

НАО «Казахский Национальный Медицинский Университет  
Имени С.Д. Асфендиярова»

УДК 615.451.16:582.796

На правах рукописи

**КАДЫРБАЕВА ГУЛЬНАРА МУХАМЕТОВНА**

**Фармакогностическое изучение видов рода *Allium* флоры Казахстана  
и перспективы их использования**

6D110400 - Фармация

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научные консультанты  
д.фарм.н., профессор Сакипова З.Б.,  
Зарубежные консультанты  
д.фарм.н., профессор Кисличенко В.С.  
PhD, Associate Prof. Wirginia Kukula-Koch

Республика Казахстан  
Алматы, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....</b>	4
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	6
<b>1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ РАСТЕНИЙ РОДА ALLIUM.....</b>	10
1.1 Систематическое положение и географическое распространение растений рода <i>Allium</i> .....	10
1.2 Химический состав растений рода <i>Allium</i> .....	14
1.3 Фармакологическое действие растений рода <i>Allium</i> и применение в современной медицине.....	23
Выводы к первой главе.....	33
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	35
2.1 Объекты исследования.....	35
2.2 Методы исследования.....	36
<b>3 МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ЛУКА ТУРКЕСТАНСКОГО (<i>ALLIUM TURKESTANICUM</i>) И ЛУКА МОЛОЧНОЦВЕТНОГО (<i>ALLIUM GALANTHUM</i>).....</b>	46
3.1 Сравнительное макроскопическое исследование сырья <i>Allium turkestanicum</i> и <i>Allium galanthum</i> .....	46
3.2 Сравнительное микроскопическое исследование сырья лука туркестанского и лука молочнокветного.....	50
3.3 Выводы к третьей главе.....	58
<b>4 ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ЛУКА ТУРКЕСТАНСКОГО (<i>ALLIUM TURKESTANICUM</i>) И ЛУКА МОЛОЧНОЦВЕТНОГО (<i>ALLIUM GALANTHUM</i>).....</b>	59
4.1 Идентификация основных групп БАВ сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	59
4.2 Фармацевтико-технологические параметры сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	77
4.3 Стандартизация сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	78
4.4 Изучение стабильности и установление сроков хранения сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	82
Выводы к четвертой главе .....	84
<b>5 СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ <i>A.TURKESTANICUM</i>, <i>A.GALANTHUM</i> .....</b>	86
5.1 Разработка оптимальной технологии получения экстрактов на основе сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	86

5.2	Высокоэффективная жидкостная хроматография этанольных экстрактов <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	90
5.3	Валидация технологического процесса производства экстрактов лука молочнокветного и лука туркестанского.....	94
5.4	Разработка критериев стандартизации экстрактов сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	109
5.5	Исследование стабильности и установление сроков хранения экстрактов сырья <i>A.turkestanicum</i> и <i>A.galanthum</i> .....	111
5.6	Изучение безопасности и скрининг биологической активности экстрактов.....	113
	Выводы к пятой главе.....	133
	<b>ВЫВОДЫ</b> .....	134
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	136
	<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	152

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.1-2003	Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления
ГОСТ 7732-2017	Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления
ГОСТ Р 7.0.12-2011	Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов и словосочетаний на русском языке. Общие требования и правила
ГОСТ 8.417-2002	Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин.
ГОСТ 34151-2017	Продукты пищевые. Определение витамина С с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии
ГОСТ 2226-2013	Мешки из бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АТХ	Анатомо-терапевтическо-химическая классификация
АФК	Активная форма кислорода
БАВ	Биологически активное вещество
БАД	Биологически активная добавка
ВЭЖХ-МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия
ВЭЖХ-УФ-МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием масс-спектрометрией
ГФ	Государственная фармакопея
ГХ-МС	Газовая хроматография масс спектрометрия
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
ЛРС	Лекарственное растительное сырье
ЛС	Лекарственное средство
НИИ	Научно-исследовательский институт
НИИ ПФМ	Научно-исследовательский институт прикладной и фундаментальной медицины
РГП на ПХВ	Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
РК	Республика Казахстан
РФ	Российская Федерация
США	Соединенные Штаты Америки
ТОО	Товарищество с ограниченной ответственностью
ФС	Фармакопейная статья
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
АВТС	2,2 азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)
DRPH	2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
EMBL	Европейская молекулярно-биологическая лаборатория
ГАСР	Надлежащая практика выращивания и сбора исходного сырья растительного происхождения
LF	Фактор слезотечения

## ВВЕДЕНИЕ

**Общая характеристика работы.** Диссертация посвящена комплексному фармакогностическому исследованию и стандартизации лекарственного растительного сырья лука молочнокветного (*Allium galanthum*) и лука туркестанского (*Allium turkestanicum*), и перспективам их использования в медицине и фармации.

**Актуальность темы исследования.** В рамках реализации Национального проекта «Здоровая нация» на 2021-2025 годы, основной задачей отечественной фармацевтической промышленности является импортозамещение, которое заключается в разработке и создании отечественных лекарственных средств полного цикла производства в стране и доведение доли отечественной фармацевтической продукции с 17 % до 50%.

В рамках реализации Комплексного плана развития фармацевтической промышленности на 2020-2025 годы вопрос организации производства лекарственных препаратов с использованием лекарственных растений, произрастающих на территории Республики Казахстан, получил статус государственного приоритета [1-3].

Поиск перспективных лекарственных растений как источников биологически активных веществ и разработка растительных фармацевтических субстанций на их основе является актуальным.

В этом отношении особый интерес представляют растения рода *Allium*, произрастающие на территории Республики Казахстан, являющиеся ценными источниками биологически активных веществ, многие виды которого издавна применяются в народной медицине в качестве мочегонных, кровоостанавливающих, противовоспалительных, бактерицидных средств. Исходя из вышеизложенного фармакогностическое изучение некоторых растений рода *Allium* флоры Казахстана и исследование фармакологической активности является перспективным.

**Цель исследования:** фармакогностическое изучение лука молочнокветного (*Allium galanthum*), лука туркестанского (*Allium turkestanicum*) и перспективы создания на их основе растительных фармацевтических субстанций.

**Задачи исследования:**

Установить диагностические морфолого-анатомические признаки ЛРС лука молочнокветного и лука туркестанского;

Провести комплексное фитохимическое изучение ЛРС лука молочнокветного (*Allium galanthum*) и лука туркестанского (*Allium turkestanicum*) и установить основные группы биологически активных соединений;

Провести стандартизацию сырья лука молочнокветного и лука туркестанского в соответствии с фармакопейными требованиями;

Разработать оптимальную технологию получения экстрактов на основе лука молочнокветного и лука туркестанского, провести стандартизацию и изучить стабильность полученных экстрактов.

Изучить токсические свойства и профиль биологической активности полученных экстрактов.

**Объекты исследования:** листья и луковицы лука молочнокветного (*Allium galanthum*), луковицы лука туркестанского (*Allium turkestanicum*) и экстракты на их основе.

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

**Научная новизна:**

Впервые:

- определены диагностические морфолого-анатомические признаки ЛРС *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* в результате сравнительного морфолого-анатомического исследования, позволяющие проводить идентификацию исследуемых видов;

- проведено сравнительное фитохимическое изучение лука молочнокветного и лука туркестанского с помощью современных физико-химических методов (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС); данные исследования позволили установить наличие продуктов первичного и вторичного обмена, элементного состава для идентификации. В анализах ВЭЖХ-ESI-QTOF-MS/MS обнаружено до 17 основных компонентов, из которых идентифицировано 15 соединений, относящихся к различным классам БАВ: простые органические кислоты, флавоноиды и их гликозиды. Установлено, что растительное сырье *Allium galanthum*, *Allium turkestanicum* характеризуются вариабельностью флавоноидных соединений. Общими для исследуемого рода являются тринадцать флавоноидов их гликозидов. Идентифицированные вещества являются химическими маркерами исследуемых растений и использованы при стандартизации. Экстракты диэтилового эфира, проанализированы с использованием GC-MS и идентифицированы 25, 22 и 17 летучих соединений в листьях и луковицах *A. galanthum* и луковицах *A. turkestanicum* соответственно.

- проведены скрининговые фармакологические исследования изучаемых растений рода *Allium*. Установлено, что все изученные виды обладают низкой токсичностью и определенным уровнем биологической активности: антимикробной, антиоксидантной, тирозиназной и являются перспективными для внедрения в медицинскую практику, в качестве источников сырья: листья и луковицы *Allium galanthum* и луковицы *Allium turkestanicum*.

Приоритет проведенных исследований защищен патентом РК на полезную модель: «Способ получения экстракта с антимикробным и антиоксидантным активностями из растения *Allium galanthum*» (патент № 7156) (Приложение А).

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

- Результаты комплексного фармакогностического исследования ЛРС лука молочнокветного (*Allium galanthum*) и лука туркестанского (*Allium turkestanicum*): фитохимического, морфолого-анатомического, испытаний для разработки подходов к стандартизации;

- Результаты экспериментального обоснования разработки оптимальной технологии получения растительных фармацевтических субстанций на основе ЛРС лука молочнокветного и лука туркестанского с противомикробной, антиоксидантной активностью и ингибирования тирозиназы.

**Практическая значимость исследования.** Технология сбора, заготовки и хранения луковиц и листьев *Allium galanthum* и луковиц *Allium turkestanicum* внедрена ТОО «ФитОлеум», г. Есик, Казахстан (Акт внедрения №1) (Приложение Б).

Разработаны спецификация качества луковиц и листьев *Allium galanthum* и луковиц *Allium turkestanicum*, на основании которых разработан проект нормативной документации на новые виды лекарственного растительного сырья: «Листья лука молочнокветного», «Луковицы лука молочнокветного», «Луковицы лука туркестанского».

Разработана технология производственного процесса опытно-промышленных серий экстрактов из лекарственного растительного сырья листьев и луковиц лука молочнокветного и лука туркестанского на фармацевтическом предприятии ТОО «ФитОлеум» (акт опытно-промышленной апробации) (Приложение В).

Разработана технология культивирования изучаемых растений в соответствии с принципами стандарта GACP «Good Agricultural and Collection Practice for starting materials of herbal origin» (Надлежащая практика выращивания и сбора исходного сырья растительного происхождения) (акт внедрения №3) (Приложение Г).

Результаты, полученные в ходе проведения диссертационного исследования, применяются в научно-учебном процессе Люблинского медицинского университета (департамент фармакогнозии) и кафедрах Школы фармации Казахского национального медицинского университета (акты внедрения) (Приложение Д).

Обосновано применение новых видов лекарственного растительного сырья «Листья лука молочнокветного», «Луковицы лука молочнокветного», «Луковицы лука туркестанского в медицинскую практику в качестве антимикробных, антиоксидантных средств.

**Личный вклад автора.** Все результаты диссертационного исследования получены автором самостоятельно, что свидетельствуют о личном вкладе соискателя в науку в области фармации.

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

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы доложены и опубликованы в материалах международных конференций:



Международной научно-практической конференции «Современные методы коррекции угревой болезни и других проблем кожи в косметологической практике» (г. Харьков, Украина, 2018 г.); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2018 г.); VII научно-практической конференции с международным участием «Приоритеты фармации и стоматологии – от теории к практике» (г. Алматы, Казахстан, 2018г.); IV Международной научно-практической конференции «Глобальная наука и инновация 2019: Центральная Азия» (г. Астана, Казахстан, 2019 г.); XIV международной научно-практической конференции «Годы развития села, туризма и народных ремесел(2019-2021)» (г. Душанбе, Таджикистан, 2019 г.); VIII международной научно-практической конференции «Приоритеты фармации и стоматологии – от теории к практике» (г. Алматы, Казахстан, 2019 г.); Международной конференции «Современная наука. Управление и стандарты научных исследований» (Прага, Чехия, 2020 г.).

**Сведения о публикациях.** По результатам исследований опубликованы четырнадцать научных работ, в том числе: статья в международном рецензируемом научном журнале, входящем в базу данных Scopus и Web of Science Core Collection – 1 (Приложение E); статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК - 4; тезисы и статьи на международных научно-практических конференциях (Россия, Украина, Чехия, Таджикистан, Казахстан) - 7; статьи в международных журналах (Россия) - 1; патенты на полезную модель - 1.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 151 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 37 таблиц, 80 рисунков, список литературы, включающий 212 источников, а также 20 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвященного материалам и методам исследования, трех разделов собственных исследований, выводов и заключения.

# 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ РАСТЕНИЙ РОДА *ALLIUM*

## 1.1 Систематическое положение и географическое распространение растений рода *Allium*

Род *Allium* L. согласно данным онлайн определителя растений России и сопредельных стран «Плантариум» насчитывает 877 видов и в мире более 900 видов (Seregin et al., 2015), что делает его одним из крупнейших родов однодольных [4]. Род *Allium* L. принадлежит к семейству Alliaceae, порядок Amaryllidales, класс Liliopsida и отдел Magnoliophyta. Представители рода луков известны за их специфический и обычно интенсивный запах и вкус и характеризуется наличием луковиц, обернутых в перепончатые, иногда волокнистые оболочки, луковицы имеют часто короткие корневище; листья с более или менее длинными цельными влагалищами, скрученными при основании стебля или раставленными по стебли: линейные, ланцетные или ремневидные, полые, дудчатые; соцветие – верхушечный зонтик, до распускания покрытый перепончатым чехлом, который затем раскалывается обычно на две доли [5].

Для удобства классификации такое большое количество видов рода *Allium* L. разделены на более мелкие подроды или секции. Это также теоретически оправдано, поскольку род состоит из групп, различающихся филогенетической историей, географическим родством, эволюционным состоянием и возрастом.

Первоначальные классификации рода луков основывались только на описаниях некоторых морфологических признаков таксонов луков. В последнее время некоторые неоднозначные подроды и разделы были пересмотрены в зависимости от их морфологических характеристик, молекулярно-генетических исследований, биогеографического распределения и эволюционной истории. Более поздняя классификация была предложена Hanelt et al. (1992), включающая шесть подродов, 57 разделов и подразделов. Авторы в данной схеме для систематики рода объединили признаки из более ранних классификаций и достижения современных молекулярных исследований [6 - 10].

Согласно литературным данным, современная систематика рода *Allium* предложена авторами Friesen и другими (2006), где виды луков разделены на 15 подродов и 72 секции и представлена в виде 3 эволюционных линий по результатам молекулярно-генетических исследований [11]:

- 1) Первая линия состоит из 139 видов, 12 секций и 3 подродов:
  - *Amerallium* Traub - 135 видов, 10 секций;
  - *Nectaroscordum* (Lindl.) - 3 вида, 1 секция;
  - *Microscordum* (Maxim.) - 1 вид, 1 секция.
- 2) Вторая линия включает 5 подродов, 19 секций и 157 видов
  - *Caloscordum* (Herb.) - 3 вида, 1 секция;
  - *Anguinum* (G. Don ex W. D. J. Koch) - 12 видов, 1 секция;
  - *Porphyroprason* (Ekberg) - 1 вид, 1 секция;
  - *Vvedenskya* (Kamelin) - 1 вид, 1 секция;

- *Melanocrommyum* (Webb et Berth.) - 140 видов, 15 секций.
- 3) Третья линия состоит около 500 видов, 39 секций и 7 подродов:
  - *Butomissa* (Salisb.) - 4 вида, 2 секции;
  - *Cyathophora* (R.M. Fritsch) - 5 видов, 3 секции;
  - *Rhizirideum* (G. Don ex W.D.J. Koch) - 37 видов, 5 секций;
  - *Allium* - 300 видов, 15 секций;
  - *Reticulobulbosa* (Kamelin) - 80 видов, 5 секций;
  - *Polyprason Radić* - 50 видов, 4 секции;
  - *Sera* (Mill.) Radić - 30 видов 5 секций.

Растения рода *Allium* широко распространены во флоре Казахстана и на сегодняшний день насчитывается около 140 видов, 45 из которых являются эндемиками [12]. Несмотря на богатую разнообразность таксона, виды луков флоры Казахстана мало изучены и требует дальнейших исследований. В Алматинской области по данным флоры Казахстана произрастает около 80 видов луков, однако данные по исследованиям (фитохимические, макро и микроскопические, фармакологические и т.д.) найдены в базах научных публикаций только по 35 видам, сведения по статусу включены согласно изучению Гемеджиевой Н.Г. (таблица 1).

Таблица 1 – Данные по изучению видов рода *Allium*

№	Вид <i>Allium</i>	Статус	Область изучения и ссылки
1	2	3	4
1.	<i>A. lineare</i> L. Л. линейный	Медоносный, пищевой декоративный,	Фитохимический анализ [13]
2.	<i>A. strictum</i> Л. торчащий	Декоративный	Химический состав ресурсоведческий [14,15]
3.	<i>A. barszewskii</i> Л. Барщевского	Декоративный	Микроскопический анализ [16]
4.	<i>A. dolichostylum</i> Л. длинностолбиковый	Декоративный	Микроскопический анализ [16 с. 61]
5.	<i>A. rubens</i> Л. красноватый	Декоративный	Филогенетический анализ [17]
6.	<i>A. caespitosum</i> Л. Дернистый	Редкий	Филогенетический анализ [17 с. 394]
7.	<i>A. caesium</i> Schrenk Л. сине-голубой	Декоративный, пищевой, Медоносный	Фитохимический анализ [17 с. 374]
8.	<i>A. obliquum</i> Л. косой	Редкий	Противогрибковая активность [18, 19], фитохимический анализ [20,21]
9.	<i>A. platyspathum</i> Л. широкочехольный	Декоративный	Макроскопический и микроскопический анализ [22]
10.	<i>A. plurifoliatum</i> Л. многолиственный	Редкий, кормовой	Интродукционное изучение [23]
11.	<i>A. fistulosum</i> L. Л. татарка	Пищевой	Фитохимические исследования [24]
12.	<i>A. pskemense</i> Л. пскемский	Эндемичный, редкий лекарственный, декоративный, пищевой	Фитохимические и фармакологические исследования [25]
13.	<i>A. kaschianum</i> Л. кашский	Декоративный	Филогенетический анализ [26]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
14.	<i>A. vvedenskyanum</i> Л. Введенского	Эндемичный	Филогенетический анализ [26 с. 720]
15.	<i>A. scrobiculatum</i> V. Л. ямчатый	Эндемичный	Таксономические исследования [27]
16.	<i>A. parvulum</i> Vved. Л. мелкоцветный	Эндемичный	Таксономические исследования [27 с. 67]
17.	<i>A. lehmannianum</i> Merckl. Л. Леманна	Эндемичный	Таксономические исследования [27 с. 68]
18.	<i>A. lasiophyllum</i> V. Л. мохнатолистный	Эндемичный	Географическое распространение [28]
19.	<i>A. Alberti</i> Rgl. Л. Альберта	Декоративный	Географическое распространение [28 с. 3]
20.	<i>A. turkestanicum</i> Rgl. Л. туркестанский	Пищевой	Географическое распространение [28 с. 7]
21.	<i>A. Valentinae</i> N.Pavl. Л. Валентины	Эндемичный	Географическое распространение [28 с. 6]
22.	<i>A. pallasii</i> Murr. Л. Палласа	Декоративный	Систематический анализ [29]
23.	<i>A. caeruleum</i> Pall. Л. голубой	Декоративный, пищевой	Фитохимическое изучение [30]
24.	<i>A. schoenoprasoides</i> Rgl. Л. скородовидный	Лекарственный, декоративный	Филогенетический анализ [31]
25.	<i>A. sabulosum</i> Stev. Л. песчаный		Систематический анализ [32]
26.	<i>A. decipiens</i> Fisch. Л. обманывающий		Систематический анализ [32 с. 3]
27.	<i>A. longicuspis</i> Rgl. Л. длинноостый	Лекарственный, пищевой	Филогенетический анализ Антимикробная активность [33-35]
28.	<i>A. oreophilum</i> Л. горолюбивый	Декоративный, медоносный	Культивирование [36, 37]
29.	<i>A. karataviense</i> Rgl. Л. Каратавский	Эндемичный, лекарственный, медоносный, ядовитый	Фитохимический анализ Культивирование Микроскопический анализ [38 - 40]
30.	<i>A. fetisowii</i> Rgl. Л. Фетисова	Декоративный	Филогенетический анализ [41]
31.	<i>A. robustum</i> Kar. Et Kir Л. коренатый	Эндемичный, декоративный	Культивирование [42]
32.	<i>A. galanthum</i> Л. молочноцветный	Пищевой	Биохимический анализ [43]
33.	<i>A. altissimum</i> Rgl. Л. высочайший	Лекарственный, декоративный, пищевой, технический	Биохимический анализ, фармакологическая активность [44]
34.	<i>A. schubertii</i> Zucc. Л. Шуберта	Декоративный, Технический	Фитохимический анализ [45]
35.	<i>A. caspium</i> Pall. Л. каспийский	Редкий	In vitro культивирование [46]

Обзор литературных данных показал, что основной областью изучения 35 видов растений рода *Allium* являлись филогенетические, ресурсоведческие и таксономические исследования, фитохимический состав и фармакологическая

активность изучены у менее 10 видов. Лук молочноцветный и лук туркестанский относятся к пищевым лукам, что дает возможность применять их и в качестве нутрицевтических препаратов, другие данные по исследованию изучаемых объектов не найдены, что подтверждает актуальность нашего исследования.

Изучаемые нами объекты *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* согласно систематике Friesen относятся:

- *Allium galanthum* ко второй эволюционной линии, подрод и секция *Sera* (по традиционной классификации подрод *Rhizirideum*). Регистрационный номер в справочнике Таксономической коллекции *Allium* IPK (Gaterslaben, Германия) 1729. EMBL AJ411905 [11 с. 377].

- *Allium turkestanicum* ко второй эволюционной линии, подрод *Allium*, секция *Medasia*. Регистрационный номер в справочнике Таксономической коллекции *Allium* IPK (Gaterslaben, Германия) 5049. EMBL AJ412718 [11 с. 374].

Род *Allium* широко распространен по всемуNearктическому и Палеарктическому региону. Зона его произрастания охватывает площадь от бореальной зоны до сухих участков субтропиков [47]. Виды, принадлежащие к этому роду, встречаются в основном в сухих регионах Северного полушария, его представители растут в Азии, Северной Америке, Южной Африке и Европе. Однако именно Центральная Азия является наиболее распространенным ареалом у различных видов, относящихся к роду *Allium* и главным центром их распространения [48].

*Allium galanthum* Kar. et Kir. – лук молочноцветный, многолетнее растение высотой 30-70 см, летний геофит (рисунок 1).



Рисунок 1 – Лук молочноцветный (*Allium galanthum* Kar. et Kir.)

Изучение онтоморфогенеза *A. galanthum* было проведено такими учеными как Байтулин И.О., Нурушевой А.М. и Лысенко А.В., в Шу-Илийских горах путем сбора разновозрастных растений.

*Allium turkestanicum* Reg. – лук туркестанский, многолетнее растение (рисунок 2).



Рисунок 2 – Лук туркестанский (*Allium turkestanicum* Reg)

Ареал распространения лука молочнокветного: Западная Сибирь, (по р. Иртышу), Средняя Азия и Казахстан (Зайсанская котловина, центральный Казахский мелкосопочник, Бетпак-дала, Тарбагатай, Джунгарский Алатау, Северный и Центральный Тянь-Шань, Шу-Илийские горы). Лук туркестанский встречается в Кызылординском регионе, Бетпакдале, Прибалхашье, Туркестане, в Джунгарском и Заилийском Алатау, в Чу-Илийских горах, Каратау, в Западном Тянь-Шане [49,50] (рисунок 3).



Рисунок 3 – Ареал распространения лука молочнокветного (красный знак) и лука туркестанского (зеленый знак)

## 1.2 Химический состав растений рода *Allium*

Фармакологические свойства растений рода *Allium* и их химические составляющие вызвали интерес научного сообщества с давних времен.

Результаты поиска литературных данных в международных баз данных PubMed, Science Direct, Google Scholar, Cochrane Library показывают, что более изученными видами являются чеснок (*Allium sativum*) и лук (*Allium cepa*). На протяжении тысячелетий *Allium sativum* и *Allium cepa* используются в народной медицине и являются одними из древнейших из всех культурных растений. Доминирующими группами биологически активных веществ растений рода *Allium* являются тиосульфиды и флавоноиды, благодаря которому виды лука обладают высокой антимикробной и антиоксидантной активностью [51, 52].

Тиосульфиды являются наиболее изученными соединениями, а история изучения серосодержащих соединений в растениях рода *Allium* начинается с 1844 года из исследований немецкого химика Теодора Вертхайма. Все, что известно об этом материале, ограничивается скудными фактами, что он выделил из чеснока путем паровой дистилляции небольшое количество эфирного масла. Другой немецкий исследователь в 1892 году Ф.В. Земмлер путем паровой дистилляции выделил сильно пахнущее масло из чеснока, диаллилдиисульфид с химической формулой  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ . Ключевое открытие в химии чеснока и лука было сделано в 1944 году Честером Дж. Кавалито и его коллегами. Они применили в качестве экстрагента этиловый спирт и установили, что паровая дистилляция и экстракция этанолом дают довольно разные вещества. В итоге авторами получено масло, оксиддиаллилсульфид  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{S}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ , в последствии это соединение получило название аллицин. Аллицин химически нестабильная бесцветная жидкость, с характерным запахом чеснока. Аллицин запатентован двумя американскими патентами, но его клиническое применение в качестве антибактериального средства было прекращено из-за сильного запаха соединения. [53,54].

В 1948 году швейцарские химики Артур Столл и Эвальд Сибек при исследованиях обнаружили, что аллицин образуется из аллиина (аллилсульфид цистеинсульфоксида) с химической формулой  $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , находящегося в цитозоле клетки растений. Согласно литературным данным, аллиин составляет (65 – 75) % всех серосодержащих соединений. Однако он нестабилен и под влиянием фермента аллиназы, находящихся в вакуолях, уже через несколько минут при измельчении чеснока подвергается расщеплению на аллицин, пировиноградную кислоту и аммиак. Аллицин, ферментативно высвобождаемый из своего предшественника аллиина при измельчении чеснока, является нестабильным. Он легко разлагается посредством 2-пропенсульфеновой кислоты (3) и тиоакролеина (5) до диаллилдиисульфида (4) и гомологичных полисульфидов (полисульфононов), винил 1,2- и 1,3-дитионов (6 и 7 соответственно) и аджоена (8) (рисунок 4) [55, 56].

Артур Столл и Эвальд Сибек назвали предшественника аллицина аллиином. Аллиин получили этанольной экстракцией при мягких условиях. Последующая кристаллизация дало чрезвычайно тонкие, бесцветные иглы без запаха. Это было первое обнаруженное природное вещество, обладающей оптической изомерией.

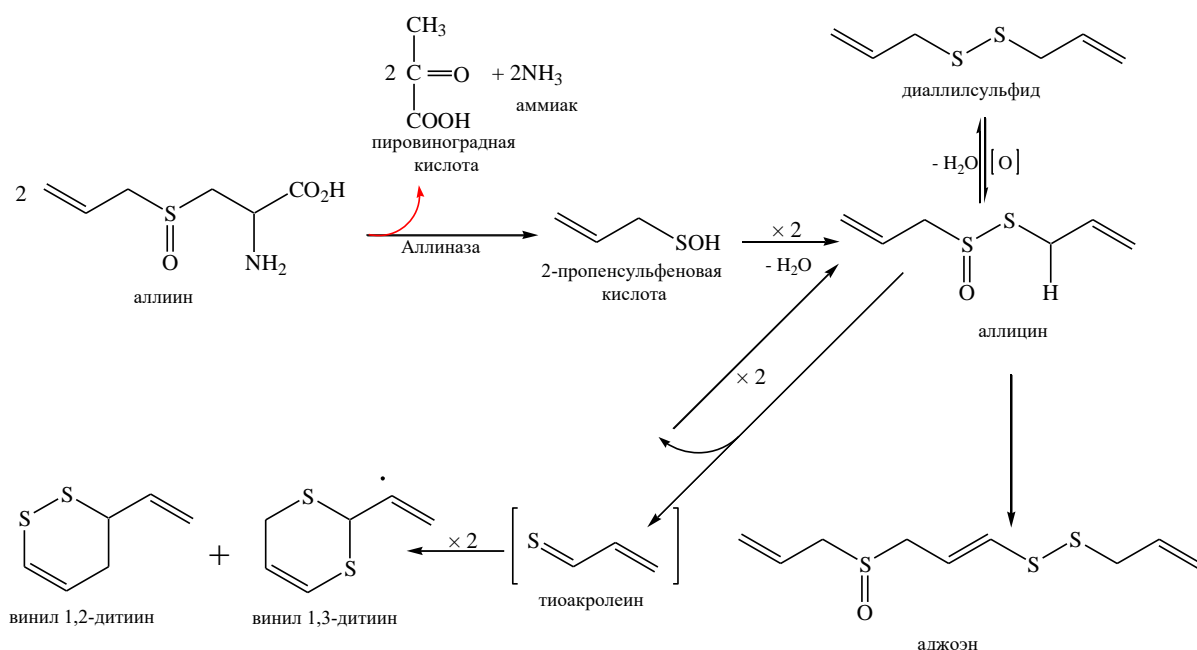


Рисунок 4 – Схема ферментативного распада аллиина

В 1961 году финским биохимиком Артуру Виртаненом был выделен изомер аллиина из лука, с соответствующей формулой (+)S-(1-пропенил)-L-цистеинсульфоксид. То есть, его химическое содержание идентично содержанию аллиина чеснока, отличается только его структурой. В частности, он отличается положением, двойной связи, которая указывает цифра 1 в его названии, присоединена непосредственно к сере. Транс- (+)S-(1-пропенил)-L-цистеинсульфоксид является предшественником слезотечения. Фермент аллииназа лука превращает его в фактор слезотечения LF (Lachrymatory factor), химическая формула LF – C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>SO.

Таким образом, в чесноке фермент аллииназа превращает аллиин в аллицин, пахучий компонент чеснока, в луке аллиин под действием фермента аллииназы превращается в фактор слезотечения.

С момента открытия Каваллитом и Артуру Виртаненом действующего вещества чеснока и лука – аллиин стал предметом обширных исследований. Результаты исследования показывают, что эфирное масло растений рода *Allium* содержат огромное количество соединений серы.

С помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) ученые Yu T.H. и др. [57] идентифицировали 28 соединений, из которых 13 являются новыми для летучих веществ чеснока (рисунок 5). Основные соединения эфирного масла чеснока они разделили на серосодержащие и кислородсодержащие соединения. Серосодержащие соединения дополнительно классифицировали на три основные группы, содержащие одну, две и три атома серы.



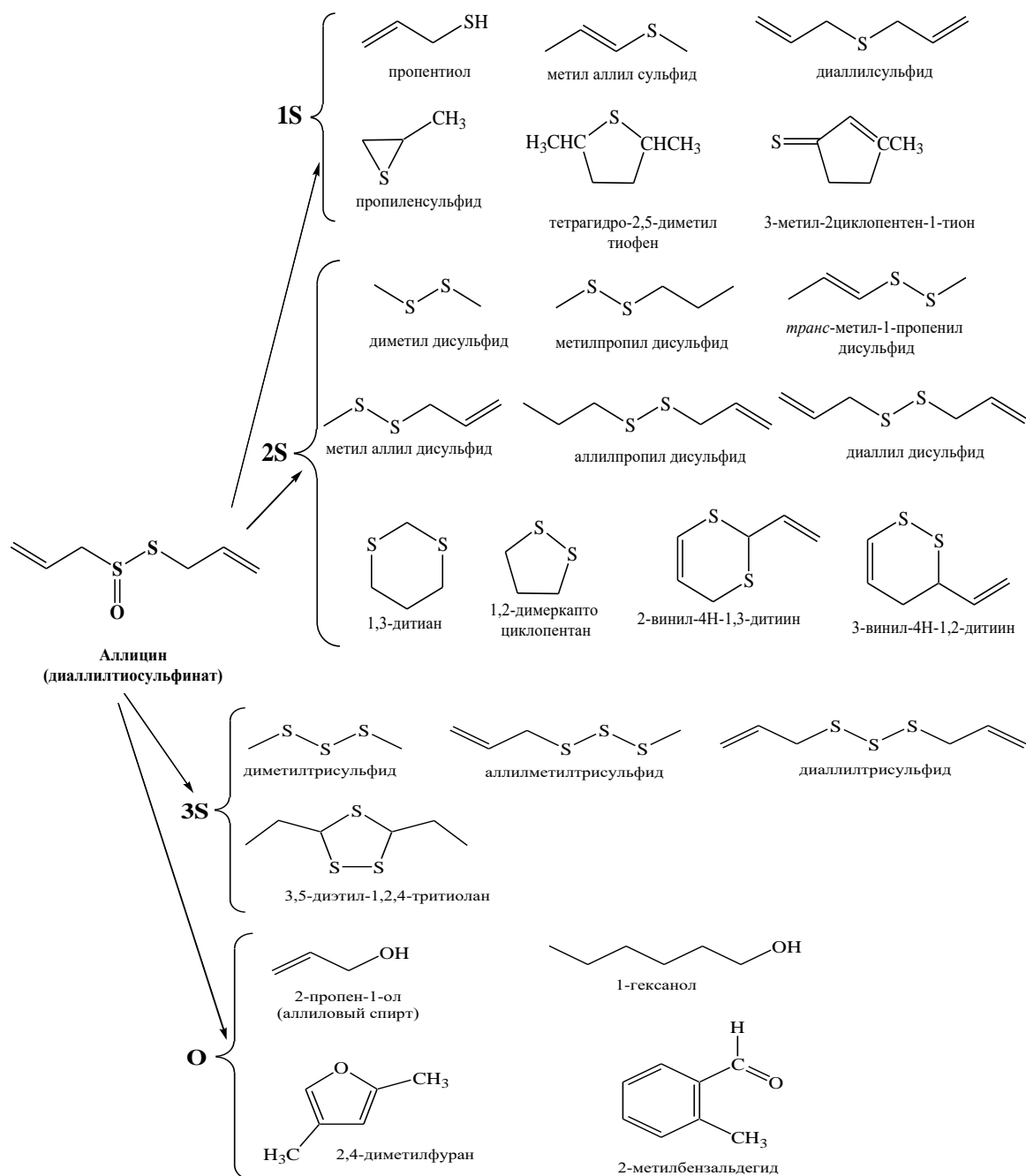


Рисунок 5 – Классификация серосодержащих соединений

Автором Ella P. Jarvenpää и другими [58] была использована твердофазная микроэкстракция (SPME) для выделения летучих веществ желтого лука (*Allium serotinum* L.) и идентифицировано 20 серосодержащих соединений. Используемая система SPME-GC-MS позволяла им легко отслеживать быстрые изменения летучего состава через определенные промежутки времени. Обнаружено, что после нарезки лука наиболее распространенным соединением был S-оксид тиопропаналя (фактор слезотечения LF) или его таутомеры, а также небольшое количество дисульфидов дипроп(ен)ила.

Для экстрагирования эфирного масла из луковиц белого лука (*Allium cepa* L.) ученый Eman Ahmed El-Wakil и его коллеги [59] использовали метод гидродистилляции и идентифицировали 40 соединений методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Основным соединением в эфирном масле был додекан (28.69 %), остальные соединения (65.20 %) представлены углеводородами, алкалоидами и сероорганическими соединениями. Результаты исследования показывают, что бутанольная фракция имеет высокое общее содержание фенолов ( $41.05 \pm 0.34$ ) мг (экв. галловой кислоты/г экв.) и флавоноидов, и обладает высокой антиоксидантной активностью в анализе DPPH.

Кроме низкомолекулярных летучих соединений таких, как тиосульфиды растения рода *Allium*, характеризуются наличием соединений фенольного и стероидного происхождения, часто гликозилированными, проявляющими интересные фармакологические свойства. Эти последние соединения, по сравнению с ранее изученными тиосульфидными, обладают преимуществами, заключающимися в том, что они не имеют резкого запаха и более устойчивы. Основные полифенольные соединения растений рода лук включают флавоноиды, фенольные кислоты и лигнаны [60].

Флавоноиды являются самым большим классом полифенолов в растениях рода *Allium*, за которыми следуют фенольные кислоты, в то время как лигнаны являются второстепенным классом полифенолов. Флавоноиды имеют характерный 15-углеродный (C6-C3-C6) скелет, который состоит из двух фенильных колец (А и В) и гетероциклического кольца (С) [61,62].

Они подразделяются на различные подклассы (флавонолы, флаванолы, флаваноны, флавоны, антоцианы и изофлавоны) в зависимости от степени ненасыщенности и окисления С-кольца. Среди различных подклассов дальнейшее разделение основано на количестве и характере групп-заместителей, присоединенных к их гетероциклическим кольцам. Флавонолы и антоцианы являются основными подклассами флавоноидов, присутствующих в луковых, хотя последние были обнаружены только в красном луке [63 ,64].

Общее содержание фенольных соединений и антиоксидантная активность четырех сортов *Allium cepa* были изучены D. Prakash и его коллегами [65]. Результаты исследования показали, что наружные сухие слои красного сорта показали самое высокое содержание фенольных соединений (74.1 мг/г), за которым следует фиолетовый лук (43.5 мг/г). Их наружные слои имели самое высокое содержание фенолов, за которым последовало непрерывное снижение по направлению к внутренней части луковицы. Количество галловой кислоты, протокатехиновой кислоты, кверцетина и кемпферола уменьшилось во всех сортах от наружных сухих до внутренних мясистых слоев. Количество феруловой кислоты непрерывно увеличивалось от внешних к внутренним слоям в красных, фиолетовых и белых сортах, в то время как в зеленых наблюдалось непрерывное снижение. Следовательно, самая высокая антиоксидантная активность наблюдалась во внешнем слое красного лука (84.1 %), за которым

следовал фиолетовый лук (73.9 %), а также наружные слои обоих сортов показали лучшие значения ингибирования перекисного окисления липидов.

Флавонолы, самый распространенный класс флавоноидов в луке, содержат 3-гидроксифлавоновую основу [66]. Их разнообразие возникает из-за различного положения фенольных групп -ОН. Кверцетин, кемпферол, изорамнетин, мирицетин, физетин и морин являются основными представителями флавоноловых агликонов лука. В таблице 2 приведены данные о флавоноидах, идентифицированных из различных видов лука.

Таблица 2 – Флавоноиды, идентифицированные из растений рода *Allium* L.

№	Вид растения	Экстрагент	Соединение	Ссылки
1	2	3	4	5
1-2	<i>Allium cornutum</i> , <i>Allium cepa</i>	Метанол 70 %	Кверцетин 3,4'-диглюкозид, кверцетин 4'-моноголюкозид, мирицетин, агликон кверцетина, изорамнетин, изорамнетин 3,4-диглюкозид	[67, 68]
3	<i>Allium triquetrum</i>	Гексан, метанол	Кемпферол 3-О-(2-О-транс-п-кумароил) глюкозид, кемпферол 3-О-(2-О-транс-п-ферулоил) глюкозид, кемпферол 3-О-глюкозид, кемпферол 3-О-рутинозид, кемпферол 7-О-глюкозид, 8-гидроксикаемпферол 8-О-глюкозид	[69]
4-5	<i>Allium subhirsutum</i> , <i>Allium nigrum</i>	Метанол	Галлат (-)-эпигаллокатехина, генистеин	[70]
6	<i>Allium neapolitanum</i>	Нет данных	Кемпферол 3-О-[[2-О-альфа-L-рамнопиранозил-4-О-бета-D-глюкопиранозил]-бета-D-глюкопиранозид]], изорамнетин 3-О-[[2-О-альфа-L-рамнопиранозил-6-О-бета-D-глюкопиранозил]-бета-D-глюкопиранозид]], изорамнетин 3-О-[[2-О-альфа-L-рамнопиранозил-6-О-бета-D-гликопиранозил] бета-D-глюкопиранозид]-7-О-бета-D-глюкопиранозид, изорамнетин 3-О-[[2-О-альфа-L-рамнопиранозил-6-О-бета-D-гентиобиозил]-бета-D-глюкопиранозид]]	[71]
7	<i>Allium vineale</i>	Нет данных	Ксериол-7-О-[2"-О-Е-ферулил]-β-D-глюкоцит, ксериол, изорамнетин-3- β-D-глюкоцит	[72]
8	<i>Allium macrostemon</i>	Метанол 70 %	Кемпферол 3,7-2-О-глюкозид, кемпферол 3,4-диО-глюкозид, кверцетин 3-О-глюкозид, кемпферол 3-О-глюкозид, изорамнетин 3-О-глюкозид	[73]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
9	<i>Allium ursinum</i>	Нет данных	Кемпферол 3-О-бета-неогесперидозид-7-О-[2-О-(транс-п-кумароил)]-бета-D-глюкопиранозид, кемпферол 3-О-бета-неогесперидозид-7-О-[2-О-(транс-ферулоил)]-бета-D-глюкопиранозид, кемпферол 3-О-бета-неогесперидозид-7-О-[2-О-(транс-п-кумароил) -3-О-бета-D-глюкопиранозил]-бета-D-глюкопиранозид	[74]
		Н-бутанол	Астрагалин (кемпферол-3-О-бета-D-глюкопиранозид (3), кемпферол-3-О-бета-D-глюкопиранозил-7-О-бета-D-глюкопиранозид (4), кемпферол-3-О-бета-D-неогесперозид (5) и кемпферол-3-О-бета-D-неогесперозид-7-О-бета-D-глюкопиранозид	[75]
10	<i>Allium porrum</i>	Нет данных	Кемпферол 3-О-[2-О-(транс-3-метокси-4-гидроксициннамоил)-бета-D-галактопиранозил] -(1->4)-О- бета-D-глюкопиранозид и кемпферол 3-О-[2-О-(транс-3-метокси-4-гидроксициннамоил)-бета-D-глюкопиранозил]-(1->6)-О-бета-D- глюкопиранозид	[76]
11	<i>Allium sativum</i>	Вода	Кверцетин 3 - О -β-D-глюкопиранозид, кверцетин 3 - О -β-D-ксилопиранозид, кемпферол 3 - О -β-D-глюкопиранозид, изорамнетин 3 - О -β-D-глюкопиранозид	[77]
12	<i>Allium fistulosum</i>	Нет данных	Мирицетин, кверцетин, рутин, кемпферол, нарингенин и гесперетин	[78]
13	<i>Allium schoenoprasum</i>	Этанол	Кверцетин, кемпферол, мирицетин, катехин, рутин,	[79]
14	<i>Allium mongolicum</i>	75 % этанол	Кверцетин, рутин	[80]
15	<i>Allium victorialis</i>		Кверцетин , кемпферол	[81]
16	<i>Allium kastambulense</i>	Метанол - хлороформ	Кверцетин, катехин, Апигенин	[82]
17	<i>Allium microdictyon</i>	Нет данных	Астрагалин (кемпферол-3-О-глюкозид), изокверцитрин (кверцетин-3-О-глюкозид), кемпферол-3-О-глюкозид-7-О-глюкуронид, кемпферол-3-О -неогесперидозид, кемпферол-3,7-ди-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкозид-7-О-глюкуронид, кверцетин-3,7- ди-О-глюкозид	[83]
18, 19	<i>Allium obliquum, Allium senescens</i>	75 % этанол	Изокверцитрин, рутин, лютеолин, апигенин, гликозиды кемпферола и кверцетина, β-ситостерол, кампестерол	[84]

У 19 видов растений рода луковые идентифицированы более 40 различных флавоноидов. Большинство флавоноидов выделены в гликозилированной форме, где сахара присоединены через кислород в положениях 3, 4' и/или 7 агликонов.

Глюкоза является наиболее распространенным сахарным фрагментом. Основными флавоноидами, обнаруженными в растениях лука, являются производными кверцетина, в то время как производные кемпферола и изорамнетина менее распространены. Кверцетин 3,4'-глюкозид (3,4'-Qdg) и кверцетин 4'-глюкозид (4'-Qmg) составляют более 90% флавонолов в луке [85].

Итальянскими учеными [86] в ходе исследования химического состава пяти сортов лука были идентифицированы 22 соединения, где преобладают соединения серы, 5 фенольных соединений, 7 органических кислот и 3 водорастворимых углеводов. А также, авторы изучали влияние климатических условий, в частности температуры воздуха на динамику накопления метаболитов в луке. Выращенные и собранные образцы в более холодные зимние месяцы, показали более низкие концентрации общих летучих и фенольных соединений.

Из экстракта красных лукович *Allium cepa* L. var. Tropea с помощью ЯМР-спектроскопии были идентифицированы новые соединения сапонинов и определена их спазмолитическая активность. Это может способствовать объяснению традиционного использования лука при лечении нарушений желудочно-кишечного тракта [87].

Matsuura выделил из чеснока 13 стероидных сапонинов и определил их структуру с помощью ЯМР-спектроскопии. В статье представлены результаты *in vitro* исследований противогрибковой, противоопухолевой, цитотоксической активности и эффекта свертываемости крови выделенных соединений. Также обобщены исследования на лабораторных животных влияния стероидных сапонинов на уровень холестерина [88].

Согласно обзорной статье, охватывающей литературные данные с начала 1970 по март 2014 года, в настоящее время идентифицированы более 200 стероидных сапонинов из рода *Allium*. Стероидные сапонины из рода *Allium* можно разделить на три группы на основе структуры сапогенина: спиростанолы, фуростанолы и сапонины с открытой цепью. Последняя группа часто упоминается в литературе как «холестановые сапонины». В статье приведены данные по: 64 сапонином спиростанолы, 140 сапонином фуростанола и 18 сапонином холестанового типа (с открытой цепью) идентифицированных в растениях рода лук [89].

Польские ученые проанализировали белые, красные и желтые сорта лука и обнаружили значительные различия в химическом составе между анализируемыми сортами. Сорта одного и того же цвета демонстрировали схожие показатели с точки зрения накопления макро- и микроэлементов, углеводов, а также витаминов. Наибольшие различия в химическом содержании были обнаружены между желтыми и красными сортами. Желтые сорта накапливали значительно большее количество N, P, K, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu и редуцированного сахара, чем у сортов красного лука. Сорта красного лука содержали значительно большее количество общего сахара и витамина C, чем сорта желтого лука [90].

Японские ученые Y. Mimaki, M Kuroda, T Fukasawa, Y Sashida в химическом составе вида *Allium karataviense* определили спиростанольные

сапонины, фураностанольные сапонины, стероидный сапогенин [91]. Эти же ученые в 2014 году продолжили изучение растительного сырья *Allium karataviense* и идентифицировали 6 новых бисдесмосидных стероидных гликозидов, каратавиозидов пяти видов [92].

Ученые Kusterer J., Fritsch R. M., Keusgen M. исследовали виды лука из Центральной и Юго-Западной Азии. В растениях *Allium altissimum* и *Allium suworowii* были идентифицированы производные цистеина (маразмин) и другие соединения [93].

Двадцать химических компонентов были обнаружены в экстракте *Allium longicuspis* на основании анализа ГХ-МС. В текущем исследовании экстракт *Allium longicuspis* успешно подавлял рост гриба *Colletotrichum Gloeosporioides* (мицелий и конидий) в тестах *in vitro* [94].

Ученые из Румынии Laurian Vlase и его коллеги в своих исследованиях, изучили химический состав некоторых видов *Allium*. Анализ серосодержащих соединений провели методом ГХ-МС, идентификацию и количественное определение полифенольных соединений методом ВЭЖХ-УФ-МС, стеролов ВЭЖХ-МС-МС. В результате исследований были идентифицированы следующие полифенольные соединения: в *Allium obliquum* (*n*-кумаровой кислоты до гидролиза – 149.59 мкг / 100 г, после гидролиза 163.71 мкг / 100 г); (изокверцитрина 123.38 мкг / 100 г; лютеолин и апигенин до 172.35 мкг / 100 г и 149.03 мкг / 100 г и после кислотного гидролиза 280.74 мкг / 100 г и 277.06 мкг / 100 г); в *Allium schoenoprasum* (изокверцетин- 363.78 мкг/ 100 г; рутин – 128.95 мкг / 100 г; кемпферол- 1563.46 мкг / 100 г) [95].

В научных работах Stajner D.I., Карог А. описаны методы выделения и идентификации из листьев лука поникающего (*A. nutans*) химических соединений: супероксиддисмутаза, каталаза, гваякол пероксидаза, глутатионпероксидаза, -ОН, малонилдальдегид, хлорофилл а, хлорофилл b, каротиноиды, флавоноиды, витамин, растворимые белки и флуоресцентные пигменты липофусцина и определена их антиоксидантная активность [96].

В обзорной статье Monika N. и Sakthi Abirami [97] приведены данные о природе экстрагентов и выделенных соединений из лука -порей (таблица 3).

Таблица 3- Фитохимический анализ

№	Соединение	Этанол	Ацетон	Петролейный эфир	Хлороформ	Водный экстракт
1	2	3	4	5	6	7
1	Дубильные вещества	+	+	-	-	+
2	Сапонины	-	-	-	-	-
3	Флавоноиды	+	+	+	+	+
4	Хиноны	+	+	+	+	+
5	Гликозиды	-	-	-	-	-
6	Сердечные гликозиды	+	+	+	-	-
7	Терпеноиды	+	+	+	+	-
8	Фенолы	+	+	+	+	+
9	Кумарины	+	+	+	+	+
10	Стероиды	+	+	-	+	+

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
11	Алкалоиды	+	+	+	-	+
12	Антоцианин	-	-	-	-	-
13	Бетацианин	+	+	-	-	+

В этанольном и ацетоновом экстрактах было выделено максимальное количество соединений, эти данные повлияли на выбор экстрагента в нашем исследовании.

Идентифицированные химические соединения в растениях рода *Allium* относятся к различным группам БАВ: серосодержащие соединения, тиосульфиды, флавоноиды, фенольные и органические кислоты, сапонины, катехины, танины, полисахариды, каротиноиды. Полученные данные литературного обзора заложили основу для исследований по изучению химического состава видов *A. turkestanicum* и *A. galantum*.

### 1.3 Фармакологическое действие растений рода *Allium* и применение в современной медицине

На протяжении более 4000 лет лук репчатый и чеснок используются в народной медицине при простуде, кашле, бронхите и гриппе. Датированный примерно 1550 годом до нашей эры египетский папирус «Кодекс Эберса», является первым документальным подтверждением чеснока, как целебного растения. Кодекс содержит более 800 терапевтических формул, из которых в 22 упоминается чеснок как эффективное средство от множественных недугов, включая проблемы с сердцем, головную боль, укусы, глисты и опухоли.

Лечебные свойства растений рода *Allium* семейства *Alliaceae* привлекают внимание большого круга исследователей благодаря высокому содержанию биологически активных веществ (БАВ) широкого спектра действия. За последние 50 лет были проведены много научных исследований по оценке биологической активности растений рода *Allium* L., на основе их экстрактов и эфирных масел. Растения рода *Allium* L. Обладают широким спектром фармакологических свойств, включая антибактериальную антиоксидантную активность, противоопухолевые свойства, способность ингибировать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, гипогликемическими и гиполипидемическими и т.п. эффектами [98-101].

*Противоопухолевая активность.* Полифенолы и сероорганические соединения (цистеин, S-метилцистеин, диаллилдисульфид и диаллилтрисульфид), содержащиеся в луке, играют важную роль в химиопрофилактике онкологических заболеваний [102-105]. Кверцетин способен предотвращать повреждение ДНК и мутационные изменения, вызванные активными формами кислорода (АФК), подавлять активность онкогенных тирозинкиназ и повышать биодоступность некоторых противоопухолевых препаратов, способствуя их всасыванию в кишечнике. и снижение их метаболизма [106]. Другое исследование подтвердило эффективность кверцетина в отношении онкологических заболеваний молочной

железы человека путем ингибирования роста раковых клеток и индукции апоптоза в раковых клетках [107]. Ряд авторов доказали эффективность кверцетина для многих типов рака, включая рак молочной железы, лейкемию, рак толстой кишки, плоскоклеточный рак, рак яичников, эндометрий, желудочный и немелкоклеточный рак легкого [108-110]. В случае сероорганических соединений предполагается, что они индуцируют ферменты, приводящие к детоксикации канцерогенов. Эти соединения также влияют на реакции обмена сульфгидрилов/дисульфидов, что, вероятно, имеет решающее значение для контроля клеточной пролиферации и роста опухоли [111-113]. Shrivastava и соавторы исследовали защитное действие водного экстракта лука на клетки меланомы. Это исследование выявило значительную активность лука в качестве цитозащитного агента нормальных клеток и агента цитотоксичности для опухолевых клеток [114].

Согласно исследованиям, описанными выше, растения рода лук обладают противоопухолевыми свойствами, предотвращают мутационные изменения, ингибируют активность тирозинкиназ и рост злокачественных клеток.

*Влияние на сердечно-сосудистую систему.* В исследованиях ряда авторов было исследовано, что водный экстракт лука может действовать как кардиопротективное средство против повреждения миокарда [115]. Nausheen и другие продемонстрировали, что антиоксидантная активность экстракта листьев лука приводит к защите от доксорубин-индуцированной кардиотоксичности у крыс [116].

Группа исследователей доказала, что кверцетин, содержащийся в растениях рода лук защищает от ишемической болезни сердца, снижает повышенное кровяное давление [117]. Влияние кверцетина на подавление повышения артериального давления связывают с увеличением доступности оксида азота и активности синтазы оксида азота, а также снижением продукции ангиотензина II [118]. Кроме того, кверцетин предотвращает атеросклероз, ингибируя перекисное окисление липидов [119]. Таким образом, лук можно рассматривать как сердечно-сосудистое средство.

*Противодиабетическая активность.* Одним из наиболее важных применений лука в народной медицине является его использование для лечения диабета для снижения уровня глюкозы в крови. Различные исследования показали, что соединение S-метилцистеинсульфоксид стимулирует секрецию инсулина, контролирует уровень глюкозы в крови и нормализует активность ферментов гексокиназы печени, глюкозо-6-фосфатазы [120]. Соединение S-аллилцистеинсульфоксид, содержащийся в луке, также оказывает терапевтическое воздействие на диабет, стимулируя выработку и секрецию инсулина, препятствуя усвоению глюкозы из пищи и способствуя сохранению инсулина [121]. Кверцетин, ингибируя  $\alpha$ -глюкозидазу, также способен предотвращать высвобождение D-глюкозы из олигосахаридов и дисахаридов, что приводит к замедлению всасывания глюкозы из кишечника и контролю уровня глюкозы в крови [122].



*Антимикробная и антиоксидантная активность.* Мнауар и соавторы протестировали антибактериальные свойства 6 видов растений *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Allium porrum*, *Allium tuberosum*, *Allium ascalonicum* и *Allium schoenoprasum* на пяти штаммах бактерий: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291). Антиоксидантные и антирадикальные свойства были протестированы с помощью анализов Фолина-Чиокальтеу и 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (DPPH). Экстракты *Allium sativum*, *Allium tuberosum* и *Allium cepa* обладали самой высокой антибактериальной активностью, тогда как экстракты *Allium ascalonicum* и *Allium porrum* были самыми сильными антиоксидантами. Представлены предположения о взаимосвязях между химическим составом и биологической активностью. Авторы утверждают, что диаллилсульфид обладает высокой антимикробной активностью [123].

Исследования этанольных экстрактов 15 видов луков из различных регионов Таджикистана показало, что эндемичный вид *A. schugnanicum* Vved., показал активность по отношению к грамотрицательным бактериям *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, экстракт из лука *A. oschaninii* эффективно действовал против штаммов *Staphylococcus aureus* и *Ecscherichia coli* [124].

Сербскими учеными были проведены исследования, целью которых было, изучение противогрибкового потенциала эфирного масла лука репчатого. В ходе данных исследований в эфирном масле лука было идентифицировано двадцать одно соединение, основными компонентами которого были диметилтрисульфид и метилпропилтрисульфид. Эфирное масло лука продемонстрировало фунгицидное действие на рост *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium chrysogenum* и *Fusarium spp.*, а также ингибирующее действие на *Aspergillus niger* и *Penicillium aurantiogriseum*. Макроскопические и микроскопические исследования показали, что применение эфирного масла лука вызывало изменения мембранных структур исследуемых грибов [125].

Есть данные об *in vivo* исследовании антибактериальной активности гексановых и дихлорметановых экстрактов *Allium stipitatum* на самках мышей с термическим ожогом, инфицированным метициллинрезистентным штаммом *S. aureus*. Антибактериальную активность определяли с помощью дисковой диффузии, минимальной ингибирующей концентрации (МИК), минимальной бактерицидной концентрации (МБК). Исследования показали, что экстракты и мази на их основе показали сильную бактерицидную активность против *S. aureus*, через 48–72 ч после инфицирования. Результаты демонстрируют потенциальное терапевтическое применение экстрактов лука для лечения ожоговых ран [126].

Недавние исследования по определению антибактериальной и противогрибковой активности луковиц и цветков *Allium staticiforme* и *Allium subhirsutum* показали, что метанольные экстракты данных растений показывают

высокую противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* и незначительную бактериальную активность. Антиоксидантная активность по удалению радикалов DPPH показал высокие результаты [127].

Михайловой Д. и соавторами при изучении антиоксидантной и антимикробной активности метанольных и этанольных экстрактов лука медвежьего (*Allium ursinum* L.) установлено, что природа экстрагента влияет на фармакологическую активность. Экстракция 70% этанолом влияет на извлечения полифенольных соединений и показывает высокую антиоксидантную активность по удалению радикалов DPPH и ABTS, и антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий: *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* [128].

