

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**
АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ГБОУ ВПО Минздрава России)

На правах рукописи

ХАРЛАМПОВИЧ ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА

**ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ДОННИКА
ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРАВЫ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА
ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

фармацевтических наук

Научный руководитель –

доктор фармацевтических наук,

профессор Л.М. Федосеева

Барнаул – 2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГМУ – Алтайский государственный медицинский университет

БАС – биологически активные соединения

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – Государственная фармакопея

ГХ - газовая хроматография

ЛРС – лекарственное растительное сырье

НПКО – ниже предела количественного определения

ПКО – предел количественного определения

ПУ – перемешивающее устройство

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрический метод

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – свет – ультрафиолетовый свет

УЗВ – ультразвуковая ванна

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Глава I. Обзор литературы.....	10
1.1. Ботанические сведения о доннике лекарственном. История рода, ресурсы.....	10
1.2. Культивирование и продуктивность.....	16
1.3. Сведения о химическом составе донника лекарственного.....	18
1.4. Изучение и использование донника лекарственного в медицине	20
1.5. История применения донника лекарственного травы в народной медицине и народном хозяйстве.....	23
Выводы.....	25
Глава II. Объекты и методы исследования.....	27
Глава III. Фитохимическое изучение донника лекарственного травы и экстракта сухого.	50
3.1. Качественный анализ БАС.....	50
3.2. Идентификация и количественное определение БАС.	54
3.2.1. Флавоноиды.....	54
3.2.2. Кумарины.....	72
3.2.3. Сапонины.....	93
3.2.4. Дубильные вещества.....	96
3.2.5. Водорастворимые полисахариды.....	97
3.2.6. Аминокислоты.....	100
3.2.7. Липофильные вещества.....	102

Выводы	112
Глава IV. Изучение острой токсичности и специфической активности донника лекарственного травы и экстракта сухого.....	115
4.1. Изучение острой токсичности	115
4.2. Изучение специфической активности (влияние на гемостаз).....	116
Выводы.....	119
Глава V. Стандартизация донника лекарственного травы.....	120
5.1. Определение подлинности	120
5.1. 1. Макроскопический анализ.....	120
5.1.2. Микроскопический анализ.....	121
5.2. Определение показателей доброкачественности.....	128
5.3. Определение тяжелых металлов.....	131
5.4. Определение экстрактивных веществ	132
5.5. Изучение динамики накопления БАС и определение сроков заготовки растительного сырья	137
5.6. Определение сроков хранения донника лекарственного травы и экстракта сухого.....	139
Выводы.....	140
Общие выводы.....	143
Библиографический список.....	146
Приложения.....	159

Введение

Актуальность проблемы. Интерес к фитотерапии последние десятилетия неизменно растет. Минимум побочных эффектов и возможность длительного приема растительных препаратов является их основным преимуществом. Известно, что фитопрепараты применяются для профилактики и на ранних стадиях заболеваний для усиления, поддержания лечебного эффекта и снижения побочных действий в комбинированной фармакотерапии.

Перспективным для создания фитопрепаратов растением является донник лекарственный, широко распространенный на территории Алтайского края и хорошо развивающийся в культуре. Обладает антикоагулянтным, мягким успокаивающим, кардиотоническим действием и способствует восстановлению эндотелия кровеносных сосудов [46,71].

Несмотря на разнообразие фармакологических свойств, на сегодняшний день на аптечном рынке отсутствуют лекарственные препараты на основе донника лекарственного травы. Донник лекарственный не включен в отечественную фармакопею. В действующей нормативной документации – ГОСТ 14101-69 «Трава донника лекарственного» имеющиеся сведения недостаточны для полной диагностики сырья и не соответствуют современным требованиям, предъявляемым к нормативным документам. Методика определения свободного кумарина методом ВЭЖХ, примененная в Европейской фармакопее, недостаточно объективна, т.к. не учитывает содержащийся в растительном сырье гликозид кумарина (мелилтозид), обладающий биологической активностью аналогичной кумарину [99]. Существует необходимость в оптимизации аналитических методов контроля и совершенствовании требований к качеству растительного сырья. Недостаточно изучен фитохимический состав БАС растительного сырья, из-за различия подходов к изучению, имеющиеся сведения, особенно по количественному содержанию индивидуальных соединений, требуют уточнения с применением

специфичных методов. Данные по фитохимическому исследованию донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края в доступной литературе нами не обнаружены.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось фитохимическое изучение донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края, установление специфической активности, разработка нормативной документации на растительное сырье и экстракт сухой на его основе. Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить состав биологически активных соединений донника лекарственного травы.
2. Усовершенствовать методики выделения, идентификации и количественного определения биологически активных соединений растительного сырья и экстракта сухого.
3. Установить показатели доброкачественности, сроки годности растительного сырья и экстракта сухого и сроки заготовки ЛРС.
4. Изучить острую токсичность и специфическую активность экстракта сухого.
5. Разработать проекты ФСП «Донника лекарственного трава» и «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок».

Научная новизна. Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края. В промышленных условиях получен и изучен донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок. Впервые изучен химический состав донника лекарственного травы, произрастающего в Алтайском крае. Установлено, что комплекс БАС состоит из кумаринов, флавоноидов, дубильных веществ, тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, липофильных веществ. Выделены и идентифицированы индивидуальные соединения: кумарин, о-кумаровая кислота, мелилотовая кислота, галловая

кислота, мирицетин, кемпферол, кверцетин, изорамнетин, формонетин, биоханин А, витамин Е, лютеин, β -каротин, β -ситостерин, фруктоза, галактоза, арабиноза, глюкоза, рамноза, аспарагиновая кислота, глютамин, треонин, валин, аргинин, изолейцин, лейцин, линоленовая, линолевая, пальмитиновая кислоты и др. Показана целесообразность стандартизации донника лекарственного травы по содержанию суммы кумаринов методом ВЭЖХ, разработана и валидирована методика количественного определения.

Практическая значимость работы. Подготовлены к рассмотрению проекты ФСП: «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* цельная и измельченная «ангро», «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок». Проведенные исследования являются основой для дальнейшей разработки лекарственного препарата на основе донника лекарственного травы.

Степень внедрения. Теоретические положения и результаты экспериментальных исследований используются в учебном процессе кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Алтайского государственного медицинского университета; используются на фармацевтическом предприятии ЗАО «Эвалар» для контроля качества растительного сырья и экстракта сухого донника лекарственного травы. Акт внедрения в работу ЗАО «Эвалар» 10.02.2014 г.

Апробация полученных результатов. Основные материалы диссертации обсуждены на научно–практических конференциях «Актуальные проблемы фармации» (г. Барнаул, 2011, 2012); «Молодежь – Барнаулу» (г. Барнаул, 2010, 2011); «Молодые ученые и студенты АГМУ» (г. Барнаул, 2011, 2012); на 76 Всероссийской научной конференции с международным участием «Молодежная наука и современность» (г. Курск, 2011); на II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Ученые Урала и Сибири - развитие отечественной фармации: от

синтеза до инновационных лекарственных средств» (г. Новосибирск, 2011); на Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы строения новых лекарственных средств» (г. Харьков, 2012); на VI Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (г. Барнаул, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, три из которых в изданиях, рецензируемых ВАК.

Личное участие автора в получении результатов. Автор является основным исполнителем исследований, публикаций по теме диссертации и всех глав диссертации. При выполнении работы автор освоила и самостоятельно выполнила все методики исследования, провела обработку данных с использованием современных статистических методов.

Связь задач исследования с проблемами фармацевтических наук.

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (номер государственной регистрации 01200600351) как фрагмент комплексной НИР фармацевтического факультета «Изучение природных ресурсов Алтая, пути их рационального использования и совершенствование лекарственного обеспечения населения» (научный руководитель комплексной НИР д-р мед. наук, профессор В.М. Брюханов). Тема утверждена на заседании научно-координационного совета ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России (протокол №1 от 21.01.2010).

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты фитохимического, фармакогностического исследования донника лекарственного травы;
- результаты фитохимического исследования донника лекарственного травы экстракта сухого.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 197 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 3 глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 38 таблицами и 53 рисунками. Библиографический указатель включает 127 источников литературы, из них 36 зарубежных.

Во введении изложена актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, обозначена новизна и практическая значимость проведенных исследований; описаны положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы: характеристику вида *Melilotus officinalis*, его распространение в РФ и за рубежом; ресурсные запасы; данные по химическому составу и использованию вида в научной и народной медицине; фармакологические исследования; номенклатуру лекарственных препаратов на основе донника лекарственного травы.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследования.

В третьей главе приведены результаты фитохимических исследований кумаринов, флавоноидов, дубильных веществ, фенолокислот, полисахаридов, сапонинов, аминокислот, липофильных соединений и др., методики стандартизации донника лекарственного травы и экстракта сухого по содержанию БАС, внесенные в проекты ФСП на данное сырье.

В четвертой главе изложены результаты фармакологических исследований донника лекарственного травы и экстракта сухого.

В пятой главе приведены результаты морфологического, микроскопического анализа, установленные товароведческие показатели сырья.

В приложении представлены результаты изучения сроков годности сырья, проекты ФСП, основные документы, подтверждающие внедрение результатов диссертационной работы.

ГЛАВА I

Обзор литературы

1.1. Ботанические сведения о доннике лекарственном. История рода, ресурсы.

Донник лекарственный *Melilotus officinalis* (L.) Pall., семейство бобовые – Leguminosae (Fabaceae). Родовое название происходит от греческого «melilotos»: «meli» - мед, «lotos» - название многих кормовых трав. Растение в период цветения имеет характерный сладкий запах и привлекает пчел [94,107].

Семейство бобовые (мотыльковые) – одно из самых крупных семейств цветковых растений: около 700 родов и свыше 17 тысяч видов [97]. Бобовые близки к камнеломковым, и вероятно, происходят от их предков. По широте распространения уступают только злакам и составляют большую часть флоры тропиков и умеренного пояса (10-20% в травостоях лесной и степной зон). Представители бобовых адаптированы к самым разнообразным природным условиям и являются эдификаторами во многих растительных сообществах. В России произрастает около 65 родов и свыше 1800 видов, преимущественно в южных районах [4].

Систематизацией рода *Melilotus* в разное время занимались такие исследователи, как Морисон (1680), Турнефор (1700), Миллер (1754), Серенж (1825), Шульц (1901) [29]. Из отечественных флористов наиболее известен Суворов В.В., сделавший большой вклад в изучение биологии донника [25].

Донник лекарственный - двулетнее травянистое растение со стержневым разветвленным корнем и прямыми стеблями высотой 0,5-1,5 м и 1-2 см в диаметре, слегка ребристыми и тонко продольнобороздчатыми, внутри полыми (рис.1). Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый. Прилистники ланцетовидные, заостренные, цельные, редко (у нижних листьев) с

1-2 зубчиками. Листья очередные, черешковые, тройчатые; верхний листочек на более длинном черешке, два боковых – почти сидячие. Листочки нижних листьев продолговато-обратнояйцевидные, листочки верхних листьев более узкие, продолговатые; те и другие с 10-13 неравными зубчиками, снизу коротко опушенные. Цветочные кисти - пазушные, длиной 4-10 см, густые с 30-70 поникающими цветками, длиной 5-7 мм, на цветоножках длиной до 1,5 мм. Чашечка длиной около 2 мм, до половины надрезана на продолговато-ланцетовидные доли. Венчик желтый из 5 неодинаковых лепестков, флаг почти равен крыльям, которые немного длиннее лодочки; завязь голая, продолговатая, на короткой ножке; столбик слегка изогнутый, обычно с 6-7 (редко 4 или 8) семязачатками [57, 33].



Рис. 1. Внешний вид донника лекарственного *Melilotus officinalis* L., семейство бобовые (Fabaceae).

Бобы длиной 3 – 4 мм, шириной 2 мм и толщиной около 1,5 мм, овальные, вверху притупленные, с шиловидным остроконечием, на короткой

ножке, сероватые, голые, с немногими поперечными морщинками, анастомозирующими между собой. Семена яйцевидные, зеленовато-желтые, гладкие или мелкобугорчатые, длиной 1,6-2,2 мм. Запах ароматный, специфический. Вкус извлечения горьковатый, иногда горьковато-сладкий. Размножается донник лекарственный семенами [5,60,37].

Донник лекарственный имеет евроазиатский тип ареала. Произрастает в Европе и Средней Азии, Северной Африке, Северной Америке и Австралии. В России распространен по всей территории европейской части (кроме северных и северо-восточных районов), в Западной Сибири и Центральной Азии. Северная граница ареала идет вдоль южного и восточного берега Ладожского озера, огибая с севера оз. Онежское, и проходит близ северо-западнее Сыктывкара, обходит с севера город Ухта, после чего резко спускается к югу, пересекает в среднем и нижнем течении Вятку и южнее Перми выходит к Уральскому хребту [10]. В Западной Сибири произрастает в лесостепной и степной зонах (Барабинская и Кулундинская степи), продвигаясь по долине р. Обь на север. В Алтайском крае встречается по всей территории; отсутствует лишь в Салаире. На востоке распространен до приенисейских островных степей и Каннской лесостепи. Как заносное растение изредка встречается в Прибайкалье. На юге распространяется до границы с Казахстаном, заходя на территорию этой республики с северо-запада по левобережью Ишима, огибает пустынные районы северного Прикаспия и пересекает реку Урал. Произрастает в республиках Средней Азии, за исключением высокогорных районов Памиро-Алая, Тянь-Шаня и опустыненных районов, куда проникает только по долинам рек и оазисам. Встречается также в предгорьях Копетдага. На Кавказе растет почти повсюду—от низменности до среднего горного пояса (рис. 2) [3].

Донник лекарственный — мезоксерофитное растение степной и лесостепной зон. Благодаря хорошо развитой корневой системе, проникающей на глубину до 2 м, может добывать воду из глубоких горизонтов почвы. Засухоустойчив и холодостоек [1]. Хорошо растет на черноземах, каштановых,

дерново-подзолистых и серых лесных почвах, но может поселяться и на малогумусных, каменистых, суглинистых и песчаных почвах. Плохо переносит избыточное увлажнение.



Рис. 2. Ареал распространения *Melilotus officinalis*

В естественном растительном покрове встречается рассеянно, чаще на нарушенных участках, на суходольных и степных лугах (иногда солонцеватых). Рассеянно растет в степях, разреженных светлых лесах, по лесным опушкам, сухим склонам балок и оврагов. Является неспецифическим сорным растением, иногда становится даже злостным сорняком [57]. На молодых залежах иногда образует заросли площадью в несколько десятков и даже сотен гектаров. Часто встречается в лесополосах, особенно молодых, на пустырях и по обочинам дорог. Хорошее развитие донника наблюдается при достаточном количестве весенних осадков, способствующих прорастанию его семян и укоренению всходов. В первый год жизни развивает лишь зеленую массу и корневую систему, отмирающую осенью [62]. Перезимовывает корневая шейка с почками возобновления, способными переносить даже в бесснежные зимы морозы до -48° . На второй год отрастание донника лекарственного начинается рано весной. Цветение растянуто, продолжается примерно 2 месяца. Цветет с июня по сентябрь, плоды созревают с июля до поздней осени [61, 7].

Характеристика других видов донника, произрастающих на территории Алтайского края и их морфологические отличия от донника лекарственного

На территории Алтайского края вместе с донником лекарственным произрастают другие виды донника: *M. albus* Desr., *M. dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers., *M. suaveolens* Ldb [45, 47, 42]. Морфологические отличия разных видов донника представлены в таблице 1 [7, 84].

***Melilotus albus* Desr.** – донник белый - двулетнее травянистое растение высотой 100 - 230 см с прямым голым стеблем. Листья перистые с немногочисленными (не более 13 с каждой стороны) зубчиками. Листочки нижних листьев обратнойцевидно – ромбические или клиновидные, с немногими (8-12 с каждой стороны) зубчиками. Прилистники линейно-нитевидные, шиловидные, при основании расширенные, цельнокрайние, иногда лишь у нижних листьев зубчатые. Цветки 4-5 мм, белые, мотылькового типа, собраны в длинные пазушные густые кисти. Бобы яйцевидные, голые, сетчато-морщинистые. Трава обладает ароматическим запахом и солоновато-горьковатым вкусом. Солевыносливое, засухоустойчивое растение, хороший медонос. Иногда применяется в народной медицине для лечения ран, при лихорадке, простуде и как мочегонное средство. Произрастает во всех районах Алтайского края.

***Melilotus dentatus* Pers.** - донник зубчатый - двулетнее травянистое растение высотой до 75 см. Листья крупные, узколанцетовидные с многочисленными (20 – 40 с каждой стороны) шиповидными зубчиками и листовидными ланцетными прилистниками, зубчатыми при основании. Цветки бледно-желтые. Встречается, в основном, в степной и лесостепной зонах края, редко - на западе Алтайского края (озеро Колыванское) и в долине реки Чарыш. Лечебного значения не имеет. Медонос.

***Melilotus suaveolens* Ldb.** – донник душистый – двулетнее травянистое растение, более низкорослое, со светло-желтыми цветками, более мелкими,

неясно сетчато-морщинистыми бобами, сильным ароматом. Произрастает в степях и остепненных лугах. На территории края изредка встречается в Баевском, Бийском, Благовещенском, Змеиногорском, Красногорском районах. Может применяться наравне с донником лекарственным. Медонос. В таблице 1 приведены отличия видов донника по Суворову В.В. (1962) [73].

Таблица 1

Видовые отличия двулетнего донника *Melilotus Adans*

Вид Органы	Донник белый	Донник лекарственный	Донник душистый	Донник зубчатый
Цветки	Белые мелкие (4-5 мм)	Желтые мелкие поникающие	Бледно-желтые, крупные (5-8 мм), цветоножка короткая (1-2 мм), часто красная	Бледно-желтые мелкие (3-6 мм) поникающие
Семена	Желтые овальные	Яйцевидные зеленовато- желтые гладкие и мелкобугор- чатые	Мелкие желто-зе- леные широко- овальные без рисунка	Мелкие округлые зеленовато-желтые или коричневые
Плоды	Бобы яйцевидные голые сетчато- морщинистые	Бобы поперечно- морщинистые с неосыпавшимся пестиком	Бобы мелкие, серые, сетчато- морщинистые с острым прямым клювом	Бобы округлые с коротким носиком и килем, голые, сетчатоморщи- нистые
Листоч- ки	Обратнойце - видноромбичес- кие, верхних - узкие зубчатые	Нижних листьев удлиненно- обратнойцевид- ные, верхних - узкие, зубчатые.	Нижних листьев округлообратно- яйцевидные, верхних - широко- овальные неясно- мелкозубчатые	Нижних листьев продолговато- эллиптические, верхних – линейно- овальные сильно игльчатозубчатые
Прили- стники	Линейно- нитевидные цельнокрайние	Ланцетовидные, заостренные, цельнокрайние	Шиловидные	Ланцетовидные широкие
Соцве- тие	Кисть удлиненно- веретеновидная с 40-150 цветками	Кисть короткая плотная с 40-70 цветками	Кисть короткая плотная с 30-50 цветками	Кисть короткая плотная с 30-70 цветками
Стебель	Прямой голый ветвистый, 100- 230 см	Прямой слегка ребристый ветвистый, 50-150 см	Прямой травянистый светло-зеленый слабоветвистый, 90-110 см	Прямой травянистый полый с длинными боковыми ветвями, 30-90 см

Таким образом, согласно И.М. Красноборову, В.В. Суворову и др. основными отличительными признаками *M. Officinalis* L., *M. albus* Desr., *M. dentatus* (Waldst. et Kit.) Pers., *M. suaveolens* Ldb. являются морфологические отличия в строении листьев, плодов и цветков.

1.2. Культивирование и продуктивность

Известно, что на территории России донник начали выращивать в 19 веке, как кормовое растение. Большой вклад по введению донника в культуру был сделан Н.А. Мелешко (1929, 1934) на Носовской сельскохозяйственной опытной станции. Посевы донника в широкой практике сельскохозяйственного производства появились в 30 годах 20 столетия. Первые партии семян были завезены из США [25].

В научных учреждениях Алтайского края на протяжении многих лет занимались изучением условий возделывания и агротехнических способов повышения продуктивности разных видов донника, в том числе и лекарственного. Работы в данной области проводились на базе Алтайского государственного аграрного университета, Алтайского научно-исследовательского института сельского хозяйства СО Россельхозакадемии [24,50].

Поскольку донник лекарственный относится к многоцелевым растениям, исследования имеют разносторонний характер. В большей степени они связаны с использованием донника, как кормовой, сидеральной, фитомелиоративной и медоносной культуры.

Известно, что проблемой для Алтайского края является большое количество засоленных земель. Донник, обладая высоким потенциалом продуктивности, является незаменимым фитомелиорантом, лучше других подходит для рекультивации сельскохозяйственных угодий, при этом не требователен к условиям произрастания. Корни донника слабопроницаемы для

солей, поэтому рост зеленой массы и корней на солонцах у него не снижается. Культура улучшает физико-химические свойства почвы, повышает содержание водопрочных агрегатов, уменьшает плотность сложения верхнего слоя, улучшает водопроницаемость. По солеустойчивости и рассоляющему действию на почву среди широкого спектра растений занимает одно из первых мест [25].

Донник характеризуется, как ценная парозамещающая культура для степных и лесостепных районов Алтайского края. Растение отличается высокой устойчивостью к засухе, хорошей зимостойкостью, не требует высокого плодородия почвы, имеет высокий потенциал продуктивности [50].



Рис. 3. Донниковое поле

Донник лекарственный обладает высокой семенной продуктивностью. По данным Суворова (1962) биологический урожай семян достигает 18-25 ц/га [73].

За шесть лет исследований Е.В. Гурковой изучено 76 сортов донника лекарственного. Показана зависимость длины вегетационного периода донника от эколого-географического происхождения, влияние осадков и тепла на продолжительность вегетационного периода [24]. В монографии «Донник»

автор описывает шесть сортов донника лекарственного, возделываемых в Сибири [25].

Анализ литературных данных указывает на наличие научной основы и положительного опыта по возделыванию донника лекарственного в Алтайском крае. Существует возможность и необходимость возделывания данной культуры на территории региона.

1.3. Сведения о химическом составе донника лекарственного

Фармакологическая активность препаратов донника лекарственного, согласно литературным данным, обусловлена наличием кумарина [7, 46].

Содержание кумарина в растительном сырье по разным источникам варьирует от 0,3 до 0,9% [99, 102, 98]. Наряду с кумарином, в траве донника лекарственного содержится мелилотозид (бета-глюкозид цис-о-кумаровой кислоты) (0,5-0,9%), гидролизующийся до кумарина и обладающий соответствующей активностью [99, 103]. Из кумаринов в траве содержится 3,4-дигидроксикумарин (мелилотин). Существуют данные о наличии скополетина и умбеллиферона [102,104,39]. В растительном сырье присутствуют метаболиты кумарина – о-кумаровая и мелилотовая кислоты [91,98]. Дикумарол образуется в пораженном плесенью растительном сырье и является продуктом микробиологической биотрансформации кумарина [106].

Донник лекарственный содержит флавоноиды, преимущественно группы флавонолов – гликозиды кверцетина и кемпферола [120]. Пакистанскими учеными (2008) была установлена структура кемпферола -3-О- β-глюкопиранозид [92]. Ученые Курского медицинского университета (2004) представили данные о наличии в растительном сырье гиперозида, витексина, рутина, кверцетина, лютеолина [9]. Есть данные о наличии в траве донника лекарственного следовых количеств изофлавоноида генистина [95].

Согласно Ю.С. Оводову трава донника лекарственного содержит пектиновые вещества – 2,5 %. В их составе: 70,3 % -галактуроновой кислоты, 4,7 % - рамнозы, 14 %-арабинозы, 0,8 % - ксилозы, 2,5 % маннозы, 0,7 % - глюкозы, 7,3 %- галактозы [58].

И.А. Сычев выделял водорастворимые полисахариды и пектин из донника лекарственного травы с целью изучения их действия на систему кроветворения [74, 75].

По данным ряда авторов в донника лекарственного траве содержатся сапонины. Проведено разделение и идентификация 14 компонентов, образующих суммарные комплексы тритерпеновых и стероидных гликозидов [83,109,110]. Установлена структура девяти из них: 3-О- α -L-арабинопиранозид-сосясапогенол В, 3-О-[β -D-галактопиранозил(1-2)- α -L-арабинопиранозид]-сосясапогенол В, 3-О-[α -L-рамнопиранозил(1-2)- β -D-галактопиранозил(1-2)- α -L-арабинопиранозид]сосясапогенол В, 3-О-{ α -L- арабинопиранозил(1-3)]-[α -L-рамнопиранозил(1-2)- β -D-галактопиранозил(1-2)- α -L-арабинопиранозид]}-сосясапогенол В, 3-О- β -D-ксилопиранозид-сосясапогенол В, 3-О-[β -D-галактопиранозил(1-2)- β -D-ксилопиранозид]-сосясапогенол В, 3-О-[α -L-рамнопиранозил(1-2)- β -D-галактопиранозил(1-2)- β -D-ксилопиранозид-сосясапогенол В, 3-О- β -D-глюкопиранозид-сосясапогенол В, 3-О-{ α -L-рамнопиранозил(1-2)- β -D-глюкопиранозил(1-2)]-[α -L- арабинопиранозил(1-6)- β -D-глюкопиранозид]}-сосясапогенол В [83].

В литературе имеются сведения о наличии в донника лекарственного траве производных пурина, жироподобных веществ (до 4,3%), белка (до 17,6%), эфирного масла (0,01%), аскорбиновой кислоты (до 389мг%), каротина (до 84мг%), витамина Е (более 45мг%), фенолкарбоновых кислот [54,60,66]. В семенах обнаружено жирного масла до 42%, включающего пальмитиновую, стеариновую, олеиновую, линолевую, линоленовую, арахидоновую, бегеновую и лигноцериновую кислоты [88].

1.4. Изучение и использование донника лекарственного

в медицине

Применение донника лекарственного в научной медицине упоминается в «Новом фармацевтическом руководстве», датированном 1904 годом. Донника лекарственного трава и донниковый пластырь были включены в «Deutsche Arzneitaxe» от 1936 года и в Немецкой фармакопее 6-го издания (1951).

Статья «Донника трава» включена в Фармакопею Европы (01/2008:2120). Монографии о препаратах, содержащих экстракт донника были опубликованы Европейским Научным Объединением по Фитотерапии (июль 1997) и Комиссией Е по Фитотерапевтическим субстанциям Немецкого Федерального Ведомства (март 1986, 1990) [99].

Донник лекарственный и лекарственные препараты его содержащие зарегистрированы в Германии, Польше, Франции, Латвии, Австрии, Румынии, Нидерландах для внутреннего и наружного применения. Донника лекарственного траву применяют в виде настоя, как спазмолитическое и вяжущее средство; при болезнях желудка и бронхитах; при бессоннице, неврастении, головных болях; для лечения геморроя [23,102,59].

Лекарственные препараты, содержащие экстракт донника угнетают ЦНС, оказывают противосудорожное действие, повышают систолическое давление, увеличивают минутный объем сердца, улучшают мозговое и периферическое кровообращение и кровоснабжение органов брюшной полости [46, 71].

Отмечены антиангинальный, антигипертензивный, антигипоксический, антикоагулянтный, снотворный, отхаркивающий, муколитический, противовоспалительный, противомикробный эффекты [30, 54].

Применение экстракта донника лекарственного травы для клинических исследований на больных страдающих варикозом, хронической венозной недостаточностью, тромбофлебитом, геморроем, лимфедемой нижних конечностей, лимфедемой верхних конечностей, связанной с заболеваниями молочных желез проводились с 1960 г (табл. 2).

Результаты клинических исследований экстракта
донника лекарственного травы

Диагноз (число пациентов)	Период лечения	Результаты	Переносимость	Литературный источник
Варикоз, тромбофлебит (1158)	30 дней	Отек, язвы, боль. Улучшение субъективных симптомов	Хорошая	100, 111
Венозная недостаточность (25)	20 дней	Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	113, 87
Геморрой (50)	10-28 дней	Заднепроходная геморрагия, отек. Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	116
Хроническая венозная недостаточность, варикоз (30)	10-20 дней	Отек. Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	93
Хроническая венозная недостаточность (385)	45 дней	Отек, язвы. Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	125
Масталгия (20)	10- 30 дней	Отек молочных желез. Улучшение функциональных симптомов	Очень хорошая	101
Хроническая венозная недостаточность (55)	15 дней	Отек. Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	119
Лимфедема (76)	6-8 месяцев	Отек. Улучшение субъективных симптомов	Очень хорошая	126
Масталгия (50)	2 месяца	Отек груди. Улучшение функциональных симптомов	Хорошая	115

Другие показания к применению препаратов донника лекарственного травы: гипертоническая болезнь и атеросклеротическая систолическая гипертония с гиперкоагулябельностью крови; ишемическая болезнь головного мозга; коронарно-церебральные синдромы среднего и старшего возраста, болезнь Бюргера; невроты, климакс, мигрень; нейроциркуляторная дистония с склонностью к вегетативным пароксизмам и потерей сознания; предтромботические состояния (профилактика и лечение); миозиты и люмбаго (раздражающее и отвлекающее средство) [59].

В монографии разработанной комиссией Государственной службы здравоохранения Германии, в рубрике применения донника и его препаратов указано: «Внутреннее применение: нарушения при хронической венозной недостаточности, такие, как чувство боли и тяжести в ногах, ночные судороги в икрах, зуд и отеки. Как вспомогательное средство при лечении тромбофлебита, посттромботического синдрома, геморроя и лимфостаза. Наружное применение: ушибы, растяжения и поверхностные кровоизлияния» [99].

Донника лекарственного трава входит в состав «Успокоительного сбора № 3» - смеси измельченного лекарственного растительного сырья (валерианы лекарственной корневища с корнями, донника трава, душицы обыкновенной трава, пустырника трава, тимьяна ползучего трава) и в состав пластыря, используемого при нарывах и нагноениях для быстрого созревания и вскрытия нарывов и фурункулов [44].

Сотрудниками Пятигорской фармацевтической академии получен биогенный стимулятор «Мелиоцин» из донника лекарственного и белого, обладающий биогенным и стимулирующим действием, по своей активности превосходящий экстракт алоэ в 2 раза [52].

Согласно В.Г. Купееву (2006) донник лекарственный за счет содержания кумарина оказывает тромболитическое действие, улучшая реологию и микроциркуляцию крови, а так же укрепляет, заживляет, восстанавливает

эндотелий кровеносных сосудов, препятствует образованию тромбов и эмболий [46].

Экспериментально доказано противосудорожное и успокаивающее действие донника лекарственного травы на ЦНС [54].

Антимикробная активность суммы тритерпеновых гликозидов, выделенных из донника лекарственного травы, изучалась в отношении тест-культур *Staph.aureus*, *E.coli*, *Bac.subtilis*, *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *C.kruzei*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *Sacch.cerevisii*. В качестве контроля использовали биомицин и нистатин. Антибактериальное действие суммы гликозидов в концентрации 1000 мкг/мл оказалось сравнимо с контролем, а в ряде случаев превысило его [58].

Антиоксидантная активность суммы тритерпеновых гликозидов донника лекарственного травы, изучалась с использованием модели окисления метилового эфира олеиновой кислоты. Контролем для сравнения служил бутилокситолуол в тех же концентрациях. Антиокислительная активность, согласно автору, близка к контролю [103].

И.А. Сычевым установлено противовоспалительное и радиопротекторное действие суммы водорастворимых полисахаридов и пектина выделенных из донника лекарственного травы [74,75].

В опытах на животных установлено, что введение внутрь водного экстракта травы донника ускоряет регенерацию клеток печени [54].

1.5. История применения донника лекарственного травы в народной медицине и народном хозяйстве

Донник лекарственный относится к многоцелевым растениям — спутникам человека [25].

Донника лекарственного трава применяется с глубокой древности в народной медицине многих стран. Упоминания о применении донника лекарственного в народной медицине восходят к временам Плиния и Галена

(I – II век нашей эры). Плиний указывал на применение донника, как вяжущего и смягчительного средства для наружного и внутреннего применения при воспалениях, язвах и опухолях. Гипократ рекомендовал применять цветки донника наружно при септических язвах. Фукс (1543г.) упоминал наружное применение донника с медом при сыпи на лице, внутрь, при расстройстве мочевого пузыря, в виде настойки. Бокк (1565г.) рекомендовал применение донника в качестве вяжущего, смягчительного и анальгезирующего наружного средства при язвах глаз, боли в ухе, воспалениях матки. Маттиоли (1626г.) описывал наружное применение донника в случае желудочной, головной боли и при микозе [5]. Леклерк (1976г.) относил донник лекарственный к спазмолитикам, а так же рекомендовал его при бессоннице у детей и пожилых людей. Хагер (1938, 1949, 1975гг.) назначал наружное применение донника в травяных подушках, в качестве вяжущего средства при язвах и ревматизме, для внутреннего применения в качестве диуретического средства, для внутреннего применения при варикозах, тромботических поражениях, геморрое, ножных язвах, эдеме и брахиалгии [105,114, 99].

В современной народной медицине настой донника лекарственного травы применяют при стенокардии, тромбозе коронарных сосудов, бронхитах, бронхиальной астме, болях в области сердца, воспалении яичников, скудных и болезненных менструациях, отеках, циститах [36,72]. Как успокаивающее средство при бессоннице, мигрени, как спазмолитическое средство, при метеоризме [84, 77,47]. Настой травы пьют от кашля и болей в животе, а в смеси с мать-и-мачехи цветками, центаврии травой и манжетки травой, взятых поровну - при воспалении яичников. Кормящие матери употребляют его для увеличения количества молока [45,40].

В народной медицине донника лекарственного траву применяют наружно в виде ванн, компрессов, припарок, примочек, как противовоспалительное, смягчительное, отвлекающее средство при абсцессах, фурункулезе, мастите, суставном ревматизме [23].

Донниковые ванны используют при подагре, ревматизме, радикулите, остеохондрозе, гнойничковых поражениях кожи, заболеваниях яичников [84].

В виде мази, приготовленной из 1 части сгущенного настоя и 4 частей вазелина – при нарывах, порезах, воспалении молочных желез [77]. Более длительное действие при наружном применении оказывают масляные вытяжки, получаемые путем кипячения цветков донника с жиром или сливочным маслом. Пары травы используют при воспалении среднего уха [45].

Донник лекарственный — хороший медонос. Он дает 200 - 600кг меда с 1га. Посадка его вблизи пасек, по склонам оврагов, пустошам и на неудобьях весьма желательна. Это позволяет использовать растение не только как пищевое и медоносное, но и как кормовое, техническое и лекарственное [88].

На Кавказе молодые корни используют в пищу в сыром или вареном виде, а листья как кулинарную пряность. Листья применяют в качестве ароматизатора в молочной, мясной, рыбной, табачной промышленности и производстве безалкогольных напитков [89].

Донника лекарственного цветки применяют для ароматизации мыла и как фиксатор запаха в парфюмерии и ликероводочной промышленности. Из молодых и свежих листьев готовят салаты, окрошки, супы. Используется для изготовления зеленого сыра. В Таджикистане и во Франции листья используют для окрашивания тканей в желтый цвет. Донник лекарственный является эффективным инсектицидом от моли, ратицидом [34].

Растение возделывается, как кормовая культура для сельскохозяйственных животных. Используется для скармливания скоту в виде силоса (в свежем виде поедается плохо). По своей питательности не уступает люцерне.

Выводы

В заключение следует отметить, что значимость донника лекарственного травы, как ценного лекарственного сырья подтверждается длительным применением в народной медицине и традиционной зарубежной медицине.

Несмотря на разнообразие фармакологического действия в отечественной научной медицине донника лекарственного трава применяется ограниченно, лекарственные препараты на фармацевтическом рынке отсутствуют. В то же время, в связи с широким использованием в народном хозяйстве, в Алтайском крае проводятся работы по культивированию данного вида. Растение хорошо адаптировано к выращиванию в культуре и может использоваться без ущерба для природных ресурсов.

Фитохимическое исследование донника лекарственного травы является актуальным, так как представляет интерес изучения его с целью использования в качестве лекарственного растительного сырья, создания лекарственных препаратов на его основе и исследования фармакологической активности.

ГЛАВА II

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали воздушно–сухое растительное сырье и донника лекарственного травы экстракт сухой.

Растительное сырье заготавливали в период с 2009 по 2011г.г., во время цветения (июнь, июль, август) в районах Алтайского края различающихся по климатическим условиям - Бийском, Красногорском, Алтайском, Зональном, Завьяловском, Мамонтовском; сушили воздушно-теневым способом.

Донника экстракт сухой получали из сухо-воздушного сырья, измельченного до размера частиц 1-4 мм, отсеянного от более мелких и крупных частиц. Для его получения на предприятии «Эвалар» разработана технология, включающая экстракцию спиртом этиловым 50% методом мацерации при соотношении сырье-экстрагент 1:10 в течение 2 ч при температуре 50-60⁰ С и распылительную сушку.

Микроскопические исследования проводили по общепринятым методикам [20, 26, 63]. Для работы использовали лабораторные микроскопы «Микмед-1» и «Микмед-6». Объекты фотографировали фотокамерой «Canon». Обработку снимков проводили с помощью программы Adobe Photoshop CS 8.0. Поперечные срезы выполняли лезвием от руки.

Определение числовых показателей (потеря в массе при высушивании, зола общая, зола, нерастворимая в растворе кислоты хлористоводородной 10%, органические и минеральные примеси, экстрактивные вещества) проводили по методикам Государственной фармакопеи XI и XII издания [21,20].

Определение тяжелых металлов и особо токсичных элементов донника лекарственного травы осуществляли методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с требованиями нормативной документации [15,13,53]. Содержание мышьяка в растительном сырье определяли колориметрическим и инверсионно-вольтамперометрическим методами [16,17]. В качестве объектов исследования использовали воздушно–сухое сырье дикорастущего донника лекарственного, заготовленного в промышленной зоне г. Бийска и в поселке Александровка, Завьяловского района (экологически чистый район).

Для проведения **качественного анализа БАС** донника лекарственного травы получали извлечения из воздушно–сухого растительного сырья. В качестве экстрагентов использовали воду очищенную, водно-спиртовые смеси различной концентрации, метанол, гексан, хлороформ. Для исследования донника лекарственного травы экстракта сухого использовали растворы в соответствующих растворителях.

Идентификацию кумаринов, флавоноидов, фенолокислот, липофильных веществ, дубильных веществ, сапонинов, алкалоидов, антрахинонов, пигментов в растительном сырье и экстракте проводили по общепринятым методикам [55,43,69]. Для проведения качественного анализа донника лекарственного травы и экстракта сухого методом ТСХ применяли системы растворителей, представленные в таблице 3.

Таблица 3

Хроматографические системы, используемые для анализа БАС донника
лекарственной травы методом ТСХ

Группа БАВ	Система растворителей	Литературный источник
Флавоноиды Фенолокислоты	Этилацетат - метилэтилкетон - муравьиная кислота - вода очищенная (5:3:1:1)	41
	Этилацетат - метанол - вода очищенная - муравьиная кислота (50:2:3:6)	122
	Толуол - этилацетат - ацетон - муравьиная кислота (100:80:20:2)	66
Флавоноиды Фенолокислоты	Бутанол - уксусная кислота ледяная - вода очищенная (4:1:2)	48,41
	Ацетонитрил - бутанол - аммиак водный - хлороформ (30:5:1:120)	80
	Этилацетат - муравьиная кислота - уксусная кислота ледяная - метилэтилкетон - вода очищенная (50:7:3:30:10)	108
	Хлороформ - этилацетат - этанол (6:1:3)	27
Кумарины	Уксусная кислота ледяная - диэтиловый эфир - толуол (10:50:50)	123
	Этилацетат - бензол (1:2)	48,72
	Бутанол - уксусная кислота ледяная - вода очищенная (68:16:16)	72
	Хлороформ - петролейный эфир (1:2)	48
Сапонины	Хлороформ - уксусная кислота ледяная - метанол - вода очищенная (65:32:12:8)	108
Сахара	Вода очищенная - ацетонитрил (15:85)	124
Аминокислоты	Бутанол - ацетон - уксусная кислота ледяная - вода очищенная (14:14:4:8)	8
Липиды	Гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота ледяная (35:15:2)	86
	Хлороформ - метанол - вода очищенная (65:35:5)	35
Пигменты	Гексан - бензол - метанол (60:15:4)	29
	Бензол - этилацетат - метанол (100:6:0,5)	82

Качественный анализ кумаринов, флавоноидов и фенолокислот донника лекарственного травы и экстракта сухого проводили по результатам общих реакций, ТСХ и ВЭЖХ [48,41,51].

Для проведения общих реакций 5,0 г измельченного воздушно–сухого сырья донника лекарственного травы обезжиривали гексаном в аппарате Сокслета в течение 12 ч.

Обезжиренное сырье экстрагировали спиртом метиловым, трижды по 50,0 мл, на перемешивающем устройстве при комнатной температуре в течение 2 ч. Объединенные извлечения упаривали досуха на роторном испарителе в вакууме при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяли в спирте метиловом.

Для определения кумаринов, флавоноидов и фенолокислот в донника лекарственного травы экстракте сухом получали метанольные извлечения (0,5 : 10) на ультразвуковой бане при комнатной температуре.

Дубильные вещества идентифицировали с использованием цветных реакций и реакций осаждения [81,51].

3,0 г измельченного воздушно–сухого сырья донника лекарственного травы помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл горячей воды очищенной и выдерживали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин.

Полученное извлечение фильтровали и после охлаждения использовали для проведения испытаний.

Для определения дубильных веществ в экстракте сухом использовали водные растворы образцов экстракта (1:100).

Идентификацию свободных аминокислот травы донника лекарственного проводили в водных извлечениях с применением цветных реакций, ТСХ и ВЭЖХ. В качестве стандартных образцов использовали аминокислоты фирмы Sigma.

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинах HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ с алюминиевой подложкой (Merck) в системе растворителей: бутанол - ацетон - уксусная кислота - вода очищенная (14:14:4:8). В качестве детектирующего реагента использовали спиртовой раствор нингидрина.

Для качественного анализа сапонинов применяли характерные реакции и ТСХ [108].

Для проведения анализа методом ТСХ 3,0 г измельченного сырья экстрагировали 10 мл спирта этилового 70%, на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин. Полученное извлечение упаривали в выпарительной чашке до объема около 5 мл. 3 мл полученного раствора встряхивали с 5 мл бутанола насыщенного водой, используя делительную воронку. Бутанольное извлечение упаривали до 1 мл.

