

На правах рукописи

ХАРЛАМПОВИЧ ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2014

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Научный руководитель:

Федосеева Людмила Михайловна доктор фармацевтических наук, профессор ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Бубенчикова Валентина Николаевна доктор фармацевтических наук, профессор ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники

Галишевская Елена Евгеньевна кандидат фармацевтических наук, доцент ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Ведущая организация: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России по адресу: 614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46.

Текст диссертации размещен на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> «10» июня 2014 г.

Дата размещения объявления о защите диссертации на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.mon.gov.ru> «___» _____ 2014 г.

Автореферат, отзыв научного руководителя и объявление о защите диссертации размещены на сайте ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России <http://www.pfa.ru> «___» _____ 2014 г.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Н.В. Слепова

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

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрический метод

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУК – трифторуксусная кислота

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Интерес к фитотерапии в последние десятилетия неизменно растет. Минимум побочных эффектов и возможность длительного приема растительных препаратов является их основным преимуществом.

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 (Купеев В.Г., 2006; Соколов С.Я., 1993). 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, обладающий биологической активностью аналогичной кумарину (Европейское агентство по оценке лекарственных средств, 2008). 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. Цель работы - 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 БАС растительного сырья и экстракта сухого.
3. Установить показатели доброкачественности ЛРС.
4. Установить сроки заготовки ЛРС и сроки годности растительного сырья и экстракта сухого.
5. Изучить острую токсичность и специфическую активность экстракта сухого.
6. Разработать проекты ФСП «Донника лекарственного травы» и «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок».

Научная новизна. Проведено комплексное фитохимическое исследование донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края. В промышленных условиях получен и изучен донника лекарственного травы экстракт сухой. Установлено, что комплекс БАС состоит из кумаринов, флавоноидов, дубильных веществ, тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, липофильных веществ. Выделены и идентифицированы индивидуальные соединения: кумарин, о-кумаровая кислота, мелilotовая кислота, галловая кислота (в составе дубильных веществ), мирицетин, кемпферол, кверцетин, изорамнетин (в составе флавоноидов), 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. Установлено количественное содержание основных групп БАС и индивидуальных соединений. Показана целесообразность стандартизации донника лекарственного травы и экстракта сухого 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».

Степень внедрения. Теоретические положения и результаты экспериментальных исследований применяются 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 донника лекарственного травы экстракта сухого (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 Перечня 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 проблемным планом. 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).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности:

Научные положения диссертации соответствуют формулам специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3 и 6 паспорта «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 197 страницах машинописного текста, иллюстрирована 38 таблицами и 53 рисунками, содержит приложение и список литературы, включающий 127 источников, в том числе 36 зарубежных.

Во *введении* изложена актуальность темы, определены цель и задачи, показана научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит обзор отечественной и зарубежной литературы: характеристику вида *Melilotus officinalis*, его распространение, ресурсные запасы, данные по химическому составу и использованию, фармакологические исследования.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследования.

В *третьей главе* приведены результаты фитохимического исследования кумаринов, флавоноидов, фенолокислот, дубильных веществ, полисахаридов, сапонинов, аминокислот, липофильных соединений и др.; разработка методик стандартизации донника лекарственного травы и экстракта сухого, внесенных в проекты ФСП.

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

В *пятой главе* приведены результаты морфологического, микроскопического анализа, установленные товароведческие показатели, использованные для разработки проектов ФСП.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 и техногенной нагрузке, - Бийском, Красногорском, Алтайском, Зональном, Завьяловском, Мамонтовском.

Донника лекарственного травы экстракт сухой получали по технологии, разработанной на предприятии «Эвалар».

Микроскопический анализ проводили с помощью лабораторных микроскопов «Микмед-1» и «Микмед-6». Объекты фотографировали фотокамерой «Canon». Обработку снимков проводили с помощью программы Adobe Photoshop CS 8.0.

Для идентификации и количественного определения БАС применяли качественные реакции, спектрофотометрию (Varian, Cary 300 Bio), хроматографические методы: ТСХ (Merck, НPTLC Silica gel 60 F₂₅₄), ВЭЖХ (Waters, оснащенный детекторами: спектрофотометрическим с диодной матрицей, светорассеяния и рефрактометрическим), ГХ (Varian, оснащенный пламенно-ионизационным детектором). Для исследований применяли СО Sigma, PhytoLab, ЕР: кверцетин, апигенин, лютеолин, мирицетин, кемпферол, гиперозид, рутин, изокверцитрин, апигенин-7-глюкозид, изовитексин, витексин, формонетин, биоханин А, гинестеин, даидзеин, о-кумаровая кислота, кумарин, скополетин, умбеллиферон, мелилотовая кислота, дикумарин, эсцин, галловая кислота, фруктоза, глюкоза, галактоза, арабиноза, манноза, β-каротин, лютеин, зеаксантин, β-ситостерин, смесь метиловых эфиров жирных кислот, смесь токоферолов, α-токоферол, аргинин, глютамин, треонин, валин, изолейцин, лейцин и др.

Определение тяжелых металлов и особо токсичных осуществляли атомно-абсорбционным, колориметрическим и инверсионно-вольтамперометрическими методами.

Острую токсичность донника лекарственного травы и экстракта сухого определяли на интактных белых мышах обоего пола массой около 20 г путем однократного перорального введения в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг.

Изучение влияния на гемостаз проводили на белых крысах линии «Wistar» массой 200-230 г. Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе Н334. Определение показателей гемостаза проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре «Минилаб 701». Определение протромбинового времени, тромбинового времени, фибриногена осуществляли с помощью специальных наборов реагентов фирмы «Технология-Стандарт» и «Ренам-НПО».

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили в соответствии с требованиями ГФ XI с использованием компьютерных программ BIOSTAT, MS Excel.

Фитохимическое исследование донника лекарственного травы и экстракта сухого

В результате качественных реакций установлено наличие в донника лекарственного траве и экстракте сухом кумаринов, флавоноидов группы флавона и флавонола, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, аминокислот.