В настоящее время собраны обширные данные по изучению фармакологической активности лука репчатого (таблица 4).

Таблица 4 – Фармакологические эффекты химических соединений лука

Фармакологическое действие	Соединение	Механизм действия	Ссылки
1	2	3	4
Противоопухолевое	Кверцетин	Подавляет активность онкогенных тирозинкиназ, снижает экспрессию мутантного белка p53 в клеточных линиях рака молочной железы человека.	[129, 130]
	Аллилсульфид	Индуктирует ферменты детоксикации фазы II, включая хинонредуктазу и глутатион-S трансферазу	[131]
	Диаллилди сульфид	Прекращает рост опухолевых клеток за счет пропорционального увеличения процента клеток, задержанных в фазе G2-M клеточного цикла	[132]
	Стероидные сапонины	Ингибирует пролиферацию нескольких линий раковых клеток	[133]
	Апигенин, эпигалло катехин-3-галлат	Ингибирует рост клеток меланомы	[134]
Антидиабетическое	S-метилцистеин-сульфоксид	Стимулирует секрецию инсулина, контролирует уровень глюкозы в крови и нормализует активность ферментов гексокиназы печени, глюкозо-6-фосфатазы и ГМГ-КоА-редуктазы. Нормализует уровень глюкозы в крови, активность глюкозо-6-фосфатазы и гексокиназы печени.	[135, 136]
	S-аллилцистеин-сульфоксид	Стимулирует выработку и секрецию инсулина, препятствуя усвоению глюкозы из пищи и способствуя сохранению инсулина	[121 с. 433]
	Кверцетин	Ингибирует $\alpha$ -глюкозидазу, предотвращает высвобождение D-глюкозы из олигосахаридов и дисахаридов. Улучшает секрецию инсулина за счет фосфорилирования киназы	[137]

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
Антитромбоцитар- Ное	Кверцетин, аденозин, аллицин, парафиновые полисульфиды	Повышают уровень циклического аденозинмонофосфата и снижают уровень тромбоксана.	[138, 139]
	Трисульфид, аллицин, аденозин, кверцетин	Снижают биосинтез тромбоксана В2 — липида группы простагландинов посредством подавления циклооксигеназы-1	[140]
	Трисульфид	Ингибирует биосинтез тромбоксана А2 путем подавления тромбоксансинтазы и снижает биосинтеза тромбоксана В2 путем ингибирования циклооксигеназы-1	[141]
Ингибитор костной резорбции	Кверцетин	Модулирует воспалительные процессы, подавляя транскрипционный фактор NF-κB, увеличивая экспрессию цитоплазматического белка-ловушки NF-κB. Ингибирует действие дифференцировки остеокластов. секрецию цитокинов, таких как интерлейкин (ИЛ)-1α, ИЛ-6 стимулирует секрецию ИЛ-3 и ИЛ-4, ответственных за ингибирование образования остеокластов	[142]
	1-пропенил- цистеинсуль- фоксид	Ингибирует активность остеокластов	[143]
	Фитоэстрогены	Ингибирует дифференцировку остеокластов	[144]
	Рутин	Замедляет резорбцию костной ткани, повышает активность остеобластов	[145]
Действие на сердечно- сосудистую систему	Кверцетин	Предотвращает атеросклероз, ингибируя перекисное окисление липидов. Снижает кровяное давление, повышает доступность оксида азота	[146]
	S-алк(ен)ил- цистеинсульфо ксид	Снижает уровень холестерина в сыворотке, защищает холестерин от окисления и повышает уровень холестерина липопротеинов высокой плотности	[147]
Влияние на функцию органов пещеварения	Кверцетин	Обладает терапевтическим потенциалом при лечении язвенной болезни, стимулируя секрецию слизи и подавляя рост <i>Helicobacter pylori</i> . Увеличивает количество желудочной слизи.	[148, 149]

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
Респираторное	Кверцетин	Действует как антиастматическое средство за счет снижения воспалительных показателей лейкотриенов и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и подавления синтеза Т-хелперов (Th2) цитокинов. Обладают антиастматическими свойствами за счет снижения маркеров окисления, включая MDA и индексы воспаления повышения уровня антиоксидантов, и подавление синтеза цитокинов Th2	[150-155]
	Полифенолы	Ингибирует высвобождение гистамина из базофилов и тучных клеток и модулирует процесс аллергической сенсibilизации	[156]
	Кемпферол, тиосульфиды	Предотвращает бронхokonстрикцию, ингибируя ферменты циклооксигеназы и липоксигеназы	[157]
	Изокверцитрин	Снижает уровень ИЛ-5 в гомогенате легких, ингибирует сократительную реакцию гладких мышц трахеи	[158]
	Алкины	Ингибирует 5-липоксигеназу, высвобождает гистамин, биосинтез лейкотриена, биосинтез тромбоксана B2	[159]
	Ресвератрол	Улучшает баланс Т-хелперов 1/Т-хелперов 2, подавляет образования иммуноглобулина E	[160]
Урогенитальное	Кверцетин	Обладает антипротозойным действием и вызывает снижение веса простаты, что в совокупности приводит к снижению риска рака простаты	[161, 162]
Гиполипидемическое	Рутин	Улучшает липидный обмен	[163]
	Кверцетин	Уменьшает мезентериальный жир, адипогенез, вызывает липолиз, улучшает метаболизм липидов и глюкозы	[164-166]
	Кверцетин (Q) и моноглюкозид кверцетина (Qmg)	Улучшает метаболизм липидов, повышает активность кишечных микробных ферментов	[167]
Нейропротекторное	Кверцетин	Положительное влияние на ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга на модели мышей, за счет ингибирования перекисного окисления липидов и повышения уровня антиоксидантных ферментов, а также антиоксидантов	[168]
		Уменьшает перекисное окисление липидов. Ослабляет активацию астроцитов и микроглии	[169]
	Кверцетин 3,4'-O-β-диглюкозид	Уменьшает апоптоз, изменяет морфологию клеток	[170]
Противовирусное	Кверцетин и его производные	Ингибирует вирусную РНК-полимеразу гриппа	[171]
	Производные кемпферола	Блокирует ионные каналы вируса при коронавирусе SARS.	[172]

Экспериментальные исследования показали широкий спектр фармакологической активности лука, в том числе снижение уровня холестерина, триглицеридов и тромбоксанов в крови (вещества, участвующие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний), ингибирование агрегации тромбоцитов и опосредованного тромбоцитами тромбоза (процесс, приводящий к сердечным приступам и инсультам). Соединения, выделенные из лука, действуют как гипогликемическое, нейропротекторное, противосудорожное, антигипертензивное, антидепрессивное и диуретическое средство, оказывает защитное действие на печень, препятствует процессам окисления и воспаления, а также высвобождению гистамина, связанному с астмой, стимулирует иммунную систему и уменьшает остеопороз. Более того, лук является одним из сильнейших антиканцерогенных компонентов, поскольку подавляет рост канцерогенных клеток [173]. Исследования ряда авторов показали, что флавонолы, полученные из растений рода *Allium*, могут представлять собой актуальный терапевтический вариант для лечения инфекции CoVID-19 [174]

Химические соединения, выделенные из растений рода *Allium* показывают широкий спектр фармакологической активности.

*Обзор рынка фармацевтических препаратов, содержащих экстракт A. сера и A. sativum.* В официальной медицине разработаны препараты, созданные на основе экстрактов из лука репчатого и чеснока, влияющих на моторику желудочно-кишечного тракта и препараты, для заживления язв [175].

С помощью контент-анализа, являющегося формализованным методом количественного анализа документов (реестр лекарственных средств и медицинских изделий Республики Казахстан, реестр лекарственных средств Российской Федерации) был проанализирован ассортимент лекарственных препаратов, содержащих экстракты лука и чеснока [176,177]. Анализ показал, что фармацевтический рынок РК данных лекарственных препаратов представлен 2 торговыми наименованиями (таблица 5).

Таблица 5 - Данные о лекарственных препаратах, содержащие экстракт *A. сера* и *A. sativum*

№	Торговое наименование, ТК номер ТК	Производитель, страна	Лекарственная форма	Состав	Фармакологическое действие
1	2	3	4	5	6
1	Контракту-бекс, РК-ЛС-5№010905	" Мерц Фарма ГмбХ&Ко. КГаА", Германия	Гель для наружного применения	Жидкий экстракт лука репчатого ( <i>Allium сера</i> ), гепарин натрия, аллантоин	Препарат для заживления ран и язв АТХ код D03АХ

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
2	Аллохол, РК-ЛС- 5№018834	"Борща- говский ХФЗ НПЦ", Украина	таблетки покрытые пленочной оболочкой	Чеснок сушеный (Allium sativum), желчь сухая, лист крапивы, активированный уголь	Препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей. АТХ код А05АХ
3	Аллохол, РК-ЛС- 5№017919	«РУК "Белмедпре Парат"», Республика Беларусь	таблетки, покрытые оболочкой	Чеснок сушеный (Allium sativum), желчь сухая, лист крапивы, активированный уголь	Препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей. АТХ код А05АХ
4	Аллохол, РК-ЛС- 5№009315	«Ирбитский химфармза- вод", Россия	таблетки покрытые оболочкой	Чеснок сушеный (Allium sativum), желчь сухая, лист крапивы, активированный уголь	Препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей. АТХ код А05АХ
5	Аллохол, РК-ЛС- 5№018558	«Биосинтез» , Россия	таблетки покрытые оболочкой	Чеснок сушеный (Allium sativum), желчь сухая, лист крапивы, активированный уголь	Препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей. АТХ код А05АХ
6	Аллохол, РК-ЛС- 5№022338	«Дальхим - фарм», Россия	таблетки покрытые оболочкой	Чеснок сушеный (Allium sativum), желчь сухая, лист крапивы, активированный уголь	Препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей. АТХ код А05АХ

По АТХ классификации препарат «Аллохол» относится к препаратам для лечения заболеваний желчевыводящих путей, «Контракту-бекс» - препарат для заживления ран и язв. Анализ структуры поставщиков данного лекарственного препарата показал, что данная продукция представлена импортными производителями.

Аналогичный анализ провели на российском фармацевтическом рынке. Данный анализ показал, что в Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации зарегистрировано 16 препаратов под торговым наименованием «Аллохол» и 1 препарат «Аллохол-УБФ». Странами производителями являются Россия – 15 препаратов, Беларусь- 1 препарат, Украина- 1 препарат. В таблице 6 приведен список зарегистрированных в РФ ЛС, в состав которых входит экстракт чеснока [Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации].

Таблица 6 – Лекарственные препараты, содержащие экстракт *A. sativum*

№	Торговое наименование	МНН	Форма выпуска	Производитель / страна
1	Ревайтл® чесночные жемчужины	Чеснока посевного луковиц масло	Капсулы	Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд Индия
2	Чеснока настойка		Настойка	ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика» Россия

Как видно из данных таблиц 5 – 6 ассортимент лекарственных препаратов из растений рода лук небольшой. Однако эти растения нашли широкое применение в качестве биологически активных добавок к пище. Анализ Единого реестра свидетельств о государственной регистрации показал ЕАЭС показал, что на рынке стран-участников Евразийского экономического союза зарегистрировано 86 БАДов, в состав которых входят экстракты различных видов растений рода лук [178]. Встречаются как однокомпонентные, так и многокомпонентные комплексы.

На рисунке 6 представлена диаграмма по форме выпуска БАДов.



Рисунок 6 – Анализ ассортимента БАДов по форме выпуска

Сегментирование ассортимента по форме выпуска выявило, что БАДы к пище выпускаются в виде 9 форм: таблетки, порошки, драже, капсулы, пилюли, леденцы, растворы, сборы, сиропы, доля твердых форм в общей структуре ассортимента составляет 88 %.

БАДы к пище представлены зарубежными производителями из 16 стран. Абсолютными лидерами являются: США- 33 %, Китай – 24%, Россия – 20% (рисунок 7).

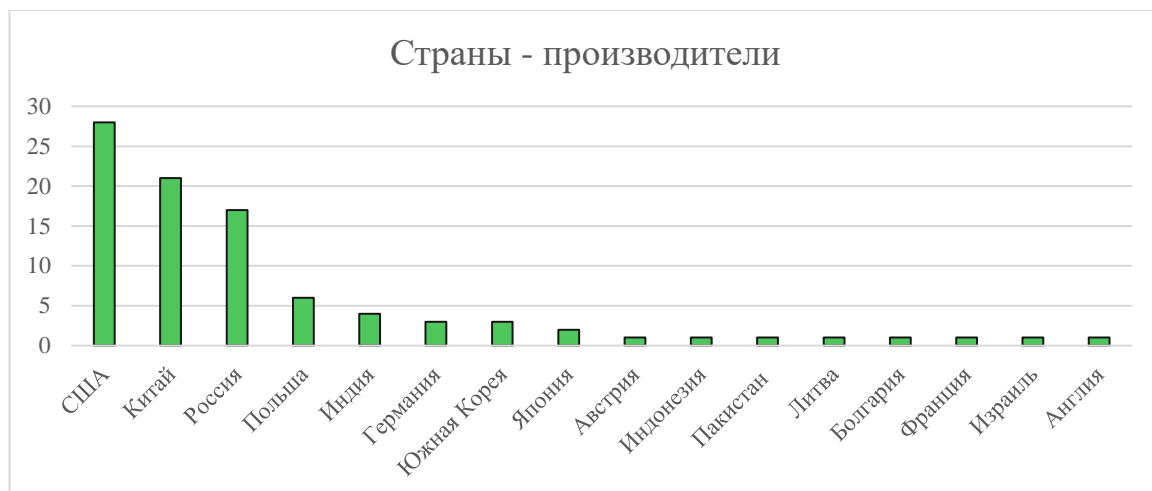


Рисунок 7 – Страны – производители БАДов

Анализ номенклатуры БАДов показал, что в состав указанной продукции входят экстракты 6 видов растений рода *Allium*: чеснока (*Allium sativum*), лука репчатого (*Allium cepa*), лука ветвистого (*Allium ramosum*), лука скороды (*Allium tuberosum*), лука - батуна (*Allium fistulosum*), лука медвежьего (*Allium ursinum*).

Таким образом, по результатам анализа установлено, что по состоянию на начало 2018 г. в Казахстане зарегистрировано 6 лекарственных препаратов с экстрактом чеснока, все импортного производства. В Российской Федерации зарегистрировано 19 препаратов данной категории. Сегментационный анализ по производственному признаку показал преобладание доли лекарственных препаратов российского производства – 84.2 %. Также установлено, что по лекарственным формам наибольший удельный вес в исследуемых фармацевтических продуктах составляют твердые лекарственные формы. Анализ наличия данных лекарственных средств на рынке Республики Казахстан свидетельствует о том, что лекарственные препараты, содержащие экстракт лука и чеснока, представлены нешироким ассортиментом импортного производства. Исходя из этого, дальнейшее изучение лекарственных растений рода *Allium* Республики Казахстан является целесообразным, а производство растительных субстанций, полученных из них - перспективным.



## Выводы к первой главе

Анализ литературных данных показал, что род *Allium* насчитывает более 900 видов и встречается в основном в Азии, Северной Америке, Южной Африке и Европе, наиболее распространённым ареалом у различных видов относящихся к роду луков является Центральная Азия, в том числе Казахстан

Особенностью химического состава многих растений рода *Allium* является наличие серосодержащих соединений. Кроме низкомолекулярных летучих соединений, растения рода *Allium*, характеризуются наличием соединений фенольного и стероидного происхождения, часто гликозилированными, проявляющими интересные фармакологические свойства. Основные полифенольные соединения растений рода лук включают флавоноиды, фенольные кислоты и лигнаны. Также были идентифицированы сапонины, органические кислоты, длинноцепочечные углеводороды, дубильные вещества, витамины и другие биологически активные вещества.

Компонентный состав растений рода *Allium* обуславливает широкий спектр фармакологической активности: в том числе снижение уровня холестерина, триглицеридов и тромбоксанов в крови (вещества, участвующие в развитии сердечно-сосудистых заболеваний), ингибирование агрегации тромбоцитов и опосредованного тромбоцитами тромбоза (процесс, приводящий к сердечным приступам и инсультам). Соединения, выделенные из лука, действуют как гипогликемическое, нейропротекторное, противосудорожное, антигипертензивное, антидепрессивное и диуретическое средство, оказывает защитное действие на печень, препятствует процессам окисления и воспаления, а также высвобождению гистамина, связанному с астмой, стимулирует иммунную систему и уменьшает остеопороз. Более того, растения рода *Allium* является одним из сильнейших антиканцерогенных компонентов, поскольку подавляет рост канцерогенных клеток антиоксидантный, антиканцерогенный, антимицробный, гипогликемический, как сердечно-сосудистые средства и др.

В Республике Казахстан произрастает около 140 видов луков, многие виды которых имеют хозяйственно-ценные значения: декоративные, пищевые, медоносные, кормовые, лекарственные. Одним из критериев выбора объектов исследования была пищевая ценность луков. Сведения о химическом составе и биологической активности растений рода *Allium*, произрастающих в Республике Казахстан, недостаточны и фрагментарны. Ввиду малой изученности химического состава и биологических свойств ни один вид не является официальным. В качестве объекта исследования были отобраны два вида: лук молочнокветный (*Allium galanthum* Kar. et Kir) и лук туркестанский (*Allium turkestanicum* Regel), произрастающих в Алматинской области, имеющие ресурсный потенциал и перспективы интродукции.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

Объектами настоящего исследования являлось растительное сырье:

- луковицы лука туркестанского (*Allium turkestanicum* Regel) рода *Allium* семейства *Alliaceae*. Сырье собрано и заготовлено до цветения и после цветения растения возле села Таргап Алматинской области. Координаты места сбора: W 43.29320031385285, E 75.50903320312501, на высоте 763 м над уровнем моря луковицы и зеленые листья лука молочнокветного.;

- листья лука молочнокветного (*Allium galanthum* Kar. & Kir.) рода *Allium* семейства *Alliaceae*. Сбор и заготовка растительного сырья проведена в фазе формирования листьев (март-апрель) в горной части возвышенной долины к северо-западу от г. Алматы в урочище Когалыс Анракайской возвышенности на высоте 1023 м над уровнем моря;

- луковицы лука молочнокветного собирали до и после цветения растений в урочище Когалыс Анракайской возвышенности на высоте 1023 м над уровнем моря.

Собранный материал был идентифицирован генеральным директором РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции», д.б.н., академиком Казахстанской Национальной Академии Естественных наук Ситпаевой Г.Т. (справка об идентификации растения *Allium galanthum* Kar.et Kir № 01-08-106 от 03.05.2019 г. (приложение Ж), справка об идентификации растения *Allium turkestanicum* Regel № 01-08-107 от 03.05.2019 г) (приложение И).

*Растительные фармацевтические субстанции:*

- 50 % этаноловый экстракт из луковицы лука туркестанского сухой – гигроскопичный кристаллический порошок от светло желтого до темно-желтого цвета с характерным чесночным запахом и сладко-жгучим вкусом;

- 50 % этаноловый экстракт из луковицы лука молочнокветного сухой – гигроскопичный кристаллический порошок от светло желтого до темно-желтого цвета с характерным луковым запахом и сладким вкусом;

- 50 % этаноловый экстракт из листьев лука молочнокветного сухой – гигроскопичный кристаллический порошок горчичного цвета, с характерным луковым запахом и слабо жгучим сладким вкусом. светло желтого до темно-желтого цвета с характерным чесночным запахом

#### **Вспомогательные вещества**

*Вода очищенная P* (ГФ РК I, т. 2). Прозрачная бесцветная жидкость [179].

*Спирт этиловый 96 % P* (ГФ РК I, т. 2). Бесцветная, прозрачная, летучая, легковоспламеняемая жидкость, гигроскопична, смешивается с водой и метиленхлоридом. Горит голубым пламенем [179, с. 581-583]. Приобретен в компании Avantor Performance Materials (Гливице, Польша).

*Муравьиная кислота безводная P* (ГФ РК I, т. 1).  $\text{CH}_2\text{O}_2$ . ( $M_r$  46.03). Содержит не менее 98.0 % (м/м)  $\text{CH}_2\text{O}_2$ . Бесцветная прозрачная жидкость. Вызывает коррозию, смешивается с водой и спиртом 96 % [180].

*Эфир диэтиловый Р* (ГФ РК I, т. 1).  $C_4H_{10}O$ . ( $M_r$  74,12). Прозрачная, бесцветная, летучая, очень подвижная, легко воспламеняющаяся жидкость. Гигроскопичен, растворим в воде, смешиваемая с 96 % спиртом [180, с. 452]. Производитель Avantor Performance Materials (Гливице, Польша).

*Ацетонитрил для хроматографии Р*. Ацетонитрил, используемый в хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание. Минимальное пропускание: 98 %. Определение проводят при длине волны 240 нм, используя в качестве раствора сравнения воду. Минимальная чистота: 99.8 %.

Растворители для анализа ВЭЖХ-МС (*вода для хроматографии Р*, *муравьиная кислота безводная Р*, *ацетонитрил для хроматографии Р*) были изготовлены компанией J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, США).

*Грибная тирозиназа 3,4-дигидрокси-1-фенилаланин (L-DOPA)* [CAS 59-92-7].  $(HO)_2C_6H_3CH_2CH(NH_2)CO_2H$ . М.м. 197.19. Производитель: Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH)* [84077-81-6].  $C_{34}H_{44}N_5O_6$ . М.м. 618.74 г/моль. Производитель: Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*2,20-азино-бис (3-этилбензотиазолин 6-сульфоновая кислота (ABTS)* [30931-67-0].  $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ . М.м. 548.68 г/моль. Производитель: Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*Тролокс* – фирмы Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*Тритон X-100* - фирмы Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*Койевая кислота* - фирмы Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

*Фетальная бычья сыворотка (FBS)* - компании Pan-Biotech (Айденбах, Германия).

*Клеточная линия мышинной меланомы B16F10 (ATCC CRL-6475)* была приобретена у LGC Standards (Люмянки, Польша).

## **2.2 Методы исследования**

### ***Методы анатомо-диагностического исследования***

В настоящей диссертационной работе проводились исследования свежих листьев, луковиц лука молочнокветного, лука туркестанского.

Подготовку микропрепаратов проводили в соответствии с требованиями фармакопейной статьи «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» ГФ РК I, т. 1 [180 с. 563].

Морфологический анализ и определение внешних признаков проводили по ФС «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы» в соответствии с ГФ РК I, т. 1 [180 с 573].

Фиксацию свежесобранного сырья для целей микроскопического анализа проводили в смеси глицерин очищенный-этанол-вода в соотношении 1:1:1. Для приготовления препаратов использовали свежее растительное сырье. Подготовку микропрепарата вели путем предварительного нагревания сырья в воде. Сырье заливали спирто-водно-глицериновой смесью (1:1:1). Просветленные кусочки сырья помещали на предметное стекло в каплю раствора

хлоралгидрата или глицерина, разделяли скальпелем или препаровальной иглой на две части, одну из них осторожно переворачивали, делали тонкие срезы. Анатомические препараты готовились с помощью микротомы с замораживающим устройством ТОС-2. Объекты для микроскопии накрывали покровным стеклом, слегка подогревали до удаления пузырьков воздуха и после охлаждения рассматривали с обеих сторон под микроскопом сначала при малом (x40), затем при большом (x100) увеличении с помощью микроскопа МС-300 (MICROS, Austria) по технике микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья. Микрофотографии получены на микроскопе МС-300 с фотокамерой (увеличение x180, x360).

Для определения макроскопических признаков объекты лекарственного растительного сырья рассматривались с использованием лупы (x10) и невооруженным глазом. Размеры изучаемых объектов определяли с помощью линейки. Цвет исследуемых объектов оценивали визуально при дневном свете; запах оценивали при растирании небольшого количества сырья; вкус – пробуя водное извлечение сырья.

#### ***Химические методы анализа***

***Качественные реакции.*** Для подтверждения наличия определенных групп БАВ в сырье лука молочнокветного и лука туркестанского нами были проведены пробирочные реакции, в качестве предварительного фитохимического анализа исследуемого вида сырья. Для проведения экспертизы качественного состава исследуемых объектов проводили предварительную экстракцию и фракционирование БАВ анализируемых органов растения. Для этого измельченное исследуемое сырье для удаления липофильных веществ последовательно настаивали при комнатной температуре с бензолом и хлороформом в течение 48 ч. Полифенольный комплекс, после удаления растворителей, извлекали трехкратным настаиванием с этанолом 70 % (об/об) сочетая при этом способ мацерации (24 ч) с последующей термической экстракцией (с обратным холодильником) при температуре (60 – 65) °С. Сухой остаток водно-спиртового извлечения растворяли в минимальном количестве воды. Последовательно обрабатывали органическими растворителями различной полярности (эфир, этилацетат), что позволило провести предварительное разделение полифенолов в зависимости от их растворимости.

***Аминокислоты:*** добавляли 1 мл 1 % *нингидрина* раствора Р1, смесь осторожно нагревали до температуры (100 – 105) °С; наблюдали образование фиолетового окрашивания.

***Гидролизуемые дубильные вещества:*** добавляли 1 мл 1 % раствора квасцов железосаммониевых; появлялось черно-синее окрашивание.

***Полисахариды:*** добавляли 5 мл этанола 95 % (об/об); наблюдали образование белого осадка.

***Сапонины:*** добавляли 1 мл *кислоты серной концентрированной Р*, 1 мл *спирта этилового Р* и 1 каплю 10 % раствора железа сернокислого, нагревали до температуры 45 °С, появлялось сине-зеленое окрашивание.

*Фенолокислоты*: добавляли 2 капли раствора бромкрезолового зеленого; появлялось желтое окрашивание на зеленом фоне.

*Флавоноиды*: добавляли 2 капли 5 % спиртового раствора алюминия хлорида; появлялось желтое окрашивание.

*Эфирные масла*: добавляли 1 мл 1 % раствора брома в хлороформе; появлялось окрашивание от голубого до синего

*Аскорбиновая кислота*: добавляли 2 мл 0.1 М калия йодида Р; наблюдали обесцвечивание.

### **Количественное определение основных групп БАВ в сырье**

*Аминокислоты*. Определение аминокислотного состава проводилось экстракцией растительного сырья этанолом 50 % (об/об) соотношении 1:6 при температуре (18 – 25) °С. и периодическом встряхивании в течение суток. Экстракт переносили в колбу со шлифом и упаривали при температуре 40 °С на вакуумном роторном испарителе до сухого остатка. Сухой остаток гидролизовали 6 М хлороводородной кислотой Р при температуре (100 – 105) °С. Полученный гидролизат выпаривали досуха на вакуумном роторном испарителе при температуре 40 °С, полученный концентрат растворяли в 5 % растворе сульфосалициловой кислоты. Полученный раствор центрифугировали при скорости 2500 об/мин, после чего методом ГЖХ на аминокислотном анализаторе Carlo-ErbaA-420 определяли компонентный состав аминокислотной фракции.

*Дубильные вещества* определяли перманганатометрией: точную навеску сырья (1 г.) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл горячей воды Р и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Водное извлечение декантировали, к сырью в колбе прибавляли еще 50 мл горячей воды и повторно экстрагировали сырье, как указано выше. Объединенные извлечения отфильтровывали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводя объем раствора водой очищенной до метки. 10 мл полученного раствора переносили в коническую колбу вместимостью 500 мл, добавляли 100 мл воды очищенной Р, 10 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании 0.02 М раствором калия перманганата Р до появления золотисто-желтого окрашивания. Параллельно титровали 10 мл индигосульфокислоты Р в 100 мл воды очищенной Р. 1 мл 0.02 М раствора калия перманганата Р соответствовал 0.004157 г гидролизуемых дубильных веществ в пересчете на танин. Содержание дубильных веществ (Х) в процентах, в пересчете на абсолютно сухое сырье, вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,004157 \times V \times 100 \times 100}{V_3 \times m (100 - W)} \quad (1)$$

где  $V_1$  - объем 0.02 М раствора калия перманганата Р, израсходованного на титрование экстракта, в миллилитрах;  $V_2$  - объем 0.02 М раствора калия перманганата Р, израсходованного на титрование в контрольном опыте, в мл;  $V_3$  - объем экстракта, взятого на титрование, в мл;  $V$  - объем экстракта, в мл;  $m$  - масса навески сырья, в граммах;  $W$  - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

*Приготовление раствора индигосульфокислоты.* 1 г индигокармина *P* растворяют в 25 мл кислоты серной концентрированной *P* и осторожно доводят объем раствора водой очищенной *P* до 1 л.

*Полисахариды* определяли гравиметрическим методом: точную навеску (1 г) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение 1 ч., охлаждали. Экстракцию водой повторяли дважды в течение 30 мин в тех же условиях. Водные извлечения объединяли и отфильтровывали в мерную колбу вместимостью 250 мл через три слоя марли. Фильтр промывали водой очищенной, доводя объем раствора водой очищенной *P* до метки. 25 мл полученного раствора помещали в центрифужную пробирку, прибавляли 75 мл этанола 95 % (об/об), перемешивали, подогревая на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отфильтровывали под вакуумом через высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16. Затем осадок количественно переносили на тот же фильтр и промывали 15 мл этанола 95 % (об/об). Фильтр с осадком высушивали при температуре (100-105) °С до постоянной массы. Содержание полисахаридов, в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (*X*), вычисляли по формуле 2:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 (100 - W)} \quad (2)$$

где  $m_1$  - масса фильтра, в граммах;  $m_2$  - масса фильтра с осадком, в граммах;  $m$  - масса навески сырья, в граммах;  $W$  - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

*Сапонины* определяли по методике: Точную навеску (1 г) измельченного сырья помещали в плоскодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл этанола 95 % (об/об), нагревали и перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч с момента закипания растворителя. Затем охлаждали, отфильтровывали. 10 мл фильтрата переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводя объем раствора до метки этанола 95 % (об/об), перемешивали. Полученный раствор в количестве 5 мл переносили в пробирку с притертой пробкой, прибавляли 5 мл 1% п-диметиламинобензальдегида в 4 *M* спиртовом растворе кислоты хлороводородной *P*. Пробирку закрывали пробкой и нагревали при температуре (58 ± 0.5) °С в термостате в течение 2 часов. Затем раствор охлаждали до температуры (18 - 25) °С и измеряли оптическую плотность при длине волны 518 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь 5 мл рабочего раствора и 5 мл 4 *M* спиртового раствора кислоты хлороводородной *P*. Смесь выдерживали в термостате при температуре (58 ± 0.5) °С. Содержание сапонинов в абсолютно сухом сырье (*X*) в процентах вычисляли по формуле 3:

$$X = \frac{C \times 0,0101 \times 50 \times 100 \times 100}{m \times 10 (100 - W)} \quad (3)$$

где  $C$  – количество  $\text{CoCl}_2$  найденное по калибровочному графику, в граммах.;  $0.0101$  – коэффициент пересчета концентрации  $\text{CoCl}_2$ ;  $m$  – масса навески сырья, в граммах;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Построение калибровочного графика по растворам  $\text{CoCl}_2$ .  $0.1$  г  $\text{CoCl}_2$ , высушенного при температуре ( $130 - 135$ ) °С растворяют в  $10$  мл *воды очищенной Р* и готовят  $5$  растворов методом разбавления.

*Флавоноиды* определяли спектрофотометрическим методом.

Точную навеску ( $1$  г) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью  $150$  мл, прибавляли  $30$  мл этанола  $90\%$  (*об/об*), содержащего  $1\%$  кислоты хлороводородной концентрированной *Р*, колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение  $1$  ч охлаждали до комнатной температуры, отфильтровывали через бумажной фильтр в мерную колбу вместимостью  $100$  мл. Экстракцию повторяли еще  $2$  раза указанным выше способом, фильтруя через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывали этанолом  $90\%$  (*об/об*), доводя объем фильтрата тем же спиртом до метки (раствор А). В мерную колбу вместимостью  $25$  мл помещали  $2$  мл раствора А, прибавляли  $1$  мл  $1\%$  раствора алюминия хлорида *Р* этанолом  $95\%$  (*об/об*), доводя объем раствора тем же растворителем до метки. Через  $20$  мин измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны  $430$  нм в кювете с толщиной слоя  $10$  мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из  $2$  мл раствора А, доведенного спиртом этиловым  $95\%$  до метки в мерной колбе вместимостью  $25$  мл. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах ( $X$ ) вычисляют по формуле 4:

$$X = \frac{D \times 100 \times 100 \times 25 \times 100}{764,6 \times m \times 2 (100 - W)} \quad (4)$$

где  $D$  - оптическая плотность испытуемого раствора;  $764.6$  - удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с раствором алюминия хлорида при  $430$  нм;  $W$  - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах;  $m$  - масса навески сырья, в граммах.

*Эфирные масла* определяли методом Гинзберга: около  $1$  г (точная навеска) измельченного сырья помещали в круглодонную колбу вместимостью  $300$  мл, приливали  $100$  мл горячей *воды очищенной Р*, присоединяли обратный холодильник с градуированной насадкой и нагревали  $4$  ч, эфирные масла накапливались по мере их отгонки с паром в градуированной пробирке. Объем масла замеряли после охлаждения прибора до комнатной температуры. Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле 5:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m (100 - W)} \quad (5)$$

где  $V$  – объем эфирного масла, в миллилитрах;  $m$  – масса навески сырья, в граммах;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья в процентах

*Аскорбиновую кислоту* определяли методом ВЭЖХ, согласно методике, описанной в Межгосударственном Стандарте - .ГОСТ 34151-2017 «Продукты пищевые. Определение витамина С с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии».

### ***Хроматографические методы анализа***

*Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС-МС).*

Хроматографический анализ проводился с использованием платформы HPLC-ESI-Q-TOF-MS, состоящей из масс-спектрометра (6500 Series Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США) и системы ВЭЖХ (1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США) и с использованием 18-колоночной Zorbax Eclipse Plus RP (150 мм × 2.1 мм,  $d = 3.5$  мкм) производства Agilent Technologies. В деталях комплект оснащался бинарным насосом (G1312C), дегазатором (G1322A), детектором КПК (G1315D) и автоматическим пробоотборником (G1329B).

Масс-спектры, которые регистрировались как в положительном, так и в отрицательном режимах ионизации и в диапазоне  $m/z$  50–1200 Да, были получены с помощью следующих настроек масс-спектрометра: капиллярное напряжение 3.5 кВ, газовые потоки 12 л/мин, напряжение 120 В, температура газа и газа оболочки 350 °С и 325 °С, соответственно, осколочное напряжение скиммера 65 В и энергии столкновения 10 и 20 В. В подготовленном способе были получены спектры фрагментации МС/МС для двух наиболее интенсивных сигналов  $m/z$  в каждом сканировании. После сбора одного спектра МС/МС выбранные сигналы  $m/z$  в дальнейшем исключались на следующие 0.2 мин из перефрагментации. Благодаря применяемым условиям менее интенсивные сигналы также могут быть фрагментированы. Идентификация компонентов в экстрактах основывалась на их спектрах фрагментации, в прямом сравнении с решениями стандартов, на основе данных аналитической литературы и открытых баз данных (Metlin), а также на зафиксированных сроках хранения.

### ***Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС)***

Анализ ГХ-МС летучих веществ, присутствующих в экстрактах, проводился с помощью прибора Shimadzu GC-2010 Plus в сочетании с масс-спектрометром Shimadzu QP2010 Ultra (Киото, Япония). Аналиты разделяли на капиллярной колонне ZB-5 MS (30 м, 0.25 мм в.д.) с толщиной пленки 0.25 м (Phenomenex, Torrance, CA, США).

Температурная программа печи была следующей: 50 °С первоначально в течение 3 мин, увеличенная до 250 °С со скоростью 5 °С/мин, и выдерживаемая в течение 5 мин; и, наконец, температуру повысили до 320 °С со скоростью 10 °С/мин и удерживали в течение 5 мин. Общее время анализа составило 60 мин. Гелий использовался в качестве газа-носителя со скоростью потока 1.0 мл/мин.



Сплит-инъекцию проводили с соотношением сплит 1:20. Температура порта инжектора, интерфейса и источника ионов поддерживалась на уровне температур 280, 250 и 220 °С соответственно. Спектрометр работал в режиме электронного удара, диапазон сканирования составлял 40–600 аеи (атомная единица массы), энергия ионизации 70 эВ (электрон-вольт), скорость сканирования 0.20 с. Показатели удерживания определяли путем анализа раствора, содержащего гомологичные ряды *n*-алканов (C8–C34) при одинаковых условиях эксплуатации. Соединения были идентифицированы с использованием компьютерных спектральных библиотек (MassFinder 2.1; NIST 2011).

#### ***Фармакопейные методы анализа***

Определение фармакопейных показателей качества таких, как зола общая и зола нерастворимая в растворе 10 % *хлористоводородной кислоты Р*, степень измельченности, содержание примесей, содержание экстрактивных веществ и влажность проводили в соответствии с методиками, изложенными в Государственной фармакопее Республики Казахстан.

*Определение макро- и микроэлементов* в сырье проводили методом атомно-адсорбционной спектроскопии на приборе КАС-120. Анализируемые пробы выпаривали из кратеров графитовых электродов, источником возбуждения спектров являлись дуги переменного тока силой 16 А. Спектры регистрировали на фотопленке с помощью спектрографа ДФС-8. Линии спектров фотографировали при длине волны от 230 нм до 347 нм с использованием микрофотометра МФ-1. Калибровочные графики строили с помощью стандартных образцов растворов солей металлов.

*Посторонние примеси* (ГФ РК I, т. 1, 2.8.2) [180, с. 226]

*Потеря в массе при высушивании* (ГФ РК I, т. 1, 2.2.32) [180, с. 91].

*Общая зола* (ГФ РК I, т. 1, 2.4.16) [180, с. 129].

*Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной* (ГФ РК I, т. 1, 2.8.1) [180, с. 226].

*Определение экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье* (ГФ РК I, т. 1.) [180, с. 566].

*Микробиологическая чистота* (ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А, 2.6.12, 2.6.13) [180, с. 479].

*Содержание тяжелых металлов в сырье* (ГФ РК I, т. 1, 2.4.8) [180, с.149].

*Содержание радионуклидов в сырье* регламентируются приказом Министра национальной экономики Республики Казахстан от 27 февраля 2015 года № 155 «Об утверждении гигиенических нормативов «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности» (ГФ РК I, т. 1.) [180, с. 566]

*Определение пестицидов в культивируемом сырье* (ГФ РК I, т. 1.) [180, с. 566].

#### ***Определение технологических параметров сырья***

Определение технологических параметров (насыпная масса, удельная масса, объемная масса, порозность, пористость, свободный объем слоя и

коэффициент поглощения экстрагента) проводили в соответствии с методиками, приведенными в литературе.

*Содержание сухого остатка экстрактов* в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.8.16 [180, с. 235].

*Описание сухих экстрактов* сырья (луковиц, листьев) *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* должны соответствовать по внешнему виду требованиям ГФ РК I, т. 1, Общая статья «Экстракты» [180 с. 77].

*Идентификация экстрактов* сырья (луковиц, листьев) лука туркестанского и лука молочноцветного определяли методом ВЭЖХ и ГХ-МС в соответствии с ГФ РК I, т. 2, 2.2.27 [180, с. 695].

*Потеря в массе при высушивании* экстрактов сырья (луковиц, листьев) *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* Regel в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.2.32 [180, с. 91].

*Тяжелые металлы* в экстрактах сырья (луковиц, листьев) лука туркестанского и лука молочноцветного в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.4.8, метод А [180, с. 123].

*Микробиологическая чистота* экстрактов сырья (луковиц, листьев) *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В, 2.6.12, 2.6.13 [180, с. 479].

*Количественное определение суммы флавоноидов* в экстрактах определяли методом ВЭЖХ (ГФ РК I, т. 1., 2.2.29) [180, с. 79].

#### **Методы скрининга биологической активности**

##### *Антибактериальный анализ in vitro*

Скрининг антибактериальной активности проводили на семнадцати эталонных штаммов коллекции американской типовой культуры:

- семь штаммов грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC ВАА1707, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC 10240),

- пять штаммов грамотрицательных бактерий (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Escherichia coli* ATCC 25922)

- пять штаммов дрожжеподобные грибы (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 2091, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 14243).

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) и минимальную фунгицидную концентрацию (МФК) определяли методом микроразведения бульона, в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (EUCAST) [181].

Эталонные штаммы бактерий пересевали на агар Мюллера-Хинтона, штаммы дрожжеподобных грибов на агар Мюллера-Хинтона с 2% глюкозой и инкубировали при 35 °С в течение 24 ч. Микробные колонии суспендировали в стерильном физиологическом растворе для получения инокулята 0,5 стандарта

МакФарланда, что соответствует  $1,5 \times 10^8$  КОЕ (колониеобразующие единицы) мл<sup>-1</sup> для бактерий и  $5 \times 10^6$  КОЕ мл<sup>-1</sup> для грибов.

Двукратные разведения экстрактов в бульоне Мюллера-Хинтона (для бактерий) или бульоне Мюллера-Хинтона с 2% глюкозой (для грибов) готовили в 96-луночных полистироловых планшетах. Конечные концентрации экстрактов находились в диапазоне от 40 до 0,155 мг/мл. Затем в каждую лунку, содержащую 200 мкл серийных разведений экстрактов в соответствующей культуральной среде, добавляли по 2 мкл каждого бактериального или грибкового инокулята. После инкубации при температуре 35 °С в течение 24 часов МИК оценивали спектрофотометрическим методом, как самую низкую концентрацию экстракта, демонстрирующую полное ингибирование роста бактерий или грибов. Эксперименты проводились в трехкратной повторности

В качестве эталонных антимикробных средств использовались: ванкомицин для грамположительных бактерии, ципрофлоксацин для грамотрицательных бактерии и флуконазол для дрожжеподобных грибов.

#### *Антиоксидантная активность методом DPPH.*

Антиоксидантную активность экстрактов оценивали с помощью метода удаления радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). В этом спектрофотометрическом анализе в качестве реагента используется стабильный радикал DPPH. Анализ DPPH проводили в соответствии с модифицированной методикой, описанной авторами Matejic и другими [182]. Метанольный раствор исследуемых экстрактов 50 мкл (различной концентрации: 1,2 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,075 мг/мл, 0,0375 мг/мл, 0,01875 мг/мл, 0,00938 мг/мл, 0,00469 мг/мл, 0,00234 мг/мл, 0,00117 мг/мл и 0,00059 мг/мл) смешивали с рабочим раствором 50 мкл DPPH (25 мМ в 99,9% метаноле). После встряхивания реакционную смесь оставляли для реакции в темноте на 10 минут при комнатной температуре.

Поглощение образцов измеряли при длине волны  $\lambda = 540$  нм с помощью микропланшетного мультidetектора FilterMax F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, США). Антиоксидантную активность в % DPPH рассчитывали с помощью формулы 6:

$$\% \text{ DPPH} = (1 - (\text{Abs (S)} / \text{Abs (C)})) \quad (6)$$

где, Abs (S) – поглощение DPPH-радикала образцами экстрактов, Abs (C) - поглощение DPPH-радикала контрольным образцом (DPPH + растворитель).

#### *Антиоксидантная активность методом ABTS.*

Активность ABTS (2,2-азинобис(3-этилбензотиазолина-6-сульфонат) по удалению радикалов была определена спектрофотометрическим методом по измененной методике, описанным Re и его коллегами [183]. Поглощение образцов измеряли при длине волны  $\lambda = 405$  нм с помощью микропланшетного мультidetектора FilterMax F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, США).

Активность по удалению радикалов ABTS в % рассчитали с помощью формулы 7:

$$\% \text{ ABTS} = (1 - (\text{Abs} (\text{S})/\text{Abs} (\text{C}))) \times 100 \quad (7)$$

где, Abs (S) — поглощение ABTS-радикала образцами экстрактов, а Abs (C) - поглощение ABTS-радикала контрольным образцом (ABTS + растворитель).

#### *Анализ ингибирования грибной тирозиназы*

Для оценки ингибирования монофенолазной активности грибной тирозиназы экстрактами лука молочнокветного и лука туркестанского применяли протокол, описанный Wang и соавторами [184]. 20 мкл разбавленного образца смешивали с 80 мкл фосфатного буфера (100 мМ, рН = 6,8) смешивали с 80 мкл фосфатного буфера (100 мМ, рН = 6,8) и 20 мкл рабочего раствора грибной тирозиназы (500 Ед). Образцы предварительно инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляли 80 мкл 2 мМ L-тирозина и инкубировали еще 20 мин при комнатной температуре в темноте

Метод, описанный Uchida и другими [185], был использован для анализа ингибирования дифенолазной активности грибной тирозиназы. 20 мкл разбавленного образца смешивали со 120 мкл фосфатного буфера (100 мМ, рН = 6,8) и 20 мкл раствора тирозиназы (500 Ед). Образцы предварительно инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 40 мкл 4 мМ L-DOPA и еще раз инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте.

Ингибирующую активность грибной тирозиназы определяли спектрофотометрическим методом при длине волны  $\lambda = 405$  нм с помощью микропланшетного мультidetектора FilterMax F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, США). Полученные значения корректировали поглощением экстрактов без тирозиназы и субстрата (L-тирозин или L-DOPA). Контрольный образец (100% активность тирозиназы) состоял из фосфатного буфера, тирозиназы, субстрата и равного объема растворителя. 100 мкг/мл койевой кислоты использовали в качестве эталонного ингибитора тирозиназы. Активность ингибирования тирозиназы в процентах рассчитана на основе формулы 8:

$$\% \text{ активности тирозиназы} = (\text{Abs}(\text{S})/\text{Abs}(\text{C})) \times 100 \% \quad (8)$$

где, Abs (S) - абсорбирующая часть образца (экстракт + тирозиназа + субстрат), Abs(C) - поглощение контрольного образца (растворитель + тирозиназа + субстрат).

#### *Анализ ингибирования мышинной тирозиназы*

Ингибирование мышинной тирозиназы исследуемых экстрактов анализировали с использованием лизата клеток меланомы мышей B16F10 по модифицированной методике автора Uchida и других [185 с. 142]. Лизат клеток культивировали в питательной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, в термостате при температуре 37 °С. Клетки ( $8 \times 10^6$ ) были лизированы в 5 мл фосфатного буфера (100 мМ, рН 6.8), содержащего 1 % Triton X-100 в ледяной водяной бане с ультразвуком в течение 1 ч. После центрифугирования (10 мин, 13 000 об/мин) супернатант собирали в виде раствора мышинной тирозиназы и

измеряли концентрацию белка с помощью анализатора белка (Bio-Rad, Варшава, Польша). Объем клеточного лизата, содержащего 20 мкг белка, смешивали с 20 мкл экстракта *Allium*, 40 мкл 4 мМ L-ДОФАи 100 мМ фосфатного буфера рН 6.8 (до 200 мкл). После 4 ч инкубации при температуре 37 °С оценивали абсорбцию при  $\lambda = 450$  нм. Койевая кислота использовалась в качестве стандартного образца. Активность тирозиназы рассчитывали на основе формулы 8.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «Microsoft Excel 2010», а также с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Статистическая значимость между результатами оценивалась с помощью одностороннего анализа дисперсии (ANOVA), за которым следовал тест Туки. Все данные отображаются как среднее  $\pm$  SD. Эксперименты проводились как минимум в трех повторностях.

#### ***Методы неклинических исследований экстрактов***

Изучение острой и подострой токсичности исследуемых экстрактов проведено на базе НИИ ФПМ им. Б. Атчабарова и выполнено согласно принципам «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У.) на белых мышах.

### 3 MORFOЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ЛУКА МОЛОЧНОЦВЕТНОГО (*ALLIUM GALANTHUM*) И ЛУКА ТУРКЕСТАНСКОГО (*ALLIUM TURKESTANICUM*)

Одним из важных аспектов стандартизации лекарственного растительного сырья является идентификация с использованием морфолого-анатомического исследования. Растением рода *Allium*, входящим в некоторые зарубежные Фармакопеи и в монографию ВОЗ о лекарственных растениях является чеснок (*Allium Sativum*) [186]. Зарубежные и отечественные ученые проявляли интерес к изучению морфологии и анатомии некоторых видов рода *Allium* [187-189]. Фармакогностические признаки лука туркестанского и лука молочнокветного не изучены и поэтому отсутствует нормативная документация на исследуемые виды сырья. Для использования в фармацевтической промышленности новых видов растительного сырья, в том числе наших объектов необходима их стандартизация. Макроскопический и микроскопический анализы необходимы для идентификации ЛРС. Для разработки проектов документов «Лука туркестанского луковицы», «Лука молочнокветного луковицы» «Лука молочнокветного листья» необходимы разделы «Макроскопия», «Микроскопия». В данной главе представлены диагностические анатомо-морфологические особенности изучаемых органов растений.

#### 3.1 Сравнительное макроскопическое исследование сырья *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum*

При изучении морфологических признаков *Allium galanthum*, *Allium turkestanicum* и фармакопейного растения *Allium sativum* нами были систематизированы результаты собственных исследований и литературные данные [190]. В таблице 7 приведены данные сравнительного анализа внешних признаков указанных растений.

Таблица 7 – Анализ внешних признаков растений рода *Allium*

Органы растения	<i>Allium galanthum</i>	<i>Allium turkestanicum</i>	<i>Allium sativum</i>
1	2	3	4
Жизненная форма	Травянистое, многолетнее	Многолетнее	Многолетнее, прямостоячее луковичное травянистое растение
Высота	(20 – 50) см	(50 – 100) см	(30 – 60) см
Стебель	Мощный, постепенно к верхушке суженный, при основании покрытый гладкими влагалищами листьев.	На 1/4 покрытый гладкими или очень редко шероховатыми листовыми влагалищами	Сильно редуцированный (дисковый), выпукло-конической формы, междуузлия очень сжатые, из которых вырастают мясистые чешуйчатые листья

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4
Листья	В числе 2-(3) цилиндрические, к верхушке постепенно суженные, дудчатые, 3-10 мм шириной, в 2 раза короче стебля	В числе 4 - 6, линейные, постепенно к верхушке суженные, плоские, 2 - 10 мм шириной, по краю шероховатые, значительно короче стебля, быстро увядающие;	Листья линейные, плоские, ланцетные.
Цветочные корзинки	Зонтик полушаровидный или чаще шаровидный, многоцветковый, более-менее густой.	Зонтик шаровидный, густой, многоцветковый, с почти равными цветоножками, которые в 2 - 4 раза длиннее ширококолокольчатого околоцветника, при основании с прицветниками.	Соцветие шарообразное, состоящее из маленьких бело-зеленых цветков.
Листья околоцветника	Белые с малозаметной жилкой, (4 - 5) мм длиной, равные, продолговатые, тупые	Не блестящие, розовые, с малозаметной жилкой, около 3 мм дл., почти равные, тупые, наружные, яйцевидные, лодочкообразные, внутренние эллиптические, суженные к основанию	Околоцветник тримерный с 6 листочками околоцветника, сегменты ланцетные, заостренные; тычинок 6, нитей внутренней мутовки трикуспидальные
Чехол	В 1.5 — 2 раза короче зонтика	Чехол остающийся, равен зонтику, с длинным носиком, равным основанию;	
Луковица	Вытянуто-цилиндрические, с оболочками тоо красно-коричневых до темно-коричневых	Имеет форму правильной сферы или шара с нежными тонкими наружными оболочками	Луковицы яйцевидные, снизу уплощенные, сужающиеся к верху и сложные, то есть состоящие из мелких луковиц.
Тычиночные нити	Длина тычиночных нитей равна длине околоцветника, при основании между собой и с околоцветником сросшиеся, наружные шиловидные, внутренние из тупо двузубчатого основания в 2 раза шире наружных;	До 1.5 раз длиннее околоцветника, при основании между собой и с околоцветником сросшиеся, наружные шиловидные, внутренние из тупо двузубчатого основания в 2 раза шире наружных;	Тычинок 6, нитей внутренней мутовки трикуспидальные

Таким образом, изучаемые объекты отличаются выраженностью опушения влагалищных листьев, характером основания, формой и количеством листьев, наличием или отсутствием крыльев на цветоносе. Корзинки имеют разные формы и цвета, разные обертки, различны форма, характер поверхности, размер семян. Луковицы отличаются формой, толщиной и цветом оболочек.

В ходе макроскопического исследования луковиц лука туркестанского нами были установлены морфологические признаки лекарственного растительного сырья:

А) Цельное сырье представляет собой шаровидные луковицы, диаметром (1 – 3) см, наружные оболочки сухие сероватого цвета, бумагообразные, без заметных жилок. Внутренние чешуи белого цвета, утолщающиеся ближе к почке - зачатки. Толщина открытых сочных чешуи колеблется от 0.1 см до 0.3 см. Располагаются концентрическими слоями. В верхней части чешуи образуют шейку луковицы. Запах ароматный, слабо чесночный. Вкус сладковато-жгучий (рисунок 8, А).

В) Измельченное сырье состоит из высушенных крупниц луковиц лука туркестанского беловато-кремового цвета, по текстуре напоминающий консистенцию кукурузной муки. Запах ароматный, слабо чесночный. Вкус сладковато-жгучий (рисунок 8, В).



А) Цельное сырье



В) Измельченное сырье

Рисунок 8 - Луковица *Allium turkestanicum*

В ходе исследований листьев лука молочноцветного нами были установлены макроскопические признаки лекарственного растительного сырья:

А) Для цельного сырья - листья полые, цилиндрической формы заостренные в верхнем конце. Число листьев колеблется от 2 до 3, диаметр листа (0.5 -1.8) см, длина от 21 см до 29 см. Нижние листья короче, верхние - длиннее. Листья темно-зеленые с густым восковым налетом, светло-зеленые со слабым восковым налетом или ярко-зеленые, блестящие без воскового налета, в поперечном разрезе круглые, овальные или 'плоскоовальные (рисунок 9, А).



Первые три настоящих листа имеют меньшие размеры и более округлую форму, чем последующие. Нет резкого запаха. Вкус острый, жгуче-пряный.

В) Измельченное сырье состоит из высушенных частей лука болотно-зеленого цвета. Запах ароматный, специфический. Вкус сладковато-пряный (рисунок 9, В).



А Цельное сырье



В) Измельченное сырье

Рисунок 9 - Макроскопические признаки листьев *Allium galanthum*

Макроскопический анализ луковиц лука молочнокветного показал, что:

А) Цельное сырье представляет собой луковицы коническо-цилиндрической формы, диаметром около 1 см, прикреплены по две-три к горизонтальному корневищу. Наружные оболочки луковиц пленчатые, красновато-коричневого цвета. Сама луковица беловато-салатного, слабо-фиолетового цвета. Вкус острый, жгуче-пряный, луковый (рисунок 10, А).

В) Измельченное сырье состоит из измельченных частиц луковиц белого, фиолетового цвета. Вкус сладковатый, чуть пряный (рисунок 10, В).



А) Цельное сырье



В) Измельченное сырье

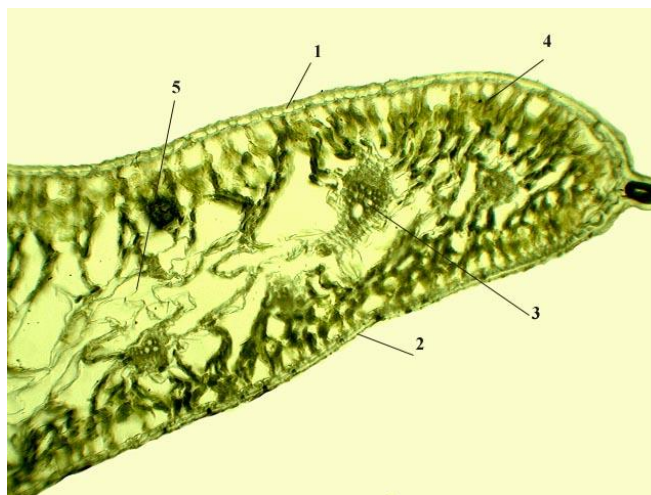
Рисунок 10 - Макроскопические признаки луковиц *Allium galanthum*

По результатам исследования определены признаки, использованные для проекта спецификации качества раздела «Макроскопия» (идентификация) на ЛРС лука туркестанского и лука молочноцветного.

### 3.2 Сравнительное микроскопическое исследование лука туркестанского и лука молочноцветного

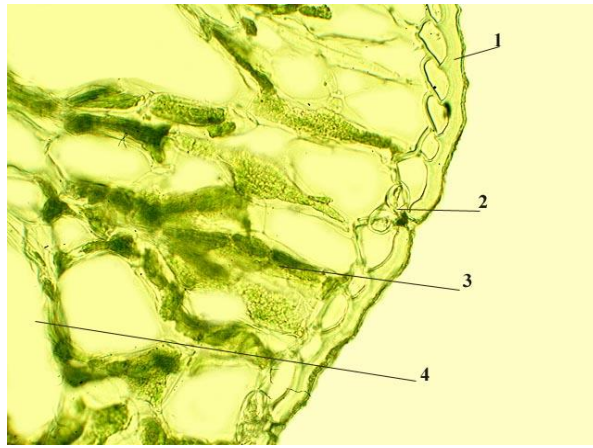
Микроскопические исследования проводили согласно методике, описанной во второй главе. Листья имеют нечетко выраженные строения. *A. turkestanicum* с плоскими листьями характеризуется только одним слоем клеток палисадной паренхимы, а *Allium galanthum* тремя слоями клеток палисадной паренхимы. Клетки эпидермы примерно одинаковы на верхней и нижней сторонах листа. Млечники различаются по размерам и форме клеток, они располагаются через 2-3 клеток палисадной ткани. Губчатая с крупными межклетниками (рисунок 11-13).