В случае экстракта: 0,3 г образца экстрагировали 10 мл спирта этилового 70% на ультразвуковой бане при температуре около 60 °С в течение 20 мин. Полученное извлечение фильтровали и упаривали в выпарительной чашке до объема около 5 мл. 3 мл полученного раствора встряхивали с 5 мл бутанола насыщенного водой. Бутанольное извлечение упаривали до 1 мл.

15 мкл испытуемого раствора наносили на линию старта хроматографической пластины HPTLC Silica gel 60 со стеклянной подложкой (Merck) и хроматографировали восходящим способом в системе растворителей хлороформ – уксусная кислота ледяная-метанол-вода (65:32:12:8). В качестве детектирующего реагента использовали раствор анисового альдегида уксуснокислого в метаноле.

Изучение липофильных веществ донника лекарственного травы проводили с помощью химических и физико–химических методов исследования: ТСХ, спектрофотометрии, ВЭЖХ [6,35].

Для разделения и идентификации липидов методом ТСХ 10,0 г измельченного сырья экстрагировали 50 мл смеси растворителей метанол – хлороформ (2:1) в течение 30 минут.

Для разделения на нейтральные и полярные липиды извлечение наносили на колонку, заполненную силикагелем. Элюировали сначала хлороформом, затем метанолом, получая фракции нейтральных и полярных липидов соответственно [85,86].

Качественный состав полученных фракций изучали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием хроматографических пластин HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Нейтральные липиды разделяли в системе растворителей гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота ледяная (35:15:2) [86].

В качестве стандартных образцов использовали β -каротин, лютеин, β -ситостерин (Sigma). Хроматограммы обрабатывали спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты 10% и нагревали при 140°C.

В качестве детектирующего раствора для обнаружения стероидов и их эфиров использовали смесь серной кислоты концентрированной и уксусной кислоты ледяной в соотношении 1:1 [35].

Для разделения *полярных липидов* использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (65:35:5) [35]. Для обнаружения полярных липидов пластинку обрабатывали парами йода; аминофосфолипидов - раствором нингидрина; гликолипидов - раствором α -нафтола.

Для идентификации *ксантофиллов* хлороформную фракцию, содержащую пигменты, анализировали методом ВЭЖХ в нормально-фазовом режиме. Анализ проводили на хроматографическом модуле «Alliance» (Waters), оснащенном спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей в следующих условиях: колонка - LiChrosorb® Si60, (250×4) мм, 5 μ м; элюент - гексан - ацетон - этилдиизопропиламин (809:190:1); скорость потока - 1,5 мл/мин. В качестве внешнего стандарта использовали смесь ксантофиллов с известным составом (DSM). Идентификацию компонентов проводили по спектрам поглощения и временам удерживания [118,127].

Количественное определение БАС в донника лекарственного траве и экстракте сухом проводили хроматографическими методами и методом спектрофотометрии.

Количественное определение кумаринов

Для количественного определения индивидуальных кумаринов в растительном сырье и экстракте донника, а так же для определения оптимальных условий экстрагирования кумаринов из растительного сырья применяли метод ВЭЖХ [98,112].

Около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом, вместимостью 100 мл. Прибавляли 100 мл экстрагента, взвешивали колбу с точностью ($\pm 0,01$ г) и проводили экстракцию, используя разные способы экстрагирования: ультразвуковая ванна, перемешивающее устройство, кипящая водяная баня. В качестве экстрагента использовали спирт метиловый, спирт этиловый 96 %, водные растворы спирта в концентрации 40%, 50%, 60%, 80%. Через каждые 30 мин содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры, потерю массы восполняли экстрагентом, отбирали 0,5 мл для анализа, фиксировали массу колбы и продолжали экстракцию.

Полноту и влияние условий экстракции контролировали методом ВЭЖХ по содержанию индивидуальных кумаринов в полученных извлечениях. Анализ проводили на хроматографическом модуле «Alliance» фирмы «Waters», оснащенном диодно-матричным детектором и хроматографической колонкой Wakosil C18 RS (250×4,6) мм, 5μм в следующих условиях: элюент А – раствор ортофосфорной кислоты 0,1%, элюент В - ацетонитрил; градиентный режим: 20 мин - от 5% до 30 % элюента В, 10 мин - 30 % элюента В; аналитическая длина волны – 275 нм; скорость потока - 1 мл/мин, объем инъекции 20 мкл; температура колонки - 30 °С.

Кумарины идентифицировали по спектрам поглощения и временам удерживания в сравнении со стандартными образцами. В качестве стандартных образцов использовали индивидуальные вещества производства Sigma и PhytoLab.

Для количественного определения суммы кумаринов оценивалась возможность использования методов, применяемых для установления данного показателя в растительном сырье:

- метод спектрофотометрии, основанный на способности кумаринов поглощать в УФ области спектра;
- колориметрический метод, основанный на взаимодействии кумаринов с солями диазония с образованием красно-коричневых продуктов, поглощающих в видимой области спектра;
- хроматографические методы.

Количественное определение дикумарина

Около 10 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, и предварительно обезжиренного в аппарате Сокслета спиртом этиловым 96%, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл пиридина и проводили экстракцию на перемешивающем устройстве при комнатной температуре в течение 8 ч.

Полученное извлечение фильтровали через ватный фильтр в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, промывая пиридином остаток в колбе. Фильтрат упаривали досуха на роторном испарителе при температуре около 70 °С.

Сухой остаток промывали последовательно водой очищенной, спиртом этиловым 96% и ацетоном, фильтруя смывы через стеклянный фильтр ПОР 16 и отбрасывая. Фильтр после высушивания промывали 10 мл пиридина в колбу с промытым остатком. Содержимое колбы упаривали досуха на роторном испарителе и растворяли в 5 мл пиридина.

Полученный раствор анализировали методом ВЭЖХ в следующих условиях: колонка - Simmetry C18 (250×4,6) мм, 5μм; элюент А – раствор натрия ацетата 0,018М (рН 7,9), В – спирт метиловый; градиентный режим: 20 мин от 10 до 40 % элюента В; аналитическая длина волны – 300 нм; скорость потока - 0,8 мл/мин; температура колонки 30°C; объем инъекции - 20 мкл [117]. В качестве стандарта использовали СО дикумарина Европейской фармакопеи.

Количественное определение флавоноидов

Для установления агликонового состава флавоноидов донника лекарственного травы, около 1 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл. Прибавляли 30 мл спирта этилового 50% и проводили экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение фильтровали через слой ваты в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию проводили еще дважды в тех же условиях, объединяя извлечения. После охлаждения объем извлечения доводили до метки спиртом этиловым 50%. Содержимое колбы перемешивали и фильтровали через фильтр «белая лента».

10 мл фильтрата помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляли 3 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и проводили гидролиз на водяной бане с обратным холодильником в течение 1,5 ч.

После охлаждения гидролизат переносили в делительную воронку вместимостью 100 мл и проводили экстракцию эфиром, трижды по 20 мл. Эфирные фракции объединяли в выпарительной чашке и упаривали досуха на водяной бане при температуре около 40 °C.

Сухой остаток растворяли в 5 мл спирта метилового. Полученный раствор хроматографировали на жидкостном хроматографе фирмы «Waters»,

оснащенном диодно-матричным детектором и колонкой SGE Enduro C18, 250 x 4,6 мм с диаметром частиц 5 мкм в следующих условиях: подвижная фаза: элюент А – раствор кислоты ортофосфорной 0,3 %, элюент В – ацетонитрил; скорость потока: 1 мл\мин; градиентный режим: от 10 % до 40 % элюент В, 40% элюент В в течение 20 мин; объем инъекции: 10 мкл; температура колонки: 30 °С.

Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания и электронным спектрам поглощения в сравнении с хроматограммами растворов стандартных образцов лютеолина, апигенина, витексина, изовитексина, мирицитина, кверцетина, кемпферола, изорамнетина, формонетина, биоханина А, даидзеина, гинестеина. Для получения стандартных растворов по 1 мг (точная навеска) каждого из стандартных образцов растворяли в метаноле в отдельной мерной колбе вместимостью 10 мл.

Количественное определение суммы флавоноидов в донника лекарственного траве и экстракте сухом проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, сущность которого заключается в способности флавоноидов образовывать с солями некоторых металлов окрашенные комплексы. При этом происходит батохромный сдвиг первой полосы в спектре поглощения флавоноидов в длинноволновую область [41, 32].

Для определения содержания суммы флавоноидов в донника лекарственного траве, около 1 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл. Прибавляли 30 мл спирта этилового 50% и проводили экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин.

Извлечение фильтровали через слой ваты в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию проводили еще дважды в тех же условиях, объединяя извлечения. После охлаждения объем объединенного извлечения доводили до

метки спиртом этиловым 50%. Содержимое колбы перемешивали и фильтровали через фильтр «белая лента».

Для количественного определения флавоноидов в донника экстракте сухом, около 0,3 г субстанции (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 70 мл спирта этилового 50% и обрабатывали на ультразвуковой бане при температуре около 60 °С в течение 20 мин. После охлаждения объем раствора в колбе довели до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр «белая лента».

2,0 мл фильтрата извлечения растительного сырья или экстракта сухого помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2,0 мл спиртового раствора алюминия (III) хлорида 2%, 10 мл спирта этилового 96% и перемешивали. Через 10 мин прибавляли 1,0 мл раствора уксусной кислоты 1% и довели объем содержимого колбы до метки спиртом этиловым 96 % (испытываемый раствор).

Через 30 минут измеряли оптическую плотность испытываемого раствора на спектрофотометре «Сагу 300» при длине волны 410 нм в кюветах толщиной 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,0 мл извлечения, 1 мл раствора уксусной кислоты 1%, доведенный спиртом этиловым 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность раствора СО рутина. Для его приготовления 1,0 мл 0,050 % спиртового раствора СО рутина (Sigma) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2,0 мл спиртового раствора алюминия (III) хлорида 2%, 10 мл спирта 96% и перемешивали.

Через 10 мин прибавляли 1,0 мл раствора уксусной кислоты 1% и довели объем содержимого колбы до метки спиртом этиловым 96%. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1,0 мл раствора СО рутина, 1,0 мл раствора уксусной кислоты 1%, доведенный спиртом этиловым 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Количественное определение полисахаридов

Количественное определение водорастворимых полисахаридов и протопектина в растительном сырье проводили гравиметрическим методом [28]. Содержание пектиновых (уроновых) кислот определяли карбазольным методом [29]. Состав моносахаридов определяли методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием [64].

Для определения **водорастворимых полисахаридов** около 10,0 г (точная навеска) измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм сырья, предварительно обезжиренного в аппарате Сокслета смесью хлороформ - метанол (2:1), помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл и прибавляли 100 мл воды очищенной, нагретой до температуры 90°C.

Колбу помещали на перемешивающее устройство и проводили экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин.

Извлечение декантировали в стакан вместимостью 500 мл. Экстракцию повторяли еще два раза. Объединенные извлечения центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин и декантировали в стакан вместимостью 2000 мл. К полученному раствору (около 300 мл) прибавляли 1200 мл спирта этилового 96%, перемешивали, нагревали на водяной до температуры 35 °C и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Надосадочную жидкость декантировали, не допуская взмучивания осадка, и фильтровали с помощью водоструйного вакуумного насоса через высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16. Осадок количественно переносили на тот же фильтр, промывая последовательно 15 мл спирта этилового 96% и 15 мл ацетона. Фильтр с осадком высушивали на воздухе, затем при температуре 100-105 °C до постоянной массы. Содержание водорастворимых полисахаридов определяли по разности массы фильтра с осадком и без.

Для определения **протопектина** к шроту, оставшемуся после извлечения водорастворимых полисахаридов, предварительно обезвоженному 50 мл

ацетона, прибавляли 100 мл раствора хлористоводородной кислоты 0,1 н. и проводили экстракцию на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин.

Извлечение декантировали, к шроту прибавляли 100 мл раствора натрия цитрата 1%. Экстракцию повторяли в тех же условиях.

К объединенному извлечению прибавляли 800 мл спирта этилового 96%, смесь нагревали на водяной бане до температуры 35 °С, перемешивали и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Надосадочную жидкость декантировали, не допуская взмучивания осадка, и фильтровали с помощью водоструйного вакуумного насоса через высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16. Осадок количественно переносили на тот же фильтр, промывая последовательно 15 мл спирта 96% и 15 мл ацетона. Фильтр с осадком высушивали на воздухе, затем при температуре 100-105 °С до постоянной массы. Содержание протопектина определяли по разности массы фильтра с осадком и без.

Осадок полисахаридов с фильтров количественно переносили водой в мерные колбы вместимостью 100 мл (раствор А).

В полученных растворах определяли содержание пектиновых кислот и состав моносахаридов.

Для определения **пектиновых кислот** 5 мл раствора А помещали в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл раствора натрия гидроксида 0,05 н. и перемешивали. Через 30 мин прибавляли 5 мл раствора хлористоводородной кислоты 0,05 н. и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора помещали в пробирку со шлифом вместимостью 25 мл, установленную на ледяную баню и прибавляли 5 мл раствора натрия тетрабората в серной кислоте 4%. Пробирку нагревали в течение 6 мин на водяной бане и быстро охлаждали. Затем прибавляли 0,2 мл раствора карбазола в абсолютном спирте 0,1%, нагревали в течение 10 мин на

водяной бане и охлаждали. Измеряли оптическую плотность образовавшегося комплекса красного цвета в максимуме поглощения при длине волны 530 нм.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора приготовленного из 0,01% раствора СО галактуроновой кислоты в соответствии с методикой.

Для определения **моносахаридного состава** 10,0 мл раствора А помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 25 мл, прибавляли 1,0 мл трифторуксусной кислоты 2 М и проводили гидролиз на водяной бане с обратным холодильником в течение 3 ч.

Гидролизат после охлаждения нейтрализовали раствором гидроксида натрия 1 н. (по лакмусу) и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 20 мл. Объем раствора в колбе доводили водой очищенной до метки. Раствор перемешивали, фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и анализировали на хроматографическом модуле «Alliance», оснащенном рефрактометрическим детектором и хроматографической колонкой Sugar-Pak (300 x 7,8) мм в следующих условиях: подвижная фаза - вода для хроматографии; скорость потока – 0,5 мл/мин; объем инъекции - 20 мкл; температура колонки - 90°C; температура ячейки детектора - 40°C.

Идентификацию и количественное определение моносахаридов проводили методом внешнего стандарта в сравнении с хроматограммами 0,10% водных растворов СО фруктозы, глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы (Sigma).

Количественное определение дубильных веществ.

Для количественного определения дубильных веществ в донника лекарственного траве использовали спектрофотометрический метод с кожным порошком [121].

Около 3 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 2 мм, помещали в

коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл горячей воды очищенной и проводили экстракцию на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин.

Извлечение декантировали в мерную колбу вместимостью 200 мл через ватный тампон. Экстракцию повторяли еще два раза, в тех же условиях.

Объем объединенного в колбе извлечения доводили водой очищенной до метки, раствор перемешивали и фильтровали через фильтр «белая лента» (раствор А).

10 мл раствора А помещали в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,1 г кожного порошка (Sigma, каталожный номер H0162) и интенсивно перемешивали в течение 60 мин (раствор Б).

В три мерные колбы вместимостью 25 мл помещали: в первую – 2,0 мл раствора А; во вторую – 2,0 мл раствора Б; в третью – 2 мл водного раствора СО галловой кислоты 0,03%. В каждую колбу прибавляли по 1,0 мл реактива Фолина – Чокальтеу (Merck, каталожный номер 1.09001) и доводили объем раствора в каждой колбе до метки раствором натрия карбоната 15%.

Через 30 мин измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре «Cary-300» в максимуме поглощения при длине волны 750 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание дубильных веществ (полифенольных соединений) в пересчете на галловую кислоту в растительном сырье определяли по разности общих фенольных соединений и фенольных соединений несорбируемых кожным порошком.

Количественное определение аминокислот

Содержание свободных аминокислот определяли методом ВЭЖХ на хроматографе «Alliance», оснащенном испарительным детектором светорассеяния и колонкой ProteCol-P C₁₈ HPH125 (250×4,6) мм, 5 мкм в следующих условиях: подвижная фаза - раствор гептафтормасляной

кислоты 0,1% в растворе трифторуксусной кислоты 0,2%; температура колонки - 30°C; температура испарительной трубки - 50°C; давление газа (азот) - 45 psi; объем пробы - 10 мкл; скорость потока - 0,5 мл/мин.

Общее содержание аминокислот определяли по нингидриновой реакции с использованием в качестве стандартного образца изолейцина фирмы Sigma. Оптическую плотность образующегося сине-фиолетового комплекса измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 568 нм [68,90].

Количественное определение сапонинов

Количественное определение сапонинов в растительном сырье проводили спектрофотометрическим методом [38].

Около 2,0 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц менее 2 мм, помещали в патрон из фильтровальной бумаги и экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета в течение 2 ч.

После высушивания, содержимое патрона переносили в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение декантировали через вату в выпарительную чашку. Вату помещали в экстракционную колбу, прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и повторяли экстракцию в тех же условиях.

После третьей экстракции извлечения, объединенные в выпарительной чашке, упаривали на водяной бане до объема около 2 мл. Остаток количественно переносили в делительную воронку вместимостью 150 мл, прибавляли 3 мл раствора хлористоводородной кислоты 1 н. и извлекали смесью пропанол - хлороформ (20:50) 2 раза по 70 мл в течение 5 мин.

Органическую фазу переносили в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, растворитель отгоняли досуха на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре около 50 °C. Сухой остаток в колбе трижды промывали эфиром, порциями по 10 мл, затем растворяли в уксусной

кислоте ледяной и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем раствора доводили уксусной кислотой ледяной до метки, 0,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки уксусной кислотой ледяной.

2,0 мл полученного раствора помещали в пробирки, прибавляли 2,0 мл раствора кобальта хлорида, 2,0 мл серной кислоты концентрированной, закрывали ватным тампоном и помещали на водяную баню на 1 ч.

Пробирки охлаждали под струей воды, затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 281 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл уксусной кислоты ледяной, 2 мл раствора кобальта хлорида и 2 мл серной кислоты концентрированной, выдержанный в тех же условиях.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО эсцина. Для его приготовления, исходный раствор СО эсцина (Sigma) 0,02% в уксусной кислоте обрабатывали аналогично испытуемому раствору.

Количественное определение липофильных веществ

Содержание **общих липидов** в донника лекарственного траве определяли гравиметрически [35,11].

Около 4 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц менее 2 мм, помещали в патрон из фильтровальной бумаги «желтая лента» и проводили непрерывную экстракцию в аппарате Сокслета в течение 12 ч, используя 200 мл смеси хлороформ – метанол (2:1).

Полученное извлечение обрабатывали в делительной воронке раствором натрия хлорида 1% (2 раза по 30 мл) для удаления веществ нелипидной природы, затем переносили в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводили объем раствора хлороформом до метки. Раствор перемешивали и фильтровали через фильтр «желтая лента».

25,0 мл фильтрата помещали в предварительно высушенную до постоянной массы выпарительную чашку, упаривали извлечение на водяной бане. Остаток сушили в сушильном шкафу при 100–105°C до постоянной массы. Содержание общих липидов в растительном сырье определяли по разности масс выпарительной чашки с содержимым и без него.

Содержание **нейтральных липидов** определяли гравиметрически, по той же методике, используя для экстракции 200 мл гексана.

Содержание **хлорофиллов** определяли спектрофотометрически. Сущность методики заключается в измерении оптической плотности вытяжки пигментов на спектрофотометре при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* (663 нм) и *b* (645 нм) с последующим расчетом концентрации пигментов по уравнениям Ветштейна и Хольма для 100% ацетона [29].

Около 5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в стеклянный бюкс, прибавляли 2-3 г стеклянного песка, соду на кончике шпателя и 10 мл ацетона. Затем содержимое бюкса растирали, растертую массу переносили в воронку Бюхнера и ацетоном извлекали пигменты до полного обесцвечивания пробы. Объем полученного извлечения измеряли с помощью цилиндра.

Интенсивность окраски ацетоновых извлечений измеряли на спектрофотометре «Cary 300» (Varian) при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b*, с последующим расчетом.

Количественное содержание **каротиноидов и ксантофиллов** определяли методами ТСХ и спектрофотометрии [118,29].

Около 5 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в стеклянный бюкс, прибавляли 2-3 г стеклянного песка, соду на кончике шпателя и 10 мл ацетона. Пробу растирали и оставляли в холодильнике на

ночь. Пробу вместе с окрашенным раствором переносили в воронку Бюхнера и многократно промывали ацетоном до обесцвечивания. Каротины из ацетоновой вытяжки переводили в гексан с помощью жидко-жидкостной экстракции. Последний отмывали водой в делительной воронке (2 раза по 20 мл) и сушили, пропуская через колонку с натрием сернокислым. Гексановую вытяжку упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 1 мл гексана.

100 мкл полученного раствора наносили на стартовую линию хроматографической пластины Merck в виде полосы шириной 20 мм. Рядом наносили по 10 мкл 0,1% гексановых растворов β –каротина и лютеина. После подсушивания, пластину помещали в хроматографическую камеру со смесью растворителей: гексан-бензол-метанол (60:15:4), предварительно насыщенную в течение 30 мин.

Зоны соответствующие каждому веществу снимали скальпелем и элюировали: β - каротин – 5 мл хлороформа; лютеин – 5 мл спирта этилового 96%.

Количественное содержание пигментов определяли на спектрофотометре «Cary 300», используя специфическое для каждого пигмента значение коэффициента удельного поглощения в соответствующем растворителе: для β –каротина – 220 при 464 нм; для лютеина – 255 при 447 нм [29].

Анализ **жирно-кислотного состава** проводили методом газовой хроматографии (ГХ). Исследовали фракцию общих, полярных и нейтральных липидов.

Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл смеси хлороформ – спирт метиловый (2:1) и интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Экстракцию повторяли еще дважды. Объединенные извлечения упаривали досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 10 мл смеси хлороформ – спирт метиловый (2:1) (раствор А).

Для анализа жирно-кислотного состава фракции общих липидов 3 мл раствора А помещали в выпарительную чашку и упаривали досуха при температуре не выше 50°C. Сухой остаток количественно переносили в круглодонную колбу вместимостью 100 мл 25 мл спиртового раствора калия гидроксида 0,5 М и проводили омыление на водяной бане, при температуре кипения смеси в течение 1 ч. После охлаждения смесь переносили в делительную воронку, прибавляли 25 мл воды и извлекали гексаном 3 раза по 25 мл. Органический слой промывали водой в делительной воронке до нейтральной реакции по фенолфталеину, упаривали досуха и оставляли для анализа неомыляемых веществ.

Водно-спиртовой остаток подкисляли хлористоводородной кислотой разведенной до слабокислой реакции и экстрагировали гексаном 3 раза по 25 мл. Гексановые извлечения объединяли в выпарительной чашке, упаривали до объема около 5 мл при температуре не выше 50°C, переносили с помощью пипетдозатора в грушевидную колбу вместимостью 25 мл и упаривали досуха.

К сухому остатку прибавляли 5 мл раствора ацетилхлорида 5% в спирте метиловом, колбу присоединяли к обратному холодильнику и проводили метилирование при температуре около 80°C в течение 40 мин.

После охлаждения к смеси прибавляли 3 мл воды и 2 мл гексана. Колбу плотно закрывали и интенсивно встряхивали в течение 3 мин. Гексановый слой с помощью пипетдозатора переносили в виалу вместимостью 2 мл, прибавляли 0,1 г натрия сернокислого и оставляли на 10 мин, затем декантировали в чистую сухую виалу и закрывали.

Полученный раствор анализировали на газовом хроматографе «СР-3800» (Varian), оснащенном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой CP –Select CB for FAME (100 м) в следующих условиях: температура инжектора - 270°C; деление потока - 100:1; температура в термостате колонок - 200°C; температура детектора - 300°C; скорость потока газа носителя (азот) - 1 мл/мин; скорость подачи вспомогательного газа –

25 мл/мин; скорость подачи водорода – 30 мл/мин; скорость подачи воздуха – 300 мл/мин; объем инъекции – 1 мкл.

Для идентификации жирных кислот на хроматограмме испытуемого раствора использовали смесь СО метиловых эфиров жирных кислот (Sigma), а так же кедровое, льняное и арахисовое масла, полученные в условиях лаборатории из семян и орехов экстракцией гексаном и подготовленные соответствующим образом [6,14].

Для получения фракций нейтральных и полярных липидов 3 мл раствора А наносили на стеклянную колонку заполненную селекагелем. Сначала 50 мл хлороформа элюировали нейтральные липиды, затем 50 мл спирта метилового – полярные.

Каждую фракцию упаривали досуха на роторном растворителе при температуре не выше 50°C и проводили омыление, метилирование и хроматографирование каждой фракции, как указано выше.

Количественное определение **витамина Е** в неомыляемой фракции проводили методом ВЭЖХ. Сухой остаток растворяли в спирте изопропиловом и хроматографировали в следующих условиях: диодно-матричный детектор; колонка Wakosil C18HG (250×4,6) мм, 5μм; аналитическая длина волны - 290 нм; элюент: ацетонитрил – изопропанол – вода для хроматографии (55:50:2); скорость потока – 1 мл/мин.

Витамин Е идентифицировали по времени удерживания и спектру поглощения и установили его количественное содержание. В качестве внешнего стандарта использовали токоферола ацетат и смесь токоферолов (Sigma).

Острую токсичность донника лекарственного травы и экстракта сухого определяли, согласно общепринятой методике, на интактных белых мышах обоего пола массой около 20 г [22]. Животные прошли двухнедельный карантин и содержались в стандартных условиях вивария при естественном

освещении. Кормление проводилось в фиксированное время. Для питья использовались автопоилки. Для каждого испытания брали по 10 мышей.

Испытуемые растворы подогревали до 37 °С и вводили внутривентрикулярно через зонд в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг. Состояние животных фиксировали через 4, 24 и 48 часов после введения препаратов и сравнивали с самочувствием животных в контрольной группе.

Изучение влияния на гемостаз проводили на былых крысах линии «Wistar» массой 200-230 г [31,56,65]. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Кормление проводилось в фиксированное время. Для питья использовались автопоилки.

Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе НЗ34. Определение показателей гемостаза проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре «Минилаб 701».

Определение протромбинового времени осуществляли с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» Техпластин[™] – тест.

Определение тромбинового времени проводили с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» Тромбо-тест. Набор предназначен для оценки тромбинового времени при диагностике нарушений конечного этапа свертывания крови.

Определение содержания фибриногена проводили с помощью набора реагентов фирмы «Ренам-НПО» ОптиФибриноген-тест.

Определение сроков годности донника лекарственного травы и экстракта сухого

Срок годности устанавливали по результатам анализа 6 серий растительного сырья, заложенных на хранение с июля 2010 года, и 3 серий донника лекарственного травы экстракта сухого, заложенных на хранение с февраля 2011 года. Растительное сырье хранили при температуре 10-25⁰С и

относительной влажности 40-70% в тюках и многослойных бумажных мешках, экстракт - при тех же условиях в двойных пакетах, изготовленных из комбинированных материалов по ГОСТ 2226-88 [18]. Показатели доброкачественности цельного и измельченного растительного сырья (внешние признаки, потеря в массе при высушивании, зола общая, количественное содержание кумарина, содержание дикумарина) оценивали через каждые 6 мес в течение 2,5 лет (срок наблюдения). Показатели доброкачественности донника лекарственного травы экстракта сухого (внешние признаки, потеря в массе при высушивании, количественное содержание кумарина) определяли через каждые 6 мес в течение 2 лет (срок наблюдения).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по ГФ XI. Однородность выборок оценивали, сравнивая значения экспериментального контрольного критерия Q , полученные для крайних вариант выборки (x , x_n), с табличным значением $Q(P, n)$. Если хотя бы одно из вычисленных значений Q превышало табличное, выборку признавали неоднородной и отбрасывали варианты, для которых $Q > Q(P, n)$. Для полученной выборки меньшего объема повторяли цикл вычислений. Полученная в конечном итоге однородная выборка использовалась для вычисления среднего результата ($\bar{x}$), стандартного отклонения (S), стандартного отклонения среднего результата ($S_{\bar{x}}$), доверительного интервала ($\Delta \bar{x}$) и относительной погрешности среднего результата (ϵ). Проверку статистической значимости разницы средних результатов двух выборок проводили, вычисляя экспериментальный критерий Стьюдента. В случае превышения величины экспериментального критерия Стьюдента (t_p) над табличным значением $t(P, f)$, различия между средними результатами выборок считали значимыми. Для установления линейной зависимости между переменными, рассчитывали величину коэффициента корреляции (r). Использовали компьютерную программу MS Excel.

ГЛАВА III

Фитохимическое изучение донника лекарственного травы и экстракта сухого.

Настоящая глава посвящена изучению основных групп биологически активных соединений донника лекарственного травы и экстракта сухого. Данные о химическом составе необходимы для разработки показателей, позволяющих устанавливать подлинность и контролировать качество растительного сырья и экстракта сухого.

3.1 Качественный анализ БАС

Для оценки группового состава БАС растительного сырья и экстракта сухого проводили качественные реакции по общепринятым методикам (глава II).

Извлечения, полученные из воздушно–сухого растительного сырья, оценивали на наличие фенольных соединений, кумаринов, флавоноидов, полисахаридов, сапонинов, дубильных веществ, пигментов, алкалоидов, аминокислот, антраценпроизводных, аминокислот.

В качестве экстрагентов использовали оптимальные для извлечения возможных групп БАС растворители: воду, спирт этиловый 30 %, 50 %, 80 %, 96 %, спирт метиловый, ацетон, хлороформ, гексан.

Для изучения состава БАС донника лекарственного травы экстракта сухого получали извлечения на ультразвуковой бане с использованием указанных растворителей. Результаты исследований представлены представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты оценки группового состава БАС донника лекарственного травы и экстракта сухого

Реактив	Основные группы БАС	Результат реакции	
		Растительное сырье	Экстракт
Аммиака раствор 10%	Флавоны, флавононы, флавонолы (желтый) Антрахиноны (красный) Ауроны, халконы (оранжево-красный)	Желтый	Желтый
Цианидиновая проба	Флавоны, флавононы, флавонолы (от оранжево-красного до малинового)	Красный	Красный
Алюминия хлорида спиртовой раствор 5%	Флавоны, флавонолы, другие фенольные соединения с рядовым расположением ОН-групп или сочетанием С=О и ОН-групп (зеленовато-желтая флуоресценция)	Зеленовато-желтая флуоресценция	Зеленовато-желтая флуоресценция
Свинца ацетата среднего раствор 2%	Флавоны, халконы, ауроны, флавонолы с о-диоксигруппировкой (желтый) Антоцианы (красный, синий)	Желтый	Желтый
Раствор сурьмы (III)хлористой 5%	5-оксифлавоны, 5-оксифлавонолы (желтое или красное окрашивание)	Желтое окрашивание	Желтое окрашивание
Диазотированная сульфаниловая кислота	Кумарины (от оранжевого до вишневого)	Оранжевый	Оранжевый

Продолжение таблицы 4

Лактонная проба	Кумарины (желтый)	Желтый	Желтый
Сублимация	Кумарины (игольчатые кристаллы при нагревании до 100°C)	Бесцветные игольчатые кристаллы	Бесцветные игольчатые кристаллы
Железа (III)хлорида раствор 2%	Фенольные соединения (от коричневого до черного)	Коричневый	Коричневый
Свинца ацетата раствор 10%	Полифенольные соединения (осадок)	Желтый осадок	Желтый осадок
Железоаммониевых квасцов раствор 1%	Гидролизуемые дубильные вещества (черно - синее) Конденсированные дубильные вещества(черно-зеленое)	Черно-коричневое в растворе Черно-синее на кожном порошке	Черно-коричневое в растворе Черно-синее на кожном порошке
Раствор желатина 1%	Дубильные вещества (помутнение)	Отсутствие	Помутнение
Раствор кислоты фосфорно-молибденовой 1%	Дубильные вещества (желтый осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Раствор хинин гидрохлорид 1%	Дубильные вещества (аморфный осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте 1%	Катехины, конденсированные дубильные вещества, антоцианы (красно-фиолетовый) Пирокатехин (бледно-розовый) Димеры флавоноидов (малиновый) Флюороглюциды (красный)	Отсутствие	Отсутствие

Продолжение таблицы 4

Раствор натрия гидроксида 10 %	Антраценпроизводные (от пурпурного до фиолетового)	Отсутствие	Отсутствие
Реактив Драгендорфа	Алкалоиды (желтый осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Реактив Майера	Алкалоиды (белый или желтоватый осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Раствор танина	Алкалоиды (белый или желтоватый осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Реактив Вагнера	Алкалоиды (бурый осадок)	Отсутствие	Отсутствие
Проба на пенообразование	Сапонины (устойчивая пена)	Устойчивая пена	Устойчивая пена
Спиртовый раствор холестерина 1 %	Сапонины (осадок)	Осадок	Осадок
Реакция Келлер-Килиани	Сердечные гликозиды (васильково-синий)	Отсутствие	Отсутствие
Реакция Розенгейма	Сердечные гликозиды (от розового до синего)	Отсутствие	Отсутствие
Реакция Либермана-Бурхарда	Сердечные гликозиды (от розового до синего)	Отсутствие	Отсутствие
Нингидрин	Аминокислоты, аминсахара, алкалоиды с NH_2 и NH группами (синий)	Синий	Синий
Спирт 96 %	Полисахариды (хлопьевидный осадок)	Хлопьевидный осадок	Хлопьевидный осадок

Результаты качественных реакций указывают на наличие в донника лекарственного травы и экстракте сухом кумаринов, флавоноидов группы флавона и флавонола, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, аминокислот.

Алкалоиды, флюороглюциды, антрахиноны, сердечные гликозиды в растительном сырье не обнаружены.

3.2. Идентификация и количественное определение БАС.

3.2.1. Флавоноиды

Для изучения качественного состава флавоноидов донника лекарственного травы и экстракта сухого применяли хроматографические методы (ТСХ, ВЭЖХ) и спектрофотометрию (глава II).

Извлечение для анализа методом ТСХ получали следующим образом: около 3 г донника лекарственного травы, измельченной до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 2 мм, или 0,3 г экстракта сухого, помещали в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта метилового и проводили экстракцию на ультразвуковой бане в течение 20 мин.

Полученное извлечение центрифугировали или фильтровали через фильтр «белая лента». 25 мкл наносили на линию старта хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 с алюминиевой подложкой (Merck) на расстоянии 2 см от нижнего края в виде полос длиной 10 мм.

В зависимости от состава подвижной фазы рядом наносили стандартные образцы агликонов: кверцетина, апигенина, лютеолина, мирицетина, кемпферола или гликозидов: гиперозида, рутина, изокверцитрина, апигенин-7-глюкозида, изовитексина, витексина.

Пластинку с нанесенными пробами помещали в хроматографическую камеру с системами растворителей, указанными в главе II (стр. 29), и хроматографировали восходящим способом.

В результате анализа методом ТСХ установлено, что флавоноиды в виде агликонов отсутствуют в донника лекарственного траве и экстракте сухом.

Оптимальное разделение гликозидов флавоноидов достигнуто в системе растворителей этилацетат - метилэтилкетон - муравьиная кислота - вода очищенная (5:3:1:1) – подвижной фазе, рекомендуемой для разделения флавонолгликозидов и флавоногликозидов (табл.5).

На хроматограммах в УФ-свете при 365 нм обнаруживались темно-коричневые зоны поглощения, характерные для флавоногликозидов. Хроматограммы опрыскивали раствором дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира 0,5% в спирте метиловом, нагревали при температуре 105°C, затем опрыскивали раствором макрогола 1% в спирте метиловом и выдерживали при комнатной температуре (реагент 1). Флавоноиды обнаруживались в виде оранжевых и желтых флуоресцирующих зон при просмотре в УФ-свете при 365 нм (рис.4).

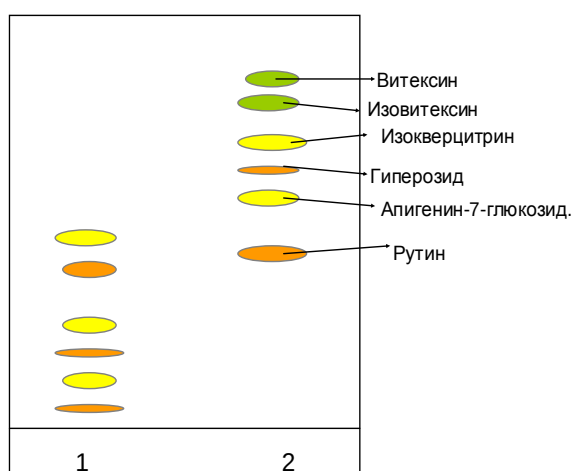


Рис.4 Хроматограмма флавоноидов донника лекарственного травы
Трек 1- флавоноиды донника лекарственного травы
Трек 2- стандартные образцы флавоноидов

Таблица 5

Результаты ТСХ-разделения флавоноидов донника лекарственного травы
и экстракта сухого

Исследуемый образец	Rf	УФ, 365 нм	Реагент 1, видимый свет	Реагент 1, УФ, 365 нм	Реагент 2, УФ, 365 нм
Донника лекарственного трава	0,05 ± 0,01	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,13 ± 0,01	Коричневая	-	Желтая	Зеленая
	0,22 ± 0,02	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,26 ± 0,02	Коричневая	Желтая	Желтая	Зеленая
	0,40 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,47 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Желтая	Зеленая
Экстракт сухой	0,04 ± 0,01	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,12 ± 0,01	Коричневая	-	Желтая	Зеленая
	0,20 ± 0,02	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,25 ± 0,02	Коричневая	Желтая	Желтая	Зеленая
	0,39 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
	0,45 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Желтая	Зеленая
Рутин	0,46 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
Апигенин-7-глюкозид	0,65 ± 0,03	Коричневая	-	Желтая	Зеленая
Гиперозид	0,67 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Оранжевая	Зеленая
Изокверцитрин	0,72 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Желтая	Зеленая
Изовитексин	0,76 ± 0,03	Коричневая	Желтая	Зеленая	Зеленая
Витексин	0,78 ± 0,04	Коричневая	Желтая	Зеленая	Зеленая

В результате исследований методом ТСХ в донника лекарственного траве и экстракте обнаружено 6 веществ флавоноидной природы, которые по хроматографическому поведению и окраске специфичными реагентами отнесены к флавонолгликозидам с двумя и более моносахаридными остатками.

Изучение структуры флавоноидов с применением метода ВЭЖХ

Для исследования агликонового состава флавоноидов, растительное сырье экстрагировали спиртом метиловым, проводили гидролиз в среде хлористоводородной кислоты, затем проводили жидко-жидкостную экстракцию эфиром.

Эфирные извлечения упаривали досуха, сухой остаток растворяли в спирте метиловом. Полученный раствор агликонов анализировали методом ВЭЖХ. Условия пробоподготовки и хроматографирования указаны в главе II (стр. 35). В связи со значительным различием хроматографической подвижности БАС, анализ проводили по результатам двух хроматографических разгонок с разным режимом элюирования.

Идентификацию компонентов проводили по временам удерживания и электронным спектрам. В качестве стандартных образцов использовали коммерчески доступные индивидуальные вещества фирмы Sigma: витексин, изовитексин, апигенин, лютеолин, мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А, гинестеин, даидзеин.

В результате проведенных исследований в растительном сырье идентифицировано 6 агликонов флавоноидной природы: мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А (рис.5,6).

Пик с временем удерживания 13,976 мин на рисунке 5 – мирицетин; 14,284 мин – сопутствующее вещество; 16,549 мин - кверцетин; 16,783 мин – сопутствующее вещество (кумарин); 19,007 мин – кемпферол; 19,339 мин – изорамнетин; 19,940 мин – сопутствующее вещество.

Пики с временами удерживания 22,162 мин и 25,536 мин на рисунке 6 соответствуют по временам удерживания и спектрам поглощения формонетину и биоханину А соответственно (рис.7).

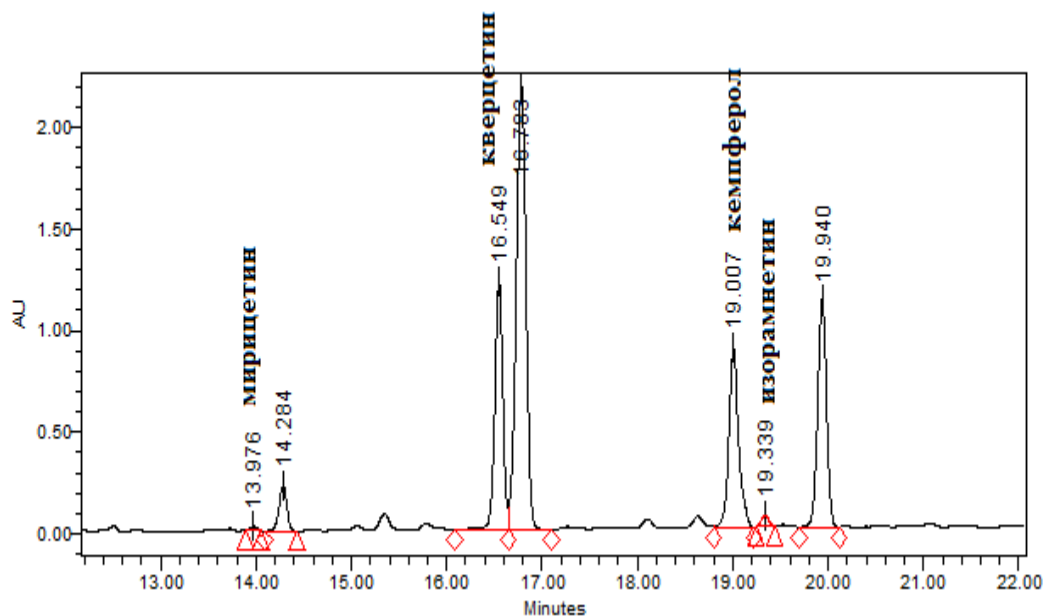


Рис 5. Хроматограмма агликонов растительного сырья. Градиентный режим: от 10 % до 40 % элюент В, 40% элюент В в течение 20 мин (элюент А – раствор ортофосфорной кислоты 0,1%, элюент В – ацетонитрил).