Далее, для изучения качественного состава флавоноидов применяли хроматографические методы (ТСХ, ВЭЖХ) и спектрофотометрию.

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. Оптимальное разделение достигнуто в системе растворителей этилацетат - метилэтилкетон - муравьиная кислота - вода очищенная (5:3:1:1).

Для исследования агликонового состава флавоноидов применяли метод ВЭЖХ. Растительное сырье экстрагировали метанолом, проводили гидролиз в среде хлористоводородной кислоты, затем жидко-жидкостную экстракцию эфиром. В результате идентифицировано 6 агликонов флавоноидов: мирицетин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин, формонетин, биоханин А.

Количественное содержание агликонов определяли методом внешнего стандарта. Из полученных данных следует, что основная доля флавоноидов в донника лекарственного траве содержится в виде гликозидов кемпферола и кверцетина (табл.1).

Таблица 1

Результаты анализа агликонового состава флавоноидных соединений
донника лекарственного травы

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

Для исследования структуры флавоноидов растительного сырья проводили выделение флавоноидных фракций и индивидуальных флавоноидов. Измельченное сырье исчерпывающе экстрагировали метанолом, контролируя полноту извлечения методом ВЭЖХ по наличию/отсутствию спектров, характерных для флавонолов. Метанольное извлечение 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. Состав каждой фракции анализировали методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием.

В этилацетатной фракции 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-моноголикозидами. Один из пиков в сравнении с хроматограммой стандартного раствора идентифицирован как гиперозид (рис.1).

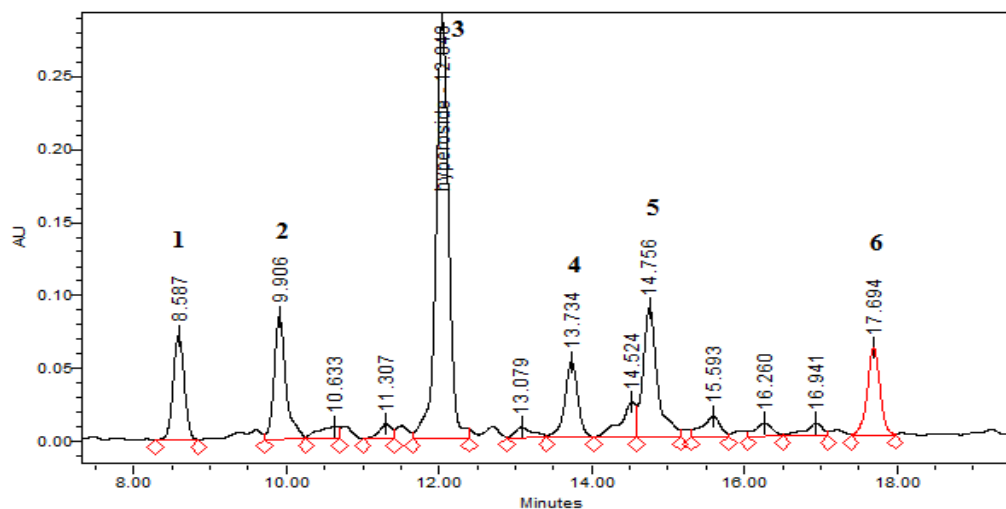


Рис. 1. Хроматограмма этилацетатного извлечения донника лекарственного травы; время удерживания пика 3 соответствует гиперозиду

Из бутанольной фракции, содержащей по результатам ВЭЖХ анализа 14 соединений флавоноидной природы, с помощью ТФЭ на патроне С18 удалось выделить сумму 2-х доминирующих гликозидов, близких по хроматографической подвижности и имеющих спектры поглощения, характерные для флавонолгликозидов (рис. 2).

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

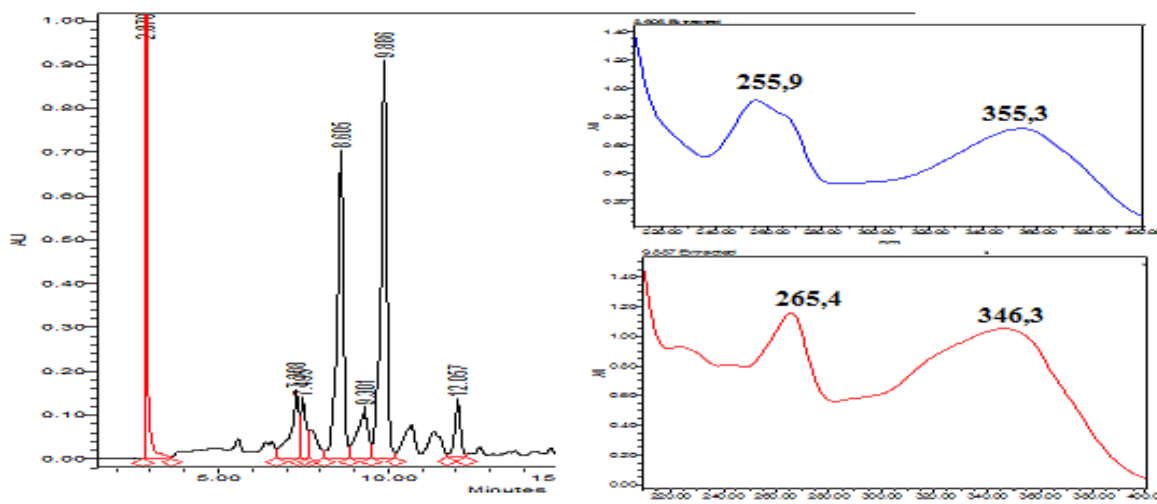


Рис. 2. Хроматограмма бутанольной фракции флавоноидов донника лекарственного травы после ТФЭ на патроне С18 и спектры поглощения основных пиков

Для установления структуры выделенных веществ применяли дифференциальную СФМ с диагностическими добавками и ВЭЖХ. Спектры метанольных растворов веществ с комплексообразующими реагентами регистрировали на спектрофотометре.

