

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



ШПЛИС ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО,
КУЛЬТИВИРУЕМОГО В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
доцент

Коломиец Наталья Эдуардовна

Томск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО	11
1.1. Систематическая, экологическая и географическая характеристика лядвенца рогатого	11
1.2. Степень химической изученности лядвенца рогатого.....	17
1.3. Сведения об изученности биологической активности лядвенца рогатого	23
1.4. Сведения о применении лядвенца рогатого в народной медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, парфюмерно-косметической промышленности	26
Выводы к главе 1.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Характеристика объекта	30
2.2 . Методы исследования	31
2.2.1. Получение экстрактов, извлечений, суммарных комплексов и фракций	31
2.2.2. Определение экстрактивных веществ, влажности сырья, золы и примесей	31
2.2.3. Качественное обнаружение и количественное определение БАВ	31
2.2.3.1 Хроматографическое и спектральное исследование	32
2.3. Методы макро- и микроскопического исследования	36
2.4 Статистические методы обработки результатов исследования	37
ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО КУЛЬТИВИРУЕМОГО	38
3.1. Качественный состав и количественное содержание БАВ травы лядвенца рогатого культивируемого	38
3.2. Получение и фракционирование экстракта.....	41
3.2.1. Хроматографическое исследование экстракта и фракций.....	43
3.2.2 Выделение и идентификация флавоноидов, кумаринов и фенолкарбоновых кислот.....	49
3.3. Исследование элементного состава	74
Выводы к главе 3.....	77
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМИЧЕСКИХ (МИКРОСКОПИЧЕСКИХ) ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАВЫ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО	80
4.1. Морфологическое строение лядвенца рогатого	81
4.2. Микроскопические признаки лядвенца рогатого	89
4.3. Ресурсное исследование <i>Lotus corniculatus</i> , культивируемого в Томской области	98

Выводы к главе 4.....	101
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО	103
5.1. Качественное обнаружение фенольных соединений	103
5.2. Количественное определение гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов	105
5.3.Валидация методики количественного определения гидроксикоричных кислот и извофлавоноидов	109
5.4. Изучение динамики накопления изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот	114
5.5. Разработка товароведческих показателей	119
5.6. Определение микробиологической чистоты.	120
5.7. Определение остаточных пестицидов	120
5.8. Определение содержания радионуклидов	121
Выводы к главе 5.....	121
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126
Приложение 1. Проекты нормативных документов.....	153
Приложение 2. Акты внедрения результатов диссертационной работы..	163
Приложение 3. Патенты.....	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Профилактический и терапевтический потенциал лекарственных растений и продуктов на растительной основе хорошо известен и давно признан во всем мире, а фитопрепараты прочно стали неотъемлемой частью мировой системы здравоохранения. По данным литературы общий мировой «травяной» рынок препаратов на растительной основе оценивается в 14-18 миллиардов долларов [126, 137, 171, 202]. И в целом на сегодняшний день востребованность препаратов на растительной основе не снижается, и даже значительно возрастает благодаря существенному скачку в развитии уровня развития технологий в смежных с фармацевтической химией и фармакогнозией областях научных знаний. Так, в последние годы активно развивается биоинформационная медицина – одно из новых клинических направлений, связывающее разностороннее воздействие активных веществ растений на организм человека с их информационно-регулирующей активностью. Получаемые исследователями с помощью современных приборов новые экспериментальные данные о химическом составе растений и «точках» их приложения в организме, являются основой понимания механизмов их действия на клеточном уровне. Производители препаратов, используя современные технологии, могут полностью контролировать процесс производства, от выбора объекта, селекции семенного материала, разработки и применения агротехнических мероприятий в процессе их выращивания в разных климатических зонах, до выпуска готового продукта со строго определенной/заданной дозой действующего вещества, что значительно облегчает врачу расчет доз, проведение доклинических и клинических исследований, а главное гарантирует необходимый профилактический или терапевтический эффекты потребителю [81,82, 90].

Перспективным для внедрения в медицину видом является *Lotus corniculatus* L. (лядвенец рогатый) - многолетнее травянистое растение рода *Lotus* L. (лядвенец), семейства *Fabaceae* (бобовые), широко распространенное

в странах Европы, а на территории России произрастающее преимущественно в Европейской части и на Кавказе, а в Сибири относится к редко встречающимся. Лядвенец рогатый – вид, широко введенный и вводимый в культуру разных стран, прежде всего для нужд сельского хозяйства, что связано с несколькими причинами. С одной стороны, он является ценным высокоурожайным, высокобелковым сырьем для сельскохозяйственных животных, по кормовой ценности по некоторым данным, превосходящим люцерну (*Medicago sativa*) и клевер (*Trifolium repens*). С другой - лядвенец фиксирует азот из атмосферы, создавая симбиотические взаимодействия с азотфиксирующими бактериями, что обосновывает его использование для рекультивации деградированных, нарушенных, бедных почв.

Перспективность лядвенца рогатого подтверждается данными о его использовании в народной медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и косметологии, широким спектром фармакологической активности (антибактериальная, противогрибковая, противовоспалительная, противопаразитарная, ранозаживляющая, антипролиферативная, повышение репродуктивной функции) [27,28,172,188,189,196,200,211]. Что касается химического состава дикорастущего и культивируемого на территории России лядвенца рогатого, то на сегодняшний день он изучен фрагментарно, что подтверждается единичными публикациями в международных базах данных Scopus, WoS и др. Информация о культивируемых в условиях Сибирского региона видах лядвенца в литературе отсутствует. Вместе с тем, рекомендация в практику нового вида сырья требует детального исследования химического состава, разработки показателей качества и безопасности для включения в нормативную документацию.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – комплексное изучение макроскопических, микроскопических признаков, химического состава надземной части лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), культивируемого для использования нового вида лекарственного сырья.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

- анализ данных отечественной и зарубежной литературы по растениям рода *Lotus* L;
- исследование химического состава, в том числе установление структуры фенольных соединений лядвенца рогатого культивируемого;
- изучение макроскопических, микроскопических признаков лядвенца рогатого культивируемого;
- оценка урожайности сырья лядвенца рогатого в процессе культивирования в условиях подтаежной зоны Томской области;
- изучение сезонной динамики накопления изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот в культивируемом сырье для обоснования сроков его заготовки;
- оценка экологической чистоты растительного сырья;
- разработка проекта Фармакопейной статьи на новый вид сырья «Лядвенца рогатого трава».

Научная новизна. Впервые установлены новые, ранее не описанные в литературе макроскопические, микроскопические признаки надземной части лядвенца рогатого, заключающиеся в разной степени опушенности стебля, имеющего различающиеся формы в верхней, средней и нижней части; в наличии междоузлий во всех частях стебля с низкой опушенностью; разворачивающихся листовых пластинок из почки с черешочками с высокой степенью опушения; встречаемости устьичного аппарата двух типов; булавовидных железистых волосков с одноклеточной ножкой и многоклеточной головкой; многорядной кристаллоносной обкладки. Физико-химическими методами в лядвенце рогатом, впервые культивируемом в Томской области, идентифицировано 34 соединения, из них 26 веществ фенольной природы, относящихся к кумаринам (изоскополетин, скополетин, умбеллиферон, эскулетин, скимин, скополин), флавоноидам (популнин, астрагалин, трифолин, изокверцитрин, кверцитрин, гиперозид,

морин-3-О-D-галактопиранозид, кемпферол-3-О-7-О-диглюкозид, кверцетин), изофлавоноидам (формонетин, генистеин, биоханин А, ононин), фенолкарбоновым кислотам (протокатеховая, п-кумаровая, галловая, кофейная, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая), 1 вещество тритерпеновой природы (олеаноловая кислота), 4 аминокислоты (валин, аргинин, лизин и глицин) и 3 углевода (D-галактоза, D-глюкозы и L-рамнозы). Для лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, впервые определена сезонная динамика накопления изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот, необходимая для обоснования сроков его заготовки. При исследовании состава макро- и микроэлементов лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, установлены высокие уровни содержания Са, К, Na и Zn значительно превосходящие дикорастущие виды и культивируемые в других регионах сорта лядвенца рогатого.

Разработана и предложена методика стандартизации сырья по содержанию изофлавоноидов спектрофотометрическим методом и гидроксикоричных кислот - экстракционно-спектрофотометрическим методом. На основании проведенных исследований разработан и представлен проект Фармакопейной статьи «Лядвенца рогатого трава».

Практическая значимость.

Результаты экспериментального изучения расширили представления о макроскопических и микроскопических признаках, химическом составе лядвенца рогатого.

На основании проведенных исследований разработаны и внедрены:

- методика качественного определения изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, методом ТСХ;

- методика количественного определения в траве лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, изофлавоноидов в пересчете на биоханин А и гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту. Методики апробированы на ООО «Фарм-Трейд», ООО «СИБРЕСУРС»;

- проект фармакопейной статьи «Лядвенца рогатого трава»;
- «Практические рекомендации по планированию и организации заготовок дикорастущего растительного сырья на территории Томской области».

Результаты диссертационного исследования: защищены 2 патентами Российской Федерации; внедрены и используются в учебном процессе и научной работе кафедры фармацевтического анализа ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований в рамках комплексной темы СибГМУ «Разработка инновационных технологий новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных комплексов» (Регистрационный № 01201152362).

Личный вклад автора заключается в выборе направления исследования, постановке цели, определении задач исследований, заготовке образцов, выполнении исследований, обобщении полученных экспериментальных данных и их статистической обработке, оформлении и представлении научных работ.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Научные положения диссертационного исследования соответствуют пунктам 5,6,7 паспорта специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Апробация работы. Основные положения диссертации обсуждались на: IV международной научно-методической конференции «Гаммермановские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2019); на II-ой международной научной конференции «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства по направлению «Метаболомика и качество жизни» (г. Москва, 2019); международной научной конференции «Энерго-ресурсоэффективность в

интересах устойчивого развития» (SEWAN, г. Томск, 2018); агрономическом форуме «Перспективы развития органического земледелия в условиях Томской области» (г.Томск, 2016, 2017, 2018).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 статьи - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, получено 2 патента РФ.

На защиту выносятся:

- результаты исследований макроскопических и микроскопических признаков надземной части лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области;

- результаты химического исследования, установления структуры фенольных соединений надземной части лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области;

- результаты сезонной динамики накопления фенольных соединений (изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот) в траве лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области;

- разработанные методики качественного и количественного анализа лекарственного сырья «Лядвенца рогатого трава»;

- проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лядвенца рогатого трава».

Объем и структура диссертационной работы. Материалы исследования изложены на 168 страницах. В тексте приведено 16 таблиц, 32 рисунка. Библиографический указатель включает 211 источников литературы, из них зарубежных - 73. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. В приложении представлены: проект фармакопейной статьи «Лядвенца рогатого трава», акты внедрения, «Практические рекомендации по планированию и организации заготовок дикорастущего растительного сырья на территории Томской области», 2 патента РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО

1.1. Систематическая, экологическая и географическая характеристика лядвенца рогатого

Lotus corniculatus L. (лядвенец рогатый) – представитель семейства *Fabaceae*, относящийся к одному из крупнейших родов – роду лядвенец *Lotus* L., объединяющему от 70 до 200 видов, в числе которых ксерофитные, пустынные, альпийские многолетники и солеустойчивые однолетники. Таксономия рода *Lotus* L. сложна и, по мнению многих исследователей, на сегодняшний день необходим его всеобъемлющий таксономический пересмотр. По данным морфолого-географических исследований рода *Lotus* L., проведенных в период с 2006 по 2018 гг. Дегтяревой И.В., и полученным на основе молекулярно-филогенетического анализа по последовательностям участка ядерной рибосомальной ДНК ITS1–2 результатам, выдвинуто предположение о том, что данный род берёт своё начало в Средиземноморье и включает четыре видовых группы: 1 - *Lotus corniculatus*; 2 - *Lotus angustissimus*; 3 - *Lotus uliginosus*; 4 - *Lotus parviflorus*. В Средиземноморье встречаются представители всех четырёх групп. Автор полагает, что эволюция *Lotus corniculatus* происходила под влиянием ее распространения на северо-восток, и процессами гибридизации между линиями групп [174]. Большинство исследователей изучающих группу *Lotus corniculatus* считают его таксономически трудной группой из-за его экстремально высокой морфологической изменчивости.

Выраженная морфологическая изменчивость *L. corniculatus* по деталям строения цветков, характеру опушенности, формам листочков, и др. обосновывает выделение форм и мелких разновидностей этого сложного полиморфного комплекса. Так, Т.Е. Краминой *Lotus stepposus* был описан как часть, описанного М.В. Клоковым *L. ucrainicus* [174]. Выяснение генетического происхождения *L. corniculatus* было предметом дискуссий на

протяжении более четверти века. Например, в 1985 году Ross и Jones выдвинули предположение, что *L. corniculatus* возник в результате гибридизации *L. uliginosus* и *L. alpinus* или с *L. tenuis*, чуть позже в 1986 году Грант и др. исследователи предположили, что объяснение все еще может быть неполным [160 - 162].

Таким образом, *L. corniculatus* – это полиморфный комплекс, состоящий из группы близкородственных видов, ранг которых истолковывается разными авторами неодинаково [64, 130].

Lotus corniculatus L. (лядвенец рогатый) - травянистый многолетник, в дикорастущем виде высотой от 10 до 45 см, в то время как в культуре его высота достигает 80 см. В исследованиях Маргарет Грубер и Биргитт Скадхауг установлено, что на размер растения и его морфо-анатомическое строение влияют эколого-географические условия обитания [163]. Обобщая имеющиеся в литературе сведения о морфологии вида можно отметить следующие основные характеристики и признаки: длинный стержневой корень до 1,5 м, многочисленные, густо облиственные стебли, разветвленные на всем протяжении, чаще лежачие или приподнимающиеся, реже восходящие, бороздчатые, имеющими слабое опушение в средней и верхней части стебля, в голые внизу. Листья лядвенца сверху голые, снизу слабоопушенные или почти голые, расположены поочередно вдоль стебля. Нижние листочки отставлены от верхних и находятся у оснований черешков, напоминая прилистники [105,106,125].

Характерным для дикорастущего и культивируемого лядвенца рогатого является наличие плотной стеблевой розетки и высокой биологической способности к кущению, которая увеличивается с возрастом. К 3-4-му году жизни у растения насчитывается от 180 до 240 побегов на куст. Благодаря данной биологической особенности растение может образовывать массовые заросли, с большой фитомассой. Лядвенец имеет продолжительный период цветения, с мая по конец сентября, не крупные обоеполые цветки, длиной 9-16 мм мотылькового типа, собраны по 2–5 в зонтиковидные соцветия, на

отдельных цветоносах, выходящих из пазух листьев (рис.1.1.1). Венчики ярко-желтые, 10–13 мм, с оранжевым или коралловым флагом, при высыхании приобретающий зеленый цвет. Цветоножки покрыты волосками. Ранее цветки лядвенца использовали как краситель для текстиля. Созревание плодов начинается с конца июня по октябрь. Плоды лядвенца представляют собой цилиндрические бобы с длиной от 2 до 3 см, голые, прямые иногда слегка дуговидно изогнутые, с двумя створками, крючковатым носиком на конце, самораскрывающиеся в период полного созревания и спирально закручивающиеся после растрескивания. Семена лядвенца шаровидные или слегка сплюснутые, с толстой одревесневшей оболочкой, которая обеспечивает способность к прорастанию в течение более чем 40 лет. Цвет семян темно-коричневый, бурый, изредка мраморно-пятнистый. Средняя масса 1000 семян 1,2 - 1,3 грамма [76,105,106,108,123,125].



Рисунок 1.1.1 Агрофитоценоз *Lotus corniculatus* L. на опытном поле стационара Лучановский, СибНИИ СХиТ – Филиал СФНЦ РАН (Томская область, г.Томск)

Размножается лядвенец семенами, очень редко вегетативно [76,105,106,124,125].

Lotus corniculatus L. – медонос, является типично перекрестно опыляющимся растением. Пыльцу с одного цветка на другой переносят шмели и культурные пчелы. В литературе приводятся данные о том, что с 1 га лядвенца в нечерноземной зоне РФ пчелы собирают до 135 кг нектара, в котором содержится до 30 кг чистого сахара [47].

Отличительной особенностью лядвенцов среди всех представителей семейства *Fabaceae*, является механизм их опыления, в частности механизм «нагрузки» пыльцы. Как показали наблюдения, насекомые, приземляясь на цветок, опираются на выдающиеся вперед крылья, соединенные совпадающими выступами и углублениями с лодочкой: последняя не открывается при давлении, а пыльца выдавливается как из тюбика, из загнутого кончика лодочки (ее клювика) рис. 1.1.2. В пестичной фазе из отверстия клювика высовывается рыльце [77].

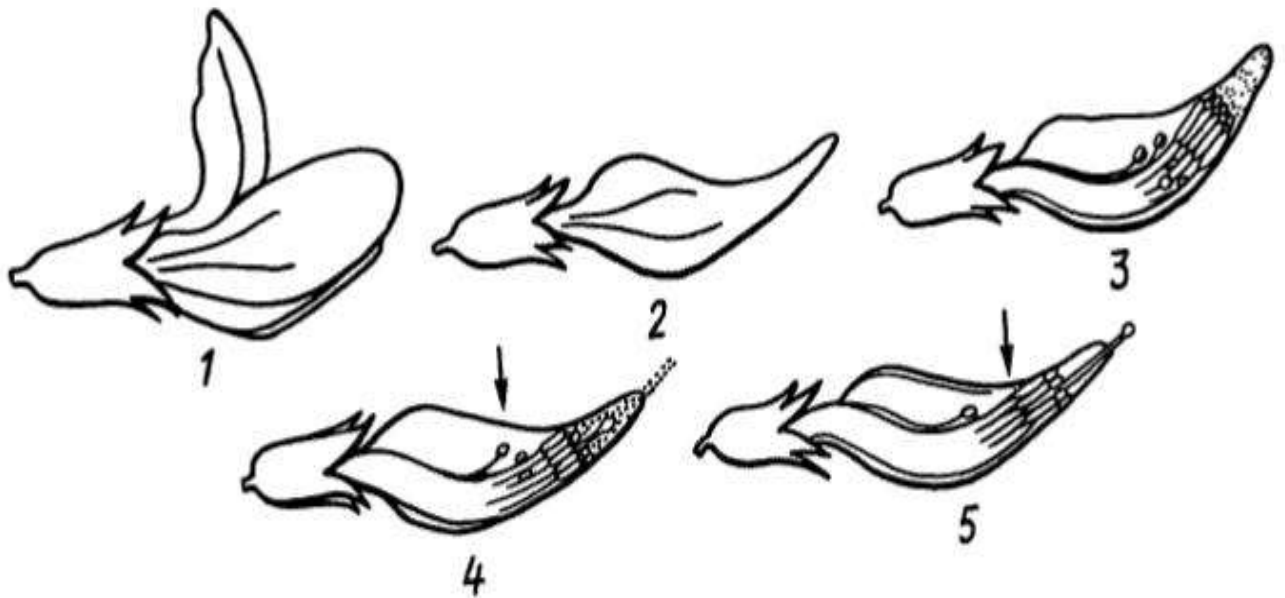


Рисунок 1.1.2 Схема механизма опыления *Lotus corniculatus*: 1 – общий вид цветка, 2 – удалены флаг и крылья, 3 – лодочка в момент вскрытия пыльников и освобождения пыльцы, 4 – выталкивание пыльцы наружу при нажиме сверху, 5 – пестичная фаза цветения

Из разных источников известно, что для *L. corniculatus* естественным ареалом обитания являются лесные и степные районы Кавказа, Европы и Азии, в Америке и Австралии дядвенец является заносным видом (рис.1.1.3) [64,124,127].



Рисунок 1.1.3. Статус *Lotus corniculatus* в Сибири (3, 4 – встречающиеся виды, расселяющиеся и натурализующиеся в настоящее время в нарушенных местообитаниях, способные к возобновлению в местах заноса; схема 1998г).

Восточная граница ареала вида в Северной Азии до сих пор не определены и трактуются учеными по-разному. Например, *L. ucrainicus* в Омской области «выступает» как аборигенный компонент флоры и даже в

региональную Красную книгу занесен со статусом 2 (V) – вид уязвимый с единственным местонахождением в юго-западной части области. В Южном Зауралье вид встречается в одном месте в Курганской области и в двух на юге Тюменской области [10,33,84,85,125].

Первые сообщения о находке *L. corniculatus* на территории Сибири сделаны в Алтайском крае в начале XX в. Е. Роддом и В. Ревердатто. На территории Новосибирской области находка *L. corniculatus* датирована 1947 г, в Республике Алтай учеными заготавливались образцы *L. corniculatus* с середины XX в. (с 1954 г.), на территории Кемеровской области в Усть-Коксинском аймаке известно 6 местонахождений, в основном, расположенных в Кузнецкой котловине, а первые сборы относят к 1972 г. возле села Проскоково [73,112].

В Прибайкалье местонахождения *L. corniculatus* отмечены в Иркутской области, сосредоточиваясь в окрестностях крупных и средних городов и сел [1,45,73].

Все местонахождения *L. corniculatus* для Томской области датируются 1996 г. и относятся к небольшой территории в северной части г.Томска и его ближайших окрестностей [130,131].

Что касается предположений заноса *Lotus corniculatus* в Сибири, то исследователями выдвигаются разные версии. С одной стороны, учитывая, что основные местообитания – это обочины дорог, железнодорожные насыпи и откосы, окраины населенных пунктов, некоторыми исследователями были выдвинуты предположения о том, что данный вид является неофитом, внедрившимся в естественные сообщества. С другой стороны, существуют предположения о том, что первоначально произошел завоз семян для интродукции *Lotus corniculatus*, а уже в дальнейшем поддержание популяций и распространение на освоенных территориях происходило как с помощью семян, так и вегетативным путем.

Некоторые виды рода *Lotus* L., например, *Lotus corniculatus*, *L.tenuis* и *L.pedunculatus* (ранее *L. uliginosus*) приобрели важный агрономический

статус. При этом наиболее широко выращиваемым является *Lotus corniculatus* (*birdsfoot trefoli*). Интересное замечание в одной из публикаций делает Дональд Мас о том, что «*Lotus corniculatus* вырос от незначительного и неприятного сорняка, до значимой кормовой культуры более одного миллиона гектаров» [12]. В мировой культурной практике сельского хозяйства этот вид известен с начала XIX в. и возделывается в различных районах Северной Америки, в нескольких странах Южной Америки, в том числе Бразилии, Аргентине, Чили и Уругвае, на территории всей Европы и части Азии, Индии, Австралии и Новой Зеландии [47].

Культивирование в СССР проводилось на небольших территориальных образованиях в лесной и лесостепной зонах в основном в европейской части России. Селекционные исследования по данному виду проводятся, начиная с 1940-х годов и по настоящее время, районировано 8 сортов. В настоящее время сорта «Луч», «Солнышко», «Фокус», «Смоленский 1», «Дединовский», «Московский 25» возделываются в Калужской, Белгородской, Курганской и других областях [47].

На территории Томской области в 1953 году были предприняты попытки интродукции лядвенца рогатого на Нарымской селекционной станции, для получения генетических линий, однако исследования были остановлены из-за смены политического курса в стране [130].

1.2. Степень химической изученности лядвенца рогатого

По мнению большинства исследователей лядвенец рогатый имеет разнообразный химический состав, который крайне вариабелен от места произрастания. В целом, имеющиеся в литературе сведения по химическому составу лядвенца делятся на исследование дикорастущих видов и культивируемых сортов. Их анализ показывает, что большинство исследователей отмечают содержание в этом виде белков, аминокислот,

фенольных соединений (флавоноидов, изофлавоноидов, фенилпропаноидов, дубильных веществ и т.д.).

Результаты исследований лядвенцов, выполненные еще 1950–1960 гг. показали присутствие флавоноидов, сапонинов и фитогормонов, при этом отдельные ученые предполагали возможность использования вышеуказанных групп в качестве маркеров в хемотаксономии этого рода, а также то, что некоторые из этих групп накапливаются преимущественно в период цветения [105,106, 147,165,183,197].

В некоторых работах встречаются довольно противоречивые сведения о накоплении цианогенных гликозидов. Так, в одних работах приводятся данные о том, что через 7–10 дней после начала цветения, лепестки цветка начинают приобретать насыщенную красно-коричневую окраску, и именно в этот временной отрезок лядвенец активно накапливает цианогенный гликозид, обеспечивающий горьковатый вкус растения. В процессе сушки сырья данный гликозид разрушается вследствие ферментативного гидролиза. Другими исследователями этот факт опровергается, в частности Джонс, Кроуфорд и Клайн утверждают, что проанализировав цвет кия лепестков лядвенца из Англии, Уэльса, Дании, Западной Германии, Нидерландов, Австрии, Франции, Испании и Швеции не выявили связи между цветом лепестков и цианогенезом [170,197].

В одной из работ канадских ученых по изучению химического состава цветочных почек культивируемого лядвенца рогатого, сообщается о выделении и установлении структуры 8-О-метилтрансферазы, влияющей на накопление 8-метоксифлавонолов [169].

Изучение вопроса распределения различных групп БАВ в листьях и стеблях культивируемого лядвенца рогатого на примере флавоноидов и сапонинов показало, что листья содержат этих групп БАВ больше, чем стебли [209].

В исследованиях Бондарь Д. А. и Бондарь А.А. выявлено, что в течение вегетационного периода в траве лядвенца рогатого варьирует содержание

флавоноидов: в фазу вегетации происходило наибольшее накопление таких флавоноидов как гиперозида (0,22%), рутина (0,89%), рабиина (0,35%), в то время как лютеолина накапливается менее 0,1%. Вегетационный период отличается от всех других наибольшим накоплением флавоноидов (1,2%), содержание которых падает и достигает уровней 1,07% и 0,7% в фазы плодоношения и цветения соответственно [14].

Harney P.M. с соавторами в траве культивируемого лядвенца рогатого, собранного в фазу бутонизации, определили концентрации жиров (до 35%), белков (20-33%), клетчатки (до 30%), безазотистых веществ (24%). В этом же исследовании установлено присутствие в траве каротиноидов и аскорбиновой кислоты, а в семенах полисахаридов (фруктоза, галактоза, глюкоза, манноза), флавоноиды, жирные масла до 7% [165].

Еще в 60-х годах прошлого века при изучении диких экотипов лядвенца рогатого был выделен ряд сапонинов [150].

Walterem E.D. из спиртового экстракта выделили олеаноловую кислоту, а также небольшое количество вещества из группы сапонинов, который после гидролиза образовывал соясапогенол β . Эти результаты были подтверждены позднее в 2016 г. учеными из Египта и США. Этим коллективом были выделены и идентифицированы спектроскопическими методами метил-О- β -D- глюкопиранозид, веститол, кемферетрин, афзелин, кемпферол-3-О-(2''-ксилопиранозил) галактопиранозид, соясапонин I и соясапогенол- β -3-О-глюкопиранозид [139].

Также стоит отметить работы ученых из Франции, исследовавших французские дикорастущие виды лядвенца и обнаруживших в них флавоноиды (8-метоксифлавоон, джеральдол, физетин, 5-дезоксикемпферол, сексангулярети, лимонитрин) [168,192].

Рейно Ж. с соавторами обобщили сведения о выделенных и идентифицированных флавоноидах в *Lotus corniculatus* L. в разные годы разными исследователями в листьях, цветках, плодах (табл.1, 2) [193,194].

Таблица 1. Агликоны флавоноидов идентифицированные в *Lotus corniculatus*

№ п/п	Соединение
1	Кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавонон)
2	Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонон)
3	Изорамнетин 3,5,7,3'-тетрагидрокси-4'- метоксифлавонон
4	Дезокси-5-кемпферол (3,7,4' - тригидроксифлавонон)
5	Дезокси-5-кверцетин (фисетин) (3,7,3', 4' - тетрагидроксифлавонон)
6	Дезокси-5-изорамнетин (геральдол)(3,7,3' - тригидрокси-4' - метоксифлавонон)
7	Метокси-8-кемпферол (сексангуларетин)(3,5,7,4' - тетрагидрокси-8-метоксифлавонон)
8	Метокси-8-кверцетин (корникулатузин) 3,5,7,3', 4' - пентагидрокси-8-метоксифлавонон)
9	Метокси-8-изорамнетин (лимоцитрин) (3,5,7,3'тетрагидрокси 8,4'-диметоксифлавонон)
10	Гидрокси-8-кверцетин (госсипетин) (3,5,7,8,3', 4' - гексагидроксифлавонон)

Таблица 2. Флавоноидные гликозиды, идентифицированные в *Lotus corniculatus*

№ п/п	Соединение	
	Монозиды	Биозиды
1	Кемпферол-3-глюкозид	13 Кемпферол-7-диглюкозид
2	Кемпферол-3-рамнозид	14 Кемпферол-3,7-диглюкозид
3	Кемпферол-7-глюкозид	15 Кемпферол-3,7-дирамнозид
4	Кемпферол-7-рамнозид	16 Кемпферол-3-рамнозид-7-глюкозид
5	Кверцетин-3- арабинозид	17 Кемпферол-3-глюкозид-7-рамнозид
6	Кверцетин-3-галактозил	18 Кверцетин-3,7- дирамнозид
7	Кверцетин-3-рамнозид (кверцитрин)	19 Кверцетин -3- глюкозид -7-рамнозид
8	Кверцетин-7-рамнозид	20 Кверцетин -3-рамнозид-7-глюкозид
9	Госсипетин-3-галактозид	21 Сексангуларетин-3-рамнозид -7-глюкозид
10	Корникулятозин-3-галактозид	22 Кверцетин-3,7-рамноглюкозид
11	Корникулятозин -3-глюкозид	
12	Сексангуларетин -3-глюкозид	

В целом, большинство авторов отмечают, что *Lotus corniculatus* отличается большим разнообразием флавонолгликозидов, но особенно богат этот вид 5-дезоксифлавонолами, характерными в целом для полифенольного профиля семейства *Fabaceae* [54].

