 18%; влажность не более 13%; содержание золы общей не более 12% золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; измельченность и содержание примесей.	Цельное сырье: **Включено: определение суммы флавоноидов не менее 0,9%**; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; **определение экстрактивных веществ извлекаемых спиртом 30% не менее 18%**; определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; определение золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; определение измельченности и содержания примесей. **Измельченное сырье: Включено: определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; определение экстрактивных веществ извлекаемых спиртом 30% не менее 18%**;	**Цельное сырье: Включено: определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; определение экстрактивных веществ извлекаемых спиртом 30% не менее 18%; определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; включено определение золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; определение измельченности и содержания примесей.** **Измельченное сырье: Включено: определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; определение золы,**

		определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; определение золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; определение измельченности и содержания примесей. **Порошок:** **Включено: определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; определение экстрактивных веществ извлекаемых спиртом 30% не менее 18%; определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; определение золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; определение измельченности.**	**нерастворимой в 10 % хлористоводородной не более 5%; определение измельченности и содержания примесей.** **Порошок:** **Включено: определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9%; определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 18%; определение экстрактивных веществ извлекаемых спиртом 30% не менее 18%; определение влажности не более 13%; определение золы общей не более 12%; определение золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной не более 5%; определение измельченности.**
Раздел «Тяжелые металлы»	Раздел отсутствует	**Введен раздел «Тяжелые металлы». Определение проводится согласно**	**Введен раздел «Тяжелые металлы». Определение**

		ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	**проводится согласно ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»**
Раздел «Радионуклиды»	Раздел отсутствует	**Введен раздел «Радионуклеиды». Определение проводится согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»**	**Введен раздел «Радионуклеиды». Определение проводится согласно ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»**
Раздел «Остаточные количества пестицидов»	Раздел отсутствует	**Введен раздел «Остаточные количества пестицидов». Определение проводится согласно ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»**	**Введен раздел «Остаточные количества пестицидов». Определение проводится согласно ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»**

Раздел «Микробиологическая чистота»	Раздел отсутствует	**Введен раздел «Микробиологическая чистота» Определение проводили согласно ОФС «Методы микробиологического контроля лекарственного растительного сырья»**	**Введен раздел «Микробиологическая чистота» Определение проводили согласно ОФС «Методы микробиологического контроля лекарственного растительного сырья»**

Примечание: жирным шрифтом показываются характеристики, которые для данных видов сырья разработаны впервые.

Выводы по главе 5

1. Впервые разработаны методики качественного определения флавоноидов, гидрооксикоричных кислот в траве тимьянов.
2. Впервые разработана спектрофотометрическая методика определения флавоноидов в пересчете на цинарозид для сырья тимьянов. Показано, что содержание флавоноидов в траве тимьяна ползучего варьирует от 0,94±0,04% до 1,64±0,06%. Установлен показатель содержания флавоноидов в траве тимьяна ползучего не менее 0,9%. Содержание флавоноидов в сырье других исследованных видов тимьяна колеблется от 0,81±0,03 до 2,43±0,08%. Исследуемые виды рода тимьян (кроме тимьяна двуликого) по содержанию флавоноидов удовлетворяют требованиям ФС «Чабреца трава».
3. Определены числовые показатели для характеристики качества сырья чабреца: влажность, зола общая, зола, не растворимая в растворе кислоты хлористоводородной 10%, сумма экстрактивных веществ, извлекаемых водой и сумма экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 30%.
4. Впервые разработаны методики спектрофотометрического определения гидрооксикоричных кислот методами прямой и дифференциальной спектрофотометрии. Содержание суммы гидрооксикоричных кислот,

определенное методом прямой спектрометрии колеблется от 2,62±0,09% до 10,83±0,34%, а методом дифференциальной спектрофотометрии от 1,04±0,04% до 7,84±0,26%. Наиболее точной является метод дифференциальной спектрофотометрии. Наибольшее количество гидрооксикоричных кислот накапливается в траве тимьяна блошиного.

5. Разработанные методики спектрофотометрического определения флавоноидов и гидрооксикоричных кислот валидированы по показателям: диапазону использований, линейности, повторяемости, правильности, воспроизводимости .
6. Проведены исследования по выявлению сроков годности сырья тимьянов, на основании чего подтвержден срок годности травы чабреца – 2 года.
7. На основании проведенных исследований разработана и утверждена ФС «Чабреца трава». Рассмотрена и утверждена «Инструкция по сбору и сушке травы чабреца» Комиссией по стандартизации ВИЛАР (Приложение №8). Разработан и подготовлен к рассмотрению проект нормативного документа «Тимьяна Маршалла трава».

ГЛАВА 6 ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В соответствии с изученным химическим составом растений рода тимьян и применением тимьяна ползучего в официнальной медицине, а также данными народной медицины по применению растений данного рода, исследование фармакологических свойств растений рода тимьян включало определение отхаркивающего, противовоспалительного, ангиопротекторного, антибактериального, антиоксидантного действия, в сравнении с тимьяном ползучим.

6.1 Определение острой токсичности настоев из растений рода тимьян

Предварительно нами была изучена острая токсичность водных извлечений (настоев) из растений рода тимьян (глава 2, раздел 2.3.1).

Изучение острой токсичности водных извлечений (настоев) из растений рода тимьян показало, что при внутрибрюшинном введении испытуемых настоев, во всех исследованных дозах гибели животных в течение всего периода наблюдения не отмечали (таблица 62).

Таблица 62 - Результаты исследования острой токсичности настоев из травы растений рода тимьян

Растение, вводимый фитопрепарат (настой)	Вводимая доза	Количество животных в группе	
		погибших	живых

Тимьян Палласа	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6
Тимьян меловой	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6
Тимьян блошиный	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6
Тимьян Маршалла	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6
Тимьян двуликий	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6
Тимьян Черняева	2000 мг/кг 3000 мг/кг 4000 мг/кг 5000 мг/кг	0 0 0 0	6 6 6 6

Максимальная вводимая доза для полученных настоев из растений рода тимьян составила 5000 мг/кг (пересчет вели на сухое сырье). Введение более высоких доз водных извлечений в течение первых часов вызывало у животных некоторые признаки интоксикации, проявляющиеся в виде снижения аппетита, вялости, учащения дыхания, гиподинамии. 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). LD_{50} в опытах не была установлена, так как введение максимально допустимой по объему дозы настоя, гибели животных не вызывало.

Таким образом, на основании полученных данных исследуемые настои из растений рода тимьян в дозах до 5000 мг/кг отнесены по классификации Е.А. Лужникова к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности) [151, 211].

6.2 Отхаркивающее действие настоев из растений рода тимьян

Заболевания органов дыхания до настоящего времени, остаются самыми распространенными среди других заболеваний [96]. Для лечения заболеваний верхних дыхательных путей, широко используются отхаркивающие средства, большая часть из которых имеет растительное происхождение. Фитопрепараты помимо отхаркивающей оказывают и другие виды активности: антимикробную, противовоспалительную, что подчеркивает их важность при лечении заболеваний. К таким растениям относится фармакопейный вид - тимьян ползучий. В связи с чем изучение возможности использования других видов рода тимьян, наряду с официнальным – тимьяном ползучим, является актуальным.

В основу определения отхаркивающей активности у исследуемых настоев взяли величину коэффициента ускорения движения ресничек мерцательного эпителия пищевода лягушки (глава 2, раздел 2.3.2) (таблица 63).

Таблица 63 – Результаты по исследованию отхаркивающей активности

Растение, вводимое извлечение	Коэффициент ускорения	Увеличение двигательной активности, %

Тимьян Палласа ▪настой травы	0,53±0,03	49,31±3,25*
Тимьян меловой ▪настой травы	0,63±0,02	36,80±2,22*
Тимьян блошиный ▪настой травы	0,62±0,02	38,46±2,02*
Тимьян Маршалла ▪настой травы	0,60±0,02	40,36±2,22*
Тимьян двуликий ▪настой травы	0,59±0,02	41,16±2,37*
Тимьян Черняева ▪настой травы	0,59±0,02	40,90±1,77*
Тимьян ползучий (чабрец) ▪настой травы	0,61 ± 0,03*	38,38 ± 2,53*

Примечание: * - различия статистически достоверны по отношению к контролем при $P < 0,05$, количество лягушек в группе равно 6.

Нами установлено, что все изучаемые настои обладают отхаркивающими свойствами, что подтверждается повышением двигательной активности мерцательного эпителия пищевода лягушек. Выявленная отхаркивающая активность исследуемых водных извлечений (настоев) была сопоставима с таковой официнального вида – тимьяна ползучего (чабреца) (увеличение двигательной активности на 38,38%) или превышает ее. Наиболее выраженное отхаркивающее действие наблюдается у травы тимьяна Палласа (увеличение двигательной активности на 49,31%) и оно значительно превосходит действие травы тимьяна ползучего [50, 52].

Отхаркивающая активность, по-видимому, обусловлена наличием в исследуемых видах сырья эфирного масла, фенилпропаноидов и полисахаридов исследуемых видов.

6.3 Изучение противовоспалительной активности растений рода тимьян

В литературном обзоре нами отмечено, что растения рода тимьян широко применяются в народной медицине в качестве противовоспалительных средств в лечении заболеваний верхних дыхательных путей, что согласуется и с данными, полученными нами при изучении химического состава растений рода тимьян, из которых следует, что в исследуемых растениях содержатся фенилпропаноиды – тимол и карвакрол; фенольные соединения (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины), эфирное масло, полисахариды. Согласно данным литературы выявленные классы природных соединений [38, 158, 159], обладают противовоспалительной активностью.

Противовоспалительную активность исследуемых водных извлечений определяли с помощью моделей асептического воспаления, которые позволяли оценить влияние настоев на различные стадии процесса воспаления: альтерацию и экссудацию.

Изучение антиэкссудативной активности настоев из растений рода тимьян при отеке, вызванном введением формалина

Антиэкссудативную активность водных настоев изучали с

использованием модели острого воспаления, которое вызывали при субплантарном введении раствора формалина 0,2% в воде очищенной в заднюю лапу мыши (глава 2, раздел 2.3.3). При этом установлено (таблица 64), что, введение формалина вызывает развитие отека конечности, масса которого у мышей в контрольной группе равна 58,27±2,65, принятом нами за 100 %.

Таблица 64 – Результаты изучения влияния настоев из травы растений рода тимьян на экссудативную фазу воспаления

Растения, вводимое извлечение	**Вводимая доза, мг/кг**	**Разность между массами конечностей отечной и неотечной, мг**	**Угнетения отека,%**
Контрольная группа		58,27±2,65	-
Тимьян Палласа - настой	1000	17,68±2,55*	69,66
Тимьян меловой - настой	1000	38,97±4,74*	33,12
Тимьян блошиный - настой	1000	21,42±2,51*	63,24
Тимьян Маршалла - настой	1000	35,68±4,24*	38,77
Тимьян двуликий - настой	1000	39,72±1,80*	31,83
Тимьян Черняева - настой	1000	42,38±7,80*	27,27
Препарат сравнения (настой **травы тимьяна ползучего**)	1000	35,03±0,93*	39,88

Примечание: *- значение, достоверно отличающиеся по сравнению с данными контрольной группы, P≤0,05; количество мышей в группе - 6.

Установлено, что при введении настоев из исследуемых растений наблюдается достоверное снижение массы отека конечности, что свидетельствует об антиэкссудативной активности. Так, при введении настоев

наблюдали уменьшение отека от 27,27 % (тимьян Черняева) до 69,66 % (тимьян Палласа) в сравнении с мышами контрольной группы [51, 52].

Наиболее выраженную антиэкссудативную активность наблюдали при введении настоев травы тимьяна блошиного (63,24%) и тимьяна Палласа (69,66%). Установлено, что антиэкссудативное действие настоев из травы тимьяна Маршалла сопоставимо с таковым травы тимьяна ползучего, а у травы тимьяна мелового, тимьяна двуликого, тимьяна Черняева антиэкссудативная активность несколько ниже, чем у препарата сравнения - тимьяна ползучего. Антиэкссудативна активность исследуемых растений рода тимьян на наш взгляд обусловлена наличием в нем фенолокислот, в том числе розмариновой кислоты, флавоноидов, полисахаридов.

Изучение пролиферативной активности настоев из растений рода тимьян

Определение влияния исследуемых настоев на образование грануляционно-фиброзной ткани у крыс проводили с использованием модели «ватной гранулемы» (глава 2, раздел 2.3.3) (таблица 65).

Таблица 65 – Результаты изучения влияния настоев из травы растений рода тимьян на пролиферативные процессы у белых крыс в очаге воспаления

Растение, вводимое извлечение	**Вводимая доза, мг/кг**	**Вес высушенных гранулем, мг**	**%, угнетение образования гранулемы**
Контрольная группа	-	140,55±8,07	-
Тимьян Палласа - настой	1000	42,97±5,19*	69,43
Тимьян меловой - настой	1000	57,98±5,42*	58,75
Тимьян блошиный - настой	1000	54,00±6,30*	61,58
Тимьян Маршалла - настой	1000	36,05±5,24*	74,35
Тимьян двуликий - настой	1000	48,27±7,33*	65,66
Тимьян Черняева - настой	1000	47,80±4,82*	65,99
Препарат сравнения **(Настой травы тимьяна ползучего)**	1000	30,70±3,84*	78,16

Примечание: * - различия в сравнении с данными контрольной группы статистически достоверны, $P < 0,05$; количество крыс в группе - 6.

Как показали результаты исследований, настои из изучаемых растений вызывают уменьшение веса фиброзно-грануляционной ткани у животных опытных групп, что говорит о наличии антипролиферативного действия. В среднем, вес высушенных гранулем у крыс, опытных групп составил от 36,05 ± 5,24 мг до 57,98 ± 5,42 мг против 140,55±8,07 мг в контроле [51, 52]. Установлено, что наиболее выраженная антипролиферативная активность характерна для настоя из травы тимьяна Маршалла: на фоне введения данного настоя угнетение образования гранулемы составило 74,35 % по сравнению с данными контрольной группы и оно было сопоставимо с таковым травы тимьяна ползучего (78,16%).

Можно предложить, что антипролиферативная активность изучаемых настоев обусловлена суммарным воздействием эфирного масла, фенолокислот, флавоноидов.

6.4 Изучение влияния настоев на проницаемость капилляров

Влияние исследуемых настоев на проницаемость капилляров изучали с помощью метода Ойвина (глава 2, раздел 2.3.4) (таблица 66).

Проведенные исследования показали, что настои из травы растений рода тимьян увеличивают время проникновения раствора трипановой сини через гисто-гематический барьер, вызванный острым асептическим воспалением, что говорит о наличии в них ангиопротекторной активности. Так, у кроликов опытных групп, которые получали настои из травы исследуемых видов тимьянов, наблюдалось увеличение латентного периода появления пятен окрашивания с 5,17±0,49 минут (у настоя тимьяна двуликого) до 9,34±0,50 минут (у настоя тимьяна мелового) по сравнению с 3,96 ± 0,18 минутами в

контрольной группе и уменьшение диаметра пятен окрашивания с 1,37±0,02 см у настоя травы тимьяна Маршалла до 0,91±0,03 см у настоя травы тимьяна Палласа. Полученные в результате исследований эффекты были сопоставимы с эффектом официнального вида настоем травы тимьяна ползучего, а иногда и превышали его. Ангиопротекторная активность настоев из растений рода тимьян по-видимому обусловлена наличием в их сырье флавоноидных соединений.

Таблица 66 - Изучение влияния водных извлечений из травы растений рода тимьян на проницаемость капилляров

Растение, вводимое извлечение	Вводимая доза, мг/кг	Время латентного периода появления пятен окрашивания, мин	Увеличение времени латентного периода появления пятен окрашивания		Диаметр пятен окрашивания, см	Уменьшение диаметра пятен окрашивания, %
			мин	%		
1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***
Контрольная	-	3,96±0,18	-	-	1,74±0,03	-
Тимьян Палласа - настой	1000	6,36±0,31*	2,40	60,61%	0,91±0,03	47,40
Тимьян меловой - настой	1000	9,34±0,50*	5,38	135,86%	1,36±0,03	21,84
Тимьян блошиный - настой	1000	5,52±0,41*	1,56	39,39	1,15±0,07*	33,91
Тимьян Маршалла - настой	1000	6,32±0,23*	2,36	59,60	1,37±0,02*	21,26
Тимьян двуликий - настой	1000	5,17±0,49*	1,21	30,56	1,34±0,05*	22,99
Тимьян Черняева - настой	1000	7,50±0,28*	3,54	89,39	0,95±0,05*	45,40
Препарат сравнения **Тимьян ползучий** - настой	1000	6,29±0,58	2,33	58,84	1,09±0,04*	37,36

Примечание: *- различия статистически достоверны в сравнении с контролем, $P < 0,05$. Количество животных в контрольном опыте и в каждом варианте опыта 10.

6.5 Изучение антиоксидантной активности растений рода тимьян

В последнее время лекарственные препараты с антиоксидантной активностью все чаще применяют в медицине для лечения заболеваний различной направленности: поражений мозга [194, 195], ишемической болезни сердца [114, 135], онкологических заболеваний [18], лучевых поражений, атеросклероза [119], туберкулеза [229].

В клинической практике наиболее широко применяются растительные антиоксиданты [119], среди которых наиболее часто используемыми являются α-токоферол [157, 313, 314, 349], а также β-каротин [18, 122]. В растениях накапливаются различные антиоксиданты [156, 175, 184, 318, 346], относящиеся к различным классам природных соединений: флавоноидам [126, 247, 264, 276], антоцианам и протоантоцианидинам [291, 310, 330, 332, 348], халконам [289, 329] танинам [203, 306, 316, 336, 341], производным кофейной кислоты [8, 157], кумаринам [187, 344, 345], дитерпеновым [307] и тритерпеновым соединениям [331], витаминам [323, 325], эфирным маслам, фосфолипидам, ферментам, аминокислотам [16, 196], ксантонам [311], лигнанам [2], алкалоидам [324].

Для медицинского применения лучше использовать антиоксиданты, в виде галеновых форм из растений [119]. Галеновые фитопрепараты, получаемые из растительного сырья проявляют высокую антиоксидантную активность, что обусловлено комплексным действием различных групп биологически активных веществ, содержащихся в них: эфирного масла, фенольных соединений, аминокислот, аскорбиновой кислоты, макро-микроэлементов и др. Помимо этого, растительные антиоксиданты характеризуются низкой токсичностью, оказывают мягкое воздействие на организм, что может служить основанием для перспективности их применения для коррекции патологий, которые возникают при активации

процессов свободно-радикального окисления [13]. Все вышесказанное говорит об актуальности выявления новых растительных антиоксидантов с целью дальнейшего использования в медицинской практике. В связи с чем нами была изучена антиоксидантная активность исследуемых видов тимьянов, произрастающих на территории средней полосы России (глава 2 раздел 2.3.6).

Таблица 67 – Изучение антиоксидантной активности растений рода тимьян

Вид экстрагента	Содержание флавоноидов, г/100 г	Содержание фенольных соединений, г/100 г	Антиоксидантная активность, мг/г		
			в пересчете на цинарозид	в пересчете на рутин	в пересчете на кверцетин
	Тимьян Палласа				
Вода очищенная	0,15±0,01	0,95±0,03	8,54±0,14	8,68±0,25	5,14±0,18
Спирт этиловый 30%	0,31±0,01	1,92±0,06	16,11±0,56	15,82±0,43	9,59±0,34
Спирт этиловый 50%	0,33±0,01	3,27±0,13	17,95±0,71	18,43±1,29	10,79±0,43
Спирт этиловый 70%	0,43±0,02	2,20±0,10	19,47±0,83	19,72±0,84	11,64±0,50
Спирт этиловый 90%	0,30±0,01	2,00±0,07	7,79±0,26	7,83±0,26	4,65±0,14
	Тимьян меловой				
Вода очищенная	0,35±0,01	0,54±0,04	14,54±0,32	14,71±0,38	8,71±0,23
Спирт этиловый 30%	0,38±0,02	0,64±0,06	15,55±0,44	15,66±0,47	9,30±0,28
Спирт этиловый 50%	0,48±0,02	1,24±0,04	20,58±0,65	20,85±0,69	12,35±0,47
Спирт этиловый 70%	0,61±0,03	0,83±0,05	24,31±0,95	24,35±0,96	14,51±0,61
Спирт этиловый 90%	0,28±0,02	0,53±0,05	10,26±0,20	10,34±0,22	6,13±0,13
	Тимьян блошиный				
Вода очищенная	0,49±0,01	1,55±0,01	13,18±0,38	13,28±0,38	7,88±0,23
Спирт этиловый 30%	0,47±0,02	1,93±0,07	14,54±0,46	14,64±0,47	8,84±0,84
Спирт этиловый 50%	0,52±0,02	2,15±0,07	15,25±0,52	15,36±0,52	9,12±0,30
Спирт этиловый 70%	0,57±0,02	2,04±0,09	19,43±0,84	19,57±0,84	11,61±0,50
Спирт этиловый 90%	0,18±0,008	1,02±0,04	8,17±0,14	8,23±0,14	4,89±0,09
	Тимьян Маршалла				
Вода очищенная	0,14±0,04	1,14±0,04	19,47±0,58	19,64±0,69	11,66±0,39
Спирт этиловый 30%	0,34±0,04	2,01±0,06	28,19±1,14	28,52±1,17	16,94±0,70
Спирт этиловый 50%	0,48±0,04	2,26±0,08	19,95±0,67	20,10±0,80	12,00±0,34
Спирт этиловый 70%	0,49±0,04	1,18±0,04	30,95±1,40	30,95±1,39	18,41±0,81
Спирт этиловый 90%	0,14±0,04	0,52±0,04	13,44±0,35	13,55±0,30	8,05±0,20
	Тимьян двуликий				
Вода очищенная	0,23±0,04	0,64±0,04	12,68±0,38	12,80±0,32	7,59±0,21
Спирт этиловый 30%	0,27±0,04	1,22±0,04	14,02±0,34	14,13±0,47	8,53±0,22
Спирт этиловый 50%	0,28±0,04	1,53±0,04	13,24±0,28	13,32±0,27	7,89±0,16
Спирт этиловый 70%	0,36±0,04	1,22±0,05	20,06±0,79	20,33±0,54	11,98±0,44
Спирт этиловый 90%	0,24±0,04	0,55±0,06	10,74±0,26	10,80±0,25	6,41±0,13
		Тимьян Черняева			
Вода очищенная	0,18±0,01	0,62±0,02	7,66±0,27	7,72±0,30	4,58±0,18

Спирт этиловый 30%	0,18±0,01	1,01±0,04	13,82±0,41	13,92±0,99	8,26±0,39
Спирт этиловый 50%	0,35±0,02	1,59±0,04	13,88±0,56	13,98±0,58	8,30±0,34
Спирт этиловый 70%	0,42±0,02	1,42±0,05	19,69±0,77	19,87±0,78	10,79±0,49
Спирт этиловый 90%	0,15±0,01	0,48±0,02	7,77±0,50	7,83±0,23	4,65±0,25
		Тимьян ползучий			
Вода очищенная	0,24±0,04	1,91±0,05	23,54±0,88	23,78±0,90	14,01±0,50
Спирт этиловый 30%	0,31±0,04	1,98±0,07	28,29±1,13	28,56±1,15	16,98±0,70
Спирт этиловый 50%	0,33±0,04	2,83±0,12	20,67±0,61	20,88±0,67	12,38±0,47
Спирт этиловый 70%	0,51±0,04	2,25±0,07	30,86±1,37	31,17±1,38	18,53±0,84
Спирт этиловый 90%	0,17±0,04	0,36±0,04	21,41±0,69	21,51±0,63	12,74±0,39

В результате определения антиоксидантной активности установлено, что все исследуемые извлечения из сырья растений рода тимьян обладают антиоксидантной активностью. Анализируя данные, представленные в таблице 67, можно отметить, что наиболее выраженную антиоксидантную активность проявляют водно-спиртовые извлечения, в которых в качестве экстрагента использовался спирт этиловый от 30% до 70%. Из исследуемых растений наиболее выраженная антиоксидантная активность выявлена у тимьяна ползучего, тимьяна Маршалла, тимьяна Палласа. Наименьшую антиоксидантную активность проявляли водные извлечения и спирт этиловый 96%. При этом содержание флавоноидов и суммы фенольных соединений коррелирует с антиоксидантной активностью. Максимальное содержание флавоноидов отмечено для извлечений спиртом этиловым 70%.