Параллельно исследовали кинетику гидролиза веществ.

На рисунках 3-6 представлены хроматограммы, полученные при изучении кинетики гидролиза вещества 1.

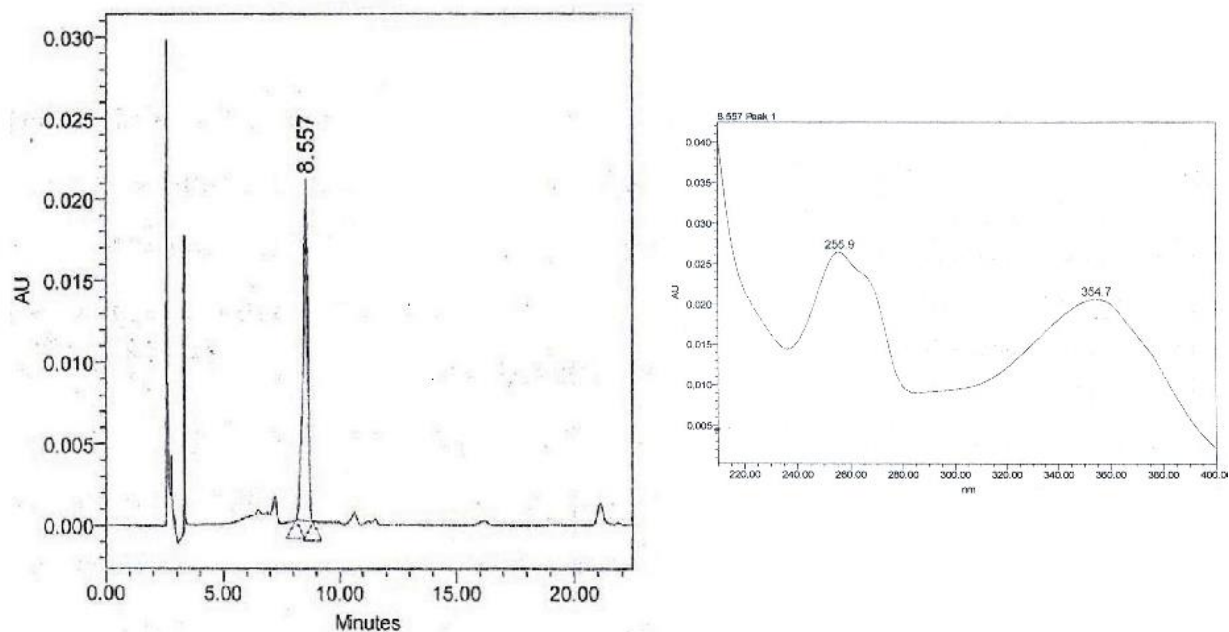


Рис. 3. Хроматограмма и спектр поглощения вещества 1 (8,557 мин), выделенного из донника лекарственного травы

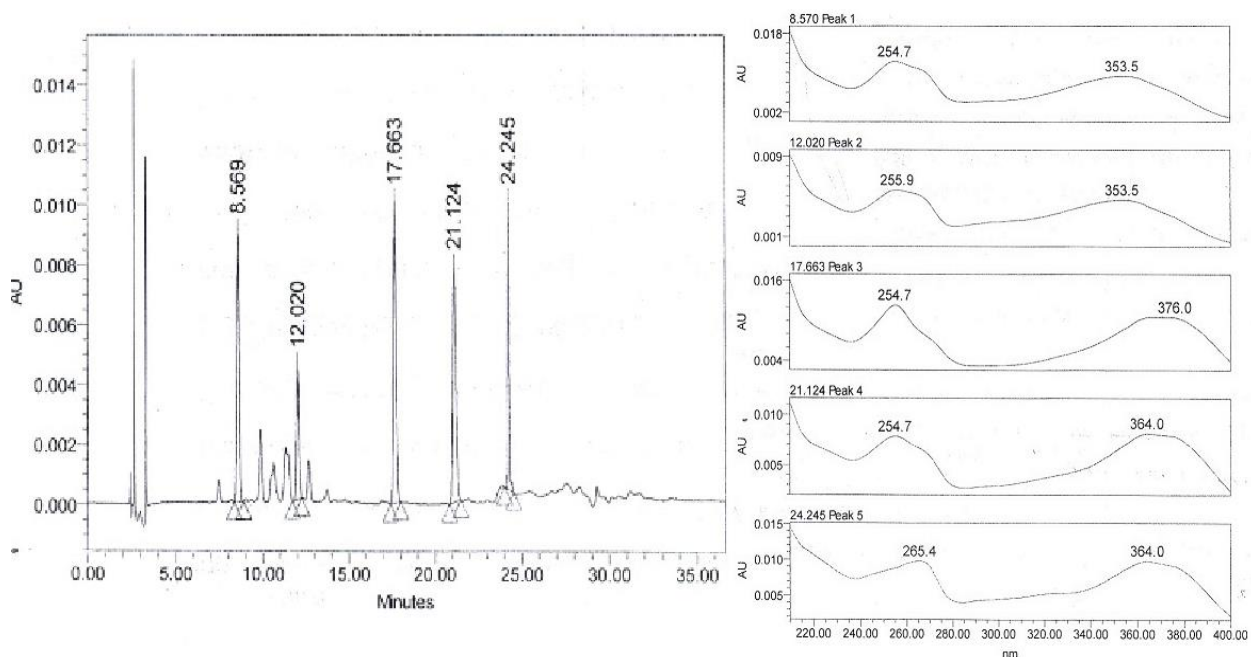


Рис.4. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектры поглощения продуктов, образовавшихся после 10 мин гидролиза