Прикорневые листья у исследованных таксонов *Allium turkestanicum*, *Allium galanthum* в поперечном разрезе имеют базальные листья в разрезе D-образные. Как на абаксиальной, так и на адаксиальной поверхности листа хорошо развита кутикула. Эпидермис однослойный. Клетки эпидермиса стенки у *A. turkestanicum* и *A. galanthum* волнистые. Абаксиальные эпидермальные клетки обычно крупнее адаксиальных клеток. Мезофилл дифференцирован на палисадную и губчатую паренхиму - эквивадиальный тип. Вдоль листа проходит проводящая система в виде сосудисто-волокнистых пучков, погруженных в губчатую ткань (рисунок 14). Крупные пучки чередуются с 3 - 4 мелкими. Эпидермальные клетки на поперечном срезе крупные и широкие, почти прямоугольные.



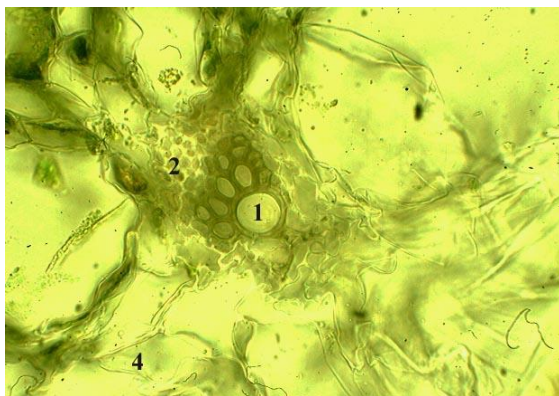
1-нижний эпидермис, 2-верхний эпидермис, 3- проводящий пучок, 4- столбчатый мезофилл, 5- губчатый мезофилл

Рисунок 11 – Микроскопия листа *Allium turkestanicum* (x180)

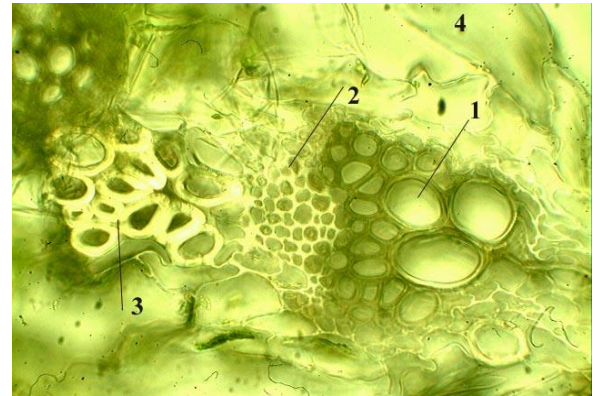


1-эпидермис, 2-устьица, 3- столбчатый мезофилл, 4- губчатый мезофилл

Рисунок 12 – Край листовой пластинки *Allium turkestanicum* (x720)



(x180)



(x720)

1-ксилема, 2- флоэма, 3- склеренхима, 4- губчатый мезофилл

Рисунок 13 – Проводящий пучок листа *Allium turkestanicum*

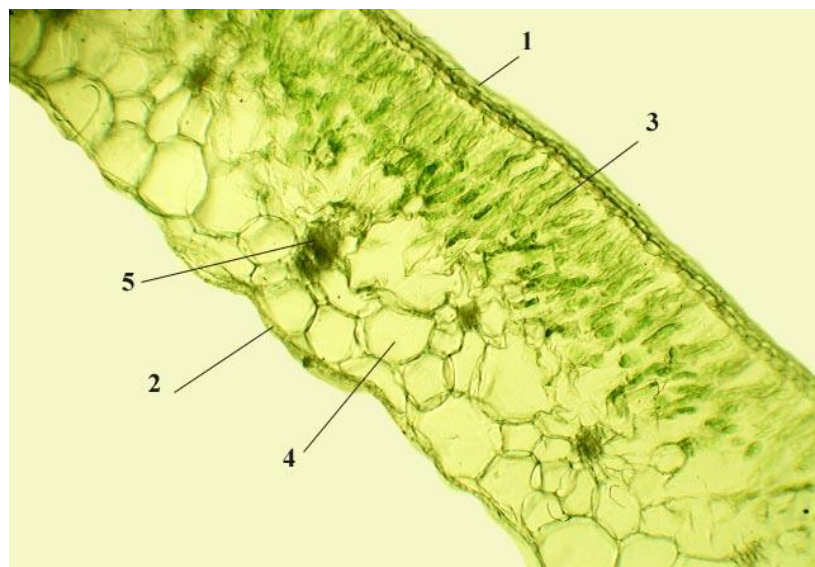


Рисунок 14 – Анатомия листа *Allium galanthum*

Жилкование листьев параллельное, закрытого типа. Жилки сходятся и сливаются у верхушки листа. Проводящие пучки располагаются двумя рядами, из которых верхний представлен только мелкими пучками.

#### *Микроскопия эпидермиса*

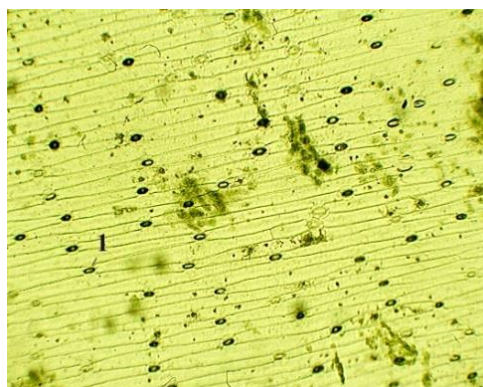
Эпидерма листа у исследованных видов лука состоит из плотно сомкнутых удлинённых клеток, почти одинаковых на верхней и нижней сторонах. По форме и расположению клеток эпидермы виды заметно различаются. У видов лука с плоскими листьями клетки эпидермы более длинные.

У *A.turkestanicum* отношение ширины клетки к ее длине составляет в среднем 1:18 и более, а у *A. galanthum* соотношение составляет 1:9. Конфигурация эпидермальных клеток и толщина их оболочек также различаются. *A.turkestanicum* имеет более толстые оболочки клеток по сравнению с *A.galanthum*, причем у *A.galanthum* клетки округлые, с некоторым утолщением на углах вблизи устьичной щели округло-заостренные, у *A.turkestanicum* - узкие концы эпидермальных клеток тупые, слегка округлые.

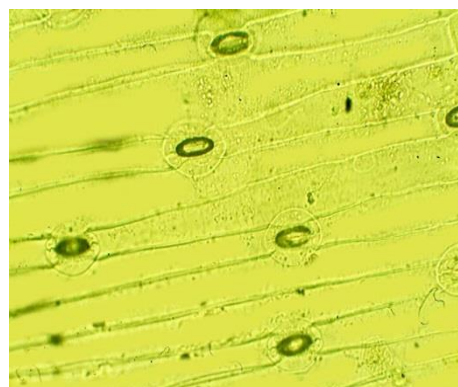
У обоих видов лука на поперечных срезах эпидермы хорошо видны кутикула и ее слои, занимающие около половины наружной сильно утолщенной оболочки клеток эпидермы. Собственно кутикула мало различается у видов по толщине, хотя она сильнее выражена у *A.turkestanicum*. Строение кутикулы у отдельных видов имеет определенное строение. Оба вида имеют бороздчатую или же кутикула имеет выросты в виде острых гребней над серединой клетки.

Для всех исследованных видов лука характерно углубленное расположение устьиц, причем особенно глубоко залегают замыкающие клетки у видов с утолщенной наружной оболочкой эпидермальных клеток (рисунок 15, 16). Количество устьиц на 1 мм<sup>2</sup> поверхности листа у *A. turkestanicum* - 86, у *A. galanthum* – 54 [191].

У видов с плоскими листьями количество устьиц на верхней и нижней сторонах листа не различается.

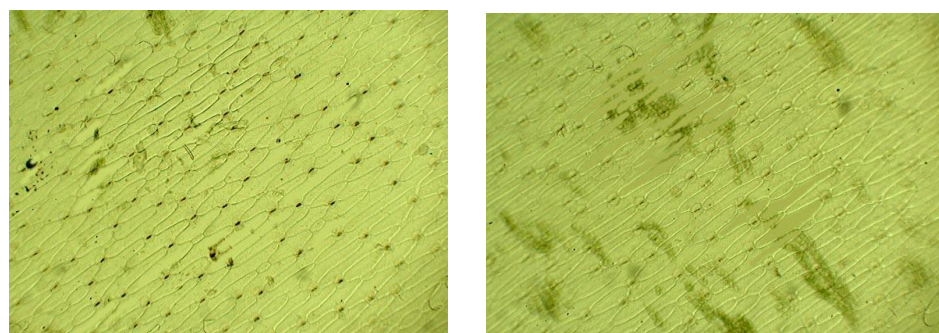


А (x180)

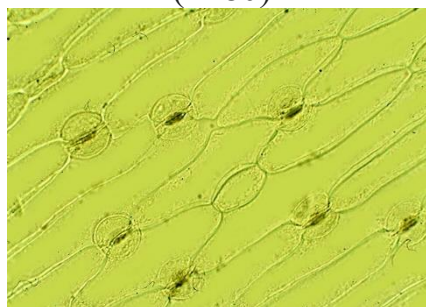


В (x720)

Рисунок 15 – Строение устьиц листа *Allium turkestanicum*



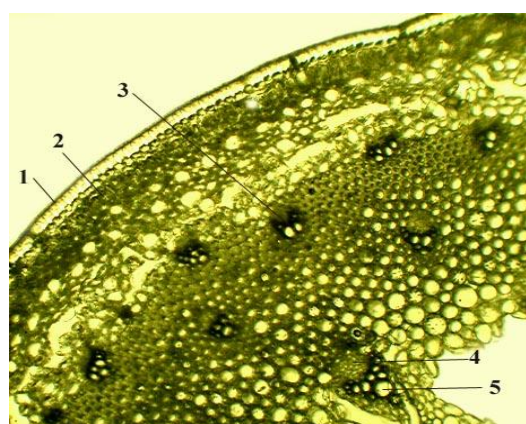
(x180)



(x720)

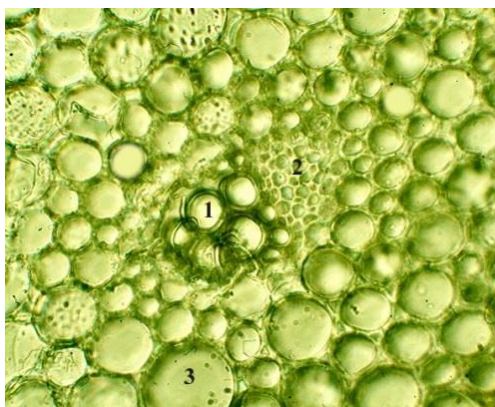
Рисунок 16 – Строение устьиц *Allium galanthum*

В целом поперечном срезе у *Allium turkestanicum* толстая кутикула на внешней части однослойный эпидермис, клетки которого имеют изодиаметрическую форму. Первичная кора 4-7-слойная и состоит из яйцевидных и тонкостенных паренхиматозных клеток. Эти клетки имеют размер (47 – 78) мкм. В коре наблюдались сильно крахмальные зерна. Склеренхиматическая ткань, состоящая из круглой полосы вдоль поперечного сечения над проводящим пучком, состоящая из 5-6 слоев клеток. Ксилема покрывает более широкую площадь, чем флоэма, клетки которой фрагментированы. Сердцевина состоит из паренхиматозных клеток, расширяющиеся внутрь у всех видов (рисунок 17 -19).



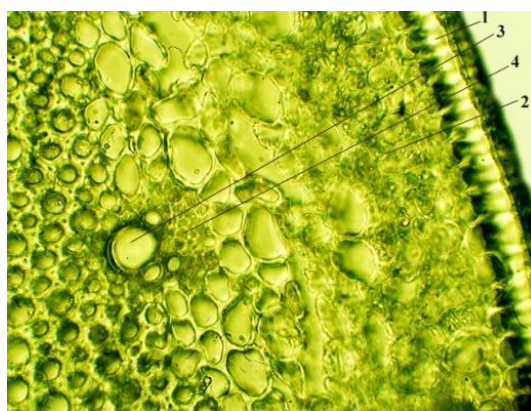
1-эпидермис, 2- первичная кора, 3-проводящий пучок, 4-флоэма, 5-ксилема

Рисунок 17 – Анатомическое строение стебля *Allium turkestanicum* (x180)



1-ксилема, 2-флоэма, 3-сердцевинная паренхима

Рисунок 18 – Сердцевина стебля *Allium turkestanicum* (x720)



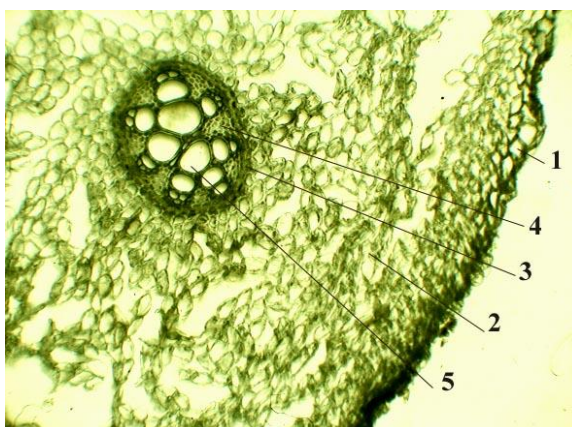
1-эпидермис, 2- первичная кора, 3-ксилема, 4-флоэма

Рисунок 19 – Микроскопия периферии стебля *Allium turkestanicum* (x720)

#### *Микроскопия луковиц.*

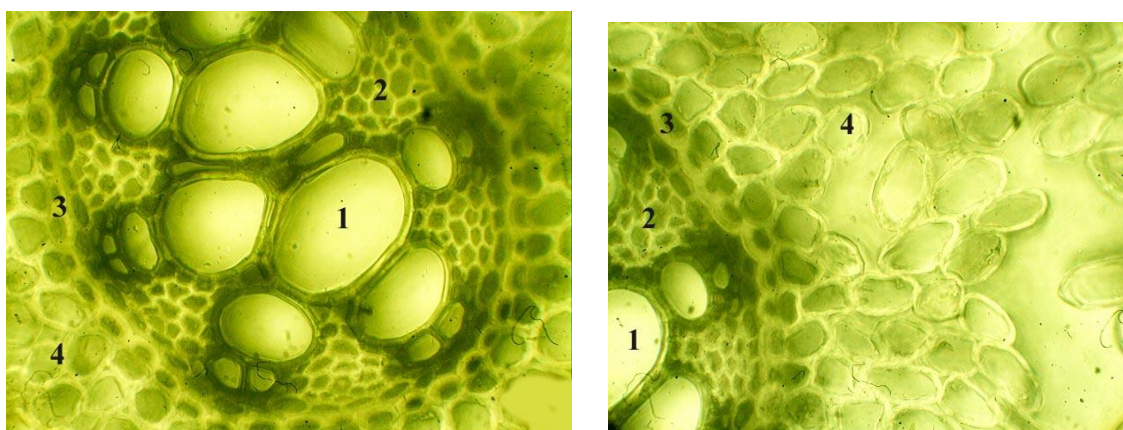
Поперечный разрез луковиц имеет следующее строение. Эпидермис состоит из однослойных, компактно расположенных клеток. Эти клетки имеют неправильную форму, разные размеры и имеют кубическую форму. Клетки эпидермиса *Allium turkestanicum* (31 – 46) мкм, *Allium galanthum* (35 – 49) мкм. Первичная кора состоит примерно из 4-5 слоев тонкостенных, паренхиматозных клеток и межклеточных пространств. При перемещении внутрь размер клеток уменьшается, и самые мелкие клетки располагаются рядом с эндодермой. Эндодерма однорядная, с заметными каспарными полосками.

Толщина эндодермальных клеток *Allium turkestanicum* (3,7 - 5,3) мкм, *Allium galanthum* (3,3 - 4,7) мкм. Внутри эндодермы, однослойной и периферической по отношению к тканям сосудов расположен перицикл. Лук туркестанский имеет единственную метаксилему, которая присутствует в средней части сосудистого цилиндра (рисунок 20 - 22). Образцы лука молочноцветного имеют две метаксилемы (рисунок 23).



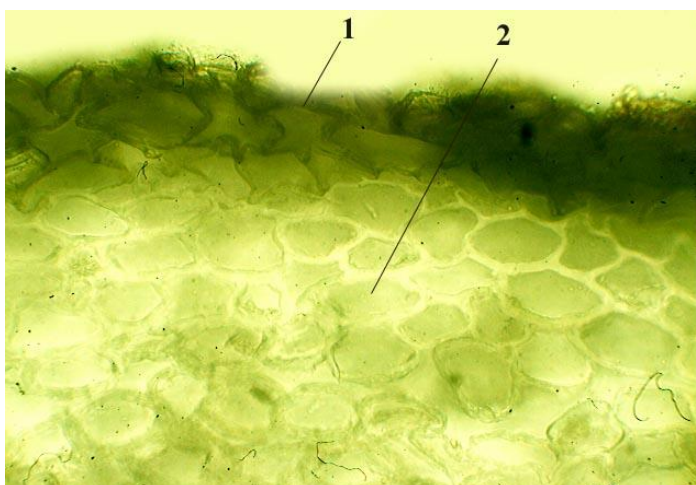
1-эпидермис, 2- первичная кора, 3- эндодерма, 4- флоэма, 5-ксилема

Рисунок 20 – Анатомическое строение луковицы *Allium turkestanicum* (x180)



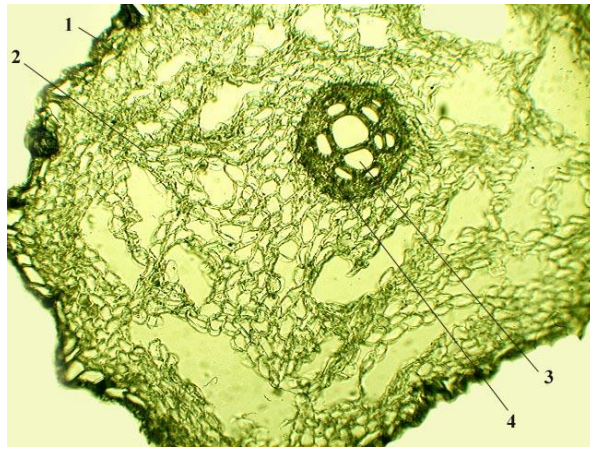
1-ксилема, 2-флоэма, 3- эндодерма, 4- паренхима первичной коры

Рисунок 21 – Сердцевина луковицы *Allium turkestanicum* (x720)

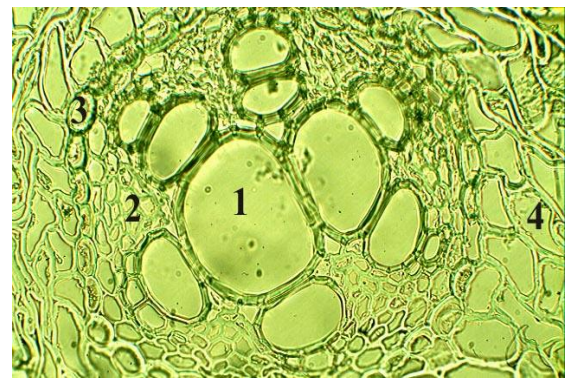
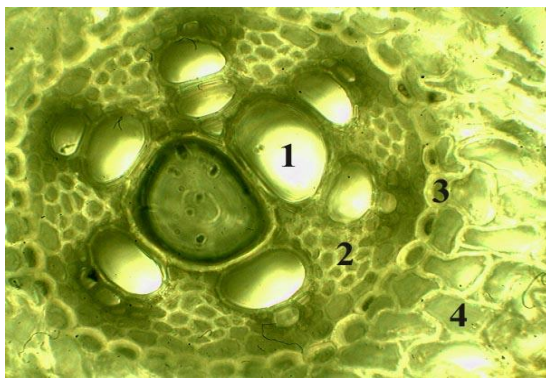


1-эпидермис, 2- паренхима

Рисунок 22 – Первичная кора *Allium turkestanicum* (x180)



А – поперечный срез (x180)



В – сердцевина корня (x720)

1-метаксилема, 2 -флоэма, 3 –эндодерма, 4- первичная кора

Рисунок 23 – Анатомическое строение луковицы *Allium galanthum*

Согласно анатомическим исследованиям, в клеточных стенках эндодермы поперечных сечений корней имеется отчетливое утолщение. Клетки эндодермы этого типа были обнаружены у большинства однодольных растений. В поперечных срезах корней *Allium turkestanicum* имеет единственную метаксилему, которая присутствует в средней части сосудистого цилиндра, *Allium galanthum* имеет две метаксилемы.

Поперечный срез стебля *Allium turkestanicum* имеют яйцевидную форму. Согласно результатам настоящего исследования сосудистые пучки в стебле располагались в единое кольцо. В большом количестве содержится крахмал.

Различия между двумя видами отмечены по толщине мезофилла, *A. galanthum* –  $(15,3 \pm 0,1)$  мкм, *A. turkestanicum* –  $(11,7 \pm 0,2)$  мкм. Толщина мезофилла прямо зависима от толщины листа. У лука молочнокветного клетки палисадной паренхимы листа узкие и длинные, плотно прилегающие друг к другу, без межклетников, у листьев лука туркестанского палисадную ткань образуют широкие клетки со слабо изогнутыми периклинальными и чаще антиклинальными перегородками, отчего они кажутся почти прямоугольными. Клетки не плотно прилегают друг к другу, образуя межклетники. Различаются



виды и строением губчатой ткани листьев, клетки *A. galanthum* более крупные, чем у *A. turkestanicum*.

Число сосудистых пучков в поперечном сечении основного листа *A. galanthum* - 22, *A. turkestanicum* - 18. Кутикула основного листа *A. galanthum* толще *A. turkestanicum*. У обоих видов есть четкое разделение мезофилла основного листа на палисадную и губчатую паренхиму. Стенки клеток эпидермиса волнистые. Число устьиц на 1 мм<sup>2</sup> поверхности листа значительно больше *A. turkestanicum*, чем у *A. galanthum*.

Таким образом, определены анатомо-диагностические показатели идентификации изучаемых объектов, необходимые для включения в проект спецификации качества на ЛРС лука молочнокветного и лука туркестанского.

### Выводы к третьей главе

Проведено сравнительное морфолого-анатомическое изучение ЛРС *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum*.

Установлены диагностические морфологические признаки, позволяющие идентифицировать ЛРС лука туркестанского и лука молочнокветного: при изучении цельного сырья: форма - размер, цвет; запах и вкус; при изучении измельченного сырья: цвет, вкус, структура измельченного сырья. Установленные морфологические признаки луковиц лука туркестанского: луковицы шаровидной формы, диаметром (1 – 3) см, наружные оболочки сухие сероватого цвета, бумагообразные, без заметных жилок; внутренние чешуи белого цвета, запах ароматный, слабо чесночный; вкус сладковато-жгучий. Луковица лука молочнокветного характеризуется коническо-цилиндрической формой, беловато-салатного, слабо-фиолетового цвета, вкус острый, жгуче-пряный, луковый. Установленными морфологическими признаками листьев лука молочнокветного являются: полые, цилиндрической формы заостренные в верхнем конце, темно-зеленые с густым восковым налетом, светло-зеленые со слабым восковым налетом или ярко-зеленые, блестящие без воскового налета, в поперечном разрезе круглые, овальные или 'плоскоовальные, нет резкого запаха.

Установлены диагностико-анатомические признаки, позволяющие отличить луковицу *Allium turkestanicum* от луковицы *Allium galanthum*: толщина эндодермальных клеток *Allium turkestanicum* (3,7 - 5,3) мкм, *Allium galanthum* (3,3 - 4,7) мкм. Внутри эндодермы по отношению к тканям сосудов расположен перицикл: однослойный и периферический. *Allium turkestanicum* имеет единственную метаксилему, которая присутствует в средней части сосудистого цилиндра. Образцы *Allium galanthum* имеют две метаксилемы. Листья имеют нечетко выраженные строения. *A. turkestanicum* с плоскими листьями характеризуется только одним слоем клеток палисадной паренхимы, а *Allium galanthum* тремя слоями клеток палисадной паренхимы. Клетки эпидермы примерно одинаковы на верхней и нижней сторонах листа. Млечники различаются по размерам и форме клеток, они располагаются через 2-3 клеток палисадной ткани. Для всех исследованных видов лука характерно углубленное расположение устьиц, причем особенно глубоко залегают замыкающие клетки у видов с утолщенной наружной оболочкой эндодермальных клеток. Количество устьиц на 1 мм<sup>2</sup> поверхности листа у *A. turkestanicum* - 86, у *A. galanthum* – 54

Определены показатели идентификации луковиц лука туркестанского, луковиц и листьев лука молочнокветного по показателям: макроскопия, микроскопия.

## 4 ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ЛУКА ТУРКЕСТАНСКОГО (*ALLIUM TURKESTANICUM*) И ЛУКА МОЛОЧНОЦВЕТНОГО (*ALLIUM GALANTHUM*)

### 4.1 Идентификация основных групп БАВ сырья *A. turkestanicum* и *A. galanthum*

*Качественный анализ.* Для подтверждения наличия основных групп биологически активных соединений в сырье лука туркестанского и лука молочнокветного нами были проведены качественные реакции, описанные во второй главе (таблица 8).

Таблица 8 – Качественный анализ сырья для идентификации основных групп БАВ

Качественная реакция	Результаты реакции	
	<i>Allium turkestanicum</i>	<i>Allium galanthum</i>
Аминокислоты		
С раствором нингидрида Р	Сине-фиолетовое окрашивание	Фиолетовое окрашивание
Дубильные вещества		
С железоаммониевыми квасцами	Сине-черный	Синий
Полисахариды		
С этанолом 95 %	Аморфный осадок	Аморфный осадок
Сапонины		
С кислотой серной концентрированной, спиртом этиловым и 10% раствором железа сернокислого,	Сине-зеленое Окрашивание	Сине-зеленое окрашивание
Флавоноиды		
С 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида	Желтое окрашивание	Желтое окрашивание
Эфирные масла		
С 1% раствором брома в хлороформе	Голубое окрашивание	Голубое окрашивание
Аскорбиновая кислота		
С 0,1 М раствором йода Р	Обесцвечивание	Обесцвечивание

*Количественный анализ.* Для количественного определения обнаруженных групп соединений в извлечениях сырья лука туркестанского и лука молочнокветного были проведены спектрофотометрический (сапонины, флавоноиды), перманганатометрический (дубильные вещества) и гравиметрический (полисахариды) методы исследования. Определение содержания сапонинов осуществляли при длине волны 518 нм, флавоноидов в диапазоне (430 – 435) нм. Результаты анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Количественное определение основных групп соединений сырья

Класс БАВ	Растительное сырье		
	Листья <i>A.galanthum</i> в %	Луковица <i>A.galanthum</i> , в %	Луковица <i>A.turkestanicum</i> , в %
Дубильные вещества	0.327 ± 0.016	0.412 ± 0.025	0.374 ± 0.018
Полисахариды	2.174 ± 0.161	2.085 ± 0.121	2.124 ± 0.148
Сапонины	0.358 ± 0.008	0.552 ± 0.032	0.627 ± 0.032
Флавоноиды	2.692 ± 0.026	2.425 ± 0.024	2.072 ± 0.024
Эфирные масла	0.112 ± 0.004	0.168 ± 0.004	0.172 ± 0.004

Результат предварительного исследования количественного определения основных групп соединений показал, что флавоноиды содержатся в большем количестве в исследуемых объектах. Поэтому, руководствуясь известным широким спектром биологической активности флавоноидов, было целесообразно их более глубокое исследование.

Методом ВЭЖХ этанольных извлечений листьев и луковиц лука молочнокветного и луковиц лука туркестанского идентифицировано 13 флавоноидов: кверцетин тригликозид, таксифолин глюкозид, кверцетин дигексозид, кемпферол диглюкозид, кемпферол диглюкозид, цианидин глюкозид, дигидрокверцетин, изорхамнетин диглюкозид, изокверцетин, кемпферол глюкозид, изорхамнетин глюкозид, кверцетин, кемпферол (рисунок 24-26) [192].

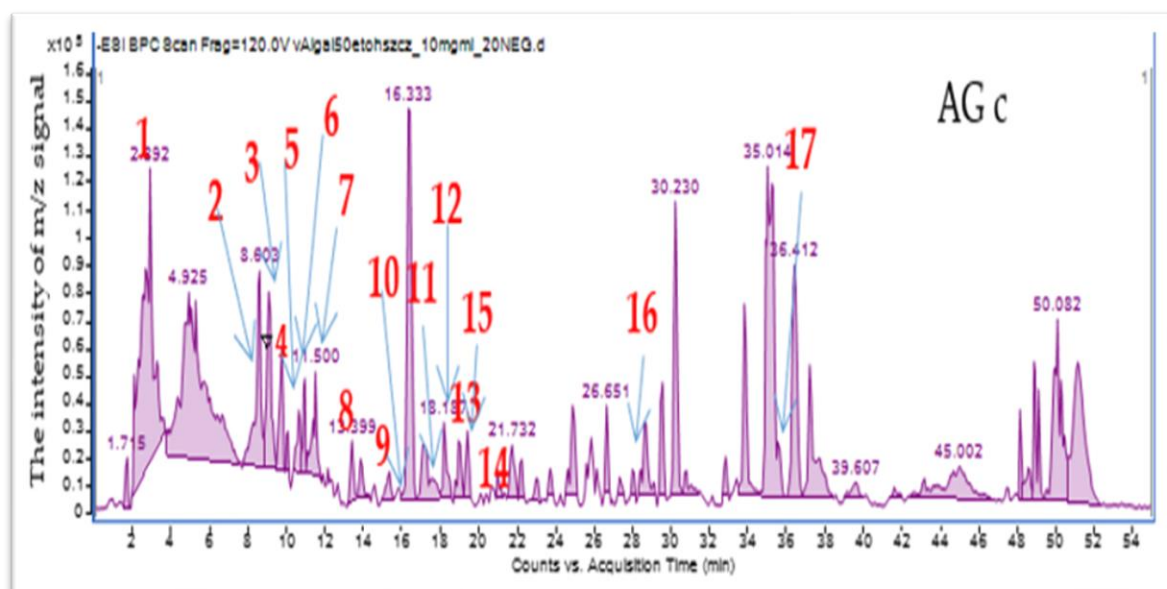


Рисунок 24 - Хроматограмма этанолового извлечения листьев лука молочнокветного

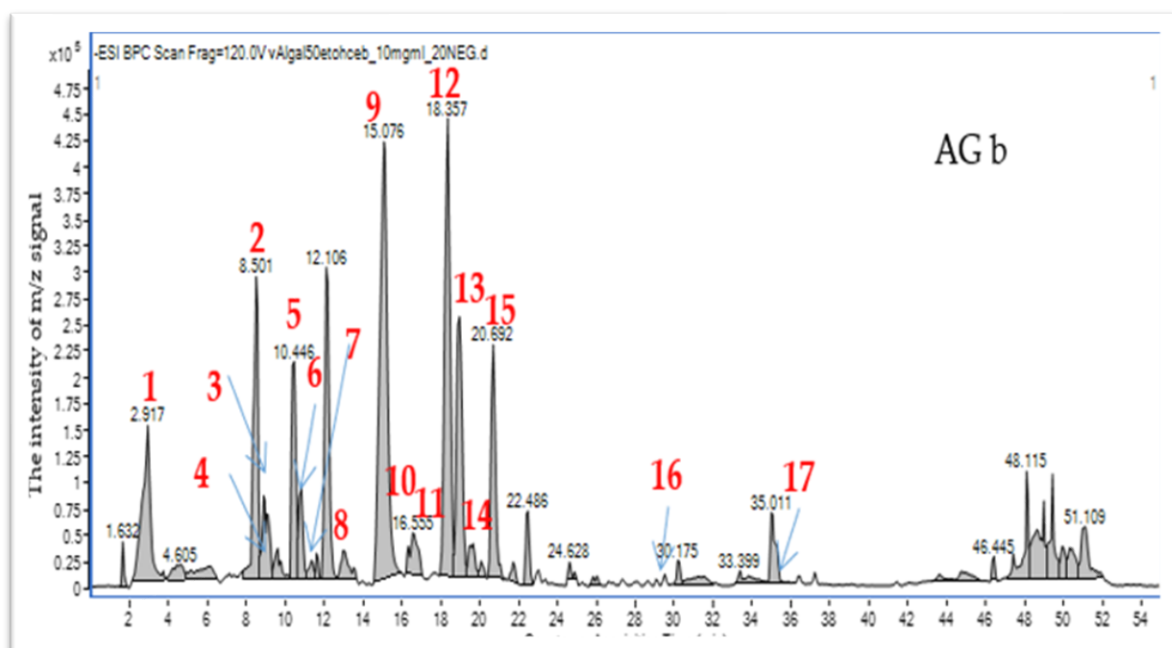


Рисунок 25 - Хроматограмма этанолового извлечения луковиц лука молочнокветного

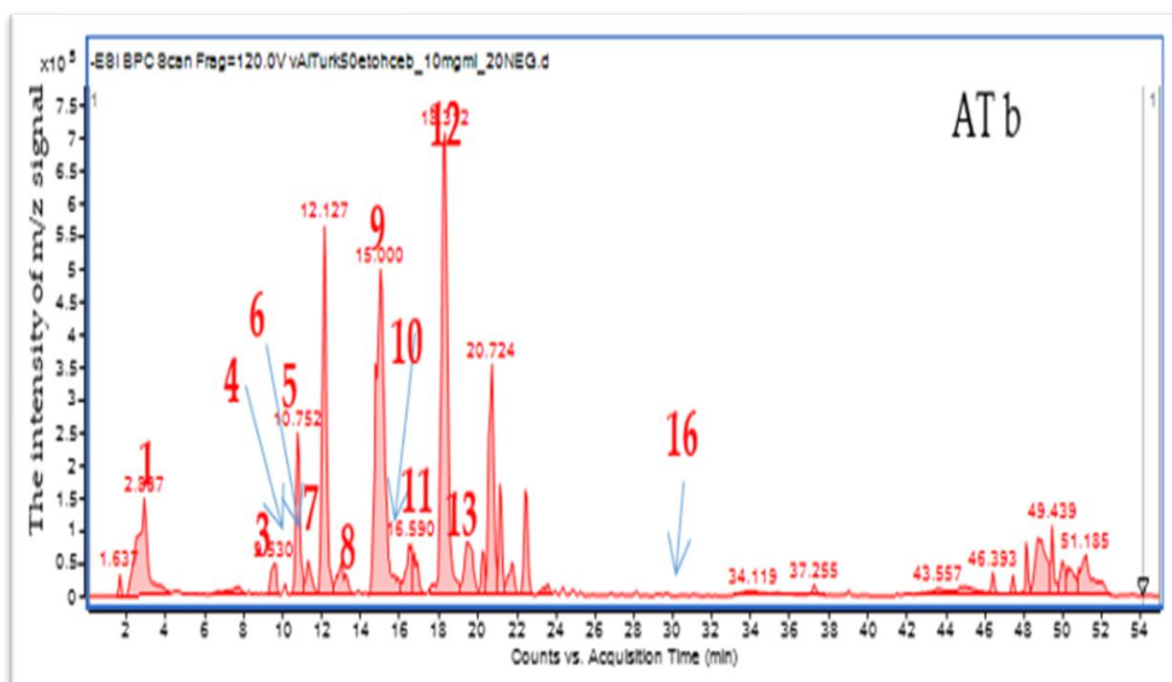
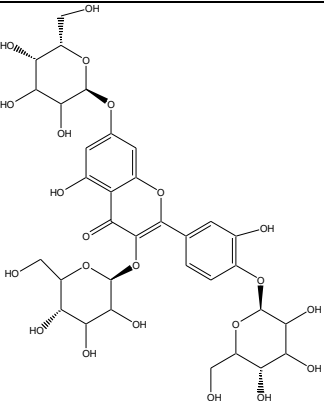
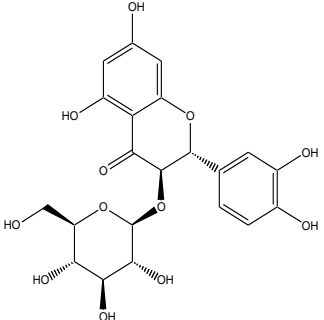
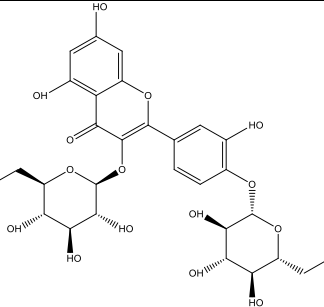
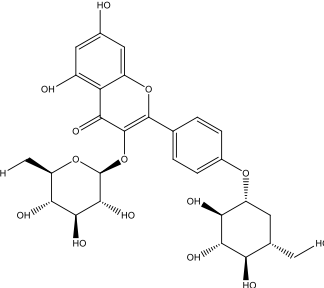
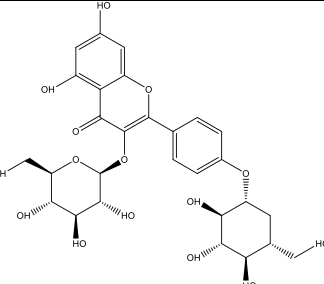


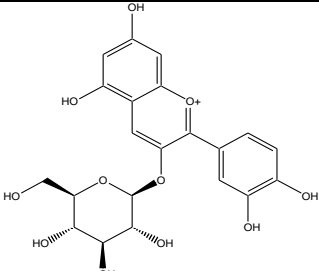
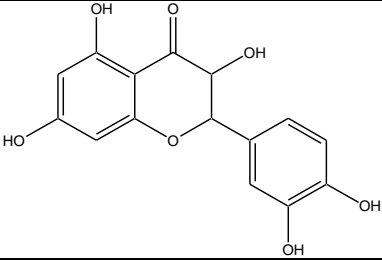
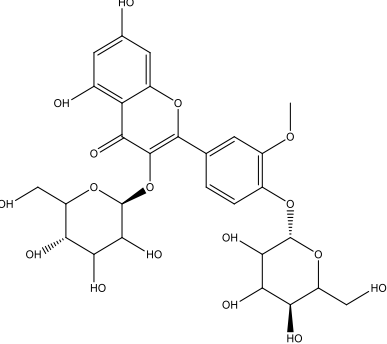
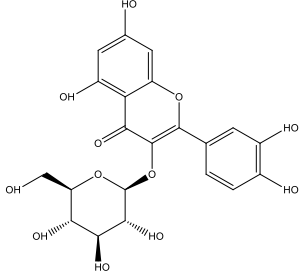
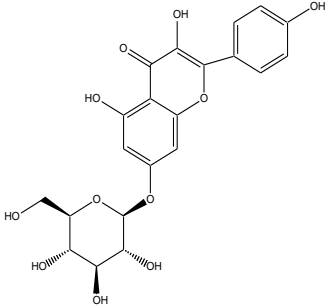
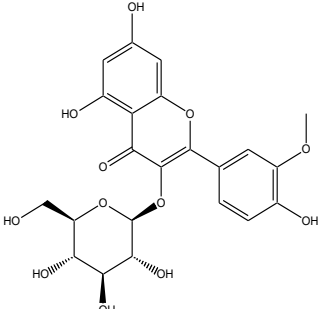
Рисунок 26 - Хроматограмма этанолового извлечения луковиц лука туркестанского

Молекулярные и структурные формулы идентифицированных флавоноидов и фрагменты тандемной масс-спектрометрии (МС-МС) представлены в таблице 10.

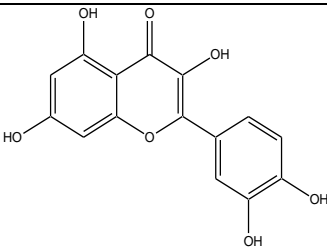
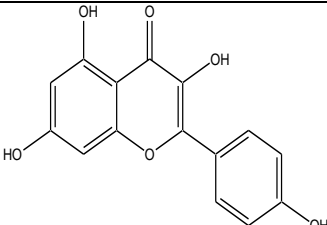
Таблица 10 - Характеристика флавоноидов, выделенных из ЛРС лука молочноцветного и лука туркестанского методом ВЭЖХ-МС-МС

Наименование соединения и брутто формула	Структурная формула	Время удерживания (мин)	Фрагменты MS/MS
1	2	3	4
Тригликозид кверцетина $C_{33}H_{40}O_{22}$		8.2	625, 463
Таксифолин глюкозид $C_{21}H_{22}O_{12}$		8.7	303, 285
Кверцетин дигексозид $C_{27}H_{30}O_{17}$		10.4	463, 301
Кемпферол диглюкозид $C_{27}H_{30}O_{16}$		10.5	283
Кемпферол диглюкозид $C_{27}H_{30}O_{16}$		11.6	285

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
<p>Цианидин глюкозид <math>C_{21}H_{21}O_{11}</math></p>	 <p>The structure shows a cyanidin cation core (a 2-phenylchromone with a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position) linked via its 3-OH group to a glucose molecule in its pyranose form. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	<p>13.1</p>	<p>287</p>
<p>Дигидрокверцетин <math>C_{15}H_{12}O_7</math></p>	 <p>The structure shows a flavan-3-ol core (a 2-phenylchromone with a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position) where the 4-position of the chromone ring is saturated. It has hydroxyl groups at C5, C7, and C8, and a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position.</p>	<p>16.0</p>	<p>285</p>
<p>Исорхамнетин диглюкозид <math>C_{28}H_{32}O_{17}</math></p>	 <p>The structure shows an isoxanthone core (a 2-phenylchromone with a 4-methoxyphenyl group at the 3-position) linked via its 3-OH group to a glucose molecule. The glucose is further linked to a second glucose molecule at its C6 position. The second glucose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	<p>16.9</p>	<p>315</p>
<p>Изокверцетин <math>C_{21}H_{20}O_{12}</math></p>	 <p>The structure shows a quercetin core (a 2-phenylchromone with hydroxyl groups at C5, C7, and C8, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at the 3-position) linked via its 3-OH group to a glucose molecule. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	<p>18.7</p>	<p>301, 151</p>
<p>Кемпферол глюкозид <math>C_{21}H_{20}O_{11}</math></p>	 <p>The structure shows a quercetin core (a 2-phenylchromone with hydroxyl groups at C5, C7, and C8, and a 4-hydroxyphenyl group at the 3-position) linked via its 3-OH group to a glucose molecule. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	<p>19.8</p>	<p>284, 174</p>
<p>Изорамнетин глюкозид <math>C_{22}H_{22}O_{12}</math></p>	 <p>The structure shows an isoxanthone core (a 2-phenylchromone with a 4-methoxyphenyl group at the 3-position) linked via its 3-OH group to a glucose molecule. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	<p>20.8</p>	<p>314</p>

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
Кверцетин $C_{15}H_{10}O_7$		29.6	301
Кемпферол $C_{15}H_{10}O_6$		35.5	285, 79

Идентификация компонентов в режиме МС/МС с высоким разрешением в извлечениях основывались на их спектрах фрагментации, в прямом сравнении с решениями стандартов, на основе данных аналитической литературы и открытых баз данных (Metlin).

Спектры МС/МС предварительно идентифицированных флавоноидов этанольных извлечений из листьев и луковиц лука молочнокветного, луковиц лука туркестанского представлены на рисунках 27–38.