В конце 90-х годов прошлого века украинскими учеными проведено фитохимическое исследование травы *Lotus corniculatus*. Авторами было установлено содержание в траве лядвенца рогатого фенольных соединений, витаминов, пигментов, фосфолипидов и фитостероидов, жирных кислот и в том числе установлена структура индивидуальных веществ вышеуказанных групп БАВ. В семенах эти же авторы обнаружили галактозу, маннозу, глюкозу, фруктозу [54].

Современные методы анализа ВЭЖХ, ЯМР- и масс-спектрометрия позволили итальянским ученым установить присутствие в *n*-бутанольном и хлороформном экстрактах лядвенца рогатого *p*-кумаровой и бензойной кислот; трансиллина и выделенного впервые из данного вида лядвенца изосалицина. Несколько веществ, относящихся к сапонидам, впервые выделены из рода *Lotus* L. трансиллин, фарбитозид А, соясапонин I, дегидросоясапонин I, медикарпин-3-О- β -D-глюкопиранозид [198].

Хроматографическими и спектральными методами исследователи из Пакистана установили значительные различия в составе групп БАВ отдельных частей и органов дикорастущего лядвенца. Методом атомно-абсорбционного анализа установлено присутствие в лядвенце Zn, Cu, Pb, Ni, Mn, Cr, Fe, Na, Ca, K. Наиболее высокие концентрации на уровне 248,8 мг/кг отмечены авторами для Mn. Установленные концентрации меди, железа, никеля, цинка, свинца, кальция, хрома, натрия и калия авторы считают средними и низкими [199].

При изучении элементного состава культивируемого в Пинском районе Брестской области лядвенца рогатого сорта Московский 287 отмечено содержание Ca на уровне 1%; Mg – 0,3-0,5 %; P – 0,5-0,7%; K – 0,8-1,0 % [108, 123].

Обобщенные сведения о химическом составе лядвенца рогатого по данным литературы приведены в таблице 3.

Таблица 3. Химический состав *Lotus corniculatus* L. (по данным литературы)

Вещества	<i>Lotus corniculatus</i> L.			Литература
	дикорастущий	Культивируемый		
		сорт Московский 287, São Gabriel	сорт Солнышко	
<i>Жирные кислоты</i>				
миристиновая и др	+	-/-	-	54
<i>Фитостероиды и гормоноподобные вещества</i>				
β-ситостерин	+	+	-	54
фитогормоны	+	-/-	-	54
<i>Азотсодержащие соединения</i>				
алкалоиды	-	-/+	-	199
белки	+++	+++/-	+++	54,101, 108,115, 123
аминокислоты	+++	+/-	++	54, 108, 115, 123
лектин	+	-/-	-	188
<i>Сапонины</i>				
соясапогенол В и др	+	-/+	-	139,150, 198
<i>Ферменты</i>				
8-метилтрансфераза	+	-/-	-	169
<i>Полисахариды, фенольные соединения</i>				
флавоноиды	+	-/+	-	14,54,105, 106,139, 165, 168, 183, 192, 194, 197
изофлавоноиды	+	-/-	-	54
фенолкарбоновые кислоты	+	-/+	-	54,105, 106,197
полисахариды	+	-/-	-	54
антраценпроизводные	+	-/+	-	54
кумарины	+	-/+	-	54
проантоцианидины	+	-/-	-	54,105, 106,197
дубильные вещества	+	-/+	-	54,105, 106,197
<i>Витамины</i>				

каротиноиды	+	-/-	-	54, 165
кальциферол (витамин D)	+	-/-	-	54, 115
токоферол (витамин E)	+	-/-	-	54, 115
итамины группы B	+	-/-	-	54, 115
аскорбиновая кислота	++	-/-	-	54, 115, 165
<i>Минеральный состав (макро – и микроэлементы)</i>				
Cu	+	-/+	-	170,199
Pb	+	-/+	-	170,199
Ni	+	-/+	-	170,199
Zn	+	-/+	-	170,199
Fe	+	-/+	-	170,199
Mn	-	+/-	-	108,123
Na	+	-/+	-	170,199
K	+	+/+	-	108,123, 170,199
Ca	+	+/+	-	108,123, 170, 199
Cr	+	-/+	-	170,199
P	-	+/-	-	108,123

Примечание: «+» - вещество присутствует, «-» - сведения отсутствуют.

Таким образом, данные литературы показывают, что, несмотря на имеющуюся информацию о химическом составе лядвенца рогатого и видов рода лядвенец в целом, в ряде случаев она носит фрагментарный или неполный характер, что является основанием для проведения дальнейших исследований.

1.3. Сведения об изученности биологической активности лядвенца рогатого

В конце 90-х годов прошлого века на кафедре фармакогнозии Украинской фармацевтической академии было проведено исследование травы лядвенца рогатого. Одним из результатов работы стала разработанная комплексная технология получения сухого экстракта «Локрин» и липофильного экстракта «Лотус». Проведенные исследования показали, что таблетки «Локрин» имеют выраженную противовоспалительную, антигипоксическую и диуретическую активность [54,158].

Severino L. совместно с группой исследователей оценили антипролиферативную активность бутанольного и хлороформного экстрактов лядвенца на трех линиях культур клеток мышей и человека (J774A1, WENI-164, НЕК-293). Исследователями было установлено, что умеренную цитотоксическую активность проявляет только бутанольный экстракт. Также в этом исследовании получены весьма значимые результаты антипролиферативной активности индивидуальных веществ - сапонинов (фарбитозида А, соясапонины I и дегидросоясапонины I), при этом фарбитозид А проявил самую высокую активность. Ученые предположили, что увеличение количества углеводов в молекуле приводит к снижению цитотоксической активности [138].

Koelzer J. с коллегами определили наличие противовоспалительного действия суммарного экстракта, некоторых фракций и индивидуальных веществ посредством разных механизмов [173].

Учеными из Пакистана изучена антибактериальная активность водно-спиртового экстракта против основных возбудителей инфекционных заболеваний ВДП и ЖКТ. Экстракт эффективно ингибировал золотистый стафилококк на уровне препарата сравнения (налидиксовая кислота); кишечную палочку, сальмонеллу тифи, пневмонийную клебсиеллу, аспергилла желтого и черного на уровне флуконазола [199].

Учеными из Ирана проведена сравнительная оценка влияния водно-спиртовых экстрактов лядвенца рогатого разной концентрации (10%, 20%, 40%), 1% крема фенитоина и их сочетанного влияния на противовоспалительные, противомикробные и ранозаживляющие свойства на покровные ткани кожи крыс-самцов. Только в двух опытных группах при совместном использовании крема и 40% экстракта установлен средний уровень восстановления раневой области. Достоверность результатов подтверждена морфометрически и гистологически [143].

Также представляют интерес работы Новозеландских ученых, изучавших дубильные вещества лядвенца. Авторами был сделан вывод о

том, что при использовании их в дозе 100 мкг/мл⁻¹ они эффективно ингибируют от 10 до 37% личинок *Trichostrongylus colubriformis*.

В другом исследовании ученых из Новой Зеландии рассматривалась роль дубильных веществ лядвенца рогатого в составе кормов в повышении репродуктивной функции овцематок. Результаты эксперимента позволили сделать заключение о том, что объект изучения в составе кормов способствует повышению репродуктивной способности овцематок во время брачного сезона [189-191].

В недавно опубликованной работе Barbara Fumić с соавторами сообщается о получении обогащенного флавоноидами экстракта из *Lotus corniculatus* на основе циклодекстрина, обладающего потенциалом в качестве субстратной восстановительной терапии при мукополисахаридозе III типа (MPS III), редкого аутосомно-рецессивного лизосомального нарушения. Потенциал экстракта для модуляции накопления гликосоаминогликанов (GAG) оценивали на фибробластах, полученных от пациентов, страдающих MPS III типа. Лиофилизированный экстракт в концентрации 3 и 6 мкг/мл снижал уровень GAG в фибробластах кожи на 33,97 и 50,08% соответственно, без каких-либо токсических эффектов в использованных дозах, что свидетельствует о возможности рассматривать его как часть субстратной восстановительной терапии при MPS III [155,156].

Еще одним заслуживающим, на наш взгляд, внимания стало исследование, проведенное в Индии. В результате изучения состава БАВ семян дикорастущего лядвенца рогатого учеными выделен лектин, который в эксперименте проявил выраженную антипролиферативную активность в перспективных концентрациях по отношению к раковым клеткам [188].

В другой, недавно опубликованной статье сообщается, что *Lotus corniculatus* L. включен в перспективный список растений семейства *Fabaceae*, богатых фитоконституентами, которые делают их эффективными лечебными средствами при различных заболеваниях. Конституционные соединения присутствующие в данных растениях проявляют

синергетический эффект, который выше отдельных соединений, в частности имеют высокий противоопухолевый потенциал для лечения рака [157].

Таким образом, лядвенец рогатый – представитель рода лядвенец, обладающий перспективными видами активности в отношении социально значимых заболеваний человека.

1.4. Сведения о применении лядвенца рогатого в народной медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, парфюмерно-косметической промышленности

Лядвенец рогатый широко используется в зарубежной и отечественной народной медицине, так, например, первые упоминания о терапевтических свойствах травы встречается в британском фольклоре на рубеже XV века. Согласно приводимым в летописях данным, лядвенец – одно из растений, которое должно входить в «веноч душистый» из бутонов летних, который положено держать в жилище, для «оздоровления» воздуха [69]. Жители Кавказа применяли еще в XII веке настои из листьев лядвенца при бешенстве у домашних животных; для лечения эндопаразитов [14].

Современная народная медицина использует лядвенец в виде настоев, компрессов и отваров как противовоспалительное, смягчительное, отхаркивающее, болеутоляющее, жаропонижающее, успокаивающее, общеукрепляющее и тонизирующее средство, вяжущее, ветрогонное, жаропонижающее, гипогликемическое, глистогонное, местное противовоспалительное средство. У кормящих женщин используют в качестве лактогонного средства. Припарки в качестве смягчительного прикладывают для снятия боли и отечности к ушибам и уплотнениям. Настой из цветков используют в качестве успокаивающего средства при переутомлении, головных болях, бессоннице; в качестве общеукрепляющего и тонизирующего средства в фазе выздоровления [47, 68, 120, 132, 133, 186].

У животных можно использовать для лечения паразитарных инфекций [92, 175, 196].

Как уже выше сообщалось, лядвенец рогатый имеет высокую агрономическую ценность, признанную как отечественными, так и зарубежными специалистами в области сельского хозяйства, являясь одним из основных источников высокобелковых кормовых культур для сельскохозяйственных животных, наряду с клевером и люцерной. Особое преимущество лядвенца среди других бобовых культур, заключается в высокой поедаемости всеми видами животных и усваиваемости травы в виде корма (до 80%). Отсутствие вызываемой тимпании у животных, в сочетании с высоким содержанием аскорбиновой кислоты позволяет выращивать молодых здоровых особей разных видов птиц и животных [108,123,153,189, 201].

Писковацкая Р. Г. сообщает о том, что лядвенец рогатый отличается высокой общей и протеиновой питательностью, хорошим соотношением аминокислот, обеспеченностью минеральными веществами и витаминами, устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, болезням и рядом других полезных свойств [98-101].

Другим преимуществом *Lotus corniculatus* L. перед прочими представителями семейства *Fabaceae* является то, что это многолетник, который в травостое при сенокосном использовании сохраняется до 10-12 лет, кроме того, оно устойчиво к вытаптыванию животными, и подходит для залуживания территорий. По данным литературы лядвенец обладает высокой биологической пластичностью к разным экологическим условиям, являясь ветровыносливым, зимостойким, способным длительно выдерживать засуху и затопления до 45 дней, а надземная часть растения не теряет тургор при температурах свыше +25⁰С. По мнению некоторых исследователей, это единственный представитель семейства *Fabaceae*, который может произрастать на слабо кислых и кислых почвах (рН от 4.1), являясь в то же время мощным почвовостанавливающим и противозерозионным компонентом, что является чрезвычайно актуальным для сибирского региона [76,105,106,124,125].

Аналогичную высокую оценку заслужил лядвенец и от специалистов научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. Вильямса. По их мнению, «лядвенец это бобовый компонент с ценными биолого-хозяйственными признаками и высоким биологическим потенциалом произрастания в широком диапазоне на различных землях, в том числе на мало окультуренных» [121,122].

Проведенная Новоселовым М.Ю. с соавторами оценка биолого-хозяйственных признаков селекционных линий *Lotus corniculatus* L. привела к выводу о том, что лядвенец может составить достойную конкуренцию по хозяйственно-биологическим характеристикам традиционно распространенным культурам, таким как клевер и люцерна [88].

Перспективность лядвенца рогатого подтверждена его практическим использованием в парфюмерно-косметической промышленности. Так, фирмы L'Observatoire des cosmétiques, Termium plus, Get good guide, Parchem и Cosmetics & Toiletries производят экстракт цветков лядвенца, который в свою очередь используют в рецептуре ряд зарубежных производителей: TianDe (тонирующая маска), Clarins (масло косметическое для лица), Eclipse solar (крем для глаз), Jane Iredale (бальзам для губ,), Jojona (масло, лосьон, крем, маска для глаз и губ), Maternatura (крем), Phyt's (лосьон для кожи).

Выводы к Главе 1

Таким образом, анализ данных литературы о систематическом положении, распространении, возможностях культивирования, использовании на сегодняшний день в растениеводстве, почвовосстановлении, противоэрозионных мероприятиях, кормопроизводстве, народной медицине, ветеринарии, парфюмерно-косметической промышленности, химическом составе и возможностях использования в медицине надземной части лядвенца рогатого демонстрируют перспективность дальнейшего

исследования данного растения в качестве источника ценных биологически активных комплексов, на основе которых можно разрабатывать оригинальные лечебные и профилактические препараты с широким спектром фармакологического действия, в том числе в отношении социально значимых заболеваний человека.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объекта

В качестве объектов исследования в данной работе была выбрана надземная часть лядвенца рогатого сорт «Солнышко», с 2014г. впервые интродуцированного в условиях Томской области в Томском районе, в настоящее время на единственном в регионе Лучановском экспериментальном опытном поле общей площадью 2430 га Богашевского отделения СибНИИ СХиТ СО РАН, на экспериментальном участке 1га. Сорт выведен с участием диких родительских линий. Оригинаторы сорта - ГУ зональный НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого и ГНУ Калужский НИПТИ АПК. Сорт включен в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации 1999 г.

Данный сорт относится к многолетним, ранне-спелым сортам. Кустистость культуры высокая от 7 до 12 стеблей в сплошных посевах, 15 – 70 в загущенных посевах. Куст чаще развалистый с высокой равномерной облиственностью 46,4 – 57,9 %. Для изучаемого сорта описаны мягкие, тонкие стебли, высотой 41 – 50 см в первом укосе и 26–46 см во втором укосе, зеленые без опушения. Листья продолговато-яйцевидные и ланцетные, без опушения, мягкие, насыщенно ярко-зеленого цвета, без воскового налета. Прилистники ярко – зеленые яйцевидные, без опушения, с абаксиальной стороны матовые. Многосемянной боб имеет от 11 до 20 мелких семян. Количество твердых семян от 16,3 до 41,7%. Масса семян от 1,05 до 1,2 г. Корневая система мощная с ярко выраженным главным корнем. Данный сорт проявляет высокую кислотно – и алюмоустойчивость, на кислых почвах рН 4,4 и содержание $Al_3 + 16,2$ мг/ 100 г почвы.

Сорт обладает высокой зимостойкостью 88–100%, он получил допуск к использованию по 12 регионам и 7 световым зонам [25, 121].

Сбор материала для разных видов исследования (химическое, анатомо-морфологическое, исследование динамики накопления БАВ) осуществляли с

2014 по 2019 года в разные фенофазы онтогенеза растения: в фазу бутонизации, бутонизации – начала цветения, цветения – созревания плодов. Собранное сырье сушили до воздушно-сухого состояния, упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации [23, 24].

2.2. Методы исследования

2.2.1 Получение экстрактов, извлечений, суммарных комплексов и фракций

Получение извлечений, экстрактов для проведения анализа качественного состава БАВ лядвенца рогатого осуществляли с помощью классических фитохимических и общепринятых фармакопейных методов анализа [19, 20, 23, 24, 35, 53, 61].

Получение экстрактов и фракций для последующего химического исследования, в том числе структурного анализа индивидуальных веществ применяли классические общепринятые методы, широко описанные в литературе [19, 20, 21, 23, 24, 35, 53, 61].

Полученные экстракты сгущали с помощью роторного испарителя ИР-1МЗ производства ОАО «Химлабприбор» (Россия), их высушивание проводили методом конвекционной сушки при температуре не выше 45°C.

Разделение на фракции проводили жидкостно-жидкостной избирательной экстракцией растворителями лиотропного ряда с изменением градиента полярности (гексан→хлороформ→этилацетат→н-бутанол→вода).

2.2.2 Определение экстрактивных веществ, влажности сырья, золы и примесей

Определение указанных числовых показателей проводили по ОФС и ФС Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания [24].

2.2.3 Качественное обнаружение и количественное определение БАВ

Обнаружение и определение БАВ, изученных в данном диссертационном исследовании проводили по методикам, включенным в ГФ

XIV издания, приведенным в монографиях, научных статьях по вышеуказанным группам БАВ [3,7-9, 15,19, 24, 35,53, 61,72,129,179].

2.2.3.1 Хроматографическое и спектральное исследование

Для хроматографического исследования флавоноидов и фенолоксилов, содержащихся в лядвенце рогатом использовали извлечения, полученные из сырья водно-этанольными смесями разных концентраций (40%, 70%, 96%). 10 мл полученного извлечения сгущали до объема около 2 мл, и наносили на хроматограммы микропипеткой в объеме 1-2 мкл. Обнаружение веществ на ТСХ и бумажных хроматограммах проводили с помощью денситометра «Сорбфилл» производства ЗАО Сорбполимер (Российская Федерация) при длинах волн 365 и 254 нм. Расчетные значения R_f анализируемых веществ являются средними величинами пяти измерений.

Хроматограммы обрабатывали общепринятыми для разных групп БАВ реактивами: 1% спиртовым $AlCl_3$, 5% спиртовым $NaOH$, борно-лимонным реактивом Вильсона, NH_3 , 3% $FeCl_3$, $[Ag(NH_3)_2]OH$, $C_6H_7NO_3S^+ C_{10}H_8O$, J_2 , $C_{14}H_{13}NO_4 + C_4H_9OH$, 5%, 20% $CaCO_3$, 25% спиртовой $H_3O_4PW_{12}xH_2O$, 0,5% $C_{10}H_{14}O$ в H_2SO_4 конц, 0,2% раствором $C_9H_6O_4$ в $CH_3-C(O)-CH_3$ и 0,3% раствором $C_9H_6O_4$ в C_4H_9OH , содержащий уксусную кислоту.

Двумерную и одномерную бумажную хроматографию проводили с использованием бумаги FN-6 и FN-12 (Germany).

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинах с силикагелем Merck KGaA (Germany) Kieselgel 60 F_{254} и «Сорбфилл» пластинки аналитические ПТСХ-АФ-А/ПТСХ-АФ-А-УФ производства ЗАО Сорбполимер (Российская Федерация).

Для хроматографического исследования различных групп БАВ использовали общепринятые [3, 6-9, 36, 52, 53, 59, 65, 103, 200] в фитохимическом анализе системы:

- для кумаринов: $CH_3COOH:H_2O$ (60:40); C_6H_{14} : EtOAc (70:30); C_6H_{14} : C_3H_6O (50:50); C_6H_{14} : C_3H_6O : CH_3COOH (33:65:2);

- для флавоноидов и изофлавоноидов: $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1:2; 4:1:5); 5% раствор Na_2CO_3 ; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (15:1; 93:7; 90:3; 95:5; 90:13; 90:15); $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (15:85; 30:70; 60:40); $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:10:50);
- для фенолкарбоновых кислот: 3%, 15% и 30% CH_3COOH ; $\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$ (65:20:15);
- для сапонинов: $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{C}_3\text{H}_5\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (19:80:1); $\text{CHCl}_3:\text{C}_3\text{H}_5\text{O}$ (70:30); $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (94:5,5:0,5);
- для углеводов: $n\text{-BuOH}:\text{C}_2\text{H}_5\text{N}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4:3); $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1:2);
- для аминокислот: $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (60:15:25); $n\text{-BuOH}:\text{C}_2\text{H}_5\text{N}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4:3).

Колоночная хроматография. Использовали силикагель колоночный марки «КСК» (0,1мкм), полиамид СС 6 (0,05-0,16мм). Для элюирования веществ использовали воду, спирт, хлороформно-спиртовые и водно-спиртовые смеси. Процесс элюирования контролировали восходящей хроматографией на бумаге «FN-6» и «FN-12», методом ТСХ на пластинках «Kieselgel 60 F₂₅₄» и «Сорбфил», используя соответствующие системы растворителей, а также качественными реакциями на соответствующие группы БАВ. Очистка индивидуальных веществ проведена с использованием рехроматографии на ТСХ пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ и «Сорбфил».

Структуру выделенных веществ устанавливали химическими, физико-химическими методами, и сравнением с известными веществами (веществами сравнения). В качестве веществ сравнения использовали: кверцетин-3-β-D-глюкозид 17793, Sigma-Aldrich; феруловая кислота Y0001013, Sigma-Aldrich; галловая кислота PHL89198, Supelco; кофейная кислота C0625, Sigma-Aldrich; п-кумаровая кислота C9008, Sigma-Aldrich; хлорогеновая кислота Y0000569, Sigma-Aldrich; неохлорошеновая кислота 94419, Sigma-Aldrich; формонетин 47752, Sigma-Aldrich, ононин 75375, Sigma-Aldrich, генистеин 92136, Supelco, биоханин А 92142, Supelco; эскулетин Y0001611, Sigma-Aldrich, умбеллиферон 54826, Supelco,

скополетин 38332 Supelco; астрагалин 68437, Supelco; популнин 18854, Sigma-Aldrich; кемпферол-3-O-D-галактозид, SMB00192, Sigma-Aldrich; изокверцитрин 00140585, Supelco; кверцитрин 00740580, Supelco; кверцетин 3-галактозид, 83388, Sigma-Aldrich; D-(+)-глюкоза 47829, Supelco; D-(+)-галактоза G0050000, Sigma-Aldrich; L- рамноза W373011, Sigma-Aldrich.

Спектральные методы. Электронные спектры снимали на спектрофотометре СФ-2000 производства ОКБ «Спектр» (Российская Федерация) в кюветах из кварцевого стекла. Для установления структуры веществ дополнительно применяли реактивы [8, 53, 176, 179, 203].

ИК–спектры снимали на спектрофотометре «Specord UR-20» фирмы Analytik Jena (Germany) в таблетках *KBr* высотой 1 мм, соотношении вещества и наполнителя 1: 400.

Температуру плавления индивидуальных веществ определяли в запаянных капиллярах на аппарате Koffler (Germany).

Углы вращения получали на поляриметре ADP 430 производства «Bellingham+Stanley» (United Kindom) при 546нм с пересчетом для 589,3нм.

Кислотный, в том числе количественный гидролиз, ферментативный гидролиз гликозидов флавоноидов, омыление метилового эфира кофейной кислоты, деструкцию кумаринов йодоводородной кислотой проводили по известным, описанным в литературе методикам [6, 8, 13, 20, 53, 61, 72].

Кислотный гидролиз флавоноидных гликозидов осуществляли путем растворения 10-20 мг вещества в 10 мл 10% раствора серной кислоты, кипячением на водяной бане до 6 ч с контролем хода гидролиза методом БХ. После охлаждения агликоны извлекают диэтиловым эфиром, образовавшийся при этом остаток растворяют в спирте. Водный кислый гидролизат нейтрализуют бария карбонатом, а выпавший при этом осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают, а остаток растворяют в 0,5 мл 95% спирта. Углеводы анализируют хроматографией на бумаге с сравнением с известными веществами в системах растворителей и проявителями, указанными выше.

Количественный кислотный гидролиз флавоноидных О-гликозидов.

в 1,5-3 мл метилового спирта растворяют 15 мг вещества и добавляют 2 мл 10% р-ра HCl, кипятят два часа, проверяя полноту гидролиза методом ТСХ в системах вода-метанол 1:2; хлороформ-метанол 7:3 и 9:1; методом БХ в системах БУВ 4:1:5; этанол-уксусная кислота-вода 5:10:75 и 4:5:16. После охлаждения гидролизат профильтровывали, полученный остаток промывали очищенной водой, высушивали и взвешивали.

Характер гликозидной связи флавоноидов устанавливали путем проведения ферментативного гидролиза β -гидролазами из гриба *Aspergillus oryzae*. Для этого 10-15 мг в-ва суспендировали в 2мл воды очищенной и добавляли суспензию фермента (из расчета 1г на 10 мл воды). Раствор перемешивали, и помещали в термостат при $T=37^{\circ}\text{C}$ на 24 часа. По истечении времени фермент дезактивировали кипячением в течение 10 мин. Полученный р-р фильтровали, упаривали, остаток углеводов растворяли в этом же растворителе и исследовали хроматографически.

ВЭЖ-хромато-масс-спектрометрия проведена на хроматографе «Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD» фирмы «Agilent Technologies» (USA), оснащенный двумя детекторами - УФ диодно-матричным «G 1315В», и масс-селективным «G1946С», регистрирующем в режиме АРСІ.

ВЭЖХ- анализ проведен на хроматографе «Миллихром-А-02» производства ЗАО Институт хроматографии «Эконова», обработка результатов проведена с использованием пакета программ «МультиХром–СПЕКТР». Неподвижной фазой является колонка «ProntoSIL 120-5-C18 AQ» 80303. В качестве подвижной фазы использована 4М LiClO₄ в 0,1М HClO₄:H₂O (5:95) (100 мкл/мин, 40⁰С, 2,0 МРа, 115 мин).

Количественное определение изофлавоноидов. За основу при оценке и разработке методики количественного содержания суммы изофлавоноидов взята методика количественного определения изофлавоноидов, разработанная в СибГМУ для климатического сбора [103].

Определение химических элементов проводили в золе надземной части лядвенца нейтронно-активационным методом и методом пламенной фотометрии, с использованием стандартных веществ [55,118]. Получение золы проводили по методике ГФ РФ [24]. Нейтронно-активационный метод проведен в анализаторной системе «CANBERRA» производства Mirion Technologies (Australia) с детектором из германия «GX-3518». Контрольные замеры изотопов проводили через 7-9 и 25 суток. Для определения натрия и калия использовали метод пламенной фотометрии, реализованный на атомно-абсорбционном двухлучевом приборе «Thermo Solaar M5 MkII» производства «Thermo Electron» (USA).

2.3 Методы макро- и микроскопического исследования

Семенной материал лядвенца рогатого сорт «Солнышко» приобретен в 2013 году в ООО «ЗауралСемена» (г. Курган), и имел следующие биолого – хозяйственные показатели: репродукция семян – R-2, полевая всхожесть 63%, энергия прорастания 66%, масса 1000 семян – 1,08 г.

Подлинность объекта диссертационного исследования проводили с использованием ключей-определителей.

Внешние признаки листьев, стеблей, цветков, плодов лядвенца рогатого изучали под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (с разным увеличением от 8x1 до 32x4) по методикам, описанным в соответствующей ОФС «Травы» ГФ XIV [24].

Приготовление микропрепаратов и их анализ выявленных признаков проводили по ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» и ОФС «Травы» ГФ XIV [24].

Всего было изготовлено около 120 препаратов, которые изучали под световым микроскопом Carl Zeiss, фотографии макро- и микропрепаратов получали с помощью цифрового фотоаппарата «Canon», «Olympus». Все

образцы изучали в 5-ти кратной повторности. Полученные фотографии обрабатывали на компьютере в программе «Adobe Photoshop CS».

Присутствие биологически активных веществ подтверждали стандартными микрохимическими реакциями (антоцианы с 10 % р-ром гидроксида натрия; дубильные вещества с железа (III) хлоридом).

2.4. Статистические методы обработки результатов исследования

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методике ОФС ГФ XIV и с использованием программы «Statistica for Windows 7,0» [24].

ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО КУЛЬТИВИРУЕМОГО

В обзоре литературы нами было показано, что в исследованиях, посвященных изучению химического состава видов рода лядвенец авторы сообщают об обнаружении различных групп БАВ. При этом некоторые авторы высказывают мнение о том, что фенольный и сапониновый профиль лядвенцов можно использовать для хемотаксономических исследований. Кроме того, исследователи отмечают «крайний полиморфизм лядвенцов», с которым связана вариабельность не только анатомо-морфологических признаков, но и химического состава в зависимости от экологических условий – региона произрастания, местообитания, мероприятий, сопровождающих процесс культивирования и др. В связи с этим нами был изучен химический состав травы лядвенца рогатого культивируемого в Томской области, в том числе для определения группы БАВ для последующей стандартизации сырья и разработке проектов нормативных документов.

3.1. Качественный состав и количественное содержание БАВ травы лядвенца рогатого культивируемого

Данные о качественном составе и содержании БАВ в дикорастущих и культивируемых видах и сортах лядвенца рогатого в отдельных случаях противоречивы, а в случае с впервые культивируемым на территории Томской области сортом лядвенца требует его детального изучения. С этой целью нами, с помощью общепринятых в фитохимическом анализе методов, исследован качественный состав и количественное содержание БАВ травы лядвенца рогатого культивируемого.