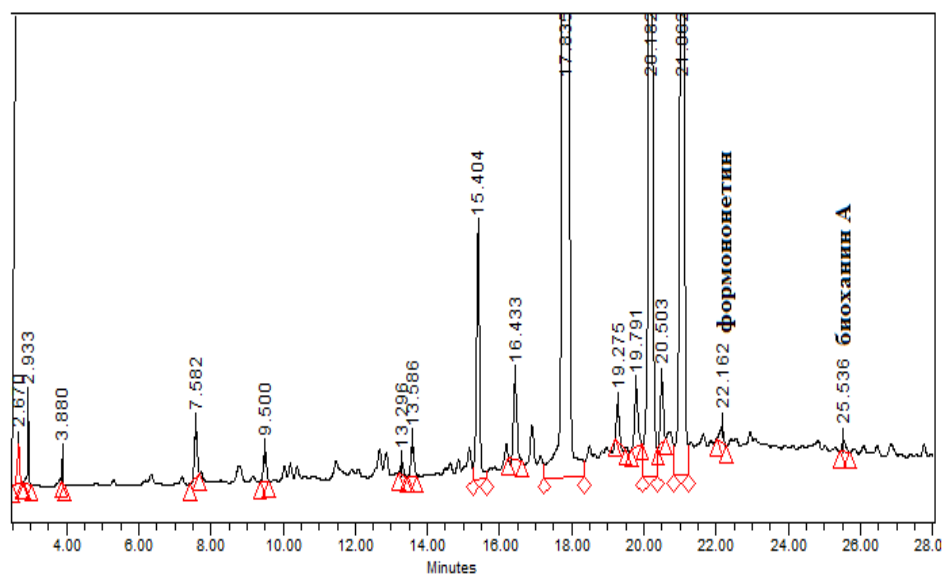


Рис 6. Хроматограмма агликонов растительного сырья. Изократический режим, элюент: ацетонитрил – раствор ортофосфорной кислоты 0,1% (1:9). 22,162 мин – формонетин; 25,536 мин – биханин А.

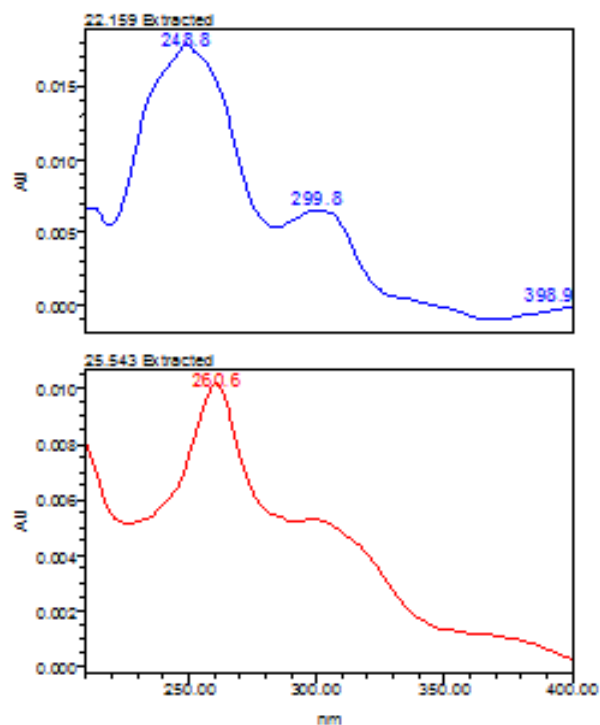


Рис.7. Спектры поглощения пиков с временами удерживания 22,162 мин (формонетин) и 25,536 мин (биоханин А).

Количественное содержание агликонов определяли методом внешнего стандарта в сравнении с хроматограммами стандартных растворов индивидуальных веществ (табл.6).

ВЭЖХ анализ метанольного извлечения растительного сырья и экстракта показал, что в виде индивидуальных соединений указанные агликоны в донника лекарственного траве и экстракте не содержатся.

Для подтверждения наличия изофлавоноидов биоханина и формонетина в растительном сырье, раствор агликонов анализировали методом ТСХ в системе растворителей ацетонитрил – бутанол - аммиак водный – хлороформ (30:5:1:120). В качестве свидетелей использовали индивидуальные вещества биоханин А и формонетин фирмы Sigma (0,1% растворы в спирте метиловом).

После обработки спиртовым раствором натрия борогидрида 1% хроматограмму просматривали в УФ-свете при 365 нм. Биоханин А и формононетин на треке стандартного раствора обнаруживались в виде зон зеленого и фиолетового цвета соответственно. На треке испытуемого раствора обнаруживались зоны по расположению и цвету соответствующие биоханину А и формононетину.

Полученные результаты подтверждают наличие производных биоханина А и формононетина в растительном сырье.

Таблица 6

Результаты анализа агликонового состава флавоноидных соединений растительного сырья

№ п/п	Время удерживания, мин	λ_{max} , нм	БАС	Содержание, %
1	$13,976 \pm 0,013$	251,2 376,0	Мирицетин	$0,004 \pm 0,001$
2	$16,549 \pm 0,015$	254,7 364,0	Кверцетин	$0,120 \pm 0,010$
3	$19,007 \pm 0,017$	266,6 364,0	Кемпферол	$0,210 \pm 0,020$
4	$19,339 \pm 0,016$	254,7 364,0	Изорамнетин	$0,010 \pm 0,001$
5	$22,162 \pm 0,024$	248,8 плечо 280-310	Формононетин	$0,002 \pm 0,001$
6	$25,536 \pm 0,026$	260,0 плечо 280-310	Биоханин А	$0,002 \pm 0,001$

Содержание в донника лекарственного траве кверцетина составило 0,12%, кемпферола – 0,21%. Остальные агликоны содержатся в растительном сырье в минорных количествах.

Из полученных данных следует, что флавоноиды донника лекарственного травы представлены преимущественно гликозидами кемпферола и кверцетина.

Для исследования структуры флавоноидов растительного сырья было проведено выделение флавоноидных фракций и индивидуальных флавоноидов.

200 г донника лекарственной травы, измельченной до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, исчерпывающе экстрагировали спиртом метиловым при соотношении сырье - экстрагент 1:10. Экстракцию проводили настаиванием в течение 10 дней в защищенном от света месте при комнатной температуре и периодическом перемешивании. Полученное извлечение декантировали. Экстракцию повторяли, контролируя полноту извлечения методом ВЭЖХ по наличию/отсутствию спектров, характерных для флавоноловых производных.

Объединенные метанольные извлечения упаривали досуха, сухой остаток растворяли в горячей воде очищенной и после охлаждения фильтровали, удаляя выпавшие в осадок сопутствующие вещества.

Водный экстракт сгущали, отмывали хлороформом от липофильных соединений и проводили дробную жидко - жидкостную экстракцию и фракционирование с использованием колоночной хроматографии с полиамидом, по схеме, представленной на рисунке 8. Состав каждой фракции контролировали методом ВЭЖХ.

В результате получены две очищенные от сопутствующих веществ и сконцентрированные флавоноидные фракции: 1 - моногликозиды; 2 - флавоноиды с двумя и более сахарными остатками.

В 1-ой фракции методом ВЭЖХ обнаружено шесть компонентов, имеющих электронные спектры, характерные для флавонолов. Три из них, судя по гипсохромному сдвигу в первой полосе спектра поглощения, имеют замещение в 3 - ОН группе, т.е. являются 3-О- моногликозидами (рис. 9, 10).

Время удерживания доминирующего пика на хроматограмме этиацетатного извлечения (12,040 мин) соответствует времени удерживания пика СО гиперозида на хроматограмме стандартного раствора.

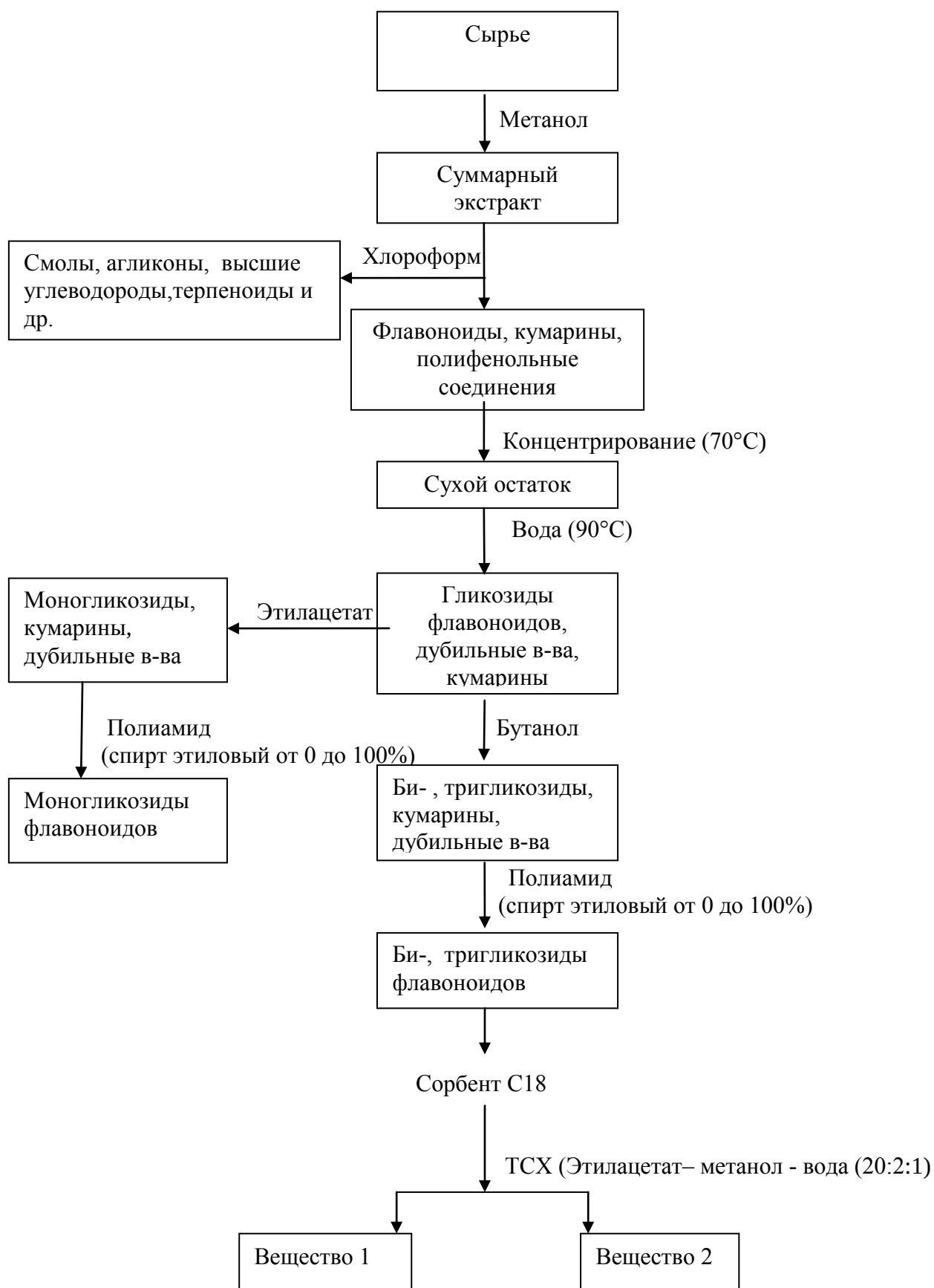


Рис 8. Схема выделения флавоноидов донника лекарственного травы

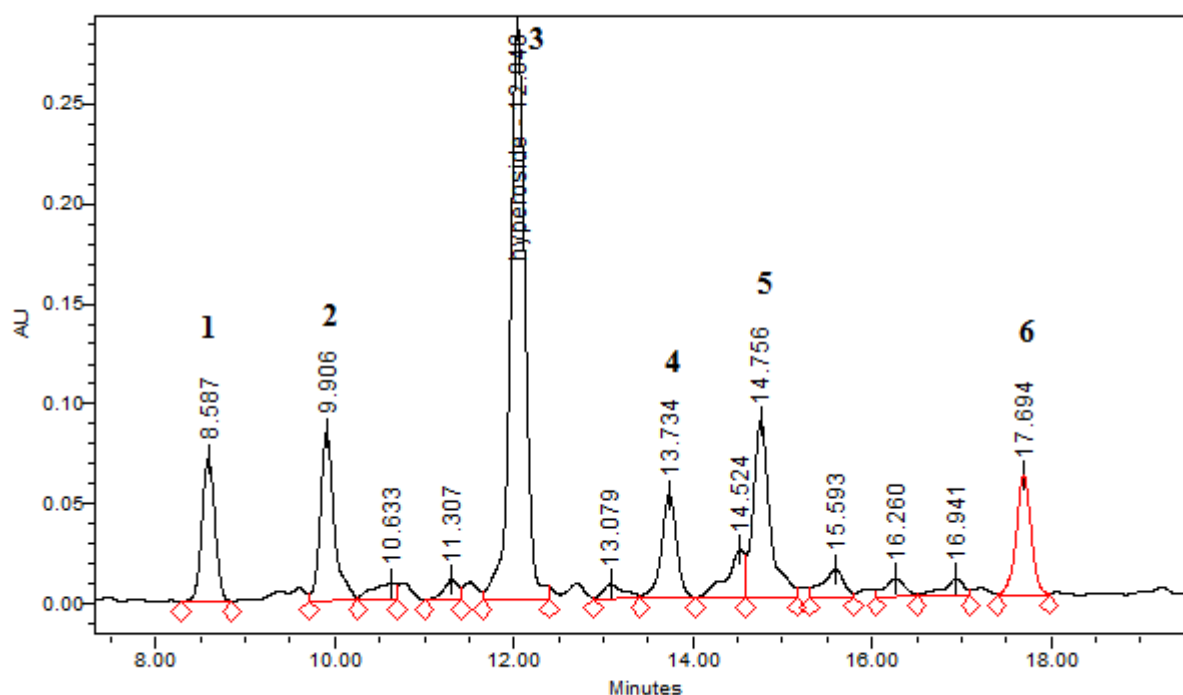


Рис. 9. Хроматограмма этилацетатного извлечения растительного сырья.

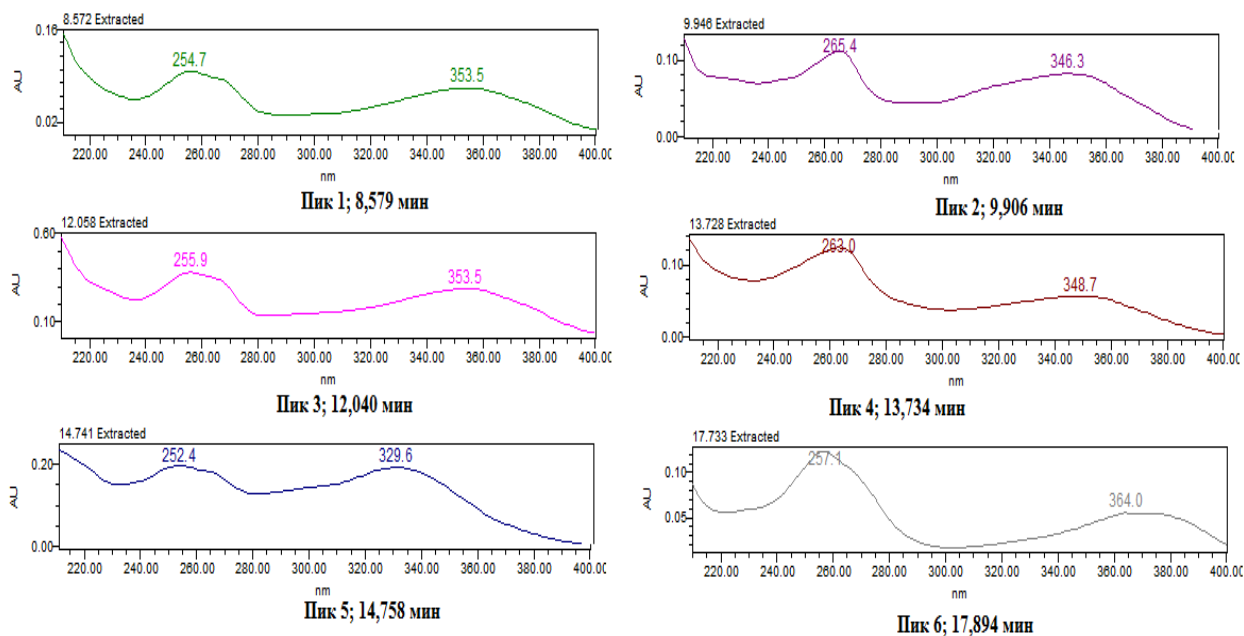


Рис. 10. Спектры поглощения пиков 1;2;3 (гиперозид);4;5;6 на рисунке 9, имеют максимумы, характерные для флавоногликозидов: I полоса - (330-364) нм; II полоса – (254-265) нм

Из 2-ой фракции, содержащей по результатам ВЭЖХ анализа 14 соединений флавоноидной природы, с помощью твердофазной экстракции на патроне C18, удалось выделить сумму 2-х доминирующих гликозидов, близких по хроматографической подвижности и имеющих спектры поглощения, характерные для флавонолгликозидов (рис. 11).

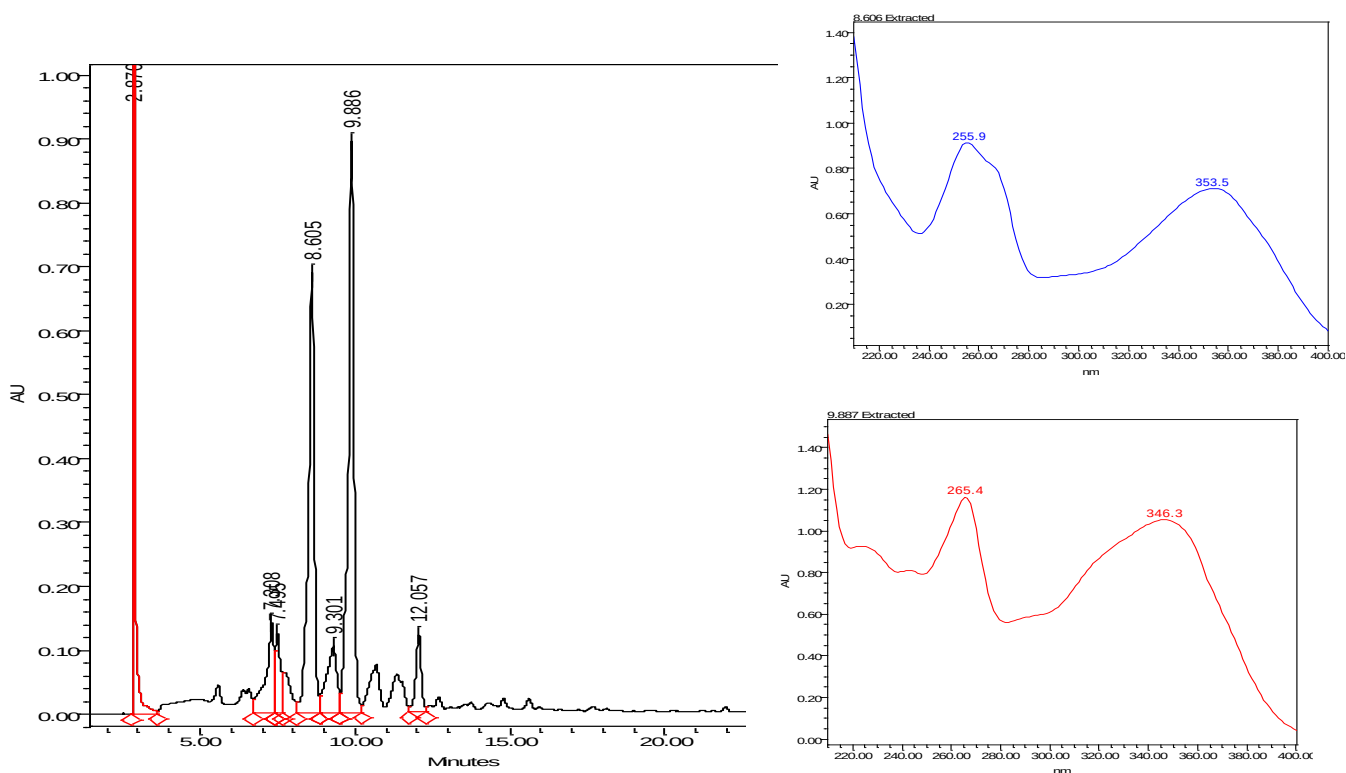


Рис. 11. Хроматограмма бутанольной фракции флавоноидов донника лекарственного травы после твердофазной экстракции на патроне C18 и спектры поглощения основных пиков.

Спектр поглощения пика с временем удерживания 8,605 мин на рисунке 11 имеет максимумы при 354 и 256 нм; 9,886 мин – при 346 и 265 нм.

С помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии данные вещества получены в индивидуальном виде. Оба вещества желтого цвета, на хроматограммах в УФ-свете обнаруживаются в виде темно-коричневых зон.

Для установления структуры выделенных веществ применяли УФ-дифференциальную спектрофотометрию с диагностическими добавками. Спектры метанольных растворов веществ с комплексообразующими реагентами регистрировали на спектрофотометре Cary 300 (Varian).

Параллельно исследовали кинетику гидролиза веществ с использованием метода ВЭЖХ. Для этого 1 мг вещества растворяли в 5 мл спирта метилового, по 1 мл раствора помещали в вials для хроматографии, прибавляли по 0,1 мл раствора хлористоводородной кислоты 0,1н., закрывали крышками с септами и устанавливали на водяную баню. Через установленные промежутки времени вials снимали с водяной бани, помещали в карусель хроматографа и проводили хроматографирование.

На рисунках 12-15 представлены хроматограммы, полученные при изучении кинетики гидролиза вещества 1.

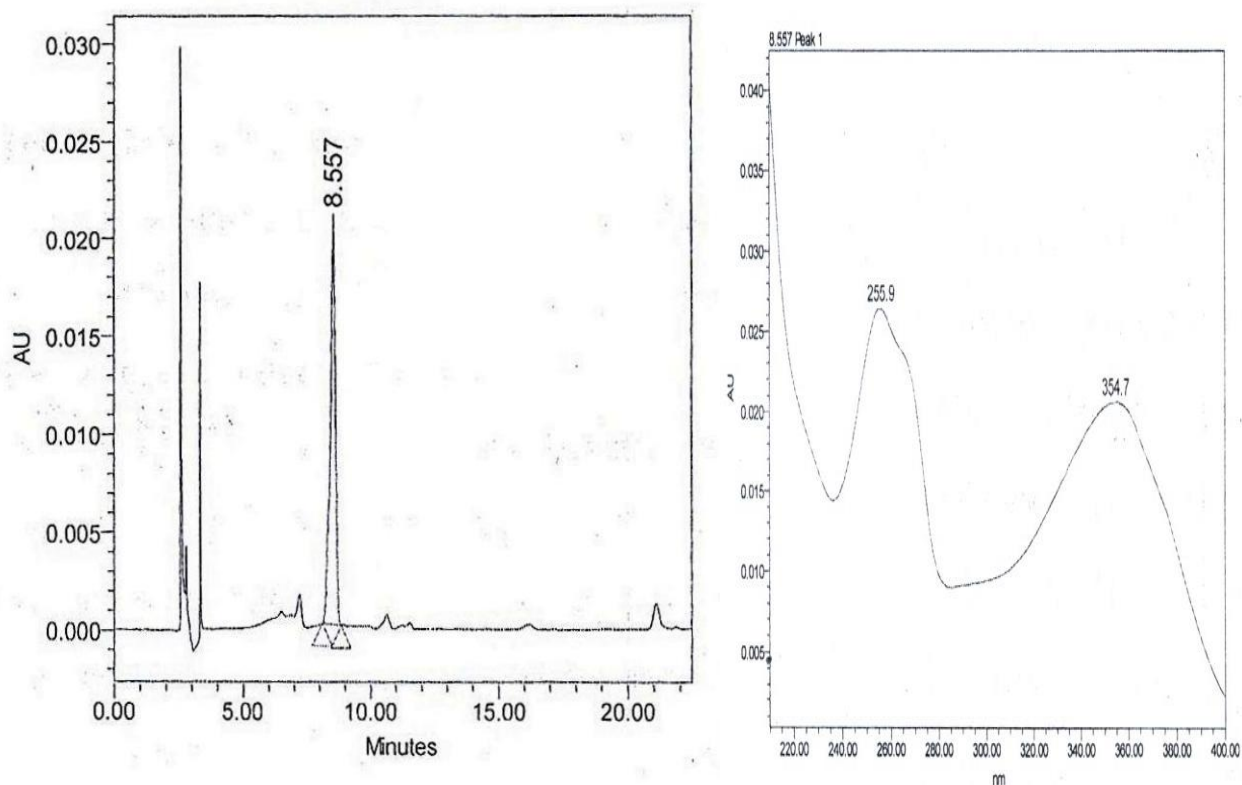


Рис. 12. Хроматограмма и спектр поглощения вещества 1 (8,557 мин), выделенного из донника лекарственного травы

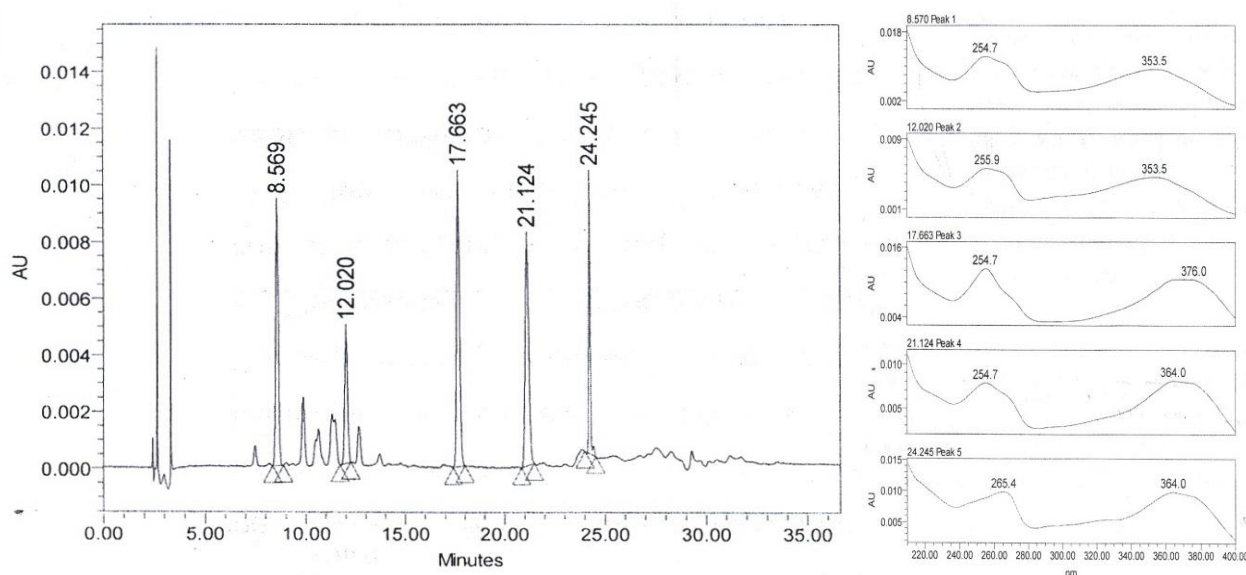


Рис.13. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектры поглощения продуктов, образовавшихся после 10 мин гидролиза

На рисунке 13 пик с временем удерживания 8,569 мин (max=254,7; 353,5нм) – исходное вещество, пики 12,020 мин (max=255,9; 353,5нм); 17,663 мин (max=254,7; 376 нм); 21,124 мин (max=254,7; 364нм) – промежуточные гликозиды, пик 24,245 мин (max=265,4; 364нм) – конечный продукт гидролиза (кемпферол).

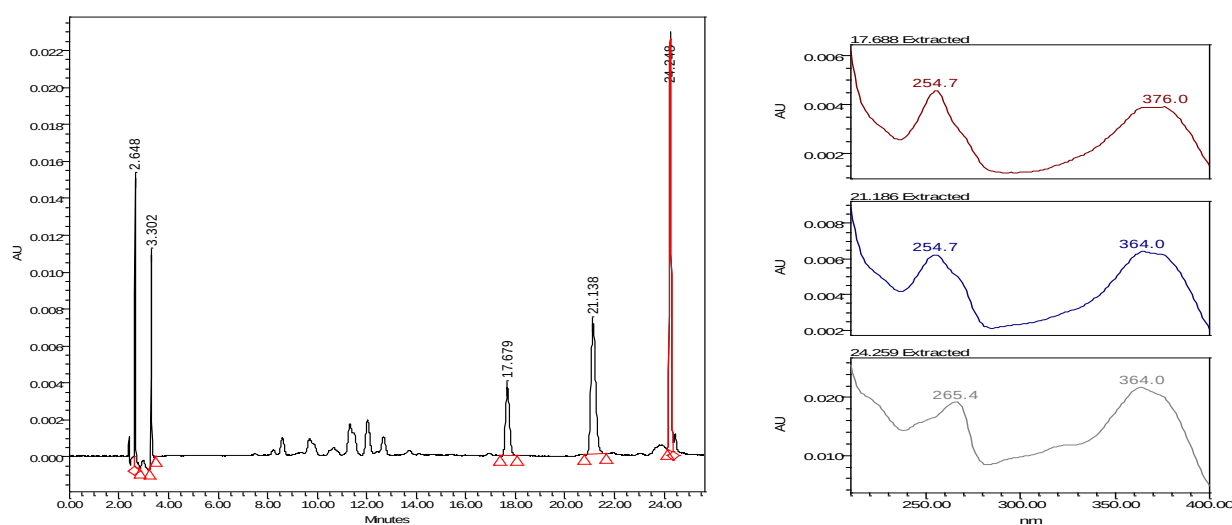


Рис.14. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектры поглощения продуктов гидролиза после 25 мин гидролиза.

На рисунке 14 пик исходного вещества и один из промежуточных гликозидов (12,020 мин) отсутствуют на хроматограмме.

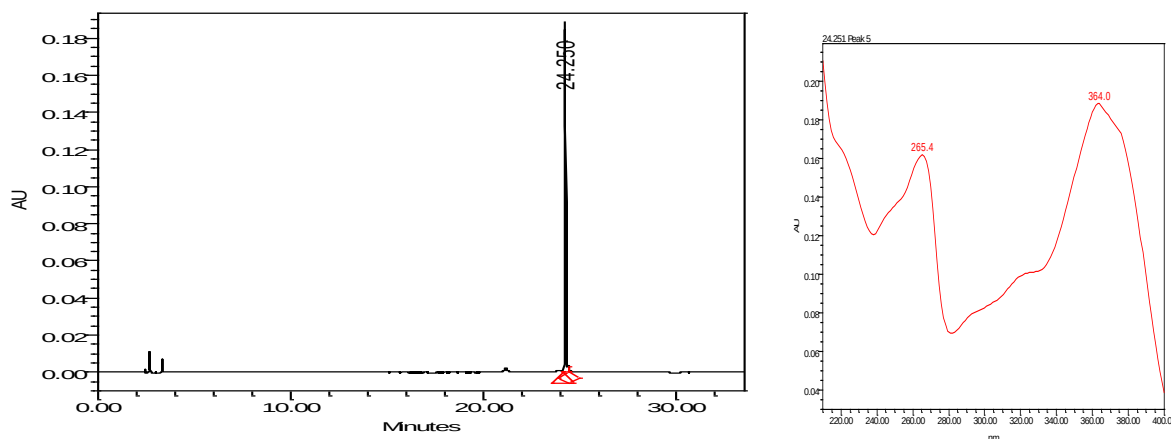


Рис.15. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектр поглощения продукта гидролиза после 40 мин гидролиза

На рисунке 15 присутствует один пик, идентифицированный как кемпферол – конечный продукт гидролиза.

Вещество 1 ($R = 8,6$ мин) – полный гидролиз до кемпферола (раствор кислоты хлористоводородной 0,1н.) происходит примерно за 40 мин, что указывает на отсутствие С-замещений. На 10-й минуте гидролиза появляется 3 промежуточных гликозида. В спектрах (ВЭЖХ) 2-х из них отсутствует гипсохромный сдвиг в первой полосе, что указывает на отсутствие заместителей в 3-ОН группе.

Характер спектра вещества 1 в метаноле указывает на его флавоноловую природу; гипсохромный сдвиг первой полосы поглощения указывает на замещение в 3 -ОН положении; батохромный сдвиг первой полосы на 40 нм без уменьшения интенсивности при добавлении натрия метилата указывает на наличие свободной 4'-ОН группы и подтверждает занятость 3-ОН группы; с натрия ацетатом отсутствует батохромия второй полосы и появляется дополнительное плечо на длинноволновом максимуме, что свидетельствует о

замещении в 7-ОН группе; образование устойчивого комплекса с алюминия хлоридом указывает на свободную 5-ОН группу.

Вещество 2 (R = 9,8 мин) – полный гидролиз до кемпферола (раствор кислоты хлористоводородной 0,1 н.) происходит примерно за 40 мин, что указывает на отсутствие С-замещений. На 10-й минуте гидролиза на хроматограмме присутствуют 3 пика: вещество 2, промежуточный гликозид, имеющий замещение в 3-ОН положении и конечный продукт гидролиза – кемпферол.

Характер спектра метанольного раствора вещества 2 указывает на его флавоноловую природу; гипсохромный сдвиг первой полосы поглощения - на замещение в 3 -ОН положении; батохромный сдвиг первой полосы на 40 нм без уменьшения интенсивности при добавлении натрия метилата указывает на наличие свободной 4'-ОН группы и подтверждает занятость 3-ОН группы; с натрия ацетатом наблюдается батохромия второй полосы на 8 нм, что свидетельствует о свободной 7-ОН группе; образование устойчивого комплекса с алюминия хлоридом указывает на свободную 5-ОН группу.

По результатам проведенного исследования установили структуру выделенных флавоноидов (рис. 16).

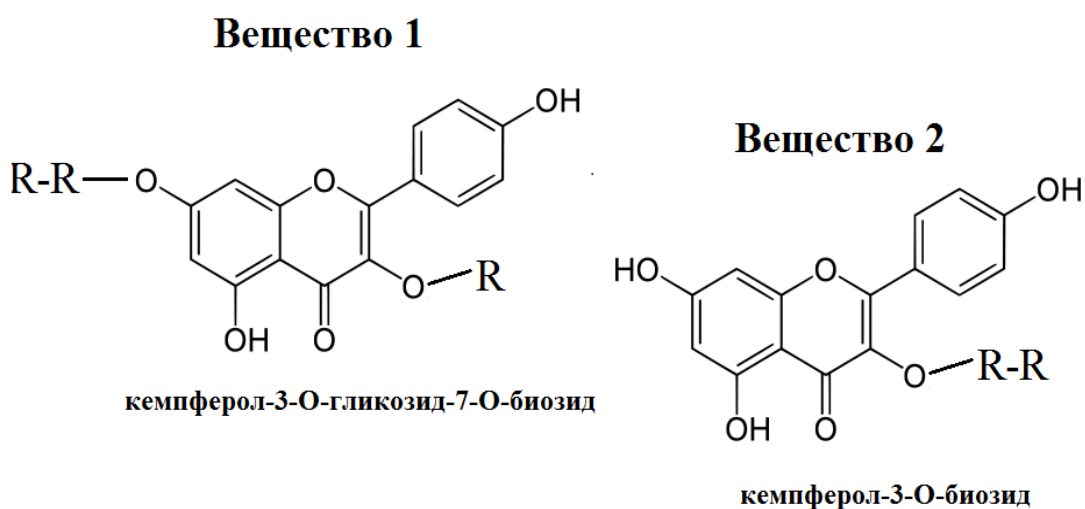


Рис.16. Структура флавоноидов, выделенных из донника лекарственного травы (R – моносахарид)

Определение количественного содержания флавоноидов

Количественное содержание суммы флавоноидов донника лекарственного травы и экстракта сухого определяли методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом по методике, представленной в главе II (стр. 35).

Для достижения максимального извлечения флавоноидов из растительного сырья использовали следующие экстрагенты: воду очищенную, спирт этиловый 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96% .

Из полученных результатов следует, что максимальное извлечение флавоноидов из растительного сырья достигается при использовании в качестве экстрагента спирта этилового с концентрацией от 40% до 60% (табл.7). В дальнейших испытаниях применяли спирт этиловый 50%.

Таблица 7

Результаты определения содержания суммы флавоноидов в образцах донника лекарственного травы, полученные при использовании разных экстрагентов

Экстрагент	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, % (n = 5, P = 95%, t _p = 2,78)		
	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	S $\bar{X}$	$\bar{X}$, %
Вода очищенная	1,21 ± 0,04	0,014	3,31
Спирт этиловый 20%	1,37 ± 0,02	0,007	1,46
Спирт этиловый 40%	1,60 ± 0,04	0,012	2,50
Спирт этиловый 50%	1,62 ± 0,03	0,011	1,85
Спирт этиловый 60 %	1,63 ± 0,02	0,005	1,23
Спирт этиловый 70%	1,59 ± 0,03	0,010	1,89
Спирт этиловый 80%	1,15 ± 0,03	0,012	2,61
Спирт этиловый 96%	0,89 ± 0,01	0,008	1,12

В качестве стандартного образца использовали рутин. Сняли спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца рутина. Максимум в спектре поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом совпадает с максимумом в спектре испытуемого раствора, что свидетельствует о достаточной специфичности методики (рис. 17).

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в образцах растительного сырья и экстракта сухого представлены в таблицах 8-9.

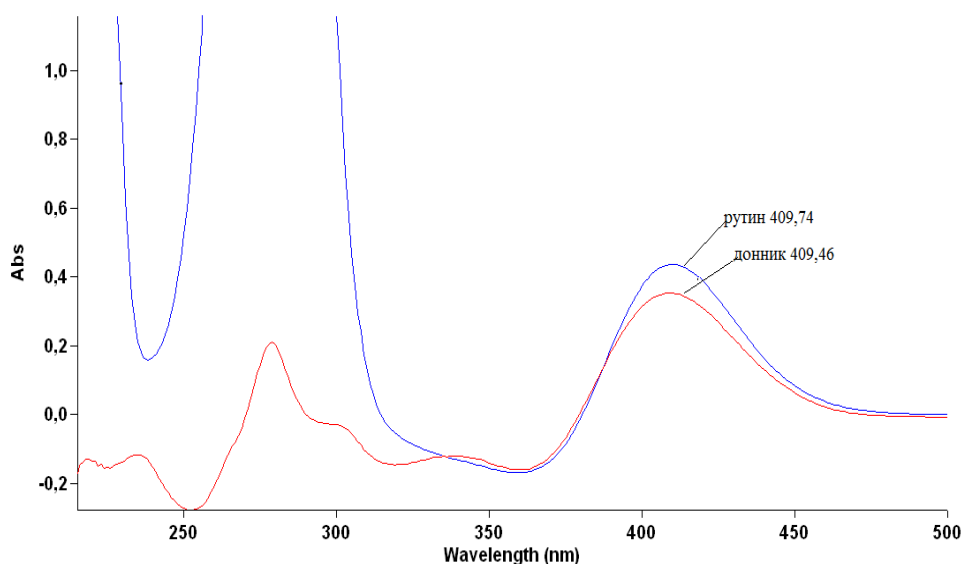


Рис.17. Спектры поглощения комплекса рутина и флавоноидов растительного сырья с хлоридом алюминия

Таблица 8

Содержание суммы флавоноидов в образцах донника лекарственного
травы, собранных из разных районов произрастания

№ п/п	Место сбора	Время сбора	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин и сухое сырье, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
			$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
1	Бийский район	20.06.10	1,37 ± 0,04	0,009	2,9
2	Бийский район	06.07.10	1,53 ± 0,03	0,007	2,0
3	Бийский район	16.07.10	1,34 ± 0,02	0,004	1,6
4	Бийский район	03.08.10	1,56 ± 0,04	0,008	2,6
5	Красногорский район	11.07.10	1,68 ± 0,04	0,009	2,4
6	Алтайский район	08.07.10	1,91 ± 0,05	0,010	2,6
7	Зональный район	02.08.10	1,73 ± 0,04	0,008	2,3
8	Завьяловский район	10.06.10	1,24 ± 0,02	0,004	1,6
9	Завьяловский район	11.07.10	1,18 ± 0,03	0,007	2,5
10	Завьяловский район	24.07.10	1,30 ± 0,03	0,006	2,3
11	Завьяловский район	15.08.10	1,33 ± 0,03	0,006	2,3
12	Завьяловский район	29.08.10	1,12 ± 0,02	0,004	1,8
13	Мамонтовский район	17.08.10	1,29 ± 0,04	0,009	3,1

Таблица 9

Содержание суммы флавоноидов в донника лекарственного травы
экстракте сухом

№ п/п	Номер производственной партии	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин и сухое вещество, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
		$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
1	010211	2,78 ± 0,05	0,012	1,8
2	020211	3,42 ± 0,06	0,014	1,8
3	030211	3,06 ± 0,09	0,020	2,9

Содержание суммы флавоноидов в донника лекарственного траве составляет от 1,1 до 1,9%. В экстракте сухом содержится около 3% флавоноидов в пересчете на рутин.

3.2.2. Кумарины

Для изучения кумаринов и кумаровых кислот растительного сырья и экстракта использовали методы ТСХ, ВЭЖХ и спектрофотометрию.

Метод ТСХ. Извлечение получали следующим образом: 0,3 г измельченного растительного сырья или 0,1 г сухого экстракта помещали в коническую колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 3 мл спирта метилового и проводили экстракцию на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин.

10 мкл полученного извлечения наносили на линию старта хроматографических пластин TLC Silica gel 60 с алюминиевой подложкой (Merck) на расстоянии 2 см от нижнего края в виде полос длиной 10 мм.

Рядом наносили по 10 мкл растворов СО скополетина, умбеллиферона, кумарина, о-кумаровой кислоты (Sigma) 0,05% в спирте метиловом.

Пластинки с нанесенными пробами помещали в хроматографические камеры с системами растворителей, указанными в главе II (стр. 29), предварительно насыщенными в течение 30 мин, и хроматографировали восходящим способом.

В зависимости от структуры кумарины в УФ-свете должны флуоресцировать голубым, зеленым, синим, фиолетовым или желтым цветом [23]. В связи с этим полученные хроматограммы после высушивания просматривали в УФ свете при 365 нм.

Затем пластинки опрыскивали натрия гидроксида спиртовым раствором 2%, нагревали при температуре 120°C и просматривали в УФ-свете (365 нм).

Далее хроматограмму обрабатывали раствором диазотированной сульфаниловой кислоты и просматривали при дневном свете.