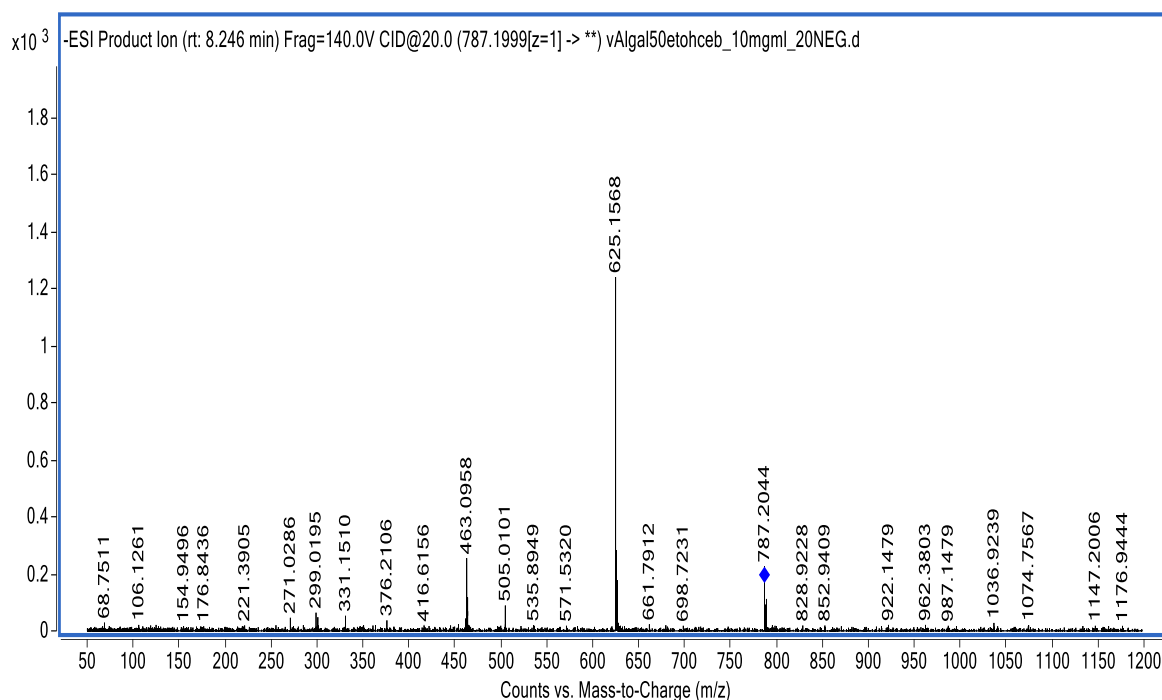


Рисунок 27 - МС/МС спектры кверцетина тригликозида



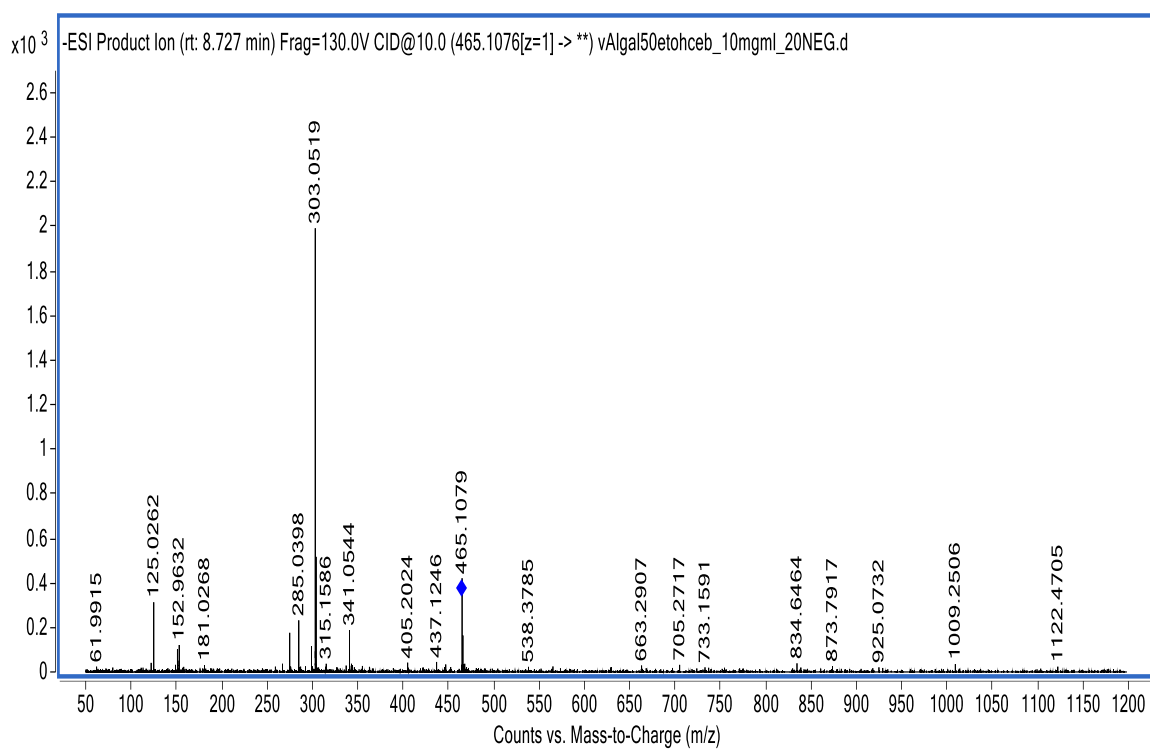


Рисунок 28 - MS/MS спектры таксифолин глюкозида

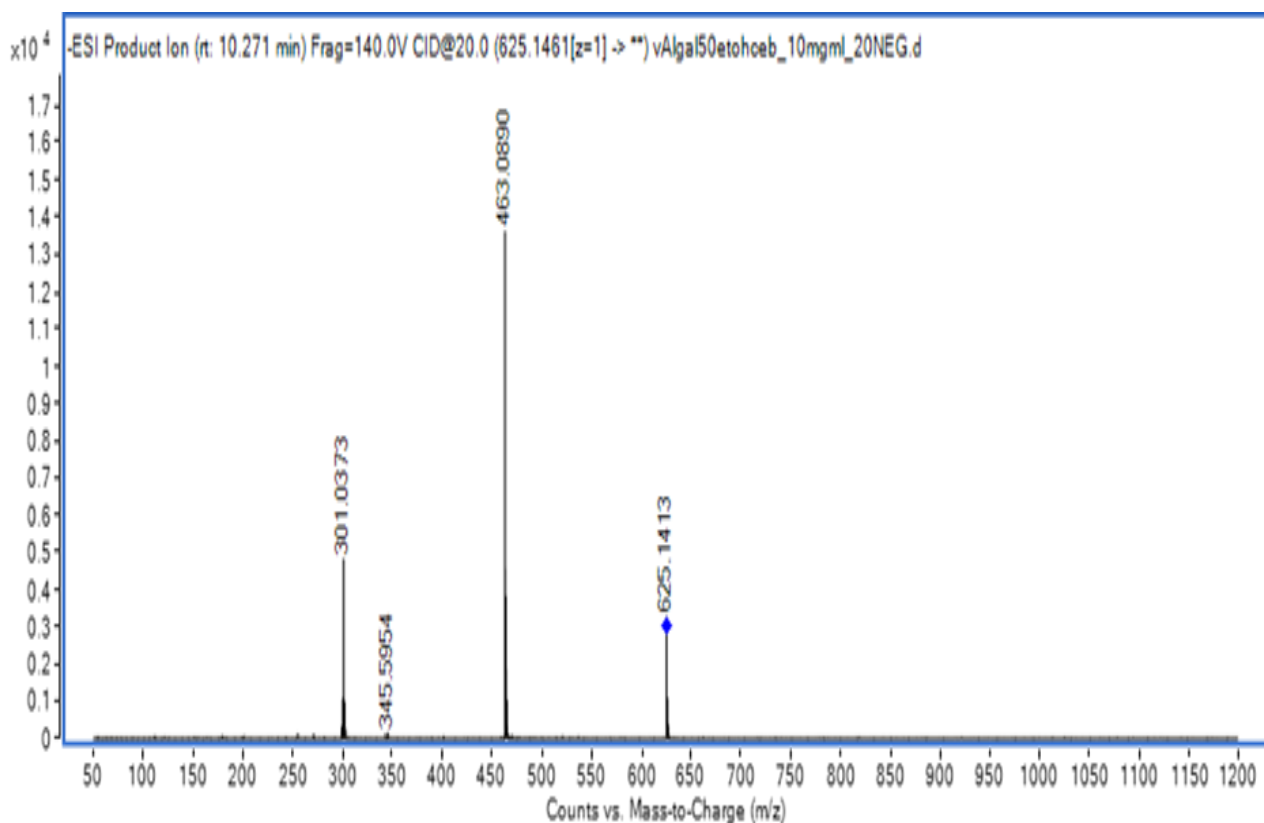


Рисунок 29 - MS/MS спектры кверцетина дигексозида

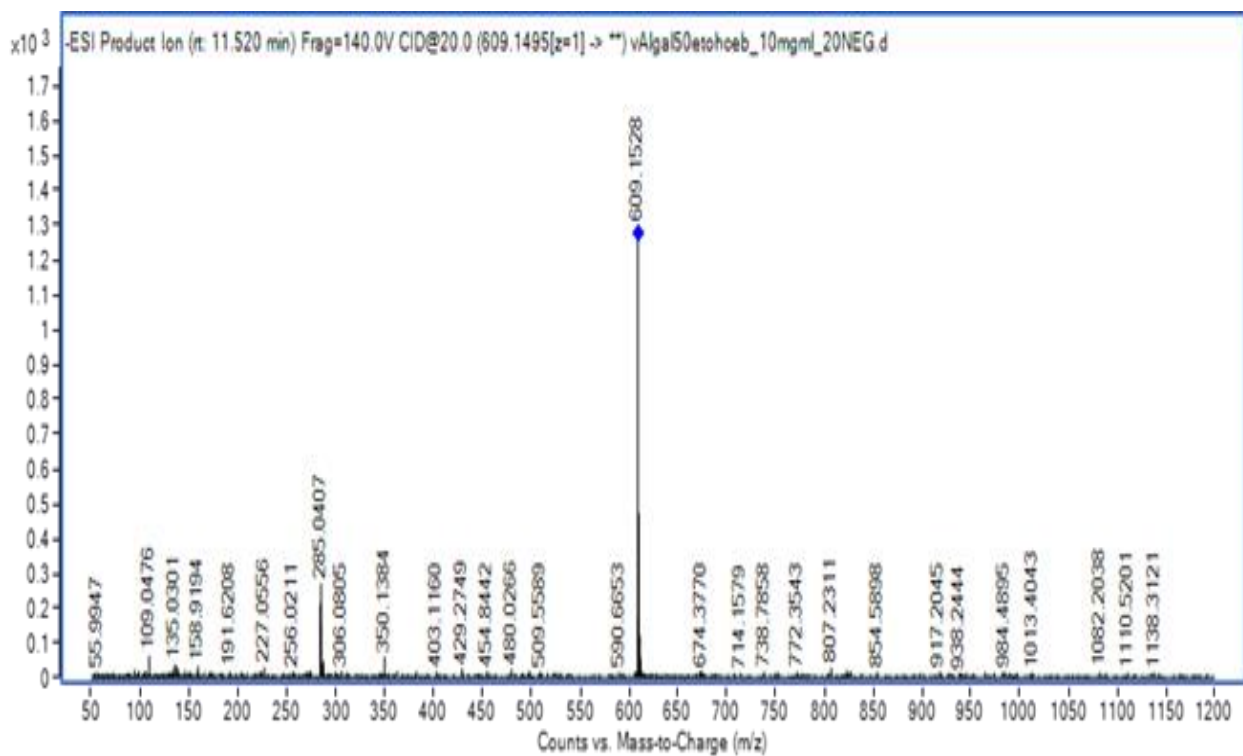


Рисунок 30 - МС/МС спектры кемпферола дигликозид

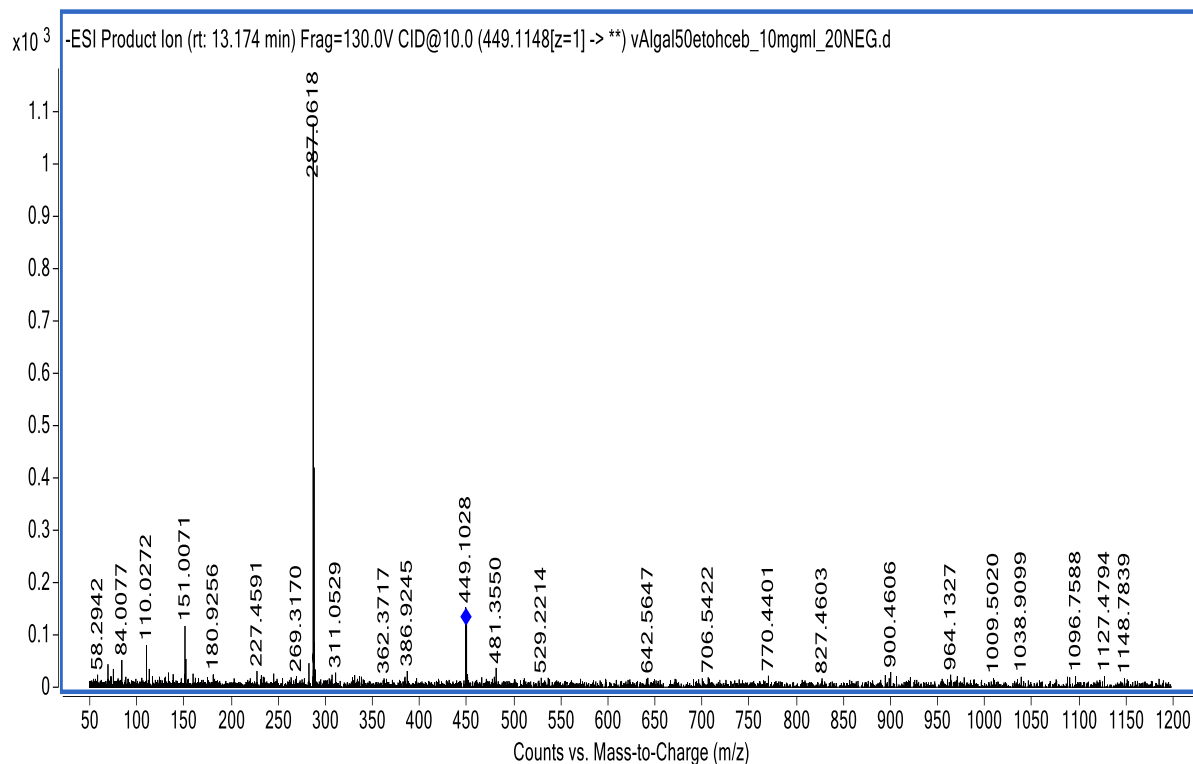


Рисунок 31 - МС/МС спектры цианидина глюкозида

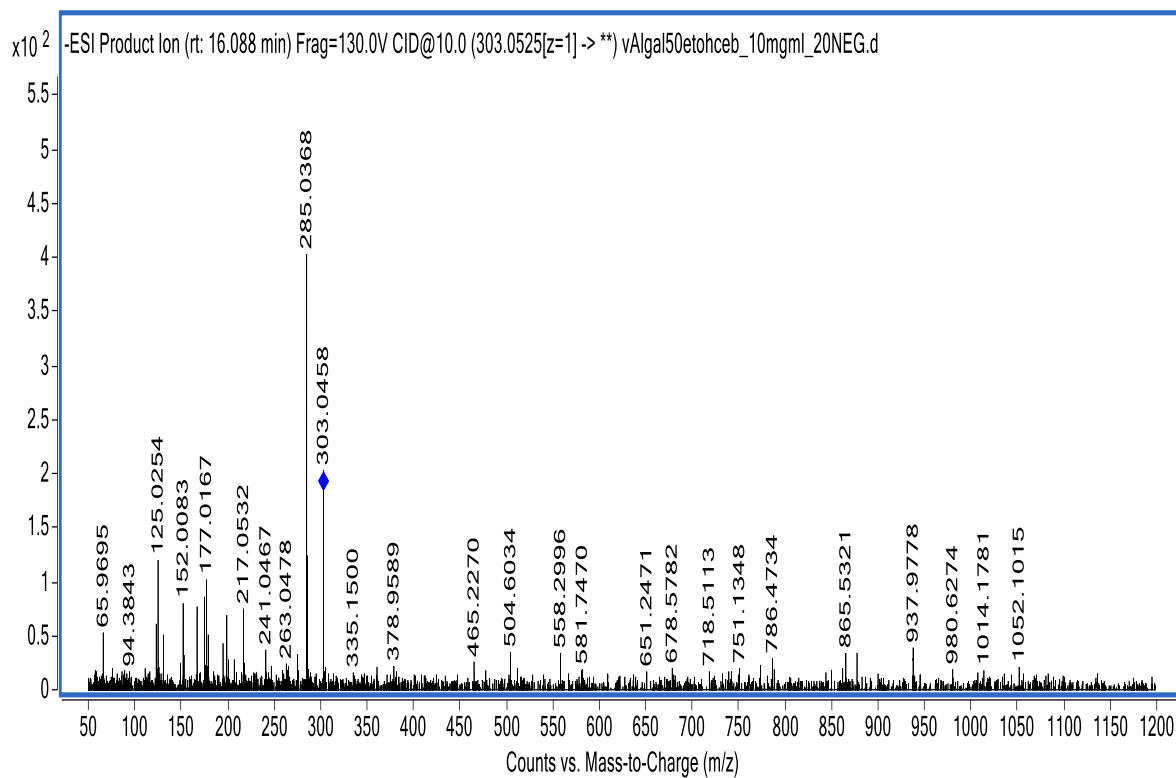


Рисунок 32 - МС/МС спектры дигидрокверцетина

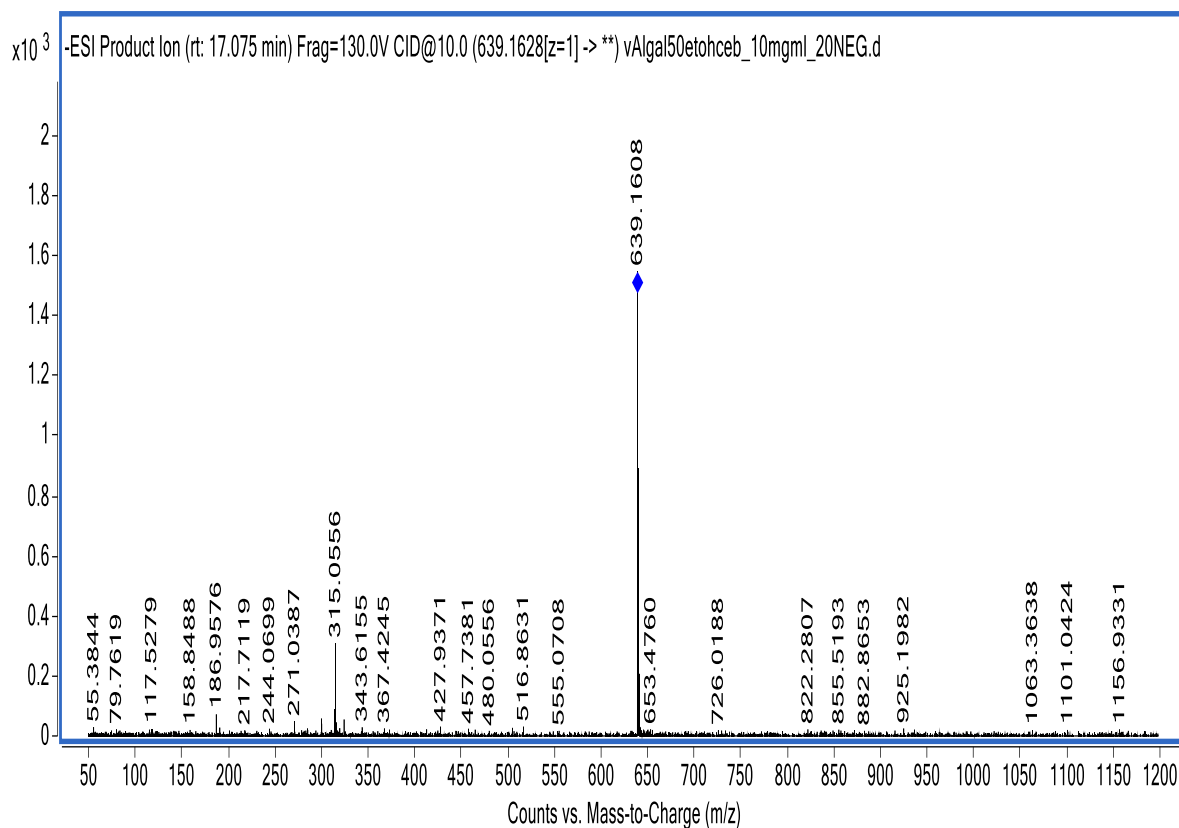


Рисунок 33 - МС/МС спектры изорхамнетина диглюкозида

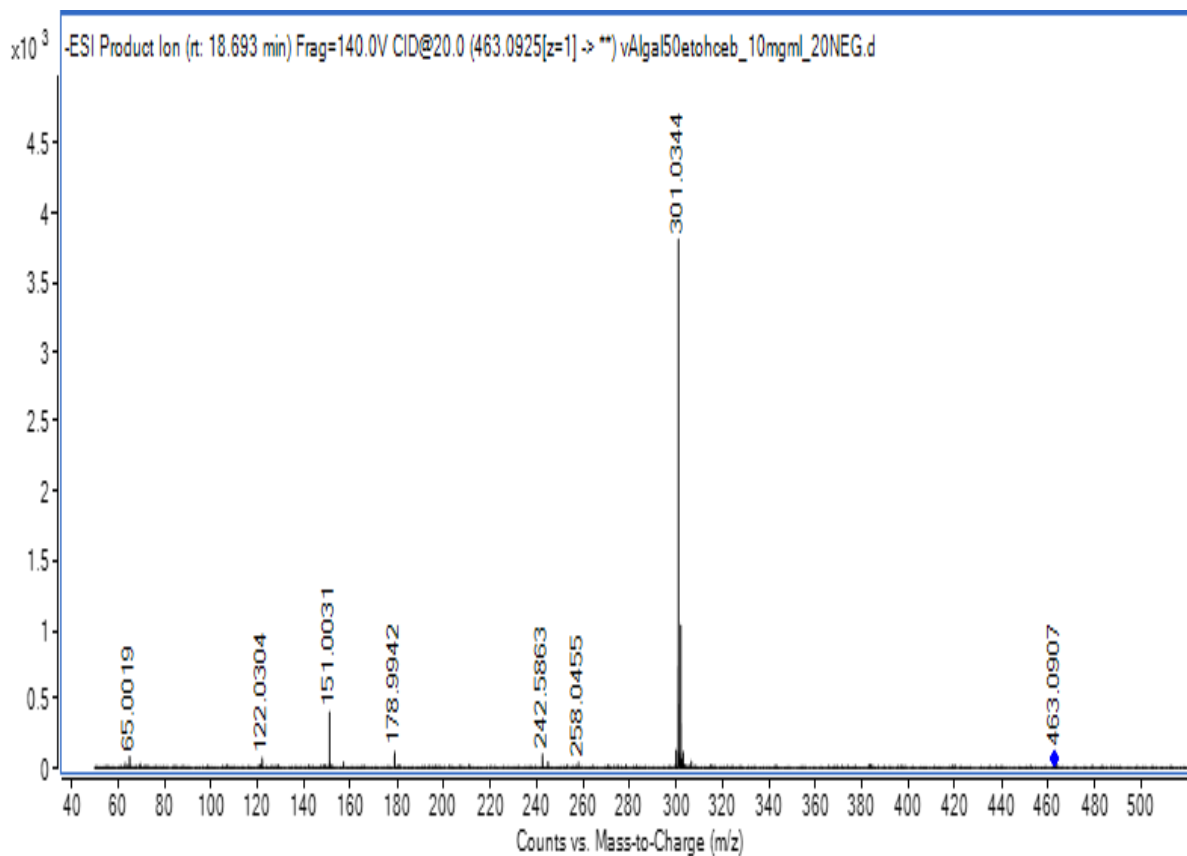


Рисунок 34 - MS/MS спектры изокверцитина

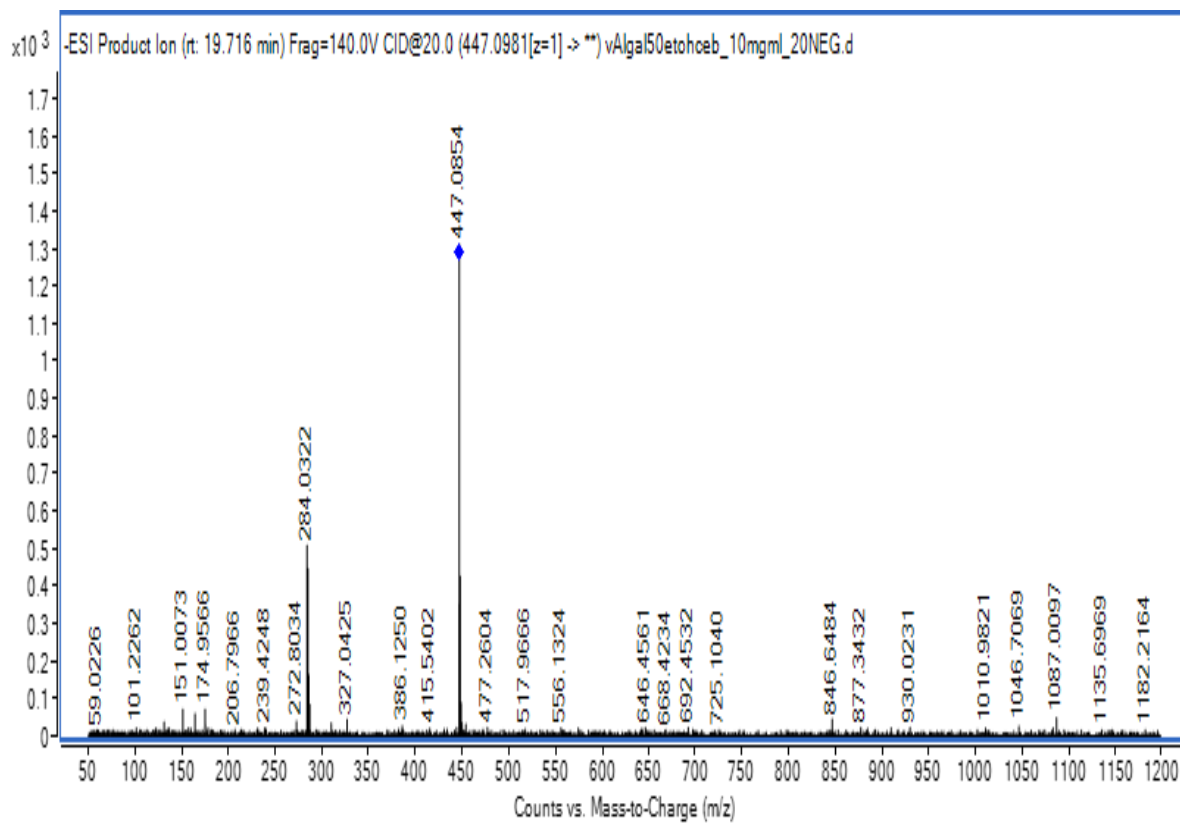


Рисунок 35 - MS/MS спектры кемпферол гликозида

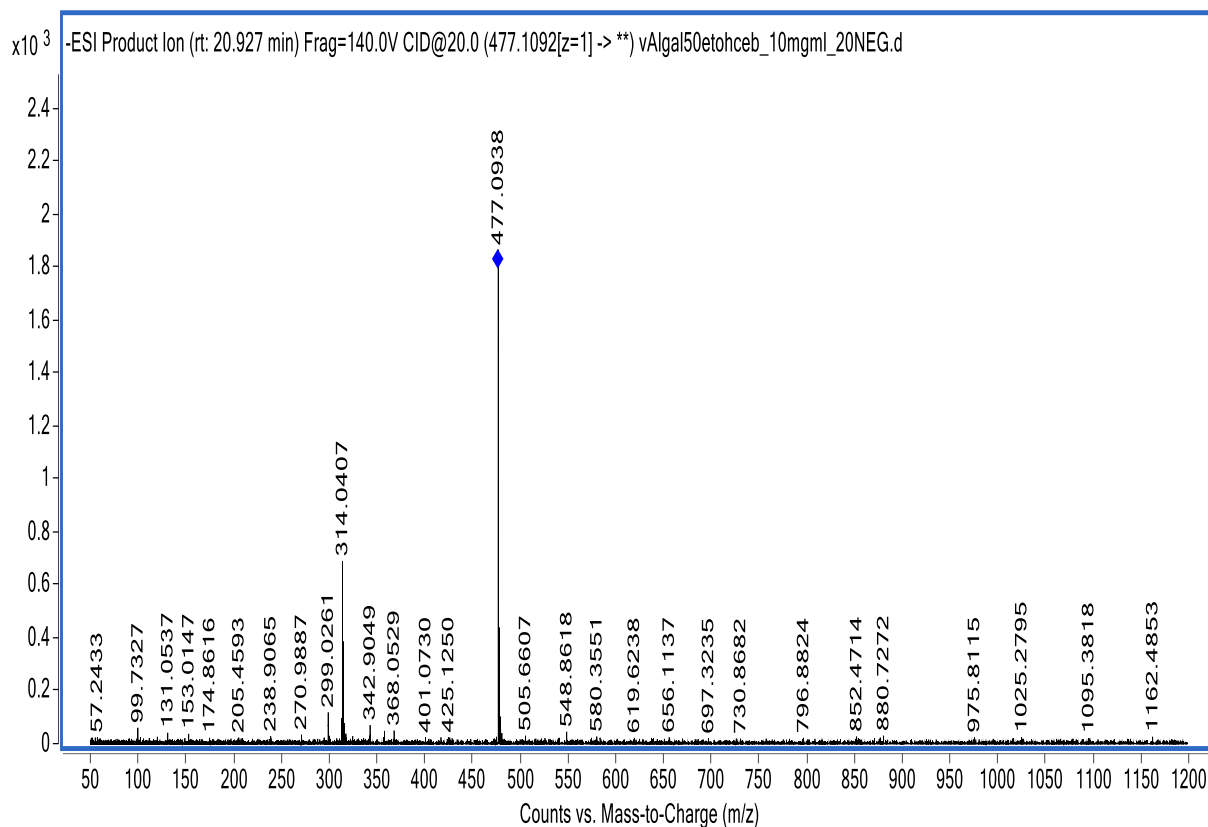


Рисунок 36 - МС/МС спектры изорхамнетина глюкозида

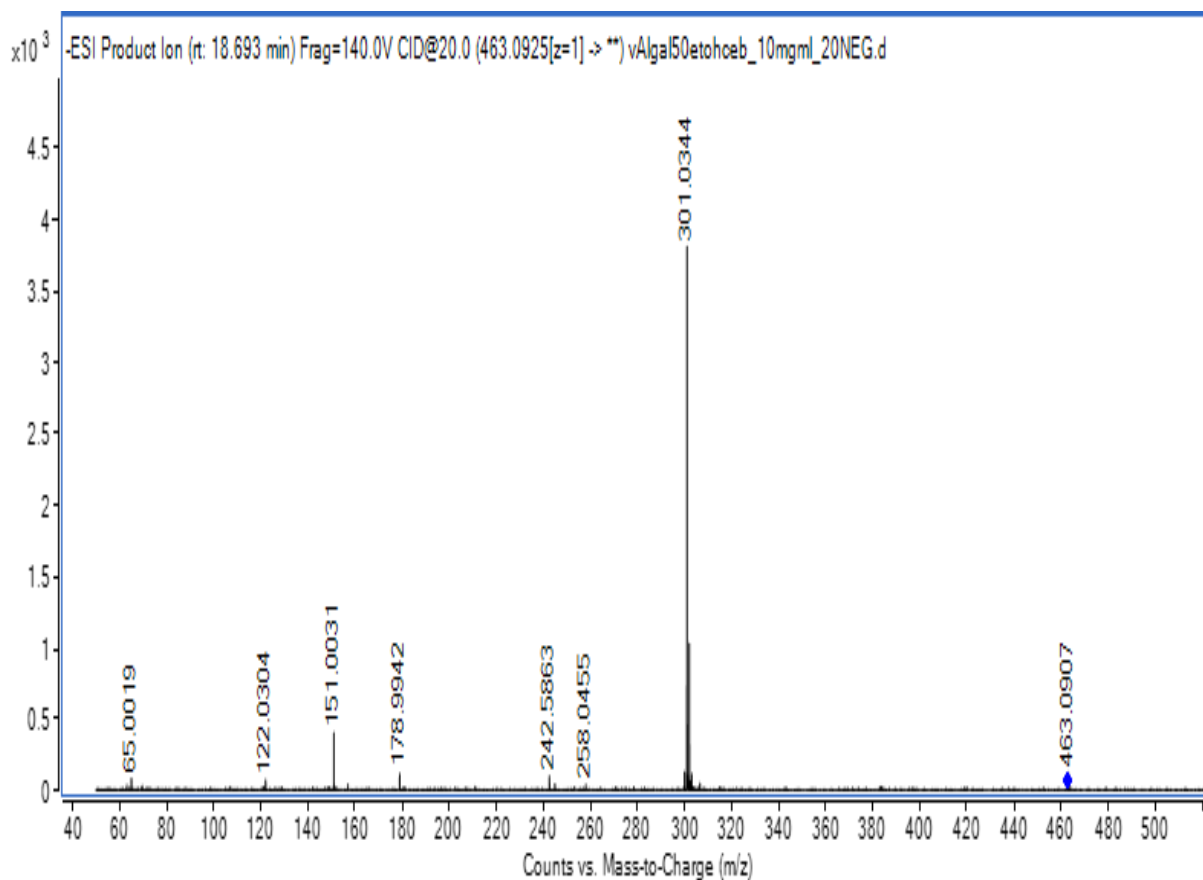


Рисунок 37 - МС/МС спектры кверцетина

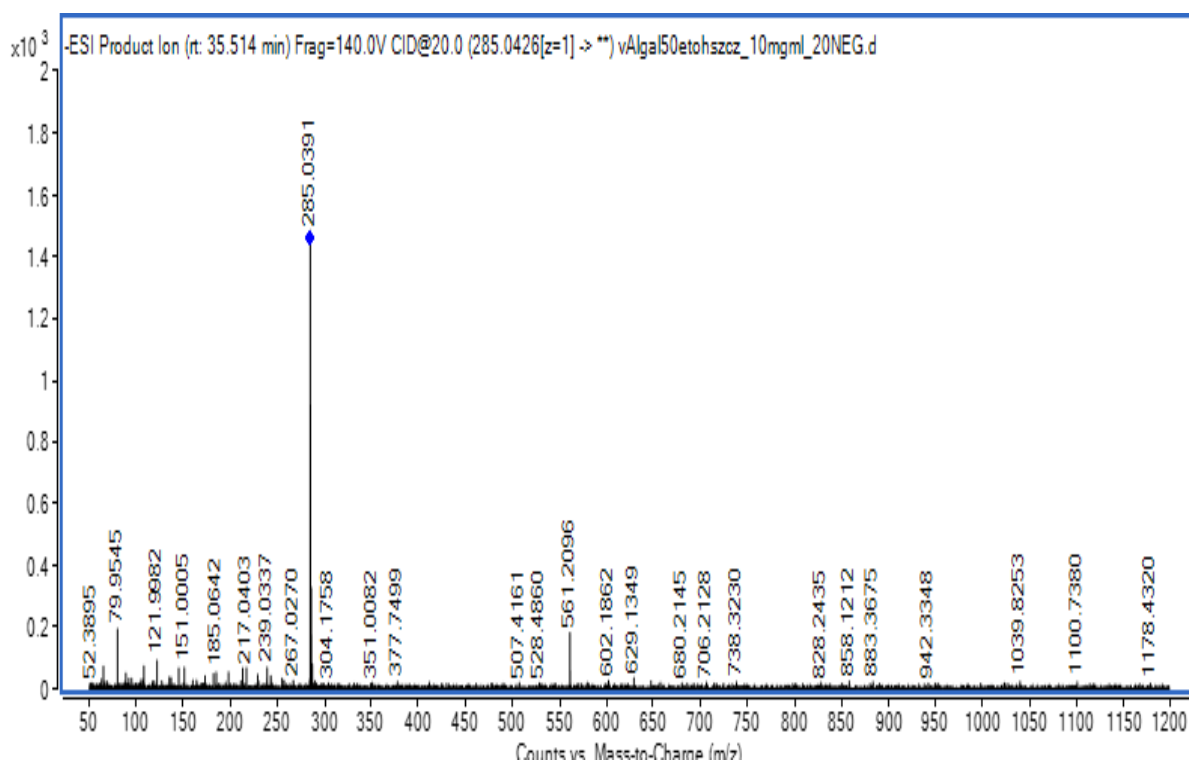


Рисунок 38 - МС/МС спектры кемпферола

Согласно литературным данным летучие компоненты входили в химический состав некоторых растений рода *Allium*. Поэтому нами проведено извлечение летучих соединений диэтиловым эфиром, для последующей их идентификации в изучаемых объектах методом ГХ-МС [192 с 13].

*Методика извлечения.* Аналитическую пробу 1 г (точная навеска) измельченного сырья листьев и луковиц лука молочнокветного и луковиц лука туркестанского помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл и прибавляют 10 мл диэтилового эфира. Колбу встряхивают на шейкере в течение 5 мин. Полученный экстракт пропускают через небольшую стеклянную колонну, заполненную силикагелем (NP silica gel 60, 0,063–0,200, Merck, Дармштадт, Германия) для очистки балластных веществ. Колбу оставляли открытой для испарения эфира. Высушенный остаток использовали для биологических исследований, в то время как для композиционного исследования на основе GC-MS сухой экстракт повторно растворяли в диэтиловом эфире до концентрации 20 мг/мл.

Анализ ГХ-МС летучих соединений, присутствующих в экстрактах, проводился с помощью прибора Shimadzu GC-2010 Plus в сочетании с масс-спектрометром Shimadzu QP2010 Ultra. Показатели удерживания определяли путем анализа раствора, содержащего гомологичные ряды n-алканов (C8–C34) при одинаковых условиях эксплуатации. Соединения были идентифицированы с использованием компьютерных спектральных библиотек (MassFinder 2.1; NIST 2011).

Экстракты диэтилового эфира, полученные из луковиц и листьев *A. galanthum* и луковиц *A. turkestanicum*, анализировали с использованием ГХ-МС.

Летучие соединения, идентифицированные в исследованных экстрактах, перечислены в таблице 11 из колонки ZB-MS. В общей сложности 25, 22 и 17 соединений были идентифицированы в луковицах и листьях *A. galanthum* и луковицах *A. turkestanicum* соответственно.

Таблица 11 - Соединения, идентифицированные в экстрактах диэтилового эфира из сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* методом ГХ-МС.

Название соединений	Брутто формула	РИ*	Агб	Агк	АТб
1	2	3	4	5	6
Длинноцепочечные алканы и алкены					
Тетракозан	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	2402	+	+	+
Пентакозан	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	2502	+	+	+
Гексакозан	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	2603	+	+	+
Гептакозан	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	2703	+	+	+
Октакозан	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	2801		+	
Нонакозан	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	2904	+	+	+
Триакоктан	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	3003	+	+	+
Хентриакоктан	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	3105	+++	+++	+++
Дотриакоктан	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	3204	+	+	
Тритриакоктан	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>	3305	++	+	+
Сквален	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	2815	+	+	+
Альдегиды					
Нонаналь	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1106	+	-	-
Кетоны жирного ряда					
16-Хентриакоктанон	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub> O	3293	-	+++	+
Жирные кислоты					
Гексадекановая кислота	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1968	+	+	+
Линолевая кислота	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2146	-	-	++
Сложные эфиры					
Этиловый эфир гексадекановой кислоты	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1992	+	-	-
Этиловый эфир линолевой кислоты	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2162	+	-	-
Этиловый эфир олеиновой кислоты	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2168	+	-	-
Этиловый эфир тетракозановая кислота	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	2798	+	-	-
Высшие жирные и полициклический спирты					
3,13-октадекадиен-1-ол	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O	2094	+	-	+
1-Тетракозанол	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	2475	+	-	-
1-Гексакозанол	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O	2681	++	+	-
1-Октакозанол	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	2882	+++	+	+

Продолжение таблицы 11					
1	2	3	4	5	6
1-Триаконтанол	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O	3084	+++	++	+
14-метилэргост-8-ен-3-ол	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	3226	+	+	+
1,30-Триаконтандиол	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O <sub>2</sub>	3251		+	
1-Дотриаконтанол	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> O	3285	++	+	
1-тритриаконтанол	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub> O	3382		+++	
Холестерин	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	3147	+	+	
Латхостерол	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	3210	+	+	
Терпены					
Неофитадиен (изомер II)	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	1836		+	

Примечание: RI – индекс удерживания относительно n-алкановых рядов; относительное содержание идентифицированных соединений указывалось как высокое (+++), умеренное (++), низкое (+) в зависимости от площади пика, (-) не обнаружено.

Наиболее характерными компонентами, присутствующими во всех анализируемых экстрактах, являются прямо- и длинноцепочечные углеводороды, и их спирты. Гентриаконтан с 31 углеродом является основным компонентом, встречающимся во всех трех исследованных образцах. Гентриаконтан - известный алкан, присутствующий в нескольких растениях семейства Молочайные (*Euphorbia*, *Alteurites*, *Colliguaja*) [193]. Данное соединение также является одним из компонентов пчелиного воска [194]. Помимо гентриаконтана, для луковиц и листьев *A. galanthum* характерны насыщенные кислородом длинноцепочечные алканы. В листьях лука молочноцветного идентифицированы 1-октакозанол и 1-триаконтанол, в то время как в луковицах *A. galanthum* 16-гентриаконтанон (пальмитон) и 1-тритриаконтанол. Другой группой соединений, обнаруженных в этих неполярных экстрактах, являются жирные кислоты и их этиловые эфиры. Стоит упомянуть о наличии линолевой кислоты, идентифицированной только в луковицах *A. turkestanicum*, сложный эфир линолевой кислоты в луковицах *A. galanthum*. Следующей группой соединений, идентифицированных в анализируемых экстрактах, являются стерины. Все экстракты содержат 14-метилэргост-8-ен-3-ол. Холестерин и промежуточный продукт холестерина, латостерол был обнаружен в луковицах и листьях *A. galanthum*. Существует распространенное мнение, что растения не содержат холестерина, однако нам удалось выявить холестерин в сырье *A. galanthum*. Концентрация холестерина в растениях примерно в несколько сотен-тысяч раз меньше, чем в тканях животных [195, 196]. Холестерин встречается как компонент растительных мембран и как составляющая поверхностных липидов листьев, где иногда он может играть роль основного стерола [194 с.25]. Сквален — промежуточное соединение, участвующее в биосинтезе тритерпенов и стероидов в растениях, был обнаружен во всех исследуемых объектах.

*Определение минерального состава*



Натуральные продукты по-прежнему представляют собой важную основу для новых терапевтических средств (противомикробных, антиоксидантных, противоопухолевых, антилипидемические, иммуномодулирующие и другие) и дополнительные источники витаминов и минералов. Необходимые элементы (макро- и микроэлементы) в адекватных концентрациях важны для нормального функционирования всех органов и метаболических и клеточных процессов. В исследуемых образцах растений лука молочнокветного и лука туркестанского обнаружено более 20 различных макро и микроэлементов (таблица 12).

Таблица 12 - Минеральный состав сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum*

№	Элемент	<i>A.galanthum</i> мг/кг	<i>A. turkestanicum</i> мг/кг
1	Li (литий)	1.3 ± 0.9	2.3±0.06
2	Be (бериллий)	2.8±0.9	0.028±0.007
3	B (бор)	1.5±0.85	0.36±0.07
4	Na (натрий)	9.1±1.4	7.9±0.18
5	Mg (магний)	2.12±0.236	2.3±0.3
6	Al (алюминий)	6.6±1.8	1.8±0.24
7	K (калий)	18±1	15±6.16
8	Ca (кальций)	1200±110	1800±175
9	V (ванадий)	0.056±0.013	0.014±0.04
10	Cr (хром)	0.52±0.1	1.87±0.17
11	Mn (марганец)	43±13	66±6
12	Fe (железо)	40±1.8	112±14
13	Cu (медь)	0.31±0.08	6.1±1.4
14	Zn (цинк)	0.6±0.15	33±9
15	Ga (галлий)	0.039±0.004	0.027±0.006
16	Se (селен)	0.14±0.008	0.019±0.002
17	Rb (рубидий)	0.1±0.09	0.78±0.07
18	Nb (ниобий)	0.018±0.006	0.048±0.004
19	Mo (молибден)	5.8±0.2	2.6±0.2
20	Ag (серебро)	Не обнаружен	0.21±0.05
21	Ba (барий)	2.3±0.3	1.4±0.2

Анализ полученных данных позволяет утверждать, что луковицы лука молочнокветного и лука туркестанского содержат макроэлементы: кальций > калий > натрий > магний по мере убывания. Также были определены эссенциальные микроэлементы с преобладающим содержанием железа *A. turkestanicum* (112 мкг) > *A.galanthum* (40 мкг); марганца *A. turkestanicum* (66) > *A.galanthum* (43 мкг); цинка *A. turkestanicum* (33 мкг) > *A.galanthum* (0.6 мкг); меди – *A. turkestanicum* (6.1 мкг) > *A.galanthum* (0,31 мкг). Наибольшее количество молибдена обнаружено в сырье *A. galanthum* (5.8 мкг) > *A. turkestanicum* (2.6 мкг). Так же были обнаружены условно-эссенциальные элементы: бор *A. galanthum* (1.5 мкг) > *A. turkestanicum* (0.36 мкг); литий *A.*

*turkestanicum* (2.3 мкг) > *A.galanthum* (1.3 мкг); *A.galanthum* (0.056) > *A.turkestanicum* (0.014 мкг).

Таким образом, различия элементного состава растительного сырья лука молочноцветного и лука туркестанского обусловлены концентрацией кальция, железа и марганца.

#### *Изучение аминокислотного состава*

Определение состава и содержания аминокислот в луковичах лука туркестанского и лука молочноцветного проводили методом газовой- жидкостной хроматографии, согласно методике, описанной в главе 2. Полученные результаты анализа представлены в таблице 13.

Таблица 13- Аминокислотный состав *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum*.

№	Аминокислоты	Луковица <i>A. turkestanicum</i> мг	Листья <i>A. galanthum</i> мг	Луковица <i>A. galanthum</i> мг
1	Аспарагиновая	0.11±0.01	0.09±0.01	0.12±0.01
2	Треонин	0.07±0.01	0.11±0.02	0.09±0.01
3	Серин	0.13±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01
4	Глутаминовая	0.17±0.01	0.16±0.02	0.20±0.01
5	Глицин	0.06±0.01	0.04±0.01	0.06±0.01
6	Аланин	0.04±0.02	0.05±0.01	0.07±0.02
7	Валин	0.07±0.01	0.06±0.01	0.09±0.01
8	Метионин	0.13±0.01	0.11±0.01	0.16±0.01
9	Изолейцин	0.09±0.01	0.08±0.01	0.13±0.01
10	Лейцин	0.13±0.01	0.11±0.01	0.15±0.01
11	Тирозин	0.05±0.02	0.04±0.01	0.07±0.01
12	Фенилаланин	0.09±0.01	0.07±0.01	0.13±0.01
13	Гистидин	0.12±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01
14	Лизин	0.13±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01
15	Аргинин	0.15±0.01	0.12±0.01	0.16±0.01
Сумма		1.56±0.07	1.28±0.05	1.73±0.09

Анализ аминокислотного состава показал, что изучаемые объекты содержит 15 аминокислот, из которых 7 являются незаменимыми (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин).

#### *Определение аскорбиновой кислоты*

Качественное и количественное содержание аскорбиновой кислоты в листьях и луковичах лука молочноцветного и луковичах лука туркестанского определяли методом ВЭЖХ. Количественное определение проводили, измеряя площади пиков. За результат принимали среднее арифметическое для двух введений, если расхождение между ними не превышало 10 %. Примеры хроматограмм, полученных при определении аскорбиновой кислоты в изучаемых объектах приведены на рисунках 39 - 41.

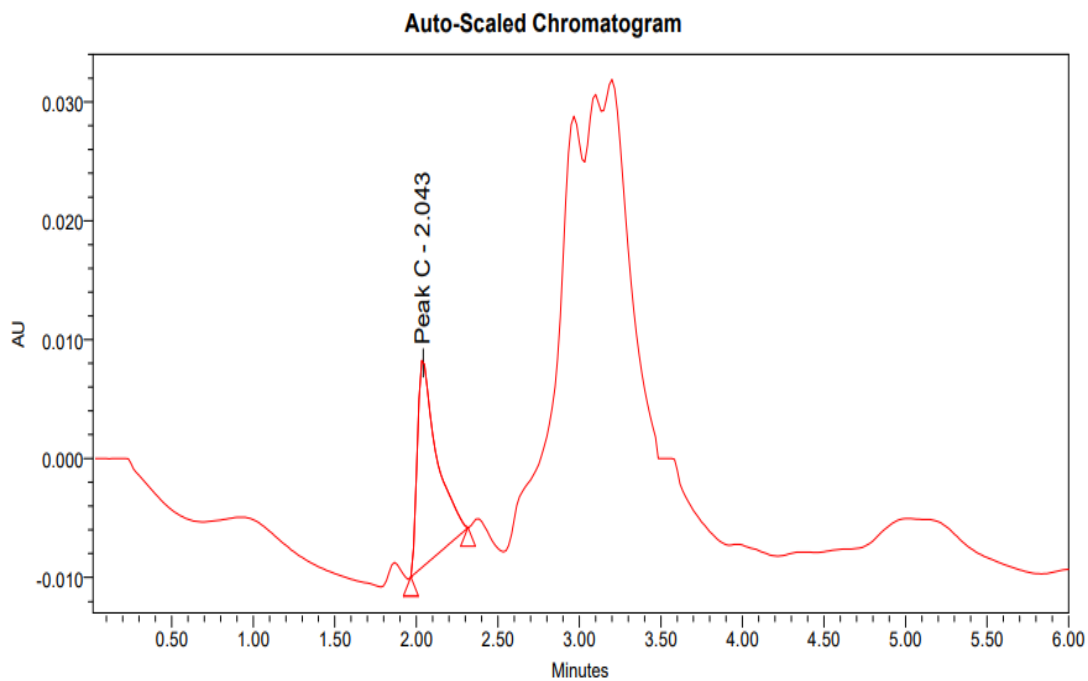


Рисунок 39- Хроматограмма определения витамина С в листьях лука  
молочноцветного

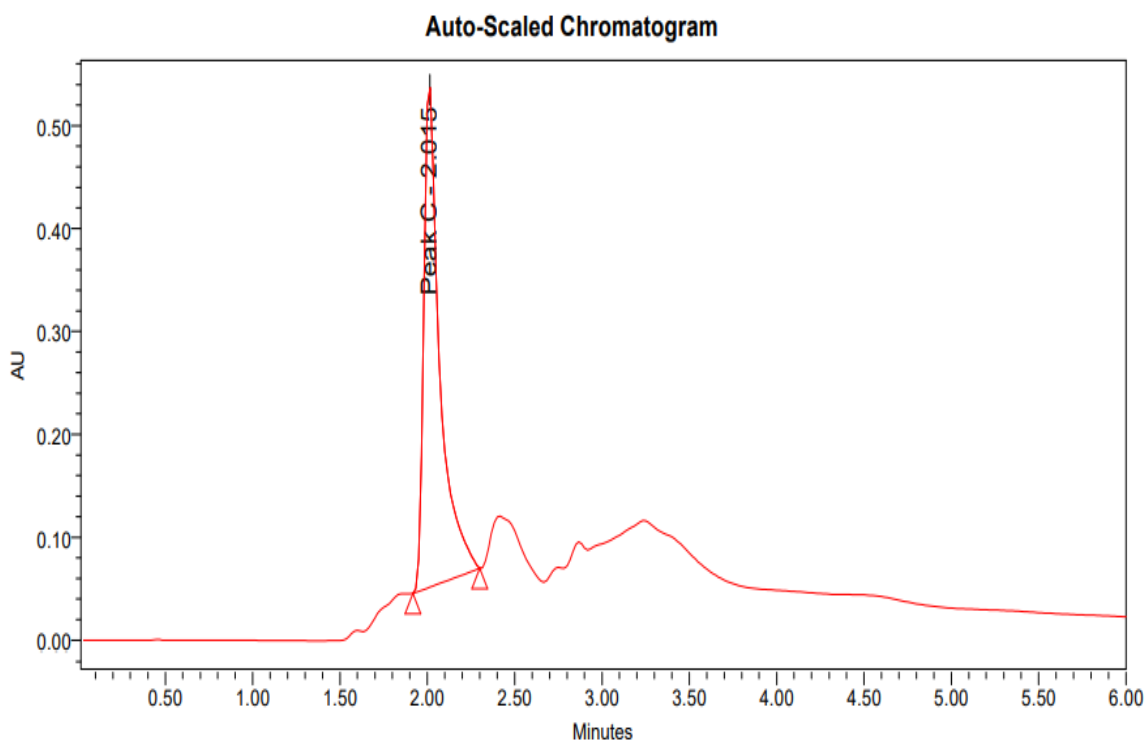


Рисунок 40- Хроматограмма определения витамина С в луковицах  
лука молочноцветного

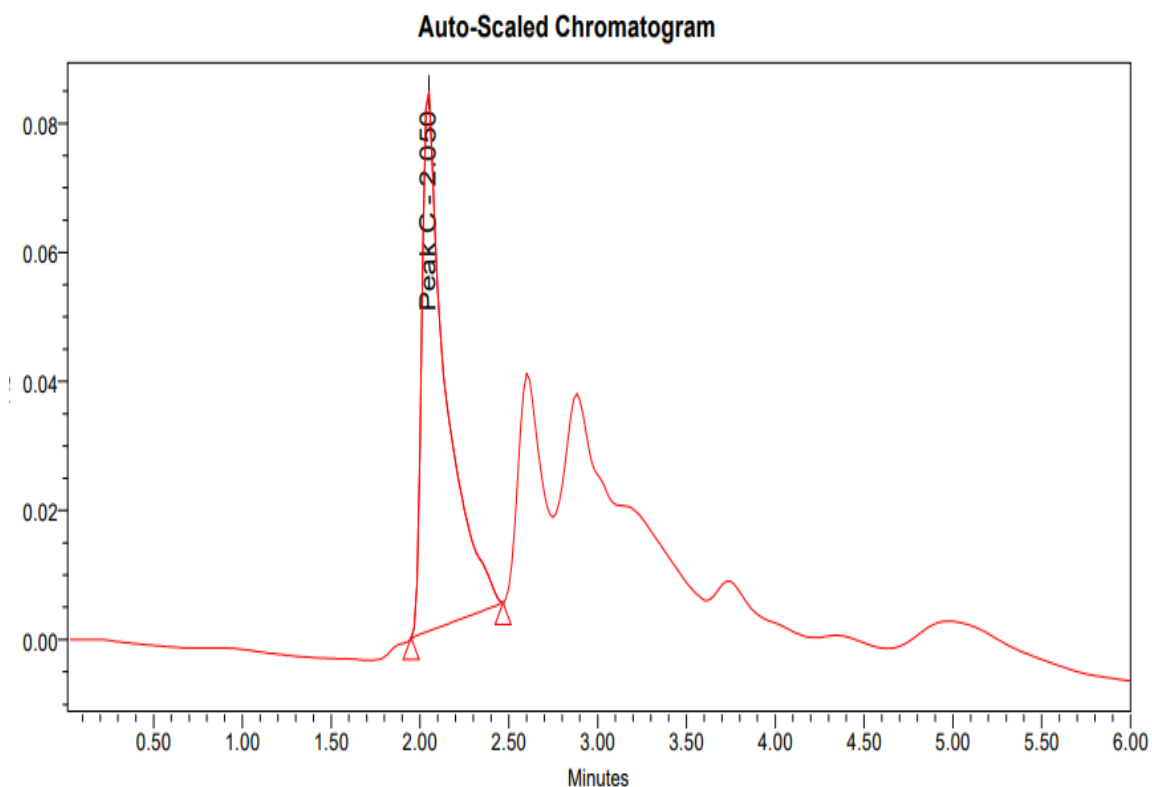


Рисунок 41- Хроматограмма определения витамина С в луковицах лука туркестанского

Результаты количественного определения витамина С приведены в таблице 14

Таблица 14 – Количественное содержание аскорбиновой кислоты в сырье

Название ЛРС	Фактический выход мг/г	Время удерживания мин	Площадь пика	Высота пика
<i>A. turkestanicum</i> Луковица	21.893 ± 2.189	2.050	790853	83359
<i>A. galanthum</i> листья	3.955 ± 0.369	2.043	145221	17663
<i>A. galanthum</i> луковица	60.672 ± 6.067	2.015	3123232	481910

Как видно из таблицы 14 самое высокое содержание аскорбиновой кислоты приходится на луковицу *A. galanthum* и низкое содержание витамина С определилась в листьях *A. galanthum*.

#### Определение жирнокислотного состава

Жирнокислотный состав определяли методом ГХ-МС в извлечениях диэтилового эфира из растительного сырья лука туркестанского и лука молочнокветного (таблица 15).

Таблица 15 - Жирнокислотный состав лука молочнокветного и лука туркестанского

Название соединений	Брутто формула	RI*	<i>A. turkestanicum</i> Луковица	<i>A. galanthum</i> листья	<i>A. galanthum</i> луковица
Гексадекановая кислота	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1968	+	+	+
Этиловый эфир гексадекановой кислоты	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1992	-	-	+
Линолевая Кислота	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2146	++	-	-
Этиловый эфир линолевой кислоты	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2162	-	-	+
Этиловый эфир олеиновой кислоты	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	2168	-	-	+
Этиловый эфир тетракозановая кислота	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	2798	-	-	+

Примечание: \*RI - индекс удерживания относительно n-алкановых рядов

Относительное содержание идентифицированных соединений указывалось как умеренное (++) , низкое (+) в зависимости от площади пика и не обнаружено или обнаружено в следовых количествах (-).

В результате проведенных исследований в образцах лука молочнокветного и лука туркестанского, были идентифицированы 2 жирные кислоты с длиной углеродной цепи от 16 до 18 атомов: гексадекановая и линолевая кислоты и 4 этиловых эфира: гексадекановой, линолевой, олеиновой, тетракозановой кислот. Во всех исследуемых образцах была идентифицирована гексадекановая кислота, линолевая кислота только в луковицах *A. turkestanicum*, их этиловые эфиры в луковицах *A. galanthum*

#### 4.2 Фармацевтико-технологические параметры сырья *A. turkestanicum* и *A. galanthum*

Для обоснования выбора оптимального способа экстрагирования целевой группы активных веществ из лекарственного растительного сырья необходимо изучить влияние технологических параметров, таких как удельная масса, объемная масса, насыпная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья, коэффициент поглощения экстрагента, на выход суммы экстрактивных веществ и эффективность технологического процесса. Исследования проводили согласно методам и методикам, описанными в главе 2.

Результаты определения фармацевтико-технологических параметров луковиц лука туркестанского, листьев и луковиц лука молочнокветного приведены в таблице 16.

Таблица 16 - Коэффициент поглощения экстрагента и выход экстрактивных веществ

Растворитель	Коэффициент поглощения экстрагента		Экстрактивные вещества, %	
	<i>A.turkestanicum</i>	<i>A.galanthum</i>	<i>A.turkestanicum</i>	<i>A.galanthum</i>
Вода очищенная	3.182 ± 0.069	4.568 ± 0.083	27.39 ± 0.519	26.63 ± 0.330
30% этанол	4.246 ± 0.048	4.86 ± 0.048	28.89 ± 0.171	31.37 ± 0.323
50% этанол	4.798 ± 0.080	5.352 ± 0.109	29.28 ± 0.096	22.5 ± 0.4951
70% этанол	3.614 ± 0.130	4.094 ± 0.078	28.34 ± 0,337	27.47 ± 0.199
96% этанол	3.182 ± 0.069	3.536 ± 0.057	22.39 ± 0.359	25.66 ± 0.329

Определение фармако-технологических параметров проводили в пяти повторениях, результаты статистически обрабатывали.

Полученные результаты позволили определить оптимальную концентрацию экстрагента и степень измельченности сырья. Исходя из данных, приведенных в таблице 16, максимальный выход экстрактивных веществ получен с использованием в качестве экстрагента 50 % этанол (об/об) для исследуемых объектов *A. turkestanicum* и *A. galanthum*.

#### 4.3 Стандартизация сырья *A.turkestanicum* и *A.galanthum*

Стандартизацию растительного сырья лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья) проводили согласно приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств» и согласно современным фармакопейным требованиям по показателям: идентификация (А. макроскопия, В. Микроскопия, С. Качественные реакции и или гистохимические реакции, D. хроматографические испытания); посторонние примеси; потеря в массе при высушивании; общая зола; зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной; экстрактивные вещества; микробиологическая чистота; количественное определение; соли тяжелых металлов; радионуклиды; упаковка; маркировка; срок хранения; транспортирование; основное фармакологическое действие.

Идентификация растительного сырья проводилась по показателям:

А. Макроскопия. Были определены макроскопические признаки сырья для цельного и измельченного сырья по параметрам: внешний вид, форма, цвет, вкус и запах.

В. Микроскопия. Определены анатомо-диагностические признаки сырья: толщина эндодермальных клеток *Allium turkestanicum* (3,7 - 5,3) мкм, *Allium galanthum* (3,3 - 4,7) мкм. Внутри эндодермы по отношению к тканям сосудов расположен перидермис: однослойный и периферический. *Allium turkestanicum*

имеет единственную метаксилему, которая присутствует в средней части сосудистого цилиндра. Образцы *Allium galanthum* имеют две метаксилемы.

С. Качественные реакции проведены на флавоноиды.

Д. Методом ВЭЖХ-МС идентифицированы флавоноиды (время удерживания кверцетина составило 29.6 мин, кемферола – 35.5 мин.

С позиций оценки экологической чистоты лекарственного растительного сырья, прежде всего, необходимо определение концентраций кадмия, свинца и ртути. Эти элементы относятся к приоритетным загрязнителям биосферы и подлежат первоочередному контролю в лекарственном растительном сырье.

Определение тяжелых металлов проводили в соответствии с Государственной Фармакопеей РК I, т. 1, 2.4.8 4-х методом атомно-абсорбционной спектрометрии.

Согласно нормативной документации в настоящее время обязательному нормированию, в ЛРС подлежат 4 основных потенциально токсичных элемента: свинец, кадмий, ртуть и мышьяк (таблица 17).

Таблица 17 - Определение солей тяжелых металлов

Образцы	Наименование показателей			
	Кадмий, мг/кг	Свинец, мг/кг	Ртуть, мг/кг	Мышьяк, мг/кг
Луковица <i>A. turkestanicum</i>	не обнаружено	0.0308 ± 0.0024	не обнаружено	не обнаружено
Листья <i>A. galanthum</i>	не обнаружено	0.0102 ± 0.0018	не обнаружено	не обнаружено
Луковица <i>A. galanthum</i>	не обнаружено	0.0336 ± 0.0085	не обнаружено	не обнаружено

Результаты исследования показали, что в испытуемых образцах не обнаружены: кадмий, ртуть и мышьяк. Содержание свинца в луке туркестанском – 0.0308 мг/кг; в луковицах лука молочнокветного – 0.0336 мг/кг; в листьях - 0.0102 мг/кг. Допустимыми нормами согласно ГФ РК т. 3, 2.4.27 являются: кадмия не более 1.0 мг/кг, свинца – не более 5.0 мг/кг, ртути – не более 0.1 мг/кг, мышьяка не более 1.0 мг/кг [197].

Радиоактивное загрязнение стало серьезной проблемой для фармацевтической промышленности и является определяющим фактором качества лекарственных растений. Способность лекарственных растений поглощать радионуклиды, как из атмосферы, так и из почвы, способствуют повышению уровня внутреннего облучения потребляющего населения. ВОЗ подчеркивает, что риски здоровья потребителей зависят от специфических радионуклидов, уровни загрязнения окружающей среды, а также на продолжительность применения и вводимой дозы лекарственного препарата.

Определение радионуклидов проводили методом гамма - сцинтилляционной спектрометрии. Испытание проводили на содержание стронция-90, цезия-137 (таблица 18).

Таблица 18 - Определение радионуклидов в *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum*

Наименование показателей	НД на методы испытаний	Требования НД	Фактические результаты (бк/кг)		
			Луковица <i>A.turkestanicum</i>	Листья <i>A.galanthum</i>	Луковица <i>A.galanthum</i>
Содержание стронция-90	МВИ № KZ 07 00 00303-2019	До 200	1.38	0.66	1.59
Содержание цезия-137	МВИ № KZ 07 00 00304-2019	До 600	1.92	4.11	9.78

По результатам исследования радионуклиды в изучаемых растениях находятся в пределах допустимых норм и, таким образом, дают информацию в мониторинге радиоактивности ареала произрастания и местности сбора лука молочнокветного и лука туркестанского [198].

Не менее важным параметром безопасности лекарственного растительного сырья является показатель «Микробиологическая чистота». Требования к микробиологической чистоте приведены в Государственной Фармакопее Республики Казахстан.

В таблице 19 приведены результаты определения микробиологической чистоты исследуемых растений.

Таблица 19 - Микробиологическая чистота

Наименование показателей	Требования НД	Фактические результаты		
		Луковица <i>A.turkestanicum</i>	Листья <i>A.galanthum</i>	Луковица <i>A.galanthum</i>
Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов, КОЕ/г	Не более $10^7$	$2.5 \times 10^2$	$2.8 \times 10^2$	$4 \times 10^2$
Грибы, КОЕ/г	Не более $10^5$	$5 \times 10$	$1 \times 10$	$1 \times 10$
<i>E.coli</i> в 1.0 г	Не более $10^2$	менее 10	менее 10	менее 10

Результаты исследования показали, что исследуемое сырье соответствует критерию «Микробиологическая чистота».

Нормирование остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье чрезвычайно важно с точки зрения безопасности пациентов. Определение хлорорганических остаточных пестицидов в исследуемом сырье проводили методом газожидкостной хроматографии (таблица 20).



Таблица 20 – Определение остаточных пестицидов

Идентификация образцов	Наименование показателей				
	( $\alpha$ -ГХЦГ)	( $\beta$ -ГХЦГ)	( $\gamma$ - ГХЦГ)	гептахлор	Дихлордифенил трихлорэтан
Луковица <i>A. turkestanicum</i>	0.06±0,01	0.04±0.01	Не обнаружено	0.3±0,01	Не обнаружено
Листья <i>A. galanthum</i>	0.11±0.01	0.09±0.02	Не обнаружено	0.07±0.01	Не обнаружено
Луковица <i>A. galanthum</i>	0.20±0.01	0.28±0.02	Не обнаружено	0.22±0.01	Не обнаружено

Результаты исследований лекарственного растительного сырья, показали практическое отсутствие хлорорганических пестицидов в анализируемом материале.

Таким образом, установлено, что все исследуемые образцы соответствуют требованиям НД по критерию экологической безопасности [198 с. 412].

Для цельного и измельченного сырья лука туркестанского (луковицы) и лука молочноцветного (листья, листья) нами были определены числовые показатели в соответствии с методиками ГФ РК, для того чтобы разработать проект нормативной документации на новый вид ЛРС, а именно: содержание действующих веществ, влажность, содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, степень измельченности и содержание примесей.

Результаты исследования по обоснованию числовых показателей растительного сырья лука туркестанского (луковицы) и лука молочноцветного (листья, листья) представлены в таблице 21.

Таблица 21- Числовые показатели растительного сырья

Показатель, %	Луковица <i>A. turkestanicum</i>	Листья <i>A. galanthum</i>	Луковица <i>A. galanthum</i>	Норма
Посторонние примеси:	-	0.12 ± 0.02	-	Не более 2 %
Частиц почерневших				
Органической примеси	-	-	-	Не более 0.5 %
Минеральной примеси	0.021 ± 0.011	0.010 ± 0.002	0.019 ± 0.009	Не более 0.5 %
Потеря в массе при высушивании	8.290 ± 1.128	5.352 ± 1.095	7.480 ± 1.238	Не более 12.0 %
Общая зола	7.142 ± 1,670	5.189 ± 0,980	6.890 ± 1.570	Не более 10.0 %
Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной	0.240 ± 0,051	0.510 ± 0,078	0.480 ± 0.127	Не более 2.0 %

Числовые показатели растительного сырья лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья) находились в пределах нормируемых показателей.

Спецификации качества на лекарственное растительное сырье представлена в Приложениях (К).

#### 4.4 Изучение стабильности и установление сроков хранения сырья *A.turkestanicum* и *A.galanthum*

Исследование стабильности проводили на протяжении 24 мес в соответствии с требованиями, установленными приказом МЗ СР РК № 680 от 25 августа 2015 г. и приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020 «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств» в условиях: температура  $25 \pm 2$  °С и влажности  $60 \pm 5$  % [199].

Испытание стабильности проводилось на трех сериях луковиц лука туркестанского, луковиц и листьев лука молочнокветного, упакованного в мешки трехслойные из крафт-бумаги (в соответствии с ГОСТ 2226 - 2013) (таблица 22) [200]. Результаты испытания стабильности и установления сроков годности и рекомендуемых условий хранения трех серии исследуемых видов сырья представлены в Приложениях Л.

За период испытания стабильности ЛРС в первичной упаковке в течение 24 месяцев параметры стабильности находились в пределах регламентируемых норм.

Таблица 22 – Исследование стабильности луковиц лука туркестанского, луковиц и листьев лука молочнокветного

Наименование ЛРС	Номер серии	Время сбора	Периодичность исследования, мес
луковица <i>A.turkestanicum</i>	01АТб2019	Март 2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
луковица <i>A.turkestanicum</i>	02АТб2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
луковица <i>A.turkestanicum</i>	03АТб2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
листья <i>A. galanthum</i>	01АГс2019	Март 2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
листья <i>A. galanthum</i>	02АГс2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
листья <i>A. galanthum</i>	03АГс2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
луковица <i>A. galanthum</i>	01АГб2019	Март 2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
луковица <i>A. galanthum</i>	02АГб2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
луковица <i>A. galanthum</i>	03АГб2019	Март2019	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24

Результаты определения количественного содержания флавоноидов в течение периода исследования стабильности представлены на рисунке 42.