Для качественного обнаружения кумаринов использовали традиционные хроматографические методы (БХ, ТСХ), реакцию с диазотированной сульфаниловой кислотой и лактонную пробу [20, 52, 60, 65,

32]; флавоноидов – традиционные для этой группы БХ и ТСХ, качественные реакции (цианидиновая проба, с раствором свинца ацетата основного и с алюминия (III) хлоридом) [8, 9,20, 50, 53, 61, 67,72, 32, 119]; хлорофилла - ТСХ [128]; сапонинов – хроматографию в тонком слое, реакцию пенообразования, с раствором ацетата свинца, раствором натрия нитрата [32, 67]; изофлавоноидов - БХ и ТСХ [103, 203]; сердечных гликозидов – реакцию Келлер-Килиани, р-цию Либермана-Бурхарда, р-цию Легаля [110, 31]; фенолокислот – БХ иТСХ [7, 66]; эфирного масла – по результатам микрохимических реакций с микропрепаратами (с Суданом III) [24,37,67]; дубильных веществ – реакцию с раствором $FeCl_3$, с раствором $Pb(CH_3COO)_2$, с бромной водой [32, 67]; алкалоидов – реакции с общеосадительными реактивами [19, 32]; каротиноидов - хроматографию в тонком слое сорбента [21, 24, 35]; антраценпроизводных – реакцию Борнтрегера, реакцию микровозгонки (сублимации) [32]; полисахаридов - хроматографию на бумаге, реакции водного извлечения с 96% спиртом [24, 36, 78]; аминокислот - хроматографию в тонком слое сорбента, реакцию с нингидрином [128]; аскорбиновой кислоты - хроматографию в тонком слое сорбента, реакцию Тильманса [24, 35, 32]; витамина К - хроматографию в тонком слое сорбента [24,35]; фосфолипидов – БХ и ТСХ [128].

Образцы сырья для фитохимического исследования отбирали, начиная с первого года по третий год вегетации в 2015-2017 гг. Результаты, представленные в таблице 4 представляют собой средние значения за три года наблюдения, и демонстрируют присутствие разных групп БАВ. В нашем исследовании в траве лядвенца не были обнаружены сердечные гликозиды и эфирное масло.

Таблица 4. Биологически активные вещества лядвенца рогатого культивируемого в Томской области

Группа БАВ	Наличие / отсутствие	Содержание, % на абс.-сух. сырье	Метод (методика) количественного определения
Кумарины	+	0,18±0,015	сумму кумаринов в пересчете на кумарин определяли спектрофотометрическим методом [81]
флавоноиды	+++	0,77±0,06	спектрофотометрическим методом по ФС «Зверобоя трава» [23]
изофлавоноиды	+++	0,78±0,06	сумму изофлавоноидов в пересчете на ононин определяли спектрофотометрическим методом по методике, разработанной для климактерического сбора [103]
фенолкарбоновые кислоты	+++	1,13±0,11	экстракционно-спектрофотометрическим методом [58]
дубильные вещества	+++	0,53±0,05	перманганатометрическим методом по ОФС ГФ XIV [23]
эфирное масло	-	не определяли	-
Сапонины	++	0,36±0,02	сумму сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту определяли спектрофотометрическим методом [21]
алкалоиды	+	0,042±0,003	сумму алкалоидов определяли титриметрическим методом [23]
сердечные гликозиды	-	не определяли	-
Антраценпроизводные	+	не определяли	-
полисахариды	+++	12,30±1,1	сумму полисахаридов в пересчет на глюкозу определяли гравиметрическим методом по ФС «Подорожника листья» ГФ XIV [23]

алифатические кислоты	+	не определяли	-
Аминокислоты	++	0,45±0,03	сумму свободных аминокислот определяли спектрофотометрическим методом в пересчете на аланин[23]
аскорбиновая кислота	+	0,070±0,06	содержание аскорбиновой кислоты определяли спектрофотометрическим методом с использованием СО аскорбиновой кислоты [36]
витамин К	+	не определяли	-
Каротиноиды	+	0,18±0,01	каротиноиды в пересчете на β-каротин определяли спектрофотометрическим методом [40]
хлорофилл	+	0,45±0,04	содержание хлорофилла в пересчете на хлорофилл β определяли спектрофотометрическим методом [16, 17, 57]
Фосфолипиды	+	не определяли	-

Примечание: «+, ++, +++» – присутствует; «-» – не обнаружено.

3.2. Получение и фракционирование экстракта

Получение, фракционирование экстракта и извлечение индивидуальных соединений из травы лядвенца рогатого проводили методом исчерпывающей этанольно-водной экстракции по схеме на рис. 3.2.1. Около 100,0 г измельченного сырья (1-3мм) подвергали трехкратной экстракции 40, 70 и 95% этиловым спиртом в течение 1 ч на водяной бане при температуре не выше 80°C. После фильтрации горячего извлечения, экстрагент удаляли

этанол до водного остатка, осадок отфильтровывали, надосадочную жидкость последовательно обрабатывали в делительной воронке хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом, с последующим удалением растворителей под вакуумом.

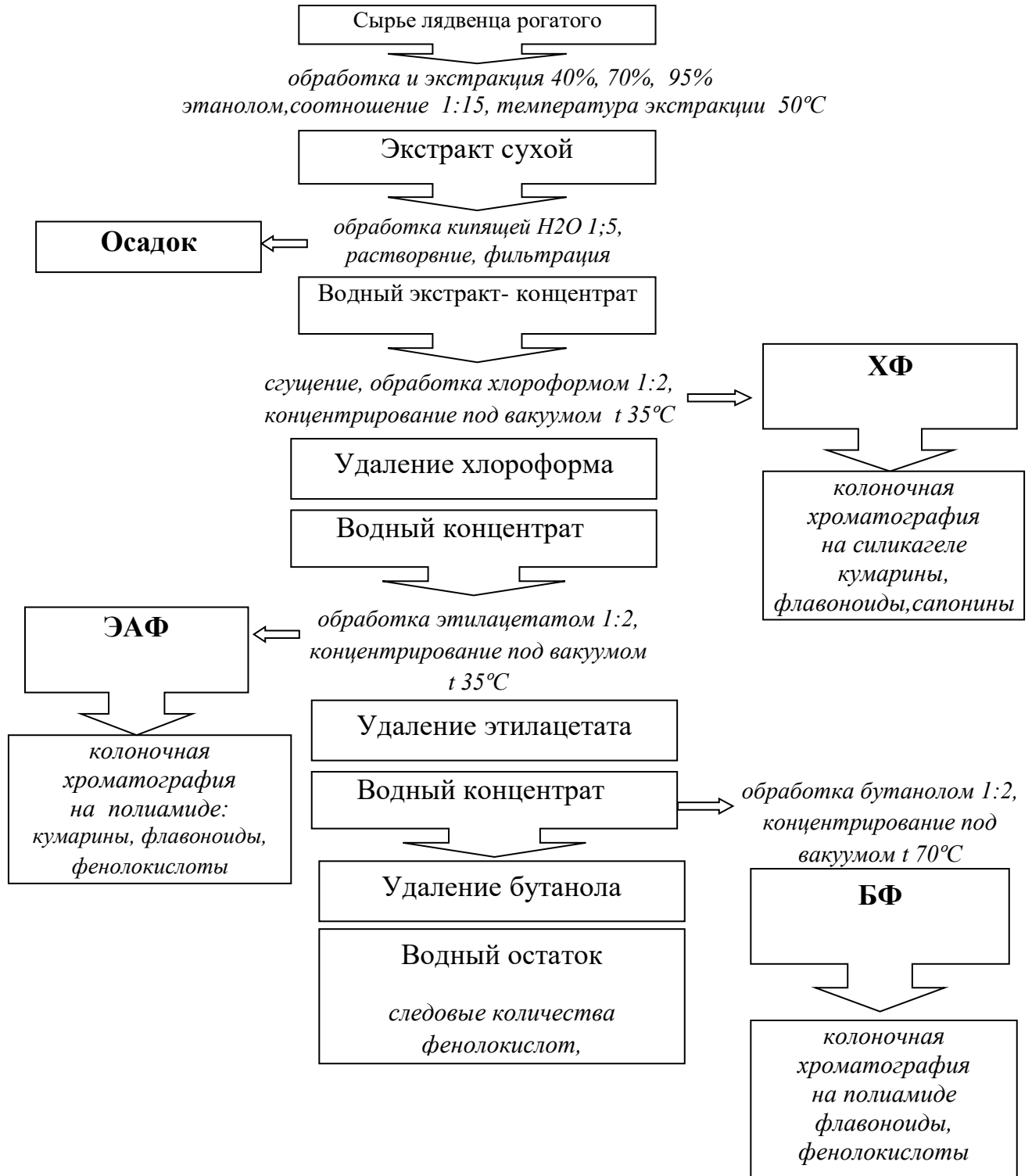


Рисунок 3.2.1 Схема фракционирования экстракта из надземной части лядвенца рогатого

Выход разных фракций составил (% , n=3, $X \pm x$): ОЭ в форме аморфного, хорошо сыпучего порошка желтовато-белого цвета $2,71 \pm 0,22$; хлороформная фракция в виде зеленой вязкообразной массы $1,96 \pm 0,15$; этилацетатная фракция в виде светло-зеленой вязкой массы $3,67 \pm 0,29$; бутанольная фракция в виде коричневатого порошка $9,1 \pm 0,09$; водный остаток в виде аморфного порошка коричневого цвета $96,54 \pm 6,75$.

Полученные фракции были подвергнуты кислотному гидролизу, агликоны из гидролизатов извлекали этилацетатом и хлороформом. Состав гидролизованных и нативных фракций исследовали хроматографическим методом.

3.2.1. Хроматографическое исследование экстракта и фракций

Результаты хроматографического анализа этанольного экстракта, бутанольной, этилацетаной фракций, водных остатков, представленные в таблице 5 показывают, что по характерной окраске пятен в УФ- и видимом свете до и после проведения качественных реакций, значениям R_f в сравнении с известными веществами и данными литературы было идентифицировано 30 компонентов из разных групп БАВ.

Таблица 5. Результаты идентификации веществ

Идентифицированный компонент	Значение R_f						Объект
	А	Б	В	Г	Д	Е	
формонетин (7-гидрокси-4'-метоксиизофлавонон)	-	0,25	на старте	-	0,12	0,34	ЭЭ ЭА БФ
генистеин (4',5,7-тригидроксиизофлавонон)	-	0,24	на старте	-	0,11	0,91	ЭЭ ЭА БФ
биоханин А (5,7-дигидрокси-4'-метоксиизофлавонон)	0,82	0,22	на старте	-	0,65	0,77	ЭЭ ЭА БФ
п-кумаровая кислота (4-оксикоричная кислота)	0,89	0,60	0,46	-	на старте	-	ЭЭ ЭА БФ
кофейная кислота	0,81	0,46	0,31	-	0,84	0,21	ЭЭ ЭА

феруловая кислота	0,89	0,55	0,44	-	0,69	на старте	ЭЭ ЭА БФ
хлорогеновая кислота (<i>5-O-кофеил-D-хинная кислота</i>)	0,62	0,70	0,65	-	-	на старте	ЭЭ БФ ВО
неохлорогеновая кислота (<i>3-O-кофеил-D-хинная кислота</i>)	0,54	0,75	0,70	-	-	на старте	ЭЭ БФ ВО
умбеллиферон (<i>7-гидроксикумарин</i>)	0,90	0,64	-	0,24	-	-	ЭЭ ЭА ХЛФ
эскулетин (<i>6,7-дигидроксикумарин</i>)	0,80	0,51	-	0,08	-	-	ЭЭ ЭА гидролизат
скополетин (<i>6-метокси-7-гидроксикумарин</i>)	0,85	0,50	-	0,61	-	-	ЭЭ ЭА ХЛФ
изоскополетин (<i>6-гидрокси-7-метоксикумарин</i>)	0,83	0,60	-	0,64	-	-	ЭА ХЛФ
астрагалин (<i>кемпферол-3-O-β-D-глюкопиранозид</i>)	0,71	0,37	-	-	-	-	ЭЭ БФ ВО гидролизат
популнин (<i>кемпферол-7-O-β-D-глюкопиранозид</i>)	0,60	-	0,47	-	-	-	БФ ВО гидролизат
трифолин (<i>кемпферол-3-O-β-D-галактопиранозид</i>)	0,61	0,33	-	-	-	-	БФ ВО гидролизат
изокверцитрин (<i>кверцетин-3-O-β-D-глюкопиранозид</i>)	0,52	0,36	-	-	-	-	ЭЭ ЭА БФ ВО гидролизат
кверцитрин (<i>кверцетин 3-O-β-D-рамнопиранозид</i>)	0,62	-	0,39	-	-	-	ЭА ВО гидролизат
морин (<i>3,5,7,2',4'-пентаоксифлаво</i>)	0,76	0,27	0,68	-	-	-	ЭА ХЛФ
морин-3-O-β-D-галактопиранозид	0,72	0,39	-	-	-	-	ЭА ВО гидролизат
гиперозид (<i>кверцетин 3-O-β-D-галактопиранозид</i>)	0,57	0,28	-	-	-	-	ЭЭ БФ ВО гидролизат
кверцетин	0,55	0,06	-	-	-	-	ЭА ХЛФ
кемпферол	0,83	0,08	-	-	-	-	БФ гидролизат
олеаноловая кислота	0,49 в системе хлороформ-метанол-уксусная кислота (94:5:1)						ЭЭ ХЛФ
валин	0,53	-	-	-	-	-	ВО

аригинин	0,11	-	-	-	-	-	ВО
лизин	0,15	-	-	-	-	-	ВО
глицин	0,20	-	-	-	-	-	ВО
L-рамноза	0,58 0,58 0,58	в системе EtOAc-НСООН- СН ₃ СООН- Н ₂ O (60:15:15:10)					ВО
D-галактоза	0,26 0,26						ЭА гидролизат
D-глюкоза	0,44 0,44						БФ гидролизат
							ВО гидролизат

Примечание: А - БУВ (4:1:5); Б - 15 % уксусная кислота; В - 3% уксусная кислота; Г - хлороформ-25% формамид; Д - 5% р-р натрия гидрокарбоната; Е – хлороформ-уксусная кислота (9:1).

При хроматографическом исследовании этанольного экстракта, этилацетатной, хлороформной, и липофильной части этилацетатного гидролизата были обнаружены четыре зоны адсорбции с голубой, сине-голубой, бледно-голубой, желтой (после обработки) флуоресценцией в УФ-свете. Одно из этих веществ идентифицировали как изоскоплетин на основании сравнения с данными литературы. Три вещества идентифицировали на основании сравнения подвижности веществ на хроматограмме, окраске с веществами сравнения: умбеллифероном, эскулетином, скополетином.

После обработки хроматограмм этанольного экстракта, хлороформной фракции, гидролизатов бутанольной фракции и водного остатка кремневольфрамовой кислотой была обнаружена зона адсорции с серо-синей флуоресценцией в видимом свете. Сравнение хроматографических характеристик данного компонента с аналогичными характеристиками известного вещества олеаноловой кислоты показали их тождественность.

На хроматограммах водного остатка после обработки раствором нингидрина было обнаружено несколько зон адсорбции с различной

флуоресценцией, которые при сравнении с хроматографическим поведением известных веществ некоторых аминокислот были идентифицированы как валин, аргинин, лизин и глицин.

В водном остатке, водной части этилацетатной и бутанольной фракций установлено присутствие свободных и связанных углеводов. При этом сравнение с известными веществами данные компоненты были идентифицированы как D-галактоза, D-глюкоза, L-рамноза. Обнаружение L-рамнозы в гидролизате этилацетатной фракции, L-рамнозы, D-алактозы и D-глюкозы в гидролизате бутанольной фракции может говорить о наличии в нативных фракциях гликозидов, содержащих эти углеводные компоненты в составе молекул. На возможность присутствия полисахаридного комплекса в нативном водном остатке указывает обнаружение свободной D-галактозы в водном остатке, D-галактоза, D-глюкозы и L-рамнозы в гидролизате водного остатка.

На хроматограммах этанольного экстракта, этилацетатной, бутанольной фракций и водного остатка детектировали 5 зон адсорбции с голубой, голубовато-фиолетовой, фиолетовой флуоресценцией в УФ-свете. Сравнение хроматографических характеристик данных веществ с аналогичными характеристиками известных фенолкарбоновых веществ показало их тождественность с п-кумаровой, феруловой, кофейной, хлорогеновой и неохлорогеновой кислотами.

Анализ хроматограмм этанольного экстракта, этилацетатной, бутанольной фракций и водного остатка и их гидролизатов позволил выявить присутствие 13 веществ имеющих флавоноидную природу.

Таким образом, хроматографическое исследование состава разных фракций этанольного экстракта травы лядвенца рогатого культивируемого в Томской области показало присутствие 30 веществ. Из перечисленных веществ к веществам фенольной природы отнесено двадцать два вещества, одно вещество представляет собой тритерпеновый сапонин, четыре вещества из группы аминокислот и три углевода.

В соответствии с данными, представленными в таблице 4, ряд (в порядке убывания) накопления биологически активных веществ в траве лядвенца рогатого культивируемого в Томской области можно представить следующим образом: полисахариды – фенолкарбоновые кислоты – изофлавоноиды \approx флавоноиды - дубильные вещества – сапонины – аминокислоты = хлорофилл – кумарины = каротиноиды – витамин К. Очевидно, что наряду с полисахаридами, к числу значимых групп БАВ относится и фенольный комплекс, роль отдельных представителей которого (флавоноидов, изофлавоноидов, дубильных веществ) в фармакологическом действии лядвенца рогатого было установлено зарубежными исследователями. Учитывая вышеизложенную информацию, нами было предпринято более детальное химическое исследование данной группы соединений.

Далее для уточнения состава некоторых групп веществ была проведена ВЭЖхроматография водно-спиртового экстракта. Полученные хроматографические данные показывают присутствие более 10 соединений, 5 из которых являются мажорными. Анализ ВЭЖ-хроматограмм по времени удерживания в сравнении с известными веществами показывает, что одному из мажорных компонентов экстракта по времени удерживания соответствует изофлавоноид биоханин А (табл.6, рис.3.2.8.).

Таблица 6. Результаты идентификации компонентов этанольного экстракта

№	Вещество	время удерживания, мин.
1	не идентифицированное вещество	1,898
2	галловая кислота	3,707
3	не идентифицированное вещество	7,495
4	хлорогеновая кислота	8,102
5	рутин	11,75
6	кофейная кислота	12,697
7	ононин	14,126
8	кверцетин	15,81
9	генистеин	17,483
10	формонетин	20,113
11	биоханин А	23,01

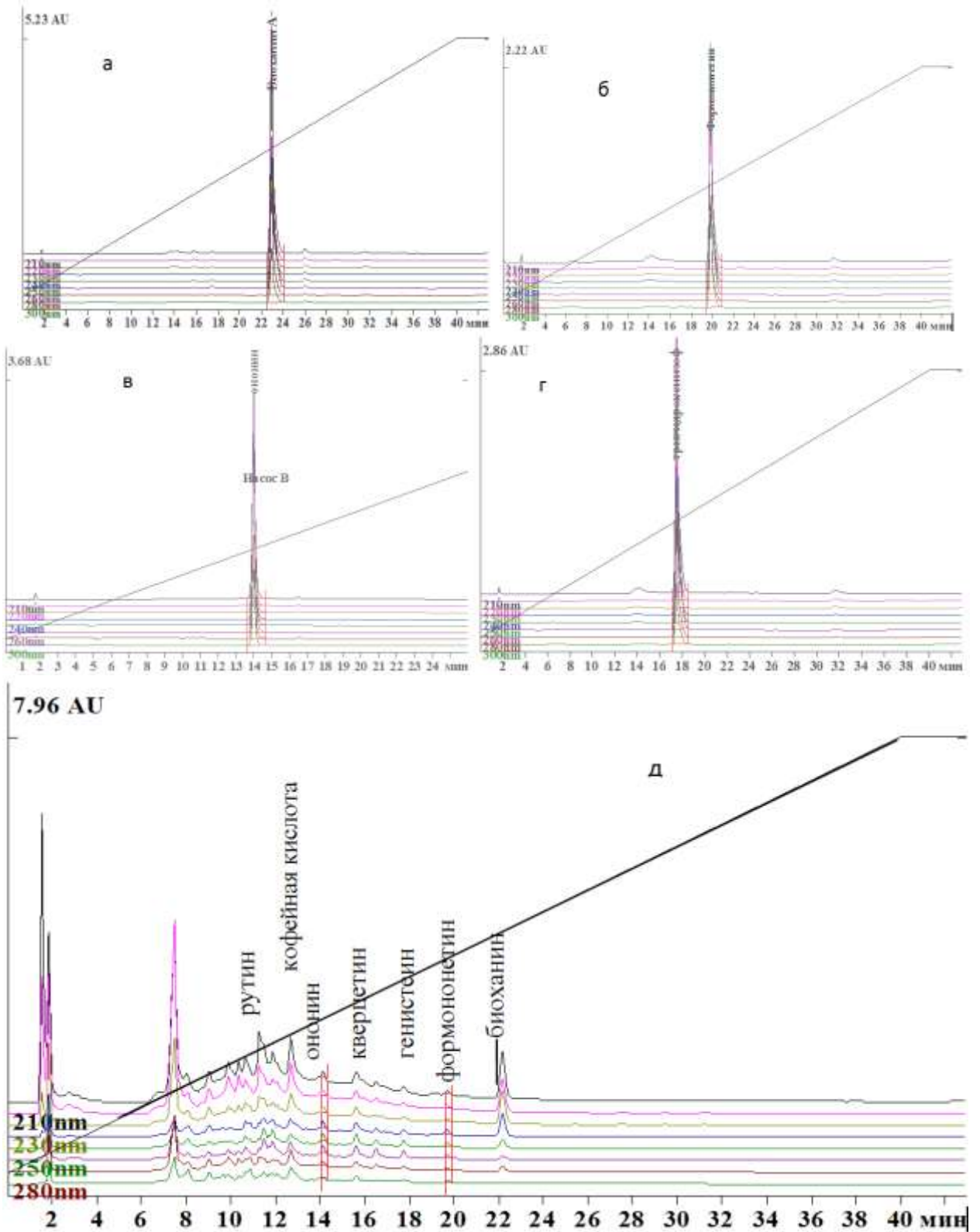


Рисунок 3.2.8 ВЭЖ-хроматограммы стандартных веществ и 40% водно-спиртового экстракта: биоханин (а), формонетин (б), ононин (в), генистеин (г), экстракт (д)

Таким образом, результаты ВЭЖХ исследования спиртового экстракта лядвенца рогатого позволило подтвердить присутствие 5 веществ обнаруженных с помощью БХ и ТСХ, и дополнительно обнаружить галловую кислоту и ононин.

На следующем этапе исследования полученные фракции были использованы для выднения индивидуальных веществ, идентификацию которых проводили сравнением с данными литературы, библиотеками ИК, УФ-спектров, сведений о температуре плавления, хроматографическом поведении, результатах гидролиза [3, 6-9, 26, 43, 52, 53, 55, 65, 66, 72, 142, 177-179], а также сравнением с аналогичными данными имеющихся в распоряжении известных веществ.

3.2.2 Выделение и идентификация флавоноидов, кумаринов и фенолкарбоновых кислот

Бутанольную, хлороформную, этилацетатную фракцию упаривали при температуре менее 45°C под вакуумом до полного удаления бутанола, хлороформа и этилацетат соответственно. Остатки отстаивали в течение 5-6 ч, получая при этом смеси, состоящие из осадка и надосадочной жидкости. Полученные осадки переносили на стеклянные фильтры и высушивали, после чего проводили их разделение методом колоночной хроматографии (в стеклянных колонках, заполненных для БФ и ЭАФ полиамидом, для ХФ силикагелем). Элюирование веществ для БФ осуществляли смесью этилацетат – этанол (в результате было выделено 12 веществ). Элюирование веществ для ХФ осуществляли этанольно-хлороформными смесями (в результате были выделены 6 соединений). Элюирование веществ для ЭАФ осуществляли водой очищенной и спирто-водными смесями (в результате было выделено 15 соединений). Выделенные вещества перекристаллизовывали из смеси метанол-хлороформ в различных

соотношениях. Индивидуальность выделенных соединений проверяли методом БХ и ТСХ.

Флавоноидная природа выделенных из бутанольной и этилацетатной фракций веществ ф1-ф11 подтверждается результатами качественных реакций, данными хроматографического и спектрального анализа. В ИК-спектрах соединений присутствуют полосы поглощения, характерные для флавоноидов: в области 3500-3100 см⁻¹ (фенольные гидроксилы), 1670-1650 см⁻¹ (карбонильная группа). Результаты качественных реакций и УФ-спектроскопии свидетельствуют о принадлежности исследуемых веществ к производным флавонола. По подвижности веществ на хроматограммах в разных системах растворителей, результатам цианидиновой пробы по Брианту 8 веществ отнесены к гликозидам флавоноидов.

Из хлороформной фракции выделены вещества к1-к5 кумариновой природы, которая подтверждается их расщеплением йодистоводородной кислотой в среде жидкого фенола до кумарина, характерной окраской зон адсорбции на хроматограммах (в УФ-свете в виде зон с голубой, синей адсорбцией, интенсивность которых усиливается после обработки хромогенными реактивами. Кумариновую природу веществ подтверждает выпадение их в осадок после растворения в щелочах и последующем подкислении. Максимумы поглощения в коротковолновой области находятся в пределах 230-298 нм и в длинноволновой области в пределах 328-343 нм. Добавление этилата натрия приводит к батохромному сдвигу максимума в длинноволновой области, что подтверждает наличие в молекуле соединений фенольных ОН-групп. В ИК-спектрах веществ регистрируются характерные полосы поглощения гидроксильных групп в области 3350-3260 см⁻¹, метоксигрупп - в области 2930-2843 см⁻¹.

Выделение фенолокислот фк-1-фк-7 проведено из хлороформной, бутанольной фракции и водорастворимого остатка. Их идентификацию проводили по результатам хроматографических и спектральных данных, аналогично веществам флавоноидной и кумариновой природы.

Вещество к-1 с молекулярной формулой $C_{10}H_8O_4$, На хроматограмме в УФ-свете вещество к-1 проявляется в виде зон адсорбции с бледно-голубой флуоресценцией (система: хлороформ-25% формамид), после обработки хроматограмм раствором щелочи зона адсорбции окрашивается в желтый цвет.

Выделенное вещество представляет собой игольчатые кристаллы белого цвета, имеет температуру плавления 185-187°C.

В электронном спектре вещества к-1: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 230, 254, 295, 345 нм.

В ИК-спектре (KBr, ν , cm^{-1}) наблюдали полосы поглощения при: 3340 (ОН); 2938, 2861 ($ОСН_3$); 1718 ($C=O$, α -пирона); 1630 ($C=C$).

Растворимость выделенного вещества: мало растворимы в H_2O , легко растворимы в 95% C_2H_5OH , $CHCl_3$, $C_4H_{10}O$, легко растворимы в водных растворах щелочей.

Полученные экспериментальные данные, сравнение с базами данных литературы позволило идентифицировать вещество **к-1** как 6-гидрокси-7-метоксикумарин (**изоскополетин**).

Вещество к-2 с молекулярной формулой $C_{10}H_8O_4$ и с Тпл. 202-204°C.

На хроматограмме в УФ-свете вещество к-2 проявляется в виде зон адсорбции с голубой флуоресценцией R_f 0,58 (система: хлороформ-25% формамид).

Выделенные игольчатые кристаллы имеют беловатый с красноватым оттенком цвет. Отличаются разной растворимостью - малорастворимы в воде, хорошо растворимы в органических растворителях, хлороформе, 95% этиловом спирте, эфире, водных растворах щелочей.

Электронный спектр вещества к-2: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 230, 255, 296, 346 нм.

Прибавление к исследуемому раствору натрия ацетата приводит к батохромному сдвигу длинноволновой полосы $\lambda_{\max}^{N_2H_5OH+CH_3COONa}$ 240, 378.

В ИК-спектре (KBr, ν , cm^{-1}) вещества имеются полосы поглощения при: 1610 ($C=C$); 3300-3350 (-ОН); 1730 ($C=O$, α -пирона); 2935, 2845 ($-ОСН_3$).

Проба смешения вещества и известного вещества скополетина не давала депрессии температуры плавления.

На основании совокупности полученных данных, сравнения с известным веществом скополетином **к-2** было идентифицировано как 6-метокси-7-гидроксикумарин (**скополетин**).

Вещество к-3 с молекулярной формулой $C_9H_6O_3$ и с Тпл. 229-231°C.

На хроматограмме в УФ-свете вещество к-3 проявляется в виде синеголубых зон адсорбции и R_f 0,40 ($CHCl_3$ -25%- CH_3NO).

К-3 выделено в виде игольчатых кристаллов белого цвета. К-3 мало растворимо в H_2O , хорошо растворимо в C_2H_5OH , $CHCl_3$, $C_4H_{10}O$, в водных растворах щелочей.

Электронный спектр вещества: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 230, 257, 326 нм;
 $\lambda_{\max}^{N_2H_5OH+CH_3COONa}$ 240нм, 378 нм.

Проба смешения вещества к-3 с достоверным образцом умбеллиферона не дала депрессии температуры плавления.

В ИК-спектре (KBr , ν , cm^{-1}) вещества к-3 отмечены полосы поглощения при 3300 (ОН), 1616-1575 (C=C), 1718, 1688 (C=O α -пирона), 1514, 1464, 1325, 1240, 1140, 855.

На основании совокупности полученных данных, сравнения с известным веществом умбеллифероном вещество **к-3** было идентифицировано 7-гидроксикумарин (**умбеллиферон**).

Вещество к-4 - $C_9H_6O_4$, мелкие бесцветные игольчатые кристаллы, имеющие Тпл. 228-230°C.

На хроматограмме в УФ-свете вещество к-4 проявляется в виде зон адсорбции с голубой флуоресценцией в УФ-свете пр 254 нм (система: хлороформ-25% формамид), которая сливается после бработки парами аммиака.

Вещество имеет следующую растворимость: не растворимо в H_2O , хорошо растворимо в 5% NaOH, 95% C_2H_5OH , $CHCl_3$, $C_4H_{10}O$.