Самое эффективное разделение достигнуто в системе растворителей уксусная кислота ледяная – диэтиловый эфир – толуол (10:50:50).

На хроматограммах испытуемых растворов обнаруживались две зоны по значению R_f соответствующие стандартному образцу кумарина (0,73) и о-кумаровой кислоты (0,35). Результаты хроматографического анализа представлены в таблице 10.

Таблица 10

Результаты ТСХ-анализа кумаринов донника лекарственного травы
и экстракта сухого

Исследуемый объект	R_f	До обработки, УФ, 365 нм	Обработка натрия гидроксида спиртовым раствором 2%, УФ, 365 нм	Обработка диазотированной сульфаниловой кислотой
Донника лекарственного трава	Старт	Коричневая	Желтая	Оранжевая
	0,35±0,02	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая
	0,73±0,03	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая
Экстракт сухой	Старт	Коричневая	Желтая	Оранжевая
	0,35±0,02	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая
	0,73±0,03	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая
О-кумаровая кислота	0,35±0,02	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая
Мелилотовая кислота	-	-	-	-
Кумарин	0,73±0,03	Голубая	Зеленая флуоресценция	Оранжевая

В результате исследований в донника лекарственного траве и экстракте сухом методом ТСХ идентифицированы кумарин и о-кумаровая кислота.

Зона старта предположительно включает гликозиды кумарина и флавоноидов. Данный вывод можно сделать исходя из состава используемой системы растворителей и по результатам взаимодействия с детектирующими реагентами.

Разработка методики количественного определения кумаринов

Для количественного определения кумаринов в донника лекарственного траве нами апробированы спектрофотометрический и колориметрический методы, как наиболее приемлемые для рутинного анализа. Проведена оценка их специфичности по отношению к объекту исследования: возможность достоверно определять содержание кумаринов в растительном сырье в присутствии сопутствующих веществ - флавоноидов.

Специфичность метода прямой спектрофотометрии оценивали по спектрам поглощения извлечений донника лекарственного травы, стандартного раствора кумарина, растворов модельных смесей кумарина и рутина. Спектры регистрировали на спектрофотометре «Cary 300» (Varian).

Специфичность колориметрического метода, основанного на реакции азосочетания, была оценена по спектрам поглощения продуктов реакции диазореактива с СО флавоноловых гликозидов, СО кумарина и извлечениями донника лекарственного травы.

Критерий приемлемости для спектрофотометрических методик: максимумы в спектрах поглощения стандартного и испытуемого растворов должны быть близкими, сопутствующие вещества не должны мешать исследованию.

При оценке специфичности спектрофотометрического метода установлено, что в спектрах водно-спиртовых извлечений донника лекарственного травы происходит наложение максимумов поглощения кумаринов и гликозидов

флавонолов, входящих в состав растения. Об этом свидетельствует отклик детектора в указанной области при добавлении к извлечению растительного сырья раствора СО рутина или СО гиперозида (рис. 18).

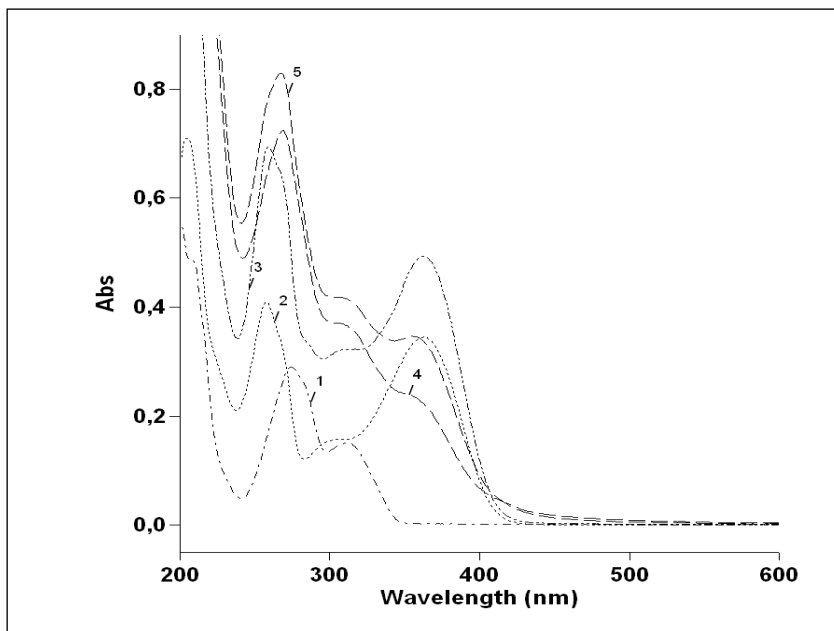


Рис.18. Спектры поглощения спиртовых растворов: 1- СО кумарина; 2- СО гиперозида; 3- смесь СО кумарина и СО гиперозида; 4- извлечение донника лекарственного травы; 5- извлечение донника лекарственного травы с добавкой СО гиперозида

Низкая специфичность методики по отношению к объекту исследований обусловлена тем, что флавоноиды, дубильные вещества и другие фенольные соединения, входящие в состав растительного сырья, в электронных спектрах имеют полосу поглощения при 250-280 нм характерную, в том числе, и для кумарина.

Колориметрический метод так же не специфичен применительно к донника лекарственного траве, ввиду значительного влияния флавонолов, образующих, как и кумарин, оранжевые комплексы с диазореактивом, поглощающие в той же области.

Применение спектрофотометрических методик для определения кумаринов в донника лекарственного траве и экстракте сухом требует их предварительного выделения. Это существенно усложняет рутинный анализ и уменьшает его воспроизводимость.

Методика определения индивидуального кумарина методом ВЭЖХ, примененная в Европейской фармакопее, на наш взгляд, не достаточно объективна, т.к. не учитывает содержащийся в растительном сырье гликозид кумарина (мелилотозид), обладающий биологической активностью кумарина.

Поэтому возникла необходимость в разработке методики количественного определения, позволяющей давать объективную оценку содержания кумарина в анализируемом объекте.

Для выбора оптимальных условий пробоподготовки, позволяющих извлекать максимальное количество кумарина и его производных из растительного сырья изучали влияние растворителя, температуры, времени и способа экстрагирования. Для анализа использовали сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2мм, что соответствует требованиям ГФ XI к степени измельченности травы для количественного анализа.

В качестве экстрагента применяли спирт метиловый, спирт этиловый в концентрации 40%, 50%, 60%, 80%, 96%. Воду очищенную не использовали, т.к. известно, что кумарин практически нерастворим в воде.

Измельченное сырье подвергали экстракции в соотношении сырья и экстрагента 1:100 с использованием ультразвуковой ванны Elmasonic S (УЗВ), перемешивающего устройства с вращающейся платформой LS 110 (ПУ) или водяной бани.

Полноту и влияние условий экстракции (экстрагент, способ мацерации, время, температура) контролировали методом ВЭЖХ по содержанию индивидуальных кумаринов в полученных извлечениях в условиях, описанных в главе II (стр. 33).

Кумарины идентифицировали по спектрам поглощения и временам удерживания в сравнении с СО о-кумаровой кислоты (Sigma, каталожный номер H2, 280-9), кумарина (Sigma, каталожный номер C4261), скополетина (Sigma, каталожный номер S2500), умбеллиферона (PhytoLab, каталожный номер 80098), мелилотовой кислоты (Aldrich, каталожный номер 39,353-3).

При исследовании методом ВЭЖХ, в извлечениях донника лекарственного травы обнаружено 4 соединения кумариновой природы: мелилотовая кислота, о-кумаровая кислота, кумарин и гликозид кумарина - компонент с временем удерживания 11,629 мин, имеющий спектр идентичный кумарину (рис.19).

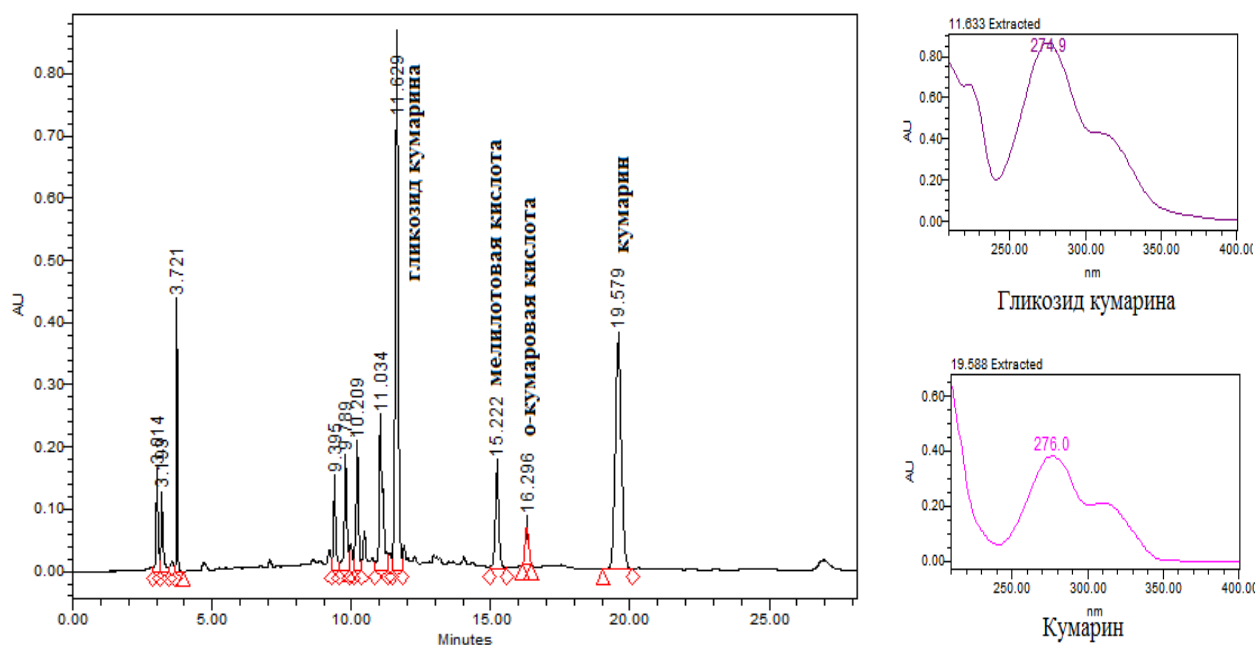


Рис.19. Хроматограмма водно-спиртового извлечения донника лекарственного травы и спектры поглощения пиков с временами удерживания 11,629 мин (гликозид кумарина) и 19,579 мин (кумарин)

Отсутствие данного компонента на хроматограмме гидролизата (рис. 20) и пропорциональное увеличение площади пика кумарина, позволило идентифицировать его, как гликозид кумарина.

Результаты идентификации кумаринов в извлечениях и их гидролизатах представлены в таблице 11.

Доминирующее содержание кумарина и его гликозида в составе кумаринов донника лекарственного травы (более 90% от суммы, полученной методом нормирования), коммерческая доступность СО кумарина позволяют заменить малоспецифичные групповые методы на анализ по пику кумарина методом ВЭЖХ, после предварительного гидролиза.

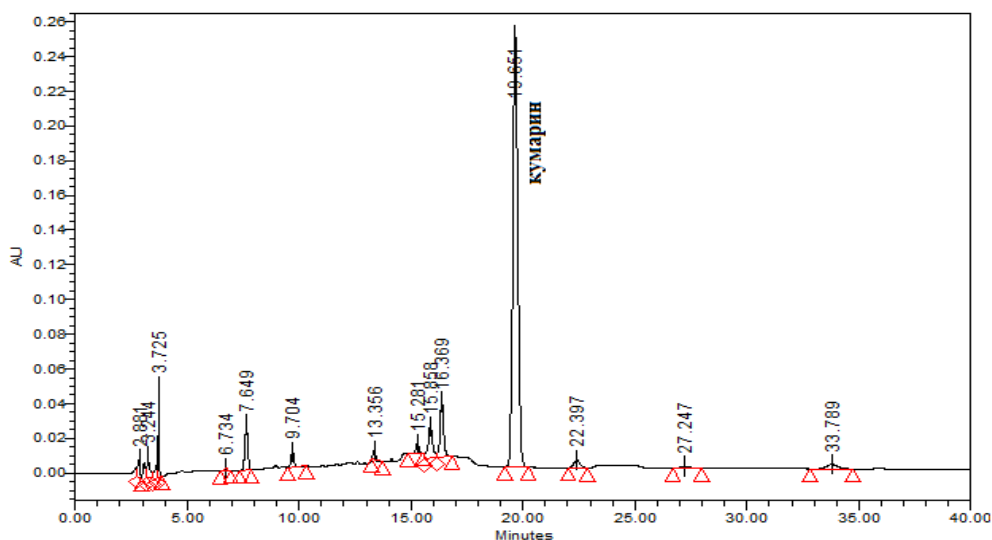


Рис. 20. Хроматограмма гидролизата водно-спиртового извлечения донника лекарственного травы

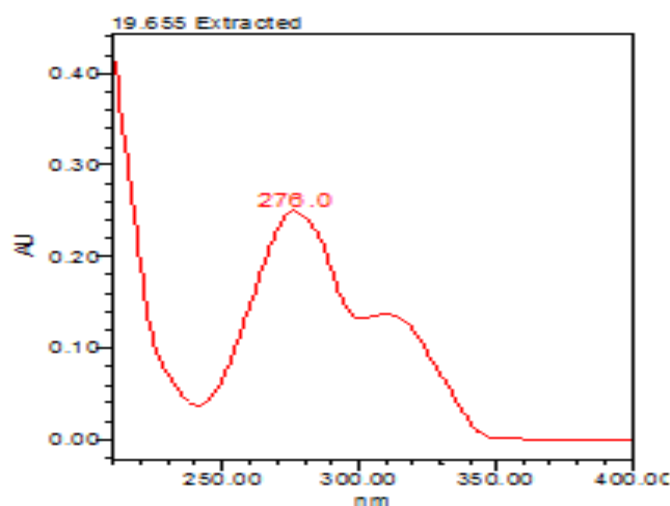


Рис.21. УФ-спектр кумарина (пик с временем удерживания 19,651 мин)

Таблица 11

Результаты идентификации кумаринов донника лекарственного травы в
сравнении с аутентичными образцами

Название компонента	Время удерживания компонента на хроматограмме извлечения, мин (рис. 18).	Время удерживания компонента на хроматограмме гидролизата, мин (рис. 20).
Гликозид кумарина	11,629	Не обнаружен
Мелилотовая кислота	15,222	15,281
О-кумаровая кислота	16,296	16,369
Кумарин	19,579	19,651
Скополетин	Не обнаружен	Не обнаружен
Умбеллиферон	Не обнаружен	Не обнаружен

При исследовании влияния условий экстракции на степень извлечения кумарина из растительного сырья установлено, что использование в качестве экстрагента спирта этилового в концентрации от 40% до 80% позволяет достигать максимальное содержание кумарина и его гликозида в извлечениях (табл. 12).

Как видно из данных таблицы 12, способ экстракции не оказывает существенного влияния на выход кумаринов. Использование ультразвуковой ванны не целесообразно, т.к. при простом перемешивании полнота экстракции достигается в течение того же времени. Использование температуры кипения не вызывает деградации кумаринов, а полнота экстракции достигается в течение более короткого времени.

Таким образом, оптимальными условиями пробоподготовки для количественного определения кумаринов в донника лекарственного траве является двукратная экстракция по 30 мин спиртом этиловым 50% на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения смеси: экстрактивные вещества - 36%, свободный кумарин - 0,64%, кумарин после гидролиза - 0,92%.

Таблица 12.

Влияние условий экстракции на степень извлечения кумарина

из донника лекарственного травы

Экстрагент	Способ экстракции, время, мин.	Свободный кумарин, %	Кумарин после гидролиза, %	Экстрактивные вещества, %
Метанол	УЗВ, 30	$0,48 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,04$	$32,1 \pm 2,6$
	УЗВ, 60	$0,63 \pm 0,03$		
	ПУ, 30	$0,33 \pm 0,02$		
	ПУ, 120	$0,50 \pm 0,03$		
	Баня, 30	$0,66 \pm 0,04$		
	Баня, 60	$0,66 \pm 0,03$		
	Баня, 90	$0,65 \pm 0,03$		
Спирт 96%	УЗВ, 30	$0,52 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,04$	$26,7 \pm 1,9$
	УЗВ, 60	$0,62 \pm 0,04$		
	ПУ, 30	$0,28 \pm 0,02$		
	ПУ, 120	$0,45 \pm 0,02$		
	Баня, 30	$0,60 \pm 0,03$		
	Баня, 60	$0,65 \pm 0,04$		
	Баня, 90	$0,65 \pm 0,03$		
Спирт 80 %	УЗВ, 30	$0,61 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,05$	$34,5 \pm 2,4$
	УЗВ, 60	$0,65 \pm 0,03$		
	ПУ, 30	$0,65 \pm 0,03$		
	ПУ, 120	$0,67 \pm 0,04$		
	Баня, 30	$0,66 \pm 0,03$		
	Баня, 60	$0,66 \pm 0,02$		
	Баня, 90	$0,67 \pm 0,03$		
Спирт 60%	УЗВ, 30	$0,55 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,04$	$37,4 \pm 2,2$
	УЗВ, 60	$0,64 \pm 0,03$		
	ПУ, 30	$0,63 \pm 0,02$		
	ПУ, 120	$0,64 \pm 0,03$		
	Баня, 30	$0,64 \pm 0,03$		
	Баня, 60	$0,64 \pm 0,03$		
	Баня, 90	$0,63 \pm 0,03$		
Спирт 50%	УЗВ, 30	$0,60 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,05$	$36,0 \pm 1,8$
	УЗВ, 60	$0,62 \pm 0,03$		
	ПУ, 60	$0,64 \pm 0,02$		
	ПУ, 120	$0,64 \pm 0,03$		
	Баня, 30	$0,63 \pm 0,02$		
	Баня, 60	$0,64 \pm 0,02$		
	Баня, 90	$0,64 \pm 0,03$		
Спирт 40%	УЗВ, 30	$0,52 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,03$	$36,0 \pm 2,0$
	УЗВ, 60	$0,66 \pm 0,03$		
	ПУ, 30	$0,69 \pm 0,04$		
	ПУ, 120	$0,75 \pm 0,04$		
	Баня, 30	$0,67 \pm 0,03$		
	Баня, 60	$0,74 \pm 0,04$		
	Баня, 90	$0,72 \pm 0,04$		

В результате предложена методика количественного определения суммарного кумарина, основанная на определении кумарина методом ВЭЖХ после предварительного кислотного гидролиза водно-спиртовых извлечений.

Методика. Около 1 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц не более 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 50% и экстрагируют на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин при температуре кипения смеси. Извлечение декантируют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще два раза, в тех же условиях. Объединенные извлечения охлаждают, доводят спиртом 50% до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента».

10,0 мл фильтрата помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и выдерживают на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения смеси в течение 1 ч.

Гидролизат охлаждают, количественно переносят спиртом этиловым 96% в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента» (испытуемый раствор).

Испытуемый раствор и раствор СО кумарина попеременно хроматографируют в условиях предложенных выше, в градиентном режиме: 20 мин - от 5% до 30 % элюента В; 10 мин - 30 % элюента В (элюент А - раствор ортофосфорной кислоты 0,1%, элюент В – ацетонитрил).

Содержание кумарина в растительном сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

S – площадь пика кумарина на хроматограмме испытуемого раствора ;

S_0 - площадь пика кумарина на хроматограмме раствора СО кумарина;

a - навеска растительного сырья, в граммах;

a_0 - навеска СО кумарина, в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах;

P - содержание основного вещества в СО кумарина, в процентах.

Приготовление раствора СО кумарина. Около 0,01 г кумарина (Sigma, каталожный № C4261 или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте 96%, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Валидация методики количественного определения кумарина в донника лекарственного траве

Валидационную оценку методики проводили по показателям специфичность, линейность, правильность, повторяемость, воспроизводимость, диапазон применения.

Нормы для критериев приемлемости валидационных характеристик установлены на основании рекомендаций ведущих фармакопей (USP, EP) и обусловлены типом методики (ВЭЖХ), анализируемым объектом (растительное сырье) и неопределенностью методики (табл.13).

Таблица 13

Критерии приемлемости валидационных характеристик методики
количественного определения кумарина в донника лекарственного траве

Валидационная характеристика	Критерий приемлемости
Линейность	Коэффициент корреляции не менее 0,990
Правильность	Границы открываемости 97 – 103 %
Повторяемость	RSD не более 3,0 %
Воспроизводимость	RSD не более 5,0 %

При изучении специфичности методики оценивали возможность распознавания определяемого компонента (кумарина) среди соединений родственной и неродственной природы, наличие которых в образце предполагается. Для этого, проводились следующие исследования:

- сравнение хроматограмм стандартного раствора кумарина и испытуемого образца до и после кислотного гидролиза: оценка УФ - спектров, времен удерживания, изменения площади пика кумарина;
- контроль спектральной чистоты пика кумарина на хроматограммах испытуемого образца для доказательства того, что хроматографический пик невозможно присвоить более, чем одному компоненту;
- оценка соответствия хроматографической подвижности пика кумарина на хроматограмме стандартного раствора и предполагаемого определяемого компонента (кумарина) на хроматограмме испытуемого раствора;
- при исследовании специфичности учитывались результаты, полученные методом добавок.

Из результатов исследования специфичности методики следует, что на хроматограмме, регистрируемой после гидролиза испытуемого раствора, компонент с временем удерживания 11,629 мин отсутствует; площадь пика, соответствующего по времени удерживания и УФ - спектру пику кумарина на хроматограмме стандартного раствора, увеличивается. Результаты оценки спектральной чистоты и хроматографической подвижности пика позволяют сделать вывод, что компонент с временем удерживания 19,651 мин на хроматограмме гидролизата – кумарин (табл. 14).

Линейность, повторяемость и правильность методики изучали в области от 80% до 150% от фактического содержания кумарина в образце, полученного по данной методике. Готовили 15 модельных смесей, по 3 на каждый уровень диапазона: 80%; 90%, 100%; 130% 150%. Для этого в навески растительного сырья, взятые из одного гомогенизированного образца, вносили расчетное

количество СО кумарина (в виде спиртового раствора). Уровень диапазона ниже 100% обеспечивали корректировкой навески растительного сырья.

Из модельных смесей в соответствии с валидируемой методикой, готовили и хроматографировали испытуемые растворы.

Для оценки линейности методики строили график зависимости площади пика кумарина от концентрации кумарина в испытуемом растворе (рис. 22).

Таблица 14

Результаты визуальной оценки хроматограмм водно-спиртового извлечения донника лекарственного травы до и после гидролиза в сравнении с хроматограммой раствора СО кумарина

Образец	Компонент, время удерживания, λ max			
	Гликозид кумарина		Кумарин	
Испытуемый раствор до гидролиза	11,629 мин	274,9 нм	19,579 мин	276 нм
Испытуемый раствор после гидролиза	-	-	19,651 мин	276 нм
Стандартный раствор кумарина	-	-	19,611 мин	276 нм

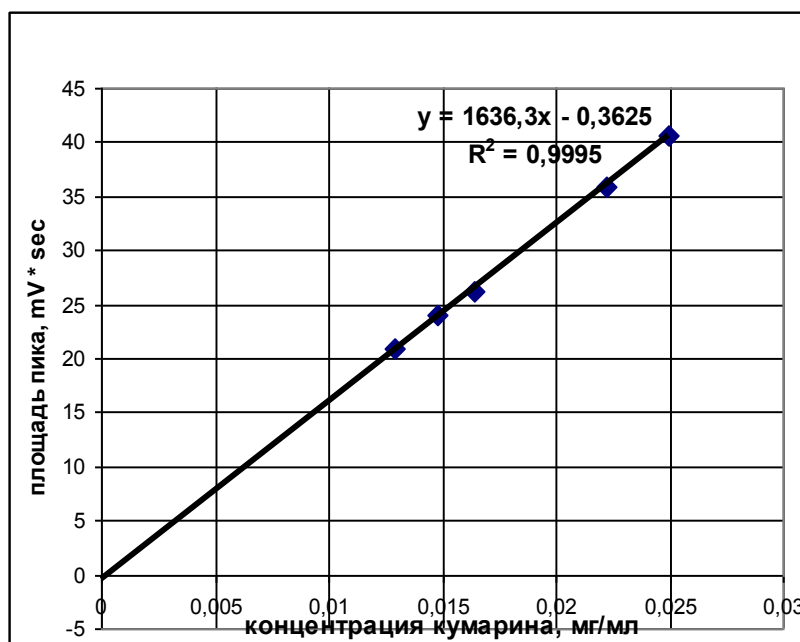


Рис. 22. График зависимости площади пика кумарина от концентрации кумарина в испытуемом растворе

Для оценки правильности и повторяемости использовали данные recovery (открываемость), полученные при изучении линейности. Рассчитали среднее значение, доверительный интервал, относительное стандартное отклонение открываемости (RSD) методики. Результаты представлены в таблице 15.

Воспроизводимость методики оценивали на трех образцах растительного сырья с различным содержанием кумарина. Анализ каждого образца проводили дважды, с интервалом в одну неделю. При этом использовали независимо приготовленные реактивы и хроматографические колонки разных производителей (Wakosil C18 RS (250×4,6) мм, 5μм и Symmetry C18 (250×4,6) мм, 5μм). Выполнили по три параллельных определения, вычислили RSD объединенных результатов анализа каждого образца (табл. 16).

В результате проведенных исследований установлено:

- методика достаточно специфична и позволяет с высокой степенью достоверности определять кумарин в донника лекарственного траве в присутствии других веществ;
- методика линейна, т.е. позволяет получать результаты пропорциональные концентрации анализируемого вещества в образце: коэффициент корреляции составил 0,9995;
- границы открываемости методики с учетом доверительного интервала находятся в пределах 97,8 % - 100,2 %, что свидетельствует о высокой степени соответствия между значением добавленного к образцу стандарта кумарина и значением, полученным по данной методике;
- RSD результатов количественного определения, полученных в условиях повторяемости менее 3 % , в условиях воспроизводимости – менее 5 %.
- в заданном диапазоне аналитическая методика удовлетворяет критериям приемлемости специфичности, линейности, правильности, повторяемости и воспроизводимости.

Таблица 15

Результаты оценки линейности, правильности и повторяемости методики

№ обра зца	Уровень диапазона	Расчетная концентрация кумарина, мг/мл	Эксперименталь- ные значения площади пика	Найдено кумарина, мг/мл	Открываем ость, R, %
1	80	0,0129	20,8447	0,0125	96,9
2	80	0,0131	22,1787	0,0133	101,5
3	80	0,0128	20,8446	0,0125	97,6
RSD = 2,51					
4	90	0,0148	24,0130	0,0144	97,3
5	90	0,0146	24,6801	0,0148	101,4
6	90	0,0148	23,6795	0,0143	96,9
RSD = 2,53					
7	100	0,0164	26,1809	0,0159	97,5
8	100	0,0160	27,0146	0,0162	101,2
9	100	0,0164	26,6811	0,0160	97,6
RSD = 2,13					
10	130	0,0222	35,8528	0,0215	96,8
11	130	0,0226	36,6866	0,0220	97,3
12	130	0,0228	38,5209	0,0231	101,3
RSD = 2,50					
13	150	0,0250	40,6887	0,0246	98,6
14	150	0,0260	43,8571	0,0263	101,1
15	150	0,0256	41,5225	0,0262	102,3
RSD = 2,14					
<i>Коэффициент корреляции, r</i>				0,9995	
<i>Коэффициент уравнения линейной регрессии, a</i>				1636,3	
<i>Коэффициент уравнения линейной регрессии, b</i>				0,3625	
<i>Средний результат открываемости, R_{ср}, %</i>				99,02	
<i>Доверительный интервал, ΔR, %</i>				1,18	
<i>Нижняя граница открываемости, R_{ср} - ΔR, %</i>				97,84	
<i>Верхняя граница открываемости, R_{ср} + ΔR, %</i>				100,2	

Таблица 16

Результаты оценки воспроизводимости методики

№ образца	Содержание кумарина, % Выборка 1	Содержание кумарина, % Выборка 2	Средний результат, %	RSD, %
1	0,48	0,52	0,51	4,64
	0,53	0,54		
	0,49	0,50		
2	0,83	0,80	0,82	3,22
	0,82	0,83		
	0,83	0,79		
3	1,39	1,44	1,38	3,31
	1,32	1,42		
	1,34	1,38		

Валидационная оценка показала обоснованность применения данной методики для определения содержания кумарина в донника лекарственного траве.

Далее по разработанной методике определили общее содержание кумарина в образцах донника лекарственного травы. Затем в водно-спиртовых извлечениях методом ВЭЖХ определили содержание свободного кумарина и кумаровых кислот. По разнице общего и свободного кумарина определили содержание в донника лекарственного траве связанного кумарина.

В таблице 17 представлены результаты количественного определения кумарина в растительном сырье методом ВЭЖХ.

Таблица 17

Содержание кумарина в образцах донника лекарственного травы, собранных из разных районов произрастания

Место сбора (район)	Общий кумарин, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)			Свободный кумарин, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)			Связанный кумарин, %
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	S $\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	S $\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	
Бийский	1,38 ± 0,04	0,010	3,0	0,61 ± 0,01	0,002	1,6	0,77
Бийский	1,48 ± 0,03	0,007	1,9	0,40 ± 0,01	0,004	2,5	1,08
Бийский	1,17 ± 0,03	0,006	2,6	0,25 ± 0,01	0,010	3,8	0,92
Бийский	1,00 ± 0,02	0,003	2,0	0,31 ± 0,01	0,006	3,2	0,69
Красногорский	1,23 ± 0,02	0,004	1,6	0,50 ± 0,02	0,004	3,0	0,73
Алтайский	1,09 ± 0,02	0,005	1,8	0,25 ± 0,01	0,002	3,0	0,84
<i>Зональный</i>	<i>0,40 ± 0,01</i>	<i>0,002</i>	2,5	<i>0,28 ± 0,01</i>	<i>0,002</i>	3,6	<i>0,12</i>
Завьяловский	0,97 ± 0,03	0,007	3,1	0,33 ± 0,01	0,002	3,0	0,64
Завьяловский	1,00 ± 0,02	0,004	2,0	0,70 ± 0,02	0,005	2,8	0,30
Завьяловский	1,02 ± 0,02	0,004	1,9	0,63 ± 0,02	0,004	3,2	0,39
Завьяловский	0,91 ± 0,03	0,006	3,3	0,55 ± 0,01	0,002	1,8	0,36
Завьяловский	0,99 ± 0,03	0,007	3,0	0,45 ± 0,02	0,004	3,4	0,54
Мамонтовский	0,84 ± 0,02	0,005	2,4	0,56 ± 0,02	0,004	3,6	0,28

В результате проведенных исследований установлено, что общее содержание кумарина в растительном сырье в период цветения составляет от 0,84 до 1,48 %, содержание свободного кумарина – от 0,25 до 0,70%, связанного кумарина – от 0,28 до 1,08%

В растительном сырье обнаружено до 0,163% о-кумаровой кислоты и до 0,073 % мелилотовой кислоты. Наблюдается тенденция к снижению содержания кумаровых кислот с течением вегетативного периода. В образцах, заготовленных в августе их количество ниже предела обнаружения (табл. 18).

Таблица 18

Содержание кумаровых кислот в образцах донника лекарственного травы,
собранных из разных районов произрастания

Место сбора (район)	Мелилотовая кислота, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)			О-кумаровая кислота, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Бийский	0,032 ± 0,002	0,0004	6,3	0,011 ± 0,001	0,0002	5,9
Бийский	0,024 ± 0,001	0,0002	3,7	0,012 ± 0,001	0,0002	6,6
Бийский	< ПКО	-	-	< ПКО	-	-
Бийский	< ПКО	-	-	< ПКО	-	-
Красногорский	0,021 ± 0,002	0,0004	8,4	0,020 ± 0,001	0,0002	4,7
Алтайский	< ПКО	-	-	< ПКО	-	-
Зональный	< ПКО	-	-	< ПКО	-	-
Завьяловский	0,156 ± 0,005	0,0010	3,4	0,021 ± 0,001	0,0002	4,3
Завьяловский	0,163 ± 0,004	0,0008	2,3	0,073 ± 0,002	0,0005	3,0
Завьяловский	0,144 ± 0,005	0,0011	3,4	0,015 ± 0,001	0,0002	6,6
Завьяловский	0,220 ± 0,011	0,0026	5,1	< ПКО	-	-
Завьяловский	< ПКО	-	-	< ПКО	-	-
Мамонтовский	0,126 ± 0,005	0,0012	4,1	0,052 ± 0,001	0,0003	2,2

Разработанная методика была модифицирована для анализа донника лекарственного травы экстракта сухого: около 0,3 г (точная навеска) экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта этилового 50% и выдерживают в ультразвуковой ванне в течение 30 мин при температуре 50 °С.

После охлаждения содержимое колбы доводят до метки спиртом этиловым 50%, перемешивают и фильтруют. Далее поступают, как указано в методике на растительное сырье.

В ходе дальнейших исследований были проанализированы образцы трех производственных серий донника лекарственного травы экстракта сухого и установлено содержание в них кумаровых кислот и кумарина (табл. 19-20).

Таблица 19

Содержание кумарина в донника лекарственного травы экстракте сухом

Номер производственной партии	Свободный кумарин, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)			Общий кумарин, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
010211	1,13 ± 0,04	0,009	3,4	3,42 ± 0,04	0,010	1,3
020211	1,64 ± 0,03	0,009	2,3	3,84 ± 0,06	0,014	1,6
030211	1,58 ± 0,04	0,008	2,4	4,06 ± 0,08	0,018	2,0

Таблица 20

Содержание кумаровых кислот в донника лекарственного травы экстракте сухом

Номер производственной партии	Мелилотовая кислота, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)			О-кумаровая кислота, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S \bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
010211	0,114 ± 0,002	0,0006	2,1	0,053 ± 0,001	0,0002	2,1
020211	0,084 ± 0,004	0,0011	5,6	0,038 ± 0,002	0,0004	4,0
030211	0,128 ± 0,005	0,0010	3,9	0,044 ± 0,001	0,0003	3,1

Содержание общего кумарина в донника лекарственного травы экстракте сухом составило от 3,4 до 4,0%, свободного кумарина от 1,1 до 1,6%, мелилотовой кислоты от 0,08 до 0,12%, о-кумаровой кислоты от 0,04 до 0,05%.

Количественное определение дикумарина

Дикумарин является продуктом микробиологической биотрансформации кумарина и о-кумаровой кислоты и образуется в пораженном плесенью растительном сырье (рис. 23) [91, 106].

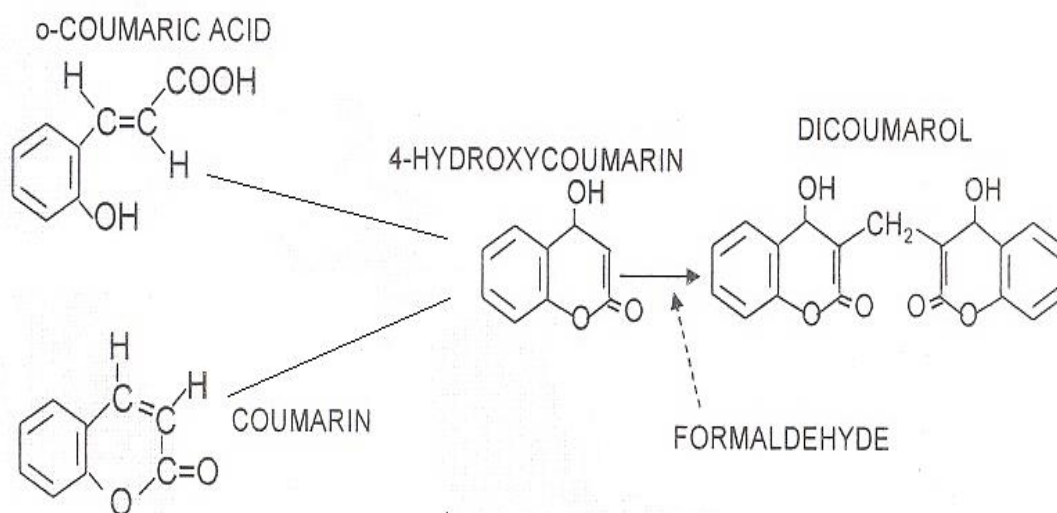


Рис.23. Схема образования дикумарина в донника лекарственного траве

В ходе дальнейшего исследования провели оценку имеющихся образцов донника лекарственного травы на содержание дикумарина.

Для извлечения дикумарина из растительного сырья использовали пиридин. Полученные извлечения концентрировали, очищали органическими растворителями и растворяли в небольшом объеме пиридина. Растворы анализировали методом ВЭЖХ в условиях, указанных в главе II (стр. 34).

Дикумарин по всей видимости не характерен для качественного сырья и обнаружен только в образце сырья заготовленного 29 августа в Завьяловском районе, в количестве менее 1 мг % (рис. 24-25).

Так как анализ растительного сырья донника лекарственного травы показал отсутствие дикумарина, а так же в связи с тем, что дикумарин практически нерастворим в воде и водно-спиртовых растворах, наличие дикумарина в полученных экстрактах маловероятно.

3.2.3. Сапонины

Для обнаружения сапонинов в растительном сырье были использованы качественные реакции и тонкослойная хроматография.

При встряхивании водного извлечения донника лекарственного травы (1:10), полученного при нагревании на водяной бане в течение 30 мин, образовалась устойчивая пена. Реакция на пенообразование является характерной только для сапонинов.

При добавлении к спиртовому извлечению спиртового раствора холестерина 1 % (1:5) наблюдалось появление сероватого осадка, что подтверждает наличие в растительном сырье сапонинов.

Для установления химической группы сапонинов 2 мл водного извлечения растительного сырья в две пробирки. В первую пробирку прибавляли 5 мл хлористоводородной кислоты 0,1 н., во вторую – 5 мл раствора натрия гидроксида 0,1н.; пробирки интенсивно встряхивали.

В пробирке с хлористоводородной кислотой образовалась более устойчивая и обильная пена. Полученный результат позволяет отнести сапонины донника лекарственного травы к группе тритерпеновых.

Анализ методом ТСХ проводили с использованием подвижной фазы, рекомендуемой для разделения тритерпеновых сапонинов, по методике, представленной в главе II (стр. 31).

После обработки пластинки анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле на хроматограмме обнаруживались две основные зоны синего цвета с R_f 0,47 и 0,54 и три слабоинтенсивных зоны синего цвета с R_f 0,38; 0,65 и 0,69.

Количественное определение сапонинов в донника лекарственного траве и экстракте сухом проводили спектрофотометрическим методом.

Методика определения включает избирательное экстрагирование, очистку и концентрирование сапонинов с использованием растворителей разной полярности.

После выделения сапонинов из растительного сырья и обработки в соответствии с методикой (глава II, стр. 42), измеряли оптическую плотность полученных растворов. В качестве стандартного образца использовали эсцин (Sigma), обработанный аналогично образцу. Максимум в спектре поглощения испытуемого раствора (281 ± 2 нм) совпадает с максимумом в спектре раствора СО эсцина (рис. 26).

Результаты количественного определения сапонинов в пересчете на эсцин и абсолютно сухое сырье в образцах донника лекарственного травы и экстракта сухого представлены в таблицах 21, 22.

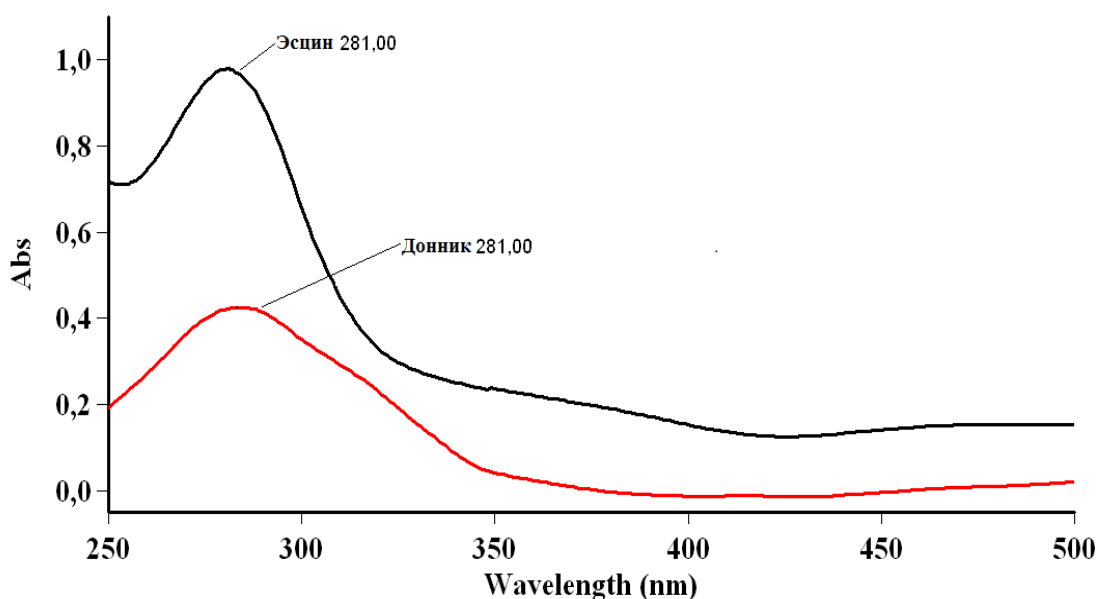


Рис. 26. Спектры поглощения раствора СО эсцина и испытуемого извлечения донника лекарственного травы

Таблица 21

Содержание сапонинов в донника лекарственного траве

№ п/п	Место сбора (район)	Время сбора	Сапонины в пересчете на эсцин и сухое сырье, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
			$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
1	Бийский	20.06.10	0,48 ± 0,01	0,003	2,6
2	Бийский	06.07.10	0,37 ± 0,02	0,004	4,4
3	Бийский	16.07.10	0,43 ± 0,01	0,002	2,3
4	Бийский	03.08.10	0,40 ± 0,02	0,003	3,5
5	Красногорский	11.07.10	0,42 ± 0,02	0,004	4,8
6	Алтайский	08.07.10	0,46 ± 0,02	0,003	4,3
7	Зональный	02.08.10	0,31 ± 0,01	0,002	3,8
8	Завьяловский	10.06.10	0,40 ± 0,02	0,003	3,6
9	Завьяловский	11.07.10	0,37 ± 0,02	0,002	2,9
10	Завьяловский	24.07.10	0,46 ± 0,01	0,002	2,3
11	Завьяловский	15.08.10	0,52 ± 0,01	0,004	4,8
12	Завьяловский	29.08.10	0,44 ± 0,01	0,002	2,8
13	Мамонтовский	17.08.10	0,35 ± 0,02	0,004	5,7

Таблица 22

Содержание сапонинов в донника лекарственного травы экстракте сухом

№ п/п	№ производственной партии	Сапонины в пересчете на эсцин и сухое сырье, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
		$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
1	п/п 010211	1,83 ± 0,04	0,009	2,1
2	п/п 020211	1,36 ± 0,05	0,011	3,6
3	п/п 030211	1,61 ± 0,02	0,004	1,2

Из представленных данных следует, что содержание сапонинов в пересчете на эсцин в донника лекарственного траве, заготовленной в период цветения в шести районах Алтайского края, составляет от 0,31 до 0,48 %. В экстракте сухом содержится (1,4 - 1,8)% суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин.