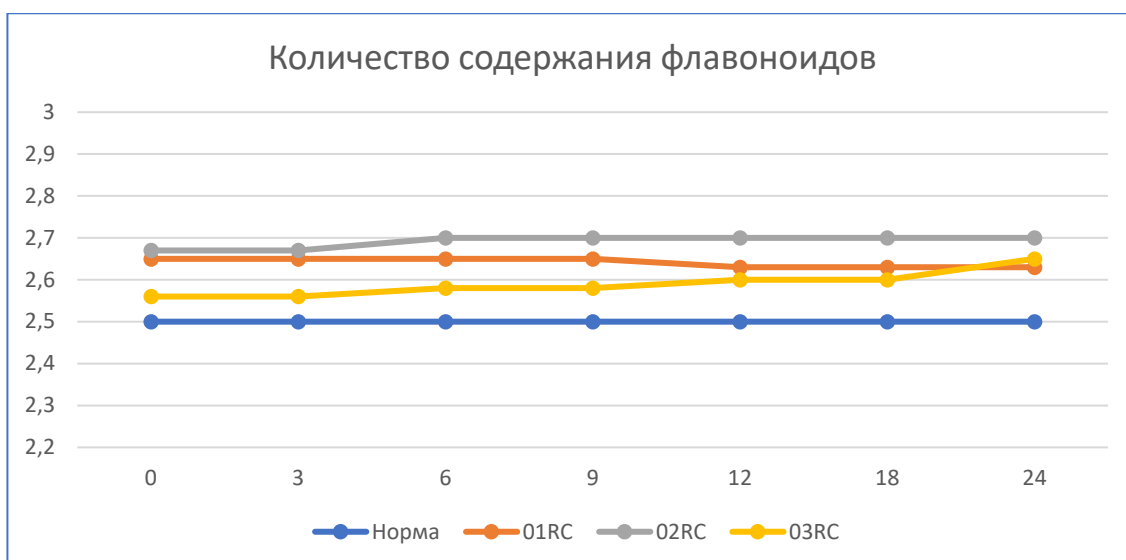


Рисунок 42 - Определения количественного содержания флавоноидов в течение периода исследования стабильности

Количественное содержание флавоноидов в течение периода исследования стабильности у сырья лука туркестанского и лука молочнокветного находились в пределах нормируемых норм.

## Выводы к четвертой главе

Проведенное сравнительное исследование растительного сырья лука туркестанского и лука молочнокветного позволило выявить спектрофотометрическим, перманганатометрическим и гравиметрическим методами различные классы соединений: аминокислоты, полисахариды, сапонины, дубильные вещества, флавоноиды. Флавоноиды и их гликозиды составляют основную группу БАВ в сырье лука туркестанского и лука молочнокветного.

Методом ВЭЖХ этанольных извлечений листьев и луковиц лука молочнокветного и луковиц лука туркестанского идентифицировано 13 флавоноидов: кверцетин тригликозид, таксифолин глюкозид, кверцетин дигексозид, кемпферол диглюкозид, кемпферол диглюкозид, цианидин глюкозид, дигидрокверцетин, изорхамнетин диглюкозид, изокверцетин, кемпферол глюкозид, изорхамнетин глюкозид, кверцетин, кемпферол.

Летучие соединения, идентифицированные в экстрактах диэтилового эфира, полученные из луковиц и листьев *A. galanthum* и луковиц *A. turkestanicum*, анализировали с использованием ГХ-МС. В общей сложности 25, 22 и 17 соединений были идентифицированы в луковицах и листьях *A. galanthum* и луковицах *A. turkestanicum* соответственно. Наиболее характерными компонентами, присутствующими во всех анализируемых экстрактах, являются прямо- и длинноцепочечные углеводороды, и их спирты. Гентриаконтан с 31 углеродом является основным компонентом, встречающимся во всех трех исследованных образцах. Другой группой соединений, обнаруженных в этих неполярных экстрактах, являются жирные кислоты и их этиловые эфиры, стеринны.

Качественное и количественное содержание аскорбиновой кислоты в листьях и луковицах лука молочнокветного и луковицах лука туркестанского определяли методом ВЭЖХ. Максимальное количество аскорбиновой кислоты было определено в листьях лука молочнокветного  $60,672 \pm 6,067$  мг/г, в луковицах лука туркестанского  $21,893 \pm 2,189$  мг/г, наименьшее количество в листьях лука молочнокветного  $3,955 \pm 0,369$  мг/г.

Атомно-адсорбционной спектроскопией в сырье выявлено содержание 6 макроэлементов (P, Mg, Ca, Na, K, Si) и 8 микроэлементов (Fe, Mn, Ni, Mo, Si, Zn, Al, Pb). В исследуемых видах сырья методом газовой- жидкостной хроматографии установлен состав и количественное содержание 18 аминокислот.

Полученные результаты фармако-технологических параметров позволили определить оптимальную концентрацию экстрагента и степень измельченности сырья. Максимальный выход экстрактивных веществ получен с использованием в качестве экстрагента 50 % этанол (об/об) для исследуемых объектов.

Установлены показатели качества на сырье лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья) и их критерий приемлемости, проведена стандартизация лука туркестанского (луковицы) и

лука молочнокветного (листья, листья) в соответствии с требованиями ГФ РК. Разработана спецификация качества на «Лука туркестанского луковицы», «Лука молочнокветного луковицы», «Лука молочнокветного листья».

В результате долгосрочных испытаний стабильности сырья установлен срок хранения 24 мес. при температуре  $(25 \pm 2)$  °С и относительной влажности  $(60 \pm 5)$  %.

Фармакогностическое исследование сырья, комплексное фитохимическое изучение лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, луковицы) позволило провести идентификацию сырья, установить критерии качества и разработать НД на исследуемое сырье.

## 5 СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ *A.TURKESTANICUM*, *A.GALANTHUM*

### 5.1 Разработка оптимальной технологии получения экстрактов на основе сырья *A.turkestanicum* и *A.galanthum*

По количественному содержанию флавоноиды являются преобладающей группой БАВ в ЛРС лука туркестанского и лука молочнокветного. Выбор экстрагента и подбор оптимальных условий экстрагирования существенно влияет на полноту извлечения флавоноидов из растительного сырья.

На выход флавоноидов влияют различные технологические факторы: природа экстрагента, температурный режим, соотношение сырье: экстрагент, воздействия ультразвука, продолжительность экстракции.

Луковицы и листья исследуемых видов мелко измельчали и экстрагировали с использованием 95 % этанола (*об/об*), 70 % этанола (*об/об*), 50 % этанола (*об/об*) и воды ультразвуковой мацерацией при комнатной температуре в течение 30 минут в три цикла, каждый раз используя свежую порцию растворителя (соотношение твердого к жидкому: 1:10 (*мас/об*)). Полученные экстракты отфильтровывали и спектрофотометрическим методом определили количественное содержание суммы флавоноидов при длине волны 430 нм (рисунок 43).

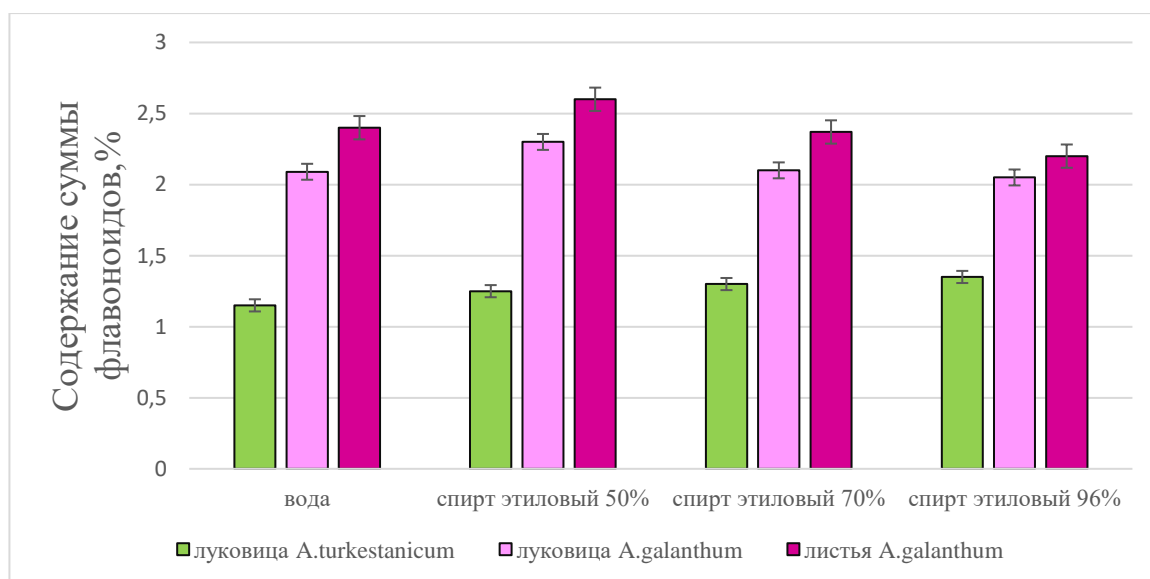


Рисунок 43 Влияние природы экстрагента на эффективность извлечения БАВ из растительного сырья

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что наилучшим экстрагентом для извлечения флавоноидов является 50 % этанола (*об/об*).

Также определяли влияние воздействия частоты 25 Гц, 30 Гц и 35 Гц ультразвука на выход сумму флавоноидов растительного сырья лука туркестанского и лука молочнокветного. Процесс экстрагирования методом

ультразвуковой экстракции проводили на ультразвуковой ванне. На рисунке 44 показаны результаты выхода флавоноидов в зависимости от частоты ультразвукового воздействия.

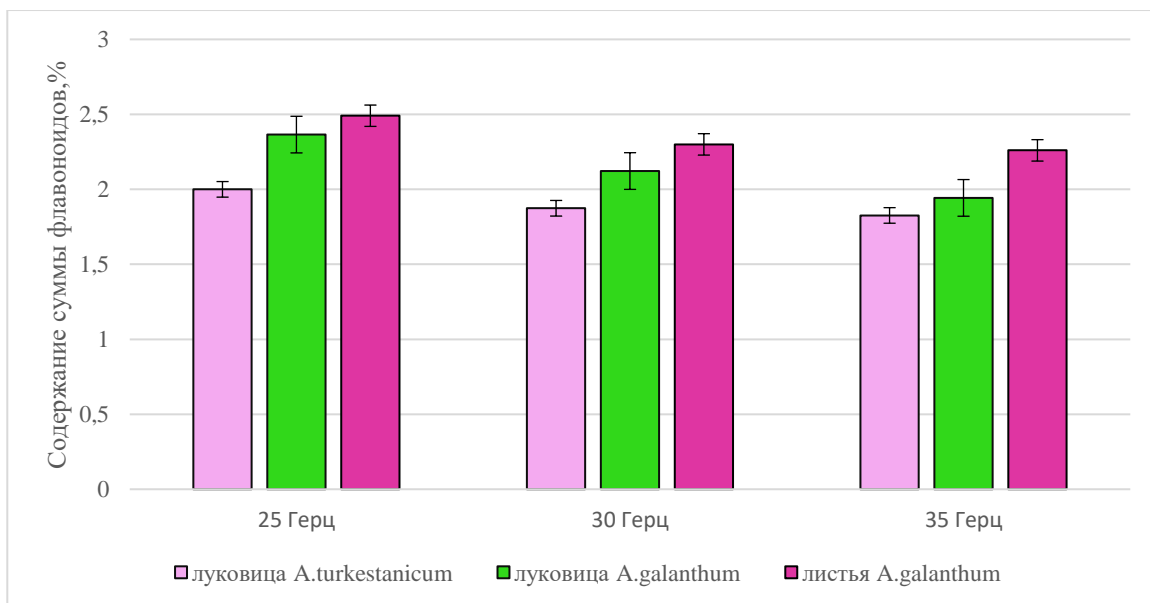


Рисунок 44 - Результаты выхода флавоноидов в зависимости от частоты ультразвукового воздействия

Частота воздействия ультразвука при 25 Гц эффективно влияет на выход флавоноидов.

Было исследовано влияние температурного режима на эффективность извлечения биологически активных веществ. Для установления влияния температурного режима на выход суммы флавоноидов изучали следующие температурные режимы: ( $20 \pm 2$  °C,  $25 \pm 2$  °C,  $30 \pm 2$  °C,  $32 \pm 2$  °C (рисунок 45).

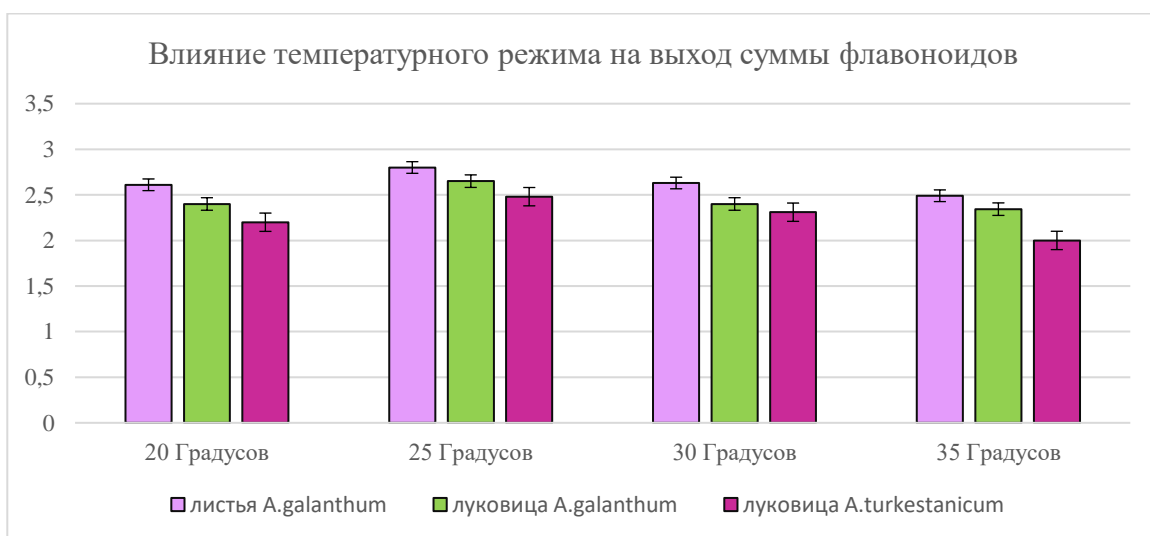


Рисунок 45 - Результаты выхода флавоноидов в зависимости от температурного режима

Анализ полученных данных показывает, что максимальный выход флавоноидов достигается при температуре 25 °С для исследуемых видов сырья. Полученные зависимости по - видимому связаны с влиянием температуры на стабильность БАВ.

На основании анализа полученных результатов предложен эффективный режим экстрагирования лука молочнокветного и лука туркестанского, позволяющий получить извлечения с высоким содержанием суммы флавоноидов:

- экстрагент - 50% спирт этиловый;
- модуль экстракции - 1:10;
- метод экстракции - мацерация с применением ультразвука частотой 25 Гц;
- температура процесса - 25 °С;
- время экстракции – 30 мин.

Согласно принципам надлежащих практик качество конечного продукта напрямую зависит от качества исходного сырья и от точного соблюдения требований технологического процесса. Соблюдение оптимальных сроков и технологии сбора, очистки, обработки, сушки, надлежащего хранения и транспортировки растительного сырья, является неотъемлемым этапом в системе обеспечения качества конечного продукта.

Для получения сухого экстракта лука туркестанского луковицы, лука молочнокветного (листья и луковицы), навеску ЛРС, измельченного до размера частиц 3.0 – 5.0 мм, загружали в ёмкость, заливали экстрагентом - этанол 50 % (об/об) в соотношении сырьё - экстрагент 1:10. Экстрагирование осуществляли методом мацерации с применением ультразвука частотой 25 Гц при температуре 25 °С, время экстрагирования - 30 мин. Полученное извлечение отстаивали, затем отфильтровывали. Сушку экстракта и удаление экстрагента проводили в вакуум-выпарном аппарате при температуре не выше 45 °С при разрежении 15-20 мм рт. ст. до остаточного влагосодержания в экстракте не более 5%. Полученные сухие экстракты измельчали и просеивали через сито 1,0 мм. Технологическая схема получения экстракта сухого из сырья лука туркестанского и лука молочнокветного приведена на рисунке 46.



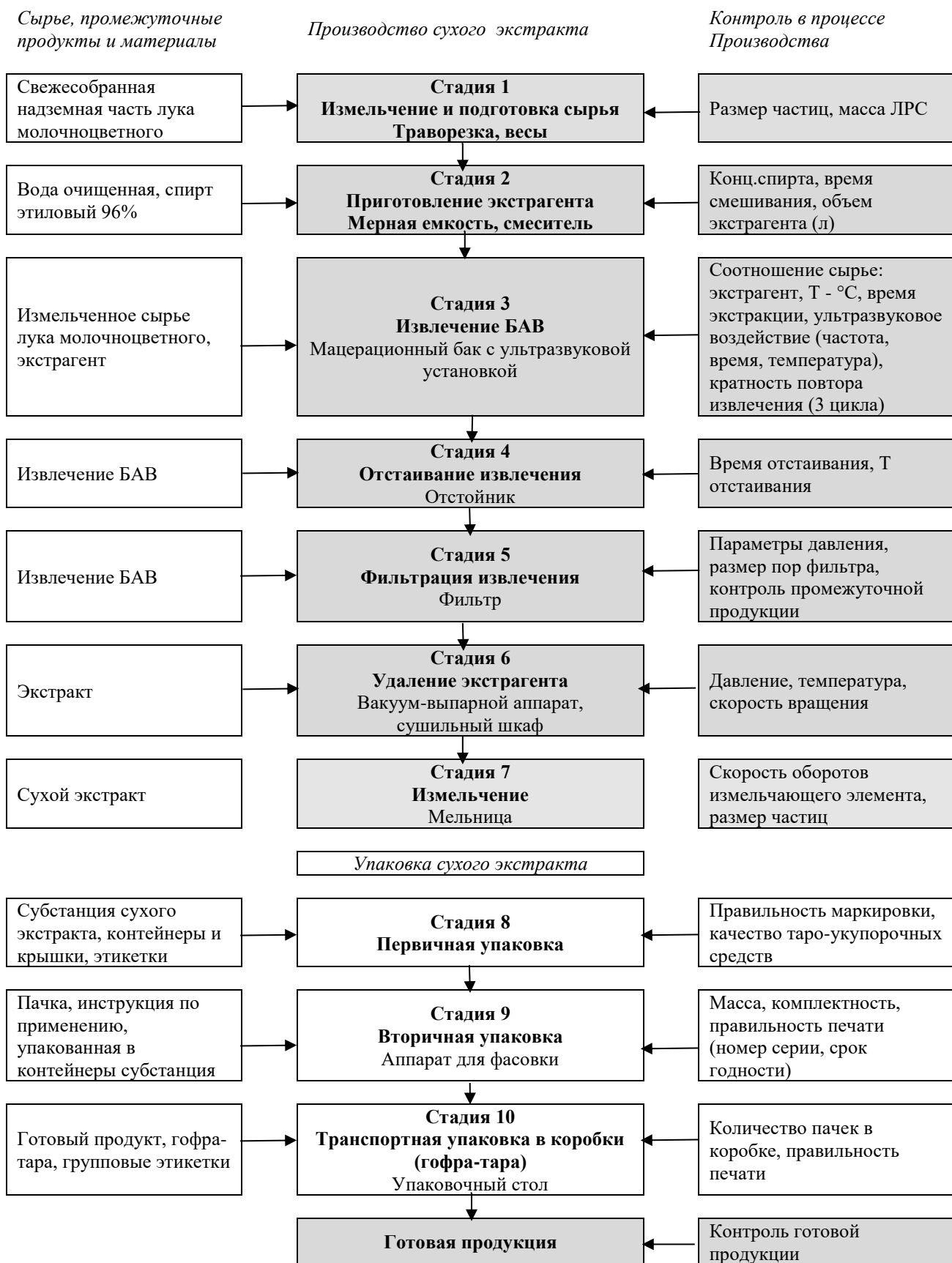


Рисунок 46 – Технологическая схема получения экстракта сухого из сырья лука туркестанского и лука молочнокветного

Технологический процесс при получении экстракта сухого из сырья методом мацерации с интенсификацией процесса воздействием ультразвука состоит из следующих технологических стадий: измельчение сырья, приготовление экстрагента, извлечение БАВ, отстаивание, фильтрация, упаривание, измельчение, первичная упаковка, вторичная упаковка и транспортная упаковка.

## **5.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) этанольных экстрактов *A. turkestanicum* и *A. galanthum***

ВЭЖХ является универсальным методом, благодаря которому возможно сразу проведение и качественного (по времени удерживания), и количественного анализа полученных экстрактов. ВЭЖХ обладает высокой чувствительностью и точностью, также позволяет экономить время, за счет того, что позволяет проводить с одной пробой несколько испытаний: «Идентификация», «Количественное определение» и «Посторонние примеси».

В результате проведенного ВЭЖХ-исследования было установлено, что кверцетин и его производные отделены от остальных флавоноидов, идентифицированных в этанольных экстрактах *A. galanthum* и *A. turkestanicum*, что позволяет рекомендовать данный метод для идентификации фитосубстанции на их основе. Отрицательный режим ионизации был признан предпочтительным по сравнению с режимом положительных ионов, поскольку он обеспечивал более высокую чувствительность к фенолическим компонентам испытуемых экстрактов. Хроматограммы, представленные на рисунке 47, показывают дифференциацию состава 50 % этанольных экстрактов сырья из луковиц по сравнению с экстрактами, полученными из листьев *A. galanthum*. Хотя состав экстрактов из луковиц *A. galanthum* и *A. turkestanicum* схож, хроматограмма последних видов пропускает четкие пики в 8.5 и 35.5 мин, и показывает менее обильный через 19.0 мин. Анализ ВЭЖХ-ESI-QTOF-MS/MS позволил предварительно идентифицировать основные сигналы, записанные в полученных хроматограммах.

Результаты показывают, что флавоноиды и их гликозиды составляют основную группу соединений в тестируемых экстрактах. Список предварительно идентифицированных соединений представлен в таблице 23.

Сравнение значения времен удерживаний пиков кверцетина и его производных позволило предположить, что именно кверцетин и его производные являются доминирующими и диагностически значимыми компонентами этанольных экстрактов *A. galanthum* и *A. turkestanicum*. Для пиков кверцетина дигексозида, дигидрокверцетина, изокверцетина и кверцетина время удерживания при данных условиях составляли 10.4 мин, 16.0 мин, 18.7 мин и 29.6 мин соответственно.

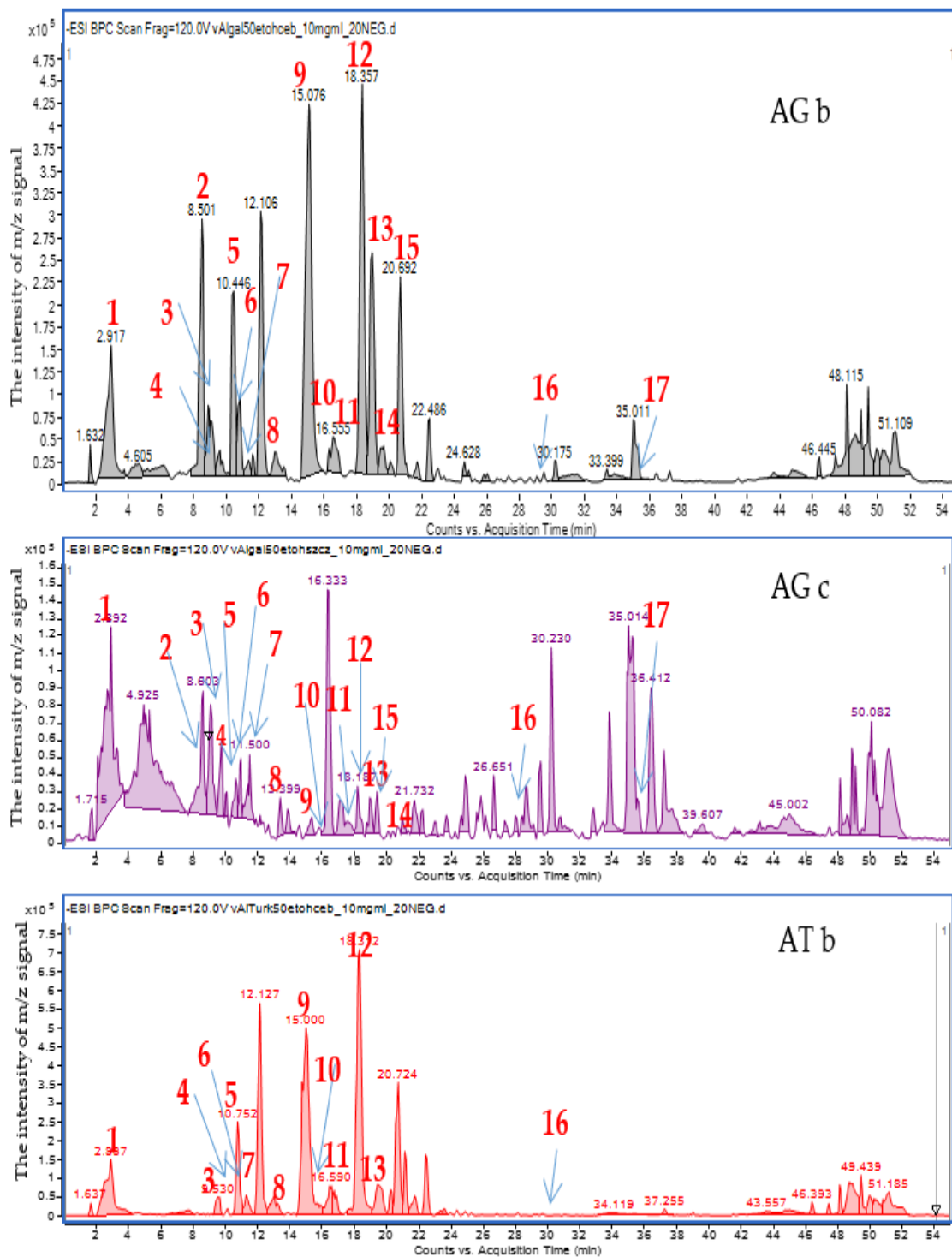


Рисунок 47 - Массовые хроматограммы в режиме отрицательных ионов 50% этанольных экстрактов: экстракт луковицы *Allium galanthum* (AGb), экстракт листьев *Allium galanthum* (AGc), экстракт луковицы *Allium turkestanicum* (ATb).

Таблица 23 - Список обнаруженных метаболитов в 50 % этанольных экстрактах из сырья *A. galanthum* и *A. turkestanicum*

Режим ионизации	Время удерживания (мин)	Молекулярная формула	m/z экспериментальный	m/z рассчитанный	Дельта (ppm)	ЭДС	MS/MS фрагменты	Предварительное соединение	Луковица <i>A.galanthum</i>	Листья <i>A.galanthum</i>	Луковица <i>A.turkestanicum</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФЛАВОНОИДЫ											
[M-H] <sup>-</sup>	8.2	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>22</sub>	787.1938	787.1986	-6.03	14	625, 463, 301	Тригликозид кверцетина	+	+	-
[M-H] <sup>-</sup>	8.7	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	465.1038	465.1067	-6.11	11	303, 285	Таксифолин глюкозид	++	+	Тр
[M-H] <sup>-</sup>	10.4	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	625.1410	625.1463	-8.43	13	463, 301	Кверцетин дигексозид	++	++	+
[M-H] <sup>-</sup>	10.5	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.1461	609.1515	-8.84	13	446, 283	Кемпферол диглюкозид	+	++	+
[M-H] <sup>-</sup>	16.0	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	303.0510	303.0481	9.62	10	285	Дигидрокверцетин	+	++	+
[M-H] <sup>-</sup>	16.9	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	639.1567	639.1573	-0.98	13	315	Изорхамнетин диглюкозид	+	+	Тр
[M-H] <sup>-</sup>	18.7	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.0882	463.0907	-5.39	12	301, 151	Изокверцетин	++	++	+
[M-H] <sup>-</sup>	19.8	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0933	447.0894	8.67	12	284, 174	Кемпферол глюкозид	+	+	-
[M-H] <sup>-</sup>	20.8	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	477.1038	477.1041	-0.52	12	314	Изорхамнетин глюкозид	++	++	Тр
[M-H] <sup>-</sup>	29.6	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301.0354	301.0381	-9.02	11	-	Кверцетин	+	++	+
[M-H] <sup>-</sup>	35.5	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285.0405	285.0391	4.76	11	-	Кемпферол	+	++	-
[M-H] <sup>-</sup>	13.1	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1089	449.1109	-4.37	11	287	Цианидин глюкозид	+	Тр	Тр
ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ											
[M-H] <sup>-</sup>	2.7	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0197	191.0209	-6.11	3	129, 111	Лимонная кислота	+	+	+
[M-H] <sup>-</sup>	9.15	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	175.0612	175.0623	-6.26	2	157, 115	Пропилмелевая кислота	+	+	+

Примечание: ЭДС: эквивалент двойной связи, дельта: разница между высчитанной и экспериментальной массой; AGb – луковицы *Allium galanthum*, AGc – листья *Allium galanthum*, ATb - луковицы *Allium turkestanicum*, Tr - следы, + обнаружено, - не обнаружено. Интенсивность пиков отмечена количеством плюсов, а именно ++ пики с интенсивностью 10<sup>5</sup> и + пики с интенсивностью 10<sup>4</sup>

В таблице 24 указаны результаты количественного определения соединений, выделенных в этанольных экстрактах луковицах и листьях *Allium galanthum* и луковицах *Allium turkestanicum*

Таблица 24- Результаты количественного определения

Соединение	Луковица <i>Allium galanthum</i> %	Лист <i>Allium galanthum</i> %	Луковица <i>Allium turkestanicum</i> %
Лимонная кислота	4.23	7.51	4.2
Тригликозид кверцетина	8.47	5.20	не обнаружено
Таксифолин глюкозид	2.11	4.62	1.40
Пропимелевая кислота	0.71	3.46	0.28
Кверцетин дигексозид	5.64	1.73	7.08
Кемпферол диглюкозид	3.53	4.84	1.41
Цианидин глюкозид	0.71	1.15	1.42
Дигидрокверцетин	0.75	0.58	1.46
Изорхамнетин диглюкозид	1.41	1.15	2.81
Изокверцетин	7.06	1.73	2.56
Кемпферол глюкозид	1.13	0.57	не обнаружено
Изорхамнетин глюкозид	6.35	1.73	1.02
Кверцетин	0.42	1.15	2.08
Кемпферол	2.12	6.97	не обнаружено -

Композиционные исследования выявили наличие различных типов флавоноидов в испытуемых экстрактах. Было обнаружено, что исследуемые нами объекты содержат как агликоны флавоноидов, так и гликозиды производные: кверцетина, кемпферола, изоргамнетина, дигидрокверцетина и цианидина. Однако, гликозилированные формы были идентифицированы в более высокой концентрации: кверцетин, дигидрокверцетин и кемпферол.

Выполненные хроматографические анализы показали, что состав экстрактов из луковиц отличался от экстракта, полученных из листьев. Луковицы также отличаются друг от друга содержанием отдельных соединений из группы полифенолов, что можно было увидеть по дифференцированным интенсивностям пиковых областей интересующих соединений.

Производное кверцетина, а именно его тригликозид, было идентифицировано в *A. galanthum* аналогично результатам ранее опубликованного исследования Виджаялакшми и соавторов [201]. При анализе ВЭЖХ-МС экстракта из листьев *A. galanthum* наблюдались два сигнала для дигексозида кверцетина во времени удерживания 10.6 и 12.6 мин, в отличие от экстрактов из луковиц лука молочнокветного. Различные два пика могут быть получены из производных кверцетина с различным замещенным сахарным остатком. Интересно, что в случае экстрактов из обеих луковиц второго изомера гексозида кверцетина не наблюдалось. Согласно полученным результатам, оба соединения (значение сигнала  $m/z$  463 и) присутствовали только в листьях *A.*

*galanthum*. Виджаялакшми и соавторы предоставили предварительную идентификацию двух изомеров. Кверцетин-7,4'-диглюкозид был элюирован в качестве первого изомера, который был выполнен на хроматографической колонке с аналогичным адсорбентом, тогда как кверцетин-3,4'-диглюкозид был идентифицирован как второй изомер.

Наибольшее количество кемферола содержится в листьях *A. galanthum*. В свою очередь, его количество в луковицах *A. galanthum* было небольшим, тогда как в луковицах *A. turkestanicum* подтверждалось наличие следовых количеств, аналогично его гликозидам, которые присутствовали только в небольшом количестве. Таким образом, можно сделать вывод, что *A. galanthum* отличается по химическому составу от *A. turkestanicum*, наличием кемпферола.

Кемпферол диглюкозид, который был подтвержден в исследуемых экстрактах, присутствовал в двух изоформах и обеспечивал два пика в массовых хроматограммах при Rt 10,5 и 11,6 мин. Две группы сигналов могут исходить от двух замещающих изомеров, причем сахарные части присоединены в разных местах к молекуле кемпферола. Ранее другие авторы обнаружили несколько изоформ этого флавонола в экстрактах из листьев *Allium tuberosum* [202]. В их анализе ВЭЖХ-МС эти производные были названы кемпферол диглюкозид, или производные кемпферол софорозида.

Согласно литературным данным, кемпферол глюкозид является ведущим соединением, идентифицированным в экстрактах представителей рода *Allium*. Его наличие также было подтверждено в проанализированных в образцах лука молочноцветного и лука туркестанского, хотя в течение времени удерживания 17.5 мин массовые хроматограммы также показали меньший пик второго глюкозида кемпферола. В природе встречаются 5- и 7-О-гликозиды кемпферола, хотя представляется вероятным, что позиция замещения С-7 является предпочтительной для представителей рода *Allium*. 3,7-ди-О-гликозиды кемпферола были ранее описаны в научной литературе, например, в *Allium macrostemon* [203].

### **5.3 Валидация технологического процесса получения сухого экстракта лука молочноцветного и лука туркестанского**

На ТОО «Fitoleum» проведено масштабирование лабораторной технологии получения сухого экстракта исследуемых объектов в опытно-промышленную. На основании анализа рисков были подобраны оптимальные технологические параметры и определены значимые контрольные точки. Анализ рисков проводили с использованием диаграммы Исикавы и метода ранжирования. Снижение и принятие рисков осуществляли при помощи корректирующих и предупреждающих действий (САРА). Объем валидируемых серий составлял 10 кг каждая. Используемое в валидационных работах технологическое и лабораторное оборудование, а также инженерные системы прошли квалификацию и поверку, используемые аналитические методики - валидацию.

В таблице 25 представлен план валидации технологического процесса производства экстракта сухого из надземной части лука молочноцветного, в

котором представлены следующие критические стадии: измельчение и подготовка сырья, приготовление экстрагента, извлечение БАВ, отстаивание извлечения, фильтрация извлечения, удаление экстрагента, измельчение, первичная, вторичная, транспортная упаковки.

Таблица 25 – План валидации технологического процесса производства сухого экстракта лука молочнокветного и лука туркестанского

Стадии процесса	Параметры	Регламентируемые нормы	Количество отбора проб в одной серии
1	2	3	4
Стадия 1 Измельчение и приготовление сырья	Качество сырья Масса сырья Размер частиц измельченных луковиц	В соответствии НТД: тех. Регл ± 0.05 кг (3 – 5) мм,	1 1 9 проб
Стадия 2 Приготовление экстрагента	Качество исходного сырья	В соответствии НТД: тех. регл	1
	Масса (объем) используемого сырья	± 0.05 кг	1
	Время смешивания	30 мин	1
	Скорость смешивания	15 об/мин	Каждые 2 мин
	Концентрация этанола	49-51 %	15 проб
Стадия 3 Извлечения из ЛРС	Температура экстракции	от 20 до 25 °С	Каждые 1 ч
	Частота ультразвука	25-35 Гц	Каждые 2 мин
	Время ультразвуковой обработки	30-50 мин	1
	Идентификация биологически активных веществ (БАВ)	В соответствии с СП-фирмы	9 точек
	Концентрация спирта этилового	В соответствии с СП-фирмы	9 точек
	Количественное определение	В соответствии с СП-фирмы	9 точек
Стадия 4 Отстаивание извлечения	Температура при отстаивании	Не выше 8 °С	Каждый 1 ч
	Время отстаивания	72 ч	1
Стадия 5 Фильтрация извлечения	Размер пор фильтров	1.0 мкм; 0.5 мкм; 0.65/0.45 мкм	1
	Качество полупродукта	В соответствии с СП-фирмы	9 точек
Стадия 6 Удаление экстрагента	Температура	Не выше 45 °С	Каждый 1 ч
	Скорость вращения	70-90 об/мин	Каждый 1 ч
	Давление	97 мкбар	Каждый 1 ч
Стадия 7 Измельчение	Размер частиц	3.0 – 5.5 мкм	9 точек

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4
Стадия 8 Первичная упаковка	Объем заполнения упаковки В начале В середине В конце	10 г ± 5 % В соответствии НТД: тех. регла, СП	9
			9
			9
	Комплектность В начале В середине В конце	В соответствии с СП	9
			9
			9
	Качество маркировки В начале В середине В конце	В соответствии с СП	9
			9
			9

Проведенная оценка сырья объектов исследования соответствует требованиям проекта нормативного документа (НД) и Государственной фармакопеи Республики Казахстан. В 9 образцах, измельченного сырья в диапазоне 3-5 мм, отобранных сверху, середины и низу сборника исследовали размер частиц. Результаты исследования фракционного состава частиц 3 x произведенных серий представлены на рисунке 48. Исследования показали, что частиц, несоответствующих указанному размеру в общем не превышает 5 %.

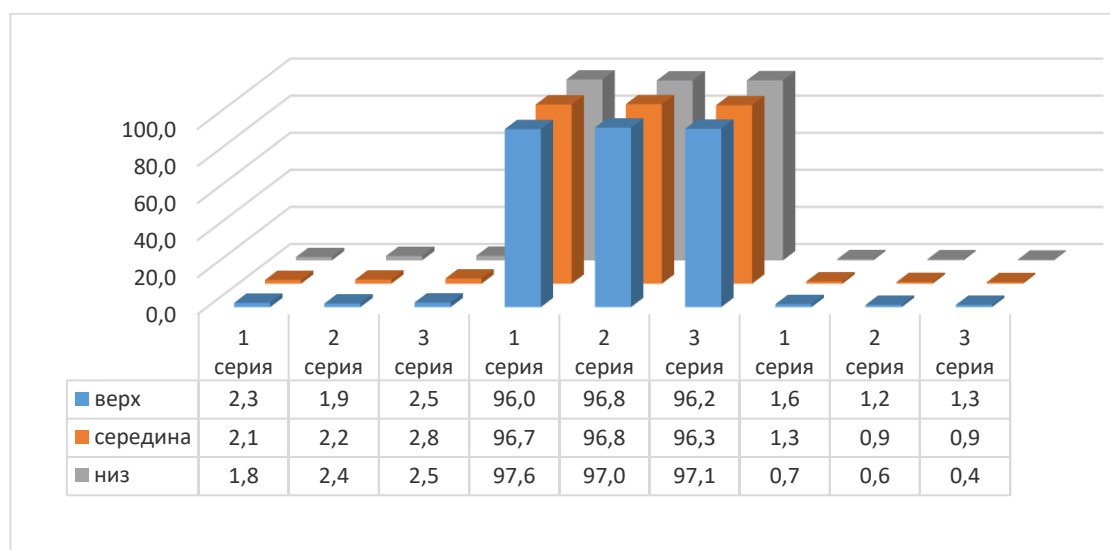


Рисунок 48 – Диаграмма результатов исследования фракционного состава частиц измельчённого сырья в трех произведенных серий

Для приготовления экстрагента в смеситель заливали этанол 96 % (об/об) и воду фармакопейного качества и перемешивали в течение 30 мин, со скоростью 15 об/мин, контроль осуществляли каждые 2 мин в исследуемого диапазона времени. Полученные значения находятся на в пределах 6 δ, RSD меньше 2 %, процесс смешивания статистически управляем по параметру скорость вращения









качества: описание, идентификация БАВ, этанол, количественное определение суммы флавоноидов. Контролировали температуру в реакторах при каждой экстракции. Полученные данные свидетельствуют о воспроизводимости процесса: результаты контрольные карт Шухарт для 3-х серий находятся в заданных регламентируемых границах, RSD не превышало 2.0 %. Отклонений в технологическом процессе не обнаружено, процесс стабилен и находился в пределах регламентируемых норм, индексы возможности процесса по параметру «Температура в реакторе при экстракции» для 1 серии составили  $C_p (1.54) \geq C_{pk} (1.53) \geq 1$ , для 2 серии -  $C_p (1.39) \geq C_{pk} (1.36) \geq 1$ , для 3 серии -  $C_p (1.51) \geq C_{pk} (1.49) \geq 1$  (рисунки 55-57).

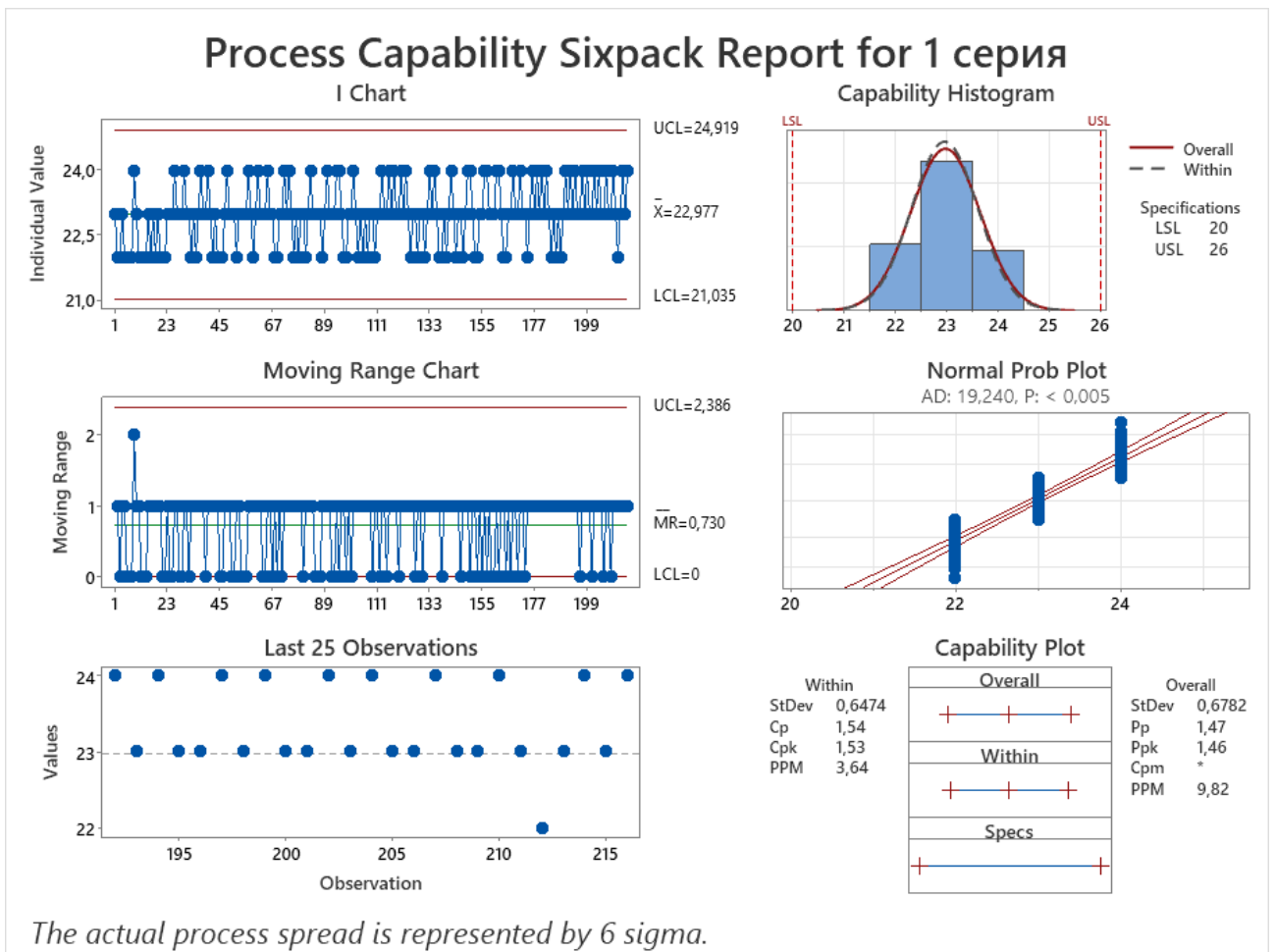


Рисунок 55 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 1)

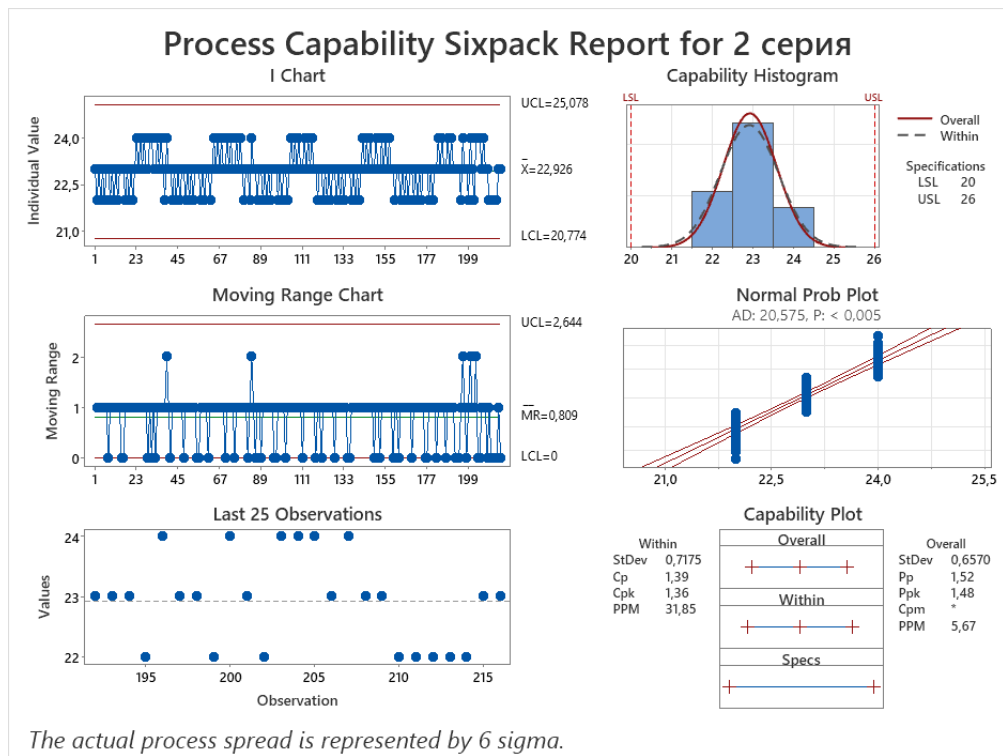


Рисунок 56 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 2)

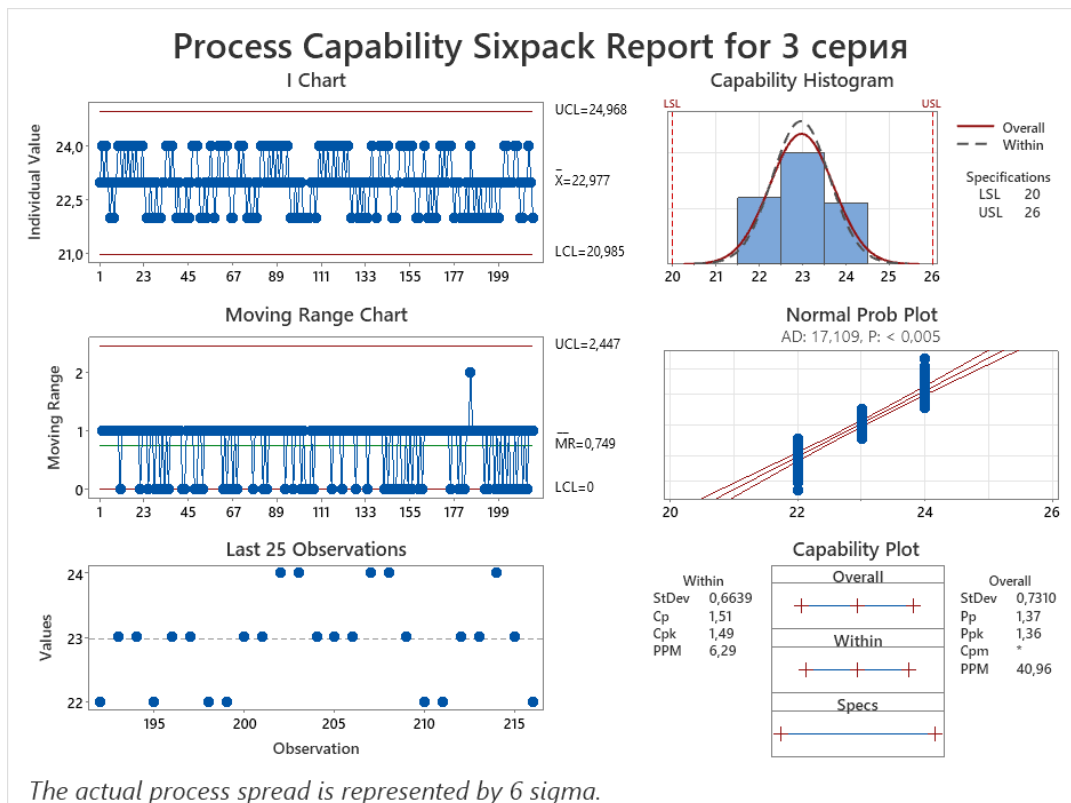


Рисунок 57 – Контрольная карта Шухарта параметра температура в реакторе при экстракции (серия 3)

Частоту ультразвука устанавливали в диапазоне от 25 до 35 Гц в течении 30-50 мин, контроль за процессом осуществляли каждые 2 мин. Полученные данные свидетельствуют о воспроизводимости процесса RSD не превышает 1 %, в контрольных картах Шухарта значительные отклонения отсутствуют (рисунки 58-60) Индексы возможности процесса по параметру «частота ультразвука» для 1 серии составили  $C_p (1.54) \geq C_{pk} (1.53) \geq 1$ , для 2 серии -  $C_p (1.39) \geq C_{pk} (1.36) \geq 1$ , для 3 серии -  $C_p (1.51) \geq C_{pk} (1.49) \geq 1$ .

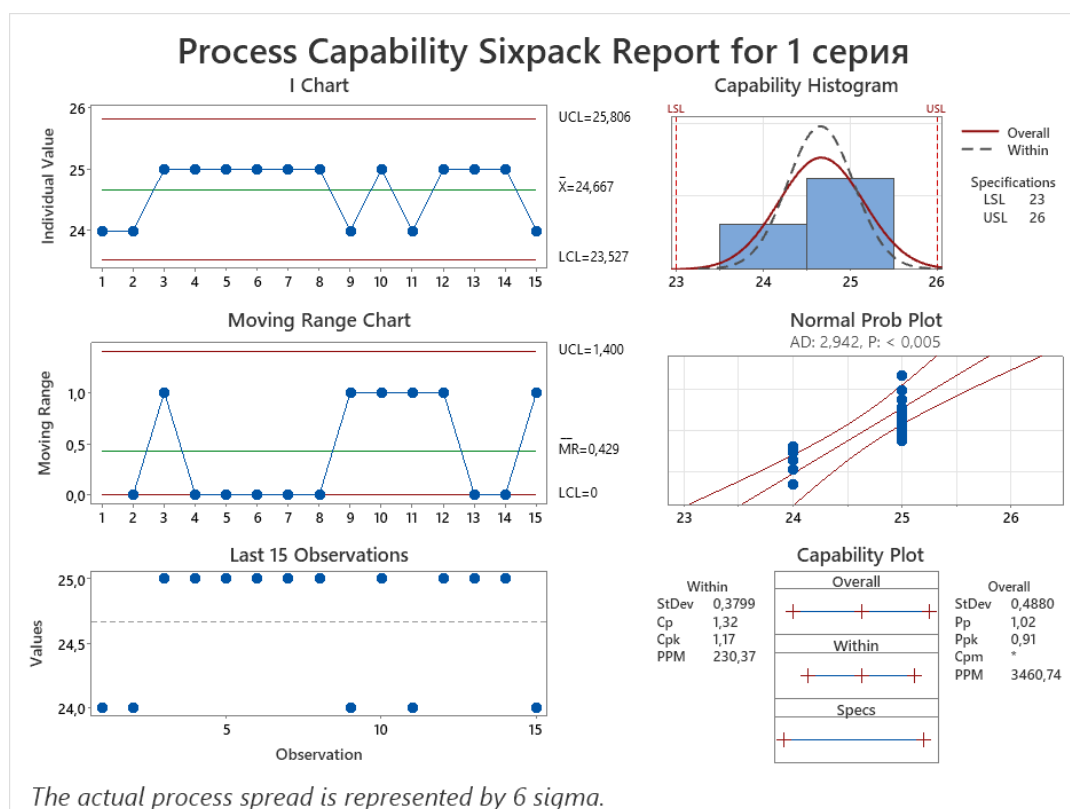


Рисунок 58 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 1)

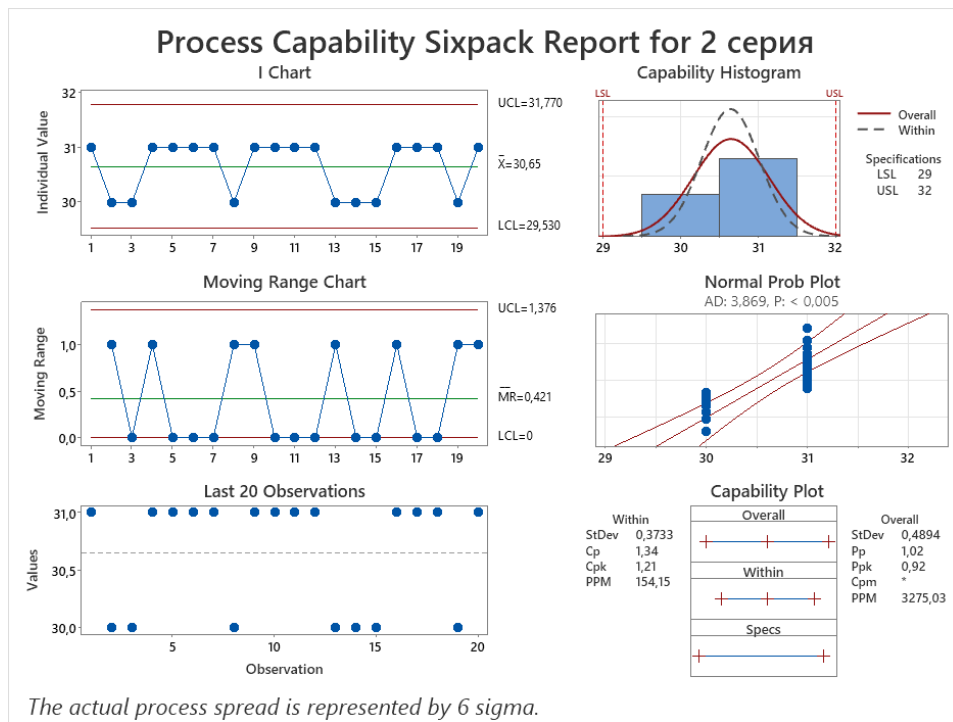


Рисунок 59 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 2)

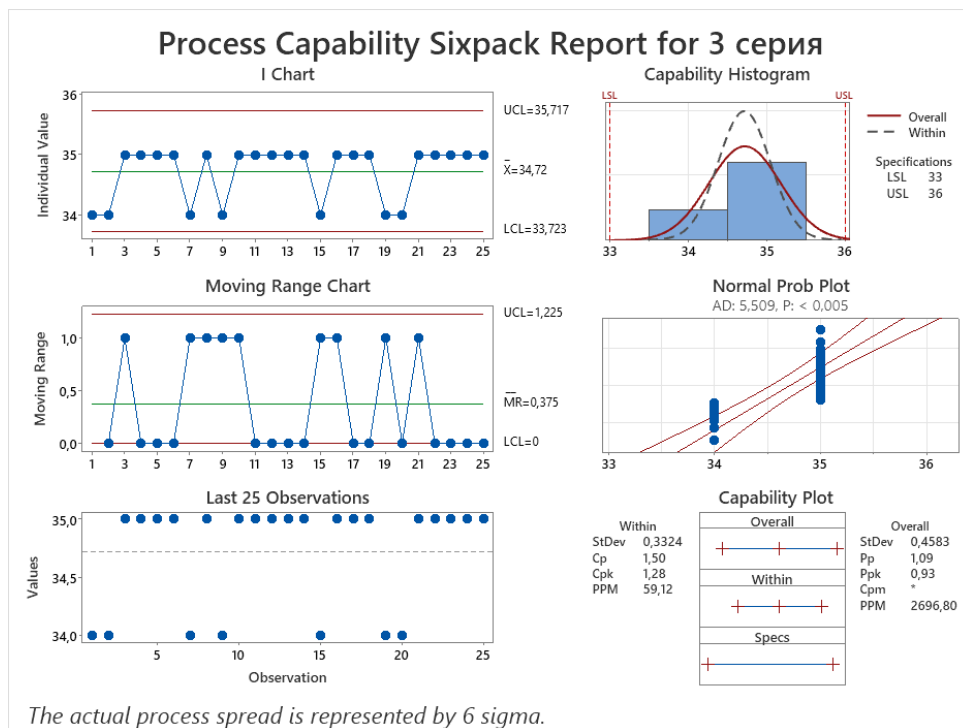


Рисунок 60 – Контрольная карта Шухарта параметра частота ультразвука в реакторе при экстракции (серия 3)

После объединения извлечений полупродукт исследовали по следующим показателям качества: описание, идентификация БАВ, этанол, количественное определение суммы флавоноидов. Отбор проб осуществляли с 9 точек (3 пробы

сверху, 3 пробы, в середине, 3 пробы внизу) по 3 повторности с каждой пробы. Описание полупродукта и идентификация основных групп БАВ полностью соответствовало спецификации качества на полупродукт. Содержание этанола в полупродукте находилось в пределах регламентируемых норм. Полученные данные свидетельствуют о воспроизводимости процесса: RSD не превышает 1 %, в контрольных картах Шухарта значительные отклонения отсутствуют (рисунки 61-63) Индексы возможности процесса по параметру «частота ультразвука» для 1 серии составили  $C_p (1.38) \geq C_{pk} (1.37) \geq 1$ , для 2 серии -  $C_p (1.58) \geq C_{pk} (1.31) \geq 1$ , для 3 серии -  $C_p (1.55) \geq C_{pk} (1.38) \geq 1$ .