При взаимодействии вещества с р-ром железа (III) хлорида образуется зеленое окрашивание.

Электронный спектр, нм: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 230, 260, 300, 360.

В ИК-спектре (KBr, ν , cm^{-1}) вещества имеются полосы поглощения при 3340, 3225 (ОН); 2680-2930 (фенольные ОН-группы); 1710, 1690 (C=O α -пирона); 1610, 1590 (C=C).

Проба смешения вещества и известного вещества скопарона не давала депрессии температуры плавления.

На основании совокупности полученных данных, сравнения с известным веществом эскулетином вещество **к-4** было охарактеризовано как 6,7-дигидроксикумарин (**эскулетин**).

Вещество к-5 - $C_{16}H_8O_8$ в виде белых игольчатых кристаллов с Тпл. 215-219°C.

Электронный спектр вещества **к-5**: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 250, 315 нм.

На хроматограмме в УФ-свете вещество к-5 проявляется в виде зон адсорбции с ярко-голубой флуоресценцией R_f 0,40 (система: хлороформ-25% формамид), усиливающейся после обработки раствором калия гидроксида.

В ИК-спектре (KBr, ν , cm^{-1}) вещества к-5 имеются полосы поглощения, соответствующие гидроксильным, карбонильной группам, ароматическому кольцу, углеводному компоненту: 3100, 1725, 1610, 1580, 1520, 1460, 1095, 1030, 902, 885.

Образующийся в результате кислотного гидролиза агликон имеет Тпл. 230-231°C, на хроматограмме проявляет такую же подвижность, как и известный образец умбеллиферона. Электронный спектр агликона имеет вид:

$\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 255, 324 нм.

Углеводный компонент кислотного гидролизата методом хроматографии на бумаге был идентифицирован как глюкоза.

На основании совокупности полученных данных, сравнения с известным образцом умбеллиферона, данными литературы вещество **к-5** было идентифицировано как 7- β - глюкозид умбеллиферона (**скимин**).

Вещество ф-1 с молекулярной формулой $C_{16}H_{12}O_4$. Вещество имеет хроматографическую подвижность в системе хлороформ-метанол 93:7 R_f 0.66, в системе этилацетат-метанол-вода 10:1,5:1 R_f 0.69, а также в системах раствора натрия карбоната R_f 0.12, проявляется в виде зон адсорбции с голубой флуоресценцией.

Выделенные кристаллы имеют белый цвет, плавятся при 258-260°C. Ф-1 нерастворимо в H_2O , легко в C_2H_5OH , CH_3OH , $CH_3-COO-CH_2-CH_3$, $NaOH$.

Электронный спектр ф-1 имеет вид: $\lambda_{C_2H_5OH}$ 249, 298, характерный для производных изофлавона.

В ИК-спектре (KBr , ν , cm^{-1}) вещества имеются полосы поглощения гидроксильных, карбонильной групп, γ -пиронового кольца, $C=C$ бензольных ядер: 3429-3075, 1638, 1621 1512. О наличии в молекуле метоксильных групп свидетельствуют полосы поглощения при 2925, 2851.

Таким образом, совокупность полученных данных и их сравнение с известным веществом формонетинном позволило идентифицировать **ф-1** как 7-гидрокси-4'-метоксиизофлавон (**формонетин**).

Вещество ф-2 с молекулярной формулой $C_{15}H_{10}O_5$, с Тпл. 302-305°C.

Вещество имеет хроматографическую подвижность в системе хлороформ-метанол 93:7 R_f 0.59, в системе раствора натрия карбоната R_f 0.11, проявляется в виде зон адсорбции с коричневой флуоресценцией.

Ф-2 выделено в виде светло-желтых призматических игольчатых кристаллов.

Электронный спектр вещества имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 262, 294, 328; $\lambda_{\max}^{CH_3OH+CH_3CONa}$ 272, 309, 379; $\lambda_{\max}^{CH_3OH+AlCl_3}$ 272, 325.

В ИК-спектре (KBr , ν , cm^{-1}) регистрировали полосы поглощения: 3408, 1662, 1614, 1565, 1517, 1503, 1308, 1044, 790.

Ф-3 имеет следующую растворимость: нерастворимо в H_2O , легко растворимо в $(CH_3)_2SO$, умеренно растворимо в C_2H_5OH , CH_3OH .

Таким образом, совокупность полученных данных и сравнение с аналогичными данными по известному веществу генистеину позволило идентифицировать вещество **ф-2** как *4',5,7-тригидроксиизофлаво*н (генистеин).

Вещество ф-3 с молекулярной формулой $C_{16}H_{12}O_5$. Плавится при 210-213°C. Вещество ф-3 имеет хроматографическую подвижность в системе хлороформ-метанол 93:7 R_f 0.50, в системе раствора натрия карбоната R_f 0.065, и проявляющееся в виде зон адсорбции с коричневой флуоресценцией.

Ф-3 выделено в виде светло-желтых игольчатых кристаллов. Ф-3 нерастворимо в H_2O , легко растворимо в $(CH_3)_2SO$, C_2H_5OH , CH_3OH , C_3H_7NO .

Электронный спектр имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 264, 330; $\lambda_{\max}^{CH_3OH+CH_3COONa}$ 264,328; $\lambda_{\max}^{CH_3OH+AlCl_3}$ 273, 310, 375.

В ИК-спектре (KBr, ν , cm^{-1}) регистрировали полосы поглощения: 3388, 1653, 1623, 1249, 842, 828, 772, 698.

На основании совокупности полученных данных, сравнения с известным веществом биоханином А позволило идентифицировать вещество **ф-3** как *4'-метилгенистеин, 5,7-дигидрокси-4'-метоксиизофлаво*н (**биоханин А**).

Вещество ф-4 - $C_{21}H_{20}O_{11}$ в виде кристаллов желтоватого цвета, плохо растворимых в воде, плавящиеся при температуре 270-272°C.

В системе 15% уксусной кислоты вещество ф-4 имеет подвижность R_f 0,35; в системе БУВ (4:1:2) R_f 0,40.

Электронный спектр вещества ф-4 имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 325пл., 269, 368; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa}$ 325пл.; λ_{\max} 269, 368; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 400, 275.

Выявленные в ИК-спектре агликона полосы поглощения соответствуют валентным колебаниям карбонильной, гидроксильной группы, бензольных ядер, cm^{-1} : 3600, 3420, 1700, 1600, 1610, 1560, 1510, 1450, 1400, 1385, 1310, 1270, 1180, 1010, 815.

Кислотный гидролиз приводил к образованию *D*-глюкозы и *агликона кемпферола*.

Сравнение полученных данных со стандартным образцом популнином позволило идентифицировать **ф-4** как **кемпферол- 7-О-глюкозид (популнин)**.

Вещество ф-5 с молекулярной формулой $C_{21}H_{20}O_{11}$, плавящееся при температуре 179-180°C. $[\alpha]_D^{20}$: -9.8 ($c=0.15$ CH_3OH).

Электронный спектр имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 265, 294 нм., 350 нм. $\lambda_{\max}^{CH_3ONa}$ 273, 324, 399 нм; $\lambda_{\max}^{AlCl_3+HCl}$ 273, 300, 345, 395 нм; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa}$ 273, 309, 387 нм; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 273, 304, 349, 395 нм; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa+H_3BO_3}$ 264, 295 нм, 352 нм.

Выделенно нами вещество представляет собой кристаллический порошок с желтоватым оттенком. Кристаллы легко растворимы в органических растворителях ДМСО и диметилформамиде, в воде нерастворимы.

ИК-спектр подтверждает присутствие в данном веществе гидроксильных, карбонильных, эфирных групп и сопряженных двойных связей, замещения в кольце В: 3440–3290 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} , 1100–1000 cm^{-1} , 815, 835.

Из продуктов кислотного гидролиза ф-5 выделены желтые кристаллы с температурой плавления - 279-280°C.

Гидролиз вещества ф-5 β -гидролазами гриба *Aspergillus oryzae* вызывало его расщепление на кемпферол и *D*-глюкозу в соотношении 1:1, что подтверждает монозидную природу вещества.

Выявленные в ИК-спектре *агликона* полосы поглощения соответствуют валентным колебаниям карбонильной, гидроксильной группы, бензольных ядер: 1667 cm^{-1} ; 3348 cm^{-1} и 1610, 1555, 1505 cm^{-1} .

Использование ионизирующих и комплексообразующих добавок для анализируемого *агликона* позволило установить место присоединения ОН-групп (положения 3,5,7 и 4'), характерное для кемпферола.

Отсутствие депрессии $T_{пл}$ смеси ф-5 и кемпферола, а также другие вышеприведенные данные говорят о том, что агликоном ф-5 является кемпферол.

После экстракции агликона водный раствор гидролизата исследовали на углеводный фрагмент, путем нейтрализации сухим бария карбонатом, последующей фильтрации, упариванию фильтрата до густой сиропообразной массы, которую исследовали методом БХ в системе: $\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{CH}_3\text{-CH}_3\text{COOH-НСOОН}$ (18:3:1) и $\text{CH}_3\text{-C(O)-CH}_3\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH-H}_2\text{O}$ (7:2:1). Для сравнения использовали стандартные образцы углеводов, перечень которых приведен в гл.2. Детектирование углеводов проводили раствором анилинфталата в н-бутаноле после нагревания хроматограмм при 100-105°C в сушильном шкафу до проявления зон адсорбции. Результаты хроматографического анализа показали, что углеводным компонентом в веществе ф-5 выступает *D-глюкоза*.

Таким образом, результаты установления структуры вещества ф-5, сравнение полученных данных с известным веществом астраглином позволяют сделать вывод о том, что вещество **ф-5** является **кемпферол-3-О-β-D-глюкозидом (астрагалин)**.

Вещество ф-6 с молекулярной формулой $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, плавящиеся при температуре 228-231. $[\alpha]_D^{20}$: -45,0 ($c=1.00 \text{ CH}_3\text{OH}$).

Гликозидный характер вещества подтверждается результатами качественных реакций, идентифицированными продуктами гидролиза ф-6, в результате которого образуется агликон кемпферол и углеводный фрагмент *D*-галактоза.

Электронный спектр имеет вид: $\lambda_{\text{CH}_3\text{OH}}$ 351, 265; $\lambda_{\text{CH}_3\text{COONa}}$ 366, 275; $\lambda_{\text{CH}_3\text{ONa}}$ 396; и λ_{AlCl_3} 276.

Ф-6 выделено в виде белых игольчатых кристаллов. Ф-6 имеет следующую растворимость: плохо растворимо в H_2O , легко растворимо в $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, CH_3OH .

В ИК-спектре вещества регистрировали сигналы полос поглощения (KBr, ν , см⁻¹) при: 3438 (-OH), 1720 (C=O, α -пирона); 1655 (C=O), 1600 (C=C).

Таким образом, анализ хроматографических и спектральных характеристик **ф-6**, и сравнение их с данными литературы позволил отождествить его с *кемпферол-3-О- β -D-галактопиранозид* (**трифолин**).

Вещество ф-7 с молекулярной формулой C₂₁H₂₀O₁₂, $[\alpha]_D^{20}$: -20 (с=0.05 CH₃OH), T_{пл.} 233-236°C.

Электронный спектр имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 363, 258; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa+H_3BO_3}$ 371, 260; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa}$ 375, 270; $\lambda_{\max}^{AlCl_3+HCl}$ 405, 270; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 434, 275.

Ф-7 выделено в виде ярко-желтых призматических кристаллов. Ф-7 имеет следующую растворимость: легко растворимо H₂O, нерастворимо в C₂H₅OH, CH₃OH.

В ИК-спектре ф-7 регистрировали полосы поглощения в области (см⁻¹): 885; 1511; 1558; 1570; 1605; 1660; 3200.

Перекристаллизация продуктов кислотного гидролиза с помощью 96% этанола привела к выделению кристаллов желто-зеленого цвета, плавящихся при температуре 309-311°C. Идентификация углеводного фрагмента хроматографией на бумаге в сравнении с известными образцами показала их тождественность с D-глюкозой.

ИК-спектр агликона вещества ф-7 выявил полосы поглощения, типичные для валентных колебаний фенольных гидроксильных, карбонильной групп, γ -пиронового кольца, C=C бензольных ядер, см⁻¹: 3300, 1664, 1621, 1576, 1531.

Электронный спектр агликона имеет вид: $\lambda_{\max}^{N_2H_5OH}$ 369, 256; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa+H_3BO_3}$ 391, 268; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa}$ 384, 269; $\lambda_{\max}^{AlCl_3+HCl}$ 429, 272; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ 429, 271.

Положение свободных гидроксильных групп установили по гипсохромному сдвигу длинноволновой полосы поглощения в присутствии этилата натрия, за счет образования устойчивого комплекса с гидроксильными группами в

положениях С-3' и С-4'. Незамещенные гидроксильные группы в положении С-3 и С-5 обнаруживали по батохромному сдвигу на 79 нм с алюминием хлоридом; и уменьшению батохромного сдвига на 72 нм при действии хлористоводородной кислоты.

О присоединении молекулы углевода к агликону в С-3 положении свидетельствует отрицательный результат реакции вещества ф-7 с кислотой лимонной и азотнокислым цирконием.

Проба смешения вещества и известного вещества *кверцетина* не давала депрессии температуры плавления.

Щелочная деструкция агликона привела к образованию и обнаружению методом хроматографии на бумаге флороглюцина (R_f 0,74) и протокатеховой кислоты (R_f 0,51).

Таким образом, агликон вещества ф-7 идентифицирован как *кверцетин*.

Совокупность полученных данных и сравнение их с данными литературы позволило идентифицировать **вещество ф-7 как кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид (изокверцитрин)**.

Вещество ф-8 с молекулярной формулой $C_{21}H_{20}O_{11}$, плавящиеся при температуре 181-184°C.

Электронный спектр вещества имеет вид: $\lambda_{снзон}$ 245, 288 и 325.

Вещество было выделено в виде желтого порошка легко растворимые в органических растворителях (этанол, ДМСО, диметилформамиде).

Флавоноидная структура вещества ф-8 и присутствие гидроксильных, карбонильных, эфирных групп и сопряженных двойных связей подтверждается ИК-спектром, в котором определено около 32 пиков, среди которых определены основные (KBr , ν , см-1): 3417; 2973; 1371; 1465; 1700-1740; 1415 и 651; 1298; 1076; 1076.

Продуктом щелочного гидролиза вещества ф-8 является флороглюцин, продуктами полного кислотного гидролиза - *D*-рамноза и агликон кверцетин.

Таким образом, анализ хроматографических и спектральных характеристик вещества **ф-8** и сравнение их с известным веществом кверцитрином позволило определить его как *кверцетин 3-О-β-D-рамнопиранозидом (кверцитрин)*.

Вещество ф-9 с молекулярной формулой $C_{21}H_{20}O_{12}$, плавящиеся при температуре 232-237С.

В системе 15% уксусной кислоты вещество имеет подвижность R_f 0,35; БУВ (4:1:2) 0,40.

Ф-9 выделено в виде светло-желтых игольчатых кристаллов. Ф-9 имеет следующую растворимость: хорошо растворимо в C_2H_5OH , CH_3OH , $CH_3-C(O)-CH_3$, H_2O , и практически не растворимые в $CHCl_3$, $C_4H_{10}O$.

Гликозидный характер вещества подтверждается хроматографическим поведением, результатами цианидиновой пробы по Брианту и результатами кислотного гидролиза.

Электронный спектр вещества имеет вид: λ_{CH_3OH} 350, 255 и 265нм.

Углеводный компонент устанавливали по результатам кислотного гидролиза 1% хлористоводородной кислотой. Осадок отфильтровывали, фильтр высушивали и обрабатывали 95% этанолом. Продукты гидролиза методом БХ были идентифицированы как кверцетин и D-(+)-галактоза. Характер β-гликозидной связи устанавливали по результатам ферментативного гидролиза.

В ИК-спектре вещества регистрировали сигналы полос поглощения (KBr, ν , см-1) при: 3380 (ОН), 1660 (α,β-ненасыщенная C=O), 1612, 1490 (Ar C=C), 1240 (Ar C-O), 1062 и 1012 (гликозидная C-O), 925,890 (углеводный компонент), 835, 815 (n-замещение в ароматическом кольце В).

Таким образом, проведенный анализ вещества **ф-9** и сравнение его с известным веществом гиперозидом позволило идентифицировать его как *кверцетин 3-О-β-D-галактопиранозид (гиперозид)*.

Вещество ф-10 с молекулярной формулой $C_{21}H_{22}O_{12}$, плавящееся при температуре 214-224°С.

Электронный спектр вещества имеет вид: $\lambda_{\text{CHЗОН}}$ 270, 358.

Кристаллы вещества ф-10 имеют желтого цвета, легко растворимы в воде и спирте.

Отрицательная цианидиновая реакция по Брианту указывает на то, что вещество является гликозидом флавоноидной природы.

Наличие темной зоны адсорбции в УФ-свете на хроматограмме позволяет предположить, что исследуемое вещество ф-10 может являться флавоном или флавонолом с замещенной оксигруппой в положении С-3.

Относительно легкое протекание кислотного гидролиза позволяет предположить, что углеводный компонент находится в положении С-3 флавоноидного ядра. Соотношение агликона и сахарного компонента в продукта хгидролиза составило 1:1, что указывает на то, что соединение является монозидом. При этом в продуктах кислотного гидролиза идентифицированы *D*-галактоза и агликон, по физико-химическим свойствам идентичный известному веществу морину.

Отсутствие батохромного сдвига максимума I-й полосы поглощения в присутствии нитрата цирконила и лимонной кислоты в веществе ф-10 и наличие батохромного сдвига в аналогичных условиях в агликоне указывает на связь *D*-галактозы с агликоном через оксигруппы в положении С-3.

На наличие β -гликозидной связи указывает отщепление галактозы при ферментативном гидролизе вещества ф-10.

В ИК-спектре (KBr, ν , см^{-1}) вещества имеются полосы поглощения при 3500-3200 (гидроксигруппы углеводных заместителей), при 3200-2800 (фенольные гидроксигруппы); при 1660 (γ -пирона); при 1610, 1570, 1520 (ароматическая природа); 830-800 (1-4 замещения кольца Б); при 1090, 1025 и 1000 (пиранозная *D*-галактоза); при 890 (β -гликозидная связь).

Таким образом, совокупность полученных данных и сравнение их с данными литературы позволило идентифицировать вещество ф-10 как **морин-3-О-*D*-галактопиранозид**.

Вещество ф-11 - $C_{27}H_{30}O_{16}$, представляет собой желтые кристаллические пластинки, мало растворимые в воде, плавящиеся при температуре 229-233°C.

Электронный спектр вещества имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 267, 325пл., 352; $\lambda_{\max}^{CH_3COONa}$ 267, 352, 325пл.; $\lambda_{\max}^{AlCl_3}$ сдвиг второй полосы на 47.

Кислотный гидролиз вещества ф-11 с 1% р-ром кислоты хлористоводородной приводит к образованию кемпферола, кемпферол-3-моноглюкозида и глюкозы. Кемпферол-3-моноглюкозид по результатам гидролиза и данным УФ-спектроскопии идентифицирован как кемпферол 3- β -D-глюкопиранозид.

Соотношение 1:2 агликона (*кемпферола*) и углеводного компонента (*глюкозы*), полученное в результате количественного кислотного гидролиза вещества ф-8, является основанием для предположения о том, что это вещество является биозидом.

Таким образом, анализ хроматографических и спектральных характеристик вещества **ф-11**, сравнение с данными литературы позволил идентифицировать его как **кемпферол-3-О-7-О-диглюкозид**.

Вещество фк-1 - $C_7H_6O_4$ в виде беловатых кристаллов, растворимых в этаноле, мало растворимых в воде, плавящихся при температуре 174-176°C.

На хроматограмме при 254 нм фк-1 проявляется зоной адсорбции с сине-фиолетовой флуоресценцией, которая не изменяется после обработки парами аммиака.

Электронный спектр вещества фк-1 имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 261, 295.

В ИК-спектре вещества фк-2 обнаружены полосы поглощения подтверждающие кислотный характер и фенольную природу вещества, cm^{-1} : 1780, 1740-1720, 1690-1590.

Таким образом, результаты хроматографического и спектрального анализа, сравнение их с данными литературы позволили идентифицировать **фк-1** как **протокатеховую кислоту**.

Вещество фк-2 с молекулярной формулой $C_9H_6O_3 \cdot 5H_2O$, плавящееся при температуре 212-214°C.

Вещество фк-2 было выделено нами в форме бесцветных кристаллов, легко растворимых в C_2H_5OH , $(CH_3)_2SO$, $(CH_3)_2NC(O)H$, и мало растворимых в H_2O .

Электронный спектр вещества фк-2 имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 310, 290, 228.

Наличие в молекуле вещества гидроксигруппы подтверждается отсутствием гипсохромного сдвига после добавления натрия этилата. При добавлении к раствору вещества фк-2 натрия ацетата наблюдается гипсохромный эффект.

В ИК-спектре вещества фк-2 обнаружены полосы поглощения подтверждающие кислотный характер и фенольную природу вещества, и соответствующие валентным колебаниям ароматического кольца и присутствия коричневого фрагмента в молекуле, cm^{-1} : 3150, 2950, 1664, 1625, 1605-1580, 840.

Щелочной гидролиз вещества фк-2 приводил к образованию п-оксибензойной кислоты, спектральные исследования которой подтвердили наличие в ее структуре 4-оксигруппы.

Таким образом, полученные данные и сравнение с известным веществом позволили идентифицировать **фк-2** как **п-кумаровую кислоту** или п-оксикоричную кислоту.

Вещество фк-3 с молекулярной формулой $C_7H_6O_5$, плавящееся при 248-250°C.

На хроматограмме в системе вещество фк-3 образует зону адсорбции с R_f 0,72 в системе растворителей этилацетат-метилэтилкетон-муравьиная кислота-вода (50:30:10:10).

Фк-3 выделено в форме бесцветных кристаллов. Фк-3 имеет следующую растворимость: легко растворимо в C_2H_5OH , CH_3OH , $C_3H_8O_3$, $CH_3-C(O)-CH_3$, мало растворимо в $CHCl_3$.

Электронный спектр вещества фк-3 имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 218, 275.

При добавлении раствора железа (III) хлорида вещество образует синее окрашивание.

В ИК-спектре фк-3 регистрировали полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям тризамещенного бензольного кольца, ароматического кольца, кислотных и спиртовых гидроксильных групп: в области 1100см^{-1} , 1600см^{-1} , 3450см^{-1} .

Полученные данные и сравнение их с аналогичными характеристиками известного вещества позволили идентифицировать соединение фк-3 как **3,4,5-тригидроксибензойную кислоту (галловая кислота)**.

Вещество фк-4 с молекулярной формулой $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ плавящееся при температуре $196\text{--}199^\circ\text{C}$.

Фк-4 представляет собой мелкие призматические кристаллы светло-желтого цвета.

Фк-4 имеет следующую растворимость: хорошо растворимо в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, не растворимо в H_2O .

На хроматограмме вещество фк-4 проявляется в виде голубой зоны адсорбции в УФ-свете имеет хроматографическую подвижность в 15% уксусной кислоте R_f 0,65; в БУВ (4:1:2) R_f 0,52.

Электронный спектр вещества фк-4, нм: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 325, 299нм, 235; $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{COONa}}$ 310, 285; $\lambda_{\text{max}}^{\text{AlCl}_3}$ 316, 260, 240; $\lambda_{\text{max}}^{\text{AlCl}_3+\text{HCl}}$ 276, 381; $\lambda_{\text{max}}^{\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}}$ 348, 250.

В ИК-спектре вещества фк-4 найдены полосы поглощения соответствующие валентные колебания спиртовых гидроксильных групп, кислотных гидроксильных групп, замещенных этиленов, бензольного кольца, спиртовых гидроксильных групп, деформационным плоскостным колебаниям, см^{-1} : 3400, 3236, 2974; 1646, 1630, 1607, 1540, 880, 860.

Проба смешения вещества фк-4 и известного вещества кофейной кислоты не давала депрессии температуры плавления.

Образование в продуктах щелочной деструкции 3,4-диоксибензойной кислоты подтверждает то, что вещество фк-4 относится к производным 3,4-диоксикоричной кислоты.

Соединение **фк-4** идентифицировано как **кофейная кислота** при сравнении аналогичных характеристик известного вещества.

Вещество фк-5 с молекулярной формулой $C_{10}H_{10}O_4$ выделено в виде бесцветных кристаллов, плавящихся при температуре 165-167°C.

Электронный спектр вещества фк-5, нм: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 234, 298н, 322. Об оксикоричной природе вещества свидетельствует гипсохромный сдвиг в УФ-области в присутствии натрия ацетата. На наличие свободной оксигруппы в молекуле указывает батохромный сдвиг после добавления этилата натрия.

На хроматограмме вещество фк-5 проявляется в виде зон адсорбции со светло-голубой флуоресценцией и с R_f 0,34 (15% уксусная кислота), усиливающейся после обработки парами аммиака.

Вещество хорошо растворимо в 95% этаноле, диметилсульфоксиде, диметилформамиде.

В ИК-спектре вещества фк-5 регистрировали полосы поглощения подтверждающие кислотный характер и фенольную природу вещества, и соответствующие валентным колебаниям спиртовых гидроксильных групп, метоксильной группы, замещенных этиленов, ассиметричным колебаниям карбоксильных групп: 2840 см^{-1} ; 2908 см^{-1} ; 1446 см^{-1} ; 1718 см^{-1} .

Образование 4-окси-3-метоксибензойной кислоты в результате щелочного плавления вещества подтверждает полученные спектральные данные о наличии в структуре вещества фк-5 3-метоксигруппы.

Сравнение характеристик в-ва фк-5 и известного вещества феруловой кислоты показали их идентичность, что позволяет сделать заключение о том, что в-во фк-5 является **феруловой кислотой**.

Вещество фк-6 с молекулярной формулой $C_{16}H_{18}O_9$, плавится при температуре 203-205°C. $[\alpha]_D^{20}$: 32 ± 1 ($c=1\text{ CH}_3\text{OH}$).

Электронный спектр вещества фк-6 имеет вид: $\lambda_{\max}^{CH_3OH}$ 240 и 321. Существенное смещение длинноволновой полосы на 50 нм после добавления щелочи говорит о наличии в молекуле вещества фк-6 сложноэфирной связи.

Фк-6 представляет собой бесцветные кристаллы. Фк-6 имеет следующую растворимость: легко растворимо в C_2H_5OH , $(CH_3)_2SO$, $(CH_3)_2NC(O)H$.

На БХ фк-6 проявляется в виде зон адсорбции с голубой флуоресценцией, с R_f 0,63 (15% CH_3COOH) и R_f 0,66 (в системе хлороформ-формаид 3:1), окраска пятен при обработке парами аммиака переходит в зеленую.

В ИК-спектре вещества фк-6 отмечали полосы поглощения cm^{-1} , 2970, 2900, 2780, 1740-1710, 1660, 1625, 1605-1550, 840.

Проба смешения фк-6 и известного вещества хлорогеновой кислоты не дает депрессии температуры плавления.

В продуктах щелочного гидролиза обнаружено равное количество кофейной и хинной кислот.

Таким образом, полученные данные и сравнение их с известным веществом позволяет идентифицировать **фк-6** как **хлорогеновую кислоту**.

Вещество фк-7 с молекулярной формулой $C_{16}H_{18}O_9$ выделено в виде белого кристаллического вещества, растворимого в горячей воде, этаноле.

Электронный спектр вещества фк-6 имеет вид: $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH}$ 325, 300, 245; $\lambda_{\max}^{C_2H_5OH+NaOH}$ 371, 265; $\lambda_{\max}^{+AlCl_3}$ 350, 310, 244.

До обработки вещество имеет на хроматограмме голубую флуоресценцию, после обработки парами NH_3 зона адсорбции переходит в желто-зеленую, с диазотированной сульфаниловой кислотой и щелочью – желто-коричневая, с раствором $FeCl_3$ – синева-зеленая.

Вещество имеет совпадающие с хлорогеновой кислотой спектральные характеристики, однако отличается хроматографической подвижностью и временем удерживания на ВЭЖХ-хроматограммах.

На основании полученных результатов и сравнении с известным веществом соединение **фк-7** идентифицировано как **неохлорогеновая кислота**.

Таким образом, в результате исследования фенольного комплекса лядвенца рогатого методом колоночной хроматографии позволило выделить 11 флавоноидов, 5 кумаринов и 7 фенолкарбоновых кислот, структура которых установлена физико-химическими методами.

Далее для уточнения компонентного состава фенольного комплекса использовали метод ВЭЖХ-МС, который позволяет определять присутствие веществ, находящихся в объектах исследования в следовых количествах. Вещества на ВЭЖ-хроматограммах идентифицировали путем сравнения основных критериев, к которым относятся времена удерживания, максимумы поглощения УФ-спектров, величины m/z масс-спектров, сравнением с аналогичными данными известных образцов, данными литературы [13, 25, 138, 32, 172].

Предварительную информацию о присутствии в различных фракциях фенолокарбоновых кислот, кумаринов, флавоноидов получали из данных на УФ- спектрах (фенолкарбоновые кислоты дают максимумы в области 235-270 нм и 290-305 нм; оксикоричные кислоты в области 230-240 нм и 290-320 нм; флавоноиды в области 250-270 нм и 350-390 нм; кумарины в области 230-250 нм и 290-360 нм).

Для вычисления молекулярной массы вещества в случае образования псевдомолекулярного иона – $[M+H]^+$ в АРСІ, Pos. Scan., необходимо отнять единицу от максимального значения m/z интенсивного пика. Данные режима Pos. Scan. предоставляют исследователям информацию о наличии гликозидов, природе, характере гликозидной связи. В режиме АРСІ, Neg.Scan. при регистрации отрицательных ионов происходит депротонирование молекул, при этом из масс-спектров, записанных в этом режиме можно получить информацию о характере агликона. Для определения молекулярной массы в этом случае необходимо прибавить единицу к максимальному значению m/z интенсивного пика. Другие пики, которые могут присутствовать в масс-спектрах, относятся к фрагментам

молекулярного иона, это могут быть комплементные пики, образующиеся в результате присоединения ионных фрагментов систем растворителей.