3.2.4. Дубильные вещества

Количественное определение фенольных соединений в водном извлечении донника лекарственного травы проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина - Чокальтеу.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье составило $2,1 \pm 0,1\%$.

Содержание дубильных веществ в растительном сырье определяли по разности суммы фенольных соединений и фенольных соединений, не сорбируемых кожным порошком. Содержание дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту в траве донника составило $0,14 \pm 0,02\%$.

Для установления групповой принадлежности дубильных веществ донника лекарственного травы к водному извлечению растительного сырья прибавили кожный порошок и перемешали; смесь выдержали в течение 1 ч, затем кожный порошок с сорбированными дубильными веществами отделили, промыли небольшим количеством воды и прибавили к нему раствор железа окисного хлорида. Кожный порошок окрасился в темно-синий цвет. Контрольный опыт показал отсутствие окрашивания.

Полученный результат указывает на присутствие в сырье гидролизуемых дубильных веществ, имеющих в своем составе пирогалловые фрагменты. На это же указывает и наличие в гидролизатах водного извлечения донника травы галловой кислоты в количестве $0,036 \pm 0,006\%$ в пересчете на абсолютно сухое сырье, что составляет около 26% в составе дубильных веществ.

3.2.5. Водорастворимые полисахариды

Содержание водорастворимых полисахаридов в донника лекарственного траве определяли гравиметрически (глава II).

ВРПС донника лекарственного травы представляют собой аморфный порошок серого цвета, при растворении в воде образующий вязкий, опалесцирующий раствор коричневатого-серого цвета.

Из оставшегося после извлечения ВРПС шрота выделили протопектин - аморфный порошок грязно-белого цвета, образующий студнеобразный прозрачный раствор.

В углеводном комплексе, извлекаемом водой из растительного сырья, помимо полисахаридов содержатся моносахара. Их содержание в донника лекарственного траве определяли по следующей методике: около 5 г (точная навеска) растительного сырья измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, экстрагировали спиртом этиловым 96% при температуре 70°C; извлечение упаривали на роторном испарителе, сухой остаток растворяли в 50 мл горячей воды очищенной, охлаждали, фильтровали и анализировали методом ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием (глава II, стр. 40).

В ходе дальнейших исследований спектрофотометрическим методом в составе ВРПС и протопектина определили содержание пектиновых кислот.

Согласно полученным данным выход ВРПС донника лекарственного травы составил 4,7% в пересчете на абсолютно сухое сырье, выход протопектина – 3,8%, содержание уроновых кислот в пересчете на галактуроновую кислоту составе ВРПС – 8,9%, в составе протопектина – 30,4%. Из свободных моносахаридов в растительном сырье обнаружены глюкоза и фруктоза (табл. 23).

Таблица 23

Результаты количественного определения полисахаридов и моносахаридов
в донника лекарственного траве

БАС	Метод	Содержание в пересчете на сухое сырье, % (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
		$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	S $\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
ВПС	Весовой	4,73 ± 0,07	0,017	1,6
Уроновые кислоты в составе ВПС	СФМ	0,37 ± 0,02	0,004	5,1
Протопектин	Весовой	3,83 ± 0,11	0,026	2,9
Уроновые кислоты в составе протопектина	СФМ	30,42 ± 0,09	0,020	0,3
Свободная глюкоза	ВЭЖХ	3,32 ± 0,05	0,012	1,6
Свободная фруктоза	ВЭЖХ	0,61 ± 0,03	0,006	4,5

Для установления моносахаридного состава ВПС и протопектина проводили их гидролиз в среде трифторуксусной кислоты 2 М при температуре кипения в течение 3 ч.

В полученных гидролизатах методом ВЭЖХ в сравнении с достоверными образцами идентифицировали глюкозу, галактозу, фруктозу, арабинозу, рамнозу (рис. 27).

Содержание в донника лекарственного траве свободной глюкозы составило 3,3%, фруктозы – 0,6%. Результаты количественного определения полисахаридов и моносахаридов донника лекарственного травы представлены в таблице 24.

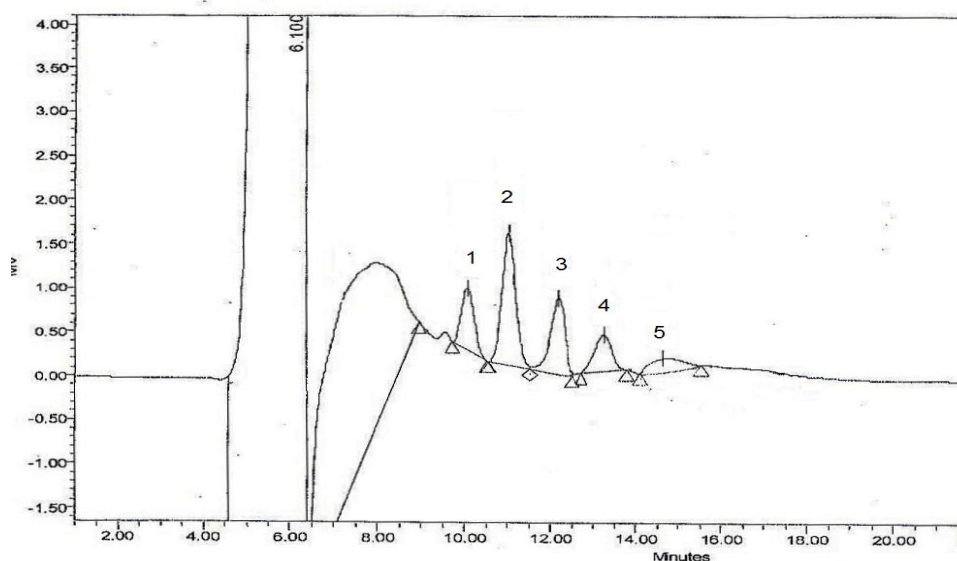


Рис. 27. Хроматограмма моносахаридов ВРПС донника лекарственного
травы: 1- глюкоза; 2 –галактоза; 3 – фруктоза; 4 – арабиноза; 5 – рамноза

Таблица 24

Результаты анализа моносахаридного состава ВРПС донника лекарственного
травы методом ВЭЖХ ($n=3$, $p=95\%$, $t_p=4,3$)

Время удержи- вания, мин	БАС	В составе ВРПС, %			В составе протопектина, %		
		$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
$9,989 \pm 0,043$	глюкоза	$6,42 \pm 0,16$	0,04	2,5	$1,86 \pm 0,07$	0,02	4,0
$10,908 \pm 0,047$	галактоза	$15,53 \pm 0,24$	0,06	1,6	$21,52 \pm 0,15$	0,03	0,7
$12,145 \pm 0,048$	фруктоза	$3,02 \pm 0,10$	0,02	3,4	$0,51 \pm 0,02$	0,01	4,8
$13,182 \pm 0,052$	арабиноза	$11,41 \pm 0,11$	0,03	1,0	$17,46 \pm 0,12$	0,03	0,7
$14,680 \pm 0,054$	рамноза	$2,44 \pm 0,06$	0,02	2,6	НПКО	-	-

Содержание моносахаридов в составе ВРПС и протопектина составило соответственно: глюкозы - 6,4% и 1,9%; галактозы – 15,5% и 21,5%; фруктозы – 3,0% и 0,5%; арабинозы – 11,4% и 17,5%; рамнозы – 2,4% в составе ВРПС. В составе протопектина рамноза обнаружена в следовых количествах.

Высокое содержание арабинозы и галактозы, а также наличие уроновых кислот закономерно для протопектина. Содержание данных компонентов в составе фракции ВПРС указывает на наличие в ней водорастворимого пектина.

3.2.6. Аминокислоты

Для установления аминокислотного состава водного извлечения донника лекарственного травы использовали хроматографические методы (глава II, стр. 30, стр. 41). По результатам анализа методом тонкослойной хроматографии проведена предварительная оценка аминокислотного состава в результате которой идентифицированы аргинин, глютамин, треонин, валин, изолейцин, лейцин (табл. 25).

Таблица 25

Результаты анализа аминокислот донника лекарственного травы методом ТСХ

Объекты исследования	Rf	Окрашивание после обработки нингидриновым реагентом	БАС
Донника лекарственного травы; донника лекарственного травы экстракт сухой	$0,11 \pm 0,04$	розовое	Аргинин
	$0,27 \pm 0,04$	желтое	-
	$0,33 \pm 0,05$	розовое	Глютамин
	$0,40 \pm 0,06$	розовое	Треонин
	$0,56 \pm 0,06$	розовое	Валин
	$0,60 \pm 0,06$	розовое	Изолейцин
	$0,64 \pm 0,07$	розовое	Лейцин

Количественное определение индивидуальных аминокислот в донника лекарственного траве проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с детекцией по светорассеянию. В качестве стандартных образцов использовали субстанции аминокислот производства Sigma-Aldrich. На рисунке 28 представлена хроматограмма аминокислот водного извлечения донника лекарственного травы.

В результате ВЭЖХ-анализа установлено содержание свободных аминокислот в растительном сырье, которое составило: глутамина – 0,32%, треонина – 0,46%, аргинина – 0,21%, валина – 0,16%, изолейцина – 1,38%, лейцина – 0,8% (табл. 26).

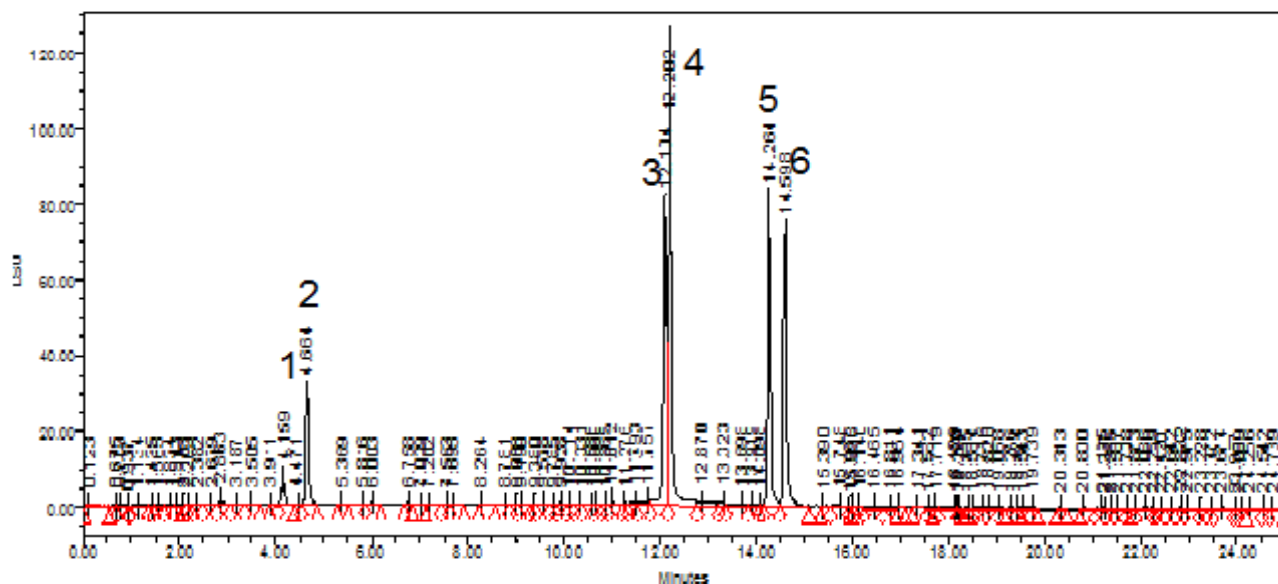


Рис. 28. Хроматограмма аминокислот донника лекарственного травы:
1 – глутамин; 2 – треонин; 3 – аргинин; 4 – валин; 5 – изолейцин; 6 - лейцин

Таблица 26

Результаты анализа аминокислотного состава донника лекарственного травы
методом ВЭЖХ, ($n=3$, $p=95\%$, $t_p=4,3$)

№ пика	Время удерживания, мин	Стандартный образец, соответствующий по времени удерживания	Содержание в пересчете на сухое сырье, %		
			$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S \bar{X}$	$\bar{\epsilon}, \%$
1	$4,159 \pm 0,006$	Глутамин	$0,32 \pm 0,01$	0,003	3,8
2	$4,664 \pm 0,008$	Треонин	$0,46 \pm 0,02$	0,006	5,3
3	$12,174 \pm 0,011$	Аргинин	$0,21 \pm 0,01$	0,001	3,0
4	$12,202 \pm 0,012$	Валин	$0,16 \pm 0,01$	0,001	3,9
5	$14,261 \pm 0,015$	Изолейцин	$1,38 \pm 0,06$	0,014	4,5
6	$14,598 \pm 0,018$	Лейцин	$0,80 \pm 0,03$	0,008	4,7

Общее содержание аминокислот в донника лекарственного траве определяли спектрофотометрически по нингидриновой реакции. Содержание аминокислот в пересчете на изолейцин в растительном сырье составило 1,6%.

3.2.7. Липофильные вещества

В результате проведенных исследований установлено, что суммарное содержание жироподобных веществ, извлекаемых смесью хлороформ – метиловый спирт (2:1) в донника лекарственного траве составляет около 5%, содержание нейтральных липидов – около 2%.

Качественный анализ липидов донника лекарственного травы проводили методом ТСХ (глава II, стр. 31). На хроматограмме хлороформно-метанольного извлечения, обработанной раствором фосфорно-молибденовой кислоты наблюдалось 11 пятен синего цвета. Три из них были идентифицированы по значениям фактора удерживания в сравнении со стандартными образцами: β -ситостерин ($R_f = 0,51$), β -каротин ($R_f = 1,0$), лютеин ($R_f = 0,26$) (табл. 27).

Для визуализации стеринов и их эфиров пластинку обрабатывали смесью серной кислоты концентрированной и уксусной кислоты ледяной (2:1).

После нагревания на хроматограмме обнаруживались 3 зоны красного цвета - стеринны: $R_f = 0,51$ (бета-ситостерин); 0,74; 0,63.

На хроматограмме полярных липидов (метанольное извлечение) после обработки парами йода проявлялось 12 пятен желтого цвета разной интенсивности. После обработки хроматографической пластинки раствором нингидрина наблюдалось 5 интенсивных пятен розового цвета – аминокислоты (Rf = 0,06; 0,25; 0,39; 0,42), после обработки раствором альфа-нафтола - 2 пятна синего цвета – гликолипиды (Rf = 0,20; 0,37) и 3 пятна красного цвета – гликостерины (Rf = 0,23; 0,44; 0,52) (табл. 28).

Таблица 27

Результаты ТСХ нейтральных липидов

Реактив Rf	Без обработки	Раствор фосфорно-молибденовой кислоты 1%	Смесь уксусной и серной кислот (1:1)	БАС
0,03 ± 0,01		Синее		
0,09 ± 0,01		Синее		
0,19 ± 0,01		Синее		
0,26 ± 0,02	Оранжевое	Синее		Лютеин
0,40 ± 0,02		Синее		
0,51 ± 0,02		Синее	Красное	β -Ситостерин
0,63 ± 0,02		Синее	Красное	Стерин
0,74 ± 0,03		Синее	Красное	Стерин
0,86 ± 0,03		Синее		
0,96 ± 0,03	Оранжевое	Синее		
1,00 ± 0,03	Оранжевое	Синее		β-Каротин

Таблица 28

Результаты ТСХ полярных липидов

Реактив Rf	Пары йода	Раствор нингидрина	Раствор альфа-нафтола	Смесь серной и уксусной кислот (1:1)	БАС
0,06 ± 0,01	Желтое	Розовое			Аминофосфолипид
0,10 ± 0,01	Желтое	Розовое			Аминофосфолипид
0,20 ± 0,01	Желтое		Синее		Гликостерин
0,23 ± 0,01	Желтое			Красное	Эфир стерина
0,25 ± 0,02	Желтое	Розовое			Аминофосфолипид
0,37 ± 0,02	Желтое		Синее		Гликостерин
0,39 ± 0,02	Желтое	Розовое			Аминофосфолипид
0,42 ± 0,02	Желтое	Розовое			Аминофосфолипид
0,44 ± 0,02	Желтое			Красное	Эфир стерина
0,52 ± 0,03	Желтое			Красное	Эфир стерина
0,66 ± 0,03	Желтое				-
0,75 ± 0,03	Желтое				-

В результате ВЭЖХ-анализа было установлено наличие в растительном сырье стереоизомеров лютеина и зеаксантина. На рисунке 29 хроматограмма хлороформного элюата липидной фракции донника лекарственного травы, полученного по методике, представленной в главе II (стр. 32).

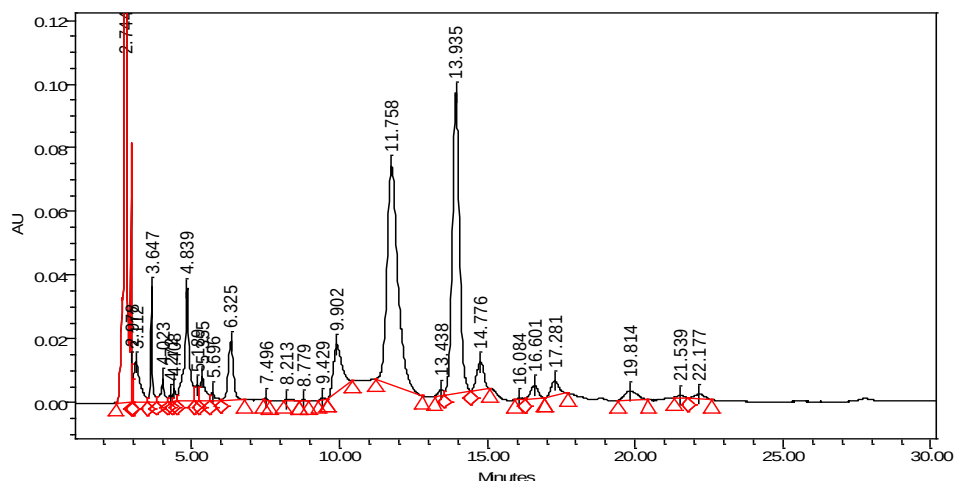


Рис. 29. Хроматограмма хлороформного элюата липидов донника лекарственного травы

Пики ксантофиллов идентифицировали по временам удерживания в сравнении с СО смеси ксантофиллов (DSM) и по характерным спектрам поглощения (рис. 30).

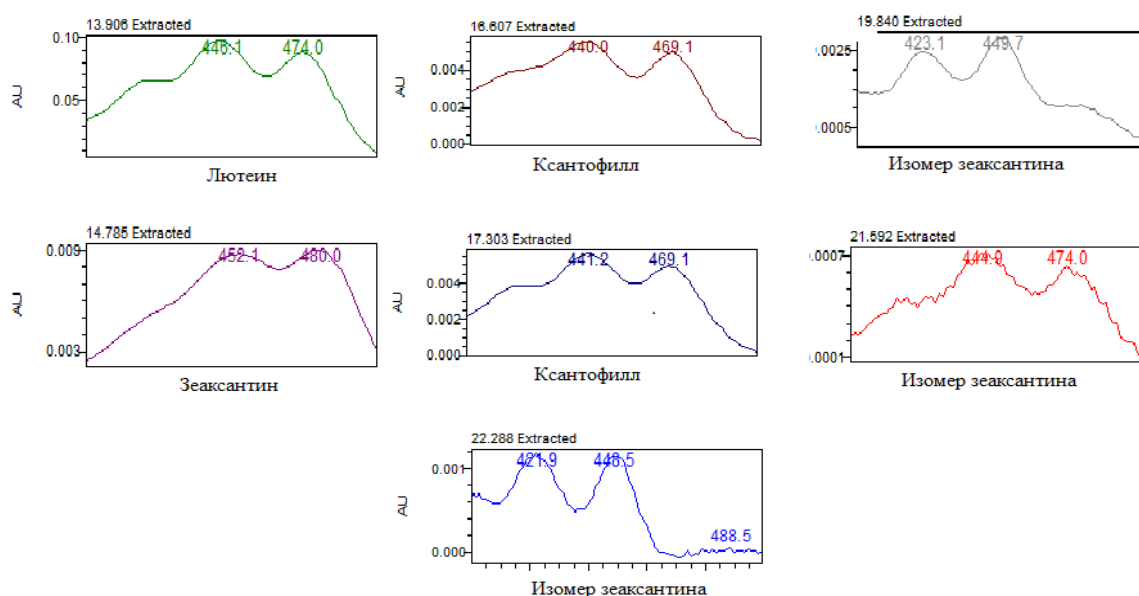


Рис. 30. Спектры поглощения пиков ксантофиллов на хроматограмме хлороформного элюата липидов донника лекарственного травы

В результате проведенных исследований идентифицировали лютеин – пик с временем удерживания 13,935 мин и зеаксантин – 14,687 мин, а так же неактивные изомеры лютеина и зеаксантина – пики с временами удерживания 16,601; 17,281; 19,814; 21,539; 22,177 мин. Пик с временем удерживания 11,768 мин – сопутствующее вещество.

Доминирующим является лютеин. Его количество, вычисленное методом нормирования, составило 77% от суммы ксантофиллов (табл. 29).

Таблица 29

Результаты идентификации ксантофиллов донника лекарственного травы

БАС	Время удерживания компонента на хроматограмме стандартного образца, мин	Время удерживания компонента на хроматограмме анализируемого образца, мин	Содержание в анализируемом образце, % от суммы
Лютеин	14,001	13,935	77,0
Зеаксантин	14,687	14,776	7,4
Ксантофилл	-	16,601	3,6
Ксантофилл	-	17,281	4,4
Изомер зеаксантина	19,788	19,814	4,2
Изомер зеаксантина	21,390	21,539	0,6
Изомер зеаксантина	21,883	22,177	1,7

В ходе дальнейшего исследования определили количественное содержание в донника лекарственного траве хлорофиллов, каротиноидов и ксантофиллов.

Для количественного определения хлорофиллов получали ацетоновую вытяжку растительного сырья по методике, описанной в главе II (стр. 44). Интенсивность окраски ацетонового извлечения измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения (662 ± 2 нм), соответствующем максимуму поглощения хлорофиллов *a* (рис. 31).

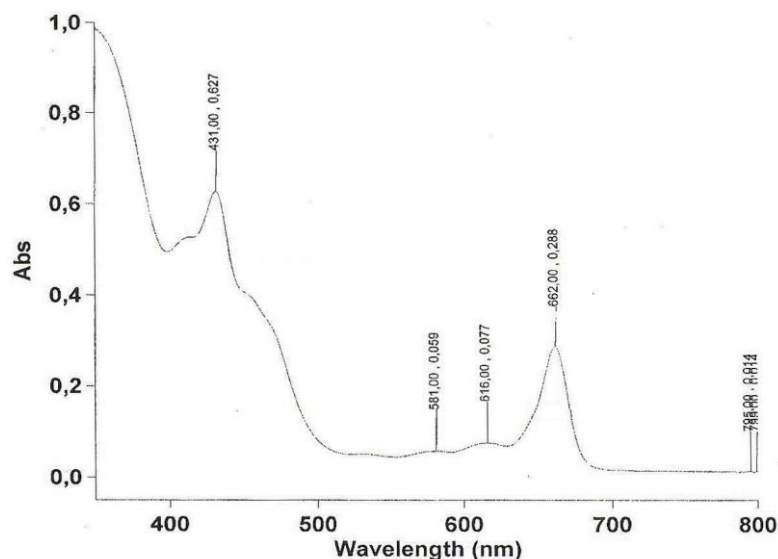


Рис. 31. Спектр поглощения хлорофиллов донника лекарственного травы

Для количественного определения ксантофиллов и каротиноидов применяли совмещенный метод ТСХ и спектрофотометрии (глава II, стр. 44).

На рисунке 32 представлен спектр поглощения раствора, полученного в результате элюирования хлороформом зоны адсорбции, расположенной на хроматографической пластинке на уровне зоны СО β -каротина. Максимум поглощения (463 ± 2 нм) соответствует максимуму поглощения β -каротина.

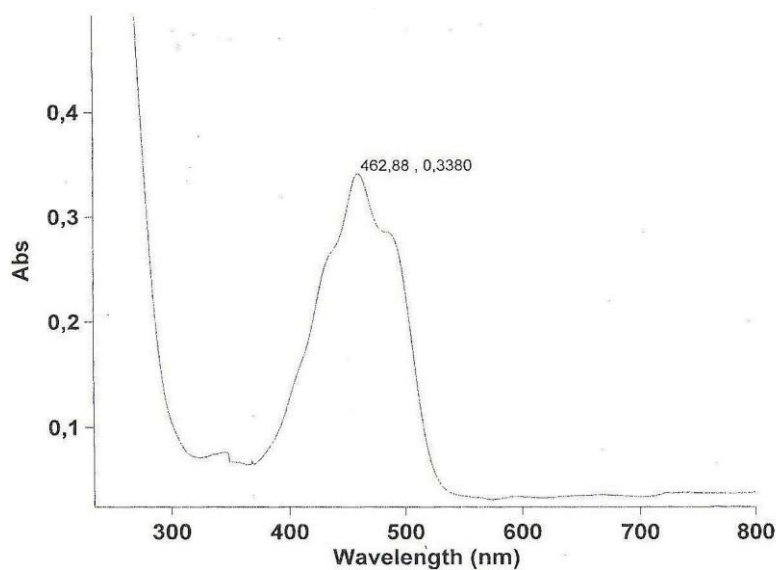


Рис. 32. Спектр поглощения каротиноидов донника лекарственного травы

На рисунке 33 представлен спектр поглощения раствора, полученного в результате элюирования этиловым спиртом 96% зоны адсорбции, расположенной на хроматографической пластинке на уровне зоны СО лютеина. Максимум поглощения (446 ± 2 нм) соответствует максимуму поглощения лютеина.

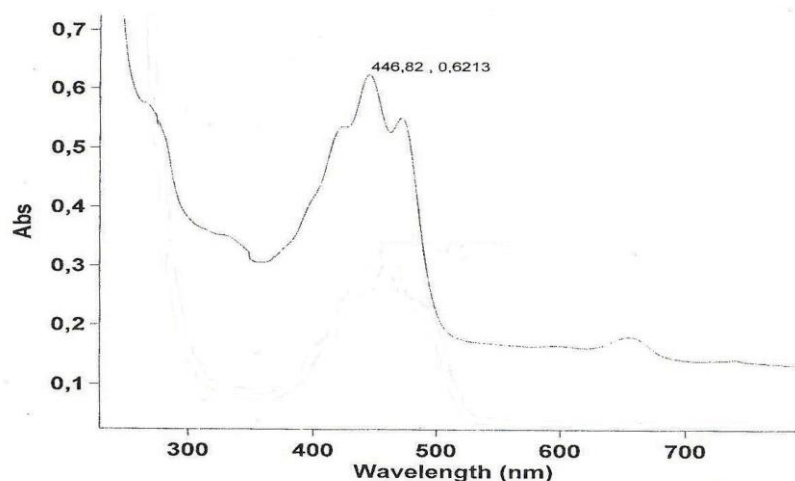


Рис. 33. Спектр поглощения ксантофиллов донника лекарственного травы

В результате содержание хлорофиллов в донника лекарственного траве составило 100 мг %, ксантофиллов – 58 мг %, каротиноидов – 111 мг %.

Витамин Е в неомыляемой липофильной фракции определяли методом ВЭЖХ по методике представленной в главе II (стр. 47). Изомеры токоферола идентифицировали по временам удерживания в сравнении с хроматограммой СО смеси токоферолов. На рисунке 34 хроматограмма неомыляемой липидной фракции растительного сырья, на которой присутствует множество сопутствующих пиков. Для достоверности результатов помимо времен удерживания оценивали спектры поглощения пиков (рис. 35). В результате идентифицированы δ -, γ - и α - изомеры токоферола, основным из которых является α -токоферол.

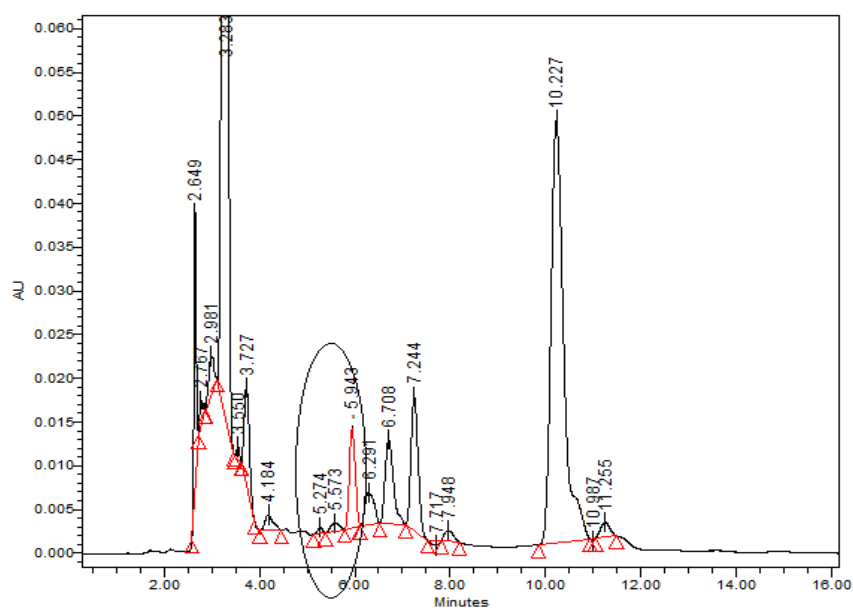


Рис. 34. Хроматограмма неомыляемой липидной фракции донника лекарственного травы. Пик с временем удерживания 5,274 мин - δ -токоферол, 5,573 мин - γ -токоферол и 5,943 мин - α -токоферол.

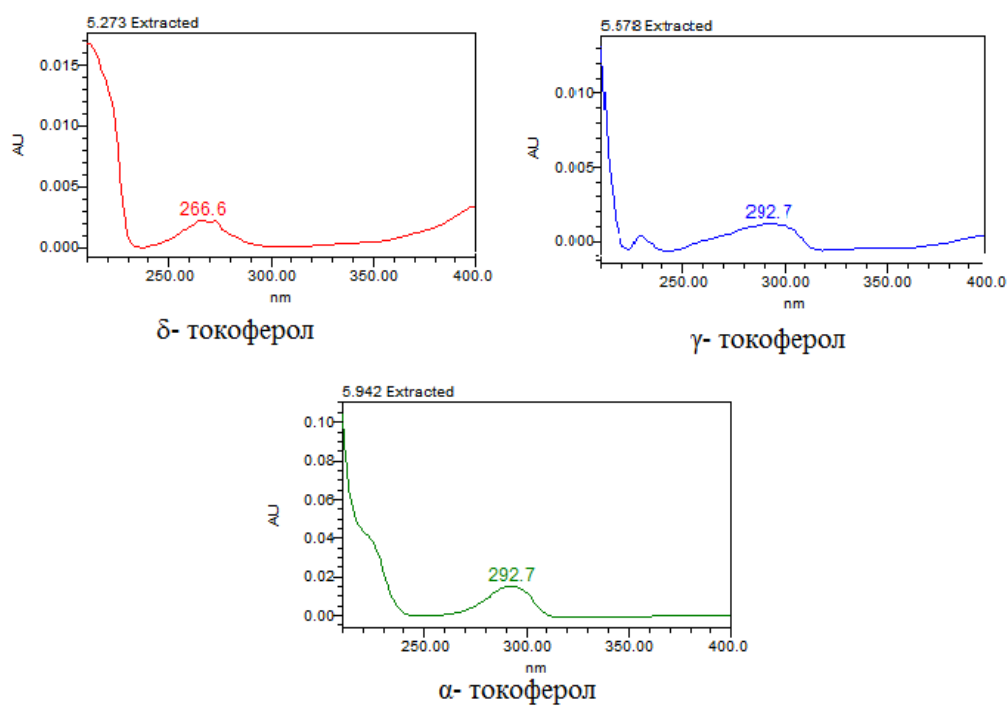


Рис. 35. Спектры поглощения пиков токоферолов на хроматограмме неомыляемой липидной фракции донника лекарственного травы

Расчет количественного содержания α -токоферола (витамина Е) проводили методом внешнего стандарта с применением СО α - токоферола ацетата фирмы Sigma. Содержание витамина Е в донника лекарственного траве составляет около 4 мг %.

Результаты количественного определения липофильных веществ донника лекарственного травы приведены в таблице 30.

Таблица 30

Результаты количественного определения липофильных веществ
донника лекарственного травы

№ п/п	БАС	Содержание в пересчете на сухое сырье (n=3, p=95%, t _p =4,3)		
		$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	S $\bar{x}$	$\bar{e}, \%$
1	Общие липиды, %	5,10 $\pm$ 0,12	0,029	2,4
2	Нейтральные липиды, %	2,32 $\pm$ 0,06	0,014	2,7
3	Хлорофиллы, мг%	100 $\pm$ 2,2	0,50	2,1
4	Каротиноиды, мг%	58,2 $\pm$ 0,9	0,22	1,6
5	Ксантофиллы, мг%	111 $\pm$ 2,5	0,58	2,2
6	Витамин Е, мг%	3,70 $\pm$ 0,07	0,02	1,8

Далее, в омыляемой липидной фракции методом ГХ (глава II, стр. 45) определили жирно-кислотный состав. В результате идентифицировано 10 жирных кислот, содержащихся, преимущественно, в составе нейтральных липидов: каприловая (C8:0), каприновая (C10:0), лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0), олеиновая (C18:1), α -линолевая (C18:2), линоленовая (C18:3), гондоиновая (C20:1) (рис.36).

В таблице 31 представлены результаты количественного определения индивидуальных жирных кислот от их суммы в составе общих, полярных и нейтральных липидов донника лекарственного травы.

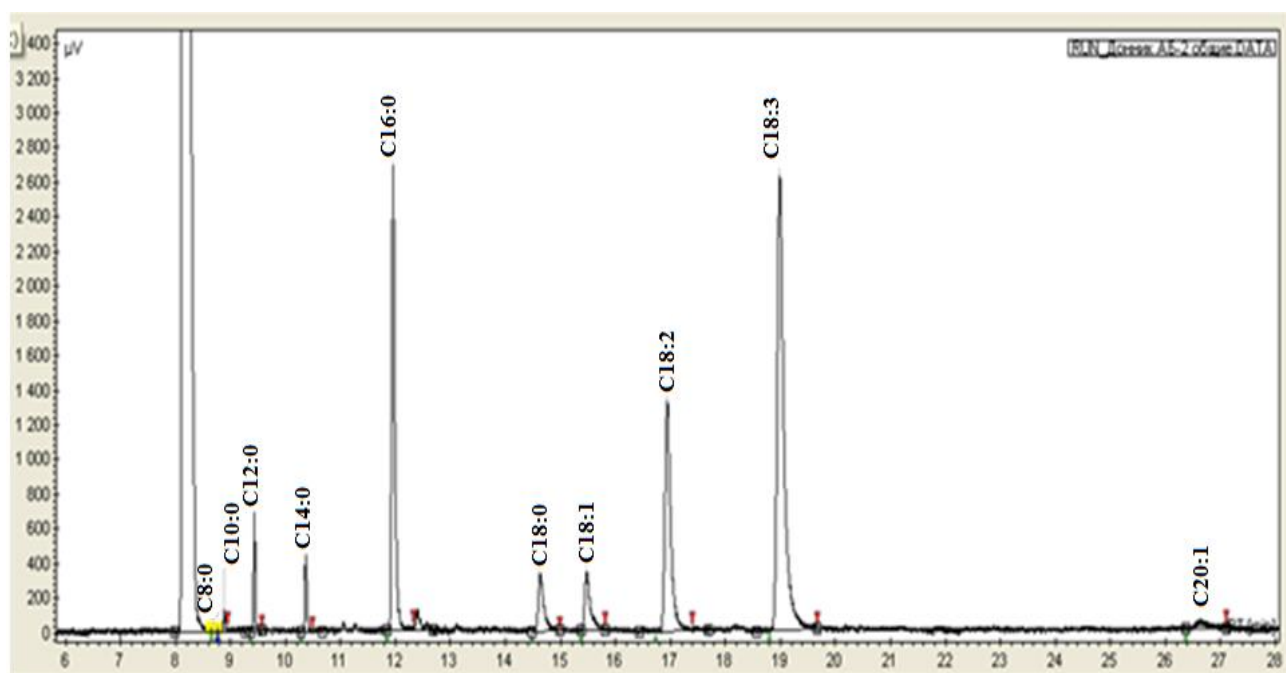


Рис. 36. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот донника лекарственного травы

Таблица 31

Жирно-кислотный состав донника лекарственного травы

Жирные кислоты	В составе общих, % от суммы	В составе нейтральных, % от суммы	В составе полярных, % от суммы
Каприловая	0,17	НПКО	НПКО
Каприновая	0,56	0,78 (92%)*	0,12
Лауриновая	2,9	4,1 (94%)	0,49
Миристиновая	2,4	3,8 (87%)	0,98
Пальмитиновая	22	26,7 (60%)	32,6
Стеариновая	4,3	5,5 (63,9%)	5,6
Олеиновая	1,8	2,2 (72%)	1,5
α-Линолевая	10,7	12,2 (66%)	11,2
Линоленовая	50,8	41,5 (61%)	47,4
Гондоиновая	1,6	3,1 (100%)	-

* В скобках указано содержание в составе нейтральных липидов от его общего количества в растительном сырье.

Из полученных данных следует, что основными являются полиненасыщенные кислоты: α -линоленовая (50,8%) и линолевая (10,7%). Из насыщенных превалирует пальмитиновая кислота (22%).

В результате фитохимического изучения установлено, что донника лекарственного трава и экстракт сухой содержат комплекс БАС, идентичный по качественному составу. Количественное содержание варьирует (табл. 32).

Таблица 32

Результаты количественного определения БАС донника лекарственного
травы и экстракта сухого

Объект исследования БАС	Донника лекарственного травы	Экстракт п/п № 010211	Экстракт п/п № 020211	Экстракт п/п № 030211
Флавоноиды, %	От 1,12 до 1,91	$2,78 \pm 0,04$	$3,42 \pm 0,03$	$3,06 \pm 0,03$
Кумарин, %	От 0,84 до 1,48	$3,42 \pm 0,06$	$3,8 \pm 0,05$	$4,06 \pm 0,08$
Сапонины, %	От 0,31 до 0,52	$1,83 \pm 0,04$	$1,36 \pm 0,07$	$1,61 \pm 0,05$
Фенольные соединения, %	$2,14 \pm 0,09$	-	-	-
Дубильные вещества, %	$0,14 \pm 0,02$	-	-	-
Аминокислоты, %	$1,64 \pm 0,10$	-	-	-
Полисахариды, %	$1,6 \pm 0,3$	-	-	-
Липиды, %	$5,1 \pm 0,3$	-	-	-
Хлорофиллы, мг%	100 ± 10	-	-	-
Каротиноиды, мг%	58 ± 6	-	-	-
Ксантофиллы, мг%	111 ± 10	-	-	-

Выводы

1. С использованием качественных реакций установлено наличие в донника лекарственного траве и экстракте сухом кумаринов, флавоноидов группы флавона и флавонола, гидролизуемых дубильных веществ, тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, аминокислот.
2. В результате исследований идентифицировано 6 флавоноидных агликонов: мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А.
3. Установлено, что флавоноиды содержатся в растительном сырье в виде ди- и три- гликозидов преимущественно кемпферола и кверцетина.
4. Установлена структура двух превалирующих флавоноидов: кемпферол - 3-гликозид -7-биозид и кемпферол-3-биозид.
5. Впервые в донника лекарственного траве обнаружены изофлавоноиды формонетин и биоханин А.
6. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растительном сырье составило от 1,1% до 1,9%.
7. Из кумаринов и их метаболитов идентифицированы кумарин, гликозид кумарина, о-кумаровая кислота, мелилотовая кислота.
8. Содержание свободного кумарина в донника лекарственного траве варьирует от 0,25% до 0,70%, связанного кумарина от 0,28% до 1,08%; общее содержание кумарина составляет 0,84% - 1,48%.
9. Содержание мелилотовой кислоты колеблется от полного отсутствия до 0,16%, о-кумаровой кислоты – до 0,07%.
10. По результатам исследований сапонины донника лекарственного травы отнесены к группе тритерпеновых. Методом ТСХ обнаружено 5 веществ сапониновой природы. Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин составило от 0,3% до 0,5%.

- 11.Дубильные вещества донника лекарственного травы являются гидролизуемыми и содержатся в незначительном количестве - 0,14% (в пересчете на галловую кислоту). Содержание галловой кислоты составляет 26% от суммы дубильных веществ.
- 12.В результате проведенных исследований установлено, что содержание ВРПС в донника лекарственного траве составляет около 5%, протопектина – около 4%.
- 13.В составе ВРПС и протопектина идентифицировано 5 моносахаридов, установлено их количественное содержание: глюкозы - 6,4% и 1,9%; галактозы – 15,5% и 21,5%; фруктозы – 3,0% и 0,5%; арабинозы – 11,4% и 17,5%; рамнозы – 2,4% в составе ВРПС. Физические свойства и компонентный состав ВРПС указывает на присутствие пектиновых веществ. Содержание уроновых кислот составляет около 8% к полисахаридному комплексу, основными мономерными звеньями являются арабиноза и галактоза.
14. Идентифицировано 6 свободных аминокислот и установлено их количественное содержание: треонин (0,46%), валин (0,16%), изолейцин (1,38%), лейцин (0,80%), глютамин (0,32%), аргинин (0,21%); 4 первые являются незаменимыми.
- 15.Суммарное содержание водорастворимых аминокислот в пересчете на изолейцин в донника лекарственного траве составило 1,6%.
- 16.Содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в растительном сырье составило 2,1%.
- 17.Общее содержание жироподобных веществ в донника лекарственного траве составляет около 5,0%, массовая доля нейтральных липидов до 2,5%. Хроматографическими методами обнаружены эфиры стерinov, гликостерины, гликолипиды, аминофосфолипиды, В- каротин, зеаксантин, лютеин, В- ситостерин.