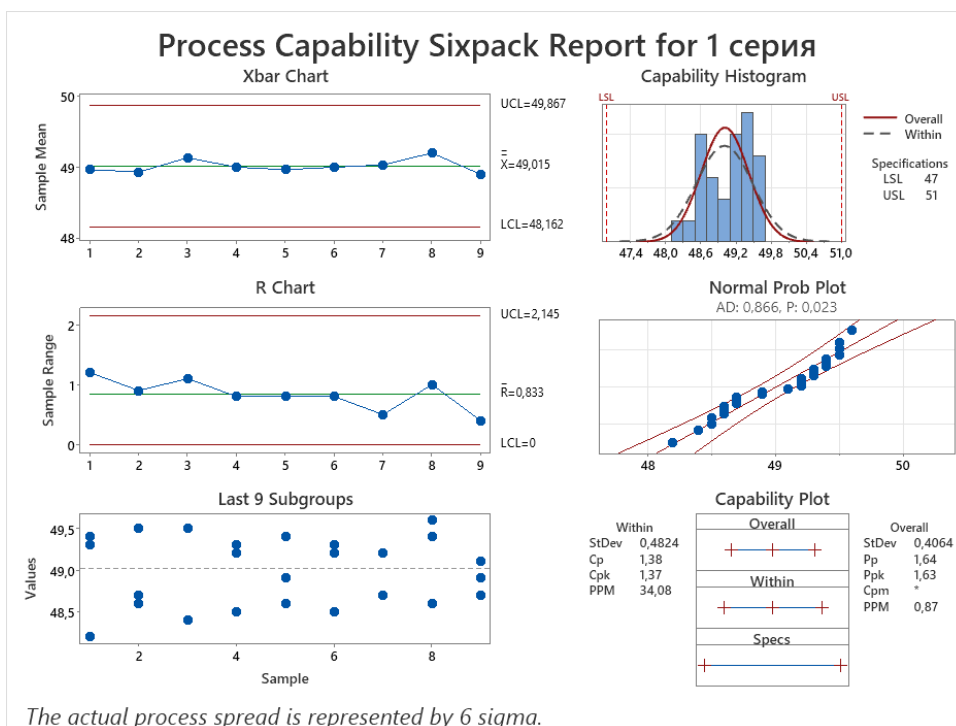


Рисунок 61 – Контрольная карта Шухарта показателя качества количественное содержание спирта этилового в извлечении (серия 1)



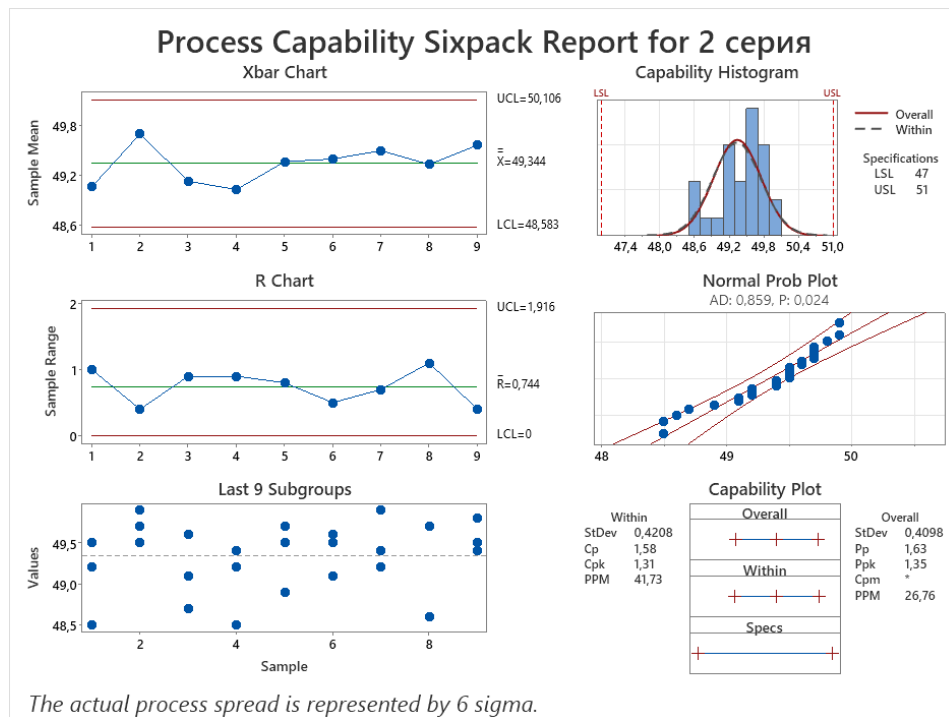


Рисунок 62 – Контрольная карта Шухарта показателя качества количественное содержание спирта этилового в извлечении (серия 2)

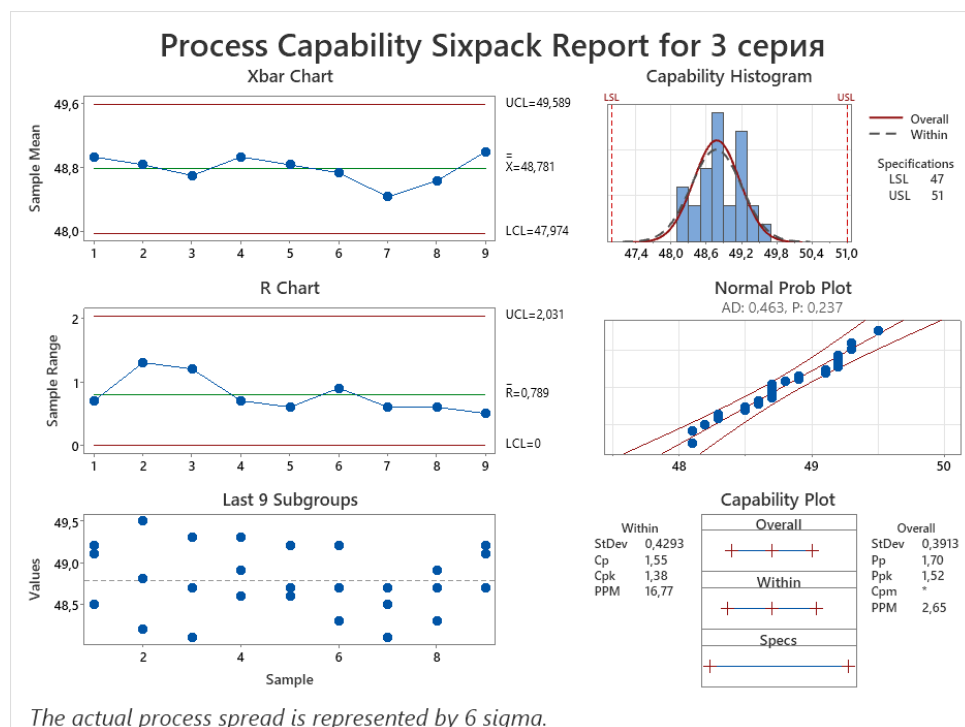


Рисунок 63 – Контрольная карта Шухарта показателя качества количественное содержание спирта этилового в извлечении (серия 3)

Полученное извлечение отстаивали при температуре 6-8 °С в течении 72 ч и ежечасно регистрировали температуру. Полученные данные свидетельствуют о воспроизводимости процесса RSD не превышает 1 %, в контрольных картах

Шухарта значительные отклонения отсутствуют (рисунки 64-66) Индексы возможности процесса по параметру «частота ультразвука» для 1 серии составили  $C_p (1.48) \geq C_{pk} (1.26) \geq 1$ , для 2 серии -  $C_p (1.41) \geq C_{pk} (1.01) \geq 1$ , для 3 серии -  $C_p (1.37) \geq C_{pk} (1.03) \geq 1$ .

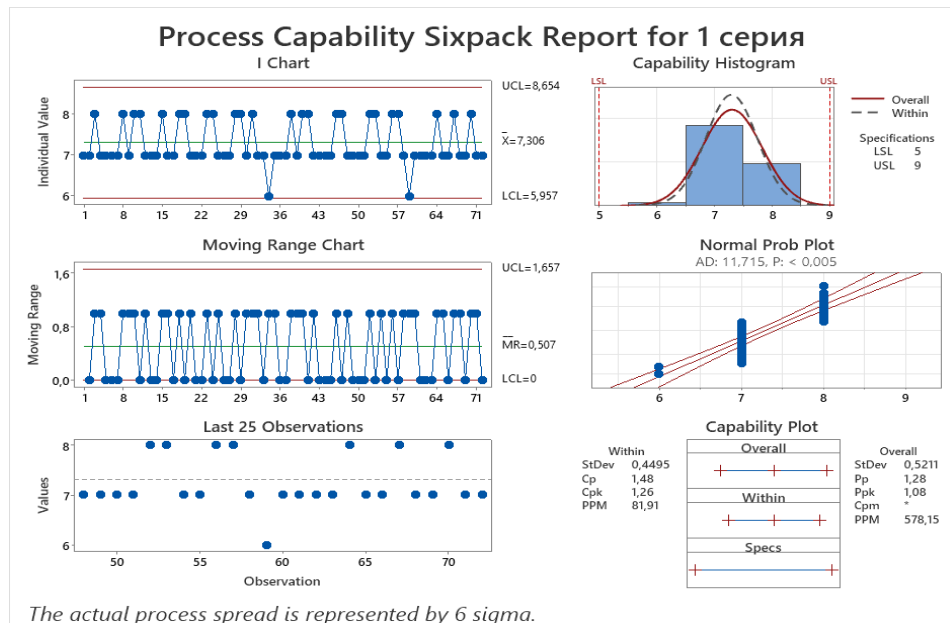


Рисунок 64 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании (серия 1)

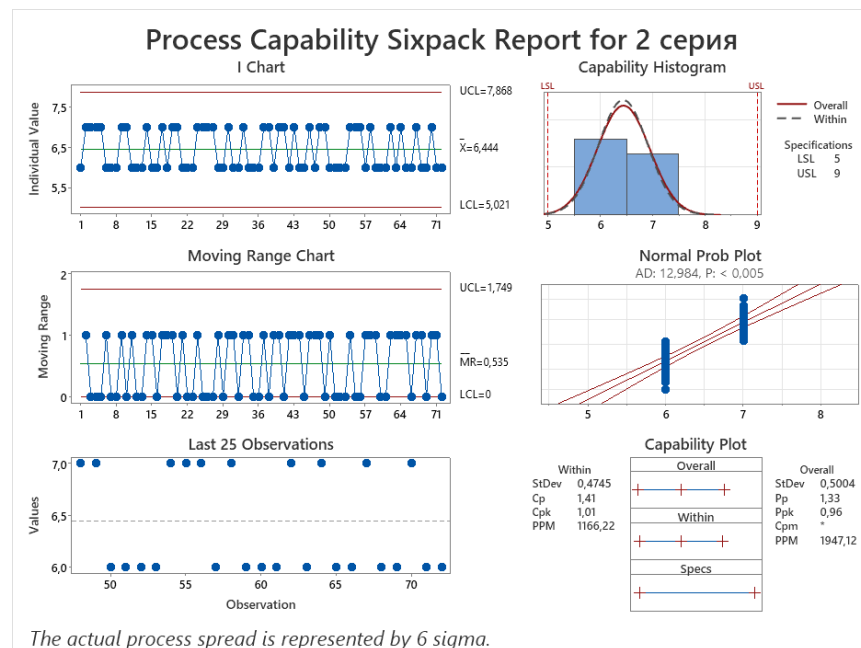


Рисунок 65 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании (серия 2)

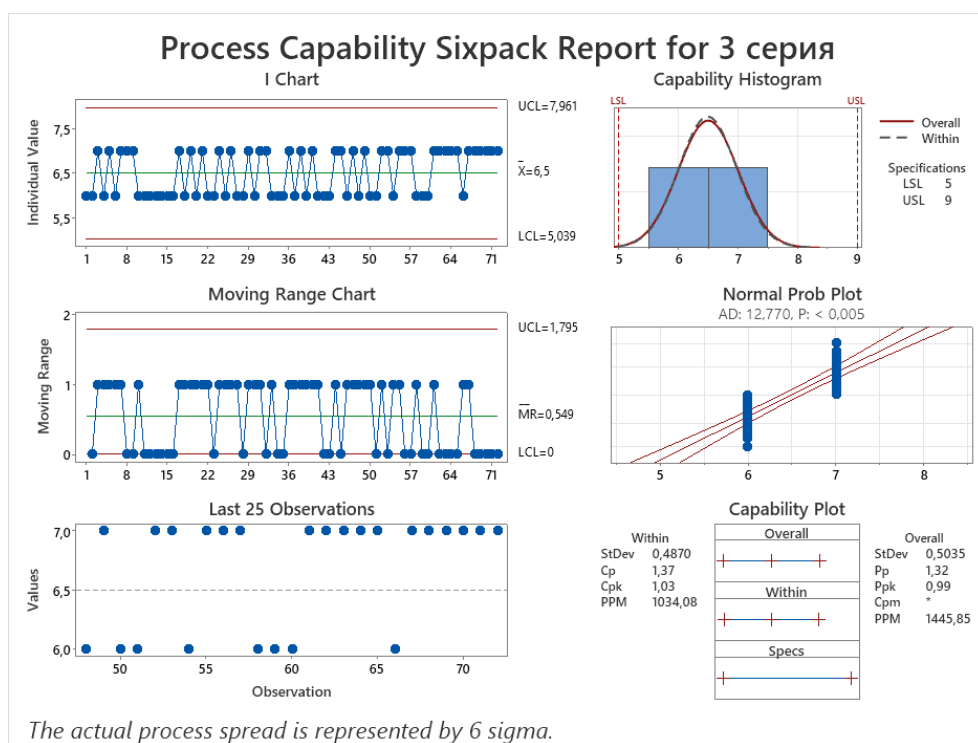


Рисунок 66 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при отстаивании (серия 3)

Фильтрацию извлечения проводили трехступенчато, через фильтры с размером пор 1.0 мкм; 0.5 мкм; 0.65/0.45 мкм. Качество фильтрата (описание, идентификация БАВ, этанол, количественное определение суммы флавоноидов) сопоставимо с данными до фильтрации.

Удаление экстрагента проводили при температуре 45 °С. Нагревание водяной рубанки составляло 30 мин, скорость вращения - составляла 70-90 об/мин. Удаление экстрагента при 39 °С осуществляли при 90 об/мин, 42 °С – 80 об/мин, 45 °С – 70 об/мин. Скорость вращения на протяжении всего времени эксперимента была постоянной. Параметр температура удаления экстрагента находился в пределах регламентируемых норм. Полученные данные свидетельствуют о воспроизводимости процесса RSD не превышает 2 %, в контрольных картах Шухарта значительные отклонения отсутствуют (рисунки 67 - 69) Индексы возможности процесса по параметру «частота ультразвука» для 1 серии составили  $C_p (1.61) \geq C_{pk} (1.45) \geq 1$ , для 2 серии -  $C_p (1.73) \geq C_{pk} (1.70) \geq 1$ , для 3 серии -  $C_p (1.33) \geq C_{pk} (1.25) \geq 1$



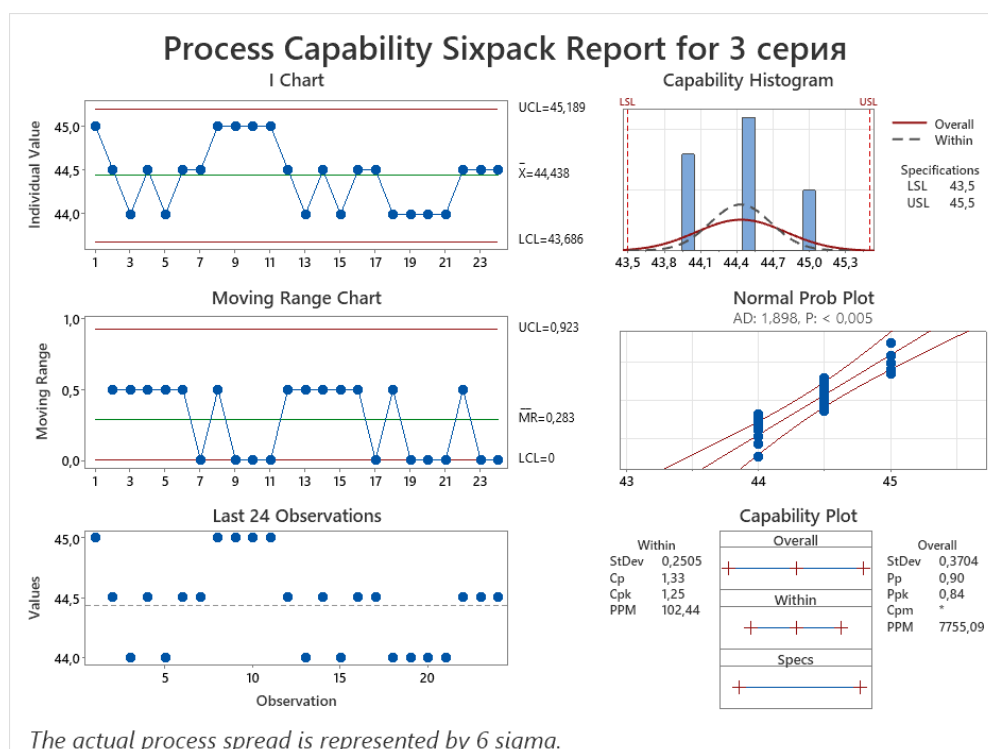


Рисунок 69 – Контрольная карта Шухарта технологического параметра температура при удалении экстрагента (серия 3)

Качество готового продукта находилось в пределах регламентируемых норм. Размер частиц при измельчении составлял 30-60 мкм. Полученный порошок упаковывали в тару из коричневого стекла по 10 г, варьирование массы не превышало 2 %, комплектность и качество маркировки соответствовало проекту НД.

По результатам валидационных испытаний составлен отчет, где подтверждены ключевые параметры процесса (Приложение М).

Проведенное исследование свидетельствует о валидности технологического процесса описанного в утвержденном опытно-промышленном регламенте на производство экстракта сухого из травы лука молочнокветного и лука туркестанского на предприятии ТОО «Fitoleum» и подтверждает успешность проведенного масштабирования технологического процесса.

#### 5.4 Стандартизация экстрактов сырья *A.turkestanicum* и *A.galanthum*

Стандартизацию экстрактов, полученных из растительного сырья *A.turkestanicum* и *A.galanthum* проводили в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № КР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств» и современными фармакопейными требованиями по показателям: описание, идентификация, остаточное количество органических растворителей содержание тяжелых металлов, потеря в массе при высушивании,

микробиологическая чистота, масса содержимого контейнера, гранулометрический состав, количественное определение: флавоноидов в пересчете на кверцетин (лук туркестанский) и кемпферол (лук молочнокветный), упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок хранения, основное фармакологическое действие

Методики приведены во второй главе. Результаты оценки качества этанольных экстрактов сухих лука туркестанского и лука молочнокветного представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты оценки качества экстрактов сухих лука туркестанского (3 серии)

Показатели качества	Регламентируемы нормы	Результаты исследования	Методы испытаний
1	2	3	4
Описание	Гигроскопичный кристаллический порошок молочного цвета	Гигроскопичный порошок молочного цвета	В соответствии с НД
Идентификация А. Качественные реакции на флавоноиды	Качественная реакция с 5 % спиртовым раствором $AlCl_3$ , желтое окрашивание	Желтое окрашивание	В соответствии с НД
В. ВЭЖХ - флавоноиды	Времена удерживания кверцетина 35.5 мин	Соответствует	В соответствии с НД
Остаточное количество органических растворителей (растворители)	Не более 0.5 %	Соответствует	ГФ РК I, т. 1 5.4 (2.4.24)
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.2	ГФ РК I, т. 1 2.8.17
Тяжелые металлы	Не более 10 млн <sup>-1</sup>	Не обнаружены	ГФ РК I, т. 1 2.4.8, метод А
Масса содержимого контейнера	Не менее 10 г	10.0 г	В соответствии с НД
Гранулометрический состав	30 – 60 мкм	40	В соответствии с НД
Микробиологическая кислота	Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г. Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамтрицательных бактерий в 1 г Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г..	Не обнаружены	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т. 2, 2.6.13

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4
Количественное определение: флавоноидов в пересчете на кверцетин	Не менее 2,0 %	2,63 %	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.29
Упаковка	По 10 г препарата в стеклянные флаконы для фармацевтического применения из коричневого стекла I класса с винтовой горловиной.	Соответствует	В соответствии с НД ГФ РК I, т. 1, 3.2.1, 3.2.2
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	Соответствует	В соответствии с НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	Соответствует	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	Соответствует	В соответствии с НД
Срок хранения	Условно 3 года	Соответствует	В соответствии с НД
Основное фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	Соответствует	В соответствии с НД РК

Спецификации качества экстрактов представлены в Приложении О.

### 5.5 Изучение стабильности и определение сроков хранения экстрактов сырья *A. turkestanicum* и *A. galanthum*

Объектами исследования являются: экстракт сухой лука молочнокветного и лука туркестанского. Долгосрочные исследования стабильности проводили на опытно-промышленных сериях (таблица 27), полученных в ТОО «Fitoleum».

Экстракты, полученные из сырья *A. galanthum*, *A. turkestanicum* упакованы в стеклянные флаконы для лекарственных средств из коричневого стекла класса I объемом 10 мл с винтовой горловиной, укупоренные навинчиваемыми полипропиленовыми крышками с контролем первого вскрытия

Таблица 27 – Дизайн проведения долгосрочных исследований стабильности для растительных субстанций *A. galanthum*, *A. turkestanicum*

Условное обозначение/код серии	Объект исследования	Дата производства продукта	Количество образцов	Запланируемая периодичность исследования, мес.
1	2	3	4	5
01ЛМСЭ2019	Сухой экстракт лука молочнокветного	Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
02ЛМСЭ2019		Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
03ЛМСЭ2019		Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5
01ЛТСЭ2019	Сухой экстракт лука туркестанского	Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
02ЛТСЭ2019		Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
03ЛТСЭ2019		Март 2019	10 ед. прод	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24

Вид проведения испытаний при исследовании природных термолабильных субстанций – долгосрочный, температура  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  и относительная влажность  $60 \pm 5\%$ . При проверке качества препаратов во времени использованы фармакопейные методы, а используемые методики прошли валидацию/верификацию. Оценка полученных результатов осуществлялась при помощи программ minitab 20.

Описание сухого экстракта лука молочнокветного, идентификация в нем маркерных групп, микробиологическая чистота соответствуют требованиям спецификации, потеря в массе при высушивании находится в пределах от 2.4 % до 3.7 %, количественное содержание флавоноидов в пересчете на кемпферол составляет не менее 3.06 %. В соответствии с регрессионным анализом, проведенным при помощи программы minitab 20 предположительный срок хранения, составляет 5 лет (рисунок 70).

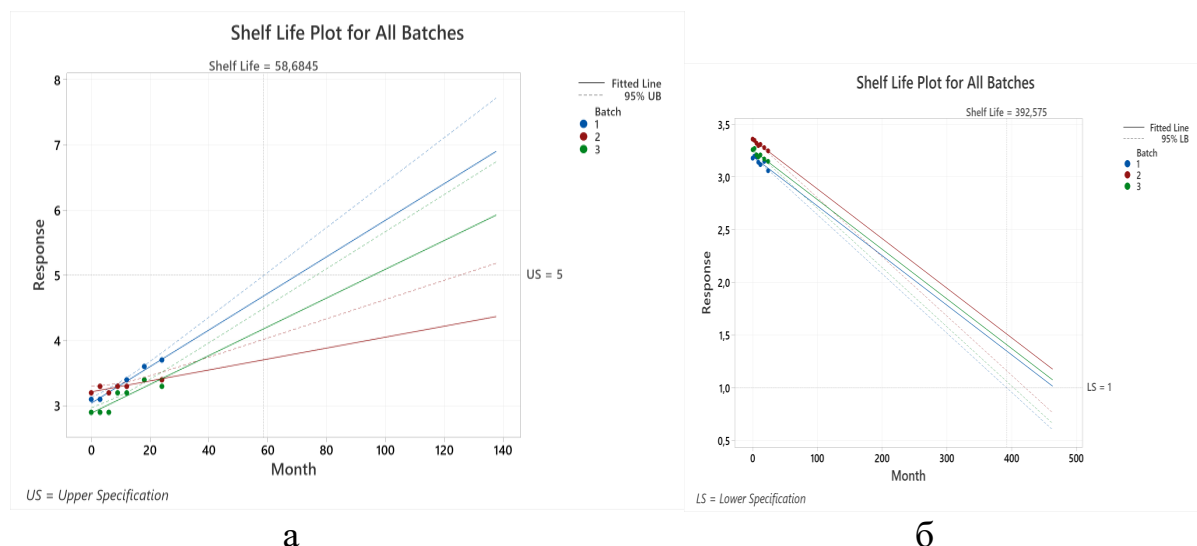


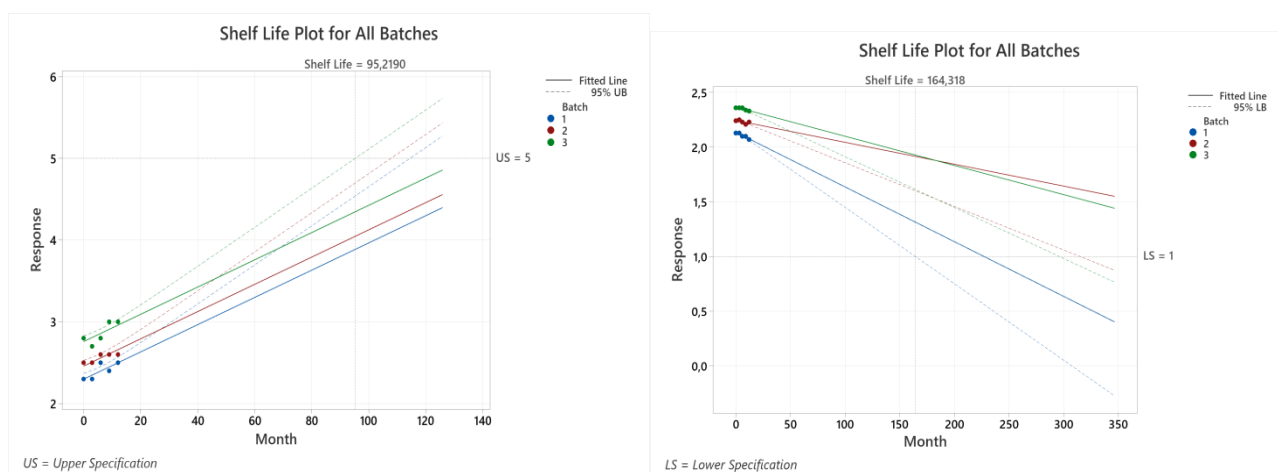
Рисунок 70 – Результаты исследования стабильности сухого экстракта лука молочнокветного (а) потеря в массе при высушивании, (б) количественное определение кверцетина

В приложении Н представлены результаты стабильности показателей качества, полученных при физико-химических и микробиологических испытаниях в соответствии со спецификациями. При исследовании стабильности трех опытно-промышленных серий исследуемых экстрактов изучали следующие показатели качества: описание, идентификацию, потеря в массе при высушивании, количественное содержание флавоноидов, микробиологическую чистоту. Периодичность контроля образцов составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяцев, для показателя



микробиологическая чистота – 0, 12, 24 месяца, данное условие позволяет подтвердить устойчивость активных компонентов во времени. На протяжении указанного срока и условий хранения готовые продукты, помещенные в первичную упаковку, характеризуются постоянством состава во времени, их качественные и количественные характеристики находятся в пределах регламентируемых норм.

Описание сухого экстракта лука туркестанского, идентификация в нем маркерных групп, микробиологическая чистота за исследуемый период (12 мес.) соответствуют требованиям спецификации, потеря в массе при высушивании находится в пределах от 2.3 % до 3.0 %, количественное содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин составляет не менее 2.07 %. Рассчитан предположительный срок хранения, который составляет 8 лет (рисунок 71).



а

б

Рисунок 71 – Результаты исследования стабильности гранул лука туркестанского (а) потеря в массе при высушивании, (б) количественное определение кверцетина

На основании проведенных исследований можно заключить, что полученные продукты (сухой экстракт лука молочнокветного и сухой экстракт лука туркестанского) подтвердили свою стабильность в течение 24 мес. и 12 мес. соответственно, сохраняя свои физико-механические и биофармацевтические показатели в первичной упаковке в установленных условиях: температура не выше +25°C, относительная влажность не выше 60 %. Рассчитанный предположительный срок хранения составляет 5-8 лет.

## 5.6 Изучение безопасности и скрининг биологической активности экстрактов

### *Определение антимикробной активности экстрактов*

Проведена оценка антимикробной и антифунгальной активности этанольных экстрактов, экстрактов диэтилового эфира луковиц *Allium*

*galanthum*, листьев и луковиц *Allium turkestanicum* против эталонных тест - микроорганизмов.

Определялись МИК (минимальная ингибирующая концентрация), МБК (минимальная бактерицидная концентрация) и МФК (минимальная фунгицидная концентрация).

МИК (минимальная ингибирующая концентрация) - самая низкая концентрация антимикробного агента, необходимая для подавления видимого роста бактерии и дрожжеподобных грибов.

МБК (минимальная бактерицидная концентрация) - минимальная концентрация антибактериального агента, которая приводит к гибели бактерий.

МФК (минимальная фунгицидная концентрация) - минимальная концентрация антимикробного агента, которая приводит к гибели дрожжеподобных грибов.

Оценка антимикробной активности показала наилучшие результаты для экстрактов диэтилового эфира, в отличие от более полярных экстрактов, содержащих воду и этанол.

В таблице 28 собраны результаты, зарегистрированные для экстрактов диэтилового эфира, полученных из луковиц и зеленого лука АГ и из луковиц АТ. Как представлено в таблице 28, экстракты диэтилового эфира показали различную активность в отношении тестируемых эталонных бактерий (МИК = 0.125–4 мг/мл) и дрожжей (МИК = 0.125–1 мг/мл).

Таблица 28 – Антимикробная активность экстрактов диэтилового эфира

Микроорганизмы	Луковица <i>Allium galanthum</i>		Лист <i>Allium galanthum</i>		Луковица <i>Allium turkestanicum</i>	
	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)
1	2	3	4	5	6	7
<i>Грамположительные бактерии</i>						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	2	0,5	1	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2	8	1	2	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC AA1707	2	2	1	1	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1	4	0,5	1	0,5	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,25	1	0,125	0,5	0,125	0,5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0,25	1	0,25	1	0,25	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	1	4	0,5	1	0,5	1
<i>Образец сравнение: ванкомицин – МИК 1 мкг/мл</i>						

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6	7
<i>Грамотрицательные бактерии</i>						
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	4	8	1	8	1	8
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	4	8	1	8	1	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	8	1	8	1	8
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	4	16	1	8	1	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	8	1	4	1	4
Образец сравнение: ципрофлоксацин – МИК 0.015 мкг/мл						
<i>Дрожжеподобные грибы рода Candida</i>						
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	0,25	1	0,125	0,25	0,125	0,25
Образец сравнение: флуконазол – МИК 1 мкг/мл						

Экстракт диэтилового эфира луковиц *Allium turkestanicum* характеризовался сильной активностью в отношении бактерий (МИК = 0.125–1 мг/мл) и дрожжеподобных грибов (МИК = 0.125–0.5 мг/мл). Напротив, была продемонстрирована более низкая антимикробная активность экстракта диэтилового эфира луковиц *Allium galanthum* (МИК = 0.25–4 мг/мл). Однако экстракт диэтилового эфира, полученный из листьев *Allium galanthum*, характеризовался более высокой активностью и самыми низкими значениями МИК (МИК = 0.125–1 мг/мл), аналогичными экстракту диэтилового эфира *Allium turkestanicum*.

Все грамположительные бактерии и дрожжеподобных грибов были чувствительны к экстрактам диэтилового эфира из лука *A. turkestanicum* с МИК = 0.125–1 мг/мл и МИК = 0.125–0.5 мг/мл соответственно. Тестируемые грамотрицательные бактерии показали хорошую чувствительность к экстрактам диэтилового эфира из луковиц *Allium turkestanicum* и листьев *Allium galanthum* в концентрации 1 мг/мл. Эти экстракты оказывали сильное действие на *Bacillus spp.* ATCC (МИК = 0.125–0.25 мг/мл) и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (МИК = 0.5–1 мг/мл). Более того, эти экстракты обладали сильными свойствами против

всех протестированных штаммов *Candida* АТСС (МИК = 0.125–0.5 мг/мл). Кроме того, водные экстракты и экстракты этанола (EtOH 50 %, EtOH 70 % и EtOH 96 %), полученные из луковиц *Allium turkestanicum* и луковиц *Allium galanthum*, также были исследованы на антимикробную активность (таблицы 29 и 30). Это исследование показали, что водные экстракты, полученные из лука молочнокветного, показали более слабую антимикробную активность (для бактерий: МИК = 16-32 мг / мл и для дрожжей: МИК = 8 мг / мл) по сравнению с водными экстрактами из лука туркестанского (для бактерий: МИК = 4-16 мг / мл и для дрожжей: МИК = 1-2 мг/мл).

Таблица 29 – Антимикробная активность экстрактов луковиц *Allium galanthum*

Микроорганизмы	<i>Allium galanthum</i>							
	H <sub>2</sub> O		Et 50%		Et 70%		Et 96%	
	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Грамположительные бактерии</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС 25923	16	32	16	32	16	32	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС 29213	32	32	32	32	16	32	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС АА1707	32	32	32	32	16	32	16	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> АТСС 12228	32	32	32	32	16	32	16	32
<i>Bacillus subtilis</i> АТСС 6633	16	16	16	16	16	16	16	16
<i>Bacillus cereus</i> АТСС 10876	16	32	16	32	16	32	16	32
<i>Micrococcus luteus</i> АТСС 10240	32	32	32	32	16	32	16	32
Образец сравнение: ванкомицин – МИК 1 мкг/мл								
<i>Грамотрицательные бактерии</i>								
<i>Salmonella typhimurium</i> АТСС 14028	16	32	16	32	16	32	16	32
<i>Bordetella bronchiseptica</i> АТСС 4617	16	16	16	16	16	16	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> АТСС 13883	16	32	16	32	16	32	16	32
<i>Proteus mirabilis</i> АТСС 12453	16	16	16	16	16	16	16	16

Продолжения таблицы 29

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	32	16	32	16	32	16	32
Образец сравнение: ципрофлоксацин – МИК 0.015 мкг/мл								
<i>Дрожжеподобные грибы рода Candida</i>								
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	8	8	8	8	8	8	8	8
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	8	16	8	16	8	16	8	16
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	8	16	8	16	8	16	8	16
Образец сравнение: флуконазол – МИК 1 мкг/мл								

Водный экстракт и экстракт из 50 % этанола из АГ обладали одинаковой активностью в отношении бактерий (МИК = 16-32 мг/мл) и дрожжей (МИК = 8 мг/мл) (таблица 29), в отличие от экстрактов АТ, где экстракт из 50 % этанола (EtOH 50%) был более активным чем водный экстракт (таблица 30).

Таблица 30 - Антимикробная активность экстрактов *Allium turkestanicum*

Микроорганизмы	<i>Allium turkestanicum</i>							
	H <sub>2</sub> O		Et 50%		Et 70%		Et 96%	
	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)	МИК (mg/ml)	МБК (mg/ml)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Грамположительные бактерии</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4	16	2	16	2	16	2	16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	16	16	8	16	4	8	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC AA1707	8	8	4	16	4	8	2	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	8	8	4	8	4	8	2	4
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	16	4	8	4	8	4	4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	8	16	4	16	4	16	4	16

Продолжение таблицы 30

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	8	8	4	8	4	8	2	4
Образец сравнение: ванкомицин – МИК 1 мкг/мл								
<i>Грамотрицательные бактерии</i>								
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	8	8	8	8	4	8	4	4
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	8	8	4	4	4	4	2	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	8	8	4	4	4	4	4	4
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	8	8	4	4	4	4	4	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	8	4	4	4	4	4	4
Образец сравнение: ципрофлоксацин – МИК 0.015 мкг/мл								
<i>Дрожжеподобные грибы рода Candida</i>								
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	2	1	1	0,5	1	0,5	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	1	2	0,5	1	0,5	1	0,5	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	2	0,5	1	0,5	1	0,5	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	2	4	1	2	1	2	1	2
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	2	2	1	2	1	2	1	2
Образец сравнение: флуконазол – МИК 1 мкг/мл								

Активность всех экстрактов этанола (EtOH50%, EtOH70%, EtOH96%) обоих видов в отношении дрожжей не сильно отличалась. Их значения МИК были рассчитаны как 8 мг/мл для AG и 0.5–1 мг/мл для AT. Экстракты EtOH70% и EtOH96% не отличались по активности в пределах одного и того же вида луковиц. Этанольные экстракты *Allium turkestanicum* показали в 4-16 раз лучшую активность, чем этанольные экстракты из AGb, на основе значений МИК. Значения МИК, рассчитанные для эталонных противомикробных веществ, были следующими:

- МИК ванкомицина для *S. aureus* ATCC 29213 составлял 1 мкг/мл,
- МИК ципрофлоксацина для *Escherichia coli* ATCC 25922 составлял 0.015 мкг/мл,

-МИК флуконазола для *Candida albicans* ATCC составлял 1 мкг/мл.

Анализ данных, представленные в таблицах 28 - 30 показали, что большинство экстрактов обладали бактерицидным (МБК/МИК = 1-4) и фунгицидным действием (МФК/МИК = 1-4).

Противомикробные препараты обычно рассматриваются как бактерицидные или фунгицидные агенты, если соотношение МБК/МИК или МФК/МИК составляет  $\leq 4$ , и принято считать, что противомикробные препараты обычно рассматриваются как бактериостатические или фунгистатические, если соотношение МБК/МИК или МФК/МИК составляет  $>4$  [181 с. 3].

Бактериостатический эффект был отмечен у некоторых экстрактов диэтилового эфира в отношении некоторых грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий (МБК/МИК = 8).

Таким образом, по сравнению с экстрактами из диэтилового эфира как лука туркестанского, так и лука молочнокветного показали более низкую антимикробную активность всех экстрактов из этанола и воды. Самая высокая микробиологическая активность экстрактов диэтилового эфира из луковиц *A. turkestanicum* наблюдалась в отношении *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 10876, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 и всех протестированных видов *Candida*: *C. albicans* ATCC 2091, *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 14243 и *C. parapsilosis* ATCC 22019 (МИК = 0.125–0.5 мг/мл), как показано в таблицах.

Также были доказаны высокие противогрибковые свойства экстрактов диэтилового эфира из АGb и АТb. Полученные результаты указывают на возможность различной пользы для здоровья и практического использования экстрактов диэтилового эфира, полученных из АТb и АGc, в препаратах для наружного применения, активных против грамположительных бактерий, главным образом *S. aureus*, и в препаратах для внутреннего применения при пищевых отравлениях, вызванных *B. cereus*, а также против грибковых инфекций, в основном вызванных *Candida spp.*

Наблюдаемая более высокая активность экстрактов диэтилового эфира может быть объяснена результатами, полученными в ходе анализа ГХ-МС. Исследуемые образцы содержали насыщенные кислородом длинноцепочечные насыщенные алканы. Среди них были идентифицированы 16-хентриаконтанон (= пальмитон) и 1-тритриаконтанол.

Ранее сообщалось, что эти метаболиты являются активными противомикробными агентами. Первое соединение было выделено из кутикулярных восков листьев, полученных из растения аннона чешуйчатая (*Annona squamosa*), Shiva Shanker и сотрудниками [204] в качестве основного компонента. Их исследования показали более высокий антимикробный потенциал пальмитона по сравнению с другими компонентами воска. Стоит отметить, что виды *Bacillus*, протестированные в их исследовании, были особенно чувствительны к этому компоненту (МИК = 6.25 мкг/мл), что соответствует результатам представленного здесь анализа.

Кроме того, ранее было доказано, что длинноцепочечные первичные спирты, такие как 1-триаконтанол и гептадеканол, влияют на антимикробные свойства листьев *Solena amplexicaulis*, что было описано Chatterjee и соавторами [205]. Эти компоненты, которые присутствовали в неполярном экстракте, могли определять общую активность образцов.

В исследованиях ряда авторов [206] экстракт хлороформа из зеленого лука *Allium ursinum* проявлял значительно более сильное антимикробное действие, чем экстракты из метанола или воды. Хлороформный экстракт из зеленого лука был наиболее активен против *B. subtilis* ATCC 6633 (МИК = 0.313 мг/мл), для *B. cereus* (МИК = 2.5 мг/мл) и *S. aureus* (МИК = 2.5 мг/мл). Представленные здесь данные свидетельствуют о выраженном антимикробном потенциале изученных экстрактов.

Ранее Сантас и др. [207] опубликовали результаты антимикробного анализа, проведенного на трех сортах *Allium cepa*, произрастающих в Испании. Экстракты этилацетата из лука были сильнее из водных экстрактов, но диапазон расчетных значений МИС по-прежнему составлял  $40 > 100$  мг / мл.

Четыре года спустя Бахт и др. [208] показали аналогичную активность этанольных экстрактов *A. cepa*, которые не ингибировали рост *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. typhi* ни в каких концентрациях. При концентрации 2 мг/диск водные экстракты были эффективны в ингибировании роста *B. subtilis* и *K. pneumoniae*. Экстракты этанола не были активны против *E. coli*, и они ингибировали рост *C. albicans* только в концентрациях  $>1$  мг/диск. Аналогичные результаты также показали Hughes and Lawson [209], Bekenblia [210] и Chathradhyunthi et al. [211].

Активность экстрактов АТ и АС также была выше помимо тех, о которых сообщалось Fredotovic et al. [212] для *A. cornutum* и *A. cepa* (желтый и красный сорт) экстракт луковой шелухи. В их недавней публикации представлены результаты антимикробного анализа, который был выполнен на экстрактах отходов этих двух видов. В эксперименте значения МИС для *S. aureus* находились в диапазоне 7,8–500 мг/мл, для *B. cereus*: 125–500 мг/мл, для *E. coli*: 500–2000 мг/мл, для *K. pneumoniae*: 500 > 2000 мг/мл и для *C. albicans*: 1000 > 2000 мг/мл. Результаты антимикробной активности трех сортов *Allium cepa*, произрастающих в Испании были исследованы и опубликованы рядом ученых. Экстракты этилацетата из лука были сильнее по сравнению с водными экстрактами, но диапазон расчетных значений МИК по-прежнему составлял  $40 > 100$  мг/мл.

#### **Определение антиоксидантной активности экстрактов *A. galanthum* и *A. turkestanicum***

Экстракты из луковиц, листьев и цветов нескольких видов *Allium* известны своей значительной антиоксидантной активностью. Было обнаружено, что сильный антиоксидантный потенциал связан с серосодержащими соединениями и флавоноидами.

Исследование способности улавливать свободные стабильные радикалы по радикалу DPPH (1,1- дифенил-2-пикрилгидразил) является одним из



старейших методов исследования антиоксидантной активности. Этот метод широко использовался как для оценки индивидуальных фенольных веществ, так и для пищевых систем в целом. Существуют две версии этого испытания: статическая и динамическая. Нами были использованы обе эти методики. Изучение DPPH теста проводилось спектрофотометрическим методом со спиртовым раствором радикала DPPH при длине волны 517 нм. В результате статических испытаний измерения были проведены через 10 мин и построены кривые зависимости % ингибирования радикалов DPPH от концентрации исходного антиоксиданта, представленные на рис. 5. Анализ проводили в трех независимых повторениях, используя витамин С в качестве эталонного соединения. Калибровочная кривая ( $y = -0.1241x + 0.24$ ;  $R^2 = 0.9974$ ) готовили с использованием 0–1 мг/мл тролокса. Содержание общих антиоксидантов в каждом образце рассчитывали, как мм эквивалентов тролокса на грамм веса высушенного экстракта.

Взаимосвязь между концентрацией экстрактов *A. galanthum* и *A. turkestanicum* и процентным содержанием нейтрализованных радикалов DPPH и ABTS показана на рисунках 72 -73.

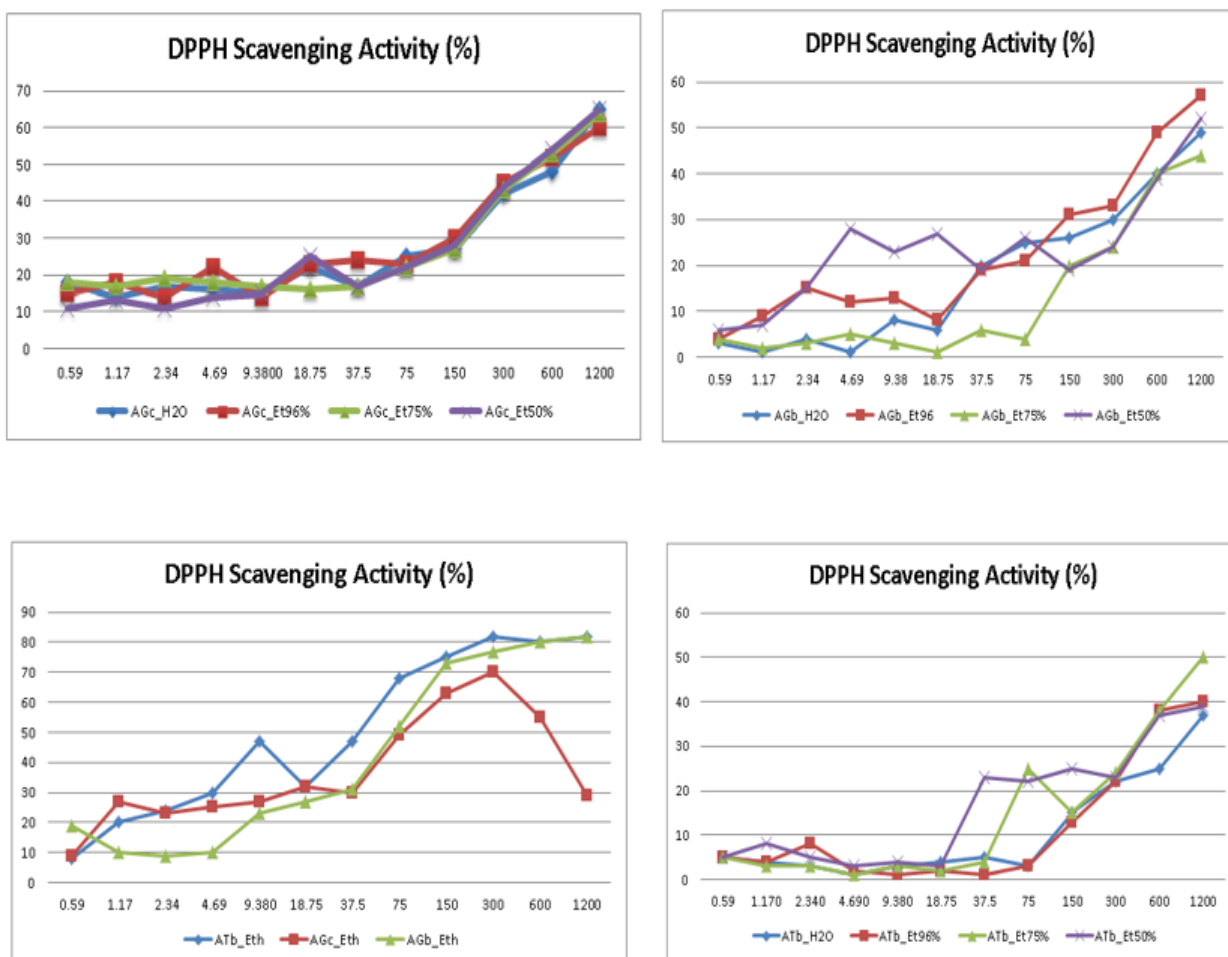


Рисунок 72 - Взаимосвязь между концентрацией экстрактов *A. galanthum* и *A. turkestanicum* и процентным содержанием нейтрализованных радикалов DPPH

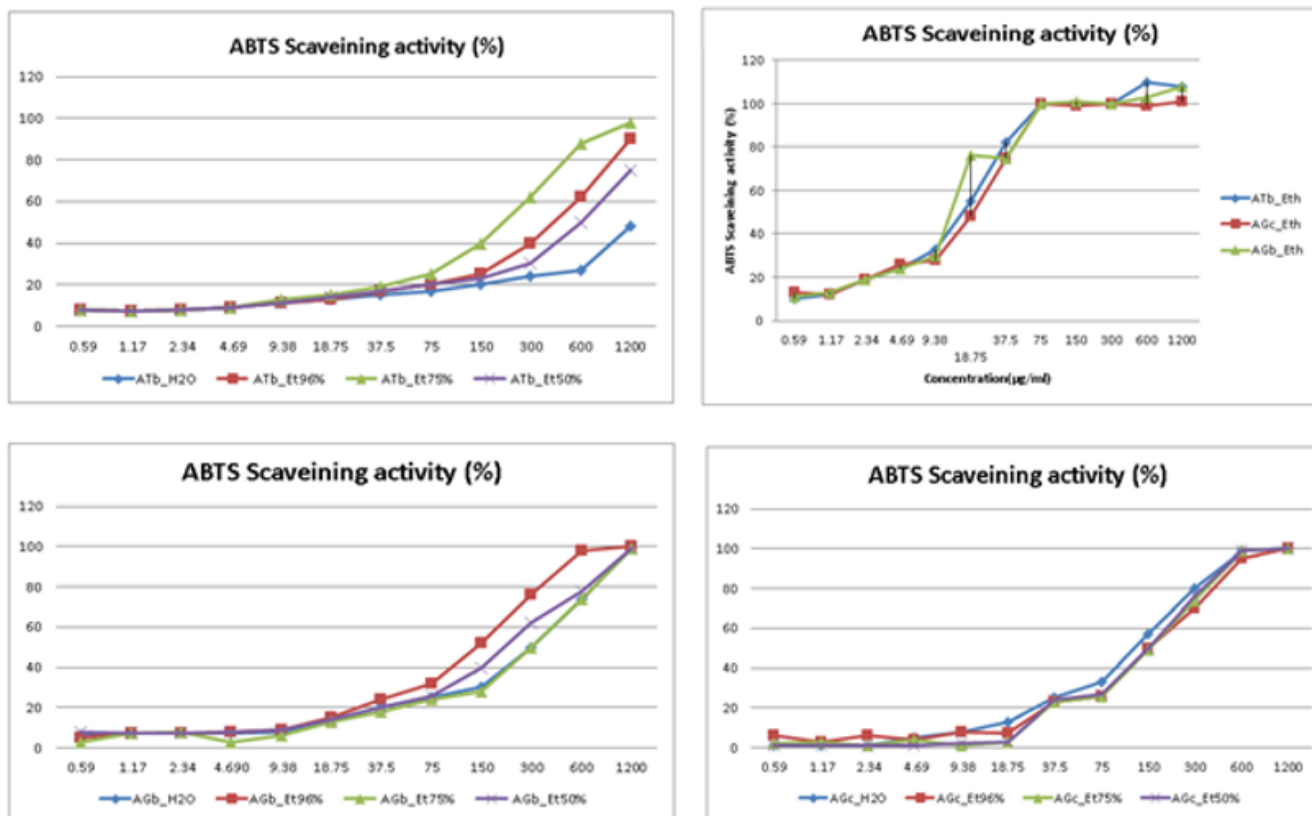


Рисунок 73 - Взаимосвязь между концентрацией экстрактов *A. galanthum* и *A. turkestanicum* и процентным содержанием нейтрализованных радикалов ABTS

В таблице 31 представлен антиоксидантный потенциал анализируемых экстрактов, отображаемый в виде эквивалентов тролокса на грамм веса высушенного экстракта. Интересно, что наиболее значительная антиоксидантная активность в анализе DPPH была обнаружена для экстрактов диэтилового эфира из луковиц *A. galanthum* (AGb\_Eth), в то время как экстракт диэтилового эфира из луковиц *A. turkestanicum* (ATb\_Eth) был наиболее активным в анализе ABTS. Было обнаружено, что этанол и водные экстракты демонстрируют более слабый антиоксидантный потенциал.

Таблица 31- Антиоксидантная активность анализируемых экстрактов

№	Образец	Анализ DPPH, мг/г	Анализ ABTS, мг/г
1.	AGc_H <sub>2</sub> O	1256.72 ± 19.28	5.08 ± 0.07
2.	AGc_Et96%	1172.78 ± 10.15	3.70 ± 0.07
3.	AGc_Et50%	1243.51 ± 24.49	4.87 ± 0.16
4.	AGc_Et70%	1280.78 ± 14.72	4.53 ± 0.23
5.	AGc_Eth	19 274,78 ± 92,11	37.51 ± 2.31
6.	AGb_H <sub>2</sub> O	1132.60 ± 23.01	2.23 ± 0.03
7.	AGb_Et96%	1208.48 ± 21.39	4.76 ± 0.06
8.	AGb_Et50%	1130.14 ± 17.27	2.54 ± 0.03
9.	AGb_Et70%	1081.01 ± 46.66	2.16 ± 0.03

Продолжение таблицы 31

10.	AGb_Eth	975.92 ± 35.94	35.68 ± 0.58
11.	ATb_H <sub>2</sub> O	1020.35 ± 40.30	0,61 ± 0,03
12.	ATb_Et50%	1088.07 ± 18.08	2.05 ± 0.04
13.	ATb_Et96%	1071.04 ± 17.82	1.81 ± 0.04
14.	ATb_Et70%	1151.29 ± 12.85	2,65 ± 0,01
15.	ATb_Eth	1501.14 ± 10.95	50.85 ± 2.90
16.	Витамин С	1535.46 ± 8.88	1252.80 ± 8.02

Анализ антиоксидантных свойств четырех видов *Allium*, произрастающих в Италии, *A. neapolitanum*, *A. roseum*, *A. sativum* и *A. subhirsutum*, показал, что экстракты из листьев и цветов обладают более высокой антиоксидантной активностью, чем луковичные экстракты. Антиоксидантная активность экстрактов растений рода *Allium* напрямую коррелирует с общим содержанием полифенолов. Аналогичное наблюдение было сделано для экстрактов *A. ursinum*: фенольное содержание и антиоксидантный потенциал, измеренные с использованием анализов DPPH, ABTS и FRAP.

Преобладающими компонентами, идентифицированными в диэтиловом экстракте луковиц *A. galanthum*, были алифатические спирты, которые, скорее всего, ответственны за высокую антиоксидантную активность этого экстракта. Сравнительный анализ масла семян расторопши (*Silybium marianum* L.) показал, что более высокое содержание алифатических спиртов в масле незрелых плодов приводит к более значительной антиоксидантной активности в анализах DPPH и ABTS по сравнению с маслом зрелых плодов, содержащим примерно на 30 % меньше этих соединений. Триаконтанол и дотриаконтанол были основными компонентами масла расторопши, полученных из незрелых плодов, оказывающих антиоксидантную активность. Эти спирты также были идентифицированы среди преобладающих компонентов диэтилового экстракта луковиц *A. galanthum*.

Антиоксидантная активность экстракта ATb\_Eth может быть результатом присутствия линолевой кислоты, которая не была идентифицирована в экстрактах AGb и AGc.

***Ингибирование тирозиназы экстрактами A. galanthum и A. turkestanicum***

Тирозиназа (ЕС. 1.14.18.1) является ключевым ферментом меланогенеза, катализируя превращение l-тирозина в l-дигидроксифенилаланин (l-DOPA) и впоследствии в допакинон. Несколько натуральных экстрактов и соединений растительного происхождения были показаны в предыдущие годы как эффективные ингибиторы тирозиназы и используются в качестве активных ингредиентов в косметике и медицинских мазях. Грибной тирозиназный ингибируемый анализ является наиболее широко используемым методом поиска новых ингибиторов тирозиназы. Однако из-за структурных и функциональных различий между грибными и млекопитающими ферментами ингибиторы грибной тирозиназы не всегда эффективны против тирозиназы млекопитающих. Например, сообщалось о значительных различиях между ингибирующей

активностью грибов и тирозиназы для экстрактов *Achillea biebersteinii* и изолированных соединений.