Вещество со временем удерживания на ВЭЖ-хроматограмме 9.477 в УФ-спектре максимумы поглощения, относящиеся к флавонолам, при 264 и 365 нм. В масс-спектре (Neg. Scan.) (рис.3.2.2) присутствуют пики: молекулярного иона, имеющего m/z 609.1 с интенсивностью 18% фрагментарного иона, имеющего m/z 447.2 с интенсивностью 100%; и пика агликона, имеющего m/z 285.1 с интенсивностью 10%.

Полученная по УФ- и масс-спектрам информация позволила рассчитать молекулярную массу вещества (610.1), определить природу агликона кемпферола (285) и с максимальной для данного метода степенью вероятности позволяет предположить, что вещество со временем удерживания на ВЭЖ-хроматограмме 9.477 является **кемпферол -3,7-диглюкопиранозидом**.

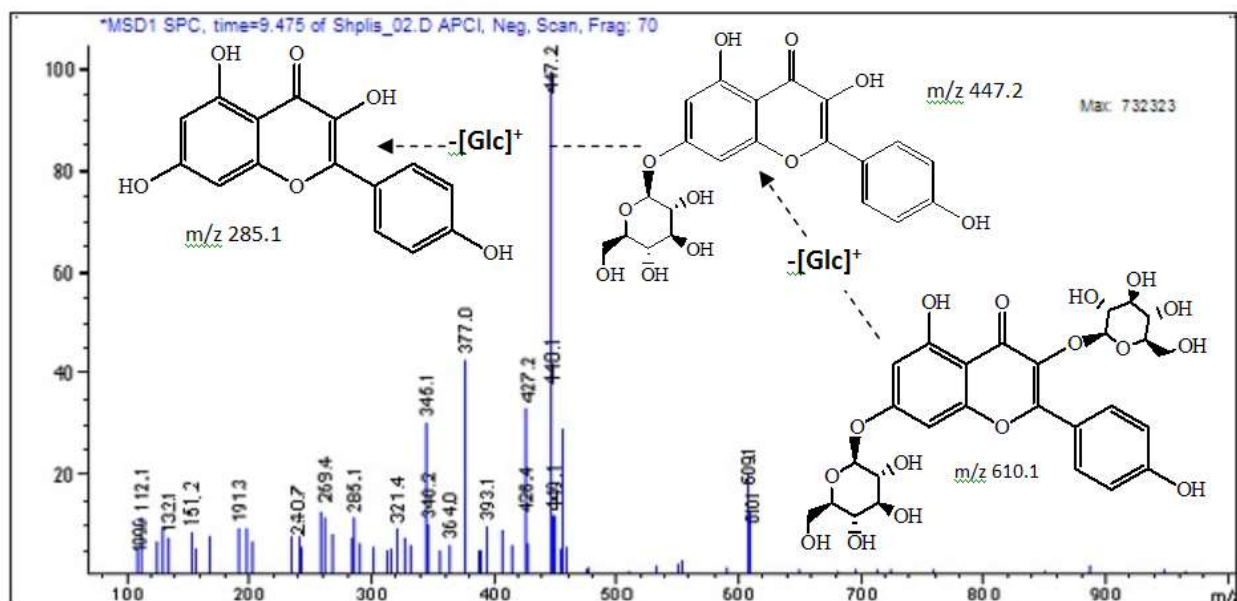


Рисунок 3.2.2 Масс-спектр (в режиме APCI Neg.Scan.) фрагментов молекулярных ионов кемпферол-3,7-диглюкопиранозида (m/z 610.1), кемпферол-7-глюкопиранозида (m/z 447.2), кемпферола (m/z 285.1)

Как и в случае с вышеописанным веществом, анализ максимумов поглощения УФ-спектра (264, 346 нм) вещества на хроматограмме со временем удерживания 17.405 мин. также позволили предположить

флавоноловую природу. В масс-спектре, записанном в режиме Neg.Scan (рис.3.2.3) это вещество образует пики: молекулярного иона с m/z 448.1 и интенсивностью 35%; депротонированной молекулы с m/z 285.1 и интенсивностью 10%, позволяющий подтвердить химическую структуру агликона (кемпферол). В масс-спектре, записанном в режиме Pos.Scan, наблюдали пики: метастабильного иона протонированной формы агликона, имеющего m/z 287.1, который образуется после углеводного фрагмента; и пик, относящийся к глюкозе с m/z 163.1.

Полученные результаты позволяют с максимальной степенью вероятности полагать, что вещество на хроматограмме со временем удерживания 17.405 мин является **гликозидом кемпферола, гликозидированным по 3 положению.**

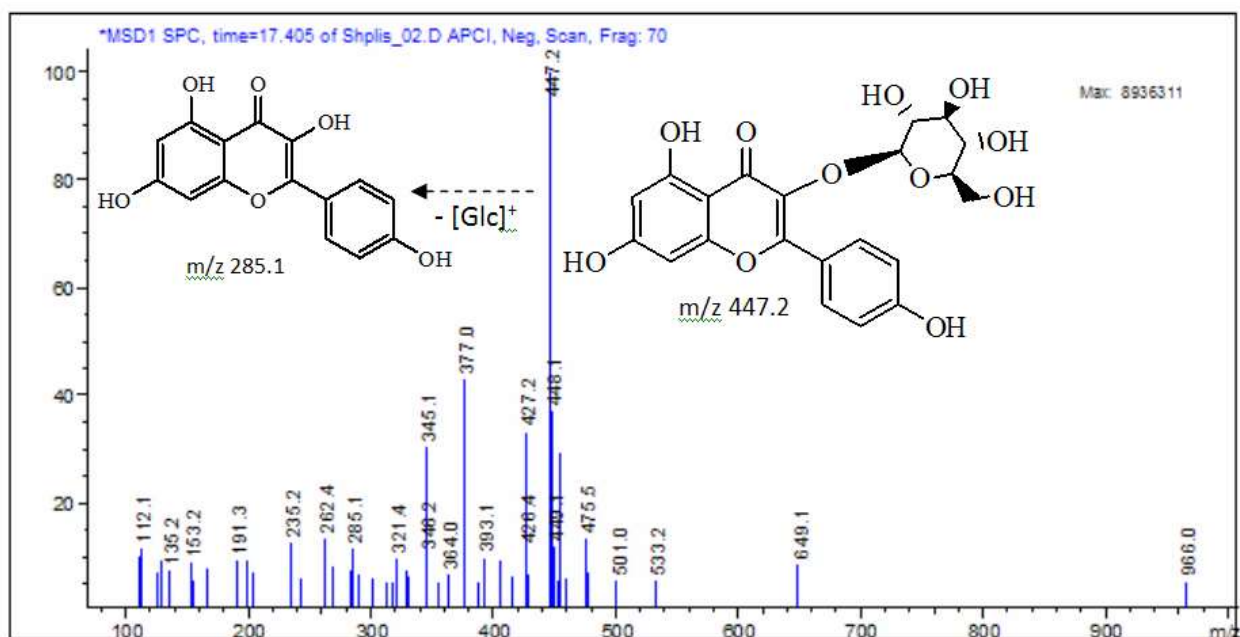


Рисунок 3.2.3 Масс-спектр (в режиме APCI Neg.Scan.) фрагментов молекулярных ионов кемпферол-3-глюкопиранозида (m/z 447.2), кемпферола (m/z 285.1)

Вещество со временем удерживания на ВЭЖХроматограмме 1.819-1.869 мин. образует в УФ-спектре максимумы поглощения 244 и 327 нм, характерные для кумаринов (рис. 3.2.4).

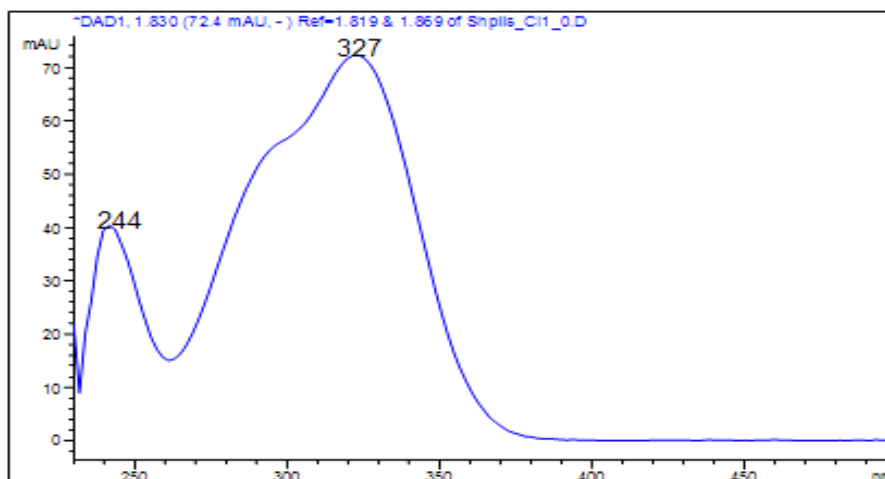


Рисунок 3. 2.4 УФ-спектр вещества со временем удерживания 1.819

В масс-спектрах в режиме АРСІ, Pos.Scan имеется пик молекулярного иона+протон $[M+H]^+$ с m/z 355,2 и интенсивностью 30%; в режиме АРСІ, Neg.Scan m/z 353,2 и интенсивностью 100%, соответствующий пику молекулярного иона-протон $[M-H]^+$ (рис. 3.2.5).

Оба этих масс-спектра позволяют получить точную информацию о величине молекулярной массы вещества, гликозидная природа которого подтверждается пиками молекулярных ионов в режиме АРСІ, Pos. Scan. с m/z 163.1 (100%), и с m/z 191,1 (29%) в режиме АРСІ, Neg. Scan (рис. 3.2.5), подтверждающим агликоновый остаток кумарина.

На основании полученных данных (УФ- и масс-спектры) получена информация, позволяющая с высокой степенью вероятности отнести пик вещества на ВЭЖХроматограмме со временем удерживания 1.819-1.869 мин.к 6-метокси-7-О-*D*-глюкопиранозилкумарину (скополину).

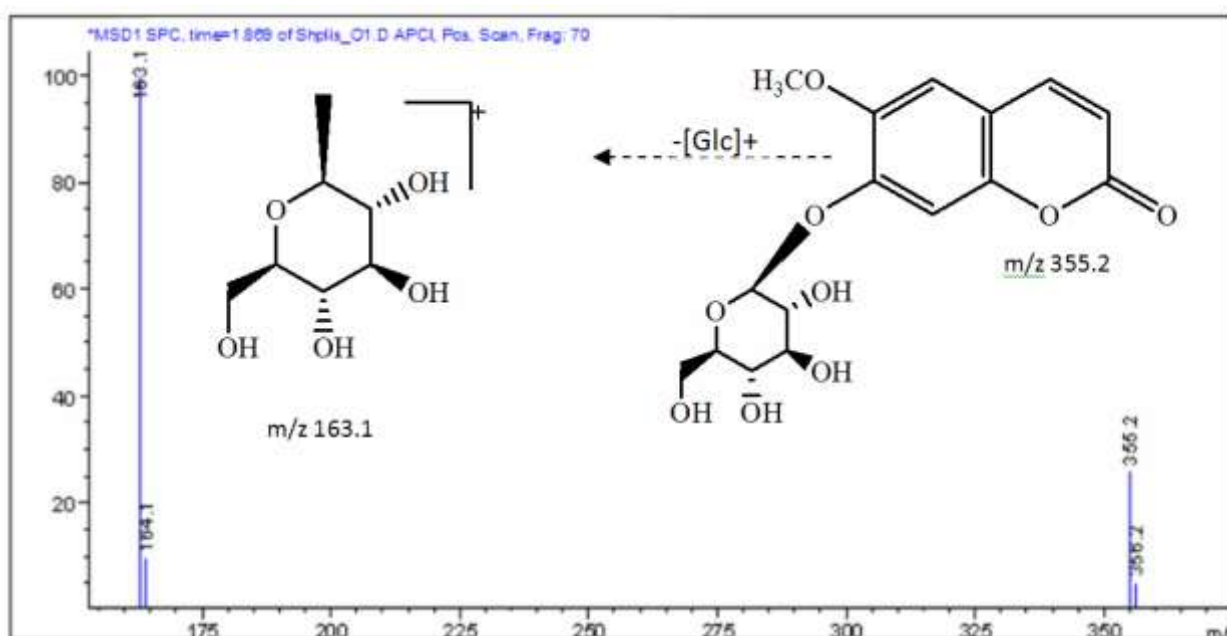
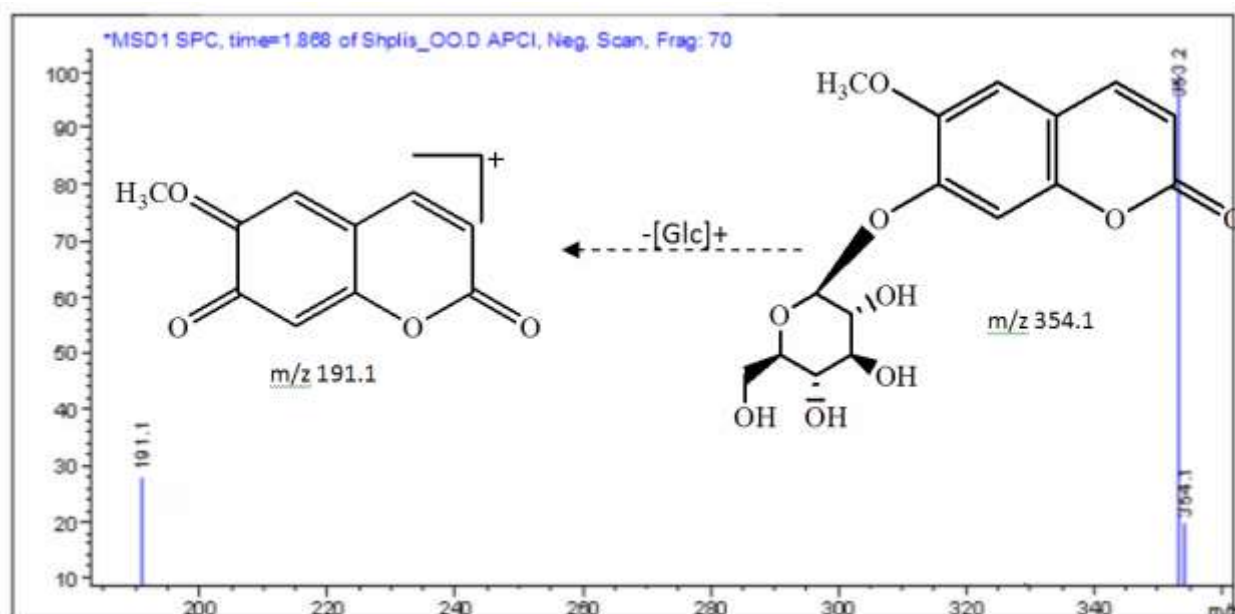


Рисунок 3.2.5 Масс-спектры (в режимах APCI, Neg. Scan.; APCI, Pos. Scan.) фрагментации молекулярного иона скополина

Полученная нами информация по УФ-, масс-спектрам вещества, дающего пики на ВЭЖхроматограммах со временем удерживания 8.266 мин. позволяет предположить, что оно относится к гликозидированному 7-положению галактопиранозиду кемпферола. Химическая структура агликона (кемпферола) подтверждается пиком фрагмента молекулярного иона с m/z 285.1 (Neg. Scan) и 287,1 (Pos.Scan.) (рис. 3.2.6).

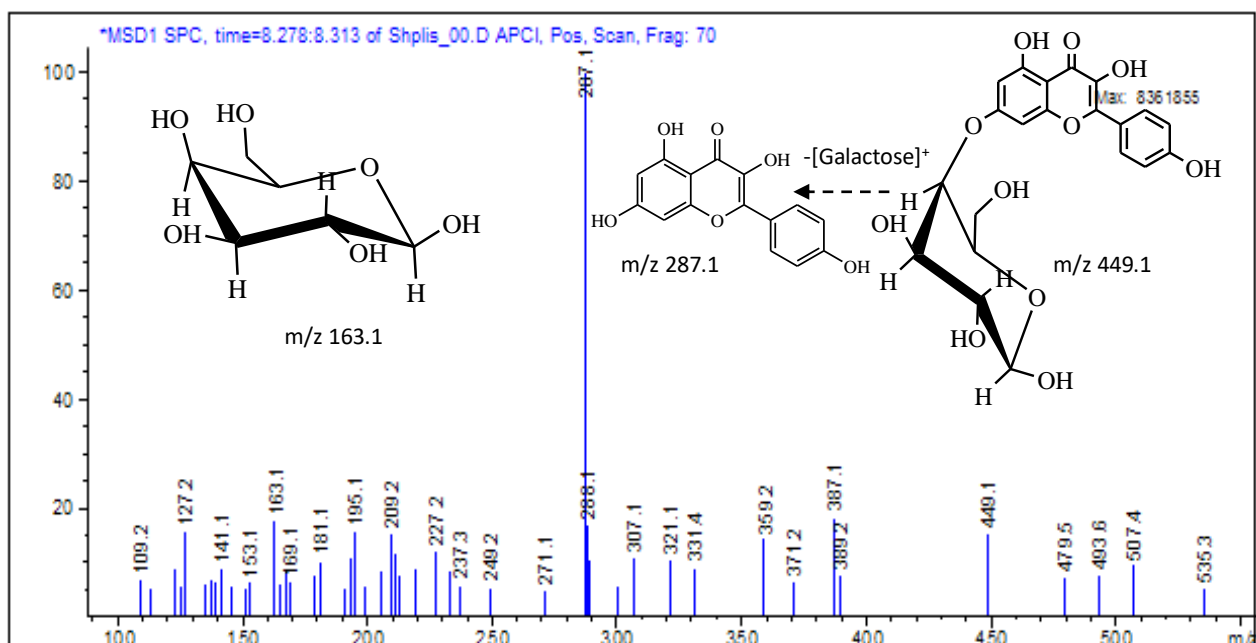


Рисунок 3.2.6 Масс-спектр (в режиме APCI, Pos. Scan.) фрагментов молекулярного иона кемпферола (m/z 287.1) и кемпферол-7-О- β -D-галактопиранозида (m/z 449.1)

В масс-спектре вещества со временем удерживания в режиме APCI, Neg. Scan. на ВЭЖ-хроматограмме 6.210 отмечен пик с m/z 447.1 и интенсивностью 100%, соответствующий молекулярному иону $[M-H]^+$ (рис.3.2.7) и совпадающий с масс-спектром известного вещества керцитрина. В масс-спектре в режиме APCI, Pos. Scan. у этого вещества и стандартного вещества кверцитрина присутствовали пики, имеющие m/z 303.1, и соответствующие фрагменту молекулярного иона – кверцетина в протонированной форме (рис. 3.2.7). Таким образом, полученная из масс-спектров информация позволила рассчитать величину молекулярной массы вещества (448.1), и предоставила информацию о природе агликона (кверцетин, 302.1).

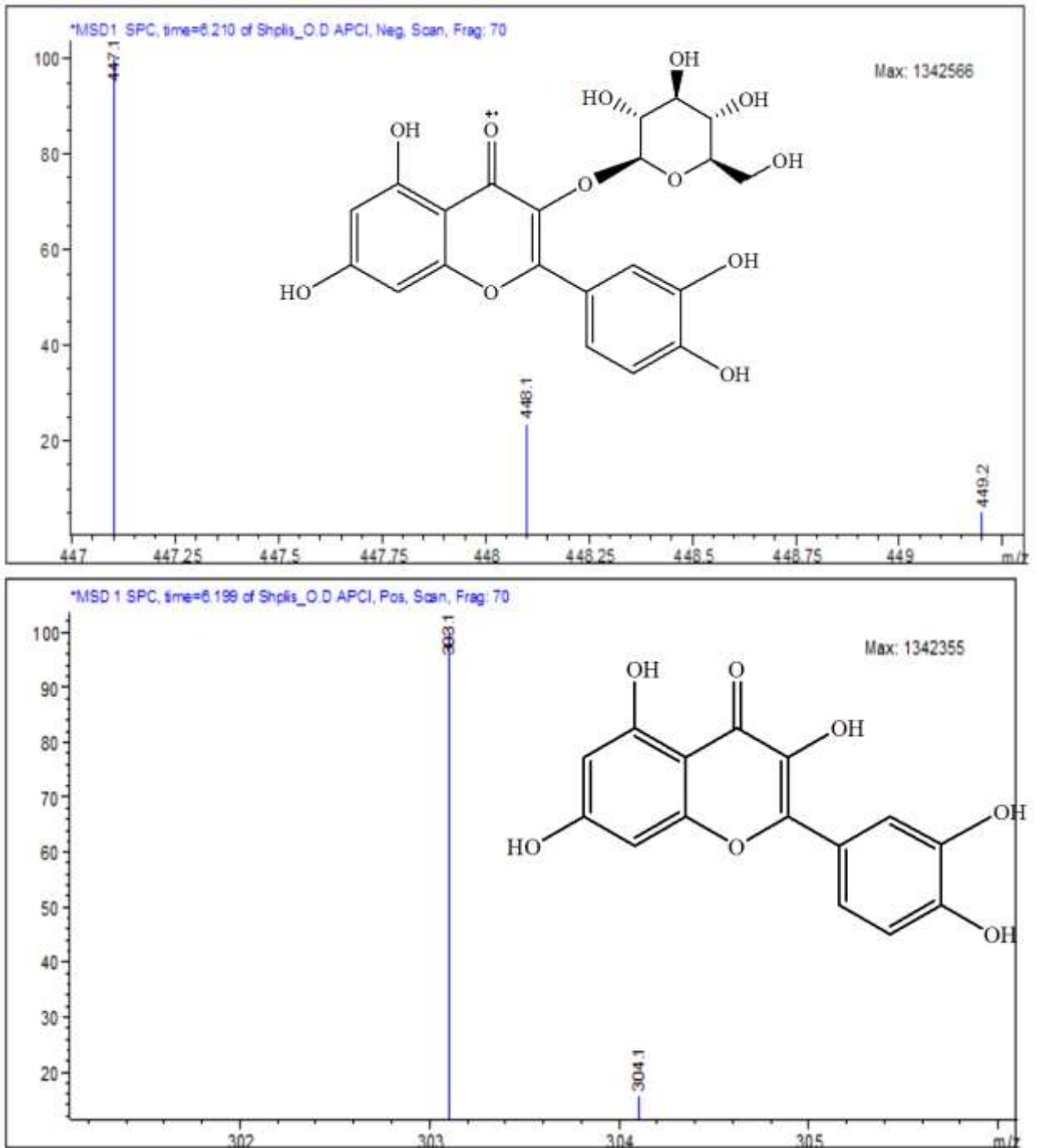


Рисунок 3.2.7 Масс-спектры (в режимах APCI, Neg. Scan.; APCI, Pos. Scan.) фрагментации молекулярного иона кверцетрина

Таким образом, исследование, проведенное методами классической структурной химии и современными методами ВЭЖХ, ВЭЖ-хромато-масс-спектрометрии, позволило установить наличие 26 веществ, в том числе 6 кумаринов, 13 флавоноидов, 7 фенолкарбоновых кислот.

3.3. Исследование элементного состава

Химические элементы растений находятся в наиболее доступной органически связанной форме, физиологичном соотношении компонентов, которые попадая в организм человека играют значительную роль в обеспечении его жизнедеятельности, входя в состав ферментов, участвуя в обеспечении прочности соединительных тканей, обменных процессов, построении клеточных мембран, и др. функциях [71, 95,152].

Изучение состава макро- и микроэлементов растений имеет значение с разных точек зрения. С теоретической, научной точки зрения знания о составе элементов могут являться дополнительным хемотаксономическим признаком видов, семейств, родов, что подтверждается многочисленными исследованиями того, что растения поглощают элементы избирательно, в соответствии с выработанной и закрепленной эволюционно характерной химической конституцией и в зависимости от систематического положения. [55, 97, 140, 141, 151, 167].

Практическая составляющая интереса к изучению элементного состава связана с одной стороны, с ролью макро- и микроэлементов в обеспечении здоровья и жизнедеятельности человека и животных. С другой стороны, этот интерес связан с тем, что некоторые растения способны избирательно поглощать тяжелые металлы, представляя опасность для здоровья. Поэтому уровень накопления элементов может говорить о степени экологической чистоты сырья и возможности получения препаратов на его основе [29-31, 38, 91, 95].

Как уже отмечалось в обзоре литературы, сведения о составе макро- и микроэлементов дикорастущих и культивируемых видов и сортов лядвенца рогатого фрагментарны [108, 199]. В нескольких публикациях приведены данные о содержании некоторых элементов, при этом чаще всего упоминаются такие как натрий, калий, магний, кальций, цинк, хром, фосфор, железо, никель [108,123,199]. Содержание в лядвенце рогатом металлов,

относящихся к группе тяжелых, в исследованиях отечественных и зарубежных авторов не изучалось.

Нами было проведено исследование состава элементов в золе надземной части лядвенца рогатого культивируемого, методами НАА и ПФ (гл.2).

Результаты, приведенные в таблице 6 представляют собой средние значения в трехкратной повторности по трем годам наблюдения с 2014 по 2017 гг. и показывают присутствие в надземной части лядвенца рогатого 31 элемент, из которых 9 биогенных (K, Ca, Na, Zn, Fe, Cr, Co, As, Br), 6 жизненно необходимых (Ca, K, Fe, Na, Co, Zn) и 4 условно необходимых (Br, Cr, Cd, As) [18, 20, 62, 202].

Более подробно материал изложен в нашей статье в «Химия растительного сырья. – 2020. – №1.– С. 237 – 244». Согласно нашим данным в надземной части лядвенца рогатого преобладают макроэлементы (K, Ca и Na), микроэлементы (Fe, Sr, Br, Ba и Rb). При сравнении полученных нами данных с данными литературы отмечено, что по содержанию K, Ca и Na лядвенец рогатый сорта Солнышко, культивируемый в Томской области значительно превосходит культивируемый в Брестской области лядвенец сорт Московский-287 и дикорастущий в Пакистане лядвенец рогатый [123,199].

Экспериментально полученные значения тяжелых металлов (ТМ) в лядвенце рогатом сравнивали с нормативами, приведенными в ОФС ГФ XIV, СанПине [17, 24,111] и установили, содержание ТМ не превышает допустимых значений и это говорит о безопасности сырья и его экологической чистоте. Такое сырье может быть использовано для получения различных видов продукции для использования в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и др.

В связи с тем, что лядвенец рогатый впервые культивируемый в Томской области представляет интерес не только для получения продукции для человека, но и для агропромышленного комплекса, хорошо развитого в

Сибирском федеральном округе, нами проведено сравнение содержания тяжелых металлов в сырье с нормативами ВСНиТ, ВМДУ для кормов [136], которое показало превышение по содержанию *Zn* и *Co*. Данный факт с нашей точки зрения может быть объяснен природным генезисом темно-серых кислых оподзоленных почв Томской области богатых *Zn* (табл. 7). Опасность избыточного поступления цинка в организм животных может приводить к их хроническому отравлению.

Таблица 7. Среднее содержание элементов в культивируемом лядвенце рогатом, мг/кг

элемент / образец / нормы	надземная часть лядвенца рогатого (сорт «Солнышко»)	Максимально допустимый уровень ¹			БАД ²	ПДС ³
		Крупный рогатый скот откорм.	Крупный рогатый скот молочн.	грубые и сочные корма		
*Ca, %	9,05±0,81	-	-	-	-	-
*K, %	28,30±2,50	-	-	-	-	-
*Na, %	0,36±0,03	-	-	-	-	-
*Fe, %	0,09±0,008	200,0	100,0	100,0	-	-
*Zn	264,35±23,11	100,0	50,0	50,0	-	-
Sr	603,24±57,25	-	-	-	-	-
Br	360,6±32,13	-	-	-	-	-
Cs	1,17±0,10	-	-	-	-	-
***Pb	0,08± 0,007	5,0	3,0	5,0	6,0	6,0
***Cd	0,09±0,008	0,4	0,3	0,3	1,0	1,0
Rb	198,2±19,11	-	-	-	-	-
**Cr	0,15±0,01	1,0	0,5	0,5	-	-
Au	0,027±0,002	-	-	-	-	-
Co	1,59±0,15	3,0	2,0	1,0	-	-
Ba	213,21±20,13	-	-	-	-	-

As	<0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5
Sm	0,24±0,02	-	-	-	-	-
Lu	0,0081±0,0007	-	-	-	-	-
U	0,21±0,009	-	-	-	-	-
Th	0,20±0,01	-	-	-	-	-
Yb	0,084±0,008	-	-	-	-	-
Hf	0,11±0,01	-	-	-	-	-
Nd	0,78±0,07	-	-	-	-	-
Ag	0,17±0,015	-	-	-	-	-
Ce	2,01± 0,19	-	-	-	-	-
Tb	0,057± 0,005	-	-	-	-	-
Sc	0,26± 0,021	-	-	-	-	-
Ta	0,02±0,001	-	-	-	-	-
Eu	0,07± 0,004	-	-	-	-	-
La	2,80± 0,21	-	-	-	-	-
Sb	0,09± 0,01	1,0	0,5	0,5	-	-

Примечание: МДУ¹ – «Временный максимально допустимый уровень (МДУ) содержания некоторых химических элементов и госсипола в кормах для сельскохозяйственных животных и кормовых добавках» и «Ветеринарно - санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных»; БАД² - биологически активная добавка в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01; ПДС³ – предельно допустимое содержание в соответствии с ОФС 1.5.3.009.15.