6.6 Изучение антибактериальной активности настоев и эфирного масла полученных из растений рода тимьян

Многие инфекционные заболевания протекают вяло, имеют хронический характер, что предусматривает длительное применение антимикробных средств для их лечения. Для лечения инфекционных заболеваний показаны лекарственные препараты растительного

происхождения, которые можно применять в течение длительного времени, кроме того, в сравнении с синтетическими препаратами они более безопасны, для них характерна полифункциональность [111, 282]. В связи с чем, возник интерес изучения антимикробной активности исследуемых видов тимьяна, в сравнении с официнальным видом – тимьяном ползучим, еще и потому, что растения рода тимьян широко применяются в народной медицине для лечения заболеваний верхних дыхательных путей.

Изучение антимикробного действия у исследуемых настоев и эфирного масла проводили методом культивирования на питательную среду микробов с добавлением к среде исследуемых настоев и эфирного масла и с использованием стандартного набора индикаторных штаммов микроорганизмов (глава 2, раздел 2.3.5).

Эфирное масло получали гидродистилляцией по методике ГФ XI издания [ГФ XI] в течении 3 часов. Настои также получали по ГФ XI издания.

Результаты проведенных исследований (таблицы 68-69) свидетельствуют о том, что исследуемые настои и эфирное масло обладают достаточно выраженным антибактериальным действием в отношении исследованных штаммов микроорганизмов.

Результаты определения антимикробной активности исследуемых настоев показали, что они оказывают неодинаковую антимикробную активность в отношении выбранных штаммов микроорганизмов (таблица 68).

Наибольшую активность проявил настои из травы тимьяна блошиного, он показал полное отсутствие роста всех используемых микроорганизмов, его активность была выше, чем у травы тимьяна ползучего. Исследуемые настои травы тимьяна Маршалла и тимьяна мелового также показали более выраженную антимикробную активность по сравнению с травой тимьяна ползучего. У настоев травы тимьяна Маршалла и тимьяна мелового наблюдалось бактериостатическое действие (слабый рост) в концентрации

1:10 в отношении культуры Escherichia coli, а у травы тимьяна мелового дополнительно в концентрации 1:10 в отношении грибов рода Candida. У настоя травы тимьяна Черняева слабый рост наблюдался в отношении Bacillus cereus в концентрации 1:10 и отсутствие антибактериальной активности в отношении кишечной палочки также в соотношении 1:10. Меньшую активность по сравнению с травой тимьяна ползучего проявили тимьян двуликий и тимьян Палласа. Однако настои из них были активными в отношении культуры Staphylococcus aureus, при этом наблюдалось отсутствие роста данной культуры во всех исследованных концентрациях. Одновременно настой из травы тимьяна Палласа угнетал рост культур Proteus vulgaris и грибов рода Candida. Настой из травы тимьяна двуликого проявил антимикробную активность в концентрации 1:4 в отношении культур Escherichia coli, Proteus vulgaris, Bacillus cereus, а из травы тимьяна Палласа в отношении культуры Pseudomonas aeruginosa [46, 51].

При исследовании эфирных масел, полученных из исследуемых тимьянов установлено, что наиболее высокую антимикробную активность проявляет эфирное масло тимьяна блошиного (таблица 69).

Оно проявляло антимикробную активность в отношении всех исследованных микроорганизмов, во всех концентрациях и превосходило по действию эфирное масло тимьяна ползучего. Остальные исследованные масла были активны в отношении культуры Staphylococcus aureus во всех исследованных концентрациях. В отношении культуры Pseudomonas aeruginosa исследуемые эфирные масла показали неодинаковое действие. Полное отсутствие роста наблюдалось у эфирных масел тимьяна блошиного, тимьяна мелового и тимьяна Палласа. Эфирное масло тимьяна Маршалла было неактивно только в соотношении 1:9. Эфирное масло тимьяна двуликого показало полное отсутствие антибактериальной активности. В отношении кишечной палочки исследуемые эфирные масла разделились на

Таблица 68 - Антимикробная активность настоев из травы растений рода тимьян

Вид тимьяна	Разведение настоев	Candida albicans ATCC 885653	Staphylococcus aureus ATCC 6538-P	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Proteus vulgaris ATCC 27853	Escherichia coli ATCC 25922	Bacillus cereus ATCC 10702
Тимьян Маршалла	1:2	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:10	-	-	-	-	±	-
Тимьян Палласа	1:2	-	-	-	-	±	-
	1:4	-	-	-	-	±	±
	1:10	-	-	±	-	+	+
Тимьян блошиный	1:2	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:10	-	-	-	-	-	-
Тимьян меловой	1:2	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:10	±	-	-	-	±	-
Тимьян двуликий	1:2	±	-	±	-	-	-
	1:4	±	-	+	-	-	-
	1:10	+	-	+	±	±	+
Тимьян Черняева	1:2	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:10	-	-	-	-	+	±
Тимьян ползучий (чабрец)	1:2	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:10	-	+	-	-	+	-

Примечание: "-" – рост тест-культур отсутствует;
"±" - рост тест-культур слабый;
"+" - рост тест-культур сильный.

Таблица 69 - Антимикробная активность эфирных масел из травы растений рода тимьян

Вид тимьяна	Разведение эфирного масла	Candida albicans ATCC 885653	Staphylococcus aureus ATCC 6538-P	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Proteus vulgaris ATCC 27853	Escherichia coli ATCC 25922	Bacillus cereus ATCC 10702
Тимьян ползучий (чабрец)	0,1+0,9	-	±	-	-	±	-
	0,2+0,8	-	-	-	-	-	-
	0,3+0,7	-	-	-	-	-	-
	0,4+0,6	-	-	-	-	-	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	-	-
Тимьян Маршалла	0,1+0,9	±	-	+	-	±	±
	0,2+0,8	-	-	-	-	±	±
	0,3+0,7	-	-	-	-	-	±
	0,4+0,6	-	-	-	-	-	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	-	-
Тимьян меловой	0,1+0,9	-	-	-	-	+	-
	0,2+0,8	-	-	-	-	+	-
	0,3+0,7	-	-	-	-	+	-
	0,4+0,6	-	-	-	-	+	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	+	-
Тимьян Палласа	0,1+0,9	-	-	-	-	+	-
	0,2+0,8	-	-	-	-	+	-
	0,3+0,7	-	-	-	-	+	-
	0,4+0,6	-	-	-	-	+	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	+	-
Тимьян	0,1+0,9	-	-	-	-	-	-

блошиный	0,2+0,8	-	-	-	-	-	-
	0,3+0,7	-	-	-	-	-	-
	0,4+0,6	-	-	-	-	-	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	-	-
Тимьян двуликий	0,1+0,9	-	-	+	+	+	+
	0,2+0,8	-	-	+	+	+	+
	0,3+0,7	-	-	+	+	+	+
	0,4+0,6	-	-	+	+	+	-
	0,5+0,5	-	-	+	+	+	-
Тимьян Черняева	0,1+0,9	±	-	+	-	+	±
	0,2+0,8	-	-	±	-	±	±
	0,3+0,7	-	-	-	-	-	-
	0,4+0,6	-	-	-	-	-	-
	0,5+0,5	-	-	-	-	-	-

Примечание: "-" – рост тест-культур отсутствует;
"±" - рост тест-культур слабый;
"+" - рост тест-культур сильный.

две части: эфирное масло тимьяна ползучего, тимьяна блошиного, тимьяна Маршалла, тимьяна Черняева оказывали антимикробное действие, а у эфирных масел тимьяна мелового, тимьяна двуликого такой активности не наблюдалось. В отношении культуры Proteus vulgaris все исследованные масла, за исключением эфирного масла тимьяна двуликого проявляли антимикробную активность. Эфирное же масло тимьяна двуликого показало полное её отсутствие. Все исследованные эфирные масла угнетали рост культур Staphylococcus aureus и дрожжеподобных грибов рода Candida. Отсутствие роста тест культур Bacillus cereus наблюдалось на питательной среде с эфирными маслами тимьяна блошиного, тимьяна ползучего, тимьяна мелового и тимьяна Палласа во всех исследуемых концентрациях. У эфирного масла тимьяна двуликого и тимьяна Маршалла наблюдалось отсутствие роста только в концентрации 1:1 и 1:1,5; в других исследованных концентрациях у эфирного масла тимьяна Маршалла наблюдался слабый рост (бактериостатическое действие); а у эфирного масла тимьяна двуликого в концентрации 1:2 наблюдалось бактериостатическое действие, а в концентрациях 1:4 и 1:9 отмечено отсутствие антибактериальной активности, у тимьяна Черняева наблюдался слабее рост в концентрациях 1:4 и 1:9 [46].

6.7 Совершенствование технологии жидкого экстракта чабреца

Литературный обзор (глава 1, раздел 1.4) показал, что до настоящего времени жидкий экстракт травы чабреца производится по методу ускоренной дробной мацерации в модификации ЦАНИИ. В качестве экстрагента используется спирт этиловый 30% с содержанием глицерина 10%. Однако эффективность такой технологии составляет всего 50%. В связи с чем, нами предприняты попытки совершенствования технологии жидкого экстракта чабреца.

6.7.1 Изучение технологических характеристик сырья и разработка жидкого экстракта вакуум-фильтрационным способом

Из литературы известно, что одним из важных этапов при разработке жидких экстрактов является использование рационального способа экстрагирования, позволяющего максимально извлекать действующие вещества. Полнота и скорость экстрагирования зависит от технологических свойств сырья. Как показали многочисленные исследования выход биологически активных веществ из лекарственно растительного сырья увеличивается при использовании для измельчения сырья двухвалковых измельчителей, в которых одновременно с процессом раздавливания происходит и истирание сырья [165, 214, 263].

Подготовленное таким образом растительное сырье эффективно экстрагировать вакуум-фильтрационным способом, предложенным В. И. Литвиненко с соавторами [263]. Ими было показано, что данный способ экстрагирования имеет значительные преимущества по сравнению с классическими методами экстрагирования (перколяция, реперколяция и др.) [214, 248, 263]: например, сокращение времени (5-10 раз) получения извлечения, увеличение эффективности экстракции (на 20-50%), применение более компактного оборудования и в связи с этим сокращение производственных площадей и т.д. [235, 248, 263].

В связи с чем, мы решили изучить возможность использования для получения жидкого экстракта чабреца метода вакуум-фильтрационного способа экстрагирования.

На первом этапе нами была проведена подготовка сырья для экстрагирования. С этой целью растительное сырье чабреца измельчали на двухвалковом измельчителе ПД 320-160/160, пропуская его через него трижды. Сырье равномерно подавали на измельчитель, подправляя распределение его специальным веслом. Сырье должно равномерно распределяться по всей

поверхности валков, не вызывая заклинивания и резкого торможения вращения. Измельченное сырье при этом имеет вид равномерно раздавленных лепестков толщиной 1,0-1,5 мм. Далее проводили сравнительное исследование технологических характеристик подготовленного тонкоизмельченного сырья и сырья, измельченного согласно ГФ XI издания (размер частиц 5 мм) и используемого для экстрагирования классическими методами: содержание действующих веществ, влажность, коэффициент спиртопоглощения и насыпная масса [83].

В исходном сырье определяли содержание: флавоноидов по методике, описанной в главе 4 (глава 4, раздел 4.1). Параллельно проводили определение влажности сырья в соответствии с методикой, предложенной в ГФ XI издания [83].

Полученные данные представлены в таблице 70.

Таблица 70 –Технологические характеристики сырья тимьяна ползучего различной степени измельчения

Степень измельчения сырья	Наименование показателей				
	Средний размер частиц, мм	Содержание суммы флавоноидов, %	Влажность сырья, %	Насыпная масса, г/см^3	Объёмная масса, г/см^3
Измельченное по ГФ XI издания	5,00	1,87±0,15	12,18±0,13	0,18±0,07	0,26±0,05
Вальцованное	0,30	2,58±0,13	11,24±0,16	0,62±0,85	0,58±0,06

Как видно из таблицы 70, содержание флавоноидов и влажность сырья соответствуют требованиям нормативной документации (ФС Чабреца трава), в соответствии с которой влажность сырья не должна превышать 13%, а содержание флавоноидов не менее 0,9%.

Коэффициенты поглощения в технологическом процессе необходимы для расчета количества экстрагента, а так же с целью учета расходования спирта,

оставшегося в отработанном сырье, и его частичном возвращении с помощью процесса рекуперации в технологический процесс [5].

Коэффициент спиртопоглощения травы тимьяна ползучего определяли по общеизвестной методике [5] для различных концентраций этанола: 20%, 30%, 40%, 50%, 70% и 96%. Используя данный коэффициент, учитывали потери спирта в набухшем сырье и рассчитали его количество для проведения процессов экстрагирования. Результаты эксперимента представлены в таблице 71.

Таблица 71 – Результаты определения коэффициента спиртопоглощения травы тимьяна ползучего

Спирт этиловый, %	Коэффициент спиртопоглощения ($см^3$/г) сырья со степенью измельчения	
	Вальцованное	5 мм
20	2,80±0,09	4,20±0,10
30	2,70±0,12	4,00±0,11
40	2,70±0,12	3,95±0,13
50	2,60±0,11	3,70±0,11
70	2,50±0,09	3,50±0,10
96	2,00±0,10	3,10±0,12

Проведенные результаты показали: чем больше размер частиц сырья, тем больше коэффициент спиртопоглощения, однако с повышением концентрации спирта этилового, коэффициент спиртопоглощения уменьшается.

К факторам, влияющим на процесс экстрагирования биологически активных веществ и технологические свойства сырья относится также выбор экстрагента, максимально их извлекающий. Для получения экстрактов наиболее широко применяется спирт этиловый различной концентрации, который экстрагирует большинство природных биологически активных веществ, в том числе и флавоноиды [4, 5]. Для выбора оптимального экстрагента было изучено влияние используемой концентрации спирта этилового на извлечение флавоноидов из сырья.

Процесс экстрагирования проводили следующим образом: точную навеску сырья (около 10,0 г), измельченного до 5,0±0,5 мм высушенного сырья

тимьяна ползучего помещали в цилиндр с притертой пробкой, заливали 30,0 мл экстрагента, герметично закрывали. Оставляли настаиваться при периодическом помешивании на 7 суток, после выстаивания извлечение полностью сливали, фильтровали [102] и оценивали его качество по содержанию суммы флавоноидов (таблица 72).

Таблица 72 – Результаты определения оптимального экстрагента

Концентрация спирта этилового, %	Содержание флавоноидов, %
20	0,67±0,12
30	1,40±0,13
40	1,24±0,12
50	2,15±0,11
70	1,94±0,10
96	0,54±0,12

Полученные данные свидетельствуют, что все исследуемые экстрагенты извлекают флавоноидные соединения в той или иной степени. Максимальное извлечение – флавоноидов наблюдается в извлечениях, полученных с применением спирта этилового 50%. Поэтому в дальнейшем в качестве оптимального экстрагента нами выбран спирт этиловый 50%.

С целью определения преимущественного способа экстрагирования нами была проведена сравнительная оценка 2-х вариантов экстрагирования: промышленным способом – ускоренной дробной мацерации (модификации ЦАНИИ) и вакуум-фильтрационной экстракции. Для этого в лабораторных условиях моделировали данные процессы экстрагирования.

Для ускоренной дробной мацерации (модификация ЦАНИИ) траву тимьяна ползучего, измельченную и просеянную сквозь сито с диаметром отверстий 5,0 мм (20,0 г) укладывали по 7,0 г в 3 диффузора. В диффузор №1 заливали 60 мл экстрагента и оставляли на 24 часа, затем вытяжку переводили в диффузор №2. Одновременно в первый диффузор заливали 5 мл экстрагента. Оба диффузора оставляли на 6 часов. Далее вытяжку из диффузора №2 переводили в диффузор №3, а вытяжку из первого – во второй. В диффузор №1 заливали 5,0 мл экстрагента, настаивали 6 часов. После настаивания получали

первую порцию готового продукта. Вытяжки из диффузора №2 переводили в диффузор №3, а из №1 – в №2, настаивали 6 часов. Получали второй слив готового продукта. Затем вытяжку из второго диффузора переводили в третий, настаивали 6 часов и получали третий слив готового продукта. Все сливы объединяли и подвергали очистке [102].

При фильтрационной экстракции 20,0 г тонко-измельченного сырья равномерно распределяли на воронке Бюхнера, которую присоединяли к колбе Бунзена. Затем пропускали («фильтровали») сквозь сырье водно – спиртовый раствор (50%) и постоянно сохраняя «зеркало» экстрагента, осуществляли сбор извлечения. Одну загрузку сырья массой 20,0 г использовали для последовательного получения пяти отдельных сливов, объемом 20,0 мл. Первые три слива экстракта получали самотеком, а затем экстрагирование вели с подключением вакуума для преодоления гидросопротивления набухающего сырья. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали под вакуумом до 20,0 мл. Результаты выбора метода экстрагирования приведены в таблице 73.

Таблица 73 – Результаты изучения влияния метода экстрагирования на содержание флавоноидов

Метод экстрагирования	Характеристика показателей	
	Содержание суммы флавоноидов, %	Истощение сырья по флавоноидам, %
Ускоренная дробная мацерация (модификация ЦАНИИ)	1,50±0,01	49,83
Фильтрационная экстракция	2,62±0,02	87,00

Изучение влияния метода экстрагирования на содержание флавоноидов показало, что при использовании метода ускоренной дробной мацерации в модификации ЦАНИИ истощение сырья по флавоноидам происходит только на 49,83 %, что согласуется и с литературными данными, а при фильтрационной экстракции на 87,00 %. Кроме того, при методе фильтрационной экстракции наряду с повышением выхода флавоноидов, значительно сокращается время экстракции.

При определении оптимального режима экстрагирования мы также использовали расчетные формулы, которые были апробированны и предложены для вакуум-фильтрационного экстрагирования [198, 263]. Так, для эффективного экстрагирования действующих веществ, слой укладки подготовленного (тонкоизмельченного) сырья в лабораторном экстракторе обычно составляет 7-8 см. На следующем этапе нами была изучена динамика выхода суммы флавоноидов и, в соответствии истощение сырья тимьяна ползучего, по отдельным сливам, которые получали в соотношении 1:1 к массе растительного сырья. С этой целью 100 г, сырья чабреца помещали в лабораторный экстрактор с ложным дном, покрытым фильтровальной бумагой и пропускали через сырье без использования вакуума (самотеком) спирт этиловый 50%, при этом собирали по 100 мл 5 сливов отдельно. Во время экстрагирования над сырьем постоянно было «зеркало» спирта этилового 50%. В результате во время экстрагирования происходило преимущественно растворение и вымывание флавоноидов и других биологически активных веществ, а не преобладали диффузионные процессы, происходящие при использовании традиционных методов экстрагирования [198]. Постоянное поступление «чистого» экстрагента сверху и вытеснение при этом обогащенного действующими веществами извлечения из сырья обеспечивало максимальную разность концентрации на границе разделения фаз «твердое тело-жидкость». Общеизвестно, что указанная разность концентраций, имеет большое значение в процессе экстрагирования, поэтому было прогнозировано максимальное истощение сырья по флавоноидам. Кроме того, особая подготовка сырья, способствующая разрушению клеток растительного сырья и позволявшая тем самым превалировать процессам растворения и смыва флавоноидов процессам их диффузии, позволила увеличивать скорость извлечения флавоноидов. В результате, полнота и скорость экстрагирования флавоноидов и других биологически активных веществ при вакуум фильтрационном способе экстракции показывают на его преимущества над другими традиционными методами экстрагирования (рисунок 232).

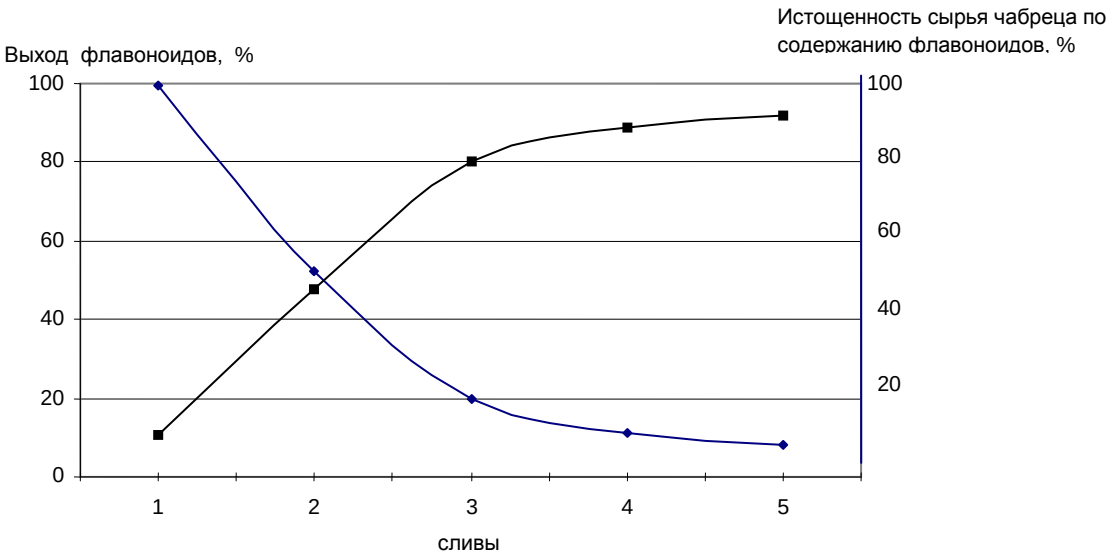


Рисунок 232 - Динамика экстракции флавоноидов из травы тимьяна ползучего (чабреца) вакуум-фильтрационным методом экстрагирования в зависимости от сливов

В итоге, при экстрагировании сырья чабреца с помощью вакуум-фильтрационного метода можно добиться истощения сырья по содержанию флавоноидов, извлекаемых спиртом этиловым 50% на 87%, что указывает на высокую эффективность экстракции, по сравнению с промышленным методом экстрагирования (эффективность экстракции 49,83%). Учитывая все исследованные факторы, в лабораторных условиях была разработана технология получения жидкого экстракта чабреца методом вакуум фильтрационной экстракции (рисунок 233). Согласно которой подготовленное растительное сырье, первоначально измельчают последовательно на двухвалковом измельчителе, а затем на бичевой мельнице до размера частиц менее 1 мм. Далее загружают подготовленное сырье чабреца в лабораторный экстрактор с высотой слоя 8 см. В экстрактор равномерно заливают спирт этиловый 50% при открытом спускном кране по всей поверхности сырья (при этом сохраняя «зеркало» экстрагента) до тех пор, пока фронт «движущегося» извлечения достигнет ложного дна, далее кран перекрывают и оставляют на 2-3 часа (для набухания сырья). При достижении набухания сырья кран открывают и начинают собирать экстракт, постоянно добавляя «свежий» экстрагент. Извлечение собирают до тех пор, пока объем жидкости в приемнике будет составлять 1:5 по отношению к массе загруженного сырья. Использование

фильтрующего материала на ложном дне позволяет исключить дополнительную операцию фильтрования. Полученное извлечение хранили в течение 7 суток при температуре +8°-10°С. При хранении осаждаются хлорофиллы, воски и другие гидрофильные вещества. Далее осадок отделяют декантацией и извлечение фильтруют через нутч-фильтр. Отфильтрованное извлечение концентрируют с использованием вакуум-роторного испарителя, при температуре не более 60°С до объема экстракта 1:1 по отношению к массе использованного сырья (рисунок 201) [75].