Экстракты АГ и АТ сравнивали по их тирозиназной активности с использованием грибной тирозиназы и клеточного лизата В16F10, содержащего мышиную тирозиназу. Койевая кислота использовалась в обоих анализах в качестве ингибирующего контроля (рисунок 74). Среди экстрактов листьев *A. galanthum* было обнаружено, что экстракты АГс\_Et50 % и АГс\_75 % значительно ингибируют мышиную тирозиназу и слегка активируют грибной фермент (рисунок 74 А). Водные и этанольные экстракты из луковиц *A. galanthum* не влияли на активность тирозиназ, за исключением АГб\_Et96 % экстракта, ингибирующего грибную тирозиназу примерно на 25 % при 100 мкг/мл (рисунок 74 В). Наиболее активные ингибиторы мышиную тирозиназы были обнаружены в экстракте АГб\_Eth, снижая активность мышиную тирозиназы на 46 % при 100 мкг/мл (рисунок 74 D). Интересно, что водный экстракт из луковиц *A. turkestanicum* повышал активность мышиную тирозиназы (рисунок 74 С).

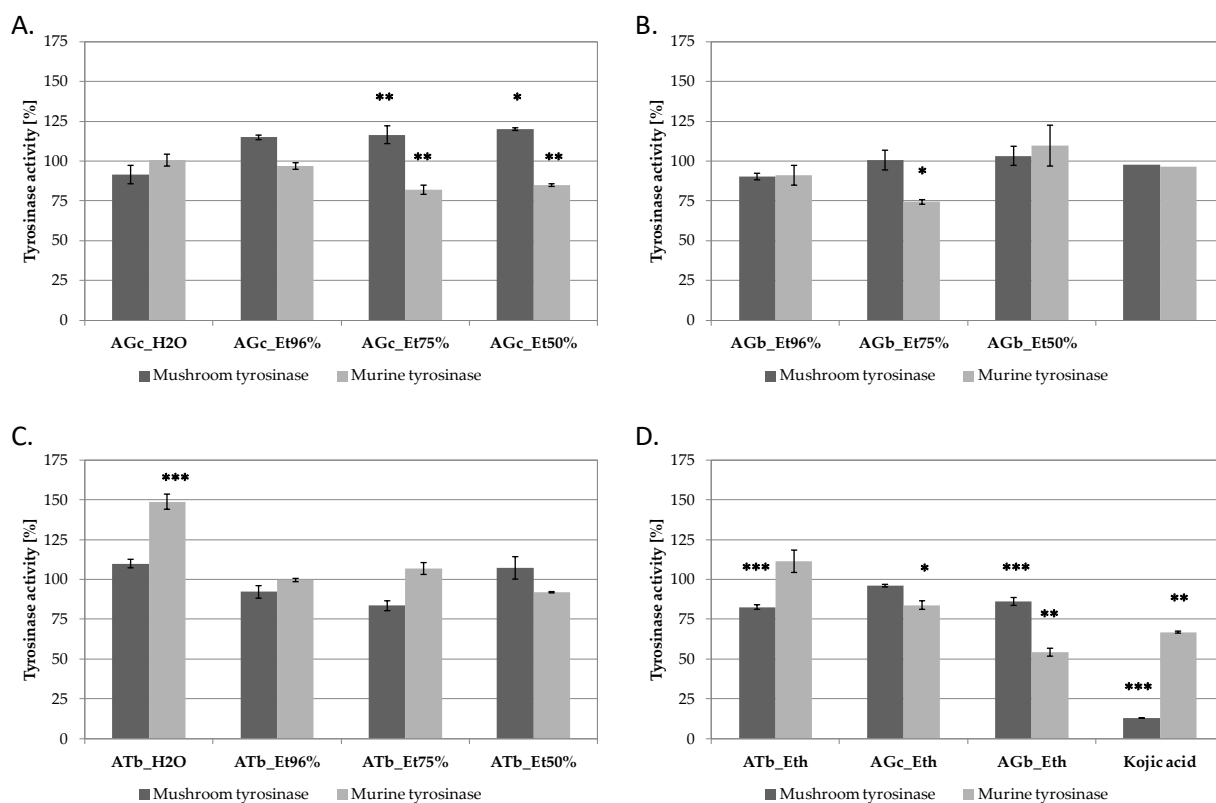


Рисунок 74 - Ингибирование тирозиназы экстрактами *A. galanthum* и *A. turkestanicum*

значения на графиках представляют собой среднее  $\pm$  SD ( $n = 3$ ), \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

Тормозной потенциал тирозиназы был ранее описан для других видов *Allium*. Было обнаружено, что метанольные экстракты *A. nigrum* L. и *A. subhirsutum* из луковиц и надземных частей ингибируют грибную тирозиназу.

Ингибирующая активность тирозиназы также была показана для *Allium scorodoprasum* L. subsp., но у этого вида был обнаружен самый высокий ингибирующий потенциал тирозиназы для экстракта цветка.

Кверцетин 4'-О-β-D-глюкопиранозид и кверцетин-3'-О-β-D-глюкозид являются двумя ингибиторами грибной тирозиназы, выделенными из метаноловых экстрактов высушенной кожи *A. sera*. Значения IC<sub>50</sub> для первого соединения составляли 4,3 и 52,7 мкМ в анализах с субстратами l-тирозин или l-DOPA соответственно. Кверцетин-3'-О-β-D-глюкозидингибирует грибную тирозиназу со значением IC<sub>50</sub> 6,5 мкМ с использованием l-тирозина и 48.5 мкМ с использованием l-DOPA в качестве субстратов соответственно. Было также обнаружено, что кверцетин-3'-О-β-D-глюкозид снижает регуляцию биосинтеза меланина в клетках меланомы B16F10 со значением IC<sub>50</sub> 38.8 мкМ.

(S)- N-транс-ферулойлоктопамин, выделенный из кожи *A. sativum*, был обнаружен в качестве эффективного ингибитора грибной тирозиназы и уменьшал относительное содержание меланина дозозависимым образом в α-MSH-стимулированных клетках B16F10. Молекулярный анализ показал, что это соединение ингибирует меланогенез, снижая уровни мРНК тирозиназы и экспрессии белка.

#### *Определение острой и подострой токсичности экстрактов.*

Была проведена оценка безопасности густого экстракта, полученного на основе лука молочнокветного и лука туркестанского по показателям острой и подострой токсичности на экспериментальных животных; определены переносимые, токсические и летальные дозы густого экстракта при однократном и многократном внутрижелудочном введении экспериментальным животным.

Исследования проведены в НИИ им. Б. Атчабарова КазНМУ в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов Республики Казахстан и международных стандартов и в соответствии с этическими правилами и нормам: Рекомендации Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях; Директива Совета ЕАС, рекомендаций FELASA Working Group Report (1994-1996). Образцы исследуемого экстракта были доставлены в лабораторию фармакологических испытаний в надлежащем виде. Все образцы хранились в помещении с ограниченным доступом. Условия хранения исследуемых образцов соблюдались. Температура и влажность помещения контролировались постоянно. В таблице 32 предоставлена соответствующая информация.

Таблица 32 - Информация об исследуемом экстракте

Название	Густой экстракт на основе лука молочнокветного и лука туркестанского
Образец 1	С - 500 мг/кг. Получают путем растворения 500 мг густого экстракта в 1 литре воды.
Образец 2	С - 2000 мг/кг. Получают путем растворения 2000 мг густого экстракта в 1 литре воды.

Продолжение таблицы 32

Образец 3	С - 5000 мг/кг. Получают путем растворения 5000 мг густого экстракта в 1 литре воды.
Образец 4	Вода очищенная

Исследования проводились в соответствии с утвержденным дизайном неклинического исследования. Эксперимент был проведен на половозрелых, здоровых животных (мыши) обоего пола. Самки были нерожавшими и небеременными. Животные распределялись по группам случайным образом. В качестве критерия приемлимой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела ( $\pm 10\%$ ). Все животные были промаркированы согласно утвержденным процедурам. Рацион питания животных был сбалансированным, все животные получали необходимое количество воды. В таблице 33 указаны используемый вид лабораторных животных и условия их содержания.

Таблица 33 - Лабораторные животные и условия их содержания

Вид	Белые мыши
Порода	Беспородные
Пол	Самцы и самки
Масса тела	18-22 г
Общее количество	4 группы по 5 особей, включая контрольную группу по отдельности для каждого из видов исследования. 40 особей в целом
Источник получения	Виварий КазНМУ
Период акклиматизации	14 дней
Индивидуальная идентификация	Метки
Метод распределения по группам	Животных распределили по группам случайным образом
Количество животных в клетке	По 5 голов
Размеры клетки	Стандартные
Материал клетки	Пластик/нержавеющая сталь
Основной рацион	Сбалансированный гранулированный корм
Источник воды	Вода очищенная, полученная из системы очистки воды 2-го класса чистоты «Сарториус», Германия
Температура воздуха	20 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C
Влажность воздуха	Не более 65%

Мышам вводили дозы 500 мг/кг, 2000 мг/кг и 5000 мг/кг. Животным контрольной группы вводили воду в эквивалентных объемах. Объемы введения и дозу экстракта определяли в соответствии с методическими рекомендациями. На протяжении эксперимента животных взвешивали:

- до начала эксперимента, на второй, седьмой, четырнадцатый день эксперимента – при определении острой токсичности;
- до начала эксперимента, на второй, седьмой, четырнадцатый и двадцать

- восьмой день эксперимента – при определении подострой токсичности;  
Информация о группах экспериментальных животных представлена в таблице 34.

Таблица 34 - Группа экспериментальных животных

Номер группы	Название субстанции, вводимая доза, режим и путь введения	Количество животных	Выход из эксперимента
1	2	3	4
<i>Белые мыши (Определение острой токсичности)</i>			
№1 Эксперимент	Экстракт 500 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутривентрикулярно	5 (2♀ 3♂)	На 15-й день
№2 Эксперимент	Экстракт 2000 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутривентрикулярно	5 (3♀ 2♂)	На 15-й день
№3 Эксперимент	Экстракт 5000 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутривентрикулярно	5 (3♀ 2♂)	На 15-й день
№4 Контроль	Вода очищенная / 0,5 мл однократно, внутривентрикулярно	5 (2♀ 3♂)	На 15-й день
<i>Белые мыши (Определение подострой токсичности)</i>			
№1 Эксперимент	Экстракт 500 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	5 (2♀ 3♂)	На 29-й день
№2 Эксперимент	Экстракт 2000 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	5 (2♀ 3♂)	На 29-й день
№3 Эксперимент	Экстракт 5000 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	5 (3♀ 2♂)	На 29-й день
№4 Контроль	Вода очищенная / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	5 (3♀ 2♂)	На 29-й день

Острую и подострую токсичность изучали в соответствии с требованиями Стандарта надлежащей лабораторной практики РК и на основании Руководств

по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Животным однократно (при определении острой токсичности) и многократно (при определении подострой токсичности) натошак при помощи металлического зонда, представляющего собой изогнутую инъекционную иглу с напаянной на конце оливой, внутрижелудочно вводили исследуемые концентрации экстракта в максимально допустимом объеме: максимальный объем для мышей весом 18-22 г 0,5 мл.

Общая продолжительность наблюдения за животными составила четырнадцать суток для определения острой токсичности и двадцать восемь суток для определения подострой токсичности. В первый день эксперимента животные находились под непрерывным наблюдением. В последующие дни ежедневно фиксировали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покровов, окраску слизистых оболочек, потребление корма и воды, реакции на тактильные, звуковые и световые раздражители.

Летальность является одним из наиболее важных показателей острой и подострой токсичностей. В данном исследовании нам не удалось установить летальность животных в экспериментальных группах даже при введении максимально допустимых доз. Результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Показатели выживаемости животных в экспериментах «острая токсичность» и «подострая токсичность»

Группы экспериментальных животных	Название субстанции, вводимая доза, режим и путь введения	Количество павших/общее количество животных	Смертность (%)
1	2	3	4
<i>Белые мыши (Определение острой токсичности)</i>			
№1 Эксперимент	Экстракт 500 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутрижелудочно	0/5	0,0
№2 Эксперимент	Экстракт 2000 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутрижелудочно	0/5	0,0
№3 Эксперимент	Экстракт 5000 мг/кг / 0,5 мл однократно, внутрижелудочно	0/5	0,0
№4 Контроль	Вода очищенная / 0,5 мл однократно, внутрижелудочно	0/5	0,0
<i>Белые мыши (Определение подострой токсичности)</i>			
№1 Эксперимент	Экстракт 500 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутрижелудочно	0/5	0,0
№2 Эксперимент	Экстракт 2000 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутрижелудочно	0/5	0,0



Продолжение таблицы 35

1	2	3	4
№3 Эксперимент	Экстракт 5000 мг/кг / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	0/5	0,0
№4 Контроль	Вода очищенная / 0,5 мл многократно (ежедневно), внутривентрикулярно	0/5	0,0

Масса тела – один из наиболее важных интегральных показателей, отражающих общее состояние животных. Уменьшение массы тела на протяжении эксперимента свидетельствует о системном токсическом воздействии изучаемого экстракта на организм животных. В течение всего эксперимента велось наблюдение за изменением веса экспериментальных животных. Динамика массы тела животных опытной группой не отличались от аналогичных показателей контрольной группы. У всех животных отмечен прирост массы тела, что видно из таблиц 36 и 37.

Таблица 36 - Динамика массы тела животных в эксперименте «острая токсичность»

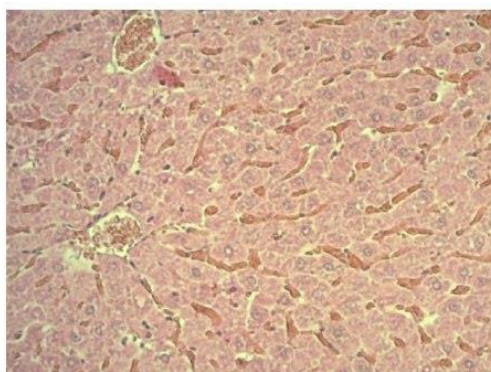
№	Название группы	Динамика массы (г), сутки после начала опыта				Прирост массы тела, г
		Фон	Через 24 часа	Через 7 дней	Через 14 дней	
1	№1 Эксперимент	♀ 18,5 ± 0,1	♀ 19,2 ± 0,1	♀ 20,2 ± 0,2	♀ 21,3 ± 0,1	♀ +2,8
		♂ 19,4 ± 0,4	♂ 20,1 ± 0,5	♂ 20,2 ± 0,3	♂ 22,1 ± 0,5	♂ +2,7
2	№2 Эксперимент	♀ 18,1 ± 0,3	♀ 18,5 ± 0,2	♀ 19,5 ± 0,3	♀ 21,3 ± 0,6	♀ +3,2
		♂ 20,4 ± 0,2	♂ 21,0 ± 0,4	♂ 21,7 ± 0,2	♂ 23,1 ± 0,4	♂ +2,7
3	№3 Эксперимент	♀ 19,5 ± 0,4	♀ 20,0 ± 0,1	♀ 20,6 ± 0,3	♀ 22,7 ± 0,1	♀ +3,2
		♂ 18,4 ± 0,2	♂ 19,0 ± 0,2	♂ 21,3 ± 0,5	♂ 23,5 ± 0,2	♂ +5,1
4	№4 Контроль	♀ 20,2 ± 0,1	♀ 20,4 ± 0,1	♀ 21,1 ± 0,2	♀ 22,5 ± 0,4	♀ +2,3
		♂ 20,7 ± 0,4	♂ 20,7 ± 0,4	♂ 21,0 ± 0,6	♂ 23,6 ± 0,3	♂ +2,9

Таблица 37 - Динамика массы тела животных в эксперименте «подострая токсичность»

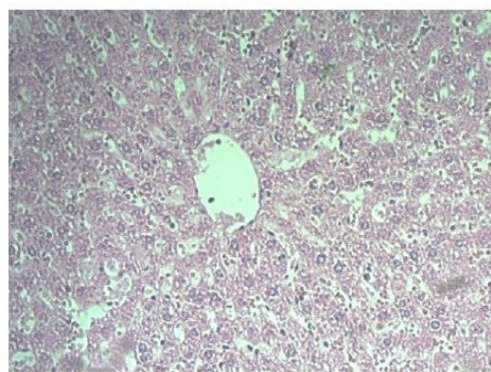
№	Название группы	Динамика массы (г), сутки после начала опыта					Прирост массы тела, г
		Фон	Через 24 часа	Через 7 дней	Через 14 дней	Через 28 дней	
1	№1 Эксперимент	♀ 20,2±0,1	♀ 20,4±0,1	♀ 21,5±0,2	♀ 22,3±0,3	♀ 27,1±0,2	♀ +7,1
		♂ 20,7±0,4	♂ 20,7±0,4	♂ 22,1±0,2	♂ 23,1±0,3	♂ 29,0±0,6	♂ +8,3
2	№2 Эксперимент	♀ 18,4±0,3	♀ 19,0±0,1	♀ 20,5±0,1	♀ 22,3±0,5	♀ 26,2±0,3	♀ +7,8
		♂ 19,5±0,2	♂ 20,1±0,3	♂ 21,4±0,4	♂ 23,4±0,2	♂ 27,8±0,2	♂ +8,3
3	№3 Эксперимент	♀ 20,1±0,2	♀ 20,2±0,2	♀ 22,1±0,3	♀ 23,0±0,6	♀ 25,4±0,5	♀ +5,3
		♂ 20,7±0,1	♂ 20,7±0,1	♂ 22,5±0,2	♂ 24,1±0,2	♂ 26,6±0,4	♂ +5,9
4	№4 Контроль	♀ 18,5±0,4	♀ 18,7±0,1	♀ 20,4±0,2	♀ 23,5±0,2	♀ 27,1±0,4	♀ +8,6
		♂ 19,2±0,1	♂ 19,4±0,2	♂ 21,3±0,4	♂ 24,0±0,6	♂ 28,0±0,2	♂ +8,8

В первый день наблюдения не выявлено никаких отклонений у экспериментальных животных от нормальных показателей жизнедеятельности. Животные исследуемых групп имели здоровый внешний вид, демонстрировали адекватные реакции на тактильные, звуковые и световые раздражители, их шерстный покров был блестящим, ровным, гладким. Последующие наблюдения в течение 14 дней для однократного введения и 28 дней при многократном введении экстракта не выявили патологических отклонений в поведении животных, их физическом и функциональном состоянии. В результате проведения исследования по изучению острой и подострой токсичностей установлено, что мыши обоего пола перенесли максимально допустимый объем без видимых отклонений от состояния животных контрольной группы.

Вскрытие животных исследуемых групп на пятнадцатые и двадцать девятые сутки показало, что расположение внутренних органов не отличалось от анатомической картины мышей контрольной группы. Сердце покрыто перикардом, на поперечном разрезе овальной формы. Легкие были светлые, равномерной окраски и консистенции. Печень имела гладкую, равномерно окрашенную структуру и форму. Почки типичной бобовидной формы. Внутренние органы имели характерный цвет и обычную консистенцию. Желудок и кишечник содержали остатки корма. При вскрытии экспериментальных животных различия в органах между контрольными и экспериментальными группами не установлено. Микроскопические исследования внутренних органов (печень, почки, легкие) также не выявили патологических изменений во всех опытных группах. На рисунках 75-80 представлены гистологические срезы внутренних органов мышей, получавших высшую концентрацию экстракта (5000 мг/кг), и мышей контрольной группы при определении острой и подострой токсичности.

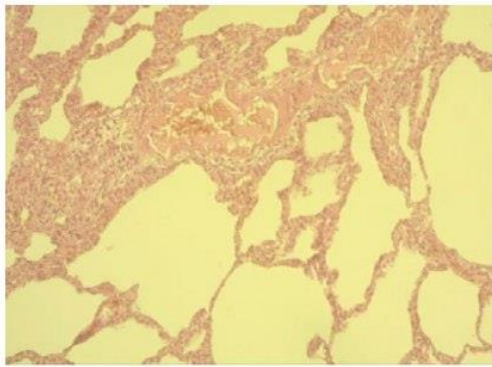


Экспериментальная группа

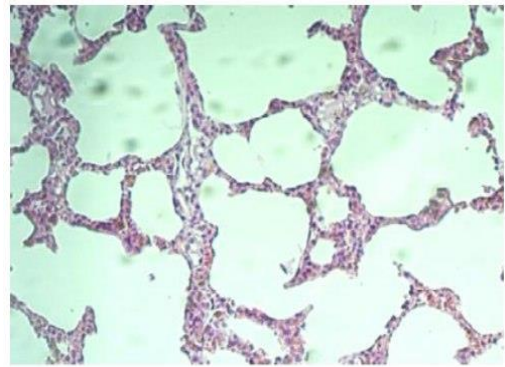


Контрольная группа

Рисунок 75 - Гистологические изображения печени, окрашенных гематоксилином и эозином (выявление острой токсичности).

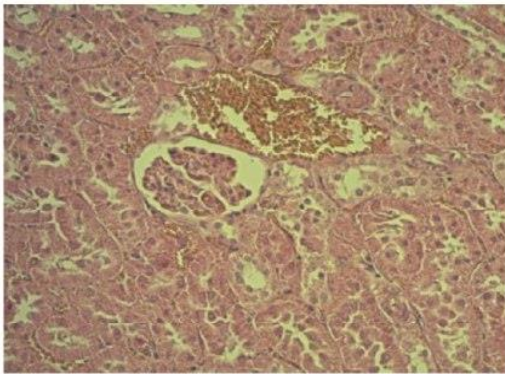


Экспериментальная группа

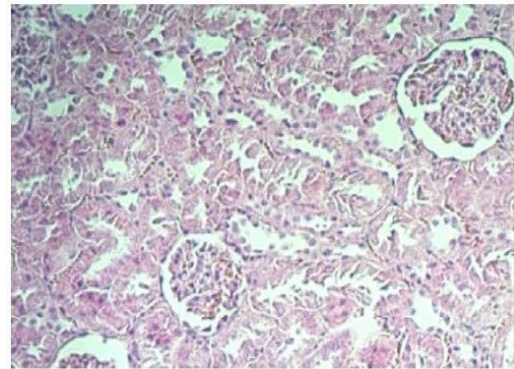


Контрольная группа

Рисунок 76 - Гистологические изображения легкого, окрашенных гематоксилином и эозином (выявление острой токсичности).

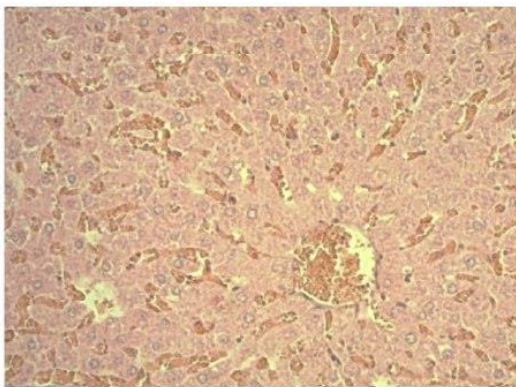


Экспериментальная группа

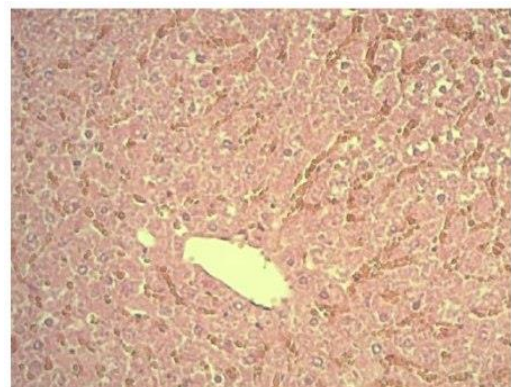


Контрольная группа

Рисунок 77 - Гистологические изображения почки, окрашенных гематоксилином и эозином (выявление острой токсичности).

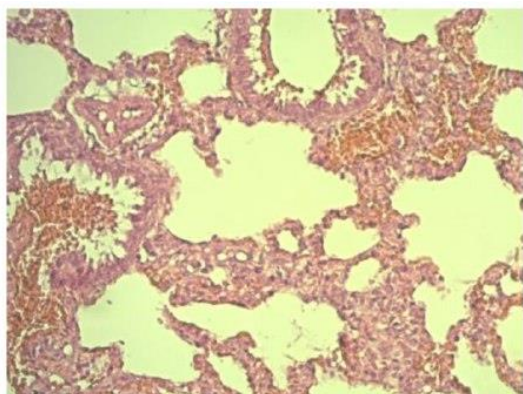


Экспериментальная группа

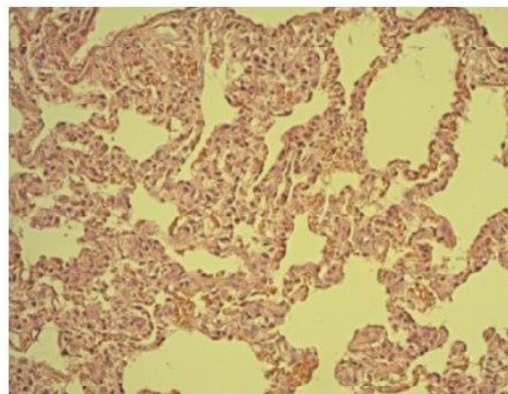


Контрольная группа

Рисунок 78 - Гистологическое изображение печени, окрашенных гематоксилином и эозином (выявление подострой токсичности).

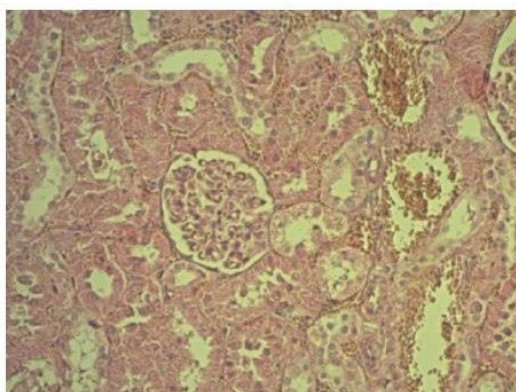


Экспериментальная группа

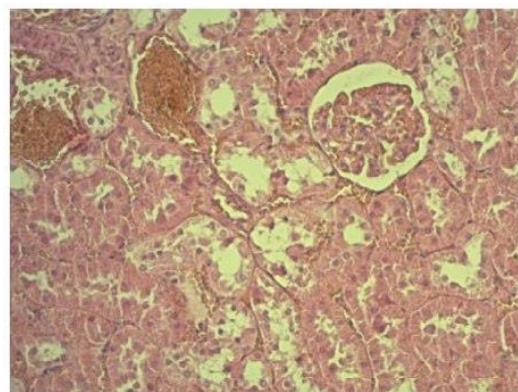


Контрольная группа

Рисунок 79 - Гистология легких, окрашенных гематоксилином и эозином (определение подострой токсичности).



Экспериментальная группа



Контрольная группа

Рисунок 80 - Гистологическое изображение почки, окрашенных гематоксилином и эозином (выявление подострой токсичности).

Летальности среди экспериментальных животных не наблюдалась. Результаты наблюдений за экспериментальными животными в пост интоксикационном периоде эксперимента, а также данные гистологических исследований внутренних органов позволяют отнести экстракты лука молочнокветного и лука туркестанского к VI классу токсичности.

## Выводы к пятой главе

При разработке технологии экстрагирования растительного сырья лука туркестанского и лука молочнокветного было исследовано влияние различных технологических факторов на выход флавоноидов, таких как природа экстрагента, температурный режим, модуль и время экстракции. Установлены технологические параметры процесса экстрагирования: обоснован выбор экстрагента, способ экстрагирования и соотношение сырья: экстрагент, на основании динамики высвобождения БАВ из сырья, выбраны длительность и температура процесса. На основании анализа полученных результатов предложен эффективный режим экстрагирования, позволяющий получить извлечения с высоким содержанием суммы флавоноидов: экстрагент – 50 % спирт этиловый; модуль экстракции 1:10; метод экстракции – мацерация с применением ультразвука частотой 25 кГц; время экстракции 30 минут; температура процесса 25 С.

Флавоноиды и их глюкозиды, органические кислоты, длинноцепочечные насыщенные кислородом алканы, жирные кислоты, этиловые эфиры жирных кислот и стерины были обнаружены в испытуемом растительном материале.

Методом ВЭЖХ установлено, что сухой экстракт лука туркестанского и лука молочнокветного содержит флавоноиды в пересчете на кверцетин  $2,242 \pm 0,008$  %,  $2,648 \pm 0,009$  % соответственно.

Оценка антимикробной активности показала более низкую активность полярных экстрактов, однако экстракт диэтилового эфира из луковиц АТ и листьев АГ показал самую сильную активность против *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 10876, некоторых видов стафилококка (*S. aureus* ATCC 25923 и *S. epidermidis* ATCC 12228) и всех протестированных видов *Candida* (*Candida albicans* ATCC 2091, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 14243 и *Candida parapsilosis* ATCC 22019) с минимальной ингибирующей концентрацией 0,125–0,5 мг/мл. Наибольшую антирадикальные способности проявили экстракты диэтилового эфира из луковиц АГ ( $IC_{50} = 19274,78 \pm 92,11$  мг Тролокса экв/г высушенного экстракта) в анализе DPPH. Методом АВТС для определения антиоксидантной активности было рассчитано наибольшее значение эквивалентов mg Trolox,  $50,85 \pm 2,90$  для экстракта диэтилового эфира из луковиц АТ. Этот же экстракт показал самое высокое ингибирование грибной тирозиназы ( $82,65 \pm 1,28$ % активности фермента), тогда как экстракт эфира луковицы АГ был наиболее эффективным ингибитором мышинной тирозиназы (54% активности фермента).

Установлены показатели качества экстракта сухого исследуемых объектов и их критерии приемлемости. Испытание стабильности, установление сроков годности и рекомендуемых условий хранения полученных экстрактов сухих проводятся по основным показателям качества. Оценка безопасности фитосубстанции показала, что экстракт относится к относительно безвредным веществам (VI класс токсичности).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена комплексному фармакогностическому изучению, стандартизации сырья лука туркестанского и лука молочнокветного, оптимальной технологии получения экстрактов и изучению профиля их биологической активности.

Оценка перспективности изучения отечественных видов растений рода *Allium* показала, что лук туркестанский и лук молочнокветный представляет научный и практический интерес как возобновляемый источник растительного сырья для получения растительных субстанций.

Установлены диагностические анатомо-морфологические признаки, позволяющие идентифицировать ЛРС лука туркестанского и лука молочнокветного. Определены показатели идентификации луковиц лука туркестанского, луковиц и листьев лука молочнокветного по показателям: А. макроскопия, В. микроскопия.

Анализ ВЭЖХ-ESI-QTOF-MS/MS позволил предварительно идентифицировать основные сигналы, записанные в полученных хроматограммах. Флавоноиды и их гликозиды составляют основную группу соединений в сырье лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья).

Установлены показатели качества на сырье лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья) и их критерии приемлемости, проведена стандартизация лука туркестанского (луковицы) и лука молочнокветного (листья, листья) в соответствии с требованиями ГФ РК. Разработана спецификация качества на «Лук туркестанский луковицы», «Лук молочнокветный луковицы», «Лук молочнокветный листья».

В результате долгосрочных испытаний стабильности сырья установлен срок хранения 24 мес. при температуре  $25 \pm 2$  °С и относительной влажности  $60 \pm 5$  %.

Было установлено, что проанализированные экстракты неполярного диэтилового эфира проявляют более сильную биологическую активность по сравнению с водными и водно-этаноловыми экстрактами различного соотношения. Первые экстракты оказались сильными противомикробными агентами не только против испытуемых грамположительных бактерий, но и ингибировали рост нескольких штаммов грамотрицательных бактерий и дрожжей, возможно, из-за присутствия 16-гептриаконтанона (пальмитона) и 1-тритриаконтанола среди других компонентов экстрактов.

Присутствие флавоноидов, насыщенных кислородом длинноцепочечных алканов и спиртов, безусловно, влияло на повышенный антирадикальный потенциал экстрактов. Также было доказано, что экстракты диэтилового эфира луковицы АГ ингибируют мышиную тирозиназу до 54 % ее активности, что может позволить использовать экстракты в лечебной косметике, как отбеливающие средства.

Подтвержденные антирадикальные свойства тестируемых экстрактов при добавлении в косметику могут проявлять успокаивающие свойства против негативного воздействия стрессоров окружающей среды, которые влияют на функцию кожи и приводят к увеличению генерации активных форм кислорода. Наконец, антимикробный потенциал тестируемых образцов будет важен для сохранения косметического продукта, а также для ингибирования развития бактериальных инфекций на поверхности кожи, подверженной раздражению и акне.

Способность экстрактов луков ингибировать активность фермента, связанного с обесцвечиванием кожи – тирозиназы, подтвержденная вышеописанными тестами, безусловно, имеет большую ценность.

Таким образом, описанные в диссертационной работе результаты проведенных исследований подтверждают применение экстрактов *A. turkestanicum* и *A. galanthum* в фармацевтической промышленности.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Единство народа и системные реформы - прочная основа процветания страны: Послание Главы государства народу Казахстана от 1 сентября 2021 года // САПП Республики Казахстан. - 2021. - № 42-43. – 254 с.

2 Об утверждении национального проекта «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация»: постановление Правительства Республики Казахстан от 12 октября 2021 года № 725 // САПП Республики Казахстан. - 2021. - № 48-49. – 301 с.

3 Об утверждении Комплексного плана по развитию фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы: Распоряжение Премьер-Министра Республики Казахстан от 6 октября 2020. - № 132 -р. [Электронный ресурс] URL: <https://adilet.zan.kz> (дата обращения 26.08.2020)

4 Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. 2007—2022. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru> (дата обращения 26.05.2019).

5 Seregin A.P., Anačkov G., Friesen N. Molecular and morphological revision of the *Allium saxatile* group (Amaryllidaceae): Geographical isolation as the driving force of underestimated speciation // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2015. - Vol. 178(1). – P. 67–101.

6 Флора Казахстана (в 9-х томах). Том 2. – Алма-Ата: Академия наук КазССР, 1958. – 291с.

7 Черемушкина В.А., Днепровский Ю.М., Гранкина В.П. Корневищные луки Серверной Азии (экология, биология, интродукция). Н.: Наука, 1992. – 157 с.

8 Черемушкина В.А. Биология луков Евразии. – Новосибирск: Наука, 2004. – 279 с.

9 Серёгин А.П. Новые комбинации в роде *Allium* L (Alliaceae) // Новости систематики высших растений. – 2004. – С. 101-102.

10 Ekberg L. Studies in the genus *Allium*: A new subgenus and new sections from Asia // Bot. Notiser. – 1989. – Vol. 122. - № 1. – P. 93–101.

11 Friesen N., Fritsch R.M., Blattner F.R. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences // Aliso. – 2006. – Vol. 22. – P. 372–395.

12 Байтенов М. С. Флора Казахстана в 2 т. Т. 2. Родовой комплекс флоры. – Алматы: Ғылым, 2001. – 280с.

13 Степанов Н.П. Спектрофотометрическое исследование экстрактов растений *Allium lineare* L и *Allium nutans* L в инфракрасной и видимой областях спектра // Кооперативное образование и наука Сибири. – 2017. – С. 150-159.

14 Матистов Н.В., Ширшова Т.И., Волкова Г.А. Липиды и высшие жирные кислоты в луке *Allium strictum* Schrad (Alliaceae) // Растительные ресурсы. – 2010. – С. 105-109.



- 15 Валуйских О. Е. Распространение и состояние популяций видов рода *Allium* (Amaryllidaceae) в Республике Коми // Ботанический журнал – 2019. - №10. - С. 1561–1573.
- 16 Zubaida Yousaf, Zabta Khan Shinwari, Rehana Asghar , Anjum Parveen. Leaf epidermal anatomy of selected *Allium* species, family Alliaceae from Pakistan // Pak. J. Bot. – 2008. – P. 77-90.
- 17 Friesen N., Fritsch R. M., Blattner F. R. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA its sequences // Aliso - 2006. – Vol. 22. - P. 372–395.
- 18 Parvu M., Parvu E., Laurian V., Groza G. Antifungal activity of *Allium obliquum* // Journal of Medicinal Plants Research. – 2014. - Vol. 4(2). - P. 138 -141.
- 19 Parvu M., Parvu E., Laurian V., Groza G., Danciu M., Parvu O. In vitro effects of *Allium obliquum* extract on the growth and ultrastructure of *Botrytis paeoniae* // Journal of Medicinal Plants Research – 2013. - Vol. 7(17). - P. 1138-1145.
- 20 Laurian V., Marcel P., Parvu E., Anca T. Chemical Constituents of Three *Allium* Species from Romania // Molecules – 2013. - № 18. – P. 114-127.
- 21 Parvu M., Toiu A., Laurian V., Parvu E. Determination of some polyphenolic compounds from *Allium* species by HPLC-UV-MS // Natural Product Research. – 2010. - № 24(14). – P. 1318 – 1324.
- 22 Антипин М. И. Эффекты высотной поясности в двух ценопопуляциях *Allium platyspathum* Schrenk // Материалы X Международной конференции по экологической морфологии растений, посвященной памяти Ивана Григорьевича и Татьяны Ивановны Серебряковых - Москва, 2019 г. - 27-30 ноября. – С. 114 – 119.
- 23 Тухватуллина Л.А., Абрамова Л.М. *Allium polyphyllum* Kar. et Kir. при интродукции в южноуральском ботаническом саду // Бюллетень ГНБС. 2019. - Вып. 131. - С. 124 - 128.
- 24 Vlase L., Parvu M., Parvu E. A., A. Toiu A. Phytochemical analysis of *Allium fistulosum* L. and *A. ursinum* L // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures - Vol. 8 (1). - P. 457 - 467
- 25 Pharmaceutical value of onions (*Allium* L.) and related species of Central Asia // Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) / Jarmila Jedelská aus Šternberk/ Marburg/Lahn – 2007. – 208 p. [Электронный ресурс] URL: <http://archiv.ub.uni-marburg.de> (дата обращения 20.12.2019)
- 26 Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China // Ann Bot. – 2010. - №106(5). – P. 709 - 733.
- 27 Khassanov F.O., EsanKulov A.S. Taxonomic Revision of *Allium* L. sect. *Minuta* F.O. Khass // Stapfia. – 2015. - Vol. 103 - P. 67–72
- 28 Байтулин И. О., Нурушева А. М., Садырова Г. А., Лысенко В. В. Дикорастущий пищевой лук Казахстана // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. - 2012. – № 6. – С. 3–9

29 Fu-Min Xie, Deng-Feng Xie, Chuan Xie, Yan Yu, Song-Dong Zhou, Xing-Jin He. Adaptation Evolution and Phylogenetic Analyses of Species in Chinese Allium Section Pallasia and Related Species Based on Complete Chloroplast Genome Sequences // BioMed Research International. - 2020 – Vol. 28. – P. 235-243.

30 Deng-Feng Xie et. al. Carbohydrates of Allium. VIII. Polysaccharides of Allium coeruleum // Chemistry of Natural Compounds. – 1985. – Vol. 21. – P. 15 – 19.

31 Deng-Feng Xie et. al. Insights into phylogeny, age and evolution of Allium (Amaryllidaceae) based on the whole plastome sequences // Annals of Botany. – 2020. - Vol. 125. – P. 1039–1055.

32 Серегин А.П. Род allium l. (Alliaceae) во флоре восточной Европы: // автореф. дис. ... биологических наук / А.П. Серегин. – Москва, 2007. – 27 с.

33 Dionisio de Guzman Alwindia, Mark Anthony Angeles. Mangoba Bioactivities of Allium longicuspis Regel against anthracnose of mango caused by Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) // Scientific Reports. - 2020. - Vol. 10.- P. 113 - 167.

34 Lee G.A., Ko H.C., Cho G.T., Lee J.R., Sung J.S. Morphological and Agronomic Traits of Allium longicuspis Regel Collected in Central Asia Korean // Journal of Plant Resources. - 2015. - Vol. 28(5). - P. 608-615.

35 Martin Fellner, Wolfgang Kneifel, Dorothea Gregorits, Wolfgang Leonhardt. Identification and antibiotic sensitivity of microbial contaminants from callus cultures of garlic Allium sativum L. and Allium longicuspis Regel // Plant Science. - 1996. - Vol. 113(2). - P.193-201.

36 Kodaira E., Mori G., Imanishi H. Allium oreophilum «Zwanenburg» // Environment Control in Biology. - 2001. - Vol. 39(4). - P. 289-295.

37 Тухватуллина Л.А. Изучение редкого вида Allium Oreophilum в Южно-уральском ботаническом саду-институте // Science in the South of Russia. - 2021. - Vol.17(3). - P. 56–61.

38 Yoshihiro Mimaki, Minpei Kuroda, Tetsuichi Fukasawa, Yutaka Sashida. Steroidal Saponins from the Bulbs of Allium karataviense // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. - 1999. - Vol. 47(6). - P. 738-743.

39 Pogroszewska E., Laskowska H., Durlak W. The effect of gibberellic acid and benzyladenine on the yield of (Allium karataviense Regel.) ‘Ivory queen’ // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. - 2007. - Vol. 6(1). - P. 15-19.

40 Beata Żuraw, Elżbieta Weryszko-Chmielewska, Halina Laskowska, Elżbieta Pogroszewska. The structure of the ovary epidermis emitting odorous compounds in Allium karataviense Regel // Acta Agrobotanica. - 2013. - Vol. 66(4). - P. 15–24.

41 Fritsch R.M. New Allium (Alliaceae) species from Tajikistan, Kyrgyzstan, and Uzbekistan // Bot. Jahrb. Syst. – 2009. – P. 459-471.

42 Smirnov S., Skaptsov M., Shmakov A., Fritsch R.M., Friesen N. Spontaneous hybridization among Allium tulipifolium and A. robustum (Allium subg. Melanocrommyum, Amaryllidaceae) under cultivation // Phytotaxa. – 2017. - Vol. 303(2). - P. 155–164.

- 43 Иванова М. И. и др. Биохимический состав листьев видов *Allium L.* в условиях Московской области // Достижения науки и техники АПК. - 2019. - Т. 33. - № 5 – С. 47-50
- 44 Kusterer J., Fritsch R.M., Keusgen M. *Allium* species from Central and Southwest Asia are rich sources of marasmin // J Agric Food Chem. – 2011. - Vol. 59(15). - P. 8289-8297.
- 45 Kawashima K., Mimaki Y., Sashida Y. Steroidal saponins from the bulbs of *Allium schubertii* // Phytochem. - 1993. - Vol. 32(5). - P. 1267-1272.
- 46 Беккужина С.С., Мухитден К.Н., Манабаева Ш.А. Введение в культуру *in vitro* дикого лука (*Allium caspicum*), произрастающего на западе Казахстана // Сборник статей XXXVII Международной научно-практической конференции. - Москва, 2021. – 15 мая. – С. 29-30.
- 47 Де Уайльд-Дуйфьес, В. Ревизия рода *Allium L.* (Liliaceae) в Африке // *Бельмонтия* – 1976. - №7. - С.75–78.
- 48 Fritsch R.M. and Friesen N. Evolution, domestication, and taxonomy. In: Rabinowitch H.D. and Currah L. (eds) *Allium Crop Science: Recent Advances*, CABI Publishing, Wallingford U.K., 2002 – 26 p. [Электронный ресурс] URL: <http://www.bogos.uni-osnabrueck.de> (дата обращения 20.12.2019).
- 49 Рачковская Е.И., Волкова Е.А., Храмцов В.Н. Ботаническая география Казахстана и Средней Азии (в пределах пустынной области) - СПб.: Бостон-Спектр, 2003. - 424 с.
- 50 Волкова Е.А. Геоботаническое картографирование – Л., 1991. – С. 22-23.
- 51 Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) // LWT-Food Sci Technol – 2004. - Vol. 37(2) - P. 263–268.
- 52 Augusti K.T., Mathew P.T. Lipid lowering effect of allicin (diallyl disulfide oxide) on long-term feeding in normal rats // *Experientia*, 1974 - Vol. 30 – P. 468–470.
- 53 Lanzotti V. The analysis of onion and garlic // *Journal of Chromatography A.* – 2006. - Vol.11-12 – P. 3–22.
- 54 Block E. The chemistry of garlic and onion // *Sci Amer.* – 1985. – Vol. 252. – P. 114–119.
- 55 Eric Block, Benjamin Bechand, Sivaji Gundala, Abith Vattekkatte, Kai Wang, Shaymaa S. Mousa, Kavitha Godugu, Murat Yalcin, Shaker A. Mousa. Fluorinated Analogs of Organosulfur Compounds from Garlic (*Allium sativum*): Synthesis, Chemistry and Anti-Angiogenesis and Antithrombotic Studies // *Molecules* – 2017. – Vol. 22. – P. 20-81.
- 56 Salim M., Bastaki A., Shreesh Ojha, Huba Kalasz, Adeghate E. Chemical constituents and medicinal properties of *Allium* species // *Molecular and Cellular Biochemistry.* - 2021. – Vol. 476(12). – P. 4301-4321.
- 57 Yu T.H., Wu C.M., Liou Y.C. Volatile compounds from garlic // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* - 1989. – Vol. 37(3). – P. 725–730.
- 58 Jarvenpaa E. P., Zhang Z., Huopalahti R., King J. W. Determination of fresh onion (*Allium cepa L.*) volatiles by solid phase microextraction combined with gas

chromatography-mass spectrometry // *Z Lebensm Unters Forsch A.* – 1998. - Vol. 207. – P. 39-43.

59 Eman Ahmed El-Wakil et al. GC-MS Investigation of Essential oil and antioxidant activity of Egyptian White Onion (*Allium cepa* L.) // *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR).* - 2015. - Vol. 6(3). - P. 537-543.

60 Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F., Crespy V. du Chaffaut L., Mennen L., Knox C., Eisner R., Cruz J., Wishart D. Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods // *Database The Journal of Biological Databases and Curation.* – 2016. - Vol. 41 – P.12–15.

61 Rauter A.P., Ennis M., Hellwich K.H., Herold B.J., Horton D., Moss G.P., Schomburg I. Nomenclature of flavonoids // *Pure Appl. Chem.* – 2018. - Vol. 90 – P. 1429–1486.

62 Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretzschmar G., Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. // *Biotechnol. J. Healthc. Nutr. Technol.* – 2007. - Vol. 2 –P. 1214–1234.

63 Pérez-Gregorio R.M., García-Falcón M.S., Simal-Gándara J., Rodrigues A.S., Almeida D.P. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest // *J. Food Compos. Anal.* – 2010. – Vol. 23. – P. 592–598.

64 Robards K., Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. *Analyst.* – 1997. - Vol.122 – P. 11–34.

65 Prakash D., Singh B. N., Upadhyay G. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*) // *Food Chemistry.* - 2007. - Vol. 102(4). - P. 1389–1393.

66 Slimestad R., Fossen T., Vågen I.M. Onions: A source of unique dietary flavonoids // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. - Vol.55 – P.10067–10080.

67 Željana Fredotović, Matilda Šprung, Barbara Soldo, Ivica Ljubenkov, Irena Budić-Leto, Tea Bilušić, Vedrana Čikeš-Čulić, Jasna Puizina. Chemical Composition and Biological Activity of *Allium cepa* L. and *Allium cornutum* Methanolic Extracts // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22(3) – P. 448-457.

68 Pérez-Gregorio R.M., García-Falcón M.S., Simal-Gándara J., Rodrigues A.S., Almeida D.P.F. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest // *J. Food Comp. Anal.* – 2010. - Vol. 23 – P.592–598.

69 Corea G., Fattorusso E., Lanzotti V. Saponins and Flavonoids of *Allium triquetrum* // *Journal of Natural Products* – 2003. – Vol. 66(11) – P.1405- 1411.

70 Emir A., Emir C., Yıldırım H. Characterization of phenolic profile by LC-ESI-MS/MS and enzyme inhibitory activities of two wild edible garlic: *Allium nigrum* L. and *Allium subhirsutum* L // *J. Food Biochem.* – 2020. - Vol. 44. – P. 193-201.

71 Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno S., De Feo V., Cicala C. The flavonoids of *Allium neapolitanum* – 1997. – Vol. 44(5) – P. 949-57.

72 Tünay Karan, Faik Gökalp, Ramazan Erenler. Theoretical Study on Flavonoids Isolated from *Allium vineale* // Cumhuriyet Science Journal - 2018. – Vol. 39(1) – P. 66-70.

73 Risa Nakanea, Tsukasa Iwashina Flavonol Glycosides from the Leaves of *Allium macrostemon* // Natural Product Communications Received. - 2015. – Vol. 67 – P. 31-40.

74 Carotenuto A, Feo V De, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S, Cicala C. The flavonoids of *Allium ursinum* // Biochemical Systematics and Ecology – 1996. – Vol. 41(2) – P. 531-536.

75 Ivanova A., Mikhova B., Najdenski H., Tsvetkova I., Kostova I. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Wild Garlic *Allium ursinum* of Bulgarian // Origin. Nat. Prod. Commun. – 2009. – Vol. 4(8) – P. 1059-1062.

76 Fattorusso E., Lanzotti V., Tagliatalata-Scafati O., Cicala C. The flavonoids of leek, *Allium porrum* // Phytochemistry. – 2001. – Vol. 57(4) – P. 565-569.

77 Kim M.-Y., Kim Y.-C., Chung S.-K. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: Inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals // J. Sci. Food Agric. – 2005. – Vol. 85 – P. 633–640.

78 El-Hadidy E.M., Mossa M.E.A., Habashy H.N. Effect of freezing on the pungency and antioxidants activity in leaves and bulbs of green onion in Giza 6 and Photon varieties // Ann. Agric. Sci. – 2014. - Vol. 59 – P. 33–39.

79 Domínguez O.G.P., Pesantes K.E.B., Martínez M.M., Gaitén Y.G. Estudio químico y evaluación biológica del extracto etanólico de *Allium schoenoprasum* L. Regel & Tiling (Cebollín) // Rev. Cuba. Farm. – 2019. – Vol. 52 – P. 13-17.

80 Mu Qie, Terigele Wang, Changjin A. Effects of flavonoids from *Allium mongolicum* Regel on cell apoptosis, cell cycle and STAT1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes of sheep // Journal of Applied Animal Research - 2021. – Vol. 84 – P. 793–795.

81 Hong Eun-Young, Choi Soo-Im, Kim Gun-Hee. Determination of Flavonoids from *Allium victorialis* var. *platyphyllum* and their effect on gap junctional intercellular communication // Food Science and Biotechnology. – 2007. – Vol.16(5) – P. 24-29

82 Dursun Kısaa, Zafer Kayab, Rizvan İmamoğlua, Nusret Gençc, Parham Taslimid, Tugba Taskin-Toke. Assessment of antimicrobial and enzymes inhibition effects of *Allium kastambulense* with in silico studies: Analysis of its phenolic compounds and flavonoid contents // Arabian Journal of Chemistry. – 2022. – Vol. 15(6). - P. 103-110.

83 Olennikov D. N. Flavonol glycosides from leaves of *Allium microdictyon* // Chemistry of Natural Compounds. - 2020. - Vol. 56(6) – P. 1035-1039.

84 Laurian Vlase, Marcel Parvu, Elena Alina Parvu, Anca Toiu. Chemical constituents of three allium species from Romania // Molecules. – 2013. – Vol. 18(1) – P. 114–127.

85 Bonaccorsi P., Caristi C., Gargiulli C., Leuzzi U. Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC–DAD–ESI–MS–MS // *Food Chem.* – 2008. – Vol. 107 – P. 1668–1673.

86 Landraces Loredana Liguori, Rosa Califano, Donatella Albanese, Francesco Raimo, Alessio Crescitelli, Marisa Di Matteo. Chemical composition and antioxidant properties of five white onion (*Allium cepa* L.) // *Journal of Food Quality.* - 2017. – Vol. 28(1). - P. 1-9.

87 Corea G., Fattorusso E., Lanzotti V., Capasso R., Izzo A.A. Antispasmodic saponins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. var. *Tropea* // *J Agric Food Chem.* - 2005. – Vol. 53(4) – P. 935-940.

88 Matsuura H. Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131. – P. 1000–1005.

89 Danuta Sobolewska, Klaudia Michalska, Irma Podolak, Karolina Grabowska. Steroidal saponins from the genus *Allium* // *Phytochem Rev.* - 2016. – Vol. 15(1) – P. 1–35.

90 Jurgiel-Malecka G., Gibczynska M., Nawrocka-Pezik M. Comparison of chemical composition of selected cultivars of white, yellow and red onions // *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* - 2015. – Vol. 21(4) – P. 736-741.

91 Mimaki Y., Kuroda M., Fukasawa T. Steroidal saponins from the bulbs of *Allium karataviense* // *Chemical & pharmaceutical bulletin* – 2009. – Vol. 47(6) – P. 738–743.

92 Kuroda M., Ori K., Takayama H., Sakagami H., Mimaki Y. Karataviosides G–K, five new bisdesmosidic steroidal glycosides from the bulbs of *Allium karataviense* // *Steroids.* - 2014. – Vol. 93. – P. 96–104.

93 Kusterer J., Fritsch R. M., Keusgen M. *Allium* Species from Central and Southwest Asia Are Rich Sources of Marasmin // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2011. – Vol. 59(15). – P. 8289 – 8297.

94 Guzman A. D., Mangoba M. A. Bioactivities of *Allium longicuspis* Regel against anthracnose of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) // *Scientific Reports.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1-20.

95 Laurian Vlase, Marcel Parvu, Elena Alina Parvu, Anca Toiu // *Chemical Constituents of Three Allium Species from Romania.* – 2012. - Vol. 8. – P. 357-362.

96 Stajner D.I., Kapor A. Exploring *Allium* species as a Source of Potential Medicinal Agents // *Phytother Res.* - 2006. – Vol. 20(7). – P. 581- 584.

97 Monika N., Sakthi Abirami M. *Allium porrum*: a review // *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences.* – 2018. - Vol. 4(3). – P. 28-40.

98 Ashwini M., Sathishkumar R. Onion (*Allium cepa*)-Ethnomedicinal and therapeutic properties // *Handbook of Medicinal plants and their Bioactive compounds.* - 2014. - P. 27–34. [Электронный ресурс] <https://docplayer.net/43900298-3-onion-allium-cepa-ethnomedicinal-and-therapeutic-properties.html> (дата обращения 20.02.2019).

99 Albishi T., John J.A., Al-Khalifa A., Shahidi F. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities // *J. Funct. Foods.* – 2013. - Vol. 5 – P. 1191–1203.

- 100 Shahidi F. Maximising the value of marine by-products // Woodhead Publishing. - 2006. [Электронный ресурс] URL: <https://www.elsevier.com/books/maximising-the-value-of-marine-by-products/shahidi/978-1-84569-013-7> (дата обращения 21.01.2020).
- 101 Lanzotti V. The analysis of onion and garlic // *J. Chromatogr. A.* – 2006. - Vol. 1112 – P. 3–22.
- 102 Griffiths G., Trueman L., Crowther T., Thomas B., Smith B. Onions-a global benefit to health // *Phytother. Res.* - 2002. – Vol. 16. – P. 603–615.
- 103 Moriarty R.M., Naithani R., Surve B. Organosulfur compounds in cancer chemoprevention // *Mini Rev. Med. Chem.* - 2007. – Vol. 7 – P. 827–38.
- 104 Le Bon A.M., Siess M.H. Organosulfur compounds from *Allium* and the chemoprevention of cancer // *Drug. Interact.* – 2000. – Vol. 17 – P. 51–80.
- 105 Shon M.Y., Choi S.D., Kahng G.G., Nam S.H., Sung N.J. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – Vol. 42 – P. 659–66.
- 106 Varadkar P., Dubey P., Krishna M., Verma N.C. Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics // *J. Radiol. Prot.* - 2001. – Vol. 21 – P. 361–70.
- 107 Choi J.A., Kim J.Y., Lee J.Y., Kang C.M., Kwon H.J., Yoo Y.D., Kim T.W., Lee Y.S., Lee S.J. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin // *Int. J. Oncol.* - 2001. - Vol. 19 – P. 837–844.
- 108 Scambia G., Mancuso S., Panici P.B., De Vincenzo R., Ferrandina G., Bonanno G., Ranelletti F.O., Piantelli M., Capelli A. Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines // *Int. J. Cancer.* – 1993. Vol. 54 – P. 462–466.
- 109 Galeone C., Pelucchi C., Dal Maso L., Negri E., Montella M., Zucchetto A., Talamini R., La Vecchia C. *Allium* vegetables intake and endometrial cancer risk. // *Public. Health. Nutr.* – 2009. – Vol. 12 – P. 1576–1579.
- 110 Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N., Marui N., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 260 – P. 10–13.
- 111 Scherer C., Jacob C., Dicato M., Diederich M. Potential role of organic sulfur compounds from *Allium* species in cancer prevention and therapy // *Phytochem. Rev.* – 2009. – Vol. 8 – P. 349-355.
- 112 Guyonnet D., Belloir C., Suschetet M., Siess M.H., Le Bon A.M. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2001. - Vol. 495 – P. 135–145.
- 113 Shon M.Y., Choi S.D., Kahng G.G., Nam S.H., Sung N.J. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions // *Food Chem. Toxicol.* – 2004. – Vol. 42 – P. 659–666

114 Shrivastava S., Ganesh N. Tumor inhibition and cytotoxicity assay by aqueous extract of onion (*Allium cepa*) & Garlic (*Allium sativum*): an in-vitro analysis // *International Journal of Phytomedicine*. – 2010. - Vol. 2. – P. 80-84.