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

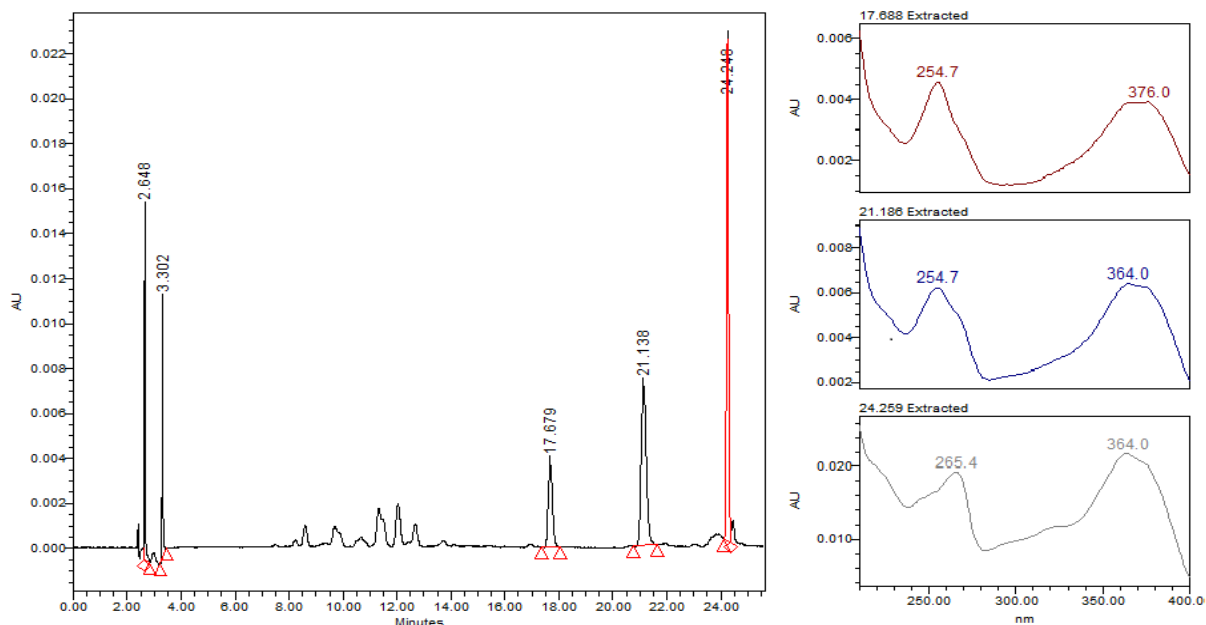


Рис.5. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектры поглощения продуктов гидролиза после 25 мин гидролиза.

На рисунке 5 пик исходного вещества и один из промежуточных гликозидов (12,020 мин) отсутствуют на хроматограмме.

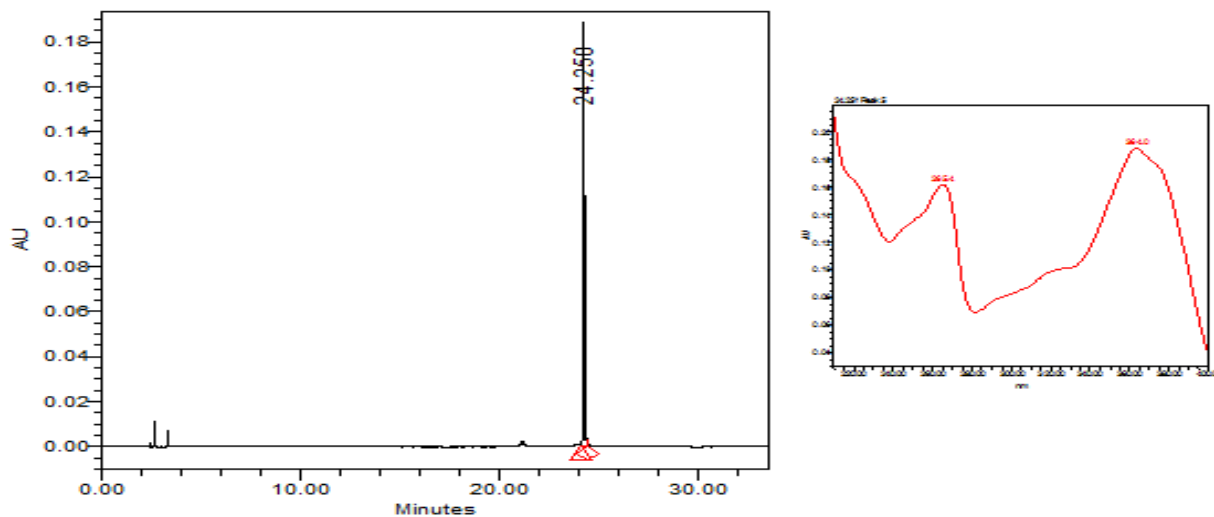


Рис.6. Хроматограмма раствора вещества 1 и спектр поглощения продукта гидролиза после 40 мин гидролиза

По результатам проведенного исследования установили структуру выделенных флавоноидов: кемпферол-3-О-гликозид-7-О-биозид, кемпферол-3-О-биозид (рис.7).

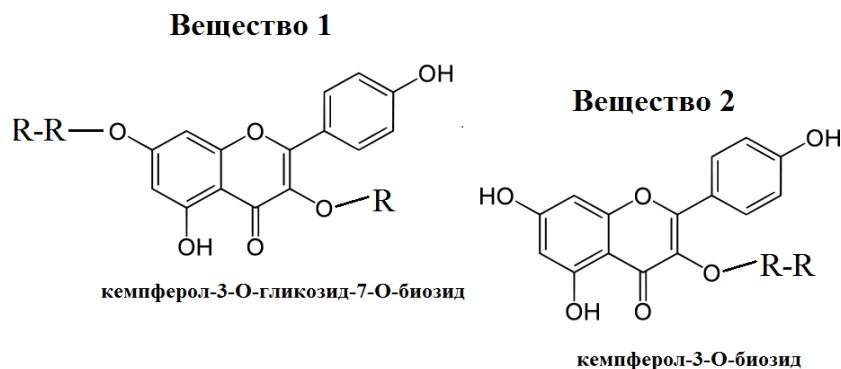


Рис.7. Структура флавоноидов, выделенных из донника лекарственного травы (R – моносахарид)

Количественное содержание суммы флавоноидов донника лекарственного травы и экстракта сухого определяли методом дифференциальной СФМ с алюминия хлоридом. В результате установлено, что содержание суммы флавоноидов в донника лекарственного траве составляет от 1,1 до 1,9%, в экстракте сухом – около 3 % в пересчете на рутин.