Данным методом было приготовлено 5 серий жидкого экстракта травы чабреца.

Полученный жидкий экстракт тимьяна ползучего (чабреца) 1:1 расфасовали в лабораторных условиях во флаконы оранжевого стекла по 30,0 мл. Флаконы укупорили пластмассовыми пробками и навинчивающимися крышками. Снабдили этикетками. Готовый продукт представлял собой прозрачную темную красновато-коричневую жидкость с ароматным характерным сладким запахом.

6.7.2 Стандартизация жидкого экстракта тимьяна ползучего

Стандартизацию готового жидкого экстракта тимьяна ползучего проводили согласно Государственной фармакопее XI изд. [83] по следующим показателям: внешний вид, количественное содержание действующих веществ (флавоноидов), тяжелые металлы, сухой остаток, содержание спирта.

Контроль качества жидкого экстракта тимьяна ползучего проводили по методике спектрофотометрического определения флавоноидов, разработанной нами для сырья и адаптированной для жидкого экстракта.

Рисунок 233 - Схема технологии производства жидкого экстракта чабреца

Методика спектрофотометрического определения флавоноидов в жидком экстракте травы тимьяна ползучего

1,0 мл жидкого экстракта помещают в мерную колбу объемом 25,0 мл, приливают 20,0 мл спирта этилового 50% для растворения и доводят спиртом этиловым 50% объем раствора до метки, далее перемешивают.

К 0,5 мл разбавленного экстракта, помещенного в мерную колбу на 25,0 мл, приливают 5,0 мл алюминия хлорида раствора 5% в 50% спирте этиловом, далее доводят спиртом этиловым 50% до метки. По истечении 20-30 минут приготовленный раствор спектрофотометрируют в кювете с толщиной слоя 10,0 мм при длине волны 395 нм. Раствором сравнения служит раствор, состоящий из 5,0 мл исходного извлечения, к которому добавлена 1 капля разведенной кислоты уксусной и спирт этиловый 50% до 25,0 мл. Содержание суммы флавоноидов в жидком экстракте проводили в пересчете на цинарозид, вычисляли по формуле и выражали в процентах:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25}{E_{1\,\%/1\,см} \times 0{,}5 \times V_1 \times V_2};$$ где

X – содержание флавоноидов, %;

D-оптическая плотность исследуемого извлечения с алюминия хлоридом; длина волны 395 нм;

$E_{1\,\%/1\,см}$ – удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 50%;

V_1 – объем жидкого экстракта, взятый для анализа, мл;

V_2 – объем разбавленного экстракта, мл.

Содержание суммы флавоноидов в жидком экстракте травы чабреца, должно быть не менее 2,0 % (таблица 74).

Таблица 74 Результаты стандартизации жидкого экстракта тимьяна ползучего (1:1)

Показатели стандартизации	Результаты проведенного анализа
Внешний вид	Прозрачная жидкость красновато-коричневого цвета
Запах	Характерный ароматный запах чабреца
Содержание спирта в %	50,00± 3,00
Содержание тяжелых металлов, %	Не превышает 0,01
Сухой остаток, %	8, 87 ± 0,15
Содержание флавоноидов, в пересчете на цинарозид, %	2,51 ± 0,15

Исходя из результатов, представленных в таблице 14, полученный жидкий экстракт тимьяна ползучего по всем показателям качества соответствует требованиям, предъявляемым Государственной фармакопеи XI изд., вып.2, ст. «Экстракты».

Таким образом, при разработке частной фармакопейной статьи, показатели качества для жидкого экстракта чабреца следующие:

- ✓ Органолептические показатели: прозрачная жидкость красновато-коричневого цвета с характерным ароматным запахом чабреца;
- ✓ Содержание флавоноидов не менее 2,00%;
- ✓ Содержание спирта не менее 45,00%;
- ✓ Содержание тяжелых металлов не более 0,01%;
- ✓ Сухой остаток не менее 8,00%.

6.7.3 Сравнительное изучение отхаркивающей активности жидкого экстракта тимьяна ползучего, полученного различными методами

Исследование отхаркивающей активности жидкого экстракта чабреца, полученного различными методами: методом вакуум-фильтрационной экстракции и ускоренной дробной мацерации (модификации ЦАНИИ)

проводили с использованием модели изучения моторной функции мерцательного эпителия пищевода лягушки [глава 2, раздел 2.3.2].

Отхаркивающее действие исследуемых экстрактов оценивали по коэффициенту ускорения движения ресничек мерцательного эпителия пищевода лягушки (таблица 75).

Таблица 75 – Результаты исследования отхаркивающей активности жидкого экстракта тимьяна ползучего

Технология приготовления жидкого экстракта	Коэффициент ускорения	Увеличение двигательной активности
Ускоренная дробная мацерация (модификация ЦАНИИ)	0,56±0,01	44,37±0,89*
Фильтрационная экстракция	0,55±0,02	45,26±1,81*

Проведенные исследования показали, что жидкий экстракт тимьяна ползучего, полученный разными методами повышает двигательную активность эпителия лягушки и соответственно обладает отхаркивающим действием. Жидкий экстракт, полученный методом фильтрационной экстракции проявлял активность, сопоставимую с таковой у экстракта, полученного промышленным способом.

6.8 Способ получения олеаноловой кислоты из травы тимьяна Палласа

Как было показано ранее, растения рода тимьян содержат значительные количества тритерпеновых соединений. В связи с чем, нами предложен способ получения олеаноловой кислоты. Олеаноловая кислота получена нами из травы тимьяна Палласа. Олеаноловая кислота представляет собой белый мелкокристаллический порошок с температурой плавления 301-305^{0}С.

Технологическая схема получения олеаноловой кислоты состоит из следующих стадий:

- измельчение травы тимьяна Палласа;
- обезжиривание травы;
- экстрагирование растительного сырья спиртом этиловым 70%;
- разбавление полученного извлечения водой;
- выделение олеаноловой кислоты;
- очистка олеаноловой кислоты.

Осуществление заявленного способа поясняется следующим примером технологического процесса. 100 г измельченного воздушно-сухого сырья травы тимьяна Палласа помещают в колбу, заливают петролейным эфиром в соотношении сырье: экстрагент 1:5 и экстрагируют на водяной бане под вакуумом в течение 1 часа для удаления липофильных веществ. Полученное петролейное извлечение аккуратно сливают, остаток петролейного эфира в сырье удаляют под вакуумом при комнатной температуре. Далее сырье дважды экстрагируют спиртом этиловым 70% с обратным холодильником при соотношении сырье: экстрагент 1:6 нагревая на кипящей водяной бане при 60°С в течение 2 часов. Полученные спиртовые экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр. К объединенному экстракту (в количестве 1100,0 мл) добавляют 200,0 мл воды очищенной и оставляют на 6 часов. Выпавший осадок отфильтровывают. Полученную олеаноловую кислоту дважды очищают перекристаллизацией из спирта этилового 96%. Выход целевого продукта составляет 0,6% (около 0,6 г), в пересчете на количество лекарственного сырья (100,0 г). Предлагаемая совокупность отличительных признаков (использование в качестве сырья травы тимьяна Палласа, экстракция петролейным эфиром на водяной бане под вакуумом в течение 1 часа в соотношении сырье: экстрагент 1:5, спиртом этиловым 70% на кипящей водяной бане при 60°С в соотношении сырье: экстрагент 1:6 в течение 2 часов, кратность экстракции - 2 раза, добавления к объединенному экстракту воды очищенной, отстаивания полученного экстракта в течение 6 часов и

перекристаллизация полученного продукта из спирта этилового) взамен способа получения олеаноловой кислоты путем предварительного экстрагирования сырья травы Thymus dimorphus Klok. хлороформом, включающий отделение урсоловой кислоты, сгущение хлороформного извлечения до сухого остатка, многократную обработку горячим метанолом, объединение извлечений, упаривание и многократную перекристаллизацию позволяет: - упростить способ получения целевого продукта - олеаноловой кислоты; - увеличить выход целевого продукта (выход олеаноловой кислоты из травы тимьяна Палласа составляет 0,6% (около 0,6 г), в пересчете на количество лекарственного сырья (100,0 г), (что в 1,4 раз больше по сравнению с ближайшим аналогом) за счет повышения интенсивности процесса экстракции, удаление липофильных веществ из сырья петролейным эфиром, извлечения олеаноловой кислоты спиртом этиловым 70% с последующей ее перекристализацией; - использовать в качестве экстрагента спирт этиловый 70% взамен токсичного экстрагента спирта метилового; - расширить сырьевую базу источников олеаноловой кислоты. До настоящего времени тимьян Палласа не рассматривался в качестве сырья для получения олеаноловой кислоты, т.е. мы предлагаем новый вид лекарственного растительного сырья для получения олеаноловой кислоты.

Выводы по главе 6

1. Установлено, что 7 видов растений рода тимьян, произрастающих на территории средней полосы Росии относятся к V классу токсичности «Практически нетоксичны».

2. Настои, полученные из растений рода тимьян обладают отхаркивающей, противовоспалительной, ангиопротекторной, антибактериальной и антиоксидантной активностями, сопоставимой с таковыми официнального вида – тимьяна ползучего.

3. Изучены технологические свойства сырья тимьяна ползучего и выбраны: оптимальный экстрагент (спирт этиловый 50%), степень измельчения

сырья (тонкоизмельченное – вальцованное) и оптимальный способ экстрагирования (вакуум-фильтрационная экстракция).

4. Разработана технология получения жидкого экстракта тимьяна ползучего вакуум-фильтрационным способом, обеспечивающая эффективность экстракции сырья до 87% по содержанию флавоноидов.

5. Разработаны показатели качества жидкого экстракта тимьяна ползучего, которые позволяют проводить его стандартизацию. Установлено содержание флавоноидов в жидком экстракте, не менее 2,0%.

6. Разработан способ получения олеаноловой кислоты, основанный на экстракции сырья спиртом этиловым 70%, разбавлении водно-спиртового извлечения, отделения олеаноловой кислоты и ее перекристаллизация из спирта этилового.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в медицинской практике России из растений рода Тимьян находят применение два вида: тимьян ползучий (чабрец) - *Thymus serpyllum* L., а также тимьян обыкновенный - *Thymus vulgaris* L. Тимьян обыкновенный – растение, произрастающее в странах Средиземноморья. Основной ареал тимьяна ползучего сосредоточен в Европейской части России, однако, ресурсы его сильно истощены. Наряду с тимьяном ползучим на тех же территориях произрастает около 7-8 близкородственных видов, которые в природных условиях трудно различаются и традиционно заготавливаются наряду с тимьяном ползучим и вместо него. К таковым относятся тимьян Маршалла, тимьян меловой, тимьян Паласа, тимьян блошиный и другие, относящиеся даже к другим секциям, различающиеся как морфологически, так и химически по составу биологически активных веществ.

При изучении химического состава растений и анализа литературных данных установлено, что в растениях рода Тимьян действующими веществами являются фенольные соединения, эфирное масло и тритерпеновые соединения. Результаты, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы, показывают, что все исследованные виды тимьяна имеют близкий состав биологически активных веществ и различаются в основном их количественным соотношением. По содержанию основных групп действующих веществ флавоноидов, фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот, эфирного масла, тритерпеновых соединений большинство исследуемых видов близки к тимьяну ползучему или превосходят его. Так, по содержанию флавоноидов, фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот все исследованные виды превосходят тимьян ползучий, за исключением тимьяна двуликого: содержание флавоноидов у него близко к тимьяну ползучему, а фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот значительно меньше. В результате проведенных исследований химического состава, в частности в отношении малоизученных

видов рода Тимьян, групп биологически активных веществ, не описанных в литературе, например жирных кислот, органических кислот, полисахаридов, аминокислот и др., получены новые данные, которые следует учитывать в плане внесения ими определенного вклада в фармакологическую активность.

Для установления диагностических признаков сырья чабреца и отличия от близко родственных видов были проведены морфолого-анатомические исследования.

При решении вопросов стандартизации сырья была определена группа перспективных для применения в медицине, наряду с тимьяном ползучим, видов для решения вопросов стандартизации: тимьян Маршалла, тимьян меловой, тимьян Черняева, тимьян блошиный, тимьян Палласа. Оценку качества растений рода Тимьян проводили по содержанию флавоноидов, как одной из преобладающих групп действующих веществ тимьянов. Обосновано использование в анализе циннарозида, как доминирующего компонента состава флавоноидов тимьянов в качестве стандартного вещества. Показана возможность стандартизации тимьянов и по содержанию гидроксикоричных кислот в пересчете на розмариновую кислоту.

Проведенные фармакологические исследования показали наличие у всех исследованных видов отхаркивающей, противовоспалительной, ангиопротекторной, антимикробной и антиоксидантной активностей. Выявленная отхаркивающая активность исследуемых тимьянов была сопоставлена с таковой официнального вида тимьяна ползучего или превышала её. К важным фармакологическим свойствам тимьянов можно отнести наличие у них противовоспалительной активности, которая заключается в снижении выраженности процессов экссудации и пролиферации при протекании воспалительного процесса. Также установлено наличие антиоксидантной активности у исследуемых тимьянов. Наиболее выраженную антиоксидантную активность проявляли водно-спиртовые извлечения, в которых в качестве экстрагента использовался спирт этиловый от 30% до 70%. При этом показано, что фенольные соединения, в том числе и флавоноиды, участвуют в

антиоксидантном действии травы исследуемых тимьянов. Максимальное содержание флавоноидов отмечено для извлечений на спирте этиловым 70%, а сумма фенольных соединений – на спирте этиловым 50%. Данные результаты показывают перспективность применения экстракционных фитопрепаратов на основе растений рода тимьяна для коррекции патологий, которые возникают при активации процессов свободно-радикального окисления.

Существенное значение для применения растений рода тимьян в научной медицине имеет и установленная нами антибактериальная активность настоев и эфирного масла, полученных из них. Антимикробная активность настоев травы тимьяна блошиного, тимьяна мелового, тимьяна Маршалла, тимьяна Черняева была либо выше, либо сопоставимой с таковой официнального вида – настоем тимьяна ползучего. Несколько ниже, однако, близкая к таковой тимьяна ползучего антимикробная активность была у настоев травы тимьяна Палласа и тимьяна двуликого.

Проведено совершенствование технологии получения жидкого экстракта чабреца с применением метода вакуум-фильтрационного экстрагирования, обеспечивающее истощения сырья по содержанию флавоноидов на 87%. С целью унификации методик контроль качества жидкого экстракта и растительного сырья проводили определение флавоноидов с использованием спектрофотометрической методики, разработанной нами для сырья и адаптированной для жидкого экстракта.

Таким образом, проведенный комплекс фармакогностических, фармакологических, технологических исследований растений рода тимьян флоры средней полосы Европейской части России показал перспективность и возможность использования в научной медицине России растений данного рода наряду с тимьяном ползучим (рисунок 202).

Научная новизна исследований подтверждена патентом на изобретение «Способ получения олеаноловой кислоты» №2538213. Разработана и утверждена фармакопейная статья «Чабреца трава», включенная в

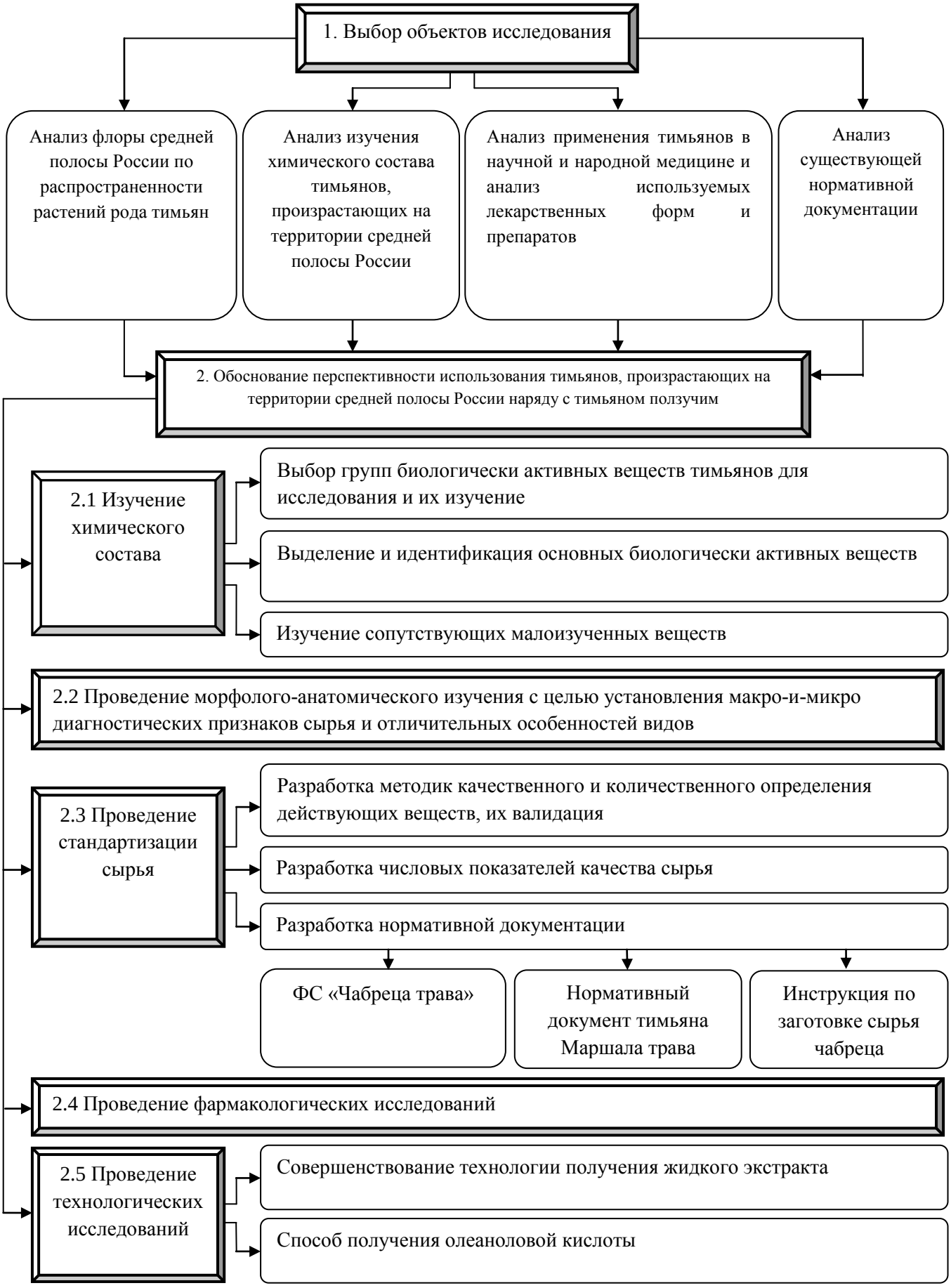


Рисунок 234 - Схема научно-методического обоснования перспективности использования растений рода тимьян в научной медицине

Государственную фармакопею РФ XIII издания, а также «Инструкция по заготовке сырья чабреца», утвержденная комиссией по стандартизации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Разработан проект нормативного документа «Тимьяна Маршалла трава», согласованный с ООО фирма «Здоровье».

Результаты диссертационной работы внедрены в научный и учебный процесс кафедры фармакогнозии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», фармацевтического факультета «Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова», а также в работу ООО фирма «Здоровье».

Материалы диссертации опубликованы в 60 публикациях, в том числе 1 монографии «Тимьяны флоры Центрального Черноземья».

ВЫВОДЫ

1. Обоснована необходимость и перспективность использования в качестве новых сырьевых источников близкородственных видов рода Тимьян средней полосы России к официнальным видам (тимьяну обыкновенному и тимьяну ползучему); в качестве таковых предложены для заготовительного процесса тимьян Маршалла, тимьян Палласа, тимьян блошиный, тимьян меловой, тимьян Черняева.
2. Проведено комплексное фитохимическое исследование 7 видов тимьянов, произрастающих на территории средней полосы России - тимьяна Маршалла, тимьяна Палласа, тимьяна блошиного, тимьяна мелового, тимьяна Черняева, тимьяна двуликого. Установлено наличие и количественное содержание эфирного масла, жирных кислот, тритерпеновых и фенольных соединений, углеводов, аминокислот и органических кислот, минеральных элементов, из которых в качестве основных групп биологически активных веществ на этапе оценки качества сырья, получения и стандартизации лекарственных препаратов предложено рассматривать флавоноиды и фенилпропаноиды.
3. С использованием различных хроматографических методов (тонкослойной, бумажной, ВЭЖХ, газожидкостной хромато-масс спектрометрии) идентифицировано 27 веществ фенольной природы, большинство из которых впервые. Методами селективной экстракции, хроматографии, кристаллизации в индивидуальном состоянии выделено 20 фенольных соединений, для которых установлена структура и изучены физико-химические характеристики. Выделенные соединения представлены фенолокислотами: ванилиновой, n-оксибензойной, галловой; оксикоричными кислотами: кофейной, феруловой, n-кумаровой, розмариновой; флавоноидными соединениями, которые отнесены к флавонам и представлены агликонами и их 7-моногликозидами.