18. Методом ГЖХ в липофильной фракции идентифицировано десять жирных кислот: каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, α -линолевая, линоленовая, гондоиновая. Основная доля приходится на пальмитиновую (более 20%) и α -линоленовую (более 10%) и линоленовую (более 50%).
19. Содержание пигментных веществ в донника лекарственного траве составляет: хлорофиллов - 100 мг%, ксантофиллов - 58 мг%, каротиноидов - 111 мг%.
20. Идентифицированы δ -токоферол, γ -токоферол, α -токоферол. Содержание α -токоферола (витамина E) - около 4 мг%.
21. Установлено, что донника лекарственного трава и экстракт сухой содержат комплекс БАС идентичный по качественному составу.
22. Содержание основных групп БАС в донника лекарственного экстракте сухом составило: сумма флавоноидов в пересчете на рутин - 2,8 - 3,4%; свободный кумарин - 1,1 - 1,6%; общий кумарин - 3,4 - 4,1%; о-кумаровая кислота - 0,038 - 0,053%; мелилотовая кислота - 0,084 - 0,128%; сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин - 1,4 - 1,8%.

ГЛАВА IV

Изучение острой токсичности и специфической активности донника лекарственного травы и экстракта сухого

4.1. Изучение острой токсичности

Изучение острой токсичности настоя и сухого экстракта донника лекарственного травы проводили в соответствии с ГФ XI на белых мышах массой до 20 г при однократном пероральном введении в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг.

Как видно из таблицы 33, пероральное введение настоя и экстракта в указанных дозах не вызывало гибели ни одного из экспериментальных животных. В их состоянии не отмечено каких-либо отклонений по сравнению с контрольной группой.

Таблица 33

Результаты изучения острой токсичности донника лекарственного травы
настоя и экстракта

Препарат	Доза	Количество животных в опыте		
		Всего	Погибшие (%)	Выжившие (%)
Настой	5000 мг/кг	10	0	100
	10000 мг/кг	10	0	100
Сухой экстракт	5000 мг/кг	10	0	100
	10000 мг/кг	10	0	100

Как показали проведенные эксперименты, введение настоя и экстракта в дозах до 10 000 мг/кг не вызвало гибели животных. Определение LD₅₀ не возможно в связи с ее высоким значением. Дальнейшее увеличение дозы настоя и экстракта явилось нецелесообразным из-за отсутствия токсичности.

4.2. Изучение специфической активности (влияние на гемостаз)

Исследование проводили на белых крысах линии Wistar обоего пола, массой 150 – 250 г. Испытуемые животные были разделены на 2 группы (n=5). Животные группы 1 получали раствор донника лекарственного травы экстракта сухого. Водный раствор экстракта вводили внутривенно через зонд в дозе 0,05 г/кг в течение 10 дней. Животные группы 2 (контрольной) получали физиологический раствор в эквивалентном объеме. Кровь для исследования брали из подъязычной вены крыс.

Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе НЗ34. По полученным коагулограммам определяли начало и конец свертывания крови и продолжительность процесса свертывания крови.

Определение показателей гемостаза вели на программируемом оптико-механическом коагулометре «Минилаб 701».

Определение протромбинового времени проводили с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» ТехпластинTM – тест. Данное определение используется для тестирования факторов свертывания протромбинового комплекса (II – протромбин, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Принцип метода основан на том, что тромбопластин превращает протромбин крови в присутствии ионов кальция в активный тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время – время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тромбопластина.

Результаты определения представлены в МНО (международное нормализованное отношение), которое рассчитывается исходя из ПО (протромбинового отношения) и МИЧ (международного индекса чувствительности), который указан в паспорте к набору и составляет 1,25.

Последовательность расчета:

$ПО = ПВ \text{ больного} / ПВ \text{ контрольной плазмы} \times k$, где

ПО – протромбиновое отношение

ПВ – протромбиновое время

k – нормализованный коэффициент, указанный в паспорте к набору и составляет 0,94.

$МНО = ПО^{МНЧ}$

Определение тромбинового времени проводили с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» Тромбо-тест.

Набор предназначен для оценки тромбинового времени при диагностике нарушений конечного этапа свертывания крови.

Принцип метода заключается в определении времени свертывания плазмы под влиянием тромбина стандартной активности.

Результаты выражают в секундах, сравнивают время свертывания образцов контрольной и исследуемой плазмы.

Определение содержания фибриногена проводили с помощью набора реагентов фирмы «Ренам-НПО» ОптиФибриноген-тест. Измерение содержания фибриногена в плазме является одним из базовых тестов, отражающих состояние гемостаза. Принцип метода основан на определении времени свертывания разведенной плазмы избытком тромбина. В этом случае время свертывания зависит только от концентрации фибриногена в плазме.

Анализ коагулограммы показал, что в группе животных, получавших раствор экстракта донника, наблюдалась тенденция к повышению времени начала свертывания крови в среднем на 28% и протромбинового времени в среднем на 25%, однако относительно значений контрольной группы при данной выборке результаты статистически не достоверны. Достоверных отличий по показателям времени свертывания и конца свертывания крови относительно контроля не зафиксировано. Тромбиновое время и содержание фибриногена также достоверно не отличались от контроля (табл.34).

Полученные результаты свидетельствуют о том, донника лекарственного травы экстракт сухой может быть предложен для дальнейшего изучения как антикоагулянт непрямого действия.

Таблица 34

Влияние донника лекарственного травы экстракта сухого на гемостаз

Показатели	Контроль	Экстракт
Начало свертывания, сек	73,6±12,08	94,4±7,76 P>0,05
Конец свертывания, сек	193,6±15,62	206,4±21,07 P>0,05
Время свертывания, сек	118,0±12,40	112,0±15,62 P>0,05
Протромбиновое время, МНО	0,84±0,08	1,05±0,12 P>0,05
Тромбиновое время, сек	8,76±1,59	9,68±1,12 P>0,05
Содержание фибриногена, г/л	2,58±0,64	2,99±0,16 P>0,05

В предложенных условиях эксперимента донника лекарственного травы экстракт сухой проявил тенденцию к продлению времени начала свертывания крови и увеличению продолжительности протромбинового времени.

Полученные результаты позволяют предположить, что компоненты изучаемого экстракта оказывают влияние на синтез факторов свертывания крови в печени, действуя, как антагонисты витамина К.

Выводы

1. Доказана практическая безвредность донника лекарственного травы настоя и экстракта сухого, поскольку применение их в дозе 10 000 мг/кг не вызвало гибели экспериментальных животных.
2. Получены результаты, позволяющие предположить, что экстракт донника лекарственного травы, полученный на опытно-промышленной площадке предприятия, оказывает влияние на синтез факторов свертывания крови в печени, проявляя свойства антикоагулянта непрямого действия.

ГЛАВА V

Стандартизация донника лекарственного травы и экстракта сухого

В связи с перспективой разработки и регистрации на ЗАО «Эвалар» лекарственного средства на основе донника лекарственного травы возникла необходимость разработки нормативной документации, регламентирующей качество растительного сырья. Для установления показателей подлинности и доброкачественности необходимо провести фармакогностический анализ растительного сырья.

Для установления подлинности растительного сырья проводили следующие исследования: макроскопический, микроскопический и физико-химический анализ.

Для разработки показателей доброкачественности донника лекарственного травы определяли: потерю в массе при высушивании, золу общую, золу, нерастворимую в кислоте хлористоводородной 10%, примеси органические и минеральные, экстрактивные вещества, количественное содержание суммы производных кумарина в пересчете на кумарин.

5.1. Определение подлинности донника лекарственного травы

5.1.1. Макроскопический анализ

Трава цельная. Цельные или частично измельченные облиственные цветущие верхушки, веточки растений с ребристым стеблем диаметром до 3 мм и длиной до 30 см. Листья очередные, мелкие, тройчатосложные. Прилистники ланцетные или шиловидные, почти всегда цельнокрайние. Нижние листочки обратнойцевидные, верхние – продолговатые или ланцетные, по краю с 10 – 13 неровными зубчиками.

Цветки мотыльковые мелкие длиной от 5 до 7 мм. Чашечка колокольчатая, пятизубчатая, голая. Иногда встречаются в незначительном количестве мелкие незрелые плоды – бобы длиной от 3 до 5 мм, поперечно-морщинистые, голые или покрытые редкими волосками. Семя одно, реже два.

Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – сероват или желто-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, цветков и бутонов зеленовато-желтый.

Запах ароматный, специфический. Вкус водного извлечения горьковатый, иногда сладко-горьковатый.

Трава измельченная. Кусочки листочков, стеблей и соцветий различной формы, отдельно цветки, бутоны, плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет стеблей снаружи зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – серовато или желто-белый, и плодов - зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый с коричневыми вкраплениями, цветков и бутонов зеленовато-желтый. Запах ароматный, специфический. Вкус водного извлечения сладковато- горьковатый.

5.1.2. Микроскопический анализ

В ходе микроскопического анализа устанавливали характерные анатомо-диагностические признаки донника лекарственного травы. Микропрепараты готовили общепринятыми методами. Готовили препараты с поверхности и с поперечных срезов с помощью лезвия, от руки.

Для исследований использовали микроскопы Биолам Р1 и Микромед, с увеличением окуляра 10х, объективов 4х, 10х, 40х, лупы (10х), стереомикроскопа МБС-9 (28х). Фотографирование объектов проводили фотоаппаратом «Canon». Снимки редактировали с помощью программы Adobe Photoshop CS 8.0.

Лист. Для семейства бобовых характерно наличие тройчатосложного листа. При рассмотрении листочка с поверхности видны клетки верхнего

эпидермиса в очертании многоугольные или слегка волнистые; клетки нижнего эпидермиса с извилистым контуром. Над жилками клетки эпидермиса сильно вытянуты, с прямыми боковыми стенками.

На обеих сторонах листочка расположены овальные устьица аномоцитного типа, окруженные 2-5 околоустьичными клетками, на нижнем эпидермисе их значительно больше (рис. 37, 38).

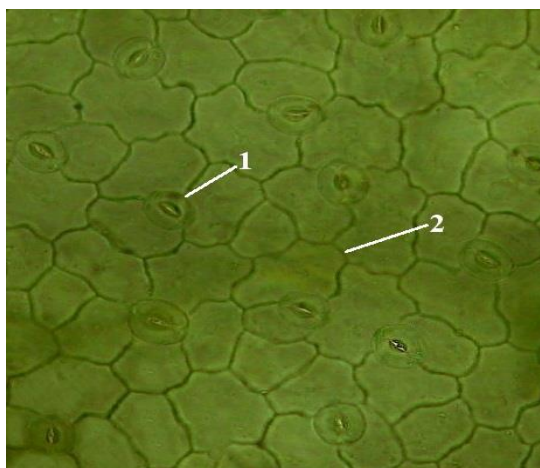


Рис. 37. Фрагмент верхнего эпидермиса листочка донника лекарственного (x 400): 1 – устьица аномоцитного типа, 2 – извилистость клеточных оболочек

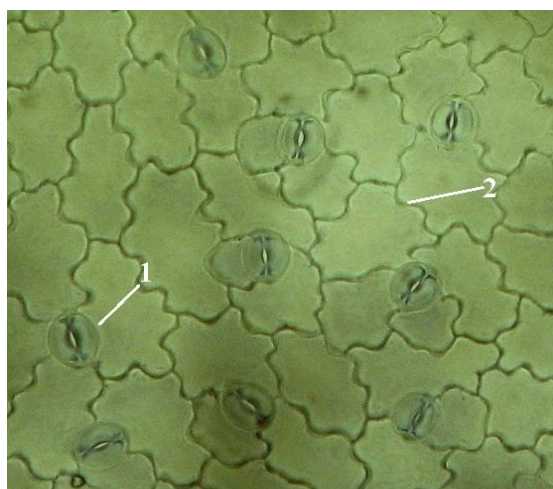


Рис. 38. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника лекарственного (x 400): 1 - устьица аномоцитного типа, 2 - извилистость клеточных оболочек

На нижней стороне листочка встречаются волоски двух типов: простые многоклеточные имеют 1-2 мелкие клетки, лежащие у основания волоска, и одну длинную конечную клетку с едва заметной полостью, очень толстой оболочкой, с неровной, зазубренной поверхностью (рис. 39).

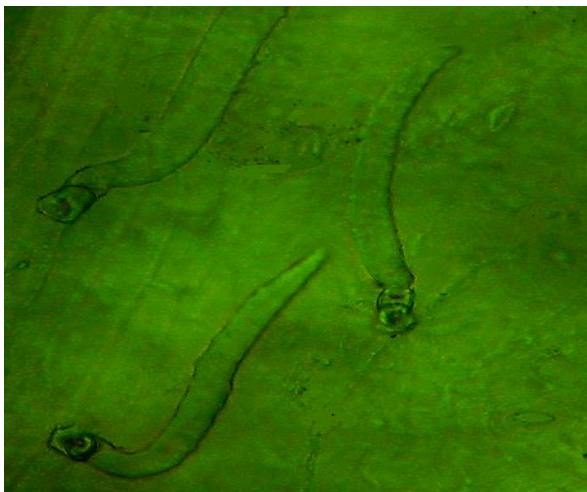


Рис. 39. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника лекарственного (x 400): – простой волосок

Имеются тонкостенные головчатые волоски, состоящие из 1-2 клеточной ножки и 1-4 клеточной овальной головки. На месте отрыва волоска остаётся валик. Клетки эпидермиса образуют розетку. На верхнем эпидермисе волоски встречаются редко (рис. 40).



Рис. 40. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника лекарственного (x 400): 1 – головчатый волосок, 2 – валик на месте отрыва волоска

По крупным жилкам и отдельными островками на мелких жилках встречаются включения калция оксалата в виде призматических кристаллов (рис. 41).



Рис. 41. Фрагменты нижнего эпидермиса листочка донника лекарственного (х 400): призматические кристаллы калция оксалата

Поперечный срез стебля. Установили, что стебель имеет вторичное непучковое строение. В центре стебля - сердцевина, состоящая из крупных паренхимных клеток с тонкими стенками.

Для установления анатомического строения стебля использовали двойное окрашивание: раствором железоммонийных квасцов, затем раствором метиленового синего.

Покровной тканью является однослойная эпидерма, под которой, особенно в ребрах, расположена уголкового колленхима, ниже тонким слоем (1 – 2 клетки) залегает хлоренхима.

Под хлоренхимой небольшими прерывистыми участками располагаются механические волокна. Флоэма располагается неравномерным кольцом, линия камбия выражена нечётко. Ксилема образует участки, между которыми находятся широкие сердцевинные лучи (рис. 42).

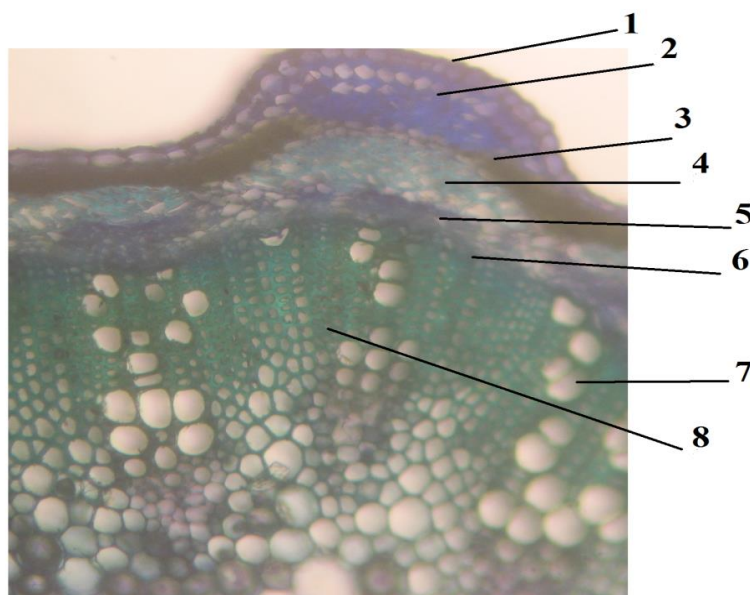


Рис. 42. Фрагмент поперечного среза стебля донника лекарственного травы (х 400): 1 – эпидерма, 2 – угловая колленхима, 3 – хлоренхима, 4 – механические волокна, 5 – флоэма, 6 – камбий, 7 – сосуды ксилемы, 8 – сердцевинные лучи

Цветок. При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами. Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабоизвилистые стенки, иногда со складчатой кутикулой.

Устьица аномоцитного типа, расположены на чашелистиках с наружной стороны (рис.43).



Рис. 43. Фрагмент эпидермиса чашелистиков (х 400)

На поверхности чашелистиков и цветоножек имеются многочисленные простые одноклеточные волоски (рис. 44), головчатые волоски, их обрывки (рис. 45).

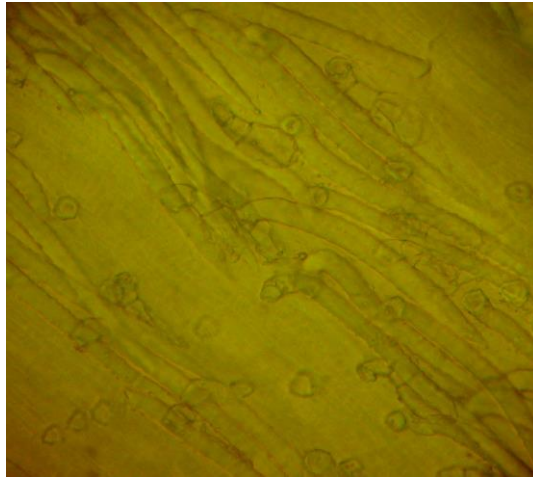


Рис. 44. Простые одноклеточные волоски на поверхности чашелистиков
(x 400)



Рис. 45. Головчатые волоски на поверхности чашелистиков (x 400)

Жилки чашелистиков окружены кристаллоносной обкладкой (многочисленные кристаллы кальция оксалата) (рис. 46).

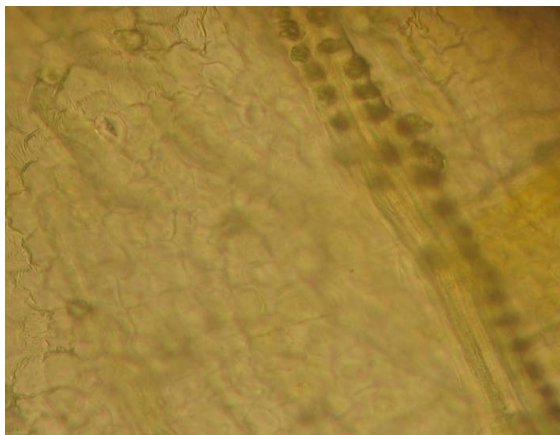


Рис. 46. Кристаллоносная обкладка на поверхности чашелистиков (х 400)

Тычинка. Пыльник имеет две половинки, соединенные друг с другом связником, являющийся продолжением тычиночной нити. Снаружи покрыт эпидермой (рис. 47). Непосредственно под эпидермой располагается слой клеток эндотелия с вторично утолщенными клеточными оболочками. Глубже залегают 1 – 3 слоя некрупных тонкостенных клеток.



Рис. 47. Пыльники (х 20)

Трава порошок. При исследовании микропрепаратов листочка видны клетки эпидермиса со слабоизвилистыми и извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип).

У фрагментов эпидермиса лепестков наблюдаются сосочковидные выросты. На некоторых фрагментах листа и чашелистиков встречаются волоски, характерные для данного сырья: простые многоклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой (рис. 48). Вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку, и простые двурядные волоски с однорядной верхушкой; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1-2-клеточной ножке и их обрывки. В мезофилле фрагментов встречаются жилки с кристаллоносной обкладкой.

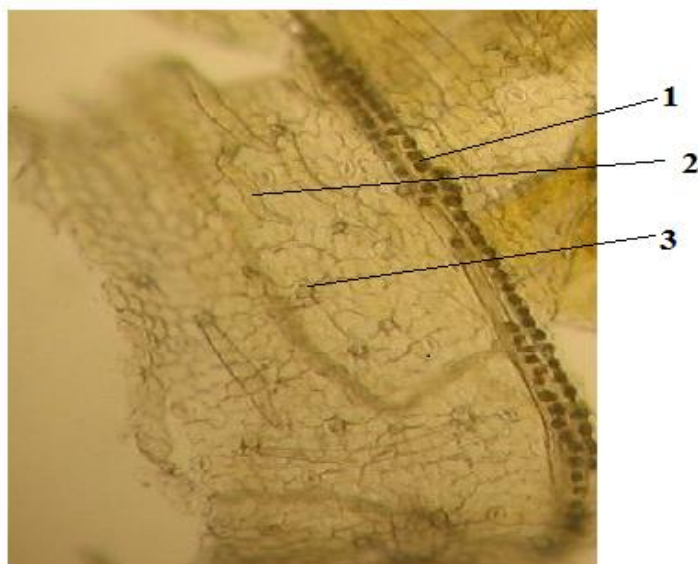


Рис. 48. Порошок: фрагмент листочка верхнего эпидермиса: 1- призматические кристаллы кальция оксалата, 2 – простые многоклеточные волоски, 3 – устьица аномоцитного типа (х 20)

5.2. Определение показателей доброкачественности донника лекарственного травы

Показатели доброкачественности оценивали по методикам ГФ XI. Определяли: потерю в массе при высушивании, золу общую, золу,

нерастворимую в хлористоводородной кислоте 10%, органические и минеральные примеси (табл. 35).

На образцах растительного сырья, собранного из разных районов произрастания в фазу цветения, установлены следующие показатели: потеря в массе при высушивании растительного сырья составляет от 6,17 до 8,14%; зола общая - от 2,74 до 4,82%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте 10 % - от 0,55 до 1,53%; содержание органических примесей - от 0,7 до 1,8%; минеральных - от 0,2 до 0,9% .

Таблица 35

Числовые показатели донника лекарственного травы,
заготовленного из разных мест произрастания Алтайского края

Район сбора	Время сбора	Числовые показатели, % (n=5, P= 95%, t _p = 4,3)														
		Потеря в массе при высушивании			Зола общая			Зола нерастворимая в HCl 10%			Органическая примесь			Минеральная примесь		
		$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\varepsilon, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\varepsilon, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
Бийский	20.06.10	6,71 ± 0,23	0,053	3,4	4,45 ± 0,16	0,037	3,6	1,43 ± 0,08	0,019	5,6	1,3 ± 0,2	0,093	12	0,5 ± 0,1	0,022	20
Бийский	06.07.10	7,17 ± 0,22	0,091	3,1	4,06 ± 0,19	0,079	4,8	0,94 ± 0,06	0,025	6,3	1,5 ± 0,2	0,100	16	0,8 ± 0,3	0,115	33
Бийский	16.07.10	6,83 ± 0,15	0,035	2,2	4,53 ± 0,11	0,045	2,4	1,09 ± 0,04	0,010	3,7	1,5 ± 0,1	0,089	10	0,2 ± 0,1	0,023	50
Бийский	03.08.10	7,35 ± 0,11	0,045	1,5	3,76 ± 0,17	0,070	4,6	1,02 ± 0,13	0,051	12	0,7 ± 0,1	0,029	10	0,3 ± 0,2	0,061	48
Красногорский	11.07.10	6,42 ± 0,16	0,037	2,5	4,82 ± 0,17	0,039	3,5	1,31 ± 0,07	0,016	5,3	1,6 ± 0,1	0,023	8,1	0,6 ± 0,1	0,021	17
Алтайский	08.07.10	6,65 ± 0,19	0,044	2,9	4,21 ± 0,16	0,036	3,8	1,27 ± 0,07	0,016	5,5	1,4 ± 0,1	0,023	7,8	0,6 ± 0,1	0,023	16
Зональный	02.08.10	6,99 ± 0,07	0,030	7,6	2,74 ± 0,12	0,050	4,5	1,53 ± 0,10	0,040	6,5	1,0 ± 0,2	0,08	21	0,2 ± 0,1	0,044	29
Завьяловский	10.06.10	8,14 ± 0,10	0,040	1,3	4,01 ± 0,09	0,036	2,2	1,07 ± 0,12	0,065	13	0,9 ± 0,2	0,046	15	0,5 ± 0,2	0,075	27
Завьяловский	11.07.10	6,97 ± 0,21	0,049	3,0	4,68 ± 0,26	0,060	5,6	1,33 ± 0,08	0,019	6,0	1,8 ± 0,2	0,044	11	0,9 ± 0,2	0,045	22
Завьяловский	24.07.10	6,27 ± 0,08	0,031	1,2	3,56 ± 0,13	0,053	3,7	0,55 ± 0,02	0,051	9,6	1,5 ± 0,1	0,073	8,7	0,7 ± 0,1	0,052	19
Завьяловский	15.08.10	5,95 ± 0,06	0,026	1,1	3,23 ± 0,12	0,061	3,9	0,88 ± 0,05	0,032	8,1	1,2 ± 0,2	0,054	10	0,4 ± 0,1	0,026	20
Завьяловский	29.08.10	6,50 ± 0,36	0,084	5,5	3,85 ± 0,16	0,037	4,1	0,96 ± 0,05	0,012	5,2	1,5 ± 0,2	0,046	12	0,7 ± 0,2	0,047	28
Мамонтовский	17.08.10	6,17 ± 0,12	0,050	2,0	3,14 ± 0,21	0,075	3,9	1,33 ± 0,07	0,028	4,9	1,0 ± 0,2	0,087	15	0,4 ± 0,1	0,026	15

5.3. Определение тяжелых металлов

Объектами исследования являлась донника лекарственного трава собранная в промышленной зоне г. Бийска (район с повышенной техногенной нагрузкой) и Завьяловском районе (экологически чистый район).

Пробоподготовку и определение элементов осуществляли в соответствии с нормативной документацией (глава II). Установили количественное содержание в растительном сырье железа, меди, ртути, мышьяка, кадмия, свинца и никеля (табл. 36).

Таблица 36

Результаты количественного определения некоторых тяжелых металлов в донника лекарственного траве (мг/кг)

Место произрастания	Fe	Cu	Hg	As	Ni	Pb	Cd
г.Бийск	177,2 ± 37,0	9,50 ± 2,60	Ниже ПКО	Ниже ПКО	0,96 ± 0,35	0,66 ± 0,51	0,030 ± 0,010
п.Александровка Завьяловского района	67,8 ±17,3	6,84 ± 2,30	Ниже ПКО	Ниже ПКО	0,32 ± 0,35	0,17 ± 0,10	0,006 ± 0,005

В результате исследования установлено, что в зависимости от техногенной нагрузки содержание в донника лекарственного траве железа составляет 67,8 и 177,2 мг/кг, меди - 6,8 и 9,5 мг/кг, никеля – 0,3 и 0,9 мг/кг, свинца – 0,17 и 0,66 мг/кг, кадмия 0,006 и 0,030 мг/кг. Из полученных данных следует, что содержание тяжелых металлов в сырье, заготовленном в экологически чистом районе ниже, что вполне закономерно.

Доказано, что содержание особо токсичных элементов (свинца, кадмия, мышьяка, ртути) не превышает допустимого уровня, установленного нормативной документацией, независимо от места сбора растительного сырья.

5.4. Определение экстрактивных веществ

Содержание экстрактивных веществ важный показатель качества, характеризующий содержание в растительном сырье всей суммы БАС, извлекаемых соответствующим растворителем. Определение экстрактивных веществ, как правило, проводят при оценке качества растительного сырья, используемого для получения экстрактов.

Проведенные исследования химического состава донника лекарственного травы показали, что основными группами БАС растительного сырья являются флавоноиды и кумарины. Содержание дубильных и липофильных веществ, влияние которых возможно на технологичность и качество экстракта, незначительно.

При выборе оптимального экстрагента основывались на совокупности данных применения различных растворителей для извлечения экстрактивных веществ и основных групп БАС.

На основании данных, полученных при фитохимическом изучении растительного сырья, в эксперименте изучения экстрагирующей способности различных растворителей использовали воду очищенную и спиртоводные смеси с концентрацией спирта этилового от 20 до 80%. Использование спирта более высокой концентрации нецелесообразно, т.к. согласно данным по изучению БАС, выход действующих веществ (кумаринов, флавоноидов) не увеличивается. Использование спирта более высокой концентрации не желательно и в технологическом процессе получения сухого экстракта, т.к. из-за влияния липофильных веществ снижается технологичность, а увеличение расхода спирта приводит к удорожанию процесса.

Количественное содержание кумарина, флавоноидов и экстрактивных веществ определяли по методикам, описанным в главе II. Результаты представлены в таблице 37.

Таблица 37

Результаты определения экстрактивных веществ и БАС
в донника лекарственного траве с использованием различных экстрагентов

Экстрагент	Содержание в % (n = 5, P = 95%, t _p = 2,78)								
	Экстрактивные вещества			Флавоноиды (пересчет на рутин)			Кумарин		
	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	S $\bar{X}$	$\bar{e}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	S $\bar{X}$	$\bar{e}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	S $\bar{X}$	$\bar{e}, \%$
Вода очищенная	42,18 ± 0,46	0,165	1,0	1,21 ± 0,04	0,014	3,31	0,52 ± 0,02	0,007	3,8
Спирт этиловый 20%	42,02 ± 0,31	0,120	1,7	1,37 ± 0,02	0,007	1,46	-	-	-
Спирт этиловый 30%	39,86 ± 0,76	0,273	1,9	-	-	-	0,64 ± 0,04	0,011	6,2
Спирт этиловый 40%	35,98 ± 0,42	0,150	1,1	1,60 ± 0,04	0,012	2,50	0,86 ± 0,03	0,009	3,4
Спирт этиловый 50%	36,08 ± 0,35	0,124	0,9	1,62 ± 0,03	0,011	1,85	0,92 ± 0,02	0,007	2,1
Спирт этиловый 60 %	37,26 ± 0,47	0,169	1,2	1,63 ± 0,02	0,005	1,23	0,91 ± 0,04	0,010	2,3
Спирт этиловый 70%	35,32 ± 0,39	0,139	1,1	1,59 ± 0,03	0,010	1,89	0,90 ± 0,03	0,011	2,7
Спирт этиловый 80%	34,46 ± 0,26	0,092	0,7	1,15 ± 0,03	0,012	2,61	0,91 ± 0,04	0,018	4,3
Спирт этиловый 96%	-	-	-	0,89 ± 0,01	0,008	2,03	0,83 ± 0,04	0,011	3,5

Установлено, что экстрагирующая способность снижается по мере увеличения концентрации спирта (рис. 49).

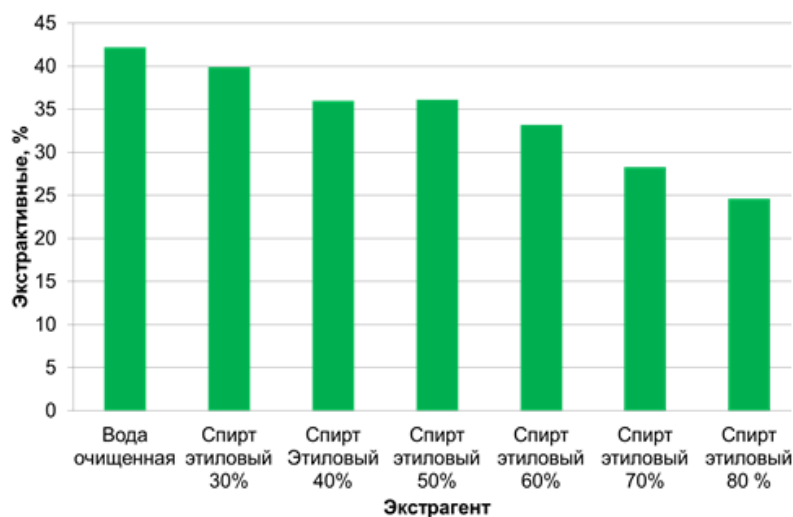


Рис.49. Результаты определения экстрактивных веществ при использовании разных экстрагентов

При этом выход БАС увеличивается с повышением концентрации спирта до 50% (рис. 50-51).

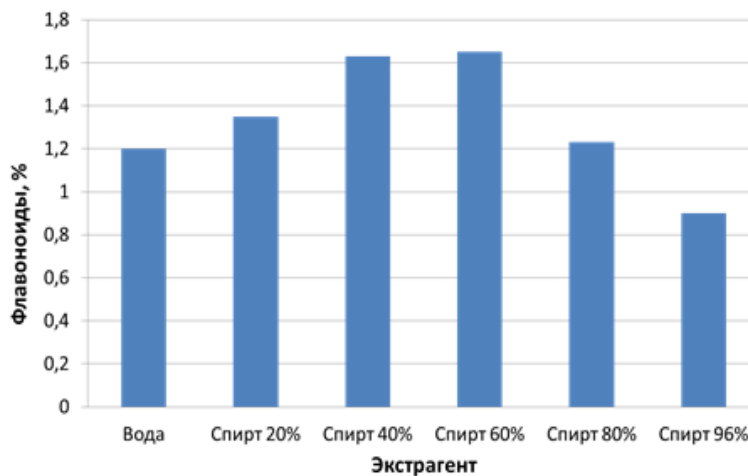


Рис. 50. Результаты определения флавоноидов при использовании разных экстрагентов

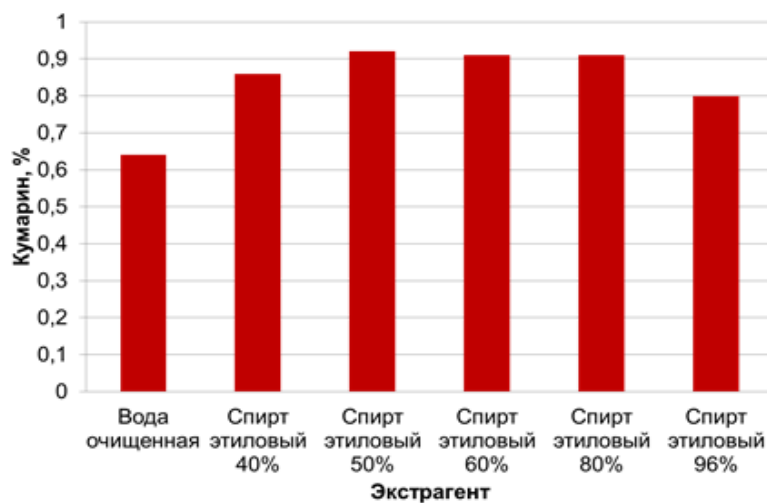


Рис. 51. Результаты определения кумарина при использовании разных экстрагентов

Далее проведен анализ образцов донника лекарственного травы на содержание экстрактивных веществ с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 50% .

В таблице 38 представлены результаты исследований, из которых следует, что содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 50% в донника лекарственного траве, в зависимости от места и времени сбора, составило от 34,6 до 39,4%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – от 1,12 до 1,91 %; содержание кумарина – от 0,40 до 1,48 %.

На основании проведенных исследований для растительного сырья «донника лекарственного трава» установлены и внесены в проект ФСП числовые показатели: потеря в массе при высушивании - не более 8,0%; зола общая - не более 5,0%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте 10% - не более 1,5%; минеральные примеси – не более 1,0% ; органические примеси – не более 2,0% ; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 50% - не менее 34,0%; кумарин - не менее 0,9%.

Разработан проект ФСП «Донника лекарственного травы экстракт сухой» с целью включения фармацевтической субстанции, неиспользуемой при производстве лекарственных препаратов, в Государственный реестр лекарственных средств. Проект ФСП включает разделы, предусмотренные для сухих экстрактов; показатели и нормы представлены в соответствии с требованиями ГФ XI, ГФ XII. В проект ФСП «донника лекарственного травы экстракт сухой» внесены следующие числовые показатели: тяжелые металлы - не более 0,01 %; потеря в массе при высушивании не более 5,0 %; остаточные органические растворители – этанола не более 0,5 %; кумарин - не менее 3,0 %.

Таблица 38

Результаты определения экстрактивных веществ и БАС в образцах донника лекарственного травы,
собранных из разных районов

Район сбора	Время сбора	Числовые показатели, % (n=5, P= 95%, t _p = 4,3)								
		Кумарин			Сумма флавоноидов в пересчете на рутин			Экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 50%		
		$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\epsilon, \%$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Бийский	20.06.10	1,38 ± 0,04	0,006	2,9	1,37 ± 0,04	0,009	2,9	34,61 ± 0,93	0,209	2,60
Бийский	06.07.10	1,48 ± 0,04	0,005	2,7	1,53 ± 0,03	0,007	2,0	38,13 ± 1,11	0,254	2,89
Бийский	16.07.10	1,17 ± 0,02	0,003	1,7	1,34 ± 0,03	0,006	2,2	38,50 ± 1,34	0,299	3,38
Бийский	03.08.10	1,00 ± 0,03	0,006	3,0	1,56 ± 0,04	0,008	2,6	38,64 ± 1,12	0,257	2,85
Красногорский	11.07.10	1,23 ± 0,02	0,004	1,6	1,68 ± 0,04	0,009	2,4	39,38 ± 1,51	0,346	3,81
Алтайский	08.07.10	1,09 ± 0,02	0,005	1,8	1,91 ± 0,05	0,010	2,6	38,22 ± 1,19	0,275	3,14
Зональный	02.08.10	0,40 ± 0,01	0,002	2,5	1,73 ± 0,04	0,008	2,3	34,53 ± 0,78	0,186	2,32
Завьяловский	10.06.10	0,97 ± 0,03	0,007	3,1	1,24 ± 0,02	0,004	1,6	35,29 ± 1,29	0,302	3,68
Завьяловский	11.07.10	1,00 ± 0,02	0,004	2,0	1,18 ± 0,03	0,007	2,5	36,76 ± 1,21	0,278	3,26
Завьяловский	24.07.10	1,02 ± 0,02	0,004	1,9	1,30 ± 0,03	0,006	2,3	36,54 ± 1,33	0,310	3,56
Завьяловский	15.08.10	0,91 ± 0,03	0,006	3,3	1,33 ± 0,03	0,006	2,3	36,91 ± 1,39	0,326	3,79
Завьяловский	29.08.10	0,99 ± 0,03	0,007	3,0	1,12 ± 0,02	0,004	1,8	35,10 ± 0,87	0,206	2,56
Мамонтовский	17.08.10	0,84 ± 0,02	0,005	2,4	1,29 ± 0,04	0,009	3,1	37,08 ± 1,01	0,232	2,69

5.5. Изучение динамики накопления БАС и определение сроков заготовки растительного сырья

Известно, что содержание биологически активных соединений в растениях в значительной мере зависит от времени заготовки и условий произрастания: состав почв, влажность, температура и другие экологические факторы.

Для изучения зависимости накопления основных групп биологически активных соединений от места произрастания и времени сбора донника лекарственного травы, растительное сырье заготавливали в фазу цветения (с начала июня до конца августа) в районах Алтайского края, различающихся по климатическим условиям. В Бийском и Завьяловском районах сбор проводили с периодичностью 1-2 недели с одной и той же плантации. В Красногорском, Алтайском, Зональном, Мамонтовском районах заготовку проводили спонтанно.

Бийский и Красногорский районы расположены в предгорье, что обуславливает особый микроклимат с достаточной влажностью. Для данных районов характерны лесные черноземные, плодородные почвы. Завьяловский и Мамонтовский районы – степные, засушливые, с луговыми солонцеватыми черноземами.

Исследование зависимости содержания БАС от срока сбора и места произрастания выявило, что содержание флавоноидов в донника лекарственного траве в границах одной местности в течение периода цветения меняется незначительно. В то же время наблюдается зависимость от места произрастания (рис.52).

Максимальное содержание флавоноидов обнаружено в образце сырья, заготовленного в Красногорском районе в первую декаду июля (1,9%). В образце из Завьяловского района, заготовленном в этот же период времени, содержится 1,2% флавоноидов в пересчете на рутин. В донника лекарственного траве, произрастающей в засушливом степном районе, на скудных почвах, флавоноидов содержится меньше, что вполне закономерно.

Содержание кумарина в растительном сырье так же зависит от места произрастания (рис. 53).

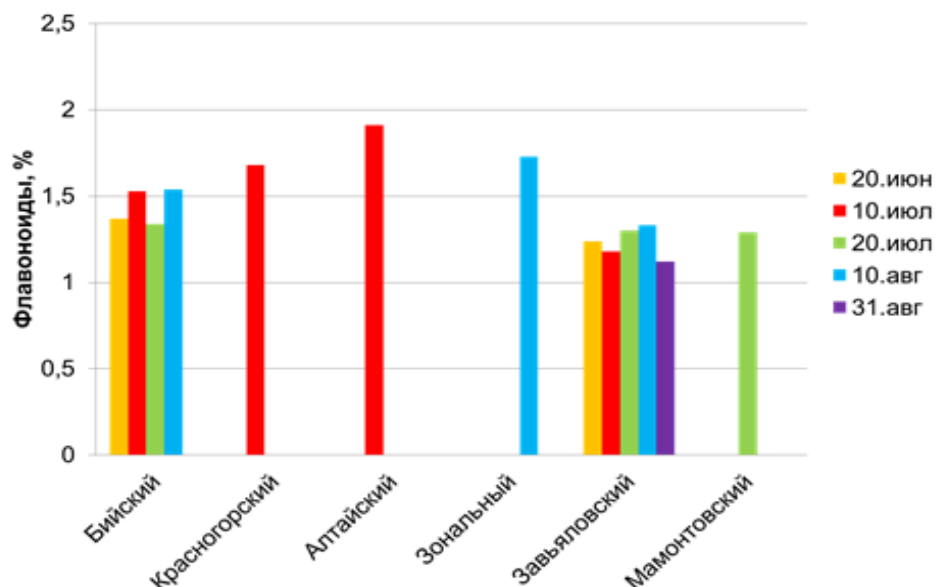


Рис.52. Зависимость содержания суммы флавоноидов от места и времени сбора донника лекарственного травы

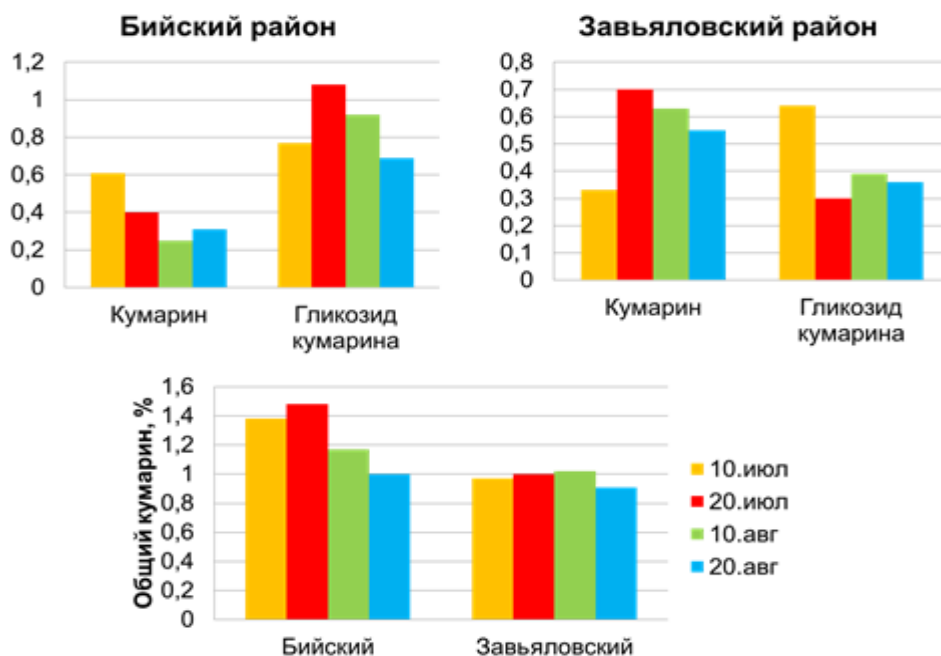


Рис.53. Зависимость содержания кумарина от места и времени сбора донника лекарственного травы

Максимальное содержание кумарина обнаружено в доннике лекарственном, произрастающем в Бийском и Красногорском районах. При этом основная его часть содержится в виде гликозида (до 1,1%). В сырье, собранном в Бийском районе кумарин содержится преимущественно в виде гликозида.