При исследовании хроматографическими методами в извлечениях донника лекарственного травы идентифицированы мелилотовая и о-кумаровая кислоты, кумарин, гликозид кумарина (рис.8).

После проведения кислотного гидролиза пик гликозида на хроматограмме исчезает, пик кумарина пропорционально увеличивается (рис.9).

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

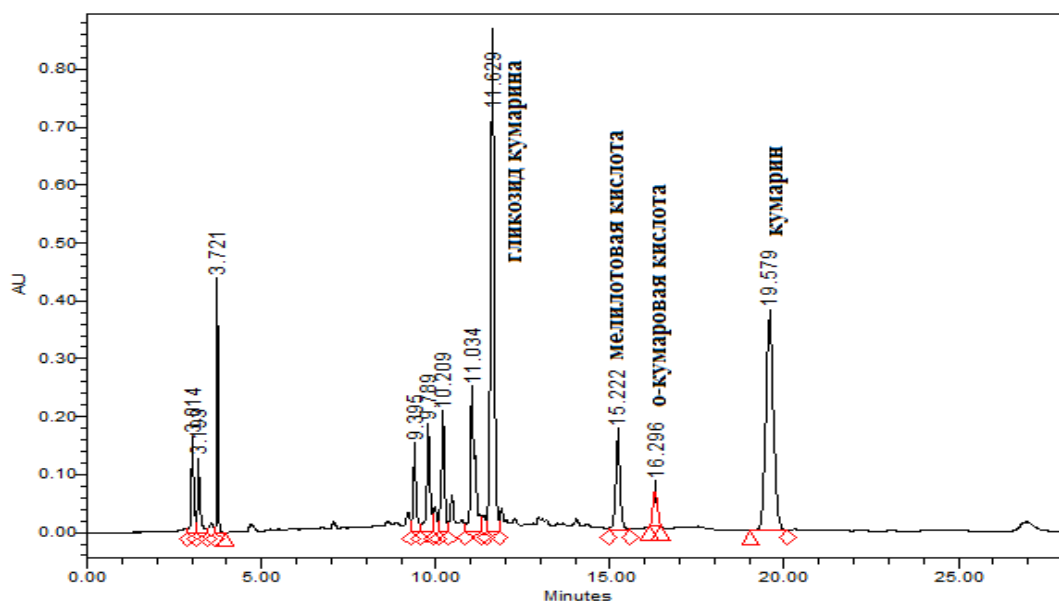


Рис.8. ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового извлечения донника лекарственного травы

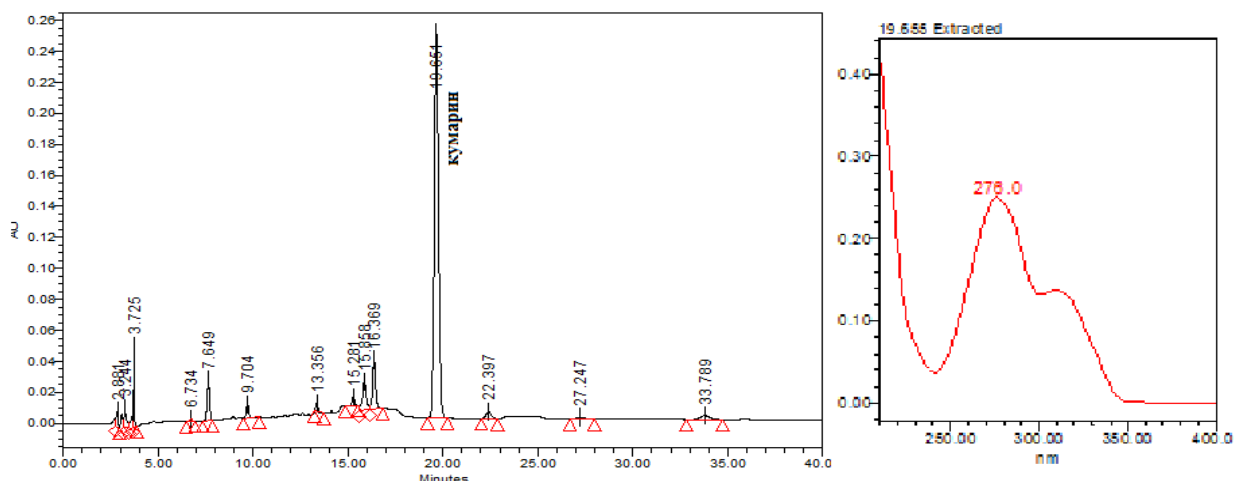


Рис. 9. Хроматограмма гидролизата водно-спиртового извлечения донника лекарственного травы и спектр пика кумарина

В результате разработана методика количественного определения суммарного кумарина, основанная на определении кумарина методом ВЭЖХ после предварительного кислотного гидролиза водно-спиртовых извлечений. Испытуемый раствор и раствор СО кумарина хроматографируют на жидкостном хроматографе, оснащённом спектрофотометрическим 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.

Валидационная оценка показала обоснованность применения данной методики для определения содержания кумарина в донника лекарственного траве. По разработанной методике определили общее содержание кумарина в образцах ЛРС. 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 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 0,16% о-кумаровой кислоты и до 0,07% мелилотовой кислоты. Наблюдается тенденция к снижению содержания кумаровых кислот с течением вегетативного периода. В образцах, заготовленных в августе их количество ниже предела обнаружения.