4. Установлено содержание эфирного масла: от 0,15±0,01% до 1,72±0,04%. Исследование его компонентного состава позволило идентифицировать более 100 соединений, среди них определены доминирующие компоненты. В большинстве изученных видов установлено наличие специфических для растений рода тимьян тимола и карвакрола, которые не всегда являются преобладающими. По преобладанию компонентов в эфирном масле выделено 6 хемотипов: 1- α – терпинеола (тимьян Палласа, тимьян ползучий); 2- неролидола, карвакрола, тимола (тимьян меловой); 3- карвакрола, кариофиллена, тимола, метилкарвакрола (тимьян блошиный); 4- карвакрола, борнеола, тимола, β –бисаболена (тимьян Маршалла); 5- цитраля (тимьян двуликий); 6 – тимола, карвакрола (тимьян Черняева).
5. В сырье тимьянов качественными реакциями и методом тонкослойной хроматографии установлено наличие тритерпеновых сапонинов, среди которых идентифицированы урсоловая и олеаноловая кислоты, а также проведено их выделение с установлением структуры. Разработан патентозащищенный способ получения олеаноловой кислоты из травы тимьяна Палласа с выходом 0,6%.
6. Из групп биологически активных веществ, имеющих сопутствующее значение для использования исследуемых растений, изучен жирнокислотный состав: установлено содержание 20 жирных кислот, среди насыщенных жирных кислот доминируют пальмитиновая и бегеновая кислоты, ненасыщенные кислоты представлены преимущественно линолевой, линоленовой, арахидоновой и олеиновой кислотами. Установлено наличие свободных и связанных аминокислот, идентифицировано 14 органических кислот и 19 минеральных элементов. В составе углеводных комплексов обнаружены как свободные, так и связанные сахара. В свободном виде обнаружены ксилоза, галактоза, глюкоза. Связанные сахара представлены в виде гликозидов и полисахаридов. Проведено выделение водорастворимых полисахаридных комплексов и пектиновых веществ, выход которых составил:

водорастворимые полисахариды - от 3,10±0,12% до 7,58±0,18%, пектиновые вещества - от 8,21±0,37% до 17,78±0,38%. Изучен их качественный и количественный моносахаридный состав.

7. Проведено морфолого-анатомическое изучение 7 видов тимьянов, произрастающих на территории средней полосы России, позволяющие проводить диагностику сырья морфологически близких видов. Морфологическими отличиями являются поперечное сечение стебля, опушение стебля, форма листьев, наличие или отсутствие черешка, строение соцветия, направление волосков на цветоножке, характеристика зубцов верхней губы чашечки, опушение чашечки. Наиболее важные микродиагностические признаки сырья - это опушение стебля, листа, чашечки и венчика простыми и головчатыми волосками. Диагностическое значение имеют также выросты клеток эпидермиса и наличие кристаллов в трубке венчика.
8. Разработаны для сырья чабреца методики качественного и количественного определения флавоноидов в траве и жидком экстракте; методики спектрофотометрического определения гидроксикоричных кислот в вариантах прямой и дифференциальной спектрофотометрии для травы тимьянов - тимьяна Маршалла, тимьяна мелового, тимьяна Палласа, тимьяна блошиного, тимьяна Черняева. Для них экспериментально обоснованы параметры качества. Разработана фармакопейная статья «Чабреца трава», включенная в ГФ РФ XIII издания и нормативный документ «Тимьяна Маршалла трава».
9. При проведении фармакологических исследований изучены острая токсичность и фармакологические свойства сырья растений рода Тимьян. Для всех исследуемых видов установлены отхаркивающая, противовоспалительная, ангиопротекторная, антибактериальная активности. Экспериментально установлена антиоксидантная активность водно- и водно-спиртовых извлечений из исследуемых растений, при этом наиболее выраженная активность характерна для извлечений, получаемых с помощью

спирта этилового 70%, и содержание флавоноидов в данных извлечениях так же наибольшее.

10. Комплекс проведенных экспериментальных исследований позволил выявить оптимальные параметры технологического процесса для получения жидкого экстракта чабреца с использованием вакуум-фильтрационного способа экстрагирования, обеспечивающим истощение сырья по флавоноидам до 87%.

Рекомендации

Проведенные исследования могут явиться основой для поиска новых источников растительного сырья из растений рода Тимьян и расширения номенклатуры отечественных лекарственных средств на их основе.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования включают направления, имеющие важное практическое и теоретическое значение: введение в отечественную номенклатуру перспективных видов сырья тимьянов, произрастающих на территории средней полосы России, углубленное изучение их фармакологической активности, а также проведение доклинических и клинических испытаний новых лекарственных препаратов на основе видов рода Тимьян.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаев, Ш.В. Химия ароматических соединений семейств бобовых и губоцветных: автореф. дис. … д-ра химических наук: 15.00.02; 02.00.10 / Ш.В. Абдулаев. – Харьков, 1992. – 62 с.

2. Айнабекова, Б.А. Об использовании препарата чаги как антиоксиданта / Б.А. Айнабекова // Клинич. геронтология. - 2001. - Т.7, №3/4. - С. 59-60.

3. Акашкина, Л.В. Теоретические и прикладные аспекты стандартизации некоторых лекарственных средств (субстанции и препараты, получаемые из лекарственного растительного сырья): автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 15.00.02 / Л.В. Акашкина. – СПб, 2000. – 72 с.

4. Алаева, Н.А. Рациональное использование сырья в производстве экстракта чабреца жидкого / Н.А. Алаева // Актуальные вопросы фармации и экспериментальной медицины: Тез. докл. науч. конф. молодых ученых и специалистов Пятигорского фармац. ин-та. – Пятигорск, 1985. – С.41.

5. Алаева-Зыкова, Н.А. Разработка ресурсосберегающей технологии экстракта чабреца жидкого / Н.А. Алаева-Зыкова, Ю.Г. Пшуков // Фармация. – 1989. - №5. – С.22-25.

6. Алексеева, Л.И. Фенольные соединения Thymus Talyevii Klok. et Schost. / Л.И. Алексеева, Л.В. Тетерюк // Химия растит. сырья. – 2008. - №4. – С. 65-68.

7. Алексеева, Л.И. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность представителей семейства Lamiaceae / Л.И. Алексеева, В.А. Канев // Вопр. биол., медицинской и фармацевтической химии. – 2014. - №2. – С.31-35.

8. Алексеева, Л.И. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность Prunella grandiflora и Prunella vulgaris (Lamiaceae) / Л.И. Алексеева, Е.В. Болотник // Растительный мир азиатской России. – 2013. - № 1. – С. 121-125.

9. Аль-Гифри, С.К. Фармакогностическое изучение растений рода Дурнишник: автореф. дис. …канд. фармац. наук: 14.04.02 / С.К. Аль- Гифри. – Курск, 2010. - 21 с.

10. Аминокислотный состав и ноотропные свойства полиноофита / И.Г. Николаева, Л.Д. Дымшеева, С.М. Николаев, Г.Г. Николаева // Хим.-фармацевт. журн. – 2011. – т.45, №8. – С.45-48.

11. Аминокислотный, жирнокислотный и углеводный состав сока некоторых видов рода Betula / Т.А. Шуляковская [и др.] // Раст. ресурсы. 2006. - Вып. 2 – Т. 42 - С.69-77.

12. Андреева, В.Ю. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной Alchemilla vulgaris L.S.L. / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина // Химия растит. сырья. – 2000. - № 2. – С. 79-85.

13. Антиоксидантная активность - показатель качества эффективности фитопрепаратов / Е.И. Шкарина [и др.] // Фармация на современном этапе - проблемы и достижения: сб. науч. тр. НИИФ. - М., 2000. -Т. 39, ч. 2. - С. 168-174.

14. Антиоксидантная активность вводно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной / О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин // Фармация. – 2013. - №1. – С. 11-12.

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

16. Арзамасцев, А.П. Оценка показателей антиоксидантной активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья / А.П. Арзамасцев, Е.И. Шкарина, Т.В. Максимова // Хим. - фармац. журн. - 1999. - №11. - С. 17-20.

17. Архипова, О.В. Изучение содержания аскорбиновой кислоты в цветках и листьях боярышников, произрастающих на территории Российской Федерации / О.В. Архипова, Е.А. Клейненберг // Молодежная наука и современность: материалы 74-й межвуз. Итоговой науч. конф. Студентов и

молодых ученых, посвящ. году молодежи в России (21-22 апр. 2009 г.). – Курск, 2009. – Ч.2. – С.161.

18. Бабаян, Т.О. Применение антиоксидантов в комплексном лечении онкологических больных / Т.О. Бабаян, А.П. Арзамасцев, Н.Е. Кушлинский // Фармация. - 1998. - №3. - С. 39-40.

19. Багдаа, Д. О биологической ценности некоторых видов разнотравья / Д. Багдаа, И.В. Кобозев // Сб. трудов Моск. с-х, акад. им. К.А.Тимирязева.- М. - 1981. - С. 127-128.

20. Багирова, В.Л. Совершенствование экспертизы и стандартизации лекарственных средств на современном этапе в РФ / В.Л. Багирова, Е.Л. Ковалева, К.С. Шахназаров // Всерос. Съезд фармац. работников (5-7 июня 2005; Сочи). - Сочи, 2005. - С. 49-50.

21. Баландина, И.А. Совершенствование принципов и методов фармакопейного анализа в системе стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных средств на его основе: автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 15.00.01; 15.00.02 / И.А. Баландина.- М., 2004. – 38 с.

22. Банаева, Ю.А. Исследование химического состава эфирного масла представителей рода Thymus L., произрастающих на Алтае / Ю.А. Банаева, Л.М. Покровский, А.В. Ткачев // Химия растит. сырья. - 1999. - №3.- С. 41-48.

23. Бандюкова, В.А. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографии на бумаге / В.А. Бандюкова // Раст. ресурсы. - 1965. - Т. 1, вып. 4. - С. 391.

24. Бандюкова, В.А. Каталитическое ацетилирование флавоноидов / В.А. Бандюкова, В.Д. Пономарев // Химия природ. соединений. - 1971. - №4. - С. 215-219.

25. Бандюкова, В.А. Методы исследования природных флавоноидов / В.А. Бандюкова. – Пятигорск : Бальнеологич. ин-т, 1977. - 72 с.

26. Бандюкова, В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов: методические рекомендации / В.А. Бандюкова, А.А. Шинкаренко. – Пятигорск, 1973. – 16 с.

27. Бандюкова, В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды / В.А. Бандюкова // Химия природ. соединений. - 1983. - №3. - С. 263-273.

28. Барнаулов, О.Д. Фитотерапия больных бронхолегочными заболеваниями / О.Д. Барнаулов.- СПб.- изд-во: Н.-Л., 2008.- 304с.

29. Беккер, Ю. Инструментальная аналитика: методы хроматографии капиллярного электрофореза / Ю.Беккер – М.: Техносфера. – 2009. – 427 с.

30. Беликов, В. В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов / В. В. Беликов, Т. В. Точкова // Фенольные соединения и их физиологические свойства. – Алма-Ата, 1973. – С. 168-172.

31. Беликов, В. В. Спектрофотометрия комплексных соединений флавоноловых смесей / В. В. Беликов, Т. В. Точкова // Современные проблемы фармацевтической науки и практики : тез. докл. II съезда фармацевтов УССР. – Киев,1972. – С. 572-575.

32. Беликов, В.В. Избирательный метод анализа флавоноидов и фитохимических препаратов. ВНИИХ-ТЛС / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Н.Т. Колесник // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств. - М., 1991. - Т. 2, ч. 2. - С. 13.

33. Беликов, В.В. Методы анализа флавоноидных соединений / В.В. Беликов, М.С. Шрайбер // Фармация. - 1970. - №1. - С. 68-72.

34. Беллами, Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. / Л. Беллами - М.: Изд-во иностр. лит., 1963. - 590 с.

35. Беллами, Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. / Л. Беллами - М.: Мир, 1971. - 318 с.

36. 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

37. Библиотечка лекарственных растений / Сост. Зимин В.М.- т.1.- Санкт - Петербург АО «Дорваль», 1993. - 266с.

38. Блажей, Л. Фенольные соединения растительного происхождения / Л. Блажей, А. Шутый. – М., 1977. – 240 с.

39. Браславский, В.Б. Комплексное фармакогностическое и физико-химическое исследование флавоноидов и фенилпропаноидов представителей семейства ивовых (Salicaceae): автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 14.04.02 / В.Б. Браславский. – Самара, 2012. – 48 с.

40. Бубенчиков, А.А. Антимикробная активность эфирных масел чабрецов Центрального Черноземья / А.А. Бубенчиков, Ю.А. Сухомлинов // Фитонциды. Бактериальные болезни растений // Материалы конференции. - 1990. – Киев – Львов. - Ч.1. - С.19-20.

41. Бубенчиков, Р.А. Изучение фенольных соединений фиалки полевой методом ВЭЖХ / Р.А. Бубенчиков, Н.Ф. Гончаров // Хим.-фарм. журн. – 2005. - №3. – С.18-21.

42. Бубенчиков, Р.А. Новые растительные источники биологически активных полисахаридов / Р.А. Бубенчиков, И.Л. Дроздова // Фармация. – 2005. - № 4. - С. 16-17.

43. Бубенчиков, Р.А. Фармакогностическое изучение растений рода фиалка и спектр их фармакологической активности: автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 14.04.02 / Р.А. Бубенчиков. – Пятигорск, 2011. – 48 с.

44. Бубенчикова, В.Н. Изучение анатомического строения тимьяна Палласа / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Фармация. - 2015. - № 1. – С. 16-18.

45. Бубенчикова, В.Н. Аминокислотный и минеральный состав травы тимьяна блошиного (Thymus pulegioides L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Научные ведомости БелГУ. – 2012. - Вып. 18/2. – Т. 7. - №10 (129). – С. 40-42.

46. Бубенчикова, В.Н. Антимикробная активность водных извлечений и эфирных масел тимьяна флоры средней полосы Европейской части России / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Ученые записки Орлов. гос. ун-та. – 2014. - № 6 (62). - С. 144-147.

47. Бубенчикова, В.Н. Жирнокислотный и углеводный состав травы тимьяна Маршалла (Thymus Marchallianus Willd.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Ученые записки Орлов. гос. ун-та. – 2014. - № 7 (63). - С. 221-222.

48. Бубенчикова, В.Н. Изучение анатомического строения травы тимьяна Маршалла (Thymus Marchallianus Willd.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак , Е.С. Лапина // Ученые записки Орлов. гос. ун-та. – 2014. - № 3 (59). - С. 263-266.

49. Бубенчикова, В.Н. Изучение морфологического и анатомического строения измельченного сырья и порошка травы чабреца Thymus serpyllum L. / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Традиционная медицина. – 2012. - №4 (28). – С. 47-50.

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

51. Бубенчикова, В.Н. Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности тимьяна блошиного (Thymus pulegioides L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Медицинский вестник Башкортостана – 2012. – Т. №5. - С. 15-17.

52. Бубенчикова, В.Н. Изучение противовоспалительной и отхаркивающей активности тимьяна Маршалла / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Традиционная медицина. – 2012. - № 5. - С. 201-203.

53. Бубенчикова, В.Н. Исследование веществ первичного биосинтеза тимьяна блошиного/ В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Современные проблемы науки и образования. – 2012. - № 3: http://www.science-education.ru/103-6445 - 6 с.

54. Бубенчикова, В.Н. Исследование эфирного масла тимьяна двуликого / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Фармация. – 2015. - № 6. – С. 7-9.

55. Бубенчикова, В.Н. Исследование эфирного масла тимьяна мелового / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Ученые записки Орлов. гос. ун-та. – 2013. - № 6 (56). - С. 198-200.

56. Бубенчикова, В.Н. Карбоновые кислоты травы тимьяна Маршалла (Thymus Marchallianus Willd.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак, А.А. Безъязычная // Фундаментальные исследования. - 2015. – № 2. - С. 3316-3318.

57. Бубенчикова, В.Н. Аминокислотный и минеральный состав травы тимьяна Маршалла (Thymus Marchallianus Willd.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Ученые записки Орлов. гос. ун-та. – 2012. - № 6 (50). - С. 214-216.

58. Бубенчикова, В.Н. Аминокислотный, жирнокислотный и полисахаридный состав травы тимьяна Палласа (Thymus Pallasianus L) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Химия растительного сырья. – 2014. - № 3. – С. 191-194.

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

60. Бубенчикова, В.Н. Изучение веществ первичного биосинтеза травы тимьяна блошиного (Thymus pulegioides L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Соврем. Проблемы науки и образования (Электронный ресурс). – 2012. - №3. – Режим доступа: http://www.science-education.ru/103-6445.

61. Бубенчикова, В.Н. Изучение дубильных веществ растений рода тимьян флоры Средней полосы Европейской части России / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2015. - Вып. 31. – № 16 (213). –С. 174-179.

62. Бубенчикова, В.Н. Изучение полисахаридного и минерального состава герани луговой (Geranium pretense L.) / В.Н. Бубенчикова,

Ж.А. Булатникова // Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации: сб. науч. тр. междунар. конгр. – М. - 2011. – С.166-168.

63. Бубенчикова, В.Н. Исследование полисахаридного комплекса травы тимьяна мелового (Thymus cretaceous Klok. et Shost.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Башкирский химический журнал. – 2013. - Т. 20. - №1. - С. 99-101.

64. Бубенчикова, В.Н. Медуница неясная – новый источник полисахаридов / В.Н. Бубенчикова, В.С. Казакова // Фармация. – 2008. - №2. – С.19-21.

65. Бубенчикова, В.Н. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в растениях рода Тимьян / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. - № 5. – С. 14-17.

66. Бубенчикова, В.Н. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве Galinsoga parviflora / В.Н. Бубенчикова, С.А. Боева // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. Медицина Фармация. - 2013.- Т.25. - Вып. 24/1. - С.80-85.

67. Бубенчикова, В.Н. Фенольные соединения и полисахариды подмаренника цепкого (Galium aparine L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». - 2008. - №3. – С.117-121.

68. Буданцев, А.Л. Розмариновая кислота; источники и биологическая активность / А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская // Раст. ресурсы. – 2012. - Т. 48. - Вып.3. - С. 453-468.

69. Бузук, А.Г. Изменчивость химического состава эфирного масла Thymus pulegioides L. / А.Г. Бузук, Р.А. Юрченко, Г.Н. Бузук // Вестник фармации. - 2012. - №1.- С.19-25.

70. Булдаков, А.С. Пищевые добавки: справочник / А.С. Булдаков. – СПб. - 1996. – 240 с.

71. Ващенко, Т.Н. Антимикробное действие пектинов и пектинсодержащих препаратов / Т.Н. Ващенко // Достижения современной фармацевтической науки и практики на рубеже XXI века: сб. науч. тр., посвящ. 30-летию фармац. ф-та Курского мед. ун-та. - Курск, 1997. - С. 185.

72. Вдовенко-Мартынова, Н.Н. Минеральный состав некоторых растений семейства Rosaceae, произрастающих на Северном Кавказе / Н.Н. Вдовенко-Мартынова // Науки о человеке : сб. ст. по материалам третьего конгр. молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 16-17 мая 2002 г.). – Томск. - 2002. – С.209.

73. Виноградова, Р.П. Физико-химические методы анализа в биохимии / Р.П. Виноградова, Б.Л. Цидзевич, С.Н. Храпунов. - Киев, 1983. - 387 с.

74. Влияние препарата чабреца при пероральном приеме на энергетический и углеводный обмен у белых крыс / Т.Н. Головина, Ю.К. Василенко, Э.Г. Оганесян, А.В. Симонян // Материалы третьего Всероссийского съезда фармацевтов / Тез. докл.- Свердловск. – 1975. с.

75. Выбор метода экстрагирования биологически активных веществ из травы тимьяна блошиного / А.А. Маркарян, Ю.А. Старчак, И.Н. Маравина, В.Н. Бубенчикова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. - № 3(8). – С. 48-53.

76. Гавашелишвили, Л.В. Разработка состава и технологии лингвальных таблеток, содержащих хлорофилипт экстракт густой и чабреца экстракт жидкий: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 15.00.02 / Л.В. Гавашелишвили. - Пятигорск, - 2011. - 23с.

77. Гаврилин, М. В. Валидация аналитических методов: метод. указания / М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко. – Пятигорск. - 2009. – 40 с.

78. Галишевская, Е. Е. Фенольные соединения двух видов растений рода Марьянник / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко // Хим.-фармацевт. журн. – 2010. – Т. 44. - № 9. – С. 30-33.

79. Гейссман, Т.А. Цветные реакции на флавоноидные соединения / Т.А. Гейссман // Химические методы анализа растений: сб. статей. - М.: Изд-во ИП. - 1960. - 469 с.

80. ГЖХ – определение тимола и карвакрола в растительном сырье и настоях травы чабреца / С.В. Сур, Ф.М. Тулюпа, А.Я. Толок, Т.Н. Пересыпкина // Химико-фармац. журнал. - 1990. - №10.- С.69-71.

81. ГОСТ 28508-90. Экстракты дубильные растительные. Методы определения. – Введ. 1991-07-01. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.

82. Государственная фармакопея Российской Федерации – 12-е изд. – М.: науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – Ч. 1. - 704 с.

83. Государственная фармакопея СССР: в 2 вып. / МЗ СССР - 11-е изд., доп. – М.: Медицина. - 1987-1989. – Т. 1,2.

84. Государственный реестр лекарственных средств - М. - 2000. -1202с.

85. Гребнева, Н.Ю. Некоторые фармакологические свойства водных извлечений растительного сбора «Полестелл» для лечения легочных заболеваний / Н.Ю. Гребнева // Раст. ресурсы. - 1999. - Т. 35. - Вып. 3. - С. 25-34.

86. Гринько, Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопеи к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н. Гринько // Фармация. – 2010. - №5. – С.49-53.

87. Губин, К.В. Изучение химического состава надземной части Urtica cannabina L. флоры Сибири / К.В. Губин, М.А. Ханина // Химия растит. сырья.- 2009.- № 2.- С.89-92.

88. Гужва, Н.Н. Биологически активные вещества астрагала эспарцетного, произрастающего в Предкавказье / Н.Н. Гужва // Химия растит. сырья. – 2009. - № 3. – С. 123-132.

89. Дембицкий, А.Д. О составе эфирного масла Thymus marschallianus / А.Д. Дембицкий, Р.А. Юрина, Г.И. Кротова // Химия природных соединений.- 1985.- №4.- С.510-514.

90. Дикорастущие полезные растения России - Санкт-Петербург, 2001.- 663 с.

91. Драник, Л.И. Выделение и химическое изучение полифенольных соединений артишока: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / Л.И. Драник. - Л., 1967. - 16 с.

92. Дурецкая, Н.А. Количественное определение дубильных веществ и динамика их накопления в надземной части шлемника обыкновенного / Н.А. Дурецкая, Л.С. Теслов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пятигорск, 2010. – Вып.65. – С.40-42.

93. Дурецкая, Н.А. Состав и содержание фенольных соединений в надземной части Scutellaria galericulata (Lamiaceae) / Н.А. Дурецкая, Л.С. Теслов, Н.Ю. Сипкина // Раст. ресурсы. – 2011. – т.47, вып. 4. – С.95-105

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

95. Евдокимова, О.В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы / О.В. Евдокимова // Фармация. – 2008. - № 7. – С. 14-17.

96. Егоров, В.А. Характеристика номенклатуры антимикробных и противовоспалительных средств для лечения заболеваний органов дыхания на Российском фармацевтическом рынке / В.А. Егоров, Л.В. Мошкова, В.А. Куркин // Фармация. – 2003. - №1. – С. 16-20.

97. Жигжитжапова, С.В. Сравнительная оценка компонентного состава эфирного масла Thymus baicalensis и Thymus Sibiricus (Lamiaceae) / С.В. Жигжитжапова и [др.] // Раст. ресурсы. – 2008. – Вып.3 – С.90-92.

98. Жигунова, А.К. Фитотерапия острого и хронического бронхита с применением препарата Бронхипрет; доказанная эффективность / А.К. Жигунова // Український медичний часопис.- 2012.-№4.- С.69-78.

99. Запорожец, О.А. Спектрофотометрическое определение гидроксикоричной кислоты и ее производных в препаратах эхинацеи / О.А. Запорожец, Е.А. Крушинская, В.Н. Барвинченко // Хим. - фармац. журнал.- 2003. - Т. 37. - № 12. - С. 11-13.

100. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования / М.Н. Запрометов // Биохимические методы в физиологии растений - М.,1971. - С. 185-207.

101. Зарубина, Л.А. Антимикробные свойства эфирных масел сибирских чабрецов / Л.А. Зарубина, В.Н. Тихонов // Фитонциды. Бактериальные болезни растений: Материалы конференции.-1990.-Киев-Львов. - Ч.1 - С.20.

102. Зыкова, Н.А. Совершенствование существующего и разработка нового экстракционного препарата травы чабреца: автореф. дис. … канд. фарм. наук: 15.00.01 / Н.А. Зыкова. – Пятигорск.-1990. – 22 с.

103. Зяблицева, Н.С. Изучение полисахаридов клубней топинамбура и создание на их основе лечебно-профилактических средств: дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / Н.С. Зяблицева – Пятигорск, 1998. - 158 с.

104. Ісюк, М.В. Дослідження амінокислотного складу герані сибірськоі / М.В. Ісюк, І.Л. Бензель, Л.В. Бензель // Актуальні питання фармацевтічноі і медичноі науки та практики. - 2012. - №3 - С.4-6.

105. Изменение №3 от 19.06.2003 г. к статье ГФ XI издания «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» // Фармация. - 2003. - №3. – С. 3-4.

106. Изучение пектинов диких яблок / М.Х Маликова [и др.] // Химия природ. соединений. - 1993. - №3. - С. 355-357.

107. Изучение состава растительного лекарственного сбора методом газо-жидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием / А.Н. Кузьменко [и др.] // Вестник Московского университета. – сер. 2, Химия, 2010. – Т.51.- № 2. – С. 132-138.

108. Использование отходов травы чабреца для получения препарата атеросклеротического действия / Л.И. Лисевицкая [и др.] // Исследование

лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения : Материалы межвузовской научной конференции.- Томск, Изд-во Томского ун-та.- 1975. - С. 87-88.

109. Исследование взаимодействия пектиновых веществ с солями меди, ртути, цинка и кадмия / Г.Н. Коцева [и др.] // Химия природ. соединений. - 1988. - №2. - С. 171-179.

110. Исследование видов рода Thymus юга Украины / Н.А. Калошина [и др.] // Вторая республиканская конференция по медицинской ботанике: Тез. докл. Киев.-1988. - С. 57-58.

111. Исследования антимикробной активности посконника конопляного травы / А.И. Прозоровская [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2005. – Вып. 60. – С. 418-421.

112. Ишмуратова, М.Ю. Анатомическое изучение надземных органов Thumus marschallianus Willd. / М. Ю. Ишмуратова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – Сборник научных трудов. – Пятигорск. – 2007 – Вып.62. – С.62-64.

113. Кабата-Пендиас, А. Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М., 1989. – 350 с.

114. Каган, В.Е. Соотношение активности антиоксидантных систем и перекисного окисления липидов в миокарде левого и правого желудочков сердца / В.Е. Каган, В.М. Савов, В.В. Диденко // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1984. - №6. - С. 664-666.

115. Калинина, С.А, Фенольные соединения сухого экстракта из надземной части Verbascum nigrum (Scrophulariaceae) / С.А. Калинина, В.М. Петриченко // Раст. ресурсы. – 2012. – Т. 48. - Вып.2. – С.237-244.

116. Касумов, Ф.Ю. Компонентный состав эфирных масел некоторых видов Thymus / Ф.Ю. Касумов // Химия природ. соединений. - 1987. - №5. - С.761-762.

117. Качественный и количественный анализ сырья и настойки мелиссы / В.А. Куркин [и др.] // Раст. ресурсы.- 1999.- Т. 35. - Вып. 3. - С. 116-120.

118. Кемертелидзе, Э. П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения / Э. П. Кемертелидзе, В. П. Георгиевский. – Тбилиси, 1976. – 224 с.

119. Колесова, В.Г. Антиоксидантная терапия растениями / В.Г. Колесова, В.А. Дадали, В.И. Лойко // Эфферентная терапия. - 1996. - Т.2. - №1. – С. 67-70.

120. Количественное определение тритерпеновых сапонинов в пятикомпонентной растительной композиции / Т.Г. Заркуа, Д.М. Попов, А.Д. Бакуридзе, Р.В. Махарадзе // Современные аспекты изучения лекарственных растений: науч. тр. – М. - 1995. – Т.34. – С. 177.

121. Комиссаренко, С.Н. Пектины – их свойства и применение / С.Н. Комисаренко, В.Н. Спиридонов // Раст. ресурсы. – 1998. – Т. 34. - Вып. 1. – С. 111-119.

122. Концентрационная инверсия антиоксидантного и прооксидантного действия β - каротина и в тканях in vivo. / В.З. Ланкин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины – 1999. – Т. 128. - № 9. – С. 314 – 316.

123. Корепанова, Н.С. Исследования по стандартизации и содержанию флавоноидов в траве пастушьей сумки / Н.С. Корепанова, Олешко Г.И. // Современные проблемы фармацевтической науки и практики. Сб. науч. тр. НИИФ - М. - 1999. - Т. 38. - Ч. 2. - С. 229-233.

124. Королев, В.А. Фармакогностическое изучение представителей рода Донник: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / В.А. Королев. - Пермь, 1996. - 26 с.

125. Косман, В.М. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений в обращено-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы и их гликозиды / В.М. Косман, И.Г. Зинкевич // Раст. ресурсы. – 1997. – Т.33. - Вып. 2.- С.14-26.

126. Костюк, В.А. Антиокислительная активность флавоноидов в различных системах перекисного окисления липидов / В.А. Костюк, А.И. Потапович, С.М. Терещенко // Биохимия. - 1988. - Т. 53. - №8. - С. 1365-1370.

127. Кочеткова, А.А. Классификация и применение пектинов / А.А. Кочеткова, А.Ю. Колесов // Пищ. Пром-сть. - 1995. - № 9. - С. 28-29.

128. Кроткова, О.А. Сравнительное изучение липофильных веществ растений рода Euphorbia L. / О.А. Кроткова, Т.В. Бомбела, В.М. Петриченко // Химия раст. сырья. – 2014.- №1 – С.147-151.

129. Куркин, В.А. Антиоксидантные свойства флаволигнанов плодов Silybum Marianum (L.) Gaertn / В.А. Куркин, А.А. Лебедев, Г.Г. Запесочная // Раст. ресурсы. – 2003. - Т. 39. - Вып. 1. - С. 89-93.

130. Куркин, В.А. Основы фитотерапии.- Самара: ОФОРТ-2009. – 963 с.

131. Куркин, В.А. Современные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, В.Б. Браславский // Всерос. Съезд фармац. работников (5-7 июня 2005; Сочи). - Сочи, 2005. - С. 95-96.

132. Куркин, В.Л. Фармакогнозия. – Самара. - 2004.- 1180с.

133. Кьосев, П.А. Полный справочник лекарственных растений / П.А. Кьосев.- М.; изд-во «Эксмо», 2004. - С. 882-885.

134. Лазебный, А. Целебные растения.- Божий дар / А. Лазебный.- Донецк: ПКФ «БАО», 2006. - 544с.

135. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В.З. Ланкин, А.К. Тихадзе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2000. - №7. – С. 48-61.

136. Ларькина, М.С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М.С. Ларькина, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова // Химия растительного сырья. – 2008. - № 6.- С. 71-74.

137. Латыпова, Г.М. Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода Primula L. и рода Humulus L.: автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 14.04.02 / Г.М. Латыпова. – Самара, 2015. – 47 с.

138. Левицкий, А.П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / А.П. Левицкий, Е.К. Вертикова, И.А. Селиванская // Мікробіологія і біотехнологія. - 2010. - Т.2. - С. 6-20.

139. Лежнева, Л.П. Исследования по разработке оптимальной прописи мази с препаратами чабреца и крапивы / Л.П. Лежнева, Н.А. Зыкова // Материалы 47-й региональной конференции по фармации и фармакологии. - Пятигорск. - 1992. - С. 31.

140. Лекарственное растительное сырье / Государственные стандарты Союза СССР // М.: Изд-во стандартов – 1980. – 296 с.

141. Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Фармакогнозия / под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева. – М. - 2003. – 534 с.

142. Лигай, Л.В. Изучение углеводов Malva neglecta L. / Л.В. Лигай // Химия природ. соединений. - 1989. - №2. - С. 280-281.

143. Листов, С.А. О содержании тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье / С.А. Листов, Н.В. Петров, А.П. Арзамасцев // Фармация. – 1990. - №2. – С. 19-25.

144. Литвиненко, В.И. Щелочной гидролиз флавоноидных гликозидов / В.И. Литвиненко, В.А. Макаров // Химия природ. соединений. - 1969. - №5. - С. 366-369.

145. Литвиненко, В.И. Хроматографическое определение количественного и качественного состава флавоноидов бессмертника и препарата фламин / В.И. Литвиненко, В.П. Георгиевский // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: тез. докл. II съезда фармацевтов УССР. - Киев, 1972. - С. 646-648.

146. Литвиненко, В.И. Дифференціина УФ-спектроскопія флавоноідів / В.И. Литвиненко, Т.П. Попова, О.С. Аммосов // Фармац. журн. – 1976. - №6. – С. 20-28.

147. Литвиненко, В.И. Некоторые принципы и методические разработки в исследовании фенольных соединений / В.И. Литвиненко // Современные проблемы науки и практики: тез. докл. II Съезда фармацевтов УССР. - Киев., 1972. - С. 674-676.

148. Литвиненко, В.И. Спектральные исследования флавоноидов: обнаружение оксигрупп в различных положениях. / В.И. Литвиненко, Н.П. Максютина // Химия природ. соединений. - 1965. - №6. - С. 420-424.

149. Литвиненко, В.И. Хемотаксономическое изучение видов Thymus L. с Украины / В.И. Литвиненко, И.Г. Зоз // Раст. ресурсы, 1969. – Т. 5. - Вып. 4. – С. 481-495.

150. Литвиненко, В.И. Химия природных флавоноидов и создание препаратов при комплексной переработке растительного сырья: автореф. дис. ... д-ра химич. наук: 02.00.10; 15.00.02 / В.И. Литвиненко. - Харьков, 1990. – 80 с.

151. Лужников, Е.А. Клиническая токсикология. / Е.А. Лужников. – М.: Медицина, 2000. – 416 с.

152. Лукманова, К.А. Аминокислотный и минеральный состав фитопрепарата люцерон / К.А. Лукманова, В.А. Рябчук, Н.Х. Салихова // Фармация. - 2000. - №1. - С. 25-27.

153. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы Европейской части России / П.Ф. Маевский. – 10-е изд., испр. и доп. – М., 2006. – 600 с.

154. Мазнев, Н.И. Энциклопедия лекарственных растений / Н.И. Мазнев. – М.: Мартин, 2004. – 137 с.

155. Макарова, Л.М. Поиск и изучение церебропротекторов в ряду производных тормозных нейромедиаторных аминокислот: дис… канд. фарм. наук / Л.М. Макарова. – Пятигорск, 2002. – 170 с.

156. Макарова, М.Н. Характеристика антирадикальной активности и состава экстрактов из растительного сырья / М.Н.Макарова // Актуальные

проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы 8 Междунар. Съезда Фитофарм 2004, 21-23 июня 2004 г. - СПб., 2004. - С.464-471.

157. Максимов, О.Б. Распространение антиоксидантов среди травянистых цветковых растений Приморского края / О.Б. Максимов, П.К Горовой, О.Е. Кривощекова // Раст. ресурсы. - 1985. - Т. 21, вып. 4. - С. 426-431.

158. Максютина, Н.П. До пытания про взаемодію деяких природних поліфенолів 3 полісахаридами / Н.П. Максютина // Фармац. журн. – 1984. - №4. – С.59-61.

159. Максютина, Н.П. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений / Н.П. Максютина, В.И. Литвиненко // Фенольные соединения и их физиологические функции. - М., 1968. - С. 7-21.

160. Маркарян, А.А. Исследование липофильных веществ растений рода тимьян /А.А. Маркарян, В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств – 2015 - № 2(7). – С. 57-60.

161. Маркова О.М. Использование оптических и хроматографических методов для стандартизации сырья и лекарственных форм чабреца и тимьяна: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 02.00.10; 15.00.02 / О.М. Маркова. – Пятигорск, 1997. - 19 с.

162. Маркова, О.М. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения // Вестник ВГУ, серия «Химия, биология, фармация». - 2003. - №1. – С.99-100

163. Мартынов, А.М. Полифенольные соединения и аминокислоты надземной части Viola uniflora (Violaceae) / А.М. Мартынов, А.М. Собенин // Раст. ресурсы.- 2011. – Т.47, вып. 2. – С. 118-122.

164. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т. / М.Д. Машковский – 15-е изд.- перераб., испр. и доп. - М.: Новая Волна, Изд. Умеренков, 2008. - 1200 с.

165. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учеб. пособие для вузов / С.А. Минина, И.Е. Каухова.- М.: ГЭОТАР-МЕД,2004.-560с.

166. Мирошников, С.В. Изучение взаимосвязи накопления тяжелых металлов в волосах и ткани щитовидной железы у лиц, проживающих в условиях экологически неблагоприятного региона / С.В.Мирошников, С.В.Нотова, О.В.Кван // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. – 2012. – № 6. – с.30-34.

167. Моцкуте, Д. Эфирное масло Thymus pulegioides L. с лимонным запахом из окрестностей Вильнюса / Д. Моцкуте, Г. Бернотене // Раст. ресурсы. - 1998. - Т.34.- Вып.1- С.131-134.

168. Назаров, Б.В. Изучение процесса экстрагирования действующих веществ чабреца и тимьяна: автореф. дисс. … канд. фармац. наук / Б.В. Назаров. – Тарту. - 1963. – 23 с.

169. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / под ред. В.Л. Багировой, А.В. Северцева. – СПб: СпецЛит, 2001. – 223 с.

170. Неверова, Н.А. Метаболизм арабиногалактана лиственницы сибирской дрожжами Saccharomyces cerevisiae / Н.А.. Неверова // Химия растительного сырья. - 2010. - №4. – С.57-62.

171. Нейротропные свойства некоторых фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды / В.А. Куркин [и др.] // Раст. ресурсы. – 2003. Т.39. - Вып.3. – С. 115-121.

172. Новикова, А.А. Профилактика и лечение заболеваний верхних дыхательных путей и органов дыхания методами фитотерапии / А.А. Новикова. - Минск. Харвест, М.: АСТ, 2000. - 288с.

173. Носаль, М.А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И.И. Носаль.- М.: Профидат, 1993. - С.125-127.

174. Носов А.М. Лекарственные растения / А.М. Носов.- М.; Изд-во: «Эксмо». - 2005. - С. 227-229.

175. О влиянии биологически активных веществ на антиоксидантную активность фитопрепаратов / Е.И. Шкарина [и др.] // Хим.-фармац. журн. –

2001. - №6. – С. 40-47.

176. Оберлис, Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д.Оберлис, Б.Харланд, А.Скальный. – СПб.: наука, 2008. – 544 с.

177. Ойвин, И.А. Методика изучения местных нарушений капиллярной проницаемости / И.А. Ойвин, С.Л. Шетель // Материалы по патогенезу воспаления и патологии белков крови. – Душанбе, 1961. - С. 167 – 173.

178. Ойвин, И.А. О роли фибрина в механизме сосудистой проницаемости / И.А. Ойвин // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1962. - Т. 54. - №10. - С. 45-47.

179. Определение гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения / Ю.В. Медведев [и др.] // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии. – 2010. - №3. – С. 25-31.

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

181. Оптимизация технологии и анализа экстракта чабреца жидкого / В.Г. Беликов [и др.] // Материалы второго научного конгресса «Традиционная медицина: теоретические и практические аспекты. - Ч. 1. – 1996. – С. 66.

182. ОФС 42-0011-03 Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90, цезий-137. Отбор проб, анализ, оценка результатов. – М. - 2003 . - 27 с.

183. ОФС 42-0013-03 Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб // Фармация. - 2003. - №6. – С.3-8.

184. Оценка антиоксидантных свойств водных настоев некоторых лекарственных растений и природных лигнинов / А.А. Лапин [и др.] // Раст. ресурсы. - 2008. - Т. 44. - Вып. 1. - С. 136-141.

185. Оценка перспективности некоторых видов лекарственного растительного сырья с точки зрения их экологической чистоты / Н.Э. Коломиец [и др.] // Химия растит. сырья. – 2004. – № 4. – С.25-28.

186. Парфенов, А.А. Аминокислоты травы пустырника пятилопастного / А.А. Парфенов, Н.С. Фурса // Фармация. – 2007. - №7. – С.6-7.

187. Парфенов, Э.А. Фармакологический потенциал антиоксидантов на основе кумарина: Обзор / Э.А. Парфенов, Л.Д. Смирнов // Хим. - фармац. журн. - 1988. - Т. 22. - №12. - С. 1438-1448.

188. Пат. 2150283. Российская Федерация, МПК А61 К 35/78. Средство для лечения псориаза / Э.Д. Колосовский, А.Ф. Никитин, Л.П. Котрехова; заявители и патентообладатели Колосовский Э.Д., Никитин А.Ф., Котрехова Л.П. - № 98122250/14; заявл. 10.12.1998; опубл. 10.06.2000 г. – 6 с.

189. Пат. 2170930. Российская Федерация, МПК G 61 N 33/50, G 01 N 33/52. Способ определения антиокислительной активности / Т.В. Максимова, И.Н. Никулина, В.П. Пахомов [и др.]; заявитель и патентообладатель «Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. - № 2000111126/14; заявл. 0.05.2000; опубл. 20.07.2001. – 4 с.

190. Пектин. Производство и применение. / Н.С. Карпович [и др.] - Киев, 1988. - 125 с.

191. Пектиновые полисахариды рябины обыкновенной Sorbus aucuparia L. / А.А. Злобин [и др.] // Химия растит. сырья. – 2011. - №1 – С.39-44.

192. Перспективы поиска антимикробных средств среди хинонов растительного происхождения / С.А. Вичканова, С.Б. Изосимова, В.В. Адгина, Л.Д. Шипулина // Растит. ресурсы. - 1979. - Т.15. - Вып.2. - С.167-177.

193. Пилат, Т.Л. Биологически активные добавки к пище (Теория, производства, применения) / Т.Л. Пилат, А.А. Иванов. – М.: Авваллон. - 2002. – 710 с.

194. Погорелый, В.Е. Исследование эффективности антигипоксантов и антиоксидантов при ишемических нарушениях мозгового кровообращения: автореф. … дис. д-ра биол. наук: 14.00.25 / В.Е. Погорелый. – Купавна. - 2001. – 47 с.

195. Погорелый, В.Е. К вопросу о применении антиоксидантов для коррекции ишемических поражений мозга / В.Е. Погорелый // Фармация в XXI

веке: инновации и традиции: тез. докл. междунар. конф., 7-8 апр. 1999 г. - СПб.: СПХФА. - 1999. - С. 190.

196. Погорелый, В.Е. Препараты аминокислот как нейропротекторы / В.Е. Погорелый, Н.Е. Слюнькова, Л.М. Макарова // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы 7 Междунар. съезда «Фитофарм 2003», 3-5 июля 2003 г. - СПб., 2003. - С. 244-250.

197. Получение и изучение физиологической активности тритерпенового вещества, выделенного из отходов производства экстракта чабреца / Ю.К. Василенко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 1978. - №9. - С.61-65.

198. Пономарев, В. Д. Экстрагирование лекарственного растительного сырья / В. Д. Пономарев. – М.: Медицина. -1978. – 204 с.

199. Попова, Н.В. Поиск растительных источников розмариновой кислоты/ Н.В. Попова, В.И. Литвиненко // VII Международный симпозиум по фенольным соединениям. Фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов, 19-23 окт. 2009г. – М. - 2009. – С. 218-220.

200. Попова, Н.В. Рослини родини ясноткові як джерема кавовоі та розмаринової кислот та іх похідних / Н.В. Попова, В.І. Літвиненко, О.І. Певнева // Фармац. часопис. – 2008. - №4. – С. 19-23.

201. Попова, Н.В. Фітохімічні дослідження та стандартизація сировини рослин родин ясноткові, айстрові, пасльонові, ломикаменеві та перспективи іх застосування: автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 15.00.02 / Н.В. Попова. – Харьків, 2012. – 41 с.

202. Почему растения лечат / М.Я. Ловкова [и др.]. - М.: Наука, 1989. - 256 с.

203. Прида, А.И. Танин из виноградных семян – источник натуральных антиоксидантов (проантоцианидинов) / А.И. Прида, С.В. Вылку // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения: материалы 7 Междунар. Съезда Фитофарм 2003, 3-5 июля 2003

г. - СПб., 2003. - С. 369-372.

204. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстиков. – Новосибирск : Гео, 2007. – 232 с.

205. Противовоспалительные и антибактериальные свойства извлечений из надземной части живокости высокой Delphinium elatum L. (Ranunculaceae) / Т.Н. Поветьева [и др.] // Бюл. Сиб. медицины. – 2012. - №3. – С.58-62.

206. 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.

207. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства Hippuridaceae – Lobeliaceae. – СПб: Наука. – 1991. – 200 с.

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

209. Романцова, Н.А. Разработка технологии сиропа отхаркивающего действия на основы фитокомплексов эвкалипта, душицы, чабреца / Н.А. Романцова, Т.А. Шаталова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.: Сб. науных трудов.- Пятигорск. - 2006. - Вып.61. - С.127-129.

210. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических видов / под ред. Р.У. Хабриева – М., 2005 – 832 с.

211. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств / под ред. В.П. Фисенко. – М.: Ремедиум, 2000. - 398 с.

212. Румянцева, Ж.Н. Поиски гепатопротекторов среди препаратов растительного происхождения / Ж.Н. Румянцева, Я.С. Гудивок // Растит. ресурсы.-1993.- т. 29.- вып.1. - С.88-97.

213. Сабиров, Р.С. Лекарственные растения традиционной медицины Средней Азии, их изучение и использование: автореф. дис. …д-ра фармац. наук: 15.00. 02 / Р.С. Сабиров. – Харьков, 1991. – 59 с.

214. Сампиев, А.М. Оптимизация технологии и совершенствование нормирования качества настойки календулы / А.М. Сампиев, М.М. Дзаурова, М.Р. Хочава // Кубан. науч. мед. вестн. - 2005. - № 3-4. - С. 50-53.

215. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. - 2004. - №2. – С. 39-41.

216. Самылина, И.А. Современное состояние и перспективы стандартизации лекарственного растительного сырья / И.А. Самылина, В.А. Ермакова // Химико-фармац. вестн. - 1999. - №6. – С. 19-22.

217. Свиридов, Г.П. Влияние фитотерапевтических комплексов на снижение медикаментозной нагрузки у больных профессиональной бронхиальной астмой / I Российский фитотерапевтический съезд // Сборник научных трудов. - М. - 2008. - С. 220-223.

218. Сезонная динамика и биологическая активность полисахаридов древесной зелени пихты сибирской Abies sibirica Ledeb. / Е.Н. Макарова, О.А. Патова, Е.А. Михайлова, В.А. Демин // Химия растительного сырья. – 2011. -№1. – С.35-42.