В сырье, заготовленном в Завьяловском и Мамонтовском районах, большая часть кумарина содержится в свободном виде (до 0,7%). Низкое содержание водорастворимого гликозида кумарина связано, возможно, с дефицитом влаги, свойственным для данной местности.

В результате исследований установлено, что заготовку ЛРС можно производить с 15 июня по 15 августа, в фазу цветения, что не противоречит правилам заготовки трав.

5.6. Определение сроков хранения донника лекарственного травы и экстракта сухого

Качество ЛРС изменяется в процессе хранения. Необходимо установить сроки, в течение которых показатели качества растительного сырья соответствуют нормам, заявленным в спецификации.

Срок годности донника лекарственного травы устанавливали по результатам анализа 3 серий сырья цельного и 3 серий сырья измельченного, заложенного на хранение в заявленной упаковке с июля 2010 г по январь 2013 г в контролируемых условиях складской зоны при температуре 10-25⁰С и относительной влажности 40-70%.

Критериями оценки качества растительного сырья служили показатели спецификации: потеря в массе при высушивании, зола общая, содержание кумарина, экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 50%. Содержание дикумарина, как посторонней примеси, определяли факультативно.

Срок годности донника лекарственного травы экстракта сухого устанавливали по результатам анализа 3 опытно-промышленных партий, заложенных на хранение с февраля 2011 г по февраль 2014 г при температуре 10-25 °С и относительной влажности 40-70%. Качество экстракта контролировали по показателям внешний вид, потеря в массе при высушивании, содержание кумарина.

Анализ проводили через каждые 6 месяцев в течение 2 лет. Данные экспериментов свидетельствуют, что числовые показатели сырья и экстракта при хранении в течение 2 лет статистически значимо не изменялись (приложение 1, 2,3).

Срок годности донника лекарственного травы 2,5 года, экстракта сухого – 2 года (срок наблюдения) при хранении в заявленной упаковке при температуре 15 ± 10 °С и относительной влажности 40-70%.

Выводы

1. На основании изученных морфологических признаков травы *Melilotus officinalis* L. установлено, что:

Цельное сырье представляет собой цельные или частично измельченные облиственные цветущие верхушки, веточки растений с ребристым стеблем диаметром до 3 мм и длиной до 30 см. Листья очередные, мелкие, тройчатосложные. Прилистники ланцетные или шиловидные, почти всегда цельнокрайние. Нижние листочки обратно яйцевидные, верхние – продолговатые или ланцетные, по краю с 10 – 13 неровными зубчиками.

Цветки мотыльковые мелкие длиной от 5 до 7 мм. Чашечка колокольчатая, пятизубчатая, голая. Иногда встречаются в незначительном количестве мелкие незрелые плоды – бобы длиной от 3 до 5 мм, поперечно-морщинистые, голые или покрытые редкими волосками. Семя одно, реже два.

Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – сероватый или желто-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, цветков и бутонов зеленовато-желтый.

Измельченное сырье. Кусочки листочков, стеблей и соцветий различной формы, отдельно цветки, бутоны, плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет стеблей снаружи зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – серовато или желто-белый, и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый с коричневыми вкраплениями, цветков и бутонов зеленовато-желтый.

2. В результате изучения анатомического строения, установлены отличительные анатомо – диагностические признаки сырья:

Цельное сырье. Стебель имеет вторичное непучковое строение. В центре стебля - сердцевина, состоящая из крупных паренхимных клеток с тонкими стенками. Покровной тканью является однослойная эпидерма, под которой, особенно в ребрах, расположена угловая колленхима, ниже тонким слоем (1 – 2 клетки) залегает хлоренхима. Под хлоренхимой небольшими прерывистыми участками располагаются механические волокна. Флоэма располагается неравномерным кольцом, линия камбия выражена нечётко. Ксилема образует участки, между которыми находятся широкие сердцевинные лучи.

При рассмотрении листа с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса в очертании многоугольные или слегка волнистые; клетки нижнего эпидермиса с извилистым контуром. Над жилками клетки эпидермиса сильно вытянуты с прямыми боковыми стенками.

На обеих сторонах листочка расположены овальные устьица аномоцитного типа, окруженные 2-5 околоустьичными клетками, на нижнем эпидермисе их значительно больше. На нижней стороне листочка встречаются волоски двух типов: простые многоклеточные, имеют 1-2 мелкие клетки, лежащие у основания волоска, и одну длинную конечную

клетку с едва заметной полостью, очень толстой оболочкой, с неровной, зазубренной поверхностью. Имеются тонкостенные головчатые волоски, состоящие из 1-2 клеточной ножки и 1-4 клеточной овальной головки. На месте отрыва волоска остаётся маленький валик. Клетки эпидермиса образуют розетку. На верхнем эпидермисе волоски встречаются редко. По крупным жилкам и отдельными островками на мелких жилках встречаются включения кальция оксалата в виде призматических кристаллов.

При рассмотрении лепестков цветка с поверхности видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами. Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабоизвилистые стенки, иногда со складчатой кутикулой. Устьица аномоцитного типа, расположенные на чашелистиках с наружной стороны. На поверхности чашелистиков и цветоножек имеются многочисленные простые одноклеточные волоски, головчатые волоски, и их обрывки.

Измельченное сырье. При исследовании микропрепаратов видны клетки эпидермиса листочка со слабоизвилистыми и извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). У фрагментов эпидермиса лепестков наблюдаются сосочковидные выросты. На некоторых фрагментах листа и чашелистиков встречаются волоски, характерные для данного сырья: простые многоклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой. Вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку, и простые двурядные волоски с однорядной верхушкой; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1-2-клеточной ножке и их обрывки. В мезофилле фрагментов встречаются жилки с кристаллоносной обкладкой. Проводящие пучки представлены спиральными сосудами.

3. Доказано, что содержание особо токсичных элементов (свинца, кадмия, мышьяка, ртути) не превышает допустимого уровня, установленного нормативной документацией, не зависимо от места сбора растительного сырья.
4. Установлены числовые показатели растительного сырья и экстракта сухого:

Донника лекарственного трава: потеря в массе при высушивании - не более 8,0%; зола общая - не более 5,0%; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте 10% - не более 1,5%; минеральные примеси – не более 1,0% ; органические примеси – не более 2,0% ; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 50% - не менее 34,0%; кумарина - не менее 0,9% .

Донника лекарственного травы экстракт сухой: тяжелые металлы - не более 0,01 %; потеря в массе при высушивании не более 5,0 %; остаточные органические растворители – этанола не более 0,5 %; кумарин - не менее 3,0 %.

5. Определен срок годности растительного сырья – 2,5 года и экстракта сухого – 2 года (срок наблюдения).
6. Разработаны проекты ФСП «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* L. цельная и измельченная «ангро», «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок». Акт внедрения в работу ЗАО «Эвалар» от 08.04.2013 г.

Общие выводы

1. Проведено комплексное фитохимическое изучение донника лекарственного травы и экстракта сухого.
Установлено наличие в растительном сырье: кумаринов, флавоноидов группы флавонола, гидролизуемых дубильных веществ, тритерпеновых

сапонинов, водорастворимых полисахаридов и пектина, аминокислот, липофильных веществ.

2. Определен качественный состав БАС растительного сырья. Идентифицированы *флавоноиды*: мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А, гиперозид, кемпферол-3-гликозид-7-биозид, кемпферол-3-биозид; *кумарины*: кумарин, гликозид кумарина; *фенолокислоты*: о-кумаровая кислота, мелилотовая кислота, галловая кислота; *моносахариды*: глюкоза, галактоза, фруктоза, арабиноза, рамноза; *аминокислоты*: треонин, валин, изолейцин, лейцин, глютамин, аргинин; *липофильные вещества*: β-каротин, зеаксантин, лютеин, β-ситостерин, δ-токоферол, γ-токоферол, α-токоферол, каприловая кислота, каприновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, олеиновая кислота, α-линолевая кислота, линоленовая кислота, гондоиновая кислота.
3. Установлено количественное содержание биологически активных соединений.

Донника лекарственного трава: флавоноиды в пересчете на рутин - 1,1-1,9%; кумарин - 0,8-1,5%; связанный кумарин - 0,28-1,08%; свободный кумарин - 0,25-0,70%; мелилотовая кислота – до 0,16%; о-кумаровая кислота – до 0,07%; тритерпеновые сапонины в пересчете на эсцин - 0,3-0,5%; дубильные вещества в пересчете на галловую кислоту – 0,14%; водорастворимые полисахариды – 4,7%; протопектин – 3,8%; аминокислоты в пересчете на изолейцин – 1,6%; сумма фенольных веществ в пересчете на галловую кислоту – 2,1%; сумма липофильных веществ – 5,1%; сумма нейтральных липидов – 2,3%; хлорофиллы – 100 мг%; каротиноиды – 111 мг%; ксантофиллы – 58 мг%; пальмитиновая кислота – 22,0%, α-линоленовая – 10,7%, линоленовая - 50,8% (от суммы жирных кислот); витамин Е – 4 мг%.

4. Установлено, экстракт сухой содержит комплекс БАС идентичный по качественному составу растительному сырью. Содержание основных групп БАС в донника лекарственного экстракте сухом составило: сумма флавоноидов в пересчете на рутин – 2,8 - 3,4%; свободный кумарин – 1,1 - 1,6%; общий кумарин – 3,4 - 4,1%; о-кумаровая кислота - 0,038 - 0,053%; мелилотовая кислота – 0,084 - 0,128%; сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин – 1,4 - 1,8%.
5. Доказано, что экстракт донника лекарственного травы, не обладает токсичностью, оказывает влияние на синтез факторов свертывания крови в печени, проявляя свойства антикоагулянта непрямого действия.
6. Установлены морфолого – анатомические признаки, предложены показатели качества для стандартизации донника лекарственного травы и экстракта сухого.
7. В процессе исследований разработаны и усовершенствованы аналитические методики.
8. Разработаны проекты ФСП «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* L. цельная и измельченная «ангро», «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок». Акт внедрения в работу ЗАО «Эвалар» от 10.02.14 г.

Библиографический список

1. Акопов, И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение / И.Э. Акопов. – Ташкент, 1990. – 305 с.
2. Алимова, Е.К. Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии / Е.К. Алимова, А.Т. Аствацатурьян. - М., 1967. - 109 с.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. – М., 1983. – 180 с.
4. Афанасьева, Л. Ф. Справочник лекарственных растений/ Л. Ф. Афанасьева, Г. Я. Мордовской, И. Д. Нешта. - Свердловск: Средне-Уральское книжное издательство, 1990. - 156 с.
5. Белеев, Н. В. Современная энциклопедия траволечения/ Н. В. Белеев. - М.: Современный литератор, 1999. – 92 с.
6. Бергельсон, Л.Д. Препаративная биохимия липидов/ Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловицкая, Ю.Г. Молотковский. - М., 1981. - 256 с.
7. Блинова, К. Ф. Растения для нас / К. Ф. Блинова, В. В. Вандышев, М. Н. Комарова. - СПб.: Учебная книга, 1996. - 606 с.
8. Бондаренко Б.Н. Количественное определение аминокислот при хроматографии в тонком слое / Б.Н. Бондаренко // Лаб. дело. 1984. № 2. С. 118–120.
9. Бубенчикова, В.Н. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, И.Л. Дроздова // Химико – фармацевтический журнал. – 2004. - №4. – С. 24 – 25.
10. Буданцев, А. Л. Иллюстрированный определитель растений Карельского перешейка / А. Л. Буданцев, Г. П. Яковлев. - СПб.: СпецЛит; Издательство СПХФА, 2000. - 478 с.

11. Ветров, П.П. Определение содержания липофильных веществ и суммы каротиноидов в растительном сырье/ П.П. Ветров, С.В. Гарная, Л.Г. Долгоненко //Химико-фармацевтический журнал.- 1989. - №3.- С. 320-325.
12. Гилярова, М. С. Биологический энциклопедический словарь. М.: 1989. - 300 с.
13. ГОСТ 30178–96 Сырье и продукты пищевые. Атомно–адсорбционный метод определения токсичных элементов». Введ. 01.01.1998. - М.: Изд–во стандартов, 1997. - 13 с.
14. ГОСТ 30623. Масла растительные и маргариновая продукция. Метод обнаружения фальсификации. Введ. 01.01.2000. - М.: Изд-во стандартов, 1998. - 16 с.
15. ГОСТ 26929–94. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. Введ. 01.01.1996. - М.: Изд–во стандартов, 1995. - 16 с.
16. ГОСТ 26930–86. Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка. Государственный стандарт Союза ССР. Введ. 01.01.1987. - М.: Изд–во стандартов, 1985. 14 с.
17. ГОСТ Р 51962–2002. Продукты пищевые и продовольственное сырье Инверсионно–вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка. Введ. 29.11.2002. - М.: Изд–во стандартов, 2003. 13с.
18. ГОСТ 2226-88. Мешки бумажные. Технические условия. Введ. 01.01.1987. - М.: Изд–во стандартов, 1985. 14 с.
19. ГОСТ 14101 «Трава донника». М., 1969. 4 с.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации. Часть 1. - М., 2008. – 704 с.

21. Государственная фармакопея СССР: в 2 т. Т. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., и доп. – М.: медицина, 1987. – 336 с.
22. Государственная фармакопея СССР: в 2 т. Т. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., и доп. – М.: медицина, 1989. – 400 с.
23. Гринкевич, Н.И., Баландина, И.А., Ермакова, В.А, Зорин, Е.Б. и др. Лекарственные растения. Справочное пособие/ под ред. Н.И. Гринкевич. - М., 1991. - С. 106-107.
24. Гуркова, Е.В. Особенности вегетации донника в условиях приобской лесостепи Алтайского края/ Е.В. Гуркова, Е.Р.Шукис// Кормовая база. - 2007. - №7. С. 66-71.
25. Гуркова, Е.В. Донник (биология, селекция, агротехника в условиях юга Западной Сибири)/ Е.В. Гуркова, Е.Р. Шукис. - Барнаул, 2012. - 212 с.
26. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. М.: Медицина, 1977. – 275с.
27. Дренин, А.А. Новый гликозид изофлавоно из *Trifolium Pratense* L./ А.А. Дренин, Э.Х. Ботиров, Ю.П. Туров// Химия растительного сырья. - 2010. - №2. - С. 53-56.
28. Дроздова, И.Л. Выделение и химическое изучение полисахаридов травы донника рослого (*Melilotus altissimus* Thuill.)/ И.Л. Дроздова// Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2004. - № 1. - с.173-175.
29. Ермаков, А.И., Арасимович, В.В., Ярош, Н.П. Методы биохимического исследования растений. - 3-е изд., перераб. и доп./ Под ред. А.И. Ермакова. - Л., 1987. - 430 с.

30. Завражнов, В. И. Лекарственные растения: лечебное и профилактическое использование / В. И. Завражнов, Г. И. Китаева, К.Ф. Хмелев. – Воронеж: Изд. ВГУ, 1993. – 480 с.
31. Западнюк, И.П. Лабораторные животные / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – Киев, 1983. – 384 с.
32. Запрометов, М.Н. Основы биохимии фенольных соединений / М.Н. Запрометов. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
33. Зимин, В. Н. Библиотека лекарственных растений / В. Н. Зимин, В. К. Калинина. – СПб.: Медицина, 1992. – 142 с.
34. Казарина, Т. Растения – целители/ Сост. Т. Казарина. - Смоленск: из-во Русич, 1997. - 608 с.
35. Кейтс, М. Техника липидологии/ М. Кейтс. - М., 1975. - 321 с.
36. Киселева, Т.Л., Карпеев, А.А. Гомеопатия и фитотерапия в лечении сердечно-сосудистых болезней/ Под ред. Т.Л. Киселевой, А.А. Карпеева. - М., 1997. - 686 с.
37. Ковалева Н. Г. Лечение растениями / Н. Г. Ковалева, М. П. Зиннер. – М.: Советский спорт, 1992. – 198 с.
38. Комарова, М.Н. и др. Фитохимический анализ лекарственного сырья: Методические указания к лабораторным занятиям/ Под ред. К.Ф.Блиновой. – СПб., 1998.- 60 с.
39. Королев В.А. Фармакогностическое изучение представителей рода донник. Автореферат диссертации. Пермь. 1996 г.
40. Кортиков, В. Н. Лекарственные растения / В. Н. Кортиков, А. В. Кортиков. - М.: Айрисс-пресс, 1999. - 768 с.
41. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А.Толстиков. – Новосибирск, 2007. – 232с.

42. Красноборов, И. М. Определитель растений Алтайского края/ И. М. Красноборов, М.Н.Ломоносова, Д.И.Шауло.- Новосибирск: СОРАН, филиал «Гео», 2003. - 634 с.
43. Краснов Е.А., Березовская Т.П. Выделение и анализ природных БАВ / Краснов Е.А., Березовская Т.П.—Томск: Издательство Томского университета, 1987.—184 с.
44. Крылов, Н. Н. Травы жизни и их искатели / Н. Н. Крылов, И. А. Калмыкова. – Томск, 1992. – 198 с.
45. Куликов, В.В. Лекарственные растения Алтайского края/ В.В. Куликов. - Барнаул: Алтайское книжное издательство, 1975. - С. 79 – 81.
46. Купеев, В.Г. Клиническая эффективность и теоретическая обоснованность лазерофореза в лечении сердечно-сосудистых патологий/ В.Г. Купеев, Е.В. Купеева, Н.А. Тимошина// Современные проблемы науки и образования. – 2006. - № 5. - С. 93-96.
47. Лавренов, В.К., Лавренова, Г.В. Полная энциклопедия лекарственных растений - СПб., 1999. - т.1. – 735 с.
48. Ладыгина, Е.Я. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е.Я. Ладыгина и др., под ред. Н.И. Гринкевич . – М.: Высшая школа, 1983. – 175 с.
49. Ложкин, А.В. Природные кумарины: методы выделения и анализа (обзор)/ А.В.Ложкин, Е.И. Саканян //Химико-фармацевтический журнал. – 2006. - Том 40, - № 6 – С. 47-56.
50. Лысенко, Л.М. Агроэкологическая роль донника, как парозанимающей культуры в лесостепи Алтайского края/ Л.М. Лысенко// Сборник научных трудов к 100-летию профессора Н.В.Орловского. - Барнаул, 1999. - С. 80-85.

51. Максютин, Н.П., Комисаренко, Н.Ф., Прокопенко, А.П. и др. Растительные лекарственные средства/ Под ред. Н.П.Максютин. - Киев, 1985. - 280 с.
52. Махлаук, В. П. Лекарственные растения в народной медицине / В. П. Махлаук. - Саратов: Приволж. кн. Изд-во, 1993. -544 с.
53. Методические указания МУК 4.1.1472 – 03. Атомно-абсорбционное определение массовой концентрации ртути в биоматериалах животного и растительного происхождения (пищевых продуктах, кормах и др.).
54. Минаева, В.Г. Лекарственные растения Сибири. - 5-е изд., перераб. и доп./ В.Г. Минаева, отв. ред. А. В. Кумина. - Новосибирск: Наука, Сибирское отделение,1991.- 428 с.
55. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2009. – 560 с.
56. Момот, А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики/ А.П. Момот. – СПб., 2006. – 208 с.
57. Никитин, А. А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений / А. А. Никитин, И. А. Панкова. - Л.: Наука, 1982. – 765 с.
58. Оводов, Ю.С. Пектиновые вещества растений Европейского Севера России/ Ю.С. Оводов, В.В. Головченко, Е.А. Гюнтер, С.В. Попов. - Екатеринбург, 2009. – 111 с.
59. Орлова, Е.А. Фитотерапия. Лечебные таинства природы / Е.А. Орлова. -М.: ТЕРРА, 2001. - 560 с.
60. Положий, А.В. Флора Сибири/ А.В. Положий, С.Н. Выдрин, В.И. Курбатский. - Новосибирск, 1996.- Т. 12.- 208 с.
61. Попов, А.П. Лекарственные растения в народной медицине / А.П.Попов. _ Киев, 1969. – 314 с.

62. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Бобовые/ отв. ред. П. Д. Соколов.—Ленинград : Наука , 1985. - 336 с.
63. Рейвн, П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника в 2 т. Т.1. / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М.: Мир, 1990. – 569 с.
64. Романов, А.В. Определение углеводного состава меда методом ВЭЖХ/ А.В. Романов, О.Г. Ларионов// Сорбционные и хроматографические процессы. - 2007. – Т.7. - Вып.5. - С. 719-725.
65. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – 2 изд., перераб. и доп./ Под общей ред. члена-кор. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
66. Салохин, А.В., Кулеш Н.И., Маханьков В.В. Флавоноиды дальневосточных видов рода *Cypripedium* (*Jrchidaceae*) / А.В. Салохин, Н.И. Кулеш, В.В. Маханьков // Растительные ресурсы. - 2010. - Т 46. - Вып. 1. - С. 86-91.
67. СанПиН 2.3.2.1078-01. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. // Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов /— М., Минздрав России, 2002.
68. Симонян, А.В. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: методические рекомендации/ А.В. Симонян, А.А. Саламатов, Ю.С. Покровская, А.А. Аванесян. - Волгоград, 2007. - 106 с.
69. Сироткина, Е.Е. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. - Томск, 1987. - 185 с.
70. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. Руководство для врачей. - М., 2000. - 976 с.

71. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям/ С.Я. Соколов. - М.: Медицина, 1993. - 203 с.
72. Союнова, Ж.А. Фармакогностическое изучение свежесобранного сырья отдельных представителей рода *Artemisia* L. и гомеопатических матричных настоек из него: Автореф. дисс. кан. фарм. наук/ Ж.А. Союнова. - М. 2012.- 25 с.
73. Суворов В.В., Донник, М.-Л., 1962. 182 с.
74. Сычев, И.А. Действие полисахаридов донника желтого на систему кроветворения в норме и при патологии / И.А. Сычев, В.М. Смирнов, Г.В. Подколзин// Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2007. - Т.1, - №1. - С. 50-58.
75. Сычев, И.А. Механизм радиопротекторного действия полисахарида донника желтого – пектина / И.А.Сычев, В.М. Смирнов, В.Г. Порядин.// Вестник РГМУ. - 2008.- №1 (60). - С. 49-54.
76. Таловина, Г.В. Род *Melilotus* Mill. во флоре России и сопредельных стран (систематика, география, экология, стратегия сохранения): Автореф. дисс. канд. фарм. наук. 03.02.01. / Г.В. Таловина. - СПб., 2011. – 10 с.
77. Телятьев, В.В. Полезные растения Центральной Сибири/ В.В. Телятьев. - Иркутск, 1987. – 400с.
78. Универсальная энциклопедия лекарственных растений/ Сост. И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. - М., 2000. - 656 с.
79. Фармакопея США: USP 29; Национальный формуляр: NF 24. Пер. с англ. М., 2009. Т. 2. С. 2929-2933.
80. Фармакопейная статья предприятия «Клевера трава цельная и измельченная «ангро», ЛСР -005105/10-010610. - 16 с.
81. Федосеева, Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.)

- Fitsch.), произрастающего на Алтае/ Л.М. Федосеева// Химия растительного сырья. - 2005. - №3. - С. 45-50.
82. Федосеева, Л.М. Изучение и сравнительная оценка липофильных веществ зеленых, красных и черных листьев бадана толстолистного, произрастающего на Алтае/ Л.М. Федосеева, Т.С. Малолеткина// Химия растительного сырья. - 1999. - №2. - С. 113-117.
 83. Ходаков, Г.В. Терпеновые и стероидные гликозиды некоторых представителей рода Донник (*Melilotus*), произрастающих в Крыму: Автореф. дисс. кан. хим. Наук. 02.00.10./ Г.В. Ходаков. - Одесса, 1995. – 24 с.
 84. Чиков, П.С. Лекарственные растения.- 4-е изд., перераб. и доп./ П.С. Чиков. - М.: Медицина, 2002.- 496 с.
 85. Ширшова, Т.И. Липиды и высшие жирные кислоты в *Allium Strictum* (*Alliaceae*)/ Т.И. Ширшова, Г.А. Волкова, Н.В. Матистов// Растительные ресурсы. - 2010. - Т.46. - вып.2. - С. 105-109.
 86. Ширшова, Т.И. Липиды и высшие жирные кислоты в некоторых видах рода *Berberis* (*Berberidaceae*)/ Т.И. Ширшова, Л.А. Скупченко, И.В. Груздев// Растительные ресурсы. - 2010. - Т.46. - Вып.1. - С. 72-76.
 87. Электронный ресурс - <pdf/lymphaselect.pdf>
 88. Юркевич, И. Д. Лекарственные растения их применение/ И. Д. Юркевич, И. Д. Мишин. - Минск, 1976. - 590 с.
 89. Яковлев, Г. П. Ботаника: Учебник для вузов / Г. П. Яковлев, В. А. Челомбитко. - СПб: СпецЛит, из-во СПХФА, 2001. – 680с.
 90. Якубке, Х.-Д., Ешкайт, Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки/ Под.ред. Ю.В.Митина. - М.: 1985.- 82 с.
 91. Akeson, Walter R. Effect of Genotype and Growth Stage on Distribution of Melilotic Acid, o-Coumaric Acid, and Cournarinic Acid in

- Melilotus alba* Desr. / Walter R. Akeson, H. J. Gorz, F. A. Haskins // Published in Crop Science. 1963. - V. 3. - No. 2. - P. 167-171.
92. Anwer, M. Suhail. Chemical constituents from *Melilotus officinalis*/ M. Suhail Anwer, M. Mohtasheem, Iqbal Azhar, S.W. Ahmed, H. Bano // Basic and Applied Sciences. - 2008. -Vol. 4. - No.2. - P. 89-94.
 93. Babilliot, J. Test Esberiven in the pathology of Circulatory System Return / J. Babilliot // Phlebology. 1977. - Vol 30. - P. 209-212.
 94. Brendler, T. Herbal Remedies (Heilpflanzen) / T. Brendler, J. Gruenwald, C. Jaenicke // Deutscher Apotheker Verlag. 1997.
 95. Daniela Hanganu. LC/MS analysis of isoflavones from fabaceae species extracts/ Daniela Hanganu, Iulian Vlase, Neli Olah // Farmacia. 2010. - V. 58. - P.177-183.
 96. Dombrowicz, E. Phenolic acids in herb *Melilotus officinalis* / E. Dombrowicz, L. Swiatek, R. Gurun, R. Zadernowski // Pharmazie. 1991. - Vol. 46. - P. 156-157.
 97. Duke, J.A. CRC Handbook of Medicinal Herbs / J.A. Duke. - Florida, 1985. - 305 p.
 98. Emanuela Martino, Ilaria Ramaiola, Mariangela Urbano, Francesco Bracco, Simona Collina. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction // Journal of chromatography A. 2006. -No.1125. - P. 147-151.
 99. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use. *Melilotus officinalis* (L.) Lam., herba. Assessment report for the development of community monographs and for inclusion of herbal substance(s), preparation(s) or combinations thereof in the list/ Doc. Ref. EMEA/HMPC354183/2007. - London, 2008. - 38 c.
 100. Feser, A. Experience with a sweet clover extract in outpatient practice therap / A. Feser // Gegenw. 1960. - Vol. 12. - P.3.

101. Giraud, D. Testing a therapeutic phlebothrombosis lymphologique in treatment of mastodynia / D. Giraud // Rev. Fr Gynecol. Obstet. 1984. – Vol. 79. - P. 229-232.
102. ESCOP Monographs, 2nd Edition, 2003 126 natural 1 September 2007.
103. Galand, N. Separation of flavonoids, coumarins and anthocyanins in plant extracts by overpressured layer chromatography. N. Galand, J. Pothier, V. Mason, C. Vier // Pharmazie. 1999. – Vol. 54. – P. 468-471.
104. Girb, Cerasela Elena. Melilotiherba. Pharmacognostic analysis of the row material / Cerasela Elena Girb, Ligia Elena DuTu, Maria Lidia Porescu // Farmacia. 2009. - Vol. 57. - P. 184- 191.
105. Grieve, M. A Modern Herbal / M. Grieve, C. Barnes. - New York, 1996. – P. 525-527.
106. Guerrero-Rodrigues, Juan de Dios. Growth and nutritive value of Lucerne (*Medicago sativa* L.) and Melilotus (*Melilotus albus Medik*) under saline conditions. / Juan de Dios Guerrero-Rodrigues. Australia, 2006. – 158 p.
107. Hegi, G. Illustrierte Flora von Mittel-Europa / G. Hegi. - München, 1924. – P. 1236-1248.
108. H. Wagner S. Blatt. Plant Drag Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition. 2003. - 384 p.
109. Kang, S.S. Soyasapogenols B and E from *Melilotus officinalis*/ S.S. Kang, C-H. Arch Lim // Pharm Res. 1987. - Vol. 10. - P. 9-13.
110. Kang, S.S. A new sapogenin from *Melilotus officinalis* / S.S. Kang, W.S. Woo // Nat. Prod. 1988. Vol. – 51. - P. 335-338.
111. Klein, L. Flebopatias treatment of Melilotus extract / L. Klein // Pren. Med Argent. 1967. - Vol. 54. - P. 1191-1193.
112. Lei Zhao. N-butanol Extract from Melilotus Suaveolens Ledeb Affects Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines and Mediators / Lei Zhao, Jun-

- Yan Tao, Shu-Ling Zhang, Feng Jin, Ran Pang, Ji-Hua // Dong Advance Access Publication. 2007. - V. 14. – P. 97-106.
113. Leng, J.J., Heugas-Darraspen J.P., Fernon M.J. Treatment of varicose veins during pregnancy and the postpartum period/ J.J.Leng, J.P. Heugas-Darraspen, M.J. Fernon // Clinical trials of Esberiven. Bordeaux Med. 1974. - Vol 11. - P. 2755-2756.
 114. Madaus, G. Lehrbuch der biologischen Heilmittel / G. Madaus, G. Olms Verlag. - Hildesheim, 1979. - Vol. 2. - 2nd ed. – P. 1862-1865.
 115. Mazzocchi, B. Treatment with extract of *Melilotus officinalis* mastodynia ciclica not cyclical in women attending a clinic Breast / B. Mazzocchi, A. Andrei, V.F. Bonifazi, R. Algeri // Gazz Med Ital. 1997. - Vol. 156. - P. 221-224.
 116. Mot, J.C. New Contribution to Therapeutic Proctology / J.C. Mot // The Esberiven.Med.Chir. Dig. 1976. - Vol 5. - P. 375-377.
 117. Muir, Alister D. Quantitative Reversed-Phase HPLC Analysis of Dicumarol in Sweetclover Hay and Silage Samples / Alister D. Muir, Bernard P. Goplen // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1992. - No.40. – P. 820- 823.
 118. Schierle, J. Determination of added lutein and zeaxanthin in foods / J. Schierle, J. D. Klipfel, B. Pietsch // DSM Nutritional Products, Basel. Switzerland. 2004. - 4 p.
 119. Stefanini, L. Drug treatment and / or insufficient balneotherapy chronic venous insufficiency / L. Stefanini, P. Gigli, A. Galassi, F. Pierallini, A. Tillieci, A. Scalabrino // Gazz. Med Ital. 1996. - Vol. 155. - P. 179-185.
 120. Sutiashvili, M.G. Flavonoids of *Melilotus officinalis*/ M.G. Sutiashvili, M.D. Alaniya // Chemistry of natural compounds. 1999. - Vol. 35. - P. 584-584.
 121. Tannins in Herbal Drugs/ British Pharmacopoeia, 2009. - 6th edition. – V. IV. - Appendix XI M. - A286.

122. Hawthorn Leaf and Flower / British Pharmacopoeia, 2009. - 6th edition.
- V. III. - Mon. 1432. - P.3446-3447.
123. Melilot / British Pharmacopoeia, 2009. - 6th edition. – V. III. - Mon.
2120.- P.3489 - 3490.
124. Ispaghula Hask / British Pharmacopoeia, 2009. - 6th edition. – V. III. -
Mon. 1334. - P.3457 - 3458.
125. Vanscheidt, W. The efficacy and safety of a coumarin-troxerutin-
combination (SB-LOT) in patients with chronic venous insufficiency /
W. Vanscheidt, E. Rabe, B. Naser- Hijazi, A.A. Ramelet, H. Partsch // A
double blind placebo-controlled randomised study. 2002. - Vol. 31. - P.
185-190.
126. Vettorello, G. Minerva Cardioangiol / G. Vettorello, G. Cerreta, A.
Derwish, A. Cataldi, A. Schettino, S. Occhionorelli. - 1996.- Vol. 44.-
447 p.
127. Xiu-Xia Li. Iron(II) – induced isomerization of (*all-E*)- xanthophylls
pigments lutein, zeaxanthin, and β - cryptoxanthin in acetone / Xiu-Xia
Li, Lu-Jia Han // Eur. Food Res. Technol. 2008. - P. 1307-1313.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Результаты изучения качества донника лекарственного травы цельной при хранении
Начало опыта 07.2010 г. Окончание опыта 01.2013 г. Температура 10-25 °С, относительная влажность 40-70 %. Вид упаковки: тюки по 10 кг нетто.

№ партии сырья	Срок хранения (месяц)	Товароведческий анализ			Фитохимический анализ	
		Почерневшие и побуревшие листья, выцветшие цветки (%)	Потеря в массе при высушивании (%)	Зола общая (%)	Содержание кумарина (%)	Содержание дикумарина (%)
6	0	1,3	7,23	4,62	1,48	< 1 мг%
	6	1,5	6,62	4,44	1,47	-
	12	1,9	6,25	4,81	1,40	-
	18	2,0	6,44	3,96	1,42	-
	24	2,2	6,93	4,28	1,38	-
	30	2,5	6,37	4,42	1,36	-
7	0	1,0	6,85	3,83	1,54	-
	6	1,2	6,27	3,62	1,52	-
	12	1,4	6,63	3,71	1,51	-
	18	1,1	6,86	3,43	1,47	-
	24	1,5	6,43	3,52	1,40	-
	30	1,3	6,62	3,76	1,38	-
8	0	0,7	6,43	3,23	1,15	-
	6	0,9	6,14	3,09	1,17	-
	12	1,5	5,93	3,34	1,10	-
	18	1,0	6,32	3,07	1,13	-
	24	1,5	6,46	3,25	1,07	-
	30	1,3	6,05	3,17	0,98	-
9	0	1,5	6,89	3,36	1,03	-
	6	1,7	7,23	3,28	0,95	-
	12	1,0	7,43	3,47	1,07	-
	18	1,5	6,76	3,36	1,05	-
	24	1,2	7,05	2,89	0,97	-
	30	1,4	7,28	3,14	0,94	-
10	0	1,0	5,96	4,38	1,31	-
	6	1,4	5,76	4,32	1,23	-
	12	1,3	6,05	4,29	1,27	-
	18	0,9	5,87	4,20	1,20	-
	24	1,3	5,92	4,51	1,23	-
	30	1,0	5,74	4,62	1,24	-

Приложение 2

Результаты изучения качества донника лекарственного травы измельченной при хранении. Начало опыта 07.2010 г. Окончание опыта 01.2013 г. Температура 10-25 °С, относительная влажность 40-70 %. Вид упаковки: многослойные бумажные мешки

№ партии сырья	Срок хранения (месяц)	Товароведческий анализ			Фитохимический анализ	
		Почерневшие и побуревшие листья, выцветшие цветки (%)	Потеря в массе при высушивании (%)	Зола общая (%)	Содержание кумарина (%)	Содержание дикумарина (%)
1	0	0,8	5,22	3,72	1,34	< 1 мг%
	6	0,7	5,54	3,53	1,37	-
	12	1,0	5,38	3,37	1,32	-
	18	1,0	4,08	3,50	1,32	-
	24	1,2	5,41	3,62	1,28	-
	30	1,5	5,05	3,44	1,26	-
2	0	1,1	6,42	3,21	1,44	-
	6	1,0	5,83	3,05	1,42	-
	12	1,4	6,21	3,28	1,41	-
	18	1,3	6,64	3,42	1,37	-
	24	1,5	6,59	3,09	1,30	-
	30	1,7	6,81	2,91	1,28	-
3	0	1,3	5,34	3,56	1,49	-
	6	1,5	5,17	3,61	1,49	-
	12	1,5	5,36	3,38	1,46	-
	18	1,7	4,87	3,34	1,41	-
	24	1,9	5,22	3,42	1,40	-
	30	1,9	5,45	3,55	1,37	-
4	0	0,5	6,33	4,37	1,03	-
	6	0,7	6,24	4,23	0,95	-
	12	1,0	6,42	4,50	1,07	-
	18	0,9	6,15	4,16	1,05	-
	24	1,0	5,86	3,97	0,97	-
	30	1,4	5,54	4,08	0,94	-
5	0	0,8	5,62	3,29	1,31	-
	6	1,1	5,70	3,36	1,23	-
	12	1,3	6,00	3,26	1,27	-
	18	0,9	5,84	3,18	1,20	-
	24	1,0	5,80	3,42	1,23	-
	30	1,0	5,71	3,37	1,24	-

Приложение 3

Результаты изучения качества

донника лекарственного травы экстракта сухого при хранении

Начало опыта 02.2011 г. Окончание опыта 02.2014 г. Условия хранения: при температуре 10-25°C, относительная влажность 40-70 %.

Вид упаковки: по 10 кг в двойные пакеты, изготовленные из комбинированных материалов. Пакет вложен в мешок бумажный.

№ партии сырья	Срок хранения (месяц)	Товароведческий анализ		Фитохимический анализ
		Изменение внешнего вида	Потеря в массе при высушивании (%)	Содержание кумарина (%)
1	0	-	3,13	1,48
	6	-	2,95	1,47
	12	-	3,72	1,40
	18	комкование	4,15	1,42
	24	комкование	4,38	1,38
2	0	-	2,52	1,54
	6	-	2,75	1,52
	12	-	2,93	1,51
	18	-	2,96	1,47
	24	-	3,42	1,40
3	0	-	2,35	1,15
	6	-	2,63	1,17
	12	-	3,32	1,10
	18	-	3,56	1,13
	24	комкование	4,02	1,07

проект

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

ЗАО «ЭВАЛАР»

Донника трава

Melilotus officinalis

цельная и измельченная «ангро»

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на собранную в фазу цветения и высушенную цельную и измельченную траву дикорастущего и культивируемого двулетнего травянистого растения донника лекарственного – *Melilotus officinalis* L., сем. бобовых – *Fabaceae*, используемую для производства лекарственной субстанции.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ЗАО «ЭВАЛАР»

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ЗАО «ЭВАЛАР»

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ЗАО «ЭВАЛАР»

ЗАЯВИТЕЛЬ (в ФГУ «НЦ ЭСМП»)

ЗАО «ЭВАЛАР»

Спецификация
Донника трава цельная и измельченная «ангро»
ЗАО «Эвалар»

Показатели	Методы	Нормы
Внешние признаки	Визуальный	Должны соответствовать описанию в ФСП
Микроскопия	Визуальный	Должна соответствовать описанию в ФСП
Подлинность	ТСХ ВЭЖХ	На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при 365 нм должны обнаруживаться три зоны оранжевого цвета с Rs по рутину около 0,1; 0,5; 0,8 и три зоны желтого цвета с Rs по рутину около 0,3; 0,6; 1,0 (флавоноиды). Допускается обнаружение других зон. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной в условиях количественного определения, должен регистрироваться пик, соответствующий по времени удерживания основному пику на хроматограмме раствора СО кумарина.
Числовые показатели		
<i>Цельное сырье</i>		
Содержание кумарина	ВЭЖХ	Не менее 0,9 %
Экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 50%	ГФ XI	Не менее 34,0 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI	Не более 8,0 %
Зола общая	ГФ XII	Не более 5,0 %
Зола, нерастворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты	ГФ XI	Не более 1,5 %
Почерневшие и побуревшие листья, выцветшие цветки	ГФ XI	Не более 3,0 %
Органические примеси (частицы других неядовитых растений)	ГФ XI	Не более 2,0 %
Минеральные примеси	ГФ XI	Не более 1,0 %
<i>Измельченное сырье</i>		

Показатели	Методы	Нормы
Содержание кумарина	ВЭЖХ	Не менее 0,9 %
Экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 50 %	ГФ XI	Не менее 34,0 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI	Не более 8,0 %
Зола общая	ГФ XII	Не более 5,0 %
Зола, нерастворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты	ГФ XI	Не более 1,5 %
Почерневшие и побуревшие листья, выцветшие цветки	ГФ XI	Не более 3,0 %
Органические примеси (частицы других неядовитых растений)	ГФ XI	Не более 2,0 %
Минеральные примеси	ГФ XI	Не более 1,0 %
Частицы, не проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7мм	ГФ XI	Не более 10 %
Частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	ГФ XI	Не более 10 %
Микробиологическая чистота	ОФС 42-0016-04	Препарат должен выдерживать требования
Масса содержимого упаковки	ОСТ 64-492-85 ОФС 42-0013-03	Препарат должен выдерживать требования
Упаковка	Цельное сырье упаковывают в тюки, измельченное сырье – в мешки бумажные многослойные.	
Маркировка	В соответствии с ФСП	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре 10 - 25 °С	
Срок годности	2,5 года	

Внешние признаки. Испытание проводят в соответствии со статьей «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ XI, вып.1, с. 256). Сырье исследуют невооруженным глазом.