Разработанная методика модифицирована для анализа донника лекарственного травы экстракта сухого. В ходе дальнейших исследований проанализированы образцы трех производственных партий донника лекарственного травы экстракта сухого и установлено содержание кумаровых кислот и кумарина. 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 около 0,1%, о-кумаровой кислоты около 0,05%.

Дикумарин образуется в растительном сырье в результате порчи и является токсичной примесью. Содержание дикумарина в образцах ЛРС определяли методом ВЭЖХ. Дикумарин обнаружен только в сырье, заготовленном 29 августа в Завьяловском районе, в количестве менее 1 мг %.

Для обнаружения сапонинов в растительном сырье применяли качественные реакции и ТСХ. По результатам качественных реакций сапонины донника отнесены к тритерпеновому ряду.

Разделение сапонинов методом ТСХ проводили в системе растворителей: хлороформ - уксусная кислота ледяная - метанол - вода (65:32:12:8). После обработки пластинки анисового альдегида раствором уксуснокислым в метаноле на хроматограмме обнаруживались 5 зон синего цвета с $R_f = 0,38, 0,47; 0,54; 0,65; 0,69$.

Количественное определение сапонинов в ЛРС и экстракте сухом проводили методом СФМ. Методика включает выделение сапонинов, очистку, концентрирование и дериватизацию. В результате установлено, 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 0,52 %. В экстракте сухом содержится 1,36 - 1,83% суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин.

Содержание дубильных веществ в растительном сырье определяли методом СФМ с реактивом Фолина - Чокальтеу по разности суммы фенольных соединений и фенольных соединений, не сорбируемых кожным порошком. Содержание дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту в траве донника составило около 0,14%.

Результаты качественных реакций на групповую принадлежность дубильных веществ показали присутствие в сырье гидролизуемых дубильных веществ, имеющих в своем составе пирогалловые фрагменты.

Выход водорастворимых полисахаридов (ВРПС) донника лекарственного травы составил 4,7%, протопектина – 3,8%, содержание уроновых кислот в пересчете на галактуроновую кислоту в составе ВРПС – 8,9%, в составе протопектина – 30,4%. Из свободных моносахаридов в растительном сырье методом ВЭЖХ обнаружены глюкоза в количестве 3,3% и фруктоза – 0,6%.

Для установления моносахаридного состава ВРПС и протопектина проводили их гидролиз в среде ТФУК раствора 2М при температуре кипения в течение 3 ч. В гидролизатах методом ВЭЖХ в сравнении с достоверными образцами идентифицировали глюкозу, галактозу, фруктозу, арабинозу, рамнозу. Высокое содержание арабинозы и галактозы, а также наличие уроновых кислот в составе ВРПС указывает на наличие в них водорастворимого пектина.

В результате ТСХ-анализа в водных извлечениях растительного сырья идентифицированы аминокислоты: аргинин, глютамин, треонин, валин, изолейцин, лейцин. Методом ВЭЖХ с детекцией по светорассеянию установлено их количественное содержание в растительном сырье: глютамина – 0,32%, треонина – 0,46%, аргинина – 0,21%, валина – 0,16%, изолейцина – 1,38%, лейцина – 0,8%.

Общее содержание аминокислот определяли методом СФМ по нингидриновой реакции. Содержание аминокислот в пересчете на изолейцин в растительном сырье составило 1,6%.

Качественный анализ липофильных веществ донника лекарственного травы проводили методом ТСХ. В результате обнаружены эфиры стеринов,

гликостерины, гликолипиды, аминофосфолипиды, β -каротин, зеаксантин, лютеин, β -ситостерин.

Общее содержание жироподобных веществ в ЛРС, полученное гравиметрическим методом, составляет около 5,0%, массовая доля нейтральных липидов - до 2,5%.

Методом нормально-фазовой ВЭЖХ установлено наличие в растительном сырье стереоизомеров лютеина и зеаксантина. Доминирующим является лютеин. Его содержание составило 77% от суммы ксантофиллов.

Витамин Е в неомыляемой липофильной фракции определяли методом ВЭЖХ. Изомеры токоферола идентифицировали по временам удерживания в сравнении с хроматограммой СО смеси токоферолов. В результате идентифицированы δ -, γ - и α - изомеры токоферола, основным из которых является α -токоферол (витамин Е). Содержание витамина Е в донника лекарственного траве составляет около 4 мг%.

В омыляемой липидной фракции методом ГХ определили жирно-кислотный состав. В результате идентифицировано 10 жирных кислот: каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, α -линолевая, линоленовая, гондоиновая. Из полученных данных следует, что основными являются полиненасыщенные кислоты: α -линоленовая (50,8%) и линолевая (10,7%). Из насыщенных превалирует пальмитиновая кислота (22,0%).

В результате фитохимического изучения установлено, что донника лекарственного трава и экстракт сухой содержат комплекс БАС, идентичный по качественному составу и отличающийся по количественному содержанию (табл.2).

Таблица 2

Результаты количественного определения БАС донника лекарственного
травы и экстракта сухого

Объект исследования	Донника лекарственного трава	Экстракт п/п 020211	Экстракт п/п 010211	Экстракт п/п 030211
Флавоноиды, %	От 1,12 до 1,91	2,78 ± 0,04	3,42 ± 0,03	3,06 ± 0,03
Кумарин, %	От 0,84 до 1,48	3,42 ± 0,06	3,80 ± 0,05	4,06 ± 0,08
Сапонины, %	От 0,31 до 0,52	1,83 ± 0,04	1,36 ± 0,07	1,61 ± 0,05
Фенольные соединения, %	2,14 ± 0,09	-	-	-
Дубильные вещества, %	0,14 ± 0,02	-	-	-
Аминокислоты, %	1,64 ± 0,10	-	-	-
Водорастворимые полисахариды, %	4,7 ± 0,3	-	-	-
Липиды, %	5,1 ± 0,3	-	-	-
Хлорофиллы, мг%	100 ± 10	-	-	-
Каротиноиды, мг%	58 ± 6	-	-	-
Ксантофиллы, мг%	111 ± 10	-	-	-
Витамин Е, мг%	3,70 ± 0,07			

Изучение острой токсичности и специфической активности

Доказана практическая безвредность донника лекарственного травы настоя и экстракта сухого. Как показали проведенные эксперименты, применение настоя и экстракта в дозах до 10 000 мг/кг не вызвало гибели животных. Определение LD₅₀ оказалось невозможным в связи с ее высоким значением.