Выводы к Главе 3

С помощью классических, общепринятых, современных методов впервые изучен химический состав травы лядвенца рогатого культивируемого в Томской области.

Установлено, что основными группами БАВ для исследованного вида являются полисахариды, фенолокислоты, флавоноиды, изофлавоноиды, дубильные вещества, аминокислоты и сапонины.

Результаты хроматографического анализа этанольного экстракта, бутанольной, этилацетаной фракций, водных остатков, позволили по

характерной окраске пятен в УФ- и видимом свете до и после проведения качественных реакций, значениям R_f в сравнении с известными веществами и данными литературы идентифицировать 30 компонентов из разных групп БАВ (двадцать два вещества фенольной природы, один сапонин, четыре аминокислоты и три углевода).

Методом ВЭЖХ было установлено присутствие 19 соединений, 5 из которых являются мажорными, одним из которых является изофлавоноид биоханин А. Дополнительно данным методом обнаружены галловая кислота, ононин и кверцитин.

Исследование состава фенольного комплекса методом колоночной хроматографии в сочетании с хроматографическими, физико-химическими и спектральными методами позволило выделить и установить структуру 24 веществ фенольной природы, из которых 11 флавоноидов (популлин, астрагалин, трифолин, изокверцитрин, кверцитрин, гиперозид, морин-3-О-D-галактопиранозид, кемпферол-3-О-7-О-диглюкозид, формонетин, генистеин, биоханин А), 7 фенолкарбоновых кислот (протокатеховая, п-кумаровая, галловая, кофейная, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая), 6 кумаринов (изоскополетин, скополетин, умбеллиферон, эскулетин, скимин, скополин).

Для подтверждения/уточнения состава фенольных соединений использован современный метод высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии. Этим методом подтверждено наличие веществ, структура которых была ранее установлена классическими физико-химическими, хроматографическими и спектральными методами. Кроме того, дополнительно установлено присутствие в лядвенце культивируемом в Томской области 7-О-D-глюкозида скополетина (скополин).

Таким образом, исследование, проведенное методами классической структурной химии и современными методами ВЭЖХ, ВЭЖ-хромато-масс-спектрометрии, позволило установить наличие 34 веществ, в том числе 6

кумаринов, 13 флавоноидов, 7 фенолкарбоновых кислот, 1 тритерпенового сапониона, 4 аминокислот, 3 моносахаров.

Также установлено, что культивируемый в Томской области вид по составу фенольных соединений, набору макро-, микроэлементов отличается от лядвенца рогатого из других регионов (культивируемых и дикорастущих в Брестской области, Пакистане, Италии, Бразилии), в которых идентифицировано большое количество разнообразных моно-, и дигликозидов кверцетина и кемпферола. В нашем исследовании показано, что культивируемый в сибирском регионе лядвенец сорта «Солнышко» преимущественно накапливает изофлавоноиды, главным образом, биоханин А, в связи с чем изофлавоноиды можно рассматривать в качестве маркеров для этого вида, что использовано нами в проекте ФС в методике ТСХ, и методике стандартизации сырья спектрофотометрическим методом.

Оценка элементного состава листьев и стеблей лядвенца рогатого культивируемого в Томской области показала присутствие 31 элемента (*Ca, Na, K, Zn, Fe, Sm, Ce, Lu, Th, U, Cr, Au, Yb, Sr, Hf, Ba, Nd, As, Ag, Br, Tb, Rb, Cs, Sc, Ta, Co, Eu, Pb, Sb, La, Cd*). При этом для исследованного вида отмечены более высокие концентрации *Ca, K, Na* и *Zn*, по сравнению с данными, приводимыми в литературе по лядвенцу из других регионов.

Анализ полученных результатов по содержанию тяжелых металлов в культивируемом в Томской области лядвенце показал соответствие требованиям ГФ, СанПиН по безопасности. Однако заслуживает внимания и тот факт, что по содержанию *Zn* и *Co* культивируемый в Томской области лядвенец не соответствует требованиям «Временный максимально допустимый уровень (МДУ) содержания некоторых химических элементов и госсипола в кормах для сельскохозяйственных животных и кормовых добавках» и «Ветеринарно - санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных», что необходимо учитывать производителям сельхозпродукции, «разбавляя» рецептуры кормов другими видами растений.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНАТОМИЧЕСКИХ (МИКРОСКОПИЧЕСКИХ) ПРИЗНАКОВ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО

Как известно, необходимость изучения морфологических и анатомических (микроскопических) особенностей растений обосновано с научно-практической точки зрения. К их числу относятся: уточнение систематического положения вида, изучение онтогенеза, строения, связи между структурой и функцией, растением и внешней средой, определение характерных диагностических особенностей вида с целью подтверждения подлинности и отличий от систематически близких видов и включения полученной информации в нормативные документы. Дополнительную особую значимость пересмотр и уточнение морфологических, анатомических признаков приобретает в случае крайнего полиморфизма видов, что имеет непосредственное отношение к объекту нашего исследования.

Как уже было отмечено ранее, информации о морфологических особенностях видов рода *Lotus* L., в т.ч. лядвенца рогатого в литературе представлено достаточно [108,115,123,158,160-162], с точки зрения его ботанической идентификации в природе, в гербаризированном виде. Однако эти описания значительно отличаются от тех, которые необходимы для представления в нормативных документах.

Что касается исследований анатомического (микроскопического) строения культивируемых и дикорастущих видов, то нами отмечено, что они единичны [146,181]. В данных публикациях авторы представляют информацию в традиционном для ботанических исследований стиле, изучая и описывая поперечные срезы подземных органов и листьев, при этом выращиваемых не в естественных условиях под «открытым небом». При разработке нормативной документации в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных

растительных препаратов», и ОФС «Травы» необходимо представлять детальное описание не только препаратов поперечных срезов, но и препаратов с поверхности для цельного сырья, а также для измельченного сырья дополнительно еще препаратов цветков и плодов/семян [24].

Сведений об изучении микроскопического и морфологического строения культивируемого на территории России лядвенца рогатого в доступной нам литературе, включая международные базы данных Scopus, WoS и др. не обнаружено.

В связи с вышеизложенным следующая задача нашего исследования состояла в выявлении характерных диагностических морфологических и микроскопических признаков *Lotus corniculatus* L, сорта «Солнышко» впервые культивируемого в Томской области.

В качестве материала для исследования морфологических и микроскопических признаков использовали образцы сырья, заготовленные в фазу бутонизации - начала цветения в 2014 - 2017 гг. Анатомические признаки изучали в соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Государственной Фармакопеи XIV издания [24].

Кроме того, дополнительно, нами для подтверждения присутствия ряда групп БАВ, были использованы микрохимические реакции на антоцианы; дубильные вещества [37].

4.1 Морфологическое строение лядвенца рогатого

Морфология стебля. Стебель представлен основным хорошо развитым побегом, ветвящимся, цилиндрическим в поперечном сечении, с гладкой, ребристой поверхностью (рис. 4.1.2 Г). В активную фазу вегетации – цветения, длина основного стебля достигает в среднем от 75 до 85 см (рис. 4.1.1). Вместе с основным побегом развиваются боковые побеги, которые



Рисунок 4.1.1. Биометрические характеристики *Lotus corniculatus* L. культивированного в Томской области

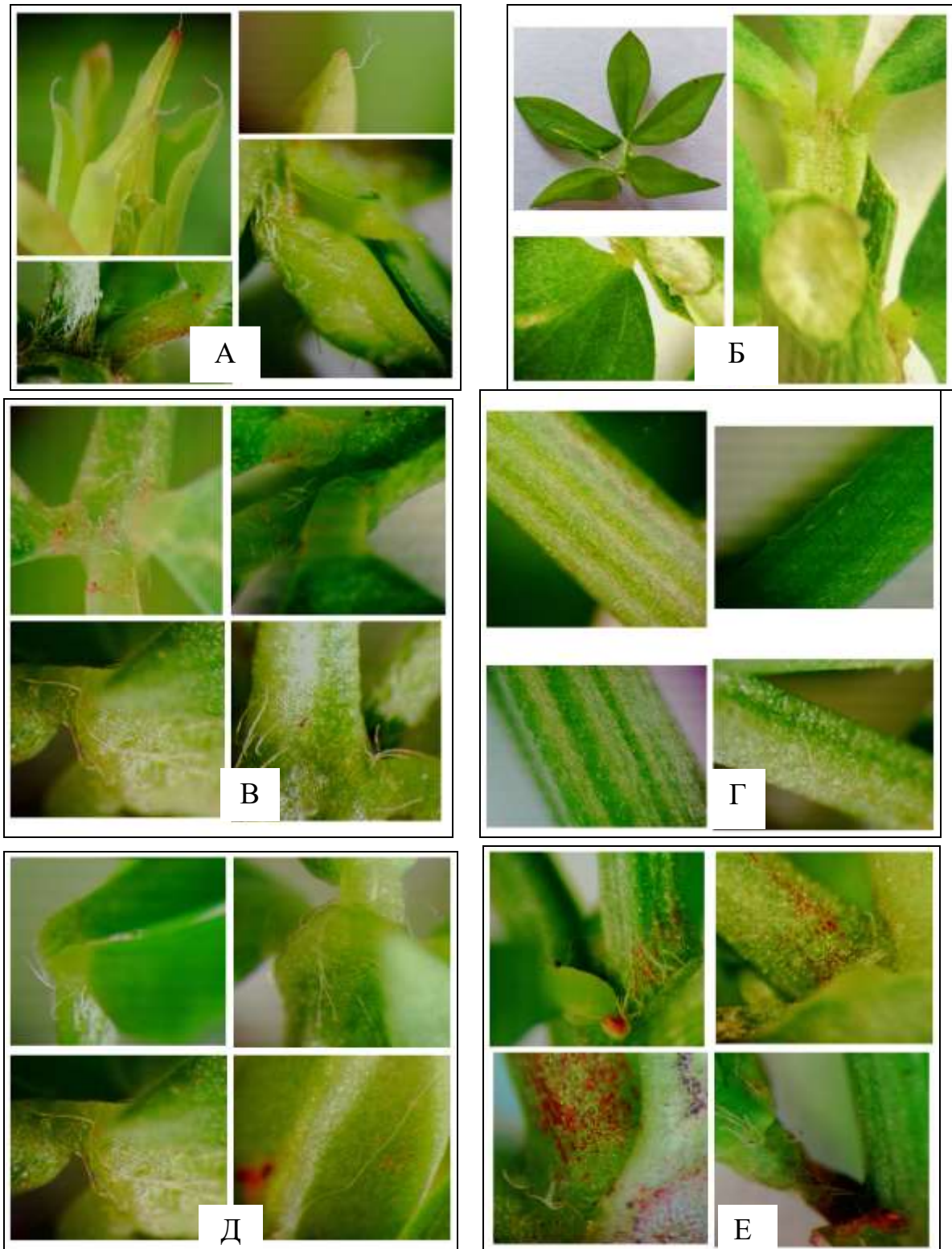


Рисунок 4.1.2. Фрагменты вегетативных органов *Lotus corniculatus* L.: А – раскрывающийся молодой лист (16х); Б – лист (8,16х); В – лист с локальным опушением на черешке и между верхними листовыми пластинками, черешочек имеет округло-крылатую форму, верхние листовые пластины с опушением (вид сверху 16х); Г – стебель с неявно выраженными ребрами до 6 междоузлия и четко выраженной ребристостью к 12 междоузлию (8-12 граней), с низким опушением и с чередованием цвета полос темно-, светло-зеленого (8х); Д – листовые пластины с опушением (вид снизу 16х); Е – междоузлия с опушением (8,16х).

иногда обгоняют основной по размерам. Кроме боковых побегов, из пазушных почек развиваются дополнительные побеги, общее число может достигать 4 и более. Диаметр побегов варьирует от 0,3 до 0,6 см. Стебли равномерно облиственны, листорасположение очередное, разветвленность высокая по всем стеблям (4.1.1). Слабое опушение, встречается в междоузлиях и узлах (рис. 4.1.2 Е). Впервые нами обнаружено низкое опушение всех стеблей, а также изменение формы – от круглой (1 – 5 междоузлия включительно) до ребристой (к 12 междоузлию) и изменение цвета (4.1.2.Г) Стеблевая розетка плотная. Свежее сырье снаружи имеет светло – зеленую окраску; сухое: бледно – зеленую, зеленую, желтовато-зеленую, зеленовато – желтую; на изломе: серовато – или желтовато – белую. Запах ароматный.

Морфология листа. Листья зеленые или серовато-зеленые, черешковые, состоят из пяти листочков (рис.4.1.2 Б). 3 верхних листочка обратнойцевидные (рис.4.1.2 В), реже узкояйцевидные (два боковых верхних слегка косые), листочки нижней пары косояйцевидные. Размер верхнего листка составляет 12,4-13,8 × 6,5-7,4 мм на листьях в средней части побега и 10-12, 7 × 4,7–5,4 мм на листьях в верхней части побега, непарно-перистые. Нами было выявлено, что листья с обеих сторон имеют низкое опушение (рис.4.1.2 В, Д), а также что молодые раскрывающиеся листовые пластины и черешочки имеют высокую степень опушения (рис.4.1.2 А), ранее данный факт в литературе не описан. Нижние 2 листочка отставлены от верхних (рис. 4.1.2Б), находятся у основания черешка и напоминают прилистники. Запах ароматный.

Морфология цветка. Цветки зигоморфные, венчик мотылькового типа, не крупные, обоеполые, длиной 9-16мм, собраны по 2–5 в зонтиковидные соцветия, на отдельных цветоносах, выходящих из пазух листьев (рис. 4.1.3).

Флаг ярко-желтого цвета от 8,5 до 13,5 мм с ярко – коричневыми горизонтальными линиями по срединной плоскости ноготка (рис. 3). Весла

цветка имеют желтую окраску с коричневыми краями средние размеры 0,4 – 0,65 см х 0,9 – 1,3 см, сросшиеся лепестки кия имеют менее насыщенный бледно – желтый цвет. Андроцей представлен 10 – ю тычинками, сросшимися в две группы по 5 и 4 (двубратственный) и одна свободная, гинецей представлен одним плодолистиком, пыльник цветка двухгнездный. Цветоножки волосистые (4.1.4 В).



Рисунок 4.1.3. Строение цветка *Lotus corniculatus* L.: А 1– весла (крылья); 2 – флаг (парус) (10х); Б – венчик мотылькового типа (5х); В – киль (лодочка) (10х); Г – тычинки (10х).

Чашечка. Чашечка коническая, темно-зеленая почти правильная, с ланцетно-шиловидными 3 – мя верхними зубцами и 2 – мя нижними, длиной от 1,8 -3,5 мм (рис. 4.1.4 Б), покрыта средней или низкой плотности трихомами слегка или сильно раскидистые, длиной 0,1-1,2 мм. По краям широкой части зубцов чашечки развиваются распространяющиеся трихомы средней плотности длиной 0,1-0,5 мм (рис. 4.1.4 А, Б).

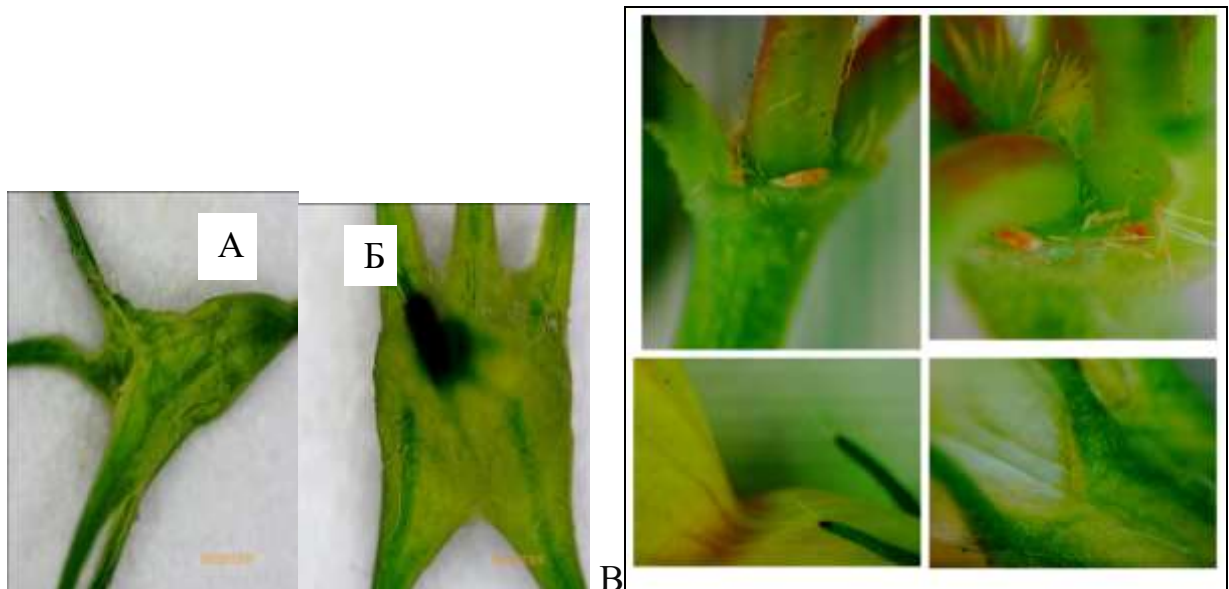


Рисунок 4. 1. 4 Фрагменты генеративных органов *Lotus corniculatus* L.: А – чашечка цветка – вид с боку (25х), Б – вид сверху (25х), В – фрагменты органов с опушением (16,24 х).

Плод. Простой верхний монокарпный сухой многосемянный цилиндрический боб длиной 2 – 3,5 см, прямой, слегка дуговидно согнутый, голый, с двумя створками и на конце крючковатым носиком, неясносетчатый или поперечно-морщинистый, самораскрывающейся (растрескиваются) в период полного созревания, створки после растрескивания спирально закручиваются (рис.4.1. 5).

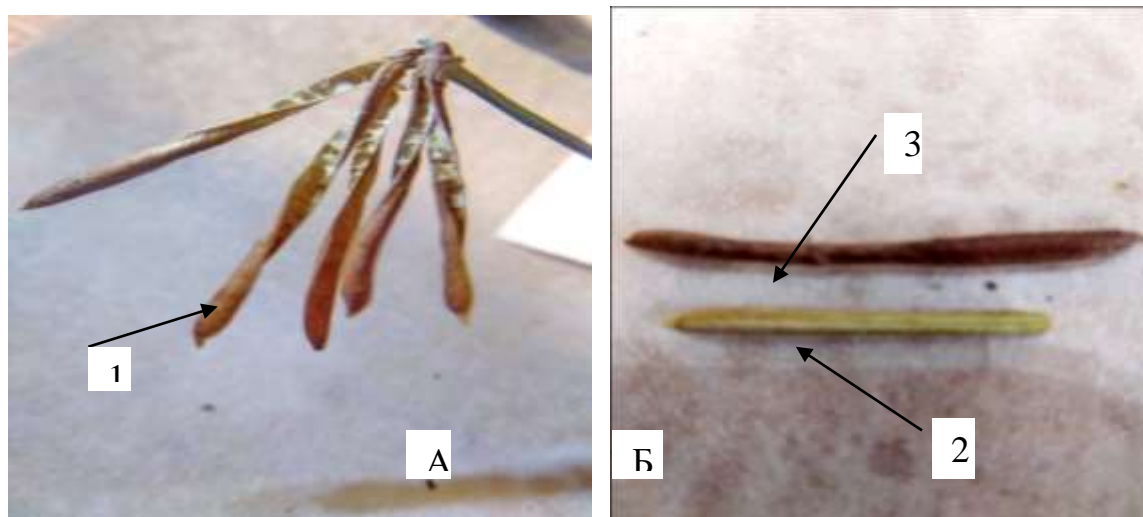


Рисунок 4.1.5. Плод *Lotus corniculatus* L.: 1 – самораскрывающиеся створки боба (3х); 2 – незрелый боб; 3- зрелый боб (3х).

Семена. У *Lotus corniculatus* L. сорт «Солнышко» семена имеют шаровидно-дисковидную или шаровидно-треугольно-дисковидную форму, на боковой стороне яйцевидные или треугольноватые, редко округлые; на хилевой стороне яйцевидные. Цвет семенной кожуры варьирует от светлотусклого коричневого до темно-коричневого-блестящего с различной формой пятнистости и гладкой поверхностью; характерным для семенного материала лядвенца, сорт «Солнышко», является выпуклая корешковая доля; средний размер семян: l – 1,2–1,4 мм, d – 1,0–1,3 мм, s – 0,9–1,1 мм (рис. 6), толстая одревесневшая оболочка (твердосемянность), способствует длительному сохранению репродуктивности семян.

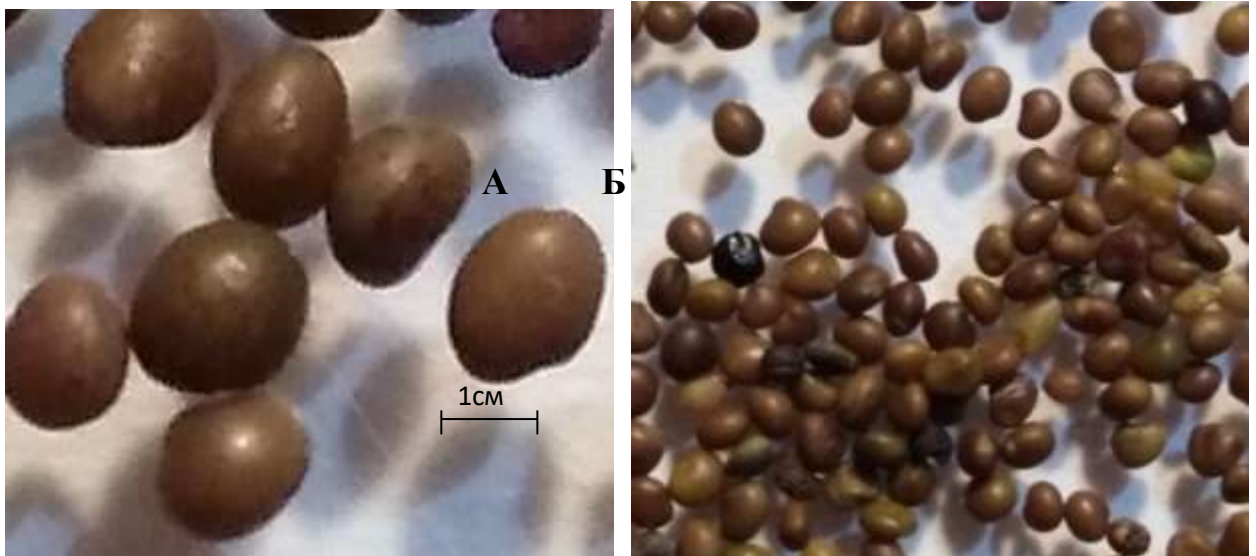


Рисунок 4.1.6. Семена *Lotus corniculatus* L.: А – размер семени растения (100х); Б – общий вид семян сорта «Солнышко» (50х).

Корни (рис. 4.1.7 А-4.1.7 В). Цилиндрические слегка суживающиеся к концу толщиной до 5 см. Поверхность корней продольно-бороздчатая с отслаивающимися длинными, мягкими лубяными волокнами и темными чешуистыми – следами. Излом снаружи волокнистый, в центре зернисто-шероховатый. Цвет корня снаружи и в изломе белый, желтовато-белый.

Корневая система у *Lotus corniculatus* L. сорт «Солнышко» – стержневая, мощная, главный корень с боковыми разветвлёнными корнями глубоко проникающая в почву на 1-2 м (рис. 4.1.7Б). На корнях расположены

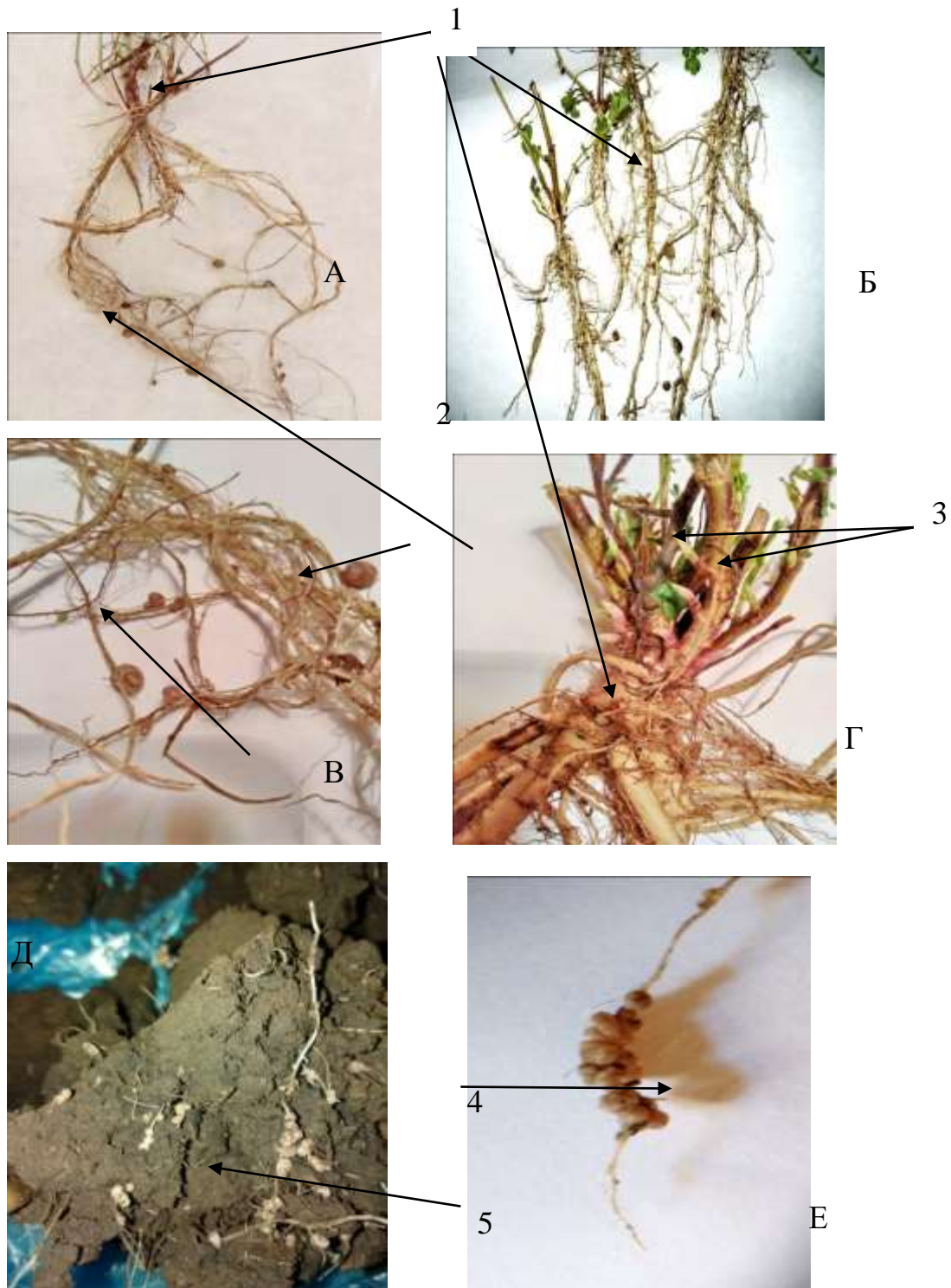


Рисунок 4.1.7. Морфология корня *Lotus corniculatus* L.: А, Б, Г – 1-главный корень (3х); А, В – 2- боковые корни (5х); Г – 3-зимующие почки (3х); В, Е – 4-клубеньки азотфиксирующих бактерий *Rhizobium lotus* (5х); Д – 5-расположение клубеньков по почвенному профилю (2х).

клубеньки азотфиксирующих бактерий *Rhizobium lotus* (рис. 4.1.7В), поглощающих азот из воздуха, переводя его в связанное состояние.

4.2 Микроскопические признаки травы лядвенца рогатого

Установленные анатомо-диагностические признаки, описанные ниже, подтверждены достоверными микрофотографиями (рис. 4.2.1 – 4.2.8).

Микроскопия листа. На плоскостных препаратах листа лядвенца клетки эпидермиса верхней стороны имеют резко извилистые очертания с характерными четковидными утолщениями на углах. Эпидермальные клетки дорсальной стороны листа меньше, прямостенные многоугольные. Лист дорсовентральный амфистамотического типа с типичным устьичным аппаратом для двудольных. Количество слоев в палисадной ткани колеблется от 2 до 3, в губчатом до 5. Устьица погруженные, анизацитного типа (рис. 4.2.1 А) и реже аномоцитного. Полученные нами результаты исследований отличаются от результатов в сообщениях, в которых говорится о наличие у *Lotus corniculatus* L. только анизоцитного или аномоцитного типа строения [54,146,181]. Больше количество устьиц встречается на нижней стороне листа. По краю листа отмечается утолщение клеточных стенок эпидермиса покрытым толстым кутикулярным слоем. В нашем исследовании впервые для лядвенца рогатого обнаружена многорядная кристаллоносная обкладка, локализуемая по главной жилке листа (рис. 4.2.2 Б).