Цельное сырье представляет собой цельные или частично измельченные облиственные цветущие верхушки, веточки растений с ребристым стеблем диаметром до 3 мм и длиной до 30 см. Листья очередные, мелкие, тройчатосложные. Прилистники ланцетные или шиловидные, почти всегда цельнокрайние. Нижние листочки обратнойцевидные, верхние – продолговатые или ланцетные, по краю с 10 – 13 неровными зубчиками.

Цветки мотыльковые мелкие длиной от 5 до 7 мм. Чашечка колокольчатая, пятизубчатая, голая. Иногда встречаются в незначительном количестве мелкие незрелые плоды – бобы длиной от 3 до 5 мм, поперечно-морщинистые, голые или покрытые редкими волосками. Семя одно, реже два.

Цвет стеблей зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – сероватый или желто-белый, листьев и плодов – зеленый, желтовато-зеленый, цветков и бутонов зеленовато-желтый.

Измельченное сырье. Кусочки листочков, стеблей и соцветий различной формы, отдельно цветки, бутоны, плоды и их части, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет стеблей снаружи зеленый, желтовато-зеленый, на изломе – серовато или желто-белый, и плодов - зеленый, желтовато-зеленый, зеленовато-желтый с коричневыми вкраплениями, цветков и бутонов зеленовато-желтый.

Микроскопия. Проводится в соответствии со статьями «Методы анализа лекарственного растительного сырья» и «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья (ГФ XI, вып.1, с. 256; с. 277, способ I).

Цельное сырье. Стебель имеет вторичное непучковое строение. В центре стебля - сердцевина, состоящая из крупных паренхимных клеток с тонкими стенками. Покровной тканью является однослойная эпидерма, под которой,

особенно в ребрах, расположена уголковая колленхима, ниже тонким слоем (1 – 2 клетки) залегает хлоренхима. Под хлоренхимой небольшими прерывистыми участками располагаются механические волокна. Флоэма располагается неравномерным кольцом, линия камбия выражена нечётко. Ксилема образует участки, между которыми находятся широкие сердцевинные лучи.

При рассмотрении листа с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса в очертании многоугольные или слегка волнистые; клетки нижнего эпидермиса с извилистым контуром. Над жилками клетки эпидермиса сильно вытянуты с прямыми боковыми стенками.

На обеих сторонах листочка расположены овальные устьица аномоцитного типа, окруженные 2-5 околоустьичными клетками, на нижнем эпидермисе их значительно больше.

На нижней стороне листочка встречаются волоски двух типов: простые многоклеточные, имеют 1-2 мелкие клетки, лежащие у основания волоска, и одну длинную конечную клетку с едва заметной полостью, очень толстой оболочкой, с неровной, зазубренной поверхностью.

Имеются тонкостенные головчатые волоски, состоящие из 1-2 клеточной ножки и 1-4 клеточной овальной головки. На месте отрыва волоска остаётся маленький валик. Клетки эпидермиса образуют розетку. На верхнем эпидермисе волоски встречаются редко.

По крупным жилкам и отдельными островками на мелких жилках встречаются включения кальция оксалата в виде призматических кристаллов.

При рассмотрении лепестков с поверхности видны клетки эпидермиса с сосочковидными выростами. Клетки эпидермиса чашелистиков и цветоножек продольно вытянутые и имеют прямые или слабоизвилистые стенки, иногда со складчатой кутикулой. Устьица аномоцитного типа, расположенные на чашелистиках с наружной стороны. На поверхности чашелистиков и

цветоножек имеются многочисленные простые одноклеточные волоски и головчатые волоски.

Измельченное сырье. При исследовании микропрепаратов видны клетки эпидермиса листочка со слабоизвилистыми и извилистыми стенками. Устьица овальные, окружены 2-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). У фрагментов эпидермиса лепестков наблюдаются сосочковидные выросты. На некоторых фрагментах листа и чашелистиков встречаются волоски, характерные для данного сырья: простые многоклеточные, тонкостенные и толстостенные с заостренным концом и бородавчатой кутикулой. Вокруг места прикрепления волоска клетки эпидермиса образуют розетку, и простые двурядные волоски с однорядной верхушкой; головчатые волоски с овальной многоклеточной головкой на короткой 1-2-клеточной ножке и их обрывки. В мезофилле фрагментов встречаются жилки с кристаллоносной обкладкой. Проводящие пучки представлены спиральными сосудами.

Подлинность

Тонкослойная хроматография

Испытуемый раствор. Около 0,5 г порошка травы помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл метанола и обрабатывают на ультразвуковой бане при температуре 60 °С в течение 15 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «белая лента».

Стандартный раствор. 0,005 г СО рутина (Sigma, каталожный № R5143 или аналогичного качества) растворяют в 5,0 мл метанола. Срок годности раствора 6 мес при хранении в защищенном от света месте.

Раствор дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира. 0,5 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл спирта 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в защищенном от света месте.

Раствор макрогола 400. 2,5 г макрогола 400 помещают в мерную колбу

вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл спирта 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ с алюминиевой подложкой (Merck), размером 10 x 10 см, на расстоянии 2,5 см от нижнего края пластинки, в виде полос длиной 10 мм наносят 10 мкл испытуемого раствора и 10 мкл стандартного раствора.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе до удаления следов растворителей, затем помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота – вода (5:3:1:1), предварительно насыщенную в течение 1 ч, и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы пройдет 7 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей, нагревают при температуре 110 °С в течение 5 мин и горячую опрыскивают раствором дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира. Пластинку сушат на воздухе в течение 5 мин, затем опрыскивают раствором макрогола 400 и снова сушат на воздухе в течение 30 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при 365 нм должны обнаруживаться три зоны оранжевого цвета с R_s по рутину около 0,1; 0,5; 0,8 и три зоны желтого цвета с R_s по рутину около 0,3; 0,6; 1,0 (флавоноиды). Допускается обнаружение других зон.

ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной в условиях количественного определения, должен регистрироваться пик, соответствующий по времени удерживания основному пику на хроматограмме раствора СО кумарина.

Числовые показатели

Цельное сырье. Содержание кумарина не менее 0,9 %; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 50 %, не менее 34 %; потеря в массе при

высушивании не более 8,0 %; золы общей не более 5,0 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты не более 1,5 %; почерневших и побуревших листьев, выцветших цветков не более 3,0 %; органической примеси не более 2,0 %; минеральной примеси не более 1,0 %.

Измельченное сырье. Содержание кумарина не менее 0,9 %; экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 50 %, не менее 34 %; потеря в массе при высушивании не более 8,0 %; золы общей не более 5,0 %, золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 1,5 %; почерневших и побуревших листьев, выцветших цветков не более 3 %; органической примеси не более 2,0 %; минеральной примеси не более 1,0 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более 10 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10 %.

Количественное определение кумарина. Испытание проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) растительного сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 50% и экстрагируют на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин при температуре кипения смеси. Извлечение декантируют в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Экстракцию повторяют еще два раза, в тех же условиях. Объединенные извлечения охлаждают, доводят спиртом 50% до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента».

10,0 мл фильтрата помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и выдерживают на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения смеси в течение 1 ч.

Гидролизат охлаждают, количественно переносят спиртом 96% в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента».

Раствор СО кумарина. Около 0,01 г кумарина (EP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл спирта 96%, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Колонка	- 300 × 3,9 мм, сорбент C ₁₈ , 5 мкм (Wakosil C18 RS или аналогичная, удовлетворяющая требованиям пригодности хроматографической системы);
Подвижная фаза	- элюент А - раствор ортофосфорной кислоты 0,1%, элюент В – ацетонитрил;
Градиентный режим	- 20 мин - от 5% до 30 % элюента В; 10 мин - 30 % элюента В;
Скорость потока	- 1 мл/мин;
Температура	- 30 °С;
Детектор	- спектрофотометрический, 275 нм;
Объем вводимой пробы	- 20 мкл.

Хроматографируют раствор СО кумарина, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если

выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора СО кумарина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика не менее 0,8 и не более 1,5;
- эффективность хроматографической колонки не менее 5000 тт;
- относительное стандартное отклонение площади пика не более 3 %.

Попеременно хроматографируют испытуемый раствор и раствор СО кумарина. На хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют пик кумарина.

Содержание кумарина в растительном сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 20 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

S – площадь пика кумарина на хроматограмме испытуемого раствора ;

S₀ - площадь пика кумарина на хроматограмме раствора СО кумарина;

a - навеска растительного сырья, в граммах;

a₀ - навеска СО кумарина, в граммах;

W- потеря в массе при высушивании сырья, в процентах;

P - содержание основного вещества в СО кумарина, в процентах.

Содержание кумарина в растительном сырье должно быть не менее 0,9%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС 42-0016-04 «Методы микробиологического контроля лекарственных растительных средств, состоящих из одного вида сырья или нескольких (сборы) – фасованная продукция, а также растительного сырья «ангро».

Масса содержимого упаковки. Препарат должен выдерживать требования ОСТ 64-492-85 «Средства лекарственные. Допустимые отклонения

на промышленное фасование» и ОФС 42-0013-03 «Правила приемки растительного сырья и методы отбора проб».

Упаковка. В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 381.

Цельное сырье упаковывают в тюки или мешки продуктовые по ГОСТ 30090-93; измельченное сырье - в мешки продуктовые по ГОСТ 30090-93 или мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88.

Масса сырья, упакованного в тюк, должна быть не более 50 кг, в мешок - не более 40 кг.

Транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. На этикетке указывают: название растительного сырья на русском и латинском языках, цельное или измельченное, наименование предприятия-изготовителя, его адрес, телефон и товарный знак, массу сырья при влажности 14 %, условия хранения, «Продукция прошла радиационный контроль», регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код.

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с требованиями ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 381.

Условия хранения. В сухом, защищенном от света месте при температуре 10 - 25 °С.

Срок годности. 2,5 года.

Примечание. Методики определения числовых показателей, указанные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в Государственной фармакопее XI, вып. I и XII, часть I. Реактивы, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующем разделе Государственной Фармакопеи XII, часть I.

Директор департамента ЛС ЗАО «Эвалар»



Важенин В.А.

**Иллюстрированное приложение к проекту ФСП
«Донника лекарственного трава»**

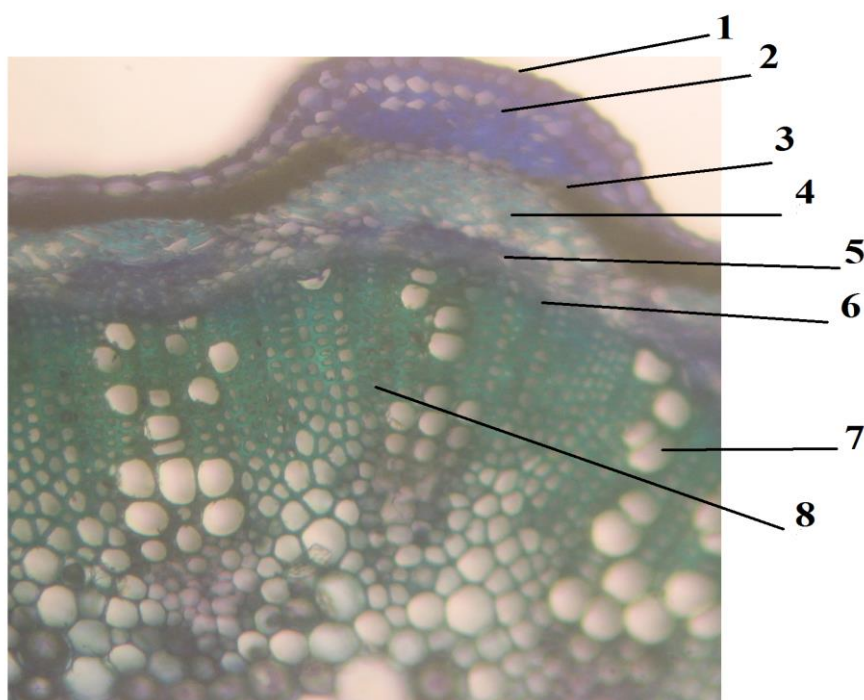


Рис. 1. Фрагмент поперечного среза стебля донника лекарственного травы (х 400): 1 – эпидерма, 2 – уголковая колленхима, 3 – хлоренхима, 4 – механические волокна, 5 – флоэма, 6 – камбий, 7 – сосуды ксилемы, 8 – сердцевинные лучи

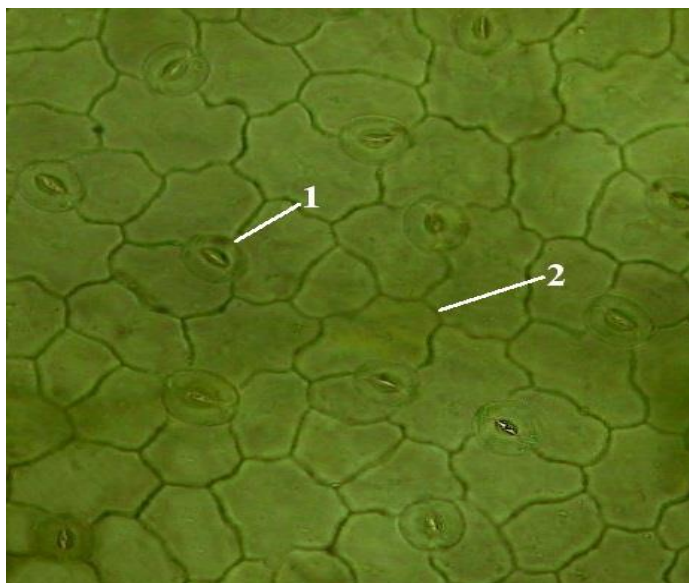


Рис. 2. Фрагмент верхнего эпидермиса листочка донника травы (х 400): 1 – устьица аномоцитного типа, 2 – извилистость клеточных оболочек

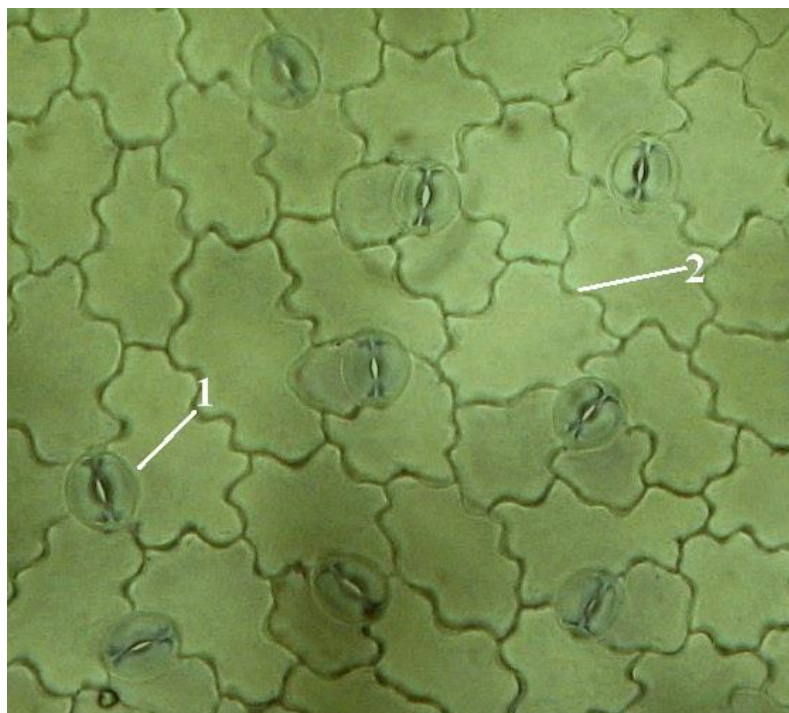


Рис. 3. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника травы (х 400):
1 - устьица аномоцитного типа, 2 - извилистость клеточных оболочек



Рис. 4. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника травы (х 400):
простой волосок

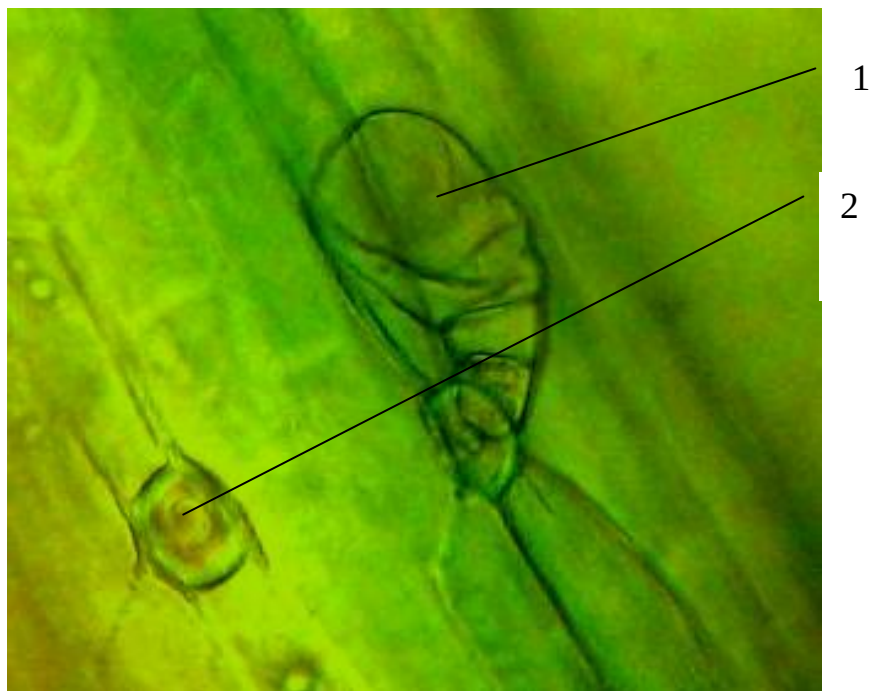


Рис. 5. Фрагмент нижнего эпидермиса листочка донника травы (х 400):
1 – головчатый волосок, 2 – валик на месте отрыва волоска



Рис. 6. Фрагменты нижнего эпидермиса листочка донника травы (х 400):
призматические кристаллы кальция оксалата



Рис. 7. Фрагмент эпидермиса чашелистиков (х 400):
клетки эпидермиса

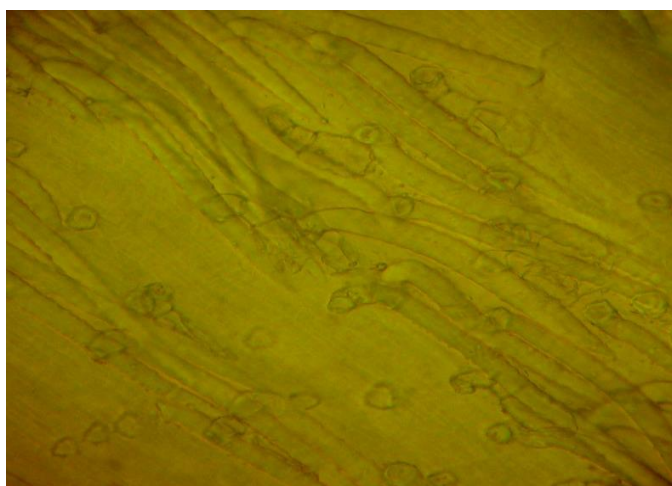


Рис. 8. Простые одноклеточные волоски на поверхности чашелистиков (х 400)



Рис. 9. Головчатые волоски на поверхности чашелистиков (х 400)

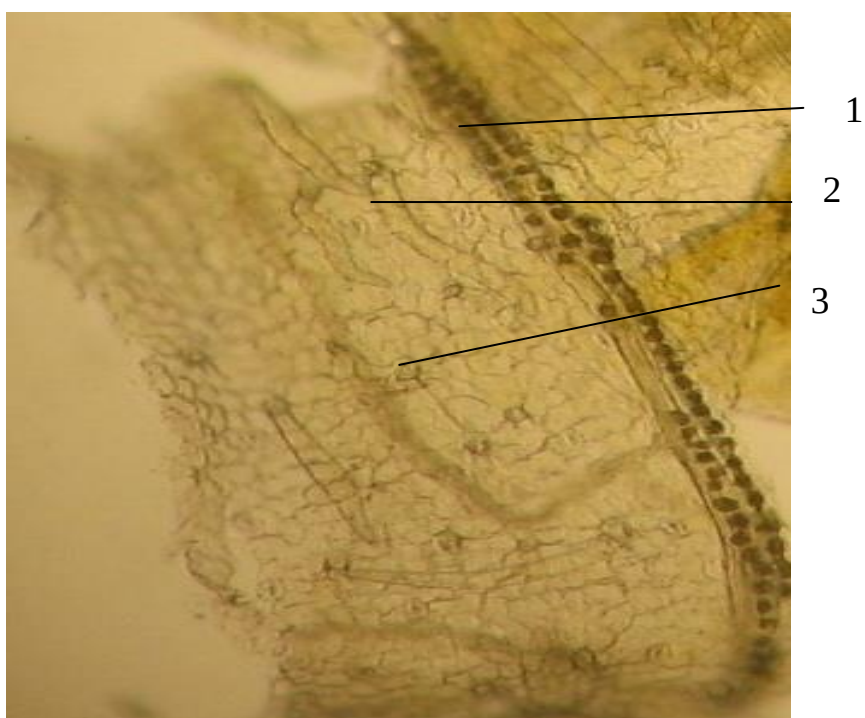


Рис. 10. Порошок: фрагмент листочка верхнего эпидермиса (х 20):
1- призматические кристаллы кальция оксалата, 2 – простые многоклеточные
волоски, 3 – устьица аномоцитного типа

проект

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « ____ » _____ 20 ____ г.

ЗАО «Эвалар», Россия,

659332, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, 23/6

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ (номер)

Донника экстракт сухой

торговое наименование лекарственного препарата

-

международное непатентованное или химическое наименование

субстанция-порошок

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ЗАО «Эвалар», Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ЗАО «Эвалар», Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ЗАО «Эвалар», Россия

СПЕЦИФИКАЦИЯ
Донника экстракт сухой,
субстанция-порошок
ЗАО «Эвалар», Россия

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Порошок светло-коричневого цвета, со специфическим запахом, комкуется при хранении.
Подлинность	Качественная реакция с диазореактивом ТСХ ВЭЖХ	Должно наблюдаться появление красно-коричневого окрашивания. На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при 365 нм должны обнаруживаться три зоны оранжевого цвета с R_s по рутину около 0,1; 0,5; 0,8 и три зоны желтого цвета с R_s по рутину около 0,3; 0,6; 1,0 (флавоноиды). Допускается обнаружение других зон. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной в условиях количественного определения, должен регистрироваться пик, соответствующий по времени удерживания основному пику на хроматограмме раствора СО кумарина.
Тяжелые металлы	ГФ XII	Не более 0,01 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI	Не более 5,0 %
Остаточные органические растворители	ГХ	Этанола – не более 0,5 %
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 3.2
Количественное определение кумарина в пересчете сухое вещество	ВЭЖХ	Не менее 3,0 %
Упаковка	По 10 или 20 кг в двойные пакеты, изготовленные из пленки полиэтиленовой или в пакеты из полимерных или комбинированных материалов. Пакет вкладывают в мешок бумажный.	
Маркировка	В соответствии с ФСП	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре 10- 25 °С	
Срок годности	2 года	

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на донника экстракт сухой, получаемый из высушенной травы донника лекарственного – *Melilotus officinalis* L., применяемый для производства нестерильных лекарственных средств.

Соотношение используемого сырья к полученному экстракту 5÷8 : 1, экстрагент спирт этиловый 50 %.

Описание. Порошок светло-коричневого цвета с характерным запахом кумарина, комкуется при хранении.

Подлинность

Качественная реакция. Около 0,05 г растворяют в 10 мл спирта 50 %.

К 3 мл полученного раствора прибавляют 10 капель 10 % раствора натрия гидроксида, нагревают на водяной бане в течение 5 мин, затем прибавляют 5 капель диазореактива. Должно наблюдаться появление красно-коричневого окрашивания.

Тонкослойная хроматография

Испытуемый раствор. Около 0,1 г экстракта помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл метанола и обрабатывают на ультразвуковой бане при температуре 60 °С в течение 5 мин. Извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр «белая лента».

Стандартный раствор. 0,005 г СО рутина (Sigma, каталожный № R5143 или аналогичного качества) растворяют в 5,0 мл метанола. Срок годности раствора 6 мес при хранении в защищенном от света месте.

Раствор дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира. 0,5 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл спирта 96 %, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в защищенном от света месте.

Раствор макрогола 400. 2,5 г макрогола 400 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл спирта 96 %, доводят объем раствора

спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 мес при хранении в защищенном от света месте.

На линию старта хроматографической пластинки HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ с алюминиевой подложкой (Merck), размером 10 x 10 см, на расстоянии 2,5 см от нижнего края пластинки, в виде полос длиной 10 мм наносят 10 мкл испытуемого раствора и 10 мкл стандартного раствора.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе до удаления следов растворителей, затем помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота – вода (5:3:1:1), предварительно насыщенную в течение 1 ч, и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт подвижной фазы пройдет 7 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей, нагревают при температуре 110 °С в течение 5 мин и горячую опрыскивают раствором дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира. Пластинку сушат на воздухе в течение 5 мин, затем опрыскивают раствором макрогола 400 и снова сушат на воздухе в течение 30 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете при 365 нм должны обнаруживаться три зоны оранжевого цвета с R_s по рутину около 0,1; 0,5; 0,8 и три зоны желтого цвета с R_s по рутину около 0,3; 0,6; 1,0 (флавоноиды). Допускается обнаружение других зон.

ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной в условиях количественного определения, должен регистрироваться пик, соответствующий по времени удерживания основному пику на хроматограмме раствора СО кумарина.

Тяжелые металлы. Не более 0,01 % (ГФ XII, ч. 1, с. 121, метод 1).

1,0 г экстракта помещают в тигель, прибавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, осторожно сжигают и прокаливают. Полученный остаток обрабатывают при нагревании 5 мл насыщенного раствора аммония ацетата,

фильтруют через беззольный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, промывают 5 мл воды, доводят объем фильтрата водой до метки и перемешивают (раствор испытуемого образца).

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 % (ГФ XI, вып. 2, с. 160).

Остаточные органические растворители. Содержание этанола должно быть не более 0,5 %. Определение проводят методом ГХ, на хроматографе, оснащенный устройством для парофазного дозирования.

Раствор внутреннего стандарта. 1,0 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 0,2 г (точная навеска) экстракта помещают в вialу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл воды, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой под кримп.

Исходный стандартный раствор. 1,0 мл этанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Рабочий стандартный раствор. 1,0 мл исходного стандартного раствора помещают в вialу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой под кримп.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Колонка	- капиллярная, полиэтиленгликоль (WAX), 60 м × 0,53 мм × 1 мкм (BP 20 (SGE) или аналогичная, удовлетворяющая требо- ваниям пригодности хроматографической системы);
Газ-носитель	- азот, 8 мл/мин, деление потока 1:10;
Температура термостата колонок	- 50 °С в течение 8 мин; от 50 °С до 200 °С со скоростью 5 °С/мин; 200 °С в течение 15 мин;
Температура инжектора	- 160 °С;
Температура детектора	- 270 °С;
Объем пробы	- 250 мкл;
Способ ввода пробы	- автоматически, шприцом с газоуплот- нительным штоком;
Детектор	- пламенно-ионизационный;
Скорость подачи водорода	- 30 мл/мин;
Скорость подачи воздуха	- 300 мл/мин;
Скорость подачи вспомогательного газа	- 25 мл/мин;
Условия термостатирования образца:	
Температура печи	- 75 °С;
Температура шприца	- 75 °С;
Время термостатирования	- 30 мин.

Порядок выхода пиков: 1 – этанол; 3 – ацетонитрил.

Хроматографируют рабочих стандартный раствор, получая не менее 3 хроматограмм.

Результаты испытания считаются достоверными, если выполняются условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы рабочего стандартного раствора выполняются следующие условия:

- разрешение R между пиками этанола и внутреннего стандарта (ацетонитрила) не менее 2;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола, не менее 5000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение отношения площади пика этанола к площади пика внутреннего стандарта, рассчитанное для 3 последовательных хроматограмм, не более 5 %.

Попеременно хроматографируют испытуемый и рабочий стандартный раствор. На хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют пик этанола.

Содержание этанола в экстракте в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{B \cdot 0,789 \cdot 100 \cdot P}{B_0 \cdot a \cdot 1000 \cdot 100} = \frac{B \cdot 0,789 \cdot P}{B_0 \cdot a \cdot 1000}, \text{ где}$$

B – отношение площади пика этанола к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

B_0 – отношение площади пика этанола к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме рабочего стандартного раствора;

a – навеска испытуемого экстракта, в граммах;

0,789 – содержание этанола в 1 мл исходного стандартного раствора, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в этаноле, взятом для приготовления исходного стандартного раствора, в процентах.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 1, с. 160 (категория 3.2).

Количественное определение кумарина в пересчете на сухое вещество. Испытание проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ.

Испытуемый раствор. Около 0,3 г (точная навеска) экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл спирта 50% и проводят экстракцию на ультразвуковой бане в течение 15 мин. После охлаждения объем раствора в колбе доводят спиртом 50 % до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «белая лента».

10,0 мл фильтрата помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и выдерживают на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения смеси в течение 1 ч.

Гидролизат охлаждают, количественно переносят спиртом 96% в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента».

Раствор СО кумарина. Около 0,01 г кумарина (EP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл спирта 96%, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Колонка	- 300 × 3,9 мм, сорбент C ₁₈ , 5 мкм (Wakosil C18 RS или аналогичная, удовлетворяющая требованиям пригодности хроматографической системы);
---------	---

Подвижная фаза	- элюент А - раствор ортофосфорной кислоты 0,1%, элюент В – ацетонитрил;
Градиентный режим	- 20 мин - от 5% до 30 % элюента В; 10 мин - 30 % элюента В;
Скорость потока	- 1 мл/мин;
Температура	- 30 °С;
Детектор	- спектрофотометрический, 275 нм;
Объем вводимой пробы	- 20 мкл.

Хроматографируют раствор СО кумарина, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора СО кумарина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика не менее 0,8 и не более 1,5;
- эффективность хроматографической колонки не менее 5000 тт;
- относительное стандартное отклонение площади пика не более 3 %.

Попеременно хроматографируют испытуемый раствор и раствор СО кумарина. На хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют пик кумарина.

Содержание кумарина в пересчете на сухое вещество в экстракте в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 20 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

S – площадь пика кумарина на хроматограмме испытуемого раствора ;

S_0 - площадь пика кумарина на хроматограмме раствора СО кумарина;

a - навеска экстракта, в граммах;

a_0 - навеска СО кумарина, в граммах;

W - потеря в массе при высушивании экстракта, в процентах;

P - содержание основного вещества в СО кумарина, в процентах.

Содержание кумарина в пересчете на сухое вещество в экстракте должно быть не менее 3,0%.

Упаковка. По 10 или 20 кг в двойные пакеты, изготовленные из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354-82 или в пакеты из полимерных или комбинированных материалов по ГОСТ 12302-83 или ГОСТ Р 52903-2007. Пакет запаивают сварным швом или завязывают вручную. Пакет вкладывают в мешок бумажный по ГОСТ Р 53361-2009. Мешок прошивают машинным способом или завязывают вручную.

Маркировка. На этикетке указывают наименование субстанции, наименование производителя субстанции, его адрес и товарный знак, номер серии, дату изготовления, количество в упаковке и единицы измерения количества, срок годности, условия хранения, назначение.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90.

Хранение. При температуре 10 - 25 °С.

Срок годности. 2 года.

Примечание. Реактивы, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующем разделе Государственной фармакопеи XII издания, стр. 1.

Директор департамента ЛС ЗАО «Эвалар»



Важенин В.А.



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

(ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России)
пр. Ленина, 40, г. Барнаул, 656038
Тел. (3852) 368848, факс (3852) 366091
E-mail: rector@agmu.ru; http://www.agmu.ru
ОКПО 01962853, ОГРН 1022201762164;
ИНН 2225003156, КПП 2225010
« » 2014 №
На №

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО «АГМУ»

Минздрава России

д-р мед. наук, профессор

В.М. Брюханов

2014 г.



АКТ

о внедрении в учебный процесс кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ
ВПО АГМУ Минздрава России
результатов исследования аспиранта кафедры фармацевтической химии с
курсом органической и токсикологической химии
Харлампович Т.А.

В учебном процессе кафедры фармакогнозии и ботаники АГМУ при изучении тем: «Анатомия растений», «Морфология растений», «Микроскопический анализ», «Фитохимическое изучение БАС химическими и физико-химическими методами» используются методики, разработанные Т.А. Харлампович.

В учебном процессе используются данные морфологического и микроскопического анализа донника лекарственного травы, собранной в Алтайском крае, сведения о результатах научно-исследовательской работы в области анализа БАС донника лекарственного травы, что позволяет студентам освоить материал учебной программы и углубить знания по данным темам.

Зав. кафедрой фармакогнозии
и ботаники,
д.м.н., доцент

И.В. Смирнов





МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

(ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России)

пр. Ленина, 40, г. Барнаул, 656038

Тел. (3852) 368848, факс (3852) 366091

E-mail: rector@agmu.ru; http://www.agmu.ru

ОКПО 01962853, ОГРН 1022201762164;

ИНН 2225003156, КПП 2225010

« » 2014 №

На №

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО «АГМУ»

Минздрава России

д-р мед. наук, профессор

В.М. Брюханов

2014 г.

АКТ

о внедрении в учебный процесс кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России результатов исследования аспиранта кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии Харлампович Т.А.

В учебном процессе кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии АГМУ при изучении тем: «Использование физико-химических методов исследования для идентификации органических соединений» используются методики, разработанные Т.А. Харлампович.

В учебном процессе используются результаты проведения химических и физико-химических методов (ТСХ, ВЭЖХ, СФМ) в качественном анализе органических соединений, что позволяет студентам освоить материал учебной программы и углубить знания по данным темам.

Зав. кафедрой фармацевтической химии
с курсом органической и
токсикологической химии
д.фарм.н., профессор

Л.М. Федосеева





МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

(ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России)

пр. Ленина, 40, г.Барнаул, 656038

Тел.(3852)368848, факс (3852) 366091

E-mail: rector@agmu.ru; <http://www.agmu.ru>

№ _____
«__» _____ 2014 г.

Справка

Дана аспиранту кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России Т.А. Харлампович (научный руководитель – доктор фарм. наук, профессор Л.М. Федосеева) в том, что ею были проведены экспериментальные фармакологические исследования по изучению токсичности донника лекарственного травы настоя и экстракта сухого. Исследования проводились на кафедре фармакологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (под руководством д.м.н., профессора Я.Ф. Зверева).

Ректор ГБОУ ВПО АГМУ
Минздрава России,
д-р мед. наук, профессор



В.М. Брюханов



Отчет
об экспериментальном исследовании по изучению токсичности
донника лекарственного травы и экстракта сухого

Изучение острой токсичности настоя и сухого экстракта донника лекарственного травы проводили на белых мышах массой до 20 г при однократном пероральном введении в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг. Из табл. 1 видно, что пероральное введение настоя и экстракта в указанных дозах не вызывало гибели ни одного из экспериментальных животных. В их состоянии не отмечено каких-либо отклонений по сравнению с контрольной группой через 4 ч, 24 ч, 48 ч.

Таблица 1

Результаты изучения острой токсичности донника лекарственного
 травы настоя и экстракта

Препарат	Доза	Количество животных в опыте		
		Всего	Погибшие (%)	Выжившие (%)
Настой	5000 мг/кг	10	0	100
	10000 мг/кг	10	0	100
Сухой экстракт	5000 мг/кг	10	0	100
	10000 мг/кг	10	0	100

Как показали исследования, введение настоя и экстракта в дозах до 10 000 мг/кг не вызвало гибели животных. Определение LD₅₀ не возможно в связи с высоким значением. Дальнейшее увеличение дозы явилось нецелесообразным из-за отсутствия токсичности.

Зав. кафедрой фармакологии
 д.м.н., профессор



В.М. Брюханов

Зав. кафедрой фармацевтической химии
 с курсом органической и токсикологической
 химии, д.фарм.н., профессор



Л.М. Федосеева

Аспирант кафедры фармацевтической химии
 с курсом органической и токсикологической
 химии



Т.А. Харлампович



УТВЕРЖДАЮ
Директор департамента ЛС
ЗАО «Эвалар»
Важенни В.А.
«10» февраля 2014 г.

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Я, нижеподписавшийся: Лудцева Алевтина Ивановна, начальник отдела контроля качества ЗАО «Эвалар», удостоверяю, что разработанные в ходе выполнения диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук проекты ФСП

- 1. Наименование предложения:** Проекты ФСП: «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* L. цельная и измельченная «ангро», «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок».
- 2. Авторы предложения:** аспирант кафедры фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет Минздрава РФ» Харлампович Т.А., зав. кафедрой фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, д-р фарм. наук, профессор Федосеева Л.М.
- 3. Где внедрено:** используются на фармацевтическом предприятии ЗАО «Эвалар» для входного контроля растительного сырья и экстракта сухого, в рамках разработки лекарственного препарата.
- 4. Эффективность внедрения:** расширение номенклатуры лекарственных препаратов и использование дополнительных источников лекарственного растительного сырья, содержащих ценных комплекс биологически активных соединений

Ответственный
за внедрение:


10.02.14

Начальник ОКК
Лудцева А.И.

ОТЧЕТ

об изучении влияния экстракта донника лекарственного травы на гемостаз

I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Материалы исследования

1.1. Исследуемый объект

Экстракт донника лекарственного травы.

1.2. Лабораторные животные

Изучение влияния извлечений на гемостаз проводили на былых крысах линии «Wistar» массой 200-230 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Кормление проводилось в фиксированное время. Для питья использовались автопоилки.

1.3. Схема эксперимента

Животные были разделены на 2 группы ($n=5$). Животные группы 1 – контрольной, получали экстракт в виде водного раствора, животные группы 2 – физиологический раствор в эквивалентном объеме. Растворы вводили внутривентрикулярно через зонд в дозе 5 мл/кг в течение 10 дней. Статистически обработанные данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M – среднее арифметическое, SEM – стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий между средними в различных группах опытов находили при помощи t -критерия Стьюдента.

2. Методы исследования

2.1. Оценка влияния на свертывание крови

Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе НЗ34. По полученным коагулограммам определяли начало и конец свертывания крови и продолжительность процесса свертывания крови (в сек).

2.2. Оценка влияния на показатели гемостаза

Определение показателей гемостаза вели на программируемом оптико-механическом коагулометре «Минилаб 701».

2.2.1. Определение протромбинового времени

Определение проводили с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» ТехпластинTM – тест.

Данное определение используется для тестирования факторов свертывания протромбинового комплекса (II – протромбин, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия.

Принцип метода основан на том, что тромбопластин превращает протромбин крови в присутствии ионов кальция в активный тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время – время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тромбопластина.

Результаты определения представлены в МНО (международное нормализованное отношение), которое рассчитывается исходя из ПО (протромбинового отношения) и МИЧ (международного индекса чувствительности), который указан в паспорте к набору и составляет 1,25.

Последовательность расчета:

ПО = ПВ больного/ ПВ контрольной плазмы × k, где

ПО – протромбиновое отношение

ПВ – протромбиновое время

k – нормализованный коэффициент, указанный в паспорте к набору и составляет 0,94.

МНО = ПО^{МИЧ}

2.2.2. Определение тромбинового времени

Определение проводили с помощью набора реагентов фирмы «Технология-Стандарт» Тромбо-тест.

Набор предназначен для оценки тромбинового времени при диагностике нарушений конечного этапа свертывания крови.

Принцип метода заключается в определении времени свертывания плазмы под влиянием тромбина стандартной активности.

Результаты выражают в секундах, сравнивают время свертывания контрольной и исследуемой плазмы.

2.2.3. Определение содержания фибриногена

Определение проводили с помощью набора реагентов фирмы «Ренам-НПО» ОптиФибриноген-тест.

Измерение содержания фибриногена в плазме является одним из базовых тестов, отражающих состояние гемостаза.

Принцип метода основан на определении времени свертывания разведенной плазмы избытком тромбина. В этом случае время свертывания зависит только от концентрации фибриногена в плазме. Результаты представлены в единицах концентрации (г/л).

II. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кровь для исследования брали из подъязычной вены крыс. Результаты представлены в таблице 1.

Анализ коагулограммы показал, что в группе животных, получавших экстракт, наблюдалась тенденция к повышению времени начала свертывания крови в среднем на 28% и протромбинового времени в среднем на 25%, однако относительно значений контрольной группы при данной выборке результаты статистически недостоверны. Достоверных отличий по показателям времени свертывания и конца свертывания крови относительно контроля не зафиксировано. Тромбиновое время и содержание фибриногена также достоверно не отличались от контроля. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракт донника лекарственного травы может быть рассмотрен для дальнейшего изучения как антикоагулянт непрямого действия.

Таблица 1

Влияние экстракта донника лекарственного травы на гемостаз

Показатели	Контроль	Экстракт	
Начало свертывания, сек	73,6±12,08	94,4±7,76	P>0,05
Конец свертывания, сек	193,6±15,62	206,4±21,07	P>0,05
Время свертывания, сек	118,0±12,40	112,0±15,62	P>0,05
Протромбиновое время, МНО	0,84±0,08	1,05±0,12	P>0,05
Тромбиновое время, сек	8,76±1,59	9,68±1,12	P>0,05
Содержание фибриногена, г/л	2,58±0,64	2,99±0,16	P>0,05

Заключение

В предложенных условиях эксперимента экстракт донника лекарственного травы проявил тенденцию к продлению времени начала свертывания крови и увеличению продолжительности протромбинового времени. Полученные результаты позволяют предположить, что компоненты экстракта оказывают влияние на синтез факторов свертывания крови в печени, действуя, как антагонисты витамина К.

Директор департамента ЛС ЗАО «Эвалар»

Важенин В.А.