Изучение влияния на гемостаз экстракта донника выявило наличие тенденции к повышению времени начала свертывания крови в среднем на 28% и протромбинового времени в среднем на 25%. Полученные результаты позволяют предположить, что компоненты изучаемого экстракта оказывают влияние на синтез факторов свертывания крови в печени, действуя, как антагонисты витамина К.

Установление показателей подлинности и доброкачественности

С целью разработки проектов ФСП, регламентирующих качество растительного сырья и экстракта сухого, устанавливали показатели подлинности и доброкачественности.

Морфолого-диагностические признаки травы *Melilotus officinalis* L.: растительное 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.

Анатомо – диагностические признаки травы *Melilotus officinalis* L.: стебель имеет вторичное непучковое строение; клетки верхнего эпидермиса листа в очертании многоугольные или слегка волнистые, клетки нижнего эпидермиса с извилистым контуром; на обеих сторонах листочка расположены овальные устьица аномоцитного типа; на нижней стороне листочка встречаются волоски двух типов: простые многоклеточные и тонкостенные головчатые; клетки эпидермиса лепестков цветка имеют сосочковидные выросты; 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.

Установлено, что содержание особо токсичных элементов (свинца, кадмия, мышьяка, ртути) в ЛРС не превышает допустимого уровня, независимо от места сбора растительного сырья.

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», в который внесены следующие числовые показатели: потеря в массе при высушивании не более 5,0 %; тяжелые металлы - не более 0,01 %; остаточные органические растворители – этанола не более 0,5 %; кумарин - не менее 3,0 %.

С целью определения оптимальных сроков заготовки растительного сырья провели оценку зависимости содержания БАС от срока сбора и места произрастания ЛРС.

Исследование 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.10).

Содержание кумарина в растительном сырье также зависит от места произрастания (рис.11). 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.

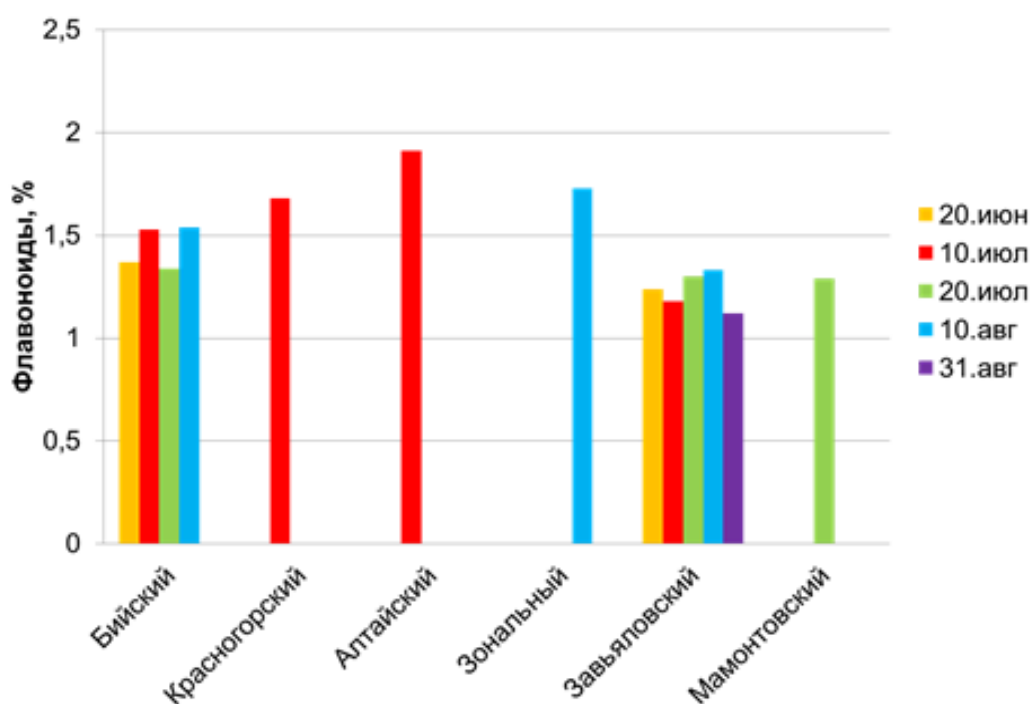


Рис.10. Зависимость содержания суммы флавоноидов от места и времени сбора донника лекарственного травы