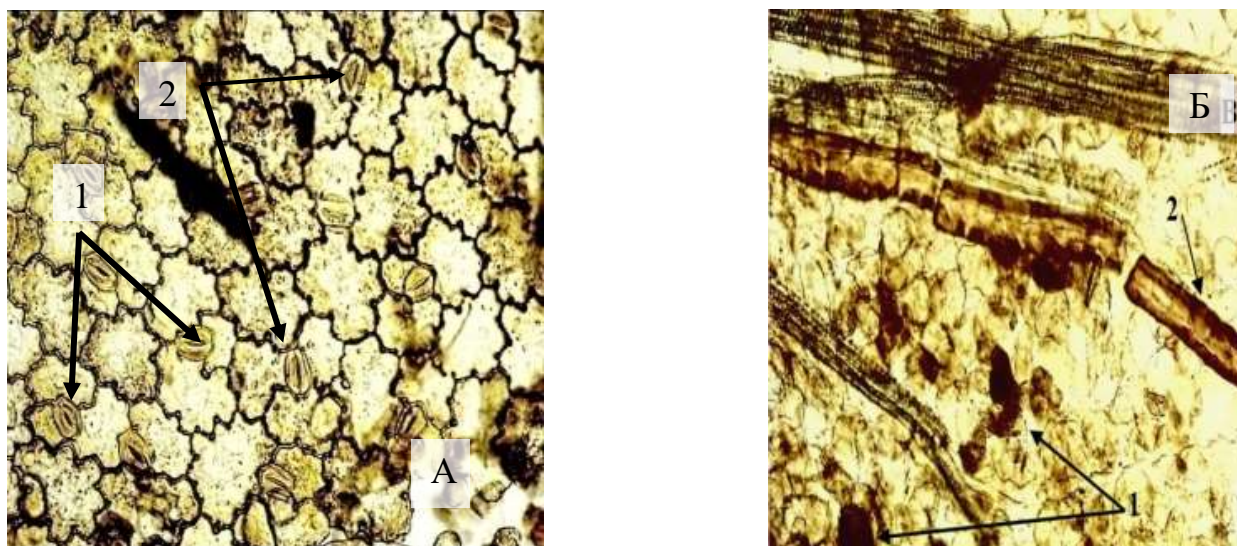


Рисунок 4.2.1 Фрагмент плоскостного препарата листа *Lotus corniculatus* L.: А 1-анизоцитный, 2-аномоцитный - тип устьичного аппарата (150х); Б 1-клетки – идиобласты с флорафенами (150х); 2-млечники (150х).

Обнаружены клетки-идиобласты, содержащие флобафены (рис. 4.2.1Б), располагающиеся однослойно непосредственно под эпидермой, формирующие в присутствии хлорного железа типичное для дубильных веществ черно-синее окрашивание. Также установлено наличие в листьях млечников, сопровождающих жилки листа с оранжево-коричневым содержимым, а по краю листа клетки с содержимым в виде антоцианов (4.2.2 А), образующих вишнево-красное окрашивание при добавлении раствора натрия гидроксида.

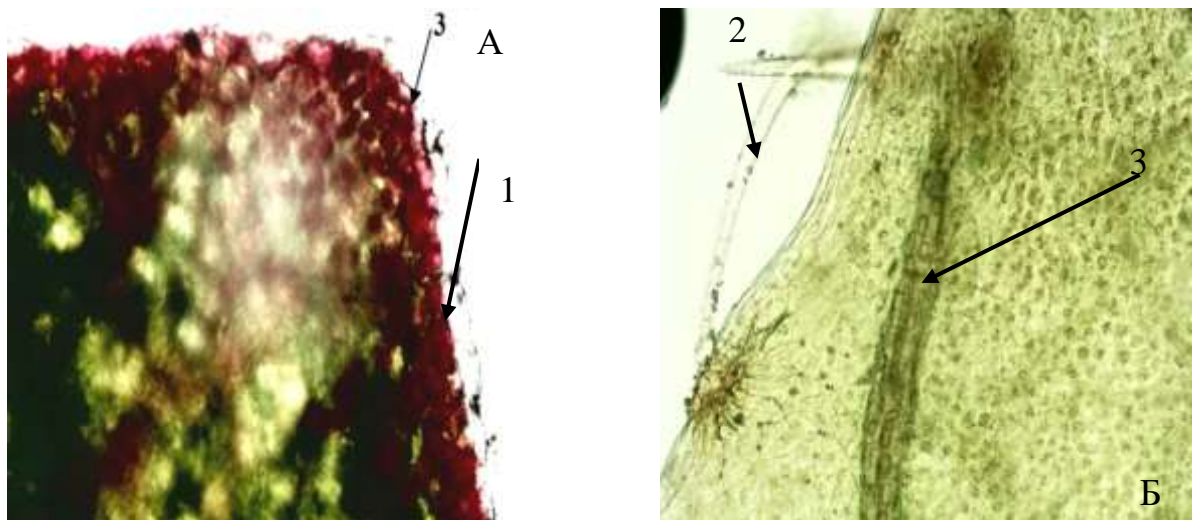


Рисунок 4.2.2 Фрагмент плоскостного препарата листа *Lotus corniculatus* L.: А 1-антоцианы (150х); Б 2-простой волосок (150х); 3-многорядная кристаллоносная обкладка (200х).

На обеих сторонах листа по краю листовой пластинки выявлены булавовидные волоски. (рис. 4.2.3 А). Как видно на рисунке 4.2.3.А волосок представлен головкой из 2-4 клеток, и ножкой, в основе которой одна клетка. Данный факт для лядвенца рогатого ранее в литературе не описан.



Рисунок 4.2.3 Фрагмент плоскостного препарата листа *Lotus corniculatus* L.: А булавовидный железистый волосок (200х); Б 1-железки (150х), 2-клетки – идиобласты с флорафенами

На эпидермисе листа имеются выросты сосочковидной формы, а на некоторых верхушках листьев имеются волоски, как правило они простые, одноклеточные, представлены на рис. 4.2.4 А.

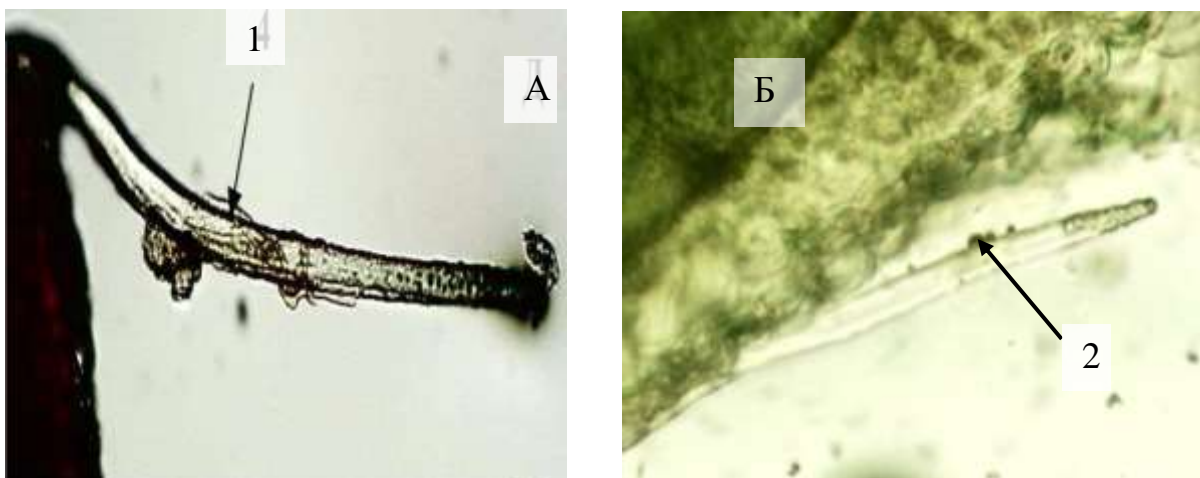


Рисунок 4.2.4 Фрагмент плоскостного препарата листа *Lotus corniculatus* L.: А 1-одноклеточный волосок на верхушке листа (100х); Б 2-простой волосок (100х).

На поверхности листьев, чашечке и стеблях (рис. 4.2.4 Б) обнаружены одно-, реже двухклеточные толстостенные простые волоски с гладкой или слабо-бородавчатой поверхностью.

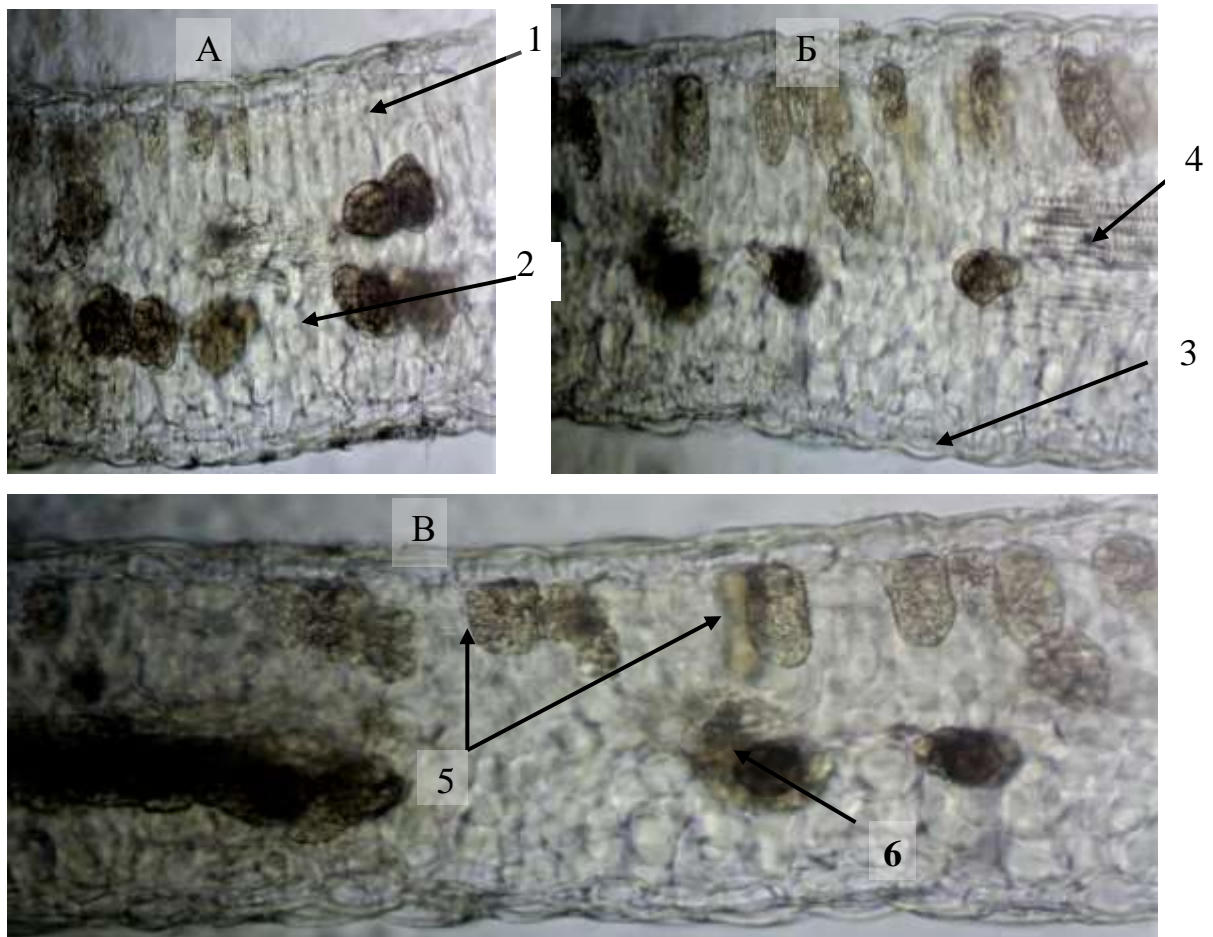


Рисунок 4.2.5 Фрагмент поперечного среза листа *Lotus corniculatus* L.: А – поперечный срез листа (250х) 1 – основная (столбчатая) паренхима; 2 – основная (губчатая) паренхима; Б – срез листа по главной жилке 3 – кутикула; 4 – коллатеральный сосудистоволокнистый пучок) (80х); В 5 – клетки идиобласты с флобафенами; 6 – друзы (250х).

Микроскопия черешка листа. Поперечный срез черешка листа имеет четкую форму крыльев, в которых одиночно располагаются сосудистые пучки, а основная часть в центре представлена паренхимными клетками. Наружная ткань состоит из клеток эпидермиса и ее защищает тонкая кутикула в один слой. Ксилема обращена к центру, а флоэма к периферии, причем флоэмы больше. В поперечных срезах черешка листа отмечено присутствие клеток-идиобластов и друз.

Микроскопия цветка. Эпидермис венчика цветка состоит из прямостенных клеток вытянутых вдоль оси. Жилки четко выражены, имеются многочисленные выросты сосочковидной формы (рис.4.2.6). В

эпидермисе стебля и чашечки установлено наличие минеральных включений оксалата кальция в виде друз.

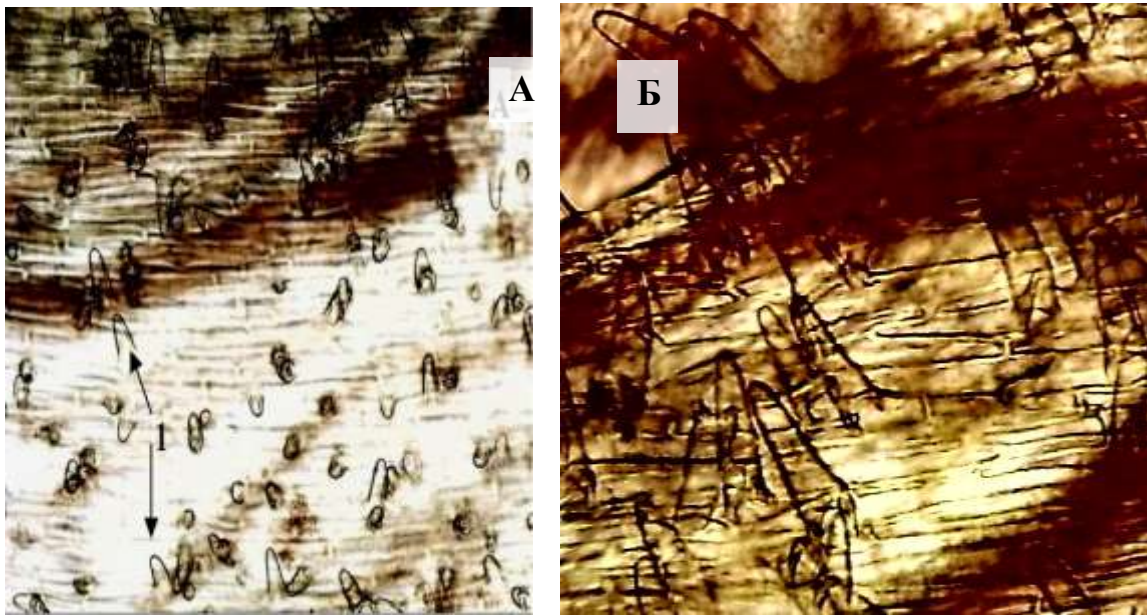


Рисунок 4.2.6 – Цветок *Lotus corniculatus* L.: А – эпидермис венчика (100х); Б – эпидермис чашечки (100х).

При рассмотрении в стереомикроскоп стебля цветоносных побегов *Lotus corniculatus* L. наблюдается: опушение высокое в нижней-средней, низкое в верхней части; стебель круглый, ровный, гладкий.

Микроскопия стебля. Покровная ткань стебля представлена клетками плотно сомкнутыми прямоугольными с закруглениями и утолщениями в точках смыкания. Отличительной особенностью является наличие тонкой 3 – 5 хлорофилоносной первичной коры (рис. 4.2.7), в слое эндодермиса встречается наличие крахмальных зерен. Также в первичной коре обнаружены многочисленные клетки – идиобласты содержащие флобафены. Локализуются идиобласты в основном вокруг проводящих тканей в виде тяжей.

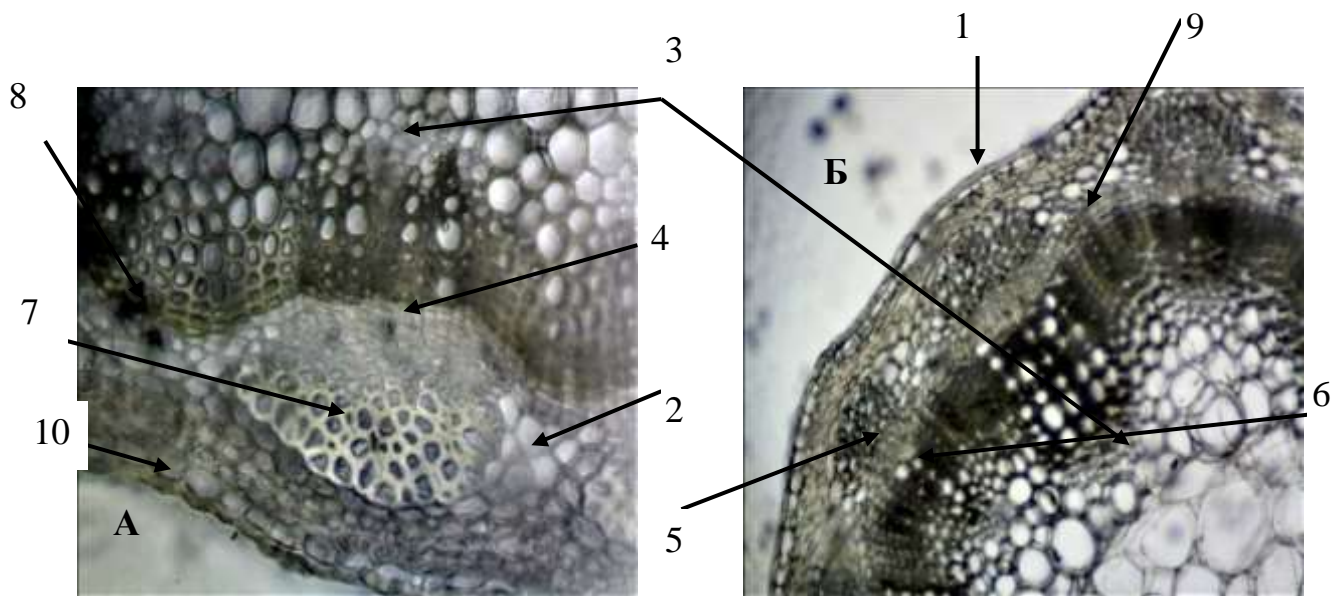


Рисунок 4.2.7 – Фрагмент поперечного среза стебля *Lotus corniculatus* L. (80x): А. 2 – паренхима коры; 3 – крахмалоносная паренхима; 4 – сосудистый камбий; 7 – склеренхима; 8 – клетки идиобласты; 10 - эпидерма Б. 1 – кутикула; эпидермис, 2 – уголковая колленхима, 6 – ксилема, 5 – флоэма; 9 – инициация перидермы.

Сосудистые пучки характерные для двудольных растений – открытые коллатеральные расположены волнообразно по кругу. Камбиальная активность в основном направлена на образование вторичной ксилемы. Флоэма представлена группами толстостенных паренхимных клеток первичных и вторичных волокон.

Механическая обкладка проводящих пучков представлена толстостенными клетками склеренхимы. При окрашивании серноокислым анилином наблюдаются многочисленные участки склерифицированной паренхимы, окрашенной в лимонно-желтый цвет.

При микроскопическом исследовании отдельных участков стебля, нами были установлены отличия, которые обусловлены специфичностью морфогенеза побегов и функциональностью физиологических задач в этих зонах.

При исследовании поперечных срезов междоузлий обнаружено:

- верхних – наличие основных сосудистых пучков в количестве от 10 до 13 и присутствие дополнительных пучков. Установлена корреляционная зависимость между количеством пучков и шириной лучей. Выявлено, что лучи в пучках узкие, содержат от 5 до 10 клеток. Процессы лигнификации в

ксилеме мало активны. Наблюдается высокое содержание клеток-идиобластов с флобофенами в первичной коре от 7 до 35, в сердцевине встречается от 1 до 18. Отмечены редкие трихомы.

- средних – наличие большего содержания проводящих элементов (пучков) от 10 до 16 и ширины лучей; содержание клеток в лучах от 8 до 18 и средне-низкой степенью лигнификации элементов древесинной паренхимы; большая степень опушения.

- нижних – наличие снижения количества основных пучков до 5-10 и увеличение их размеров, ширина пучка варьируется от 8 до 34 элементов. Также, наблюдали увеличение количества дополнительных пучков. У отдельных лучей пучка, ширина уменьшается до 3-9 клеток. Встречаются многочисленные клетки-идиобласты с флобафенами в коровой части. Количество трихом высокое.

Микроскопия корня. Главный корень имеет вторичное строение – триарх (рис. 4.2.8 Г). В первичной коре встречаются многочисленные клетки идиобласты с флобафенами (рис. 4.2.8 Д). Количество слоев варьирует от 3 до 5. Вторичное утолщение стелы развивается рано, что соответствует образованию перидермы и впоследствии ритидома (у многолетников). Хорошо развиты протофлоэмные и вторичные флоэмные волокна. Четко выражены широкие 3 – 8-рядные вторичные лучи и узкие 1-2-рядные первичные лучи. Их клетки паренхиматозны с не одревесневшими или слегка одревесневшими клеточными стенками. В многолетних корнях границы годовых колец во вторичной ксилеме едва заметны. Клетки паренхимы заполнены крахмальными зёрнами. Линия камбия узкая 1 – 2 рядная, четко – выраженная (рис. 4.2.8 Б). Древесина состоит из толстостенных клеток паренхимы, крупных сосудов (рис. 4.2.8 Г), лежащих одиночно или небольшими группами и мелких групп лубяных волокон с утолщенными неодревесневшими стенками, расположенными прерывистыми концентрическими поясами, с заостренными, реже виллообразно разветвленными концами.

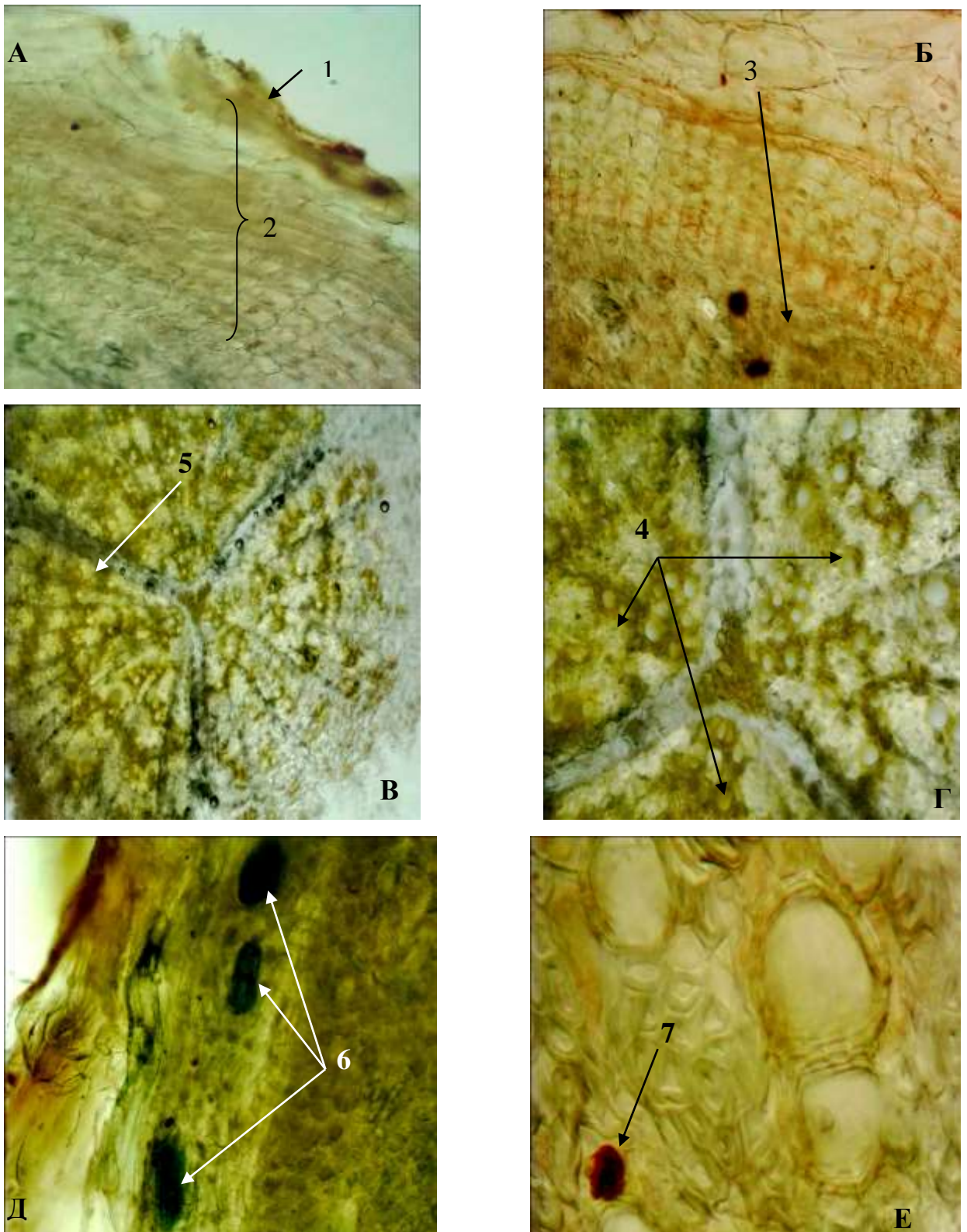


Рисунок 4.2.8 Фрагмент поперечного среза корня *Lotus corniculatus* L. (80x): А.1-пробка; 2-кора; Б 3-камбий; Г 4-лучи ксилемы, В 5- сердцевинные лучи; Д. 6-флобафены; Е 7-идиобласты с жирным маслом.

В паренхиме встречаются клетки с оранжево – красным содержимым, находящиеся как в коре, так и в древесине. Крахмальные зерна простые округлые или овальные, редко встречаются 2–5-сложные.

4.3 Ресурсное исследование *Lotus corniculatus*, культивируемого в Томской области

Перспективность использования возобновляемых ресурсов обуславливается возможностью управления продукционным процессом и объемом ресурсной базы. Агрофитоценозы лекарственных растений являются относительно стабильными элементами, которые на каждом этапе производства получения ЛРС контролируются и могут корректироваться с целью повышения объема и качества сырья, не зависимо от природно-климатических условий, объемов природных зарослей и т.д.

Ресурсное исследование *Lotus corniculatus* L. проводили в 2014-2017 гг. на территории Томской области (Томский район, стационар с. Лучаново – научно – производственная площадка; Шегарский район, с. Баткат – производственные поля).

Для оценки урожайности использовали метод учетных площадок и прямое комбайнирование. По стандартным методикам принятым в растениеводстве закладывали серию опытов (3 по 2) размером 640 м² – один опыт, варианты в опытах закладывались систематически при единообразии условий эксперимента. Площадь агрофитоценоза растений рассчитывалась в м², га. Ошибка метода не превышала 8 % [80].

В связи с тем, что семена лядвенца рогатого относятся к твердо – семенным с длительным сроком прорастания, нами был разработан экологический способ стимуляции семян кремнийорганическими частицами льна, способствующий повышению энергии их прорастания от 10,8% до 100 %, всхожести от 17,4% до 29,4%, а также повышению накопления содержания БАВ [93]. Данный способ доказал свою эффективность и на других видах – люцерна изменчивая, галега восточная, клевер красный.

Кроме того, поскольку *Lotus corniculatus* является интродуцентом в агроклиматических условиях Томской области, таких как низкие температуры, высокая кислотность почв, низкая солнечная активность, короткий вегетационный период, для успешной реализации интродукционного процесса нами был разработан экологический способ возделывания культуры [94], способствующий не только получению экологически чистого сырья, но и восстановлению плодородия почв. Противоэрозийная стойкость почв в варианте с участием лядвенца, увеличилась на 71,4% и повышение содержания гумуса до 7%. Результаты определения запасов культивируемого сырья *Lotus corniculatus* представлены в табл.8.

Таблица 8. Инвентаризационные запасы культивируемого сырья *Lotus corniculatus* в Томской области

Сроки заготовки сырья	Площадь посевов, га	Урожайность зеленой массы, г/м ²	Эксплуатационный запас, кг	Возможный ежегодный объем заготовки, кг
24.09.2014	0,84	3060 ±183,6	2262	377
11.09.2015	0,84	5234±261,7	3957	659,5
18.09.2016	0,84	6301±315,05	4764	794
Итого ср	0,84	4865±253,6	3361	610,2

Из представленных в таблице данных следует, что средняя урожайность *Lotus corniculatus* в условиях Томской области составляет 4865±253,6 г/м², эксплуатационный запас - 3361 кг, возможный ежегодный объем заготовок с 0,84 га моноагрофитоценоза - 610 кг сырья.

В связи с тем, что сравнить урожайность лядвенца рогатого сорта Солнышко на территории Сибири не представляется возможным, нами проведен сравнительный анализ урожайности лядвенца рогатого разных сортов, произрастающих в разных природно-климатических условиях России и ближнего зарубежья. В таблице 9 приведены данные из открытых источников (Государственного реестра селекционных достижений и др.) [89, 134, 135]. Сравнение полученных данных показывает, что продуктивность

лядвенца рогатого возделываемого в биоклиматических условиях Томской области значительно выше сортов, возделываемых в средней полосе России на 6,5-80,7%, выше сортов выращиваемых на Украине на 2,4-32% и незначительно уступает сортам, выращиваемым в черноземных зонах Республики Беларусь.