219. Сергиенко, В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева – М. - 2000. –263 с.

220. Сергунова, Е.В. Методы количественного определения органических кислот в лекарственном растительном сырье и водных извлечениях / Е.В. Сергунова, А.И. Марахова, А.С. Аврач // Фармация. – 2013. - №4. – С. 8-11.

221. Симонян А.В. Тритерпеновые кислоты некоторых представителей рода Thymus / А.В. Симонян, А.Л. Шинкаренко // Химия природ. соединений. - 1970. - №5. - С. 632-633.

222. Симонян, А.В. Количественное определение тритерпеноидов в растениях рода Thymus / А.В. Симонян, А.Л. Шинкаренко, Э.Г. Оганесян // Химия природ. соединений. - 1972. - №3. - С. 293-295.

223. Симонян, А.В. Отходы травы чабреца – источник получения препарата с гипохолестеринемическим действием / А.В. Симонян, А.Л. Шинкаренко, Э.Г. Оганесян // Фармация. - 1975. - № 1- С. 72-73.

224. Симонян, А.В. Ромариновая кислота в представителях рода Thymus / А.В Симонян, В.И. Литвиненко // Химия природ. соединений. - 1972. - №6. - С.797.

225. Симонян, А.В. Фенолкарбоновые кислоты рода Thymus / А.В. Симонян, В.И. Литвиненко, А.Л. Шинкаренко // Химия природ. соединений. - 1972. - №3. - С. 383-384.

226. Симонян, А.В. Флавоновые агликоны некоторых видом тимьяна Кавказа/ А.В. Симонян, В.И. Литвиненко // Раст. ресурсы. – 1971. – Т.4. - Вып. 4. – С. 580-582.

227. Симонян, А.В. Флавоновые гликозиды некоторых видов тимьяна, произрастающих на Кавказе / А.В. Симонян, А.Л. Шинкаренко, В.И. Литвиненко // Раст. ресурсы. – 1973. – т. IX. – Вып. 3. – С. 395-399.

228. Системная фитотерапия / В.С. Кисличенко [и др.]. – Харьков; изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2008. - С.36-46.

229. Скакун, Н.П. Применение антиоксидантов и антигипоксантов при туберкулезе (обзор литературы) / Н.П. Скакун // Врачеб. дело. - 1991. - №3. - С. 52-56.

230. Скальный, А.В. Биоэлементы в медицине / А.В. Скальный, И.А. Рудаков. – М.: ОНИКС 21 век, Мир, 2004. – 272 с.

231. Скальный, А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. – М.: ОНИКС 21 век, Мир, 2004. – 216 с.

232. Смирнова, Л. П. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного / Л. П. Смирнова, Л. Н. Первых // Хим.-фармацевт. журн. – 1998. – № 6. – С. 35-38.

233. Смит, Л. Прикладная ИК-спектрометрия. / Л. Смит. - М.: Мир, 1982. - 237 с.

234. Современная фитотерапия: пер. с болг. / Под ред. В. Петкова.- София: Медицина и фузкультура, 1988. - С.239-241.

235. Современное состояние пути повышения уровня фитохимических производств / А.П. Прокопенко [и др.] // Фармаком. - 1993. - №6-7. - С. 16-25.

236. Содержание розмариновой кислоты в листьях некоторых видов семейств Lamiaceae и Boraginaceae / А.Л. Буданцев [и др.] // Раст. ресурсы. – 2015. – Т. 51. - Вып. 1. – С. 105-116.

237. Сокольская, Т.А. Стандартные образцы в контроле качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов / Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева, Я.Ф. Копытько // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения: материалы 7 Междунар. Съезда Фитофарм 2003. 3-5 июля 2003 г. - СПб., 2003. - С. 374-377.

238. Сорокина, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья: автореф. дис. … д-ра фармац. наук: 15.00.02 / А.А. Сорокина. – М., 2002. – 46 с.

239. Состав эфирных масел травы чабреца / С.В. Сур [и др.] // Химико-фармацевтический журнал, - 1988 - №11. - С.1361-1366.

240. Спиридонова Е.И. Исследование эфирного масла степного чабреца // Журнал общей химии.-1936. - Т.6.- вып.10.- С.1510-1513.

241. Сравнительное исследование антибактериальных свойств полифенолов из сухих экстрактов растений семейства Geraniaceae и семейства Rosaceae / В.С. Никитина [и др.] // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : материалы VIII Междунар. съезда «Фитофарм 2004» (Миккели, Финляндия 21-23 июля 2004 г.). – СПб., 2004. – С.492-495.

242. Сравнительное исследование содержания флавоноидов в препаратах седативного сбора №3 / М.Н. Быстрова, Г.А. Панина,

М.А. Демидова, Е.В. Харитонова // Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации : сб. науч. тр. междунар. конгр. – М., 2011. – с.174-177.

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

244. Степаненко, Б.Н. Химия и биохимия углеводов (Полисахариды) / Б.Н. Степаненко. - М.: Высш. шк., 1978. - 256 с.

245. Степаненко, Б.Н. Химия и биохимия углеводов (Моносахариды) / Б.Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1977. – 222 с.

246. Сур, С.В. Состав эфирных масел лекарственных растений / С.В. Сур// Раст. ресурсы. -1993. - Т.29. - Вып.1. - С. 98-117.

247. Теселкин, Ю.О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Ю.О. Теселкин, Б.А. Жамбалова, И.В. Бабенкова // Биофизика. - 1996. - Т. 41. - Вып 3. - С. 620-624.

248. Технология и стандартизация лекарств: сб. науч. тр. / ГНЦЛС.- Харьков: Ирерг, 2000.-С.475-489

249. Тимьян ползучий (Thymus serpyllum L.) и тимьян обыкновенный (Thymus vulgaris L.): ботаническая характеристика и фармакологические свойства (обор литературы) / Т.П. Гарник [и др.] // Український медичний альманах.-2009. - Т.12. - №5. - С.215-218.

250. Тихонов, В.Н. Противовоспалительные свойства тимьянов флоры Сибири / В.Н. Тихонов // Новые достижения в создании лекарственных средств растительного происхождения : материалы Всероссийской науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения профессора Л.Н. Березнеговской. - Томск. - 2006. - С.317-320.

251. Тихонов, В.Н. Фенольные соединения сибирских видов тимьяна / В.Н. Тихонов // Современное состояние и перспективы научных исследований в области фармации / Тез. докл. научн. - практ. конф., посвященной 25-летию фарм. фак-та Самарского гос. мед. ун-та. - Самара. - 1996. - С.165-166.

252. Тихонов, В.Н. Фенольные соединения тимьяна Маршаллов (Thymus marchallianus Will.), произрастающего на территории Сибири / В.Н. Тихонов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: мат II Всерос. конф. 2005. - Кн.2. - С.350-353.

253. Точкова, Т.В. Аналитические исследования препаратов растительного сырья, содержащих флавонолы: автореф. дис. … канд. фарм. наук: 15.00.02 / Т.В. Точкова. – Харьков, 1984. – 22 с.

254. Трошин, Д.А. Биологическая активность эфирного масла чабреца / Д.А. Трошин, А.Я. Толок, Т.Н. Пересыпкина // Фармакология: состояние и перспективы исследований: VI съезд фармакологов Украинской ССР.-Тд. докл. Харьков. - 1990. - С.312.

255. Туроходжаев, М.Т. Растительные пектиновые вещества. Способ выделения пектиновых веществ / М.Т. Туроходжаев, М.А. Ходжаев // Химия природ. соединений. - 1993. - №5. - С. 635-643.

256. Углеводный состав некоторых представителей рода Centaurea флоры Сибири / Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова, Е.А. Краснов, М.С. Ларькина // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всерос. конф. (Барнаул. 21-23 апр. 2009 г.). – Барнаул. - 2009. - Кн.2. – С.247-248.

257. Удельнова, Т.Н. Микроэлемент, экология и здоровье человека / Т.Н. Удельнова, С.Г. Торгин, В.А. Ягодин // Успехи современной биологии. - 1990. - Вып. 2. - С. 279.

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

259. Фармакотерапия с основами фитотерапии: в 2-х т. / под ред. Л.В. Пастушенко и [др.]. – СПб. - 1995. – Т. 2. – 250 с.

260. Фенольные соединения и антиоксидантная активность уральских представителей рода Thymus Lamiaceae / Л.И. Алексеева, Л.В. Тетерюк,

А.Г. Быструшкин, М.А. Булышева // Раст. Ресурсы. - 2012. - Т.48. - Вып.1. - С.110-117.

261. Фенольные соединения луба лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина / С.З. Иванова [и др.] // Химия растительного сырья. - 2011. - № 2 - С.107-112.

262. Физико-химические свойства пектинов / Е.Н. Губенкова [и др.] // Пищ. пром-сть. - 1988. - №5. - С. 13-16.

263. Фильтраційна екстракция та ii аппаратурне оснащення. Повідомления IV/ Попова Т.П. [и др.] // Фармац. журн. - 1995. - №6. - С.91-95.

264. Фитотерапия антиоксидантами - биофлавоноидами / В.К. Колхир [и др.]. // Человек и лекарство.: тез. докл. 5 Рос. нац. конгр. 7-11 апр. 1998 г. - М., 1998. - С. 374.

265. Фитохимическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья клопогона кистевидного (Cimicifuga racemosa L/ Nutt.) / Д.М. Обольский, Т.А. Сокольская, В.В. Вандышев, А.А. Денисов // Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии.- 2010. - № 3. – С. 36-41.

266. Флора Европейской части СССР / под ред. А.А. Федорова – Ленинград «Наука». - 1978. - Т.3. - 260 с. (191-204).

267. Флора СССР: в 30 т. / под ред. В.Л. Комарова. – М.-Л., 1934-1964.

268. Флора Центрального Черноземья и ее анализ / под ред. Н.С. Камышева. – Воронеж. - 1978. – 117 с.

269. Фуклева, Л.А. Перспективні тимол-вмісні види роду Thymus L. флори Украіни / Л.А. Фуклева // «Фармакогнозія XXI століття». Досягнення та перспективи: Ювілейни науково-практична конференція з міжнародною участю присвячена пам’яті кандидата фармацевтичных наук, доцента Михаіла Івановича Борисова (до 80 – річча віддня народження). Тези доповідей. – Харьків. - 2009. - С.236.

270. Харборн, Д. Биохимия фенольных соединений / Д. Харборн. - М.: Мир. - 1969. - 572 с.

271. Хафизьянова, Р.Х. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии / Р.Х. Хафизьянова, И.М. Бурыкин, Г.Н. Алексеева. – Казань: Медицина, 2006. – 374 с.

272. 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. – 1994 .- Т.30. - Вып. 3. - С.66-70.

273. Храмов, В.А. О химическом составе сухих экстрактов листьев Gymnena sylvestre / В.А. Храмов, А.А. Спасов, М.П. Самохина // Хим.-фармацевт. журн. 2008. – Т.42. - №1. – С.30-32.

274. Хроматография на бумаге / под ред. И.М. Хайца, К. Мацека. - М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. - 851 с.

275. Хроматография. Практическое приложение метода: в 2-х частях / под ред. Э. Хефтмана. - М.: Мир, 1986. - Ч. 1- 336 с.; ч. 2 - 422 с.

276. Чекман, І.С. Флавоноїди – клініко-фармакологічний аспект / І.С. Чекман // Фітотерапія в Україні. – 2000. - №2. – С. 3-5.

277. Черногород, Л.Б. Эфирные масла видов рода Achillea(Asteraceae), содержащие фрагранол / Л.Б. Черногород, Б.А. Виноградов // Раст. ресурсы. – 2006.- Вып. 2 - Т. 42- С.61-68.

278. Чушенко, В.Н. Исследования в области анализа полисахаридных препаратов: автореф. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / В.Н. Чушенко. - Харьков, 1980. - 16 с.

279. Ширшова, Т.И. Содержание макро- и микроэлементов в листьях и плодах некоторых видов рода Berberis (Berberidaceae) / Т.И.Ширшова, Л.А. Скупченко // Растительные ресурсы. – 2011. – Т.47. - Вып.2. – С.123-129.

280. Шкроботько, П.Ю. Изучение состава и содержания заменимых и незаменимых аминокислот в листьях трех видов валерианы / П.Ю.Шкроботько // Запорож. мед. журн. - 2010. – Т.12. - № 3. – С.132-136.

281. Штабский, Б.М. К методике определения среднесмертельных доз и концентраций химических веществ / Б.М. Штабский // Гигиена и санитария. - 1980. - №10. - С. 49-61.

282. Щепин, О.П. Современное состояние и тенденции заболеваемости населения Российской Федерации / О.П. Щепин, Е.А. Тишук // Здравоохр. Рос. Федерации. - 2001.- №6. - С. 3-8.

283. Щербакова, О. В. Спетрофотометрический метод определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части Linaria vulgaris (Scrophulariaceae) / О. В. Щербакова, В. М. Петриченко, Л. А. Чекрышкина // Раст. ресурсы. – 2011. – Т. 47. - Вып. 4. – С. 141-147.

284. Энциклопедия травоцелительства / А.Ю. Нестеровская, [и др.] – М.: КРОН-ПРЕСС, 1998. – 736 с.

285. Эфирные масла Mentha longifolia (L.) Huds и Thymus serpyllum L. (Армянская ССР) / Р.Г. Авитесян, Л.К. Асланянц, Е.Г. Арутюнян, С.В. Акопян // Раст. ресурсы, 1988. - Т. 26. - Вып. 4. – С.605-610.

286. Эфиромасличные растения сибирской флоры – источники антимикробных средств / Г.И. Калинкина [и др.] // Ресурсоведческое и фитохимическое иучение лекарственной флоры СССР: Научные труды. - М. - 1991. - Т.29.- С.89-93.

287. Alzoreky, N. Antioxydant activivty of some edible Yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin / N. Alzoreky, K. Nakahara // Food Sci. Technol. Res.- 2001. - Vol.7. - №2. - P.141-144.

288. Antioxydant and anticetylcholinesterase activities of five plants used as Partuguese food spices / A.T. Mata [et al.] // Food Chem. - 2007. - Vol.103. - P.778-786.

289. Arti, A. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a siries of flavonoids in a liposomal system / A. Arti, G.N. Muraleedharan, M.Gale // Free Radic. Biol. and Med. - 1998. - Vol. 24. - №9. - P. 1355-1363.

290. Aziz, S. Studies of the chemical constituents of Thymus serpyllum / S. Aziz-Habib-Ur-Rehman// Turk. J. Chem. - 2008. - Vol.32. - P.605-614.

291. Baba, S. Absorption and urinary excretion of procyanidin B-2 [epicatechin-(4p-8)-epicatechin] in rats / S. Baba, N. Osakabe, M. Natsume // Free radical biology & medicine. – 2002. – Vol. 33. - №1. – P. 142-148.

292. Briant, E.T. A note of the differentiation between flavonoid glicosides and their aglicones / E.T. Briant // J. Amer. Pharm. Assoc. - 1950. - Vol. 39. - №8. - P. 480-488.

293. Carrapiso, A.I. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification / A.I. Carrapiso, C. Carcia // Lipids. 2000. - № 35. - P. 1167 – 1177.

294. 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.

295. Content and composition of the essential oil Thymus serpyllum L., growing wild in Estonia / A. Raal, U. Paaver, E. Arak, A. Orav // Medicina (Kaunas).-2004. - Vol.40. - №8. - P.795-800.

296. Cotton S. Soundbite molecules / S. Cotton // Educ. Chem. – 2004. – 41. - №6. - P. 146.

297. Davies, J.S. Aminoacids, peptides and proteins / J.S. Davies. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry. - 2006. – 472 p.

298. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods / C. Chang, M. Yang, H. Wen, J. Chern // J. Food Drug Anal. – 2002. – N 10. – P. 178-182.

299. European Pharmacopeia.- 4th ed.- Strasbourg: Council of Europe, 2002.- 2416 p.

300. European Pharmacopeia.- 6th ed.- Strasbourg: Council of Europe, 2007.- P. 4668-4670.

301. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and application / ed. M. Andersen, K.R. Markham.- Boca Raton, 2006.- 1237 p.

302. Flavonoids: biosynthesis, biological effects and dietary sources / ed. R.B. Keller. – NY : Nova Science Publishers, 2009. – 347 p.

303. Fukuyama, Y. Two new benzofuran type lignans from the wood of Viburnum awabuki / Y. Fukuyama, M. Nakahara, H. Minami // Chem. Pharm. Bull. - 1996. - Vol. 44, №7. - P. 1418-1420.

304. Geissman, T.A. Chemistry of flavonoid compounds / T.A. Geissman. - Oxford: Pergamon Press, 1962. - 666 p.

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

306. Hagerman, A. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants / A. Hagerman, K. Riedl, G. Jones // J. Agric. Food Chem. - 1998. - Vol. 46. - P. 1887-1892.

307. Haraguichi, H. Ingibition of lipid peroxidation and super-oxide generation by diterpenoids from Rosmsrinus officinalis / H. Haraguichi, T. Saito, N. Okamura // Planta Med. - 1995. - Vol. 61, №4. - P. 333-336.

308. Harborn, J.B. Plant polyphenols XXI: Characterisation of flavonoid glycosides by acid and ansimatic hydrolyses / J.B. Harborn // Phytochemistry. - 1965. - Vol. 4, №1. - P. 107-121.

309. Holzmannova, V. Rosmarinic acid and its biological activity / V. Holzmannova // Chem. Listy. – 1996 . – Vol. 90. - P. 486-496.

310. Ichikawa, H. Antioxidant activity of antocyanin extract from purple black rice / H. Ichikawa, T. Ichiyanagi, B. Xu // J. Med. Food. – 2001. – Vol. 4. - №4. – P. 211-218.

311. Iinuma, M. Three new xanthones from the bark of Garcinia dioica / M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka // Chem. Pharm. Bull. – 1996. – Vol. 44. - №1. – P. 232-234.

312. Ismail H. Бронхипрет (Bronchipret) при остром бронхите. / H. Ismail, H. Willer, H. Shteidl // Современная педиатрия. - 2008. - №3 (18). - С.1-10.

313. Kon1, J. Vitamin A and lipid peroxide: influence of retinol insufficiency / J. Kon1, L.S. Gorgoshidze, O.N. Vasileva // Biochemistry. – 1986. – Vol. 51. - №1. – P. 70-75.

314. Krasowska, A. Chemiluminescence detection of peroxyl radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds / A. Krasowska, D. Rosiak, K. Szkapiak // Current Topics in biophysics. – 2000. –Vol.24. - №920. – P. 89-95.

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

316. Lim, D.Y. Comparison of green tea extract and epigallocatechin gallate on blood pressure and contractile responses of vascular smooth muscle of rats / D.Y. Lim, E.S. Lee, H.G. Park // Arch. Pharm. Res. – 2003. – Vol. 26. - №3. – P. 214-223.

317. Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolik acid / J. Liu // J. Ethnopharmacol. – 1995. – Vol. 49. - № 2. – P. 57-68.

318. Lopez-Velez, M. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine / M. Lopez-Velez, F. Martinez-Martinez, C. del Valle-Ribes // Grit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2003. – Vol. 43. - №3. – P. 233-244.

319. Loziene, K.R. Chemical composition of the essential oil of Thymus serpullum L. ssp. serpyllum, growing wild in Lithuania / K.R. Loziene, P.R.Venskutonis // J.Essent.Oil. Res.-2006. - Vol.18. - №2. - P.206-211.

320. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, M. R. Markham, M.B. Thomas – New York: Springer, 1970. - 354 p.

321. Marfonfi, P. Chemotype pattern differentiation of Thymus pulegioides on different substates / P. Marfonfi, A. Grejtovski, M. Repsak // Biochem. System. And ecol.-1994. - Vol.22. - №8. - P.819-825.

322. Marfonfi, P. Polymorphism of essential oil in Thymus pulegioides subsp. chamaedrys in Slovakia / P. Marfonfi, J. Ess. //Oil. Res. - 1992. - Vol.4. - №2. - P. 173-179.

323. Mathiesen, L. Antioxidant activity of fruit alkaloid and C-metilated dihydrochalcones from Myrta gale / L. Mathiesen, K.E. Malterud, R.B. Sund // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, №6. – P. 515-518.

324. Michalska, M. Antioxidant capacities of natural supplements with high doses of vitamin C / M. Michalska, M. Wasek // Actual problems of creation of new

medicinal preparations of natural origin PHYTOPHARM 2003: proceedings of the 7 Intern. Cong. (3-5 july; 2003; St.-Peterburg-Pushkin, Russia). – Spb, 2003. – P. 491-494.

325. Misik, V. Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberin and aporphine Alkaloid from Mahonia aguifolium / V. Misik, L. Besakova, L. Malekova // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, №4. – P. 372-373.

326. Osinka, E. Polish ecotypes of Hypericum sp. and Thymus sp. as a rich source of phenolic compounds / E Osinka, K. Suchorska-Tropilo, A. Geszprych // Proc. of the 6 internat. Congr. St. Petersburg. - 2002. - P.655-658.

327. Petersen, M. Rosmarinic acid / M. Petersen, M.S. Simmonds // Phytochemistry. – 2003. – V.62. - P. 121-125.

328. Phytochemical analysis of the essentisl oil of Thymus serpyllum L., growing wild in Estonia / U. Paaver, [et al.]. // Nat. Prod.Res. – 2008. – Vol.22. - №2. – P. 108-115.

329. Podmore, I.D. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties / I.D. Podmore, H.R.Griffiths, K.E. Herbert // Nature. -1998.-Vol. 392. – P. 559.

330. Prior, R.L. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Antho-cyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species / R.L. Prior, G.Cao, A. Martin // J. Agric. Food Chem. -1998. – Vol. 46. – P. 2686-93.

331. Recio, M.C. Structural reguirements for the antiinflamatory activity of natural triterpenoids / M.C. Recio // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, №2. – P. 182-185.

332. Rigo, A. Contribution of proanthocyanidins to the eroxyl radical scaveng ing capacity of some Italian red wines / A. Rigo, F. Vianelio, G. Clementi // J. Agric. Food. Chem. – 2000. – Vol. 48, №6. – P. 1996-2002.

333. Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (Melissa officinalis L.). / J. Toth, M. Mrlianova, D. Tekelova, M..Korenova // Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae. - 2003. - Vol. 50. - P. 139-146.

334. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive – like affect in the forced swimming test in mice / T. Hiroshi [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2002. - № 3. – P. 261-267.

335. Rossetto, M. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles / M. Rossetto, P.Vanzani, F.Mattivi // Arch Biochem Biophys. – 2002. – Vol. 408. – P. 239-45.

336. Schratz, E. Zusammensetzung des Ttherischen ales von Thymus vulgaris und Thymus marschallianus in Abhängigkeit von Blattalter und Jahreszeit / E. Schratz, H. Hirster // Planta medica. - 1970. - Bd 19. - S. 160-176.

337. Senatore, F. Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of a Time (Thymus pulegioioles L.) Groving Wild in Campania (Southern Italy) / F. Senatore // J. Agric. Food Chem. – 1996. - Vol. 44. - P. 1327-1333.

338. Shibata, K. Untersuchungen iber das baikalin, eine neue flavonglukuronsaure verbindung aus den Wurzein von Scutellaria baicalensis / K. Shibata, S. Iwata, N. Nakamura // Acta Phytochem. - 1973. - Vol. 1. - №1. - P. 106-139.