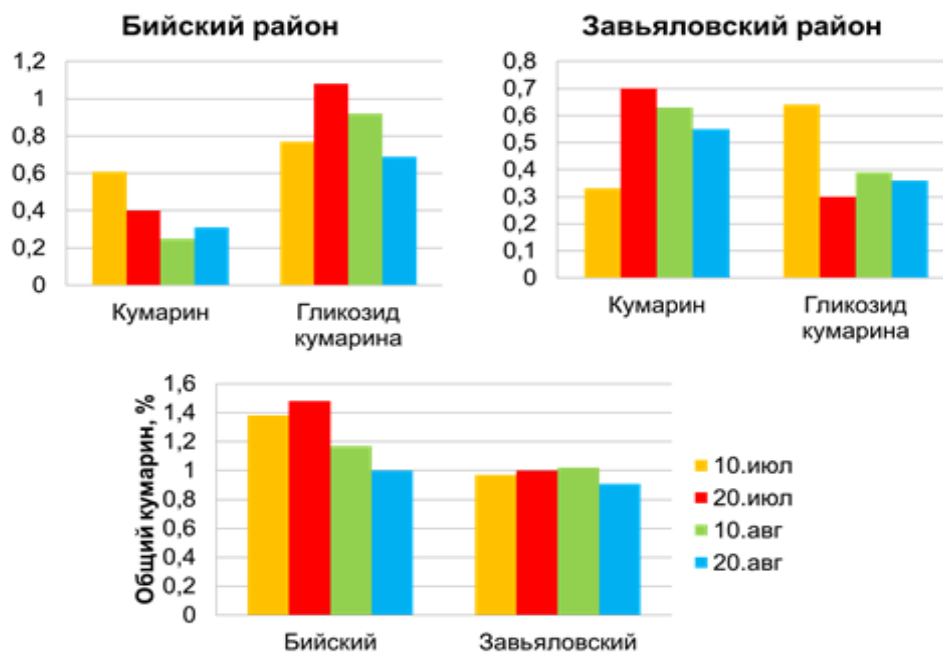


Рис.11. Зависимость содержания кумарина от места и времени сбора донника лекарственного травы

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

Установлены сроки годности ЛРС – 2,5 года и экстракта сухого – 2 года (срок наблюдения).

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 БАС в донника лекарственного траве: 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, что экстракт сухой содержит комплекс БАС идентичный по качественному составу растительному сырью: 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 острой 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 ЛРС и экстракта сухого.

7. В процессе исследований усовершенствованы аналитические методики, разработана и валидирована методика количественного определения кумарина методом ВЭЖХ.

8. Установлены сроки заготовки ЛРС – фаза цветения, сроки годности ЛРС – 2,5 года и экстракта сухого – 2 года.

9. Разработаны проекты ФСП «Донника лекарственного травы *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.).

Список публикаций

1. Изучение агликонового состава фенольных соединений донника лекарственного флоры Алтайского края / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Актуальные проблемы фармации. Ежегодный сборник работ преподавателей, молодых ученых и студентов. – Барнаул, 2010. - Вып. 7 - С. 104-107.

2. Изучение флавоноидов донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сборник научных трудов. - Пятигорск, 2011. - Вып. 66 - С. 202-205.

3. Изучение динамики накопления кумаринов донника лекарственного травы, заготовленной в разных районах Алтайского края / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А.// Актуальные проблемы фармации. Ежегодный сборник работ преподавателей, молодых ученых и студентов. – Барнаул, 2011. - Вып. 8 - С. 178-183.

4. Анатомио-диагностическое изучение донника лекарственного травы / Киселева Н.В., Федосеева Л.М., Гербер Т.В., Харлампович Т.А. // Актуальные проблемы фармации. Ежегодный сборник работ преподавателей, молодых ученых и студентов – Барнаул, 2011. - Вып. 8 - С. 93-98.

5. Изучение липидного состава надземной части *Melilotus officinalis* L. / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Химия растительного сырья. – Барнаул, 2011. - Вып. 4 - С.213-218.

6. Разработка методики количественного определения суммы кумаринов в донника лекарственного траве (*Melilotus officinalis* L.) / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Химия растительного сырья. – Барнаул, 2012. - Вып.3 - С. 135 - 141.

7. Изучение биологически активных соединений донника лекарственного травы методом ВЭЖХ/Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Материалы Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств».– Харьков, 2012.- Том 1. – С.120-121.

8. Валидация методики количественного определения кумарина в донника лекарственного траве / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Актуальные проблемы фармации. Ежегодный сборник работ преподавателей, молодых ученых и студентов – Барнаул, 2012. - Вып. 9 - С. 157-165.

9. Изучение некоторых водорастворимых соединений донника лекарственного травы (*Melilotus officinalis* L.) / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Химия растительного сырья. – Барнаул, 2013. - Вып. 2 - С. 153 - 157.

10. Динамика накопления биологически активных соединений донника лекарственного травы (*Melilotus officinalis* L.), произрастающего на территории Алтайского края / Федосеева Л.М., Харлампович Т.А. // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья».– Барнаул, 2014.- Вып. 6.– С. 275-277.

Харлампович Татьяна Анатольевна (Россия)**Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края**

Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование донника лекарственного травы, произрастающего на территории Алтайского края. Установлено, что комплекс БАС состоит из кумаринов, флавоноидов, полисахаридов, тритерпеновых сапонинов, дубильных веществ, липофильных веществ. Показана целесообразность стандартизации донника лекарственного травы по содержанию суммы кумаринов методом ВЭЖХ, разработана и валидирована методика количественного определения. Установлены показатели подлинности и доброкачественности ЛРС. В промышленных условиях получен и изучен донника лекарственного травы экстракт сухой. Проведены исследования по определению острой токсичности и влиянию на гемостаз. Разработаны проекты ФСП: «Донника лекарственного трава *Melilotus officinalis* цельная и измельченная «ангро» и «Донника лекарственного травы экстракт сухой, субстанция-порошок».

Kharlampovich Tatyana (Russia)**Phytochemical study and standardization of Melilot herb, growing in the territory of the Altai**

For the first time phytochemical study of Melilot herb, growing in Altai territory was conducted. It is found that the complex of biologically active compounds consists of coumarins, flavonoids, polysaccharides, triterpene saponins, tannins, lipophilic substances. Reasonability of standardization of Melilot herb according to the content of total coumarins by HPLC was shown; assay method was developed and validated. Identification and good quality indices of medicinal plant raw material were established. Melilot herb dry extract was obtained and investigated in industrial conditions. Investigations on determination of acute toxicity and influence on hemostasia were conducted. Projects of manufacturer's monograph were developed: "Whole and grinded in bulk *Melilotus officinalis*", "Melilot herb dry extract, powdered of substance".