115 Kharadi G.B., Patel K.J., Purohit B.M., Baxi S.N., Tripathi C. Evaluation of cardioprotective effect of aqueous extract of *Allium cepa* Linn bulb on isoprenaline-induced myocardial injury in Wistar albino rats // *Res. Pharm. Sci.* – 2016. –Vol.11 – P. 419–427.

116 Nausheen Q.N., Ali S.A., Subur K. Cardioprotective and antioxidant activity of onion (*Allium cepa*) leaves extract in doxorubicin induced cardiotoxicity in rats // *Ann. Exp. Biol.* – 2014. – Vol. 2 – P. 37–42.

117 Erdman Jr J.W., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137 – P. 718–737.

118 Yamamoto Y., Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2006. – Vol. 70. – P. 933–939.

119 Reilly J.D., Mallet A.I., McAnlis G.T., Young I.S., Halliwell B., Sanders T.A., Wiseman H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans // *J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73 – P. 1040–1044.

120 El-Demerdash F., Yousef M., El-Naga N.A. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats // *Food Chem. Toxicol.* – 2005. – Vol. 43 – P. 57–63.

121 Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts // *Int. J. Food Sci. Nutr.* - 2005. – Vol. 56 – P. 399–414.

122 Jo S.H., Ka E.H., Lee H.S. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. // *J. Appl.* – 2009. - Vol.2 – P.52–60.

123 Mnayar D., Fabiono-Tixier A.S., Petitcolas E., Hamieh T., Nehme N., Ferrant C., Fernandez X. Chemat F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae family // *Molecules* – 2014. - Vol. 19 – P. 20034–20053.

124 Саторов С., Мирзоева Ф.Д. Исследование антибактериальной активности экстрактов различных видов рода *Allium*, произрастающих в Таджикистане // *Вестник Авиценны* – 2021. - Т. 23 - № 2. – С. 216-234.

125 Sunčica Kocić-Tanackov, Gordana Dimić, Ljiljana Mojović, Antifungal Activity of the Onion (*Allium cepa* L.) Essential Oil Against *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species Isolated from Food // *Journal of Food Processing and Preservation*. – 2016. – Vol. 21(4). – P. 234-243.

126 Arunkumar Karunanidhi, Ehsanollah Ghaznavi-Rad, Jayakayatri Jeevajothi Nathan *Allium stipitatum* Extract Exhibits In Vivo Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Accelerates Burn Wound Healing in



a Full-Thickness Murine Burn Model // Evid Based Complement Alternat Med. – 2017 – Vol. 2017 –P. 1914732.

127 Alican Bahadır Semerci, Vusale Mammadova Antimicrobial activities of *Allium staticiforme* and *Allium subhirsutum* // Bangladesh Journal of Pharmacology - 2020 – P. 19-23

128 Dasha Mihaylova, Iordanka Alexieva, Aneta Popova, Sapunjieva T. Antimicrobial and antioxidant activity of extracts of *Allium ursinum* L. // Journal of BioScience and Biotechnology January 2012

129 Shin S.C., Choi J.S., Li X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. // Int. J. Pharm. – 2006. – Vol.313 – P. 144–9.

130 Wu C.P., Calcagno A.M., Hladky S.B., Ambudkar S.V., Barrand M.A. Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5) FEBS J. – 2005. – Vol.272 – P.4725–40

131 Fukao T., Hosono T., Misawa S., Seki T., Ariga T. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. // Food Chem. Toxicol. – 2004. – Vol.42 – P.743–9.

132 Sigounas G., Hooker J., Anagnostou A., Steiner M. S-allylmercaptocysteine inhibits cell proliferation and reduces the viability of erythroleukemia, breast, and prostate cancer cell lines. // Nutr. Cancer . – 1997. –Vol.27 – P.186–91.

133 Fattorusso E., Lanzotti V., Tagliatalata-Scafati O., Di Rosa M., Ianaro A. Cytotoxic saponins from bulbs of *Allium porrum* L. // J. Agric. Food Chem. – 2000. Vol.48 – P.3455–62.

134 Dorsch W., Wagner H., Bayer T., Fessler B., Hein G., Ring J., Scheftner P., Sieber W., Strasser T., Weiss E. Anti-asthmatic effects of onions: Alk(en)ylsulfinothioic acid alk(en)yl-esters inhibit histamine release, leukotriene and thromboxane biosynthesis in-vitro and counteract paf and allergen-induced bronchial obstruction in vivo. // Biochem. Pharmacol. – 1988. Vol.37 –P. 4479–86.

135 El-Demerdash F., Yousef M., El-Naga N.A. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. // Food Chem. Toxicol. – 2005. – Vol.43 – P.57–63.

136 Dwivedi C., Dasgupta S. Antidiabetic herbal drugs and polyherbal formulation used for diabetes: A review. // J. Phytopharmacol. – 2013. – Vol.2 – P.44–51.

137 Kim S.H., Jo S.H., Kwon Y.I., Hwang J.K. Effects of onion (*Allium cepa* L ) extract administration on intestinal  $\alpha$ -glucosidases activities and spikes in postprandial blood glucose levels in SD rats model. // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol.12 – P.3757–69.

138 Moon C.H., Jung Y.S., Kim M.H., Lee S.H., Baik E.J., Park S.W. Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A2 synthase inhibition and TXA2/PGH2 receptor blockade. // Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids . – 2000 – Vol.62 – P.277–83.

139 Ro J.Y., Ryu J.H., Park H.J., Cho H.J. Onion (*Allium cepa* L ) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. // Springerplus. – 2015. – Vol.4 – P.17.

140 Ali M., Thomson M., Afzal M. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. // PLEFA. – 2000. – Vol.62 – P.55–73.

141 Vilahur G., Badimon L. Antiplatelet properties of natural products. // Vascul. Pharmacol. – 2013. – Vol.59 – P. 67–75.

142 Wattel A., Kamel S., Prouillet C., Petit J.P., Lorget F., Offord E., Brazier M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF $\kappa$ B and AP-1. // J. Cell Biochem. – 2004. – Vol.92 – P.285–95.

143 Ashwini M., Sathishkumar R. Onion (*Allium cepa*)-Ethnomedicinal and therapeutic properties. // Handbook of Medicinal plants and their Bioactive compounds. - 2014. - P. 27–34.

144 Marefati N., Ghorani V., Shakeri F., Boskabady M., Kianian F., Rezaee R., Boskabady M.H. A review of anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Allium cepa* and its main constituents. // Pharm Biol. – 2021. – Vol.59 – P.287–302

145 Horcajada-Molteni M.N., Crespy V., Coxam V., Davicco M.J., Remesy C., Barlet J.P. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. // J. Bone. Miner. Res. – 2000. – Vol.15 – P. 2251–8.

146 Duarte J., Pérez-Palencia R., Vargas F., Ocete M.A., Pérez-Vizcaino F., Zarzuelo A., Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. // Br. J. Pharmacol. – 2001. – Vol.133 – P.117–24.

147 Augusti K., Chackery J., Jacob J., Kuriakose S., George S., Nair S.S. Beneficial effects of a polar fraction of garlic (*Allium sativum* Linn) oil in rats fed with two different high fat diets. // Indian. J. Exp. Biol. – 2005. – Vol.43 –P.76–83.

148 Martin M.J., La-Casa C., Alarcon-de-La-Lastra C., Cabeza J., Villegas I., Motilva V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. // Z. Naturforsch. C. - 1998. – Vol.53 – P. 82–8.

149 de la Lastra A., Martin M.J., Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. // Pharmacology. – 1994. – Vol.48 – P.56–62

150 Helen A., Krishnakumar K., Vijayammal P., Augusti K. Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa* Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. // Toxicol. Lett. – 2000. – Vol.116 – P.61–8.

151 Marzocchella L., Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. // Recent. Pat. Inflamm. Allergy. Drug. Discov. – 2011. – Vol.5 – P.200–20.

152 Gulsen A., Makris D.P., Kefalas P. Biomimetic oxidation of quercetin: isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its in-vitro antioxidant properties. // Food Res. Int. – 2007. – Vol.40 – P.7–14.

153 Kawai M., Hirano T., Higa S., Arimitsu J., Maruta M., Kuwahara Y., Ohkawara T., Hagihara K., Yamadori T., Shima Y., Ogata A. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. // Allergol. Int. - 2007. – Vol.56 – P.113–23

154 Tanaka T., Takahashi R. Flavonoids and asthma. // *Nutrients*. – 2013. – Vol. 5 – P.2128–43.

155 Nair M.P., Kandaswami C., Mahajan S., Chadha K.C., Chawda R., Nair H., Kumar N., Nair R.E., Schwartz S.A. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN $\gamma$ ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* – 2002. – Vol.1593 – P. 29–36.

156 Singh A., Holvoet S., Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. // *Allergy* . – 2011. – Vol.41 – P.1346–59.

157 M Calderon-Montano J., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. // *Mini Rev. Med. Chem.* - 2011. – Vol.11 – P. 298–344.

158 Fernandez J., Reyes R., Ponce H., Oropeza M., Vancalsteren M.R., Jankowski C., Campos M.G. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol.522 – P.108–5

159 Dorsch W. *Allium cepa* L (Onion): Part 2 chemistry, analysis and pharmacology. // *Phytomedicine*. – 1997. –Vol.3 – P. 391–7.

160 Kumazawa Y., Takimoto H., Matsumoto T., Kawaguchi K. Potential use of dietary natural products, especially polyphenols, for improving type-1 allergic symptoms. // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol.20 – P. 857–63.

161 Lakhanpal P., Rai D.K. Quercetin: a versatile flavonoid. // *IJMU*. – 2007. – Vol.2 – P. 22–37.

162 Elberry A.A., Mufti S., Al-Maghrabi J., Abdel Sattar E., Ghareib S.A., Mosli H.A., Gabr S.A. Immunomodulatory effect of red onion (*Allium cepa* Linn) scale extract on experimentally induced atypical prostatic hyperplasia in Wistar rats. // *Mediators. Inflamm.* – 2014. – Vol.2014 – P. 640746.

163 He Y., Jin H., Gong W., Zhang C., Zhou A. Effect of onion flavonoids on colorectal cancer with hyperlipidemia: An in vivo study. // *Oncotargets Ther.* – 2014. – Vol. 7 – P.101.

164 Kim O.Y., Lee S.M., Do H., Moon J., Lee K.H., Cha Y.J., Shin M.J. Influence of quercetin-rich onion peel extracts on adipokine expression in the visceral adipose tissue of rats. // *Phytother. Res.* – 2012. Vol.26 – P.432–437.

165 Bae C.R., Park Y.K., Cha Y.S. Quercetin-rich onion peel extract suppresses adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. // *J. Sci. Food Agric.* – 2014. – Vol.94 – P.2655–2660.

166 Sung Y.Y., Kim D.S., Kim S.H., Kim H.K. Aqueous and ethanolic extracts of welsh onion, *Allium fistulosum*, attenuate high-fat diet-induced obesity. *BMC Complement.* // *Altern. Med.* – 2018. – Vol.18 – P.105.

167 Grzelak-Błaszczyk K., Milala J., Kosmala M., Kołodziejczyk K., Sójka M., Czarnecki A., Klewicki R., Juśkiewicz J., Fotschki B., Jurgoński A. Onion quercetin monoglycosides alter microbial activity and increase antioxidant capacity. // *J. Nutr. Biochem.* – 2018. – Vol.56 – P.81–88.

168 Singh V., Krishan P., Shri R. Amelioration of ischaemia reperfusion-induced cerebral injury in mice by liposomes containing *Allium cepa* fraction administered intranasally. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2018. – Vol.46 – P. S982–S992.

169 Hwang I.K., Lee C.H., Yoo K.Y., Choi J.H., Park O.K., Lim S.S., Kang I.J., Kwon D.Y., Park J., Yi J.S. Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. // *J. Med. Food.* – 2009. – Vol.12 – P.990–995.

170 Sarchielli E., Morelli A., Guarnieri G., Iorizzi M., Sgambati E. Neuroprotective effects of quercetin 4'-O- $\beta$ -d-diglycoside on human striatal precursor cells in nutrient deprivation condition. // *Acta Histochem.* – 2018. – Vol.120 – P.122–128.

171 Gansukh E., Nile A., Kim D.H., Oh J.W., Nile S.H. New insights into antiviral and cytotoxic potential of quercetin and its derivatives-A biochemical perspective. // *Food Chem.* – 2020. –Vol.334 – P.127508.

172 Schwarz S., Sauter D., Wang K., Zhang R., Sun B., Karioti A., Bilia A.R., Efferth T., Schwarz W. Kaempferol derivatives as antiviral drugs against the 3a channel protein of coronavirus. // *Planta Med.* – 2014 – Vol.80 – P.177.

173 Kianian F., Marefati N., Boskabady M., Ghasemi S.Z., Boskabady M. H. Pharmacological Properties of *Allium cepa*, Preclinical and Clinical Evidences; A Review // *Iran J Pharm Res.* – 2021. –Vol. 20(2) - P. 107–134.

174 Pandey P., Rane J.S., Chatterjee A., Kumar A., Khan R., Prakash A., Ray S. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: An in silico study for drug development. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2020. – P.1–11.

175 Кадырбаева Г.М., Сакипова З.Б. Обзор рынка фармацевтических продуктов, содержащих экстракт лука и чеснока // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции «Глобальная наука и инновация 2019: Центральная Азия». -Астана - 2019. - С.106-109.

176 Реестр лекарственных средств и медицинских изделий Республики Казахстан [http://register.ndda.kz/category/search\\_prep](http://register.ndda.kz/category/search_prep) Интернет ресурс 01.11.2018

177 Реестр лекарственных средств и медицинских изделий Республики Россия <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> Интернет ресурс 02. 11.2018

178 Единый реестр свидетельств о государственной регистрации ЕАЭС [https://portal.eaeunion.org/sites/odata/\\_layouts/15/portal.eec.registry.ui/directoryform.aspx?listid=0e3ead06-5475-466a-a340-6f69c01b5687&itemid=231#](https://portal.eaeunion.org/sites/odata/_layouts/15/portal.eec.registry.ui/directoryform.aspx?listid=0e3ead06-5475-466a-a340-6f69c01b5687&itemid=231#) 02.12.2019

179 Государственная Фармакопея Республики Казахстан // В 3 т. – Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы», - 2009. – Т. 2. – 804 с.

180 Государственная Фармакопея Республики Казахстан // В 3 т. – Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы», - 2008. – Т. 1. – 592 с.

181 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. // *Clin. Microbiol. Inf. Dis.* – 2003. - Т. 9. – С. 1–7.

182 Matejic, J.S., Dzamic A.M., Mihajilov-Krstev T., Randelovic V.N., Krivosej Z.D., Marin P.D. Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three Seseli, L. taxa. // Cent. Eur. J. Biol. – 2012. - Т.7. – С. 1116–1122.

183 Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. // Free Radic. Biol. Med. – 1999. Т. 26. – С.1231–1237.

184 Wang Y., Hao M.M., Sun Y., Wang L.F., Wang H., Zhang Y.J., Li H.Y., Zhuang P.W., Yang Z. Synergistic Promotion on Tyrosinase Inhibition by Antioxidants. // Molecules – 2018. – Т. 23. - С. 106

185 Uchida R., Ishikawa S., Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanin pigmentation by 2-hydroxytyrosol. // Acta Pharm. Sin. B – 2014. – Т. 4. – С. 141–145

186 Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в Новых независимых государствах (НИГ). Франция. WHO Library // Cataloguing-in-Publication Data: Всемирная организация здравоохранения, - 2010. — 455 с.

187 Chen-Yi Lin, Dun-Yan Tan. The taxonomic significance of leaf epidermal micromorphological characters in distinguishing 43 species of *Allium* l. (Amaryllidaceae) from Central Asia. Pak. // J. Bot., - 2015. – Vol.47(5) – P. 1979-1988.

188 Akida T., Abdullaeva N K., Rakhimova G. Comparative Study of the Anatomical Structure of Some Vegetative Organs *Allium caspium* (pall.) M. Bieb. and *Allium tschimganicum* B. Fedtsch. Ex Popov Growing in Natural Conditions of Uzbekistan // American Journal of Plant Sciences. – 2020. – Vol.11(9). – P. 1020-1038.

189 Анцупова Т.П., Жапова О.И. Сравнительная анатомическая характеристика некоторых видов лука Забайкалья // Вестник Бурятского Государственного университета. - 2018. - Вып. 3. - С. 10-14.

190 Кадырбаева Г.М., Сакипова З.Б., Жумашова Г.Т., Алламбергенова З.Б., Курманалиева Ш.М. Морфологическое и анатомическое строение растений *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum* // Фармация Казахстана. – 2022. - №4. – С. 18-21.

191 Кадырбаева Г.М., Сакипова З.Б. Определение типа устьиц и устьичного индекса в лекарственном растительном сырье *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum* // Modern science. Management and standards of scientific research»: Международная научно-практическая конференция.- Прага (Чехия), - 2020. - С. 58.

192 Kadyrbayeva G., Zagórska J., Grzegorzcyk A., Gawel-Beben K., Strzepak-Gomółka M., Ludwiczuk A., Kumar M., Koch W. et al. The phenolic compounds profile and cosmeceutical significance of two kazakh species of onions: *A. galanthum* and *A. turkestanicus* // Molecules. – 2021. – Vol.26. - P. 1-20.

193 Meyre-Silva C., Mora T.C. Biavatti M.W., Santos A. R. Dal-Margo J. et al. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves (L.)Wild. // Phytomedicine. – 1995. – Vol.5. – P. 109–113.

194 Svečnjak L., Chesson L.A., Gallina A., Maia M., Martinello M., Mutinelli F. et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – P. 1-20.

195 Behrman E.J., Gopalan V. Cholesterol and plants // *J. Chem. Educ.* – 2005. - Vol.82. – P. 1791–1793.

196 Sonawane P.D., Pollier J., Panda S., Szymanski J., Massalha H., Yona M., Unger T., Malitsky S., Arendt P., Pauwels L. et al. Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. // *Nat. Plants*. – 2016. – Vol. 3. – P. 115-138.

197 Кадырбаева Г.М., Сакипова З.Б., Тілеубпй С.Г., Шуленова Н., Бакытжан Д. Определение содержания тяжелых металлов в некоторых растениях рода *Allium* // Приоритеты фармации и стоматологии – от теории к практике: Сборник материалов VIII международной научно-практической конференции. - Алматы. – 2019. – С. 129-130.

198 Кадырбаева Г.М., Сакипова З.Б., Кожанова К.К., Шуленова Н., Бакытжан Д., Тілеубпй С.Г. Оценка безопасности некоторых растений рода *Allium*. // Вестник Казахского национального медицинского университета – 2020. - №2. – С. 410-412.

199 Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020. [Электронный ресурс] URL: <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2000021545/history> (дата обращения 26.08.2020)

200 Технология получения фитосубстанции лука туркестанского // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. - №4. – С. 150-154.

201 Vijayalakshmi G., Raja M., Naik M., Lakshmi pathi M., Carbone V., Russo G.L., Khan P.S.V. Determination of antioxidant capacity and flavonoid composition of onion (*Allium cepa* L.) landrace 'Krishnapuram' bulb using HPLC-ESI-ITMS. // *J. Biosci.* – 2021. – Vol.46. – p. 58.

202 Niu K.-M., Kothari D., Lee W.-D., Cho S., Wu X., Kim S.-K. Optimization of Chinese chive juice as a functional feed additive. // *Appl. Sci.* 2020. – Vol.10. – p. 6194.

203 Nakane R., Iwashina T. Flavonol glycosides from the leaves of *Allium macrostemon*. // *Nat. Prod. Commun.* – 2015. - Vol. 10. – P. 1381–1382.

204 Shanker K.S., Kanjilal S., Rao B.V., Kishore K.H., Misra S., Prasad R.B. Isolation and antimicrobial evaluation of isomeric hydroxy ketones in leaf cuticular waxes of *Annona squamosa*. // *Phytochem. Anal.* – 2007. – Vol. 18. – P. 7–12.

205 Chatterjee S., Karmakar A., Azmi S.A., Barik A. Antibacterial activity of long-chain primary alcohols from *Solenanthe amplexicaulis* leaves. // *Proc. Zool. Soc.* – 2018. – Vol. 71. – P. 313–319.

206 Tomovic M.T., Krivokapic M.Z., Jakovljevic V.L., Sovrljic M.M., Bradic J.V., Petkovic A.M., Radojevic I.D., Brankovic S.R. Comic, L.R., Andjic M.M. et al.

Biological activities of different extracts from *Allium ursinum* leaves. // *Acta Pol. Pharm.* – 2020. – Vol. 77. –P. 121–129.

207 Santas J., Almajano M.P., Carbó R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2010. - Vol. 45. – P. 403–409.

208 Bakht J., Khan S., Shafi M. In vitro antimicrobial activity of *Allium cepa* (dry bulbs) against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi. // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2014. – Vol. 27. – P. 139–145.

209 Hughes B.G., Lawson L.D. Antimicrobial effects of *Allium sativum*, *Allium ampeloprasum* and *Allium cepa* // *Phytother. Res.* – 1991. - Vol. 5. – P. 154–158.

210 Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*) // *LWT-Food Sci. Technol.* - 2004. – Vol.37. – P. 263–268.

211 Chaithradhyuthi G.S., Sowmya P.S., Shwetha B.R., Gowri S., Bhat P.R., Nagasapige H.M., Rao B.R. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of some members of *Allium*. // *Electr. J. Environ. Agric. Food Chem.* - 2009. – Vol. 8. – P. 345–350.

212 Fredotovič Ž., Puizina J., Nazlič M., Maravič A., Ljubenkovič I., Soldo B., Vuko E., Bajič D. Phytochemical characterization and screening of antioxidant, antimicrobial and antiproliferative properties of *Allium cornutum clementi* and two varieties of *Allium cepa* L. peel extracts // *Plants.* – 2021. – Vol. 10. – P. 832-844.

# ПРИЛОЖЕНИЕ А

**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ**      **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

**REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

**ПАТЕНТ**  
**PATENT**

№ 7165

**ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL**



(21) 2022/0049.2

(22) 25.01.2022

(45) 03.06.2022

(54) *Allium galanthum* өсімдігінен микробқа қарсы және антиоксиданттық белсенді әсері бар экстракт алу тәсілі  
Способ получения экстракта с антимикробным и антиоксидантным активностями из растения *Allium galanthum*  
Method for obtaining extract with antimicrobial and antioxidant activities from *Allium galanthum* plant

(73) «С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)  
Некоммерческое акционерное общество «Казакский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова» (KZ)  
Non-profit joint stock company «Kazakh national medical university named after S.D. Asfendiyarov» (KZ)

(72) Кадырбаева Гүлнара Мухаметовна (KZ)	Kadyrbayeva Gulnara Mukhametovna (KZ)
Сақипова Зурияда Бектемировна (KZ)	Sakipova Zuriyadda Bektemirovna (KZ)
Кожанова Калданай Каржауовна (KZ)	Kozhanova Kaldanay Karzhauovna (KZ)
Ибрагимова Лилия Николаевна (KZ)	Ibragimova Liliya Nikolayevna (KZ)
Алламбергенова Зоя Бакбергенқызы (KZ)	Allambergenova Zoya Baqbergenqyzy (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды  
Подписано ЭЦП  
Signed with EDS

Е. Оспанов  
Е. Оспанов  
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директоры  
Директор РПП «Национальный институт интеллектуальной собственности»  
Director of RSE «National institute of intellectual property»



## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1

Г. Есик

«20» 03 2021 г.

#### результатов PhD диссертационной работы Кадырбаевой Г. М.

1. Наименование: внедрение технологии сбора, заготовки и хранения лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum*.
2. Название организации: ТОО «ФитОлеум», РК, г. Есик, ул. Маметовой, 25.
3. Область применения: фармацевтическое производство.
4. Основное содержание внедрения, разработанного в рамках выполнения диссертационной работы: технология сбора, заготовки и хранения лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* состоит из следующих технологических стадий: сбор сырья, обработка сырья, сушка сырья, упаковка в мешки, склад (хранение).
5. Формы и методы внедрения: на основании динамики накопления биологически активных веществ установлены оптимальные сроки сбора лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* (весной и осенью до и после цветения).
6. Технологическая схема заготовки лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* представлена на рисунке 1.

Ингредиенты	Стадия	Контрольные точки
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Листья и луковицы <i>Allium galanthum</i> и луковицы <i>Allium turkestanicum</i></div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <b>Стадия 1.</b>  <b>Сбор сырья.</b>                      Очистка, промывка,                      обработка                 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">                     Фармакогностические                      признаки                      Визуальный осмотр,                      органолептическая оценка                 </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Листья и луковицы <i>Allium galanthum</i> и луковицы <i>Allium turkestanicum</i></div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <b>Стадия 2.</b>  <b>Сушка сырья</b>                      Сушиллка                 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">                     - температура,                      - период ворошения,                      - контроль в соотв. с                      ГФ РК;                      - степень высушенности                 </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Цельное высушенное сырье, мешки из крафт- бумаги</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <b>Стадия 3.</b>  <b>Упаковка в мешки</b>                      Ручной труд                 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">                     - Масса, контроль на                      соответствие ГФ РК,                      качество упаковки                 </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Упакованное цельное высушенное сырье</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <b>Хранение</b> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">                     - температура;                      - влажность;                      - МБЧ                 </div>

Рисунок 1 – Технологическая схема заготовки лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum*

7. Эффективность внедрения: внедрение технологии сбора, заготовки и хранения в рамках требований международных надлежащих практик GACP и GMP, обеспечить качество, эффективность и безопасность лекарственных средств, увеличит номенклатуру и конкурентоспособность, снизить импортозависимость, предоставит возможность отечественным производителям выход на внешние рынки.

Директор ТОО «ФитОлеум»

О.В. Сермухамедова

Начальник производства

Г. Б. Наден

Протокол №1

От «20» 03 2021 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В



### АКТ

#### опытно - промышленной апробации результатов диссертационной работы PhD докторанта Кадырбаева Г. М.

PhD докторант Кадырбаева Г. М. под руководством специалистов департамента исследований и разработок успешно провела апробацию технологии производства экстрактов из лекарственного растительного сырья листьев *Allium galanthum* и луковиц *Allium turkestanicum* в опытно - промышленных условиях на предприятии ТОО «ФитОлеум».

В результате проведенных работ по производству экстрактов установлены рациональность разработанного состава, подобраны и отработаны технологические параметры на аппарате для сушки псевдоожиженном слое FBE 5 «ACG Pharma Technologies Pvt LTD», Индия.

На основании проведенных исследований успешно проведена валидация трех опытно - промышленных серий. Отбор проб проводили в валидационном объеме, исследован худший случай, контролированы критические технологические параметры с учетом оценки рисков.

Разработаны проект опытно – промышленного технологического регламента и спецификация качества.

Полученные экстракты соответствуют требованиям ГФ РК и спецификации качества.

Руководитель департамента исследований и разработок

Супервайзер департамента исследований и разработок

PhD докторант

Кадырбаева Г. М.

«10» 03 2021 г.

# ПРИЛОЖЕНИЕ Г

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 3

Г. Есик

« 4 » 02 2022 г.

### результатов PhD диссертационной работы Кадырбаевой Г. М.

Наименование: культивирование лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* в соответствии с принципами «Good Agricultural and Collection Practice for starting materials of herbal origin» GACP (Надлежащая практика выращивания и сбора исходного сырья растительного происхождения) и внедрение производства полного цикла в рамках требований международных надлежащих практик GACP и GMP и разработка на их основе растительных субстанций фармакопейного качества.

1. Название организации: ТОО «ФитОлеум». РК. г. Есик. ул. Маметовой. 25.
2. Область применения: фармацевтическое производство
3. Основное содержание внедрения разработанного в рамках диссертационной работы: внедрение GACP, надлежащая практика культивирования и сбора лекарственного растительного сырья *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* состоит из следующих технологических стадий: подготовительные работы, идентификация, сбор посадочного материала для размножения, культивирование, заготовка, обработка, сушка, маркировка и упаковка, хранение.
4. Формы и методы внедрения: Для культивирования нами были отобраны дикорастущие виды *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum*, представляющего собой многолетнее травянистое растение семейства Луковых (*Alliaceae*). Идентификацию растений проводили сотрудники «Института ботаники и фитоинтродукции» г. Алматы. Методология проведения идентификации включала определение ботанической видовой принадлежности, составление отчета (время и место сбора). В ходе полевых исследований указанный вид растения был собран для гербарного образца. Культивирование *Allium galanthum* и *Allium turkestanicum* проводили в Алматинской области на опытно-промышленном участке фармацевтической компании ТОО «ФитОлеум».
5. Эффективность внедрения: внедрение производства полного цикла в рамках требований международных надлежащих практик GACP и GMP, обеспечит качество, эффективность и безопасность лекарственных средств, увеличит номенклатуру и конкурентоспособность, снизит импортозависимость, предоставит возможность отечественным производителям выход на внешние рынки.

Директор ТОО «ФитОлеум»



(подпись)

О.В. Сермухамедова

Руководитель ОКК

(подпись)

Протокол №

От « 4 » 02 2022 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### АКТ

on the implementation of the results of the dissertation work of Gulnara Kadyrbaeva "Pharmacognostic study of species of the genus *Allium* of the flora of Kazakhstan and prospects for their use", presenting for the degree of **Doctor of Philosophy (PhD) in the specialty 6D110400 – "Pharmacy"** at the Chair and Department of Pharmacognosy with Medicinal Plants Unit, **Medical University of Lublin (Poland)**

**1. Title of the scientific development for the implementation:** determination of antioxidant, antimicrobial, mushroom and murine tyrosinase inhibitory activities of *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum* extracts in frame of dissertation research on the theme "Pharmacognostic study of species of the genus *Allium* of the flora of Kazakhstan and prospects for their use".

**2. The name and address of the organization to be implemented:** The methods were implemented into scientific and educational program of the Department of Pharmacognosy with Medicinal Plants Garden, Medical University of Lublin, 1 Chodzki St., 20-093 Lublin (Poland) in the frame of determining antioxidant, antimicrobial, mushroom and murine tyrosinase inhibitory activities of *Allium turkestanicum* и *Allium galanthum* extracts.

**3. The area of application:** Pharmacy. The methods for obtaining extracts and biological activity were developed by specialists in the field of pharmaceutical chemistry and pharmacognosy.

**4. Efficacy of implementation:** The methods allow us to determine the optimal technology for obtaining extracts of ethyl alcohol and diethyl ether from *Allium turkestanicum* and *Allium galanthum*. And the methods establish approaches for determining the biological activity of plant raw materials in vitro. The results of the research work are presented in the following publications:

- Kadyrbayeva G., Koch W., Malm A., Sakipova Z. et al. The Phenolic Compounds Profile and Cosmeceutical Significance of Two Kazakh Species of Onions: *Allium galanthum* and *A. turkestanicum* // *Molecules*. - 2021. – Vol. 26(18). – 5491. – pp. 1-20.

Department of Pharmacognosy  
with Garden of Medicinal Plants,  
Medical University of Lublin

Associate Professor

Wirginia Kukuła-Koch

Dr hab. n. farm.  
Wirginia Kukuła-Koch  
Profesor Uczelni

*Wirginia Kukuła-Koch*

Department of Pharmacognosy  
with the Medicinal Plant Garden,  
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN  
1 Chodźki St., 20-093 Lublin, POLAND  
tel: +48 81 448 7080

10.12.2021

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ  
«ҰЛТТЫҚ МЕМЛЕКЕТТІК ҒЫЛЫМИ-  
ТЕХНИКАЛЫҚ САРАПТАМА ОРТАЛЫҒЫ»  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ  
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОЙ  
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

050026, Қазақстан Республикасы  
Алматы қ., Бөгенбай батыр көш., 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09  
Email: info@ncste.kz http://www.ncste.kz  
dir@inti.kz

050026, Республика Казахстан  
г. Алматы, ул. Бөгенбай батыра, 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09  
Email: info@ncste.kz http://www.ncste.kz  
dir@inti.kz

Исх №: 3079/15-03-02  
«20» 06 2022

**Кадырбаевой Гульнаре  
Мухаметовне**  
г. Алматы, ул. Дунентаева 10 б

№ ФЛ-0655  
16.06.2022 г.

АО «НЦГНТЭ» предоставляет информацию о наличии публикаций Кадырбаевой Гульнары Мухаметовны в научных изданиях, входящих в международные информационные ресурсы Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier).

«Molecules» (Switzerland), ISSN 1420-3049, годы охвата в Web of Science Core Collection с 1997 года по настоящее время, в Scopus с 1992, с 1996 года по настоящее время. Предметная область – химия: химия (разное), физическая и теоретическая химия, органическая химия, аналитическая химия; фармакология, токсикология и фармацевтика: лекарствоведение, поиск новых лекарств; биохимия, генетика и молекулярная биология: молекулярная медицина; биохимия и молекулярная биология; химия.

Статья Кадырбаевой Г.М.:

Kadyrbayeva Gulnara, Zagórska Justyna, Grzegorzczak Agnieszka, Gaweł-Bęben Katarzyna, Strzypek-Gomółka Marcelina, Ludwiczuk Agnieszka, Czech Karolina, Kumar Manoj, Koch Wojciech, Malm Anna, Głowniak Kazimierz, Sakipova Zuriyadda. The phenolic compounds profile and cosmeceutical significance of two kazakh species of onions: *Allium galanthum* and *a. turkestanicum* // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, Iss. 18. – Article number 5491.

Статья выявлена в базах данных Web of Science Core Collection и Scopus. В момент ее опубликования в 2021 году журнал «Molecules» имел Impact Factor за 2020 год равный 4,412, и квартиль по биохимии и молекулярной биологии – Q2; квартиль по химии, междисциплинарным трудам – Q2. Имел CiteScore за 2020 год равный 4,7, и процентиль по химии (разное) – 74; процентиль по лекарствоведению – 69; процентиль по

Бланк сопроводительных документов является формой собственности АО «НЦГНТЭ». Жалобы и претензии принимаются только в письменном виде. При отмене документа обязательно сослаться на наш № и дату.

004148

физической и теоретической химии – 67; процентиль по органической химии – 65; процентиль по аналитической химии – 64; процентиль по поиску новых лекарств – 56; процентиль по молекулярной медицине – 43.

**Вице-президент**



**М. Арапов**

*Исп. Жандаулетова Ж.  
Тел. 8 (727) 378-08-96*

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым  
Министрлігі ғылым Комитетінің  
шаруашылық жүргізу құқығындағы  
Республикалық мемлекеттік кәсіпорныны  
«Ботаника және фитоинтродукция  
институты»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И  
НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ

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

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

№ 01-08/2016

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

«03» сәуір 2019 г.

Проректор по академической деятельности  
АО «Национальный медицинский университет»  
Бальдиновой К.Ж.

**Уважаемая Уважаемая Клара Женисовна!**

В ответ на Ваше письмо об оказании содействия в идентификации дикорастущего вида растения рода: *Allium*L. для научных исследований в области фармакогностического анализа вышеуказанного образца сообщаем, что в результате идентификации выявлено, что предоставленный образец соответствует виду: *Allium galanthum* Kar.et Kir.

Генеральный директор, д.б.н.



Ситпаева Г.Т.



## ПРИЛОЖЕНИЕ И

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым  
Министрлігі ғылым Комитетінің  
шаруашылық жүргізу құқығындағы  
Республикалық мемлекеттік кәсіпорныны  
«Ботаника және фитоинтродукция  
институты»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И  
НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ

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

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

№ 01-08/107

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

«03» мае 2019 г.

Проректор по академической деятельности  
АО «Национальный медицинский университет»  
Бальдиновой К.Ж.

Уважаемая Уважаемая Клара Женисовна!

В ответ на Ваше письмо об оказании содействия в идентификации дикорастущего вида растения рода: *Allium*L. для научных исследований в области фармакогностического анализа вышеуказанного образца сообщаем, что в результате идентификации выявлено, что предоставленный образец соответствует виду: *Allium turkestanicum* Regel.

Генеральный директор, д.б.н.



Ситпаева Г.Т.

## ПРИЛОЖЕНИЕ К

### Спецификация качества на луковицы *Allium turkestanichum*

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Определение	Свежие или высушенные луковицы <i>Allium turkestanichum</i> , собранные до начала или после цветения	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Макроскопия	А) Цельное сырье представляет собой шаровидные луковицы, диаметром 1-3 см, наружные оболочки сухие сероватого цвета, бумагообразные, без заметных жилок. Внутренние чешуи белого цвета, утолщающиеся ближе к центру. Толщина открытых сочных чешуи колеблется от 0,1 до 0,3 см. Располагаются концентрическими слоями. В верхней части чешуи образуют шейку луковицы. Запах ароматный, слабо чесночный. Вкус сладковато-жгучий В) Измельченное сырье состоит из высушенных крупниц луковиц лука туркестанского беловато-кремового цвета, по текстуре напоминающий консистенцию кукурузной муки. Запах ароматный, слабо чесночный. Вкус сладковато-жгучий	ГФ РК I, т.1
В. Микроскопия	Эпидермис состоит из однослойных, компактно расположенных клеток. Эти клетки имеют неправильную форму, разные размеры и имеют кубическую форму. Эндодерма однорядная, с заметными каспарными полосками. Метаксилема, присутствует в средней части сосудистого цилиндра. Имеется интенсивный крахмал.	ГФ РК I, т.1
С. Качественные реакции Флавоноиды	С 5% спиртовым раствором алюминия хлорида Желтое окрашивание	В соответствии с НД РК
Д. Хроматографические испытания (ВЭЖХ) Флавоноиды в перерасчете на кверцетин	На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должна совпадать с временем удерживания пика кверцетина на хроматограмме раствора сравнения	ГФ РК I, т.1
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.2

Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
Общая зола	Не более 10.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.4.16
Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	Не более 2.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.1
Микробиологическая чистота	Должна соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А В 1 г лекарственного растительного сырья допускается наличие не более $10^7$ бактерий и $10^5$ дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) и не более 100 <i>Escherichia coli</i> .	ГФ РК I, т.1, 2.6.12 ГФ РК I, т. 2, 2.6.13
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями государственного органа	ГФ РК I, т.1, 2.4.8,
Радионуклиды	В соответствии с НД	Санитарные правила от 27.02.2015 г. №155 МНЭ РК  В соответствии с НД РК ГОСТ 17768-90Е
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кверцетин)	Не менее 2,0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.25
Упаковка	В пакетах из крафт- бумаги, трехслойные.	В соответствии с НД РК, ГОСТ 2228-81
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД РК
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В сухом защищенном от света месте, при температуре не более 25 °С.	В соответствии с НД РК
Срок хранения	2 года	В соответствии с НД РК
Фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД РК

## ПРИЛОЖЕНИЕ К-1

### Спецификация качества на луковицы *Allium galanthum*

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Определение	Свежие или высушенные луковицы <i>Allium galanthum</i> , собранные до начала или после цветения	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Макроскопия	А) цельное сырье представляет собой луковицы коническо-цилиндрической формы, диаметром около 1 см, прикреплены по две-три к горизонтальному корневищу. Наружные оболочки луковиц пленчатые, красновато-коричневого цвета. Сама луковица беловато-зеленого, слабо-фиолетового цвета. Вкус острый, жгуче-пряный, луковый. В) измельченное сырье состоит из измельченных частиц луковиц белого, фиолетового цвета. Вкус сладковатый, чуть пряный.	ГФ РК I, т.1
В. Микроскопия	В клеточных стенках эндодермы поперечных сечений луковиц имеется отчетливое утолщение и две метаксилемы. Сердцевина состоит из паренхиматозных клеток, расширяющиеся внутрь.	ГФ РК I, т.1
С. Качественные реакции Флавоноиды	С 5% спиртовым раствором алюминия хлорида Желтое окрашивание	В соответствии с НД РК
Д. Хроматографические испытания (ВЭЖХ) флавоноиды в перерасчете на кемферол	На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должна совпадать с временем удерживания пика кемферол на хроматограмме раствора сравнения	ГФ РК I, т.1
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.2
Потеря в массе при Высушивании	Не более 12.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
Общая зола	Не более 10.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.4.16

Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	Не более 2.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.1
Микробиологическая чистота	Должна соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А В 1 г лекарственного растительного сырья допускается наличие не более $10^7$ бактерий и $10^5$ дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) и не более 100 <i>Escherichia coli</i> .	ГФ РК I, т.1, 2.6.12 ГФ РК I, т. 2, 2.6.13
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями государственного органа	ГФ РК I, т.1, 2.4.8,
Радионуклиды	В соответствии с НД	Санитарные правила от 27.02.2015 г. №155 МНЭ РК В соответствии с НД
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кемпферол)	Не менее 3.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.25
Упаковка	В пакетах из крафт- бумаги, трехслойные.	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В сухом защищенном от света месте, при температуре не более 25 °С.	В соответствии с НД
Срок хранения	2 года	В соответствии с НД
Фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД

## ПРИЛОЖЕНИЕ К-2

### Спецификация качества на листья *Allium galanthum*

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Определение	Свежие или высушенные листья <i>Allium galanthum</i> , собранные до начала цветения	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Макроскопия	А) листья полые, цилиндрической формы заостренные в верхнем конце, диаметр листа 0,5-1,8 см, длина от 21 до 29 см. Листья темно-зеленые с густым восковым налетом, нет резкого запаха. Вкус острый, жгуче-пряный. В) измельченное сырье состоит из высушенных частей лука болотно-зеленого цвета. Запах ароматный, специфический. Вкус сладковато-пряный	ГФ РК I, т.1
В. Микроскопия	Эпидермальные клетки ромбовидной формы. Антиклинальные стенки изогнутые. Три слоя клеток палисадной ткани. Жилкование листьев параллельное, закрытого типа. Жилки сходятся и сливаются у верхушки листа. Проводящие пучки располагаются двумя рядами, из которых верхний представлен только мелкими пучками паренхимы.	ГФ РК I, т.1
С. Качественные реакции Флавоноиды	С 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида Интенсивно-желтое окрашивание	В соответствии с НД РК
Д. Хроматографические испытания (ВЭЖХ) флавоноиды в перерасчете на кемферол	На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должна совпадать с временем удерживания пика кемферол на хроматограмме раствора сравнения	ГФ РК I, т.1
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.2
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
Общая зола	Не более 10.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.4.16
Зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте	Не более 2.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.1
Микробиологическая чистота	Должна соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А	ГФ РК I, т.1, 2.6.12 ГФ РК I, т. 2, 2.6.13

	В 1 г лекарственного растительного сырья допускается наличие не более $10^7$ бактерий и $10^5$ дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) и не более 100 <i>Escherichia coli</i> .	
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями государственного органа	ГФ РК I, т.1, 2.4.8,
Радионуклиды	В соответствии с НД	Санитарные правила от 27.02.2015 г. №155 МНЭ РК  В соответствии с НД РК ГОСТ 17768-90Е
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кемпферол)	Не менее 3.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.25
Упаковка	В пакетах из крафт- бумаги, трехслойные.	В соответствии с НД РК, ГОСТ 2228-81
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД РК
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В сухом защищенном от света месте, при температуре не более 25 °С.	В соответствии с НД РК
Срок хранения	2 года	В соответствии с НД РК
Фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД РК

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л

### Результаты испытаний стабильности лекарственного растительного сырья лукович *Allium turkestanicum*

Партия: ЛМСЭ2019												
Дата начала испытания: 03.2019 г												
Дата окончания испытания: 03.2021 г												
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.								
				0	3	6	9	12	18	24	т.д.	
Описание	Температура: (25±2) °С. Относительная влажность: (60±5)%	ГФ РК I, т.1	В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.		
Идентификация: А. Макроскопия		ГФ РК I, т.1	А) В соответствии со спецификацией В) В соответствии со спецификацией С) В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси		ГФ РК I, т. 1, 2.8.2	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	- - 0.20	- - 0.20	- - 0.20	- - 0.21	0.02 - 0.21	0.02 - 0.21	0.3 - 0.21		
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т. 1, 2.2.32	Не более 12.0 %	8.2	8.3	8.2	8.3	8.2	8.3	8.2		
Общая зола		ГФ РК I, т. 1, 2.4.16	Не более 10.0 %	7.1	7.2	7.1	7.2	7.1	7.2	7.1		
Микробиологическая чистота		ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 А, 2.6.12, 2.6.13	В соответствии со спецификацией	Соответ.		Соответ.		Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кверцетин)		В соответствии с НД	Не менее 2,0 %	2.7	2.6	2.7	2.6	2.6	2.5	2.6		



## ПРИЛОЖЕНИЕ Л-1

### Результаты испытаний стабильности лекарственного растительного сырья луковиц *Allium galanthum*

Партия: ЛМСЭ2019 Дата начала испытания: 03.2019 г Дата окончания испытания: 03.2021 г												
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.								
				0	3	6	9	12	18	24	т.д	
Описание	Температура: (25±2) °С.  Относительная влажность: (60±5)%	ГФ РК I, т.1	В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.		
Идентификация:		ГФ РК I, т.1	А) В соответствии со спецификацией В) В соответствии со спецификацией С) В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.		
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси		ГФ РК I, т. 1, 2.8.2	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	- - 0.019	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т. 1, 2.2.32	Не более 12.0 %	7.4	7.4	7.4	7.5	7.4	7.6	7.4		
Общая зола		ГФ РК I, т. 1, 2.4.16	Не более 10.0 %	6.8	6.8	6.8	6.9	6.8	6.7	6.8		
Микробиологическая чистота		ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 А, 2.6.12, 2.6.13	В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кемпферол)		В соответствии с НД	Не менее 3.0 %	3.6	3.6	3.6	3.7	3.6	3.6	3.5		

## ПРИЛОЖЕНИЕ Л-2

### Результаты испытаний стабильности лекарственного растительного сырья листьев *Allium galanthum*

				Партия: ЛМСЭ2019 Дата начала испытания: 03.2019 г Дата окончания испытания: 03.2021 г							
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.							
				0	3	6	9	12	18	24	т.д
Описание	Температура: (25±2) °С. Относительная влажность: (60±5)%	ГФ РК I, т.1	В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Идентификация: А. Макроскопия		ГФ РК I, т.1	А) В соответствии со спецификацией В) В соответствии со спецификацией С) В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Посторонние примеси – частиц, почерневших - органической примеси – минеральной примеси		ГФ РК I, т. 1, 2.8.2	Не более 2 % Не более 0.5 % Не более 0.5 %	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	0.12 - 0.010	
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т. 1, 2.2.32	Не более 12.0 %	5.3	5.3	5.3	5.4	5.3	5.4	5.3	
Общая зола		ГФ РК I, т. 1, 2.4.16	Не более 10.0 %	5.1	5.1	5.2	5.1	5.2	5.1	5.2	
Микробиологическая чистота		ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 А, 2.6.12, 2.6.13	В соответствии со спецификацией	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	
Количественное определение Флавоноидов (в пересчете на кемпферол)		В соответствии с НД	Не менее 3.0 %	4.2	4.2	4.2	4.1	4.0	4.0	4.0	

## ПРИЛОЖЕНИЕ М

### Отчет о валидации опытно- промышленных серии экстрактов

Критические стадии	Параметры		Регламентируемые нормы	Результаты		
				Серия 1	Серия 2	Серия 3
Подготовка сырья	Масса сырья		10кг± 0.05 кг	10кг	10кг	10кг
	Размер частиц	Луковица <i>A. turkestanicum</i>	3 – 5 мм	3.5	3.6	3.5
		Листья <i>A. galanthum</i>	3 – 5 мм	4.0	4.1	4.3
		Луковица <i>A. galanthum</i>	3 – 5 мм	3.4	3.5	3.3
Приготовление экстрагента	Масса (объем) используемого сырья		10 кг± 0.05 кг	10 кг	10 кг	10 кг
	Время смешивания		30 мин	30 мин	30 мин	30 мин
	Скорость смешивания		15 об/мин	15 об/мин	15 об/мин	15 об/мин
	Концентрация этанола		49-51 %	50%	50%	50%
Извлечения из ЛРС	Температура экстракции		от 20 до 25 °С	20 °С	25 °С	23 °С
	Частота ультразвука		25-35 Гц	25 Гц	25 Гц	25 Гц
	Время ультразвуковой обработки		30-50 мин	30 мин	40 мин	50 мин
	Идентификация биологически активных веществ (БАВ)		Должен соответствовать требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
	Концентрация спирта этилового		Должен соответствовать требованиям	50%	50%	50%
Отстаивание извлечения	Количественное определение		Должен соответствовать требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
	Температура при отстаивании		Не выше 8 °С	8 °С	8 °С	8 °С
	Время отстаивания		72 ч	72 ч	72 ч	72 ч
Фильтрация извлечения	Размер пор фильтров		1.0 мкм; 0.5 мкм; 0.65/0.45 мкм	0.45 мкм	0.45 мкм	0.45 мкм
	Качество полупродукта		Должен соответствовать требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям

Удаление экстрагента	Температура		Не выше 45 °С	40°С	43°С	45°С
	Скорость вращения		70-90 об/мин	90 об/мин	80 об/мин	70 об/мин
	Давление		97 мкбар	97 мкбар	97 мкбар	97 мкбар
Измельчение	Размер частиц		3.0 – 5.5 мкм	4.2мкм	4.2мкм	4.2мкм
Первичная упаковка	Объем заполнения упаковки	Вначале В середине В конце	10 г ± 5 %	10.0 г	10.0 г	10.0 г
	Комплектность	Вначале В середине В конце	Должен соответствовать требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям
	Качество маркировки	Вначале В середине В конце	Должен соответствовать требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям

## ПРИЛОЖЕНИЕ Н

### Результаты испытаний стабильности экстракта сухого лукавиц лука туркестанского

Упаковка: в соответствии с проектом НД										
										Партия: ЛТСЭ2019 Дата начала испытания: 03.2019 г Дата окончания испытания: 03.2021 г
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура: (25±2) °С.	ГФ РК I, т.1	Гигроскопичный кристаллический порошок светло желтого до темно-желтого цвета с характерным чесночным запахом	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Идентификация А. Качественные реакции на флавоноиды	Относительная влажность: (60±5)%	В соответствии с НД	Качественная реакция с 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида, желтое окрашивание	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
В. ВЭЖХ - флавоноиды			Время удерживания кверцетина	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5 %	2.3	2.3	2.5	2.4	2.5	2.5	2.5
Микробиологическая кислота		ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А. Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.	Соответ.		Соответ.		Соответ.		Соответ.

			Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г. Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.							
Количественное определение: флавоноидов (в пересчете на кверцетин)		ГФ РК I, т.1, 2.2.25	Не менее 2,0 %	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.6	2.6

## ПРИЛОЖЕНИЕ Н 1

### Результаты испытаний стабильности экстракта сухого лукавиц лука молочнокветного

Партия: ЛМСЭ2019 Дата начала испытания: 03.2019 г Дата окончания испытания: 03.2021 г										
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температу́ра: (25±2) °С. Относительная влажность: (60±5)%	ГФ РК I, т.1	Гигроскопичный кристаллический порошок от светло желтого до темно-желтого цвета с характерным луковым запахом	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Идентификация А. Качественные реакции на флавоноиды		В соответствии с НД	Качественная реакция с 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида, желтое окрашивание	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
В. ВЭЖХ - флавоноиды			Время удерживания кемпферола	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5 %	3.1	3.1	3.2	3.2	3.4	3.6	3.7
Микробиологическая кислота		ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А.	Соответ.				Соответ.		Соответ.

			<p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г.</p> <p>Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.</p>							
Количественное определение - флавоноидов (в пересчете на кемпферол)	ГФ РК I, т.1, 2.2.25	Не менее 3.0 %	3.43	3.41	3.39	3.40	3.43	3.44	3.42	



## ПРИЛОЖЕНИЕ Н 2

### Результаты испытаний стабильности экстракта сухого листьев лука молочнокветкового

Упаковка: в соответствии с проектом НД				Партия: ЛМЛСЭ2019 Дата начала испытания: 03.2019 г Дата окончания испытания: 03.2021 г						
Показатели качества	Условия исследований	Метод исследований	Спецификация нормы отклонения	Периоды контроля, мес.						
				0	3	6	9	12	18	24
Описание	Температура: (25±2) °С.  Относительная влажность: (60±5)%	ГФ РК I, т.1	Гигроскопичный кристаллический порошок горчичного цвета, с характерным луковым запахом	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Идентификация А. Качественные реакции на флавоноиды		В соответствии с НД	Качественная реакция с 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида, желтое окрашивание	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
В. ВЭЖХ - флавоноиды			Время удерживания кемпферола	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.	Соответ.
Потеря в массе при высушивании		ГФ РК I, т.1, 2.2.32	Не более 5 %	3.2	3.3	3.2	3.3	3.3	3.4	3.4
Микробиологическая кислота		ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4А	Соответ.					Соответ.	

			<p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г.</p> <p>Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г. Отсутствие <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.</p>							
Количественное определение - флавоноидов (в пересчете на кемпферол)		ГФ РК I, т.1, 2.2.25	Не менее 3 %	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6

## ПРИЛОЖЕНИЕ О

### Спецификация качества экстракта луковиц лука туркестанского сухого

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Гигроскопичный кристаллический порошок светло желтого до темно-желтого цвета с характерным чесночным запахом	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Качественная реакция на флавоноиды	Появляется желтое окрашивание	В соответствии с НД
В. ВЭЖХ - флавоноиды	Время удерживания кверцетин 29,6 мин	В соответствии с НД
Остаточное количество органических растворителей (растворители)	Не более 0,5 %	ГФ РК I, т.1, 5.4 (2.4.24)
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	ГФ РК I, т.1, 2.2.32
Тяжелые металлы	Не более 10 млн-1	ГФ РК I, т.1, 2.4.8, метод А
Масса содержимого контейнера	Не менее 10 г	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г.</p> <p>Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамтрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие Escherichia coli, Staphylococcus aureus в 1 г.</p>	ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13
Количественное определение: флавоноидов в пересчете на кверцетин	Не менее 2,0 %	ГФ РК I, т.1, 2.2.25
Упаковка	По 10 г препарата в стеклянные флаконы для лекарственных средств из коричневого стекла класса I (ГФ РК I, т. 1, 3.2.1) с винтовой горловиной	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90
Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	В соответствии с НД
Срок хранения	2года	В соответствии с НД

Основное фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД РК
-------------------------------------	-----------------------------------	------------------------

## ПРИЛОЖЕНИЕ О-1

### Спецификация качества экстракта луковиц молочнокветного сухого

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Гигроскопичный кристаллический порошок от светло желтого до темно-желтого цвета с характерным луковым запахом	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Качественная реакция на флавоноиды	Появляется зеленовато-желтое окрашивание	В соответствии с НД
В. ВЭЖХ - флавоноиды	Время удерживания кемпферола 35.5 мин	В соответствии с НД
Остаточное количество органических растворителей (растворители)	Не более 0,5 %	ГФ РК I, т.1, 5.4 (2.4.24)
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	ГФ РК I, т.1, 2.2.32
Тяжелые металлы	Не более 10 млн-1	ГФ РК I, т.1, 2.4.8, метод А
Масса содержимого контейнера	Не менее 10 г	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г.</p> <p>Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие Escherichia coli, Staphylococcus aureus в 1 г.</p>	ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13
Количественное определение: флавоноидов в пересчете на кемпферол	Не менее 3.0 %	ГФ РК I, т.1, 2.2.25
Упаковка	По 10 г препарата в стеклянные флаконы для лекарственных средств из коричневого стекла класса I (ГФ РК I, т. 1, 3.2.1) с винтовой горловиной	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90
Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	В соответствии с НД
Срок хранения	2 года	В соответствии с НД

Основное фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД РК
-------------------------------------	-----------------------------------	------------------------

## ПРИЛОЖЕНИЕ О-2

### Спецификация качества экстракта листьев лука молочнокветного сухого

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Гигроскопичный кристаллический порошок горчичного цвета, с характерным луковым запахом	ГФ РК I, т.1
Идентификация: А. Качественная реакция на флавоноиды	Появляется желтое окрашивание	В соответствии с НД
В. ВЭЖХ - флавоноиды	Время удерживания кемпферола 35.5 мин	В соответствии с НД
Остаточное количество органических растворителей (растворители)	Не более 0.5 %	ГФ РК I, т.1, 5.4 (2.4.24)
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	ГФ РК I, т.1, 2.2.32
Тяжелые металлы	Не более 10 млн <sup>-1</sup>	ГФ РК I, т.1, 2.4.8, метод А
Масса содержимого контейнера	Не менее 10 г	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В.</p> <p>Общее число аэробных бактерий – не более 1000 в 1 г.</p> <p>Общее число грибов – не более 100 мл в 1 г.</p> <p>Не более 100 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>Отсутствие Salmonella в 10 г.</p> <p>Отсутствие Escherichia coli, Staphylococcus aureus в 1 г.</p>	ГФ РК I, т.1, 2.6.12, 2.6.13
Количественное определение: флавоноидов в пересчете на кемпферол	Не менее 3.0%	ГФ РК I, т.1, 2.2.25
Упаковка	По 10 г препарата в стеклянные флаконы для лекарственных средств из коричневого стекла класса I (ГФ РК I, т. 1, 3.2.1) с винтовой горловиной	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90
Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	В соответствии с НД

Срок хранения	2 года	В соответствии с НД
Основное фармакологическое действие	Противомикробное, антиоксидантное	В соответствии с НД РК