339. Stahl-Biskup, E. The chemical composition of Thtmys oils: a review of literature 1960-1989 / E. Stahl-Biskup // J. Ess. Oil. Res. - 1991. - Vol.3. - P.61-82.

340. Studies on the essential of chemical constituents of Thymus serpyllum / J. Zhang, A. Liu, Y. Yang, J. Yao // Sichuan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban. - 2004. - Vol.41. - №4. - P.890-892: Chem. Abstr. - 2006. - Vol.144.-№366463.

341. Sugihara, N. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid hydroperoxidations in cultured hepatocytes / N. Sugihara, M. Ohnish, M. Imamura // J. of health science. – 2001. – Vol.47. - №2. – P. 99-106.

342. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (Origanum vulgare L. spp. hirtum), thyme (Thymus vulgaris L.) and wild thyme (Thymus serpyllum L.) on the copper-induced oxidation of human low-density

lipoproteins / T. Kulisic [et al.] // International journal of Fodd Sciences and nutrition. – 2007. - № 58 (2). - P. 87-93.

343. Thyme: The genus Thymus / eds. Stahl-Biskup E., Saez F. London, New York: Taylor, Francis, 2002. – 346 p.

344. Vladimirov, Y.A. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation / Y.A. Vladimirov // Free Radical Bioi. Med. - 1995. - Vol. 18. - P. 739-745.

345. Vladimirov, Y.A. Quinolizin-coumarins as physical enhancers of chemiluminescence during lipid peroxidation in live HL-60 cells / Y.A. Vladimirov // Arch Biochem. Biophys. - 2000. - Vol. 384. - №1. - P. 154-162.

346. Wada, L. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon Caneberries / L. Wada, B. Ou // J. Agric. Food Chem. - 2002. - Vol. 50. - P. 3495-3500.

347. Wagner, H. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas / H. Wagner, S. Blads // Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlang. - 1996. – 348 p.

348. Wu, X. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity / X. Wu, L.Gu, R.L. Prior // J. Agric. Food Chem. - 2004. - Vol. 52. - P. 7846-7856.

349. Yurttas, H.C. Antioxidant activity of nontocopherol hazelnut (Corylusspp.) phenolics / H.C. Yurttas, H.W. Schafer, J.J. Warthesen // JFS: Food Chemistry and toxicology. - 2000. - Vol. 65. - №2. - P. 276-280.

Приложения

Приложение №1

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО Фирма «Здоровье»

_____ Л.И. Шабанова

«_____» _____ 2012г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование: методика качественного обнаружения эфирного масла методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»

Авторы внедрения: Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

Место разработки ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»; кафедра фармакогнозии и ботаники.

Место внедрения: ОКК ЗАО Фирма «Здоровье»

Форма внедрения: используется с января 2012 года в работе ОКК ЗАО Фирма «Здоровье», при фитохимическом анализе сырья, содержащего эфирные масла

Эффективность: По разработанной методике, обнаружение эфирного масла в траве чабреца ползучего проводят методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) 7,5 х 15 мм. В качестве достоверного образца используют 0,1% спиртовой раствор тимола; в качестве подвижной фазы используется хлороформ, раствор для детектирования – 1 % раствор п-диметиламинобензальдегида в кислоте серной 75 %. При просматривании хроматограммы обнаруживаются основных зоны: коричневого цвета, оранжевого цвета и красно-коричневого цвета, (одна из которых – на уровне зоны тимола).

Методика хорошо воспроизводима.

Начальник ОКК

ЗАО Фирма «Здоровье» Т.А. Белоус

Приложение №2

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО Фирма «Здоровье»

_____ Л.И. Шабанова

«_____» _____ 2012г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование: методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»

Авторы внедрения: Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

Место разработки ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»; кафедра фармакогнозии и ботаники.

Место внедрения: ОКК ЗАО Фирма «Здоровье»

Форма внедрения: используется с января 2012 года в работе ОКК ЗАО Фирма «Здоровье», при фитохимическом анализе сырья, содержащего флавоноиды

Эффективность: По разработанной методике, обнаружение флавоноидов в траве чабреца ползучего проводят методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А) 7,5 х 15 мм. В качестве достоверного образца используют 0,1% раствор стандартного образца цинарозида; в качестве подвижной фазы – систему растворителей: этилацетат- кислота муравьиная – вода (70:15:15), раствор для детектирования – спиртовой раствор алюминия хлорида 2 %. При просматривании хроматограммы в УФ-свете обнаруживаются 4 основных зоны флавоноидов с желтой и темно-коричневой флуоресценцией (одна из которых – на уровне зоны цинарозида). Допускается наличие дополнительных зон.

Методика хорошо воспроизводима.

Начальник ОКК

ЗАО Фирма «Здоровье» Т.А. Белоус

Приложение №3

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Пятигорского филиала
ГБОУ ВПО Волгоградского
государственного медицинского
университета, д.м.н. В.Л. Аджиенко
_____
«11» января 2013 г

Предмет внедрения: методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»

Авторы внедрения: Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

Место разработки: ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; кафедра фармакогнозии и ботаники.

Место внедрения: кафедра фармакогнозии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет

Форма внедрения: используется с января 2013 года в учебном и научном процессе кафедры Пятигорского филиала ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, при фитохимическом анализе сырья, содержащего флавоноиды

Эффективность: По разработанной методике, обнаружение флавоноидов в траве чабреца ползучего проводят методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А) 7,5 х 15 мм. В качестве достоверного образца используют 0,1% раствор стандартного образца цинарозида; в качестве подвижной фазы – систему растворителей: этилацетат- кислота муравьиная – вода (70:15:15), раствор для детектирования – спиртовой раствор алюминия хлорида 2 %. При просматривании хроматограммы в УФ-свете обнаруживаются 4 основных зоны флавоноидов с желтой и темно-коричневой флуоресценцией (одна из которых – на уровне зоны цинарозида). Допускается наличие дополнительных зон.

Методика хорошо воспроизводима.

Зав. кафедрой фармакогнозии, проф. Д.А. Коновалов

Приложение №4

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-воспитательной работе
ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный
университет им. К.Л. Хетагурова»
профессор _____ А.В. Райцев
«13» _____ 2012г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование: методика качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в сырье «Чабреца трава»

Авторы внедрения: Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

Место разработки ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»; кафедра фармакогнозии и ботаники.

Место внедрения: фармацевтический факультет ГОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова»

Форма внедрения: используется с марта 2012 года в работе сотрудников фармацевтического факультета ФБГОУ ВПО «Северо- Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова», при фитохимическом анализе сырья, содержащего флавоноиды

Эффективность: По разработанной методике, обнаружение флавоноидов в траве чабреца ползучего проводят методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А) 7,5 х 15 мм. В качестве достоверного образца используют 0,1% раствор стандартного образца цинарозида; в качестве подвижной фазы – систему растворителей: этилацетат- кислота муравьиная – вода (70:15:15), раствор для детектирования – спиртовой раствор алюминия хлорида 2 %. При просматривании хроматограммы в УФ-свете обнаруживаются 4 основных зоны флавоноидов с желтой и темно-коричневой флуоресценцией (одна из которых – на уровне зоны цинарозида). Допускается наличие дополнительных зон. Методика хорошо воспроизводима.

Ответственный за внедрение: декан фармацевтического факультета ФБГОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова» к.фарм.н. Морозов В.А. _____

Приложение №5

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО Фирма «Здоровье»
_____Л.И. Шабанова
«__» ноября 2009 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование: методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца ползучего

Авторы внедрения: Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

Место разработки: Курский государственный медицинский университет; кафедра фармакогнозии и ботаники.

Место внедрения: ОКК ЗАО Фирма «Здоровье»

Форма внедрения: используется с сентября 2009 года в работе ОКК ЗАО Фирма «Здоровье» при стандартизации сырья «Чабреца трава», по содержанию флавоноидов.

Эффективность: Данная методика позволяет определить содержание суммы флавоноидов в траве чабреца ползучего спектрофотометрическим методом, основанным на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в среде 70% спирта этилового, в области 395 нм, в пересчете на цинарозид.

Начальник ОКК

ЗАО Фирма «Здоровье» Белоус Т.А. Белоус

Приложение №6

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации «___»_____ 201_ г.

ООО Фирма «Здоровье», 121170, г. Москва, ул. 1812 года, д. 2.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

№ _____

Тимьяна Маршалла трава

Thymus Marshallianus Willd.

трава цельная

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ	ООО Фирма «Здоровье», Россия
ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)	ООО Фирма «Здоровье», Россия
УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)	ООО Фирма «Здоровье», Россия
ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	ООО Фирма «Здоровье», Россия

Утверждаю

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Производитель: ООО Фирма «Здоровье», Россия

Заявитель: ООО Фирма «Здоровье», Россия

Разработчик: ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет

Тимьяна Маршалла трава **ФС.**

Thymi Marshalliani herba

Собранная в фазу цветения, высушенная и обмолоченная трава дикорастущего полукустарника тимьяна Маршалла - *Thymi Marshalliani Willd.*, сем. Яснотковых – *Lamiaceae.*

Внешние признаки. *Цельные (обмолоченное) сырье.* Смесь цельных или частично измельченных тонких стеблей, листьев и цветков. Стебли округло- или неясно четырехгранные, тонкие, зеленовато- или желто-коричневого цвета, под соцветием опушены длинными перпендикулярно отстоящими или слегка вниз направленными волосками, в нижней части с коротким вниз отогнутым опушением. Листья почти сидячие, от ланцетных до линейно-ланцетных, длиной до 24 мм, голые или негусто волосистые со

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
Внешние признаки	Визуальный (с помощью микроскопа и лупы), органолептический, ГФ XI	Соответствует ФС
Микроскопия	ГФ XI, вып. 1	Соответствует ФС
Определение основных групп биологически активных веществ	ТСХ	Соответствует ФС
Числовые показатели:		
Суммы флавоноидов, в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид	Спектрофотометрия	не менее 0,9%
Экстрактивных веществ, извлекаемых водой	ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	не менее 18%
Экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30%	ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	не менее 18%
Влажность	ГФ XI,вып. 1	не более 13%
Зола общая	ГФ XI,вып. 1	не более 12%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	ГФ XI,вып. 1	не более 5%
Примесь кусочков стеблей толщиной более 0,5 см	ГФ XI, вып. 1	не более 10%
Органическая примесь	ГФ XI, вып. 1	не более 1%
Минеральная примесь	ГФ XI, вып. 1	не более 1%
Измельченность:	ГФ XI, вып. 1	
Цельное сырье частиц, проходящих сквозь сито d=3 мм		не более 5%
Измельченное сырье частиц, не проходящих сквозь сито d=5 мм		не более 5%
частиц, проходящих		не более 5%

сквозь сито d=0,18 мм *Порошок* частиц, проходящих сквозь сито d=0,18 мм частиц, не проходящих сквозь сито d=2 мм		 не более 5% не более 5%
Тяжелые металлы	ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует ОФС
Радионуклиды	ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует ОФС
Остаточные количества пестицидов	ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует ОФС
Микробиологическая чистота	ОФС «Микробиологическая чистота»	Соответствует категории А4
Упаковка, маркировка и транспортирование	ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратах».	Соответствует ОФС
Хранение	ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».	Соответствует ОФС
Срок годности		2 года
Фармакологическая группа		Противовоспалительное, отхаркивающее средство

слабо заметными боковыми жилками. При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) по всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев видны редкие длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, собраны по несколько штук в полумутовки, образующие удлиненные и прерывистые соцветия с 3-7 расставленными мутовками. Чашечка колокольчатая, длиной 2,25-2,75 мм, опушенная; зубчики верхней губы чашечки остроугольные, длиннореснитчатые по краю. Венчик воронковидный, длиной 5 мм, с мало заметной трубкой.

Цвет листьев светло-зеленый, чашечки – светло-зеленый, зубцы темно-зеленые, иногда пурпуровые, венчика - бледно-лиловый или светло-розовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Измельченное сырье. Смесь кусочков тонких стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки стеблей округло- или неясно четырехгранных, тонких, зеленовато- или желто-коричневого цвета; листья зеленые или серовато-зеленые, цельные и в виде кусочков различной формы; на поверхности листьев видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев видны редкие длинные щетинистые волоски или их обломки; цветки мелкие, собраны по несколько штук в полумутовки с воронковидным венчиком бледно-лилового или светло-розового цвета и колокольчатой светло-зеленой чашечкой, часто измельчены.

Цвет зеленый, зеленовато- или желто-коричневый, светло-зеленый, темно-зеленый, пурпуровый, бледно-лиловый, светло-розовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Порошок. Смесь кусочков тонких стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видны кусочки округло- или неясно четырехгранных тонких стеблей, зеленовато- или желто-коричневого цвета; кусочки листьев различной формы с многочисленными желтовато-коричневыми точками (эфиромасличные железки) зеленые или серовато-зеленые; на некоторых кусочках (по краю и у основания листа) видны редкие длинные щетинистые волоски; кусочки соцветий (чашечка или их части, опушенные с внешней стороны и по краю зубцов реснитчатыми волосками, иногда с заметными желтовато-коричневыми точками железок; лепестки венчика или их части, опушенные с внешней стороны) светло-зеленого, бледно-лилового или светло-розового цвета.

Цвет порошка зеленовато- или желто-коричневый, светло-зеленый, темно-зеленый, пурпуровый, бледно-лиловый, светло-розовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное (обмолоченное), измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми боковыми стенками, эпидермис с нижней стороны листа более извилистостенный; на верхнем эпидермисе заметно четковидное утолщение клеточных стенок. Устьица имеются на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней стороне их значительно больше; устьица сопровождаются двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфиромасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски нескольких типов: простые одноклеточные, покрытые бородавчатой кутикулой, верхушка которых слегка заострена, расположены по отношению поверхности листа под углом, приурочены к краю листа; простые одноклеточные толстостенные удлиненные, с бородавчатой поверхностью, верхушка которых тонко заострена, встречаются у основания листовой пластинки; простые двух-

пятиклеточные, стенки которых слегка утолщены и покрыты слабобородавчатой кутикулой (щетинистые), встречаются у основания листа.

Клетки эпидермиса стебля прямоугольные, удлиненные, с прямыми или со скошенными концами, с четковидным утолщением клеточных стенок и крупнозубчатой кутикулой. Эпидермис опушен волосками: простыми одноклеточными толстостенными колпачковидной формы, покрытыми бородавчатой кутикулой, у основания которых образуется цистолит, расположенными в межреберье по эпидермису стебля; простыми одно-двухклеточными толстостенными, покрытыми слегка бородавчатой кутикулой; простыми 3-х, 6-клеточными со слегка бородавчатой поверхностью с зернистым содержимым, расположенными в большей степени на ребрах; головчатыми, состоящими из пузеревидной головки и одноклеточной ножки. Встречаются эфиромасличные железки, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально. Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски четырех типов: простые многоклеточные щетинистые, стенки которых сильно утолщены, расположенные по краю зубцов; простые многоклеточные тонкостенные с тупой закругленной верхушкой, расположенные в основании; головчатые волоски на двухклеточной ножке с одноклеточной головкой, расположенные по эпидермису основания чашечки; головчатые волоски на одноклеточной ножке с пузыревидной одноклеточной головкой, расположенные по эпидермису чашечки в средней ее части.

Эпидермис трубки венчика прямостенный, с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами. В зеве и на отгибе венчика эпидермис извилистостенный, с сосочковидными выростами, опушен одноклеточными и многоклеточными простыми бородавчатыми волосками, базальная клетка которых у основания расширена и верхушка заострена. Головчатые волоски двух типов: с одноклеточной удлиненно-округлой головкой, на одноклеточной ножке; с округлой одноклеточной головкой на многоклеточной ножке.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми и четковидно утолщенными боковыми стенками; устьица с двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Округлые эфиромасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски 3 типов: простые одноклеточные, бородавчатые, верхушка которых слегка заострена или их фрагменты; простые одноклеточные толстостенные удлиненные, с бородавчатой поверхностью, верхушка которых тонко заострена; простые двух-пятиклеточные, стенки которых слегка утолщены и покрыты слабобородавчатой кутикулой (щетинистые) или их фрагменты. На фрагментах стеблей и частях цветков видны волоски: простые одноклеточные толстостенные бородавчатые колпачковидной формы, у основания которых образуется цистолит; простые одно-двухклеточные толстостенные, покрытые нежно бородавчатой кутикулой; простые 3-х, 6-клеточные волоски со слегка бородавчатой поверхностью с зернистым содержимым; простые многоклеточные щетинистые волоски, стенки которых сильно утолщены; простые многоклеточные тонкостенные волоски с тупой закругленной верхушкой; головчатые волоски, состоящие из пузеревидной головки на одноклеточной ножке; головчатые волоски на двухклеточной ножке с одноклеточной головкой и с округлой одноклеточной головкой на многоклеточной ножке.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-О-глюкозида. Около 0,1 г СО лютеолин-7-О-глюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют в 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до

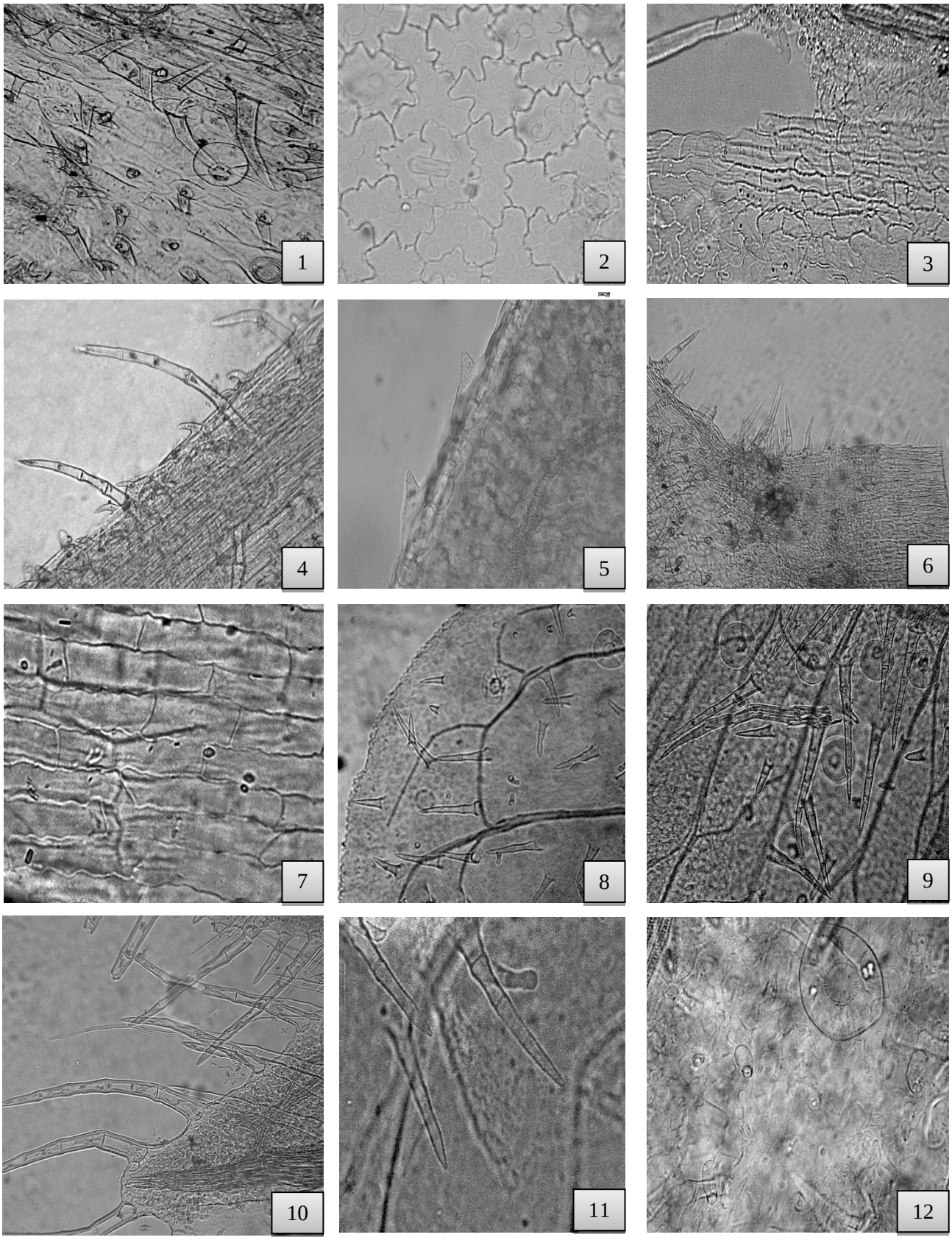


Рисунок – Тимьяна Маршалла трава

1 - фрагмент эпидермиса стебля в межреберье с простым двухклеточным толстостенным со слегка бородавчатой кутикулой волоском, с эфиромасличной железкой (вид сверху), с простым одноклеточным колпачковидным волоском с цистолитом у основания (300х), 2 - фрагмент верхнего эпидермиса листа с устьичным аппаратом диацитного типа (600х), 3 - фрагмент эпидермиса листа по жилке с клетками эпидермиса с четковидным утолщением клеточных стенок (300х), 4 - фрагмент эпидермиса вдоль ребра стебля с простым многоклеточным волоком со слегка бородавчатой поверхностью, с эфиромасличной железкой (вид сверху), с простым двухклеточным толстостенным волоском, со слегка бородавчатой поверхностью (120х), 5 - фрагмент края листа с одноклеточным простым волоском, покрытым бородавчатой кутикулой, верхушка которого слегка заострена (300х), 6 - фрагмент листа в его основании с простым многоклеточным волоском со слегка утолщенными клеточными стенками и слабобородавчатой кутикулой (щетинистым), с простым, толстостенным одноклеточным удлиненным волоском с тонкозаостренной верхушкой и слабобородавчатой поверхностью (120х), 7 - фрагмент эпидермиса трубки венчика с призматическими кристаллами (300х), 8 – фрагмент эпидермиса верхней губы венчика с эфиромасличной железкой, с простым одноклеточным бородавчатым волоском с заостренной верхушкой, с простым многоклеточным бородавчатым волоском с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой, с сосочковидными клетками эпидермиса (120х), 9 - фрагмент эпидермиса нижней губы венчика с эфиромасличной железкой (вид сверху), с простым многоклеточным бородавчатым волоском с заостренной верхушкой и расширенной у основания базальной клеткой, с простым одноклеточным бородавчатым волоском с заостренной верхушкой (120х), 10 - фрагмент эпидермиса края зубцов чашечки с простым многоклеточным щетинистым волоском с очень сильно утолщенными клеточными стенками (200х), 11 - фрагмент эпидермиса нижней губы венчика с простым многоклеточным бородавчатым волоском, базальная клетка которого у основания расширена и верхушка заострена, с головчатым волоском с одноклеточной округлой удлиненной головкой на одноклеточной ножке, с головчатым волоском с округлой одноклеточной головкой и многоклеточной ножкой (300х), 12 - фрагмент эпидермиса в средней части чашечки с устьицем диацитного типа, с эфиромасличной железкой (вид сверху), с головчатым волоском с пузыревидной одноклеточной головкой и одноклеточной ножкой (300х).

полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 х 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А), рядом - 5 мкл раствора СО лютеолин-7-О-глюкозида.

Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру со смесью растворителей (без предварительного насыщения) этилацетат - муравьиная кислота безводная - вода (70:15:15) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 - 90%

длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают алюминия хлорида раствором 2%, сушат и сразу просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО лютеолин-7-О-глюкозида должна обнаруживаться желтая зона.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-глюкозида и 3 зоны адсорбции желтого цвета ниже; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13%.

Зола общая. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5%.

Измельченность сырья. *Цельное (обмолоченное) сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, - не более 5%. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, - не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, - не более 5%. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, - не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, - не более 5%.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей толщиной более 0,5 см. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье* – не более 10%.

Органическая примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1%.

Минеральная примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1%.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид – не менее 0,9%; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, - не менее 18%; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30%, - не менее 18%.

Сумма флавоноидов

Алюминия хлорида раствора 5% в спирте 70%. 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 70% и взвешивают с погрешностью ±0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный

фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин - 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (раствор Б).

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

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид в абсолютно сухое сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_{1\ см}^{1\%} \times a \times 2{,}5 \times (100-W)},$$

где А – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\ см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолин-7-О-глюкозид с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345;

а – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – вода очищенная).

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30%, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – спирт 30%).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30% и водой, - в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
генерального директора
по качеству
ООО Фирма «Здоровье»
_____М.А. Смирнова
«12» февраля 2015г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Авторы: зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, доктор фарм. наук, проф. Бубенчикова В.Н., доцент кафедры общей и фармацевтической химии Орловского государственного университета Медицинского института, канд. фарм. наук Старчак Ю.А.

Объект апробации: Проект ФСП «Тимьяна Маршалла трава».

Источник информации: результаты исследования докторской диссертации

Где и кем проведена апробация: ОКК ООО Фирма «Здоровье».

Цель апробации: расширение сырьевой базы сырья тимьяна ползучего.

Результаты апробации: ФСП «Тимьяна Маршалла трава» составлена по требованиям предъявляемой НД. Проведенные исследования качества травы тимьяна Маршалла соответствует показателям ФСП. Данный вид сырья будет включен в план развития ООО Фирма «Здоровье».

Начальник ОКК
ООО Фирма «Здоровье» Т.А. Белоус

Приложение №7

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XIII издание

Том III

Москва
2015

ФГБУ Федеральная электронная медицинская библиотека

Организации, учреждения Российской Федерации и специалисты, принявшие участие в подготовке Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания

1. Организации, учреждения России и специалисты, принявшие участие в составлении Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания

Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации

Цындымеев Арсалан Гармаевич – директор департамента, к.фарм.н.

Романов Филипп Александрович – заместитель директора департамента, начальник отдела регистрации лекарственных препаратов

Глухарева Светлана Александровна – заместитель начальника отдела регистрации лекарственных препаратов

Саканян Карен Маисович – начальник отдела регистрации цен на жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ)

Олефир Юрий Витальевич – генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП», д.мед.н.

Меркулов Вадим Анатольевич – заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д. мед.н., проф.

Миронов Александр Николаевич – д. мед.н., проф.

Сакаева Ирина Вячеславовна – к.фарм.н.

Саканян Елена Ивановна – директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм. н., проф.

Кондратова Юлия Александровна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники, к.фарм.н.

Бубенчиков Роман Александрович – ассистент кафедры фармакогнозии и ботаники, д.фарм.н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России)

Калинкина Галина Ильинична – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н, проф.

Коломиец Наталья Эдуардовна – профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н.

Андреева Валерия Юрьевна – доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.биол.н.

Исайкина Надежда Валентиновна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Федько Ирина Валерьевна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, заместитель декана фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Полуэктова Татьяна Викторовна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Орловский государственный университет» (ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет»; ОГУ)

Старчак Юлия Анатольевна – преподаватель курсов фармацевтической химии и фармакогнозии для студентов специальности

«Фармация» на кафедре общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии, к.фарм.н.

Федеральное унитарное государственное предприятие «Государственный научный центр по антибиотикам» (ГНЦА)

Долгова Галина Владимировна – руководитель сектора фармакологии, к.биол.н.

Юркевич Александр Морисович – ведущий научный сотрудник, д.хим.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН):

Морозов Сергей Владимирович – заведующий лабораторией экологических исследований и хроматографических методов анализа, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН)

Краснова Маргарита Андреевна – ведущий инженер отделения изучения новых противоопухолевых лекарств с однодневным стационаром амбулаторной химиотерапии, к. фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биорганической химии им.академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН)

Мирошников Анатолий Иванович – заместитель директора по науке, д.хим.н., академик РАН.

ФЭМБ Федеральная электронная медицинская библиотека

Чабреца трава	**ФС.2.5.0047.15**
Thymi serpylli herba	**Взамен ГФ XI, вып. 2, ст. 60**
	(изм. № 1 от 16.06.1999)

Собранная в фазу цветения, высушенная и обмолоченная трава дикорастущего полукустарника тимьяна ползучего (чабреца) – *Thymus serpyllum* L., сем. яснотковых – *Lamiaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное (обмолоченное) сырье.* Смесь цельных или частично измельченных тонких стеблей, листьев и цветков. Стебли четырехгранные, тонкие, зеленовато- или желто-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком. Листья короткочерешковые, ланцетные, эллиптические или продолговато-эллиптические, длиной до 15 мм, голые или слабоопушенные с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) по всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, одиночные или собранные по нескольку штук в полумутовки. Каждый цветок состоит из двугубой чашечки и двугубого венчика. Чашечка длиной около 4 мм, венчик длиной 5 - 8 мм, тычинок – 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый; чашечки – красновато-коричневый; венчика – синевато-фиолетовый. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Измельченное сырье. Смесь кусочков тонких стеблей, листьев и цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стеблей четырехгранные, тонкие, зеленовато- или желтовато-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком; листья зеленые или серовато-зеленые, цельные и в виде кусочков различной формы; на поверхности листьев видны желтовато-коричневые точки (эфирномасличные железки), у основания листьев часто видны крупные щетинистые волоски или их обломки; цветки мелкие, одиночные с двугубым венчиком синевато-фиолетового цвета (венчик иногда обесцвечивается) и двугубой красновато-коричневой чашечкой, часто измельчены.

Цвет зеленый, серовато-зеленый или зеленовато-коричневый с зеленовато-фиолетовыми, желтовато-коричневыми, коричневато-белыми, бледно-фиолетовыми, коричневато-фиолетовыми, синевато-фиолетовыми, красновато-коричневыми вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки четырехгранных тонких стеблей голых или слегка опушенных, чаще в продольном сечении, желтовато-белые на изломе, снаружи – зеленовато-коричневые, красновато-коричневые или светло-коричневые, часто с фиолетовым оттенком; кусочки слабоопушенных листьев с многочисленными желтовато-коричневыми точками (эфирномасличные железки) светло-зеленого или зеленого цвета; на некоторых кусочках (по краю и у основания листа) видны редкие длинные щетинистые волоски; кусочки соцветий (чашечки или их части, опушенные с внешней стороны и по краю зубцов реснитчатыми волосками, иногда с заметными желтовато-коричневыми точками железок; лепестки венчика или

их части, опушенные с внешней стороны) зеленого, коричневато-зеленого, красно-коричневого, розовато-фиолетового или синевато-фиолетового цвета.

Цвет порошка серовато-зеленый или коричневато-зеленый с желтовато-белыми, красно-коричневыми, светло-коричневыми, часто с фиолетовым оттенком, синевато-фиолетовыми, розово-фиолетовыми, зелеными и темно-зелеными вкраплениями. Запах ароматный. Вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Микроскопические признаки. *Цельное (обмолоченное), измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности должно быть видно, что клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми боковыми стенками; на верхнем эпидермисе и по краю листа иногда заметна складчатость кутикулы и четковидное утолщение клеточных стенок. Устьица имеются на обеих сторонах листовой пластинки, на нижней стороне их значительно больше; устьица сопровождаются двумя околоустьичными клетками, смежные клетки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Эфирномасличные железки крупные, состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки часто образуют розетку. Волоски нескольких типов: очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположенные у основания листа; выше по краю листовой пластинки встречаются более мелкие простые двух-, трехклеточные волоски с бородавчатой поверхностью; головчатые волоски очень мелкие с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, встречаются по всей поверхности листа; сосочковидные выросты эпидермиса, гладкие или слегка бородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне и по краю листовой пластинки.

Клетки эпидермиса стебля прямоугольные, удлиненные, с прямыми или со скошенными концами, с четковидным утолщением клеточных стенок; устьица расположены в основном по ребрам. Эпидермис опушен простыми, коленчатоизогнутыми двух-, пятиклеточными волосками с бородавчатой

кутикулой, головчатыми волосками с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке, реже встречаются сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой; встречаются эфирномасличные железки, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально. На эпидермисе черешка располагаются сосочковидные выросты с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой и многоклеточные волоски с бородавчатой кутикулой Клетки наружного и внутреннего эпидермиса листочков чашечки сильно извилистостенные; имеются волоски трех типов: простые, двух-, пятиклеточные с бородавчатой кутикулой, сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой кутикулой, головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке.

Эпидермис трубки венчика прямостенный, с продольной складчатостью кутикулы с прямыми или со скошенными концами. В зеве и на отгибе венчика эпидермис извилистостенный, с сосочковидными выростами, опушен простыми и головчатыми волосками. Простые волоски двух-, четырех-, реже пятиклеточные с бородавчатой кутикулой. Головчатые волоски двух типов с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке и с овальной одноклеточной головкой на двухклеточной ножке. На эпидермисе листочков чашечки и венчика встречаются крупные эфирномасличные железки, иногда с желто-коричневым содержимым, состоящие из 8 выделительных клеток, расположенных радиально; клетки эпидермиса вокруг места прикрепления железки иногда образуют розетку.

Порошок. При рассмотрении микропрепарата порошка должны быть видны клетки эпидермиса с извилистыми и утолщенными боковыми стенками; устьица с 2 околоустьичными клетками, смежные стенки которых расположены перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Округлые эфирномасличные железки состоят из 8 выделительных клеток, расположенных радиально, клетки эпидермиса вокруг места прикрепления

часто образуют розетку. Простые волоски 3 типов: очень крупные многоклеточные бородавчатые волоски или их фрагменты; более мелкие 2-, 3-клеточные волоски с бородавчатой поверхностью, часто слегка согнутые в местах сочленения; сосочковидные выросты эпидермиса с гладкой или слегка бородавчатой поверхностью; головчатые волоски с овальной одноклеточной головкой на короткой одноклеточной ножке. На фрагментах стеблей и частях цветков видны точно такие же трихомы, как и на листьях, за исключением бородавчатых волосков: на цветках многоклеточные простые волоски имеют более тонкие оболочки и покрыты нежно-бородавчатой кутикулой; головчатые волоски 2 типов: на одноклеточной ножке с одноклеточной головкой и на 2-клеточной ножке с одноклеточной головкой.

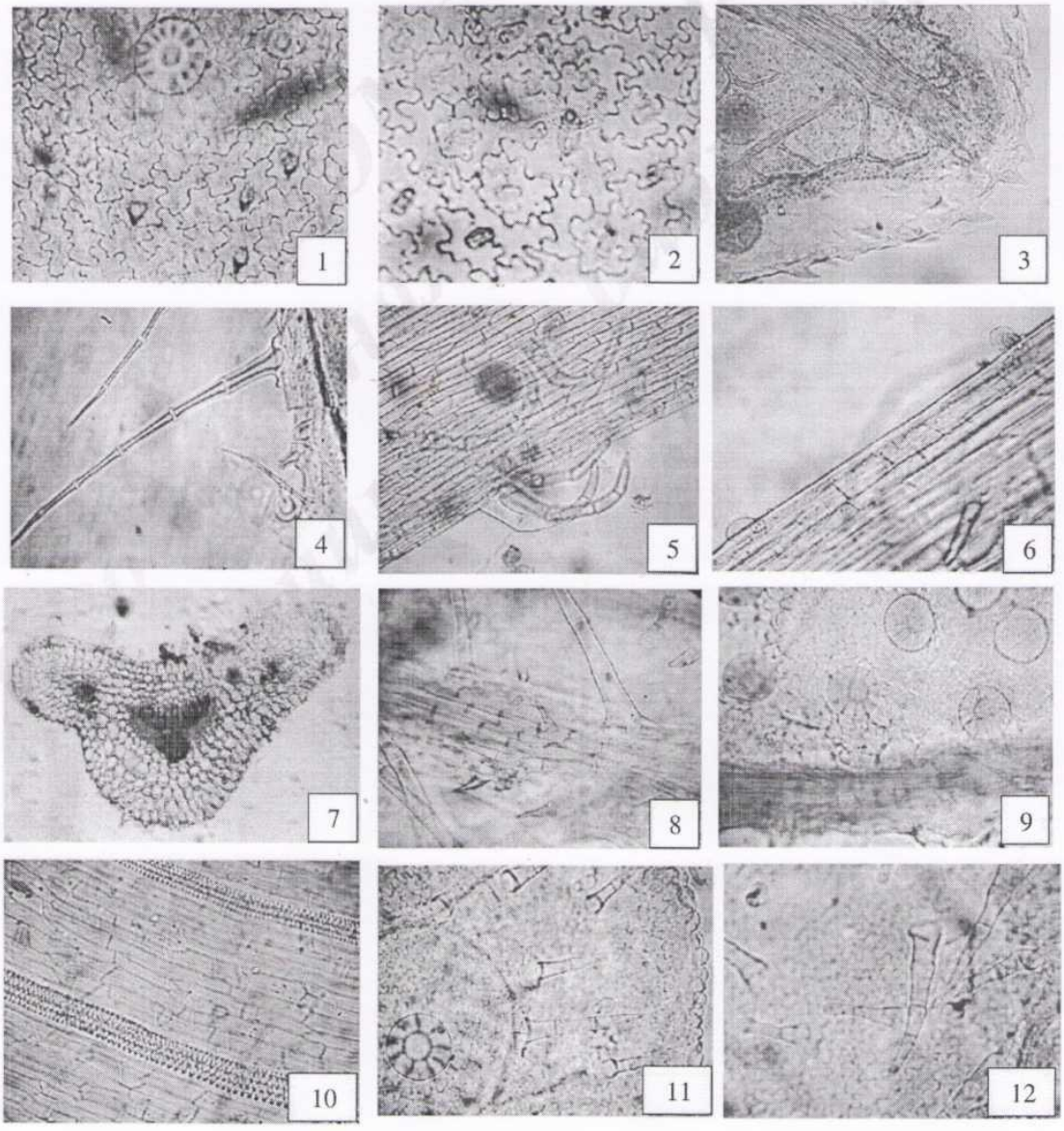


Рисунок – Чабреца трава.
1 – фрагмент верхнего эпидермиса листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 2 – фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатым волоском, устьица диацитного типа (300×), 3 – фрагмент края листа с эфирномасличными железками (вид сверху), с сосочковидными выростами (300×), 4 – фрагмент края листа с многоклеточными бородавчатыми и 3-клеточными волосками (300×), 5 – фрагмент эпидермиса по стеблю с эфирномасличными железками (вид сверху), многоклеточными простыми волосками (300×), 6 – фрагмент эпидермиса по стеблю с головчатыми волосками (300×), 7 – поперечный срез черешка листа (120×), 8 – фрагмент эпидермиса чашечки с многоклеточными простыми и головчатыми волосками, с сосочковидными выростами (300×), 9 – фрагмент эпидермиса чашечки с эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 10 – фрагмент эпидермиса трубки венчика (300×), 11 – фрагмент эпидермиса отгиба венчика с сосочковидными выростами, головчатыми и простыми многоклеточными волосками, эфирномасличными железками (вид сверху) (300×), 12 – фрагмент эпидермиса венчика с простыми многоклеточными и головчатыми волосками на 2-клеточной ножке (300×).

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-О-глюкозида. Около 0,1 г СО лютеолин-7-О-глюкозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют в 85 мл спирта 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение. Сумма флавоноидов» приготовление раствора А), рядом – 5 мкл раствора СО лютеолин-7-О-глюкозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат, помещают в камеру со смесью растворителей (без предварительного насыщения) этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (70:15:15) и хроматографируют восходящим

способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, обрабатывают алюминия хлорида раствором 2 %, сушат и сразу просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме СО лютеолин-7-О-глюкозида должна обнаруживаться желтая зона.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета на уровне зоны адсорбции СО лютеолин-7-О-глюкозида и 3 зоны адсорбции желтого цвета ниже; допускается обнаружение других зон адсорбции (флавоноиды).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 13 %.

Зола общая. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5 %.

Измельченность сырья. *Цельное (обмолоченное) сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Кусочки стеблей толщиной более 0,5 см. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Органическая примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье* – не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное (обмолоченное) сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид – не менее 0,9 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – не менее 18 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %, – не менее 18 %.

Сумма флавоноидов

Алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 %. 5,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 70 % и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на

кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом 70 %. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл алюминия хлорида раствора 5 % в спирте 70 % и через 10 мин – 1 мл уксусной кислоты раствора 3 %, доводят объем раствора тем же спиртом до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин (раствор Б).

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

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\,см}^{1\%} \cdot a \cdot 2{,}5 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения лютеолин-7-О-глюкозид с алюминия хлоридом в спирте 70 % при длине волны 396 нм, равный 345;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых водой, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – вода очищенная.

Определение экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 %, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 1, навеска сырья – 1,0 г, экстрагент – спирт 30 %).

Примечание. Определение суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид проводят в сырье, предназначенном для производства лекарственных растительных препаратов (пачки, фильтр-пакеты); экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 30 % и водой, – в сырье, предназначенном для производства экстрактов.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Федеральная электронная медицинская библиотека

Приложение № 8

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБНУ ВИЛАР
_____ Н.И. Сидельников
«11» февраля 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ГБОУ ВПО КГМУ
Минздрава России, профессор
_____ В.А. Лазаренко
«11» февраля 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ ТРАВЫ ЧАБРЕЦА
(ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО)

Чабрец (тимьян ползучий, Богородская трава) – Thymus serpyllum L., s. l., вечнозеленый, сильно ветвистый, низкий полукустарник семейства Яснотковые (Lamiaceae). Стволики тонкие, древеснеющие, укореняющиеся, заканчиваются лежачими бесплодными побегами. Цветоносные побеги прямостоячие или приподнимающиеся от основания, высотой 2–15 см, опушенные под соцветием длинными отстоящими или полуприжатыми короткими волосками. Листья супротивные, короткочерешковые, эллиптические или удлиненно-эллиптические, по краям от основания до середины длинно-реснитчатые, голые, с малозаметными точечными железками и выдающимися снизу тонкими жилками. Средние стеблевые листья длиной 5–10 мм, шириной 1,5–3,5 мм; верхушечные листья под соцветием ромбически-эллиптические. Соцветия головчатые, компактные. Цветки на коротких цветоносах, с узкоколокольчатой двугубой, обычно окрашенной снизу волосистой чашечкой, длиной около 4 мм. Зубцы верхней губы чашечки треугольные, острые, по краю с рассеянными длинными ресничками; венчик длиной 6–8 мм, розовато-лиловый с длинной толстоватой трубкой. Плод – цинобий. Орешки коротко-эллипсоидальные, гладкие, заключенные в чашечки, темно-бурые, длиной около 0,6 мм.

Цветет в июне – июле. Плоды созревают в августе. Размножается семенами посевом в грунт и вегетативно – с помощью укореняющихся побегов.

Чабрец ползучий встречается в лесных и лесостепных районах Европейской части России, в Закавказье и Западной Сибири. Растет на боровых песках в разреженных сосновых и смешанных лесах, на лесных опушках и полянах, в молодых посадках леса, редко на гранитных и меловых обнажениях. В степных районах более распространены близкие к чабрецу ползучему виды и разновидности, используемые наряду с ним: тимьян Маршалла, тимьян блошиный и др.

Основные заготовки чабреца ведутся в Воронежской и Ростовской областях, Краснодарском и Ставропольском краях.

В качестве сырья используют смесь цветков и листьев, получаемую после обмолота срезанных надземных цветущих побегов чабреца. Сырье заготавливают в фазе цветения растения (в мае-июле в зависимости от

района), срезая ножами или серпами верхние части облиственных побегов без грубых одревесневших оснований стеблей. Не следует выдергивать растение с корнями, так как это ведет к уничтожению его зарослей.

Сушат сырье чабреца на открытом воздухе в тени, на чердаках или под навесами, разложив его тонким слоем (толщиной 5–7 см) и периодически перемешивая. В хорошую погоду сырье высыхает за 3–5 дней. Сушку прекращают, когда листья и цветки чабреца при ворошении начинают легко осыпаться. Затем сырье обмолачивают и отделяют грубые стебли на решетах и веялках. Выход сухого сырья составляет 32–34% от массы свежесобранного. Допускается искусственная сушка при температуре 35–40^0 С.

Согласно требованиям ГФ XI издания, сырье чабреца состоит из цельных и частично измельченных тонких стеблей, листьев и цветков. Стебли четырехгранные, тонкие (до 0,5 см), зеленовато- или желто-коричневого цвета, иногда с фиолетовым оттенком. Листья короткочерешковые, ланцетные, эллиптические или продолговато-эллиптические, длиной до 15 мм, голые или слабоопушенные с резко выступающими жилками на нижней стороне листа. По всей поверхности листа видны многочисленные желтовато-коричневые точки (эфиромасличные железки), у основания листьев часто видны длинные щетинистые волоски.

Цветки мелкие, одиночные или собранные по нескольку штук в полумутовки. Каждый цветок состоит из двугубой чашечки и двугубого венчика. Чашечка длиной около 4 мм, венчик длиной 5–8 мм, тычинок – 4, пестик с четырехраздельной верхней завязью.

Цвет листьев – зеленый или серовато-зеленый; чашечки – красновато-коричневый; венчика – синевато-фиолетовый. Запах ароматный, вкус водного извлечения горьковато-пряный.

Числовые показатели: Суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,9 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 18 %; потеря в массе при высушивании не более 13 %; золы общей не более 12 %; золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной разведенной 10 %, не более 5 %; кусочков стеблей, толщиной более 0,5 см не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм не более 10 %; органической примеси не более 1 %; минеральной примеси не более 1 %.

Не допускается наличие в сырье ядовитых растений и их частей, помета грызунов и птиц, плесени и гнили, а также устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании.

Готовое сырье упаковывают в тюки из ткани не более 50 кг нетто или в мешки тканевые или льно-джуто-кенафные не более 20 кг нетто.

Хранят на стеллажах, в сухом, защищенном от света месте в соответствии с требованием ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Срок годности сырья 2 года.

Траву чабреца используют в качестве отхаркивающего, противомикробного и анальгетического средства. Жидкий экстракт входит в состав препаратов: «Пертуссин», «Бронхипрет», применяемые как отхаркивающее и противокашлевое средства, а также препарата «Пассифит», используемого в качестве седативного средства.

Литература:

1. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций). – М.: Медицина, 1985. – С. 270–272.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. / МЗ СССР, – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.

Инструкцию составили:
Зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники
ГБОУ ВПО КГМУ, д.ф.н., профессор В.Н. Бубенчикова

Доцент кафедры общей и фармацевтической
химии Орловского государственного
университета Медицинского института Ю.А. Старчак