Таблица 9. Урожайность зеленой массы и сухого вещества агрофитоценоза сортов *Lotus corniculatus*

№	Географическое место произрастания/ организация/ сорт	Площадь посева, га	Урожайность зеленой массы травы, т/га	Урожайность сухой массы травы, т/га
1	Московский/ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса/ <i>Луч</i>	1	42,6 – 45,5	8,52 – 9,1
2	Воронежский/ ГАУ НИИСХ / <i>Солнышко</i>	1	22,4 – 23,91	4,48 – 4,78
3	Калужский/ ГНУ НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого/ <i>Солнышко</i>	1	33,75 – 41,0	6,75 – 8,2
4	Саратовский/ФГНУ Российский НИПТИ сорго и кукурузы/ <i>Фокус</i>	1	35,0-36,0	7,0 – 7,2
5	Смоленская /ГНУ ГОСХОС им. А.Н. Энгельгардта/ <i>Смоленский 1</i>	1	28,0 – 32,5	5,6 – 6,5
6	Московская область/ Дединовская опытная станция по пойменному луговодству/ <i>Дединовский</i>	1	15,1-34,2	3,02 – 6,84
7	Московский/ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса/ <i>Московский 25</i>	1	13,8 – 38,2	3,7 – 7,1
8	Удмуртский/ НИИСХ / <i>Солнышко</i>	1	20,3-27,2	4,2-5,6
9	Ижевский/ ФГОУ ВПО ГСХА/ <i>Солнышко</i>	1	38,5 – 47,3	7,7 – 8,6
10	Уфимский / ФГБНУ Федеральный	1	16,8 – 18,65	3,36 – 3,73

	Исследовательский Центр РАН/ <i>Факел</i>			
11	Дания/DLF SEEDS A/S/ <i>Лотанова</i>	1	38,6 – 41,0	7,72 – 8,2
12	Томский р-он/ФГБНУ НИИСХиТ/ <i>Солнышко</i>	1	54,28 – 57,92	10,85-11,58
13	Нижегородская обл./ООО «Вперед»/ <i>Иржа</i>	1	20,0 – 24,0	4,0 – 4,8
14	Республика Беларусь/ Республиканское научное предприятие «Полесский институт растениеводства»/ <i>Мозырянин</i>	1	27,0 – 51,5	5,4-10,3
15	Республика Беларусь/ Республиканское научное предприятие «Полесский институт растениеводства»/ <i>Солнышко</i>	1	35,1-44,6	7,2-9,09
16	Республика Беларусь/ Республиканское научное предприятие «Полесский институт растениеводства»/ <i>Раковский</i>	1	51,5 – 95,0	10,3 – 19,0
17	Республика Беларусь/ РУП «Научно- практический центр НАН / <i>Изис</i>	1	53,0 – 94,5	10,6 – 18,9
18	Республика Беларусь/ РУП «Научно- практический центр НАН / <i>Изумруд</i>	1	50,5 – 84,0	10,1 – 16,8
19	Украина/ Ивано- Франковская опытная станция/ <i>Монастырецкий 2</i>	1	42,0 – 45,0	8,4 – 9,0
20	Украина/ Ивано- Франковская опытная станция/ <i>Ант</i>	1	36,5 – 45,5	7,3 – 9,1
21	Украина/ Институт сельского хозяйства Полесья УААН,	1	38,5 – 46,0	7,7 – 9,2

	Институт кормов УААН/ <i>Динамо</i>			
22	Украина/ Ужгородский национальный университет/ <i>ОВiMapC-1</i>	1	44,5 – 47,5	8,9 – 9,5
23	Украина/ Ужгородский национальный университет/ <i>ОВiMapC-2</i>	1	36,5 – 42,5	7,3 – 8,5

Сравнение показателей урожайности сорта «Солнышко» в разных природно-климатических зонах России демонстрируют, что сорт «Солнышко» возделываемый в условиях Томской области продуктивнее по зеленой массе и сухому веществу на 6,6 – 69,9%.

Выводы к Главе 4

Определены характерные морфологические и анатомические (микроскопические) признаки сырья для культивируемого в Томской области *Lotus corniculatus* L., которые могут быть использованы для его диагностики и включены нами в проект нормативной документации. При этом некоторые из выявленных признаков описаны впервые для лядвенца рогатого.

Характерными морфологическими диагностическими признаками растения являются: цельные или частично измельченные стебли, цилиндрические в поперечном сечении, с гладкой, ребристой поверхностью, низкое опушение встречается по всей поверхности: в междоузлиях и узлах средней и нижней части стебля, листовых пластинах, соцветиях и цветках. Листья черешковые, тройчатые, состоящие из пяти листочков – 3-х верхних широко обратнояйцевидных или обратноузкояйцевидных ланцетных (два боковых верхних слегка косые) и нижней пары косояйцевидных. Нижние 2 листочка отставлены от верхних, находятся у основания черешка и напоминают прилистники. Листья сверху и снизу слабоопушенные Черешок крылатый с низкой степенью опушения, различной длины. В месте обрыва

черешка, поверхность ровная без остатков нитевидных жилок. Край листа цельный. непарно-перистые. Цвет листовых пластинок от бледно-зеленого до темно-зеленого или серовато-зеленого.

Зигоморфные цветки с венчиком мотылькового типа собраны на побегах в зонтиковидные соцветия. Чашечка цветка коническая, почти правильная, с ланцетно-шиловидными 3-мя верхними зубцами и 2 – мя нижними, покрыта средней плотности трихомами. Плод простой, верхний монокарпный сухой многосеменной боб с семенами шаровидно-дисковидной-треугольной формы покрытыми специфической толстой одревесневшей оболочкой.

К характерным диагностическим анатомическим признакам относятся: устьичный аппарат двух типов (анизоцитный и аномоцитный), извилистая угловая нижняя эпидерма листа с характерными утолщениями по углам; в эпидермисе листьев встречаются клетки, содержащие антоцианы, а во всех органах лядвенца - клетки-идиобласты; узкая 3-5-слойная хлорофиллоносная первичная кора с внутренним слоем эндодермиса, содержащая крахмальные зерна; низкая степень лигнификации клеточных стенок элементов ксилемы; булабовидные железистые волоски с одноклеточной ножкой и многоклеточной головкой на обеих сторонах листа и по краю, по жилкам многорядная кристаллоносная обкладка обнаруженные и описанные впервые.

Урожайность *Lotus corniculatus* в условиях Томской области составила $4865 \pm 253,6$ г/м², эксплуатационный запас 3361 кг, возможный ежегодный объем заготовок с 0,84 га 610 кг сырья. Сравнение урожайности сорта «Солнышко», возделываемого в природно-климатических условиях Томской области и других областях европейской части России показало его высокую продуктивность по зеленой массе и сухому веществу, превосходящую другие регионы на 6,6 – 69,9%.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО

Внедрение новых видов сырья и/или препаратов на их основе в медицинскую и фармацевтическую практику обязательно сопровождается разработкой нормативной документации, содержащей перечень требований к их подлинности и качеству [23,24,51], что и являлась одной из следующих наших задач.

5.1 Качественное обнаружение фенольных соединений

Как уже было показано ранее в главе 3 изофлавоноиды и гидроксикоричные кислоты - группы биологически активных веществ лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, накапливающиеся в значительных количествах. Кроме того, роль изофлавоноидов в проявлении одного из видов фармакологической активности (влияние на репродуктивную функцию животных) в настоящее время изучается нашими коллегами из НИИФиРМ им.Е.Д.Гольдберга Томского НИМЦ СО РАН. Электронный спектр суммарных этанольных экстрактов демонстрирует наличие нескольких максимумов поглощения, характерных для данных групп БАВ - 262 ± 2 нм и 323 ± 2 нм (рис.5.1.1). Данное обстоятельство послужило основанием для выбора данных групп БАВ при разработке методик определения подлинности и качества культивируемого в условиях Томской области лядвенца рогатого.

Ранее на нашей кафедре изучались растения и растительные сборы, содержащие изофлавоноиды [103,114], поэтому в своих исследованиях мы использовали имеющиеся данные о системах растворителей (5% р-р Na_2CO_3 ; CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (70:30; 93:7)), пластинках для хроматографии («Сорбфилл», «Kieselgel F₂₅₄»), позволяющих добиться наилучшего разделения этих веществ и их последующего детектирования. Основываясь на имеющихся данных, нами разработаны оптимальные условия идентификации изофлавоноидов и

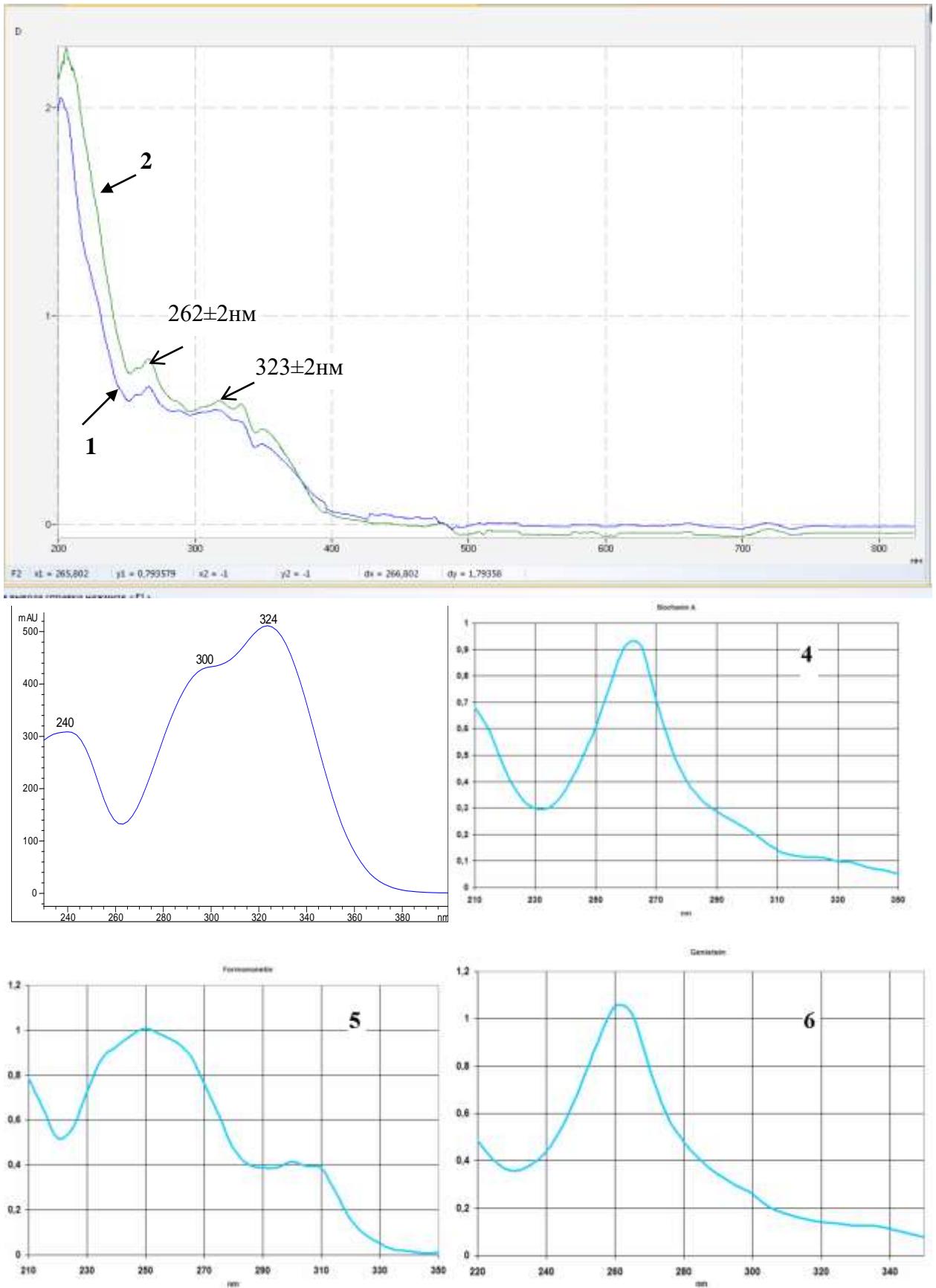


Рисунок 5.1.1 Электронные спектры этанольных экстрактов лядвенца рогатого 40% (1), 70% (2), известных веществ кофейной кислоты (3), биоханина А (4), формонетина (5), генистеина (6).

гидроксикоричных кислот при их совместном присутствии в траве лядвенца рогатого.

Хроматографический анализ проводили на пластинах с силикагелем «Сорбфилл» в системе $\text{CHCl}_3\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (93:7). Детекцию веществ проводили при 365 и 254 нм в УФ-свете. На хроматограмме 40% экстракта наблюдали зоны адсорбции с R_f около 0.75, 0.66 и 0.56, которые имеют бледно-фиолетовую, фиолетовую и голубую флуоресценцию, соответствующие известным веществам генистеину, биоханину А и кофейной кислоте. Также на хроматограмме обнаруживали зоны адсорбции с различной флуоресценцией.

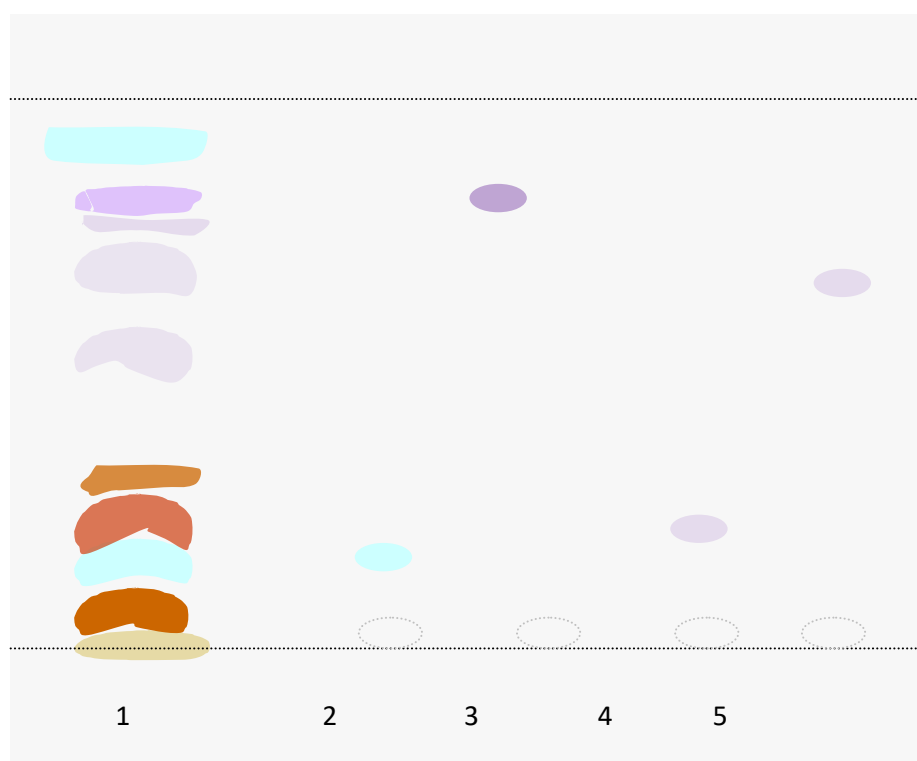


Рисунок 5.1.2. Схема хроматограммы экстракта травы лядвенца рогатого. *Обозначения и условия хроматографирования:* 1 – 40% экстракт травы лядвенца рогатого; 2 - кофейная кислота; 3 – генистеин; 4 – формонетин, 5 – биоханин А, система растворителей – $\text{CHCl}_3\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 93:7, 365нм.

5.2. Количественное определение гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов

Как уже отмечалось выше при изучении спектральных характеристик экстрактов из травы лядвенца рогатого, полученных водно-спиртовыми

смесями разной концентрации, наблюдали выраженные для гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов максимумы ($323\pm 2\text{нм}$ и $262\pm 2\text{нм}$), которые совпадают с максимумами известных веществ кофейной кислоты ($323\pm 2\text{нм}$), биоханина А ($262\pm 2\text{нм}$), которые были использованы нами в дальнейшем для расчета $E_{1\text{см}}^{1\%}$ при разработке методик определения ГКК и изофлавоноидов в траве лядвенца экстракционно-спектрофотометрическим и прямым спектрофотометрическим методами соответственно.

Экспериментально установлены оптимальные параметры экстракции ГКК и изофлавоноидов (табл.10): размер частиц сырья (измельченность) – 1-3 мм; вид экстрагента – этиловый спирт с концентрацией 40% (изофлавоноиды), 70% (ГКК), температурный режим процесса экстракции изофлавоноидов 80°C , гидроксикоричных кислот 100°C , продолжительность (время) экстрагирования – 30 минут; кратность (число ступеней) экстракции – трехкратная. Объемы мерных колб, аликвоты р-ра А при приготовлении испытуемых растворов (А, В), также определяли экспериментальным путем, учитывая получение достоверных воспроизводимых результатов в пределах значений оптической плотности растворов в интервале от 0.2 до 0.9.

Количественное определение изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот предложено проводить расчеты с использованием *удельного показателя поглощения*. Методики представлены в Приложении 1 «Проекты нормативных документов».

Таблица 10. Определение оптимальных условий экстракции ГКК и изофлавоноидов

параметры экстракции /№ образца	содержание ГКК / изофлавоноидов, %				
	2	3	6	7	9
<i>l</i>	2	3	4	5	6
экстрагент: H ₂ O C ₂ H ₅ OH 40 % C ₂ H ₅ OH 70%	0,45/ 0,38	0,50/ 0,33	0,43/ 0,25	0,31 / 0,29	0,38/ 0,27
	0,56 /	0,71 /	0,64 /	0,69 /	0,70 /
	0,83	0,79	0,69	0,81	0,79
	0,79 /	0,81 /	0,70 /	0,78 /	0,76 /

		0,69	0,70	0,65	0,72	0,80
сырьё: экстрагент:	1:30	0,86 /	0,78/	0,84/	0,79 /	0,83/
		0,79	0,79	0,90	0,83	0,88
	1:50	0,69 /	0,71/	0,80/	0,69 /	0,75/
	1:100	0,72	0,73	0,80	0,77	0,77
		0,49 /	0,60/	0,58/	0,49 /	0,54/
		0,40	0,67	0,66	0,58	0,60
степень измельченности, мм:	менее 1	0,50 /	0,50/	0,39/	0,40 /	0,42/
		0,36	0,39	0,46	0,49	0,37
	1-3	0,29 /	0,76 /	0,67 /	0,79 /	0,81 /
	3-5	0,85	0,84	0,79	0,80	0,86
		0,46 /	0,69 /	0,59 /	0,72 /	0,69 /
		0,54	0,74	0,66	0,75	0,78
время экстракции, мин:	30	0,84 /	0,76 /	0,69 /	0,80 /	0,79 /
		0,88	0,87	0,78	0,83	0,86
	45	0,76 /	0,68 /	0,57 /	0,74 /	0,68 /
	60	0,75	0,79	0,69	0,77	0,79
		0,67 /	0,59/	0,51/	0,63 /	0,63/
		0,65	0,71	0,55	0,60	0,68
кратность экстракций:	одна	0,29 /	0,34/	0,30/	0,19 /	0,30/
		0,19	0,27	0,19	0,18	0,19
	две	0,51 /	0,58 /	0,57 /	0,69 /	0,68 /
	три	0,59	0,59	0,60	0,69	0,72
		0,80 /	0,74 /	0,67 /	0,82 /	0,84 /
		0,79	0,78	0,79	0,87	0,81
		0,65 /	0,54 /	0,54 /	0,70 /	0,69 /
		0,70	0,61	0,57	0,72	0,72
температура экстракции, °С:	60	0,55 /	0,53 /	0,49 /	0,69 /	0,68 /
		0,64	0,59	0,56	0,73	0,71
	80	0,73 /	0,71 /	0,58 /	0,71 /	0,71 /
	100	0,90	0,82	0,77	0,85	0,86
		0,83 /	0,79 /	0,69 /	0,80 /	0,82 /
		0,69	0,73	0,62	0,75	0,77

Построение калибровочных графиков известных веществ - кофейной кислоты и биоханина А

Растворы А (биоханина А (I) и кофейной кислоты (II)) для последующего разведения и построения калибровочных графиков готовили следующим образом: точные навески (для I около 0,050 мг и около 1мг для II соответственно) растворяли в 95% C₂H₅ОН в мерной колбе вместимостью 100 мл (для I) и в мерной колбе вместимостью 50 мл (для II). Аликвоты р-ров

А с шагом в 0,1 мл (для I) и с шагом в 0,05 мл (для II) помещают в мерные колбы (для I в 10 колб на 25 мл и для II в 12 колб на 10мл). Оптическую плотность (А) полученных разведенных растворов I и II снимали при 320 ± 5 нм и 260 ± 5 нм соответственно. Раствором сравнения является 95% C_2H_5OH .

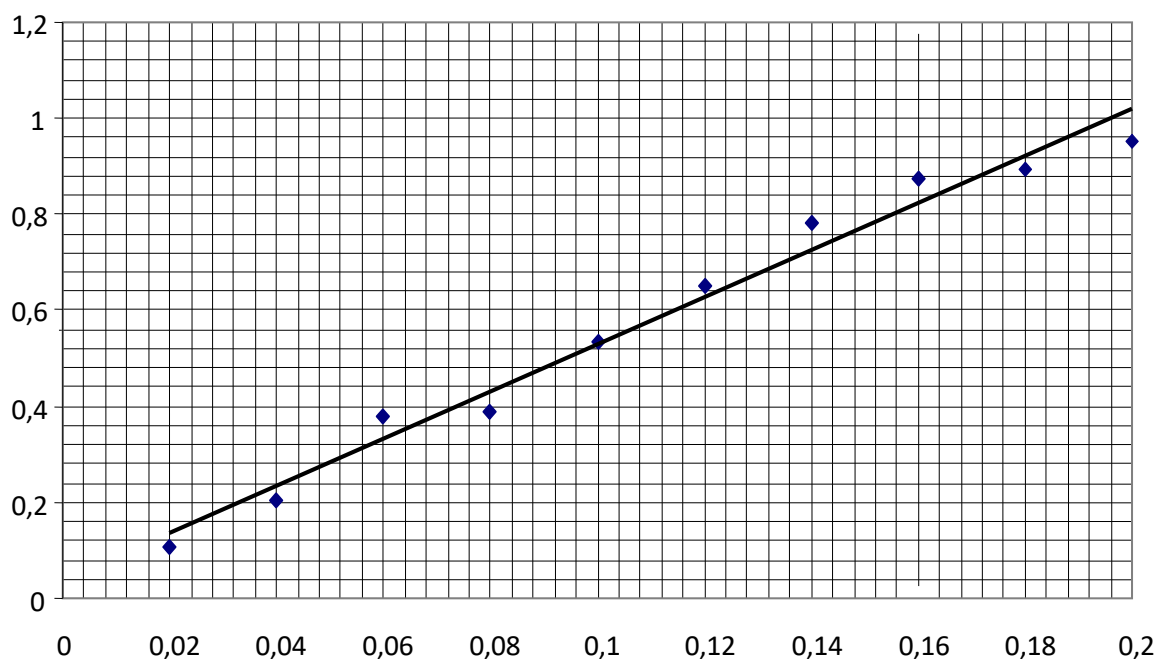


Рисунок 5.2.1 Калибровочный график известного вещества - кофеиновой кислоты

По результатам проведенных измерений строили калибровочные графики (рис. 5.2.1, 5.2.2.) и рассчитывали коэффициенты экстинкции $E_{1cm}^{1\%}$.

Удельный показатель поглощения (коэффициент экстинкции)

$E_{1cm}^{1\%}$ рассчитывали по известной формуле:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A \times 100\%}{c \times l}, \text{ где применительно к данному определению } A - \text{ оптическая}$$

плотность известного вещества кофеиновой кислоты; c – концентрация кофеиновой кислоты по калибровочному графику, мг/мл; l – толщина слоя кварцевой кюветы, мм.

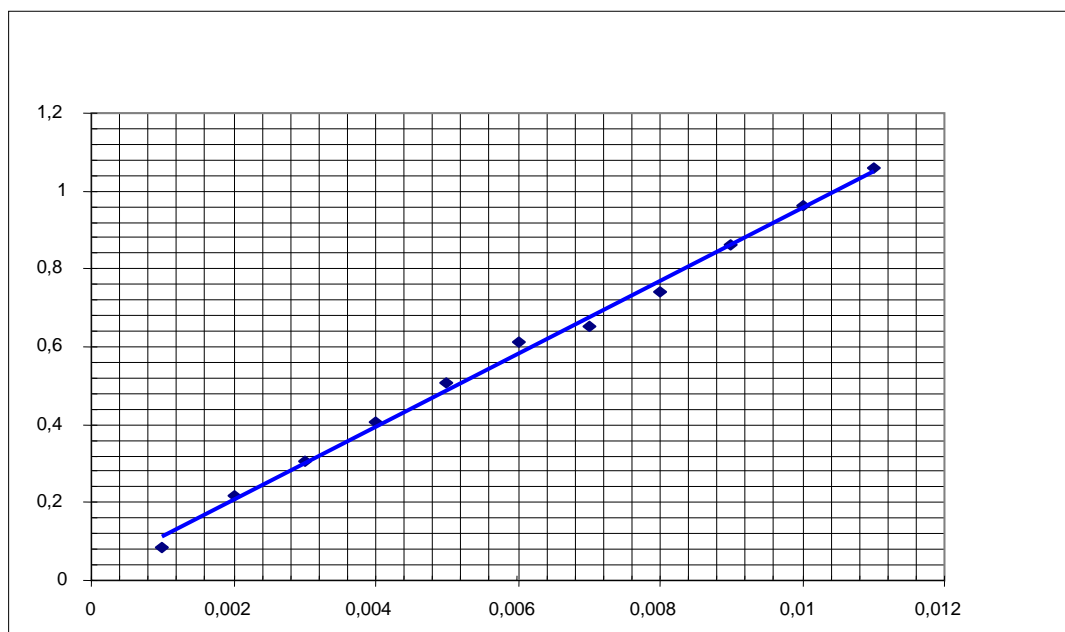


Рисунок 5.2.2 Калибровочный график известного вещества биоханина А

5.3. Валидация методики количественного определения гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов

Для подтверждения пригодности разработанной нами методики была проведена ее валидация по правильности, прецизионности и линейности [23, 206].

Повторяемость определяли одним оператором в одной лаборатории, с использованием одного и того же спектрофотометра в течение короткого интервала времени. Результаты статистически обработаны, достоверны (расчетные значения RSD составили 2,95% и 1,67%). Стандартное отклонение (SR) составило 0,407% и 0,04%, что подтверждает прецизионность методики (табл. 11).

Таблица 11. Метрологические характеристики методики определения ГКК и изофлавоноидов

Группа БАВ, % /образец	1	2	3	4	5	6	$X_{\text{ср}}$
ГКК	0,87	0,83	0,85	0,90	0,87	0,88	0,87
изофлавоноиды	0,84	0,85	0,82	0,84	0,82	0,84	0,84
RSD для ГКК 2,95%, S_x 0,0099979; S_R , 0,407%; S^2 0,000576							
RSD для изофлавоноидов 1,67%; S_x 0,000547609; S_R 0,04; S^2 0,000179							

Таблица 12. Результаты оценки воспроизводимости методики количественного определения и метрологические характеристики методики

Образцы		Лаборатория								
		№ 1			№ 2			№ 3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
A_1		0,246313	0,25421	0,25341	0,234553	0,26041	0,25977	0,24036	0,24861	0,26252
A_2		0,23513	0,2458	0,24875	0,23979	0,24973	0,25042	0,23122	0,25358	0,25335
A_3		0,23954	0,24789	0,24956	0,232495	0,252370	0,25467	0,23355	0,24066	0,25132
Содержание ГКК в пересчете на кофейную кислоту	X_1	0,87	0,90	0,90	0,83	0,92	0,92	0,85	0,88	0,93
	X_2	0,83	0,87	0,88	0,85	0,88	0,89	0,82	0,90	0,90
	X_3	0,85	0,88	0,88	0,82	0,89	0,90	0,83	0,85	0,89
Среднее значение содержания ГКК в пересчете на кофейную кислоту, X_{cp}		0,85	0,88	0,89	0,83	0,90	0,90	0,83	0,88	0,91
Метрологические характеристики										
лаборатория	уровни	X_{cp}	S^*	S	S_x	$S_r, \%$	$P_r, \%$	$t(P, f)$	RSD, %	
1	1	0,85	0,0004	0,02	0,01154734	0,58	95	2,57	3,49	
1	2	0,88	0,000249999	0,01581138	0,00912898	0,57	95	2,57	2,66	
1	3	0,89	0,000149999	0,01224744	0,00707	0,58	95	2,57	2,04	
2	1	0,83	0,0002500	0,01581139	0,0091289	0,57	95	2,57	2,82	
2	2	0,90	0,000449999	0,0212132	0,01224781	0,58	95	2,57	3,49	
2	3	0,90	0,000249999	0,01581138	0,00912897	0,57	95	2,57	2,61	
3	1	0,83	0,000249999	0,01581138	0,00912897	0,57	95	2,57	2,83	
3	2	0,88	0,000649995	0,0254950	0,01473699	0,58	95	2,57	4,30	
3	3	0,91	0,0003001583	0,017325080	0,01001185	0,58	95	2,57	2,83	
Результаты оценки межлабораторной воспроизводимости по уровням										
Уровень	d	m	S^*	S	S_x	$S_r, \%$	$P_r, \%$	$t(P, f)$	RSD, %	
1	3		0,0001499978	0,01224744	0,00707	0,58	95	2,57	2,16	
2	3		0,0001499978	0,01224744	0,00707	0,58	95	2,57	2,04	
3	3		0,0001	0,01	0,00577367	0,57	95	2,57	1,65	
Результаты оценки межлабораторной воспроизводимости методики: S_r , метода 0,58%; ошибка метода 1,95%										

продолжение таблицы 13

Образцы		Лаборатория									
		№ 1			№ 2			№ 3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
A_1		0,317773	0,32246	0,30821	0,32252	0,32765	0,313522	0,32153	0,32945	0,30551	
A_2		0,321350	0,318233	0,30988	0,32576	0,32011	0,31630	0,32760	0,32670	0,30732	
A_3		0,315830	0,322167	0,311643	0,320031	0,326357	0,315141	0,32126	0,33105	0,308965	
Содержание изофлавоноидов в пересчете на биоханин А		X_1	0,84	0,85	0,82	0,85	0,87	0,83	0,85	0,87	0,81
		X_2	0,85	0,84	0,82	0,86	0,85	0,84	0,87	0,86	0,81
		X_3	0,84	0,85	0,83	0,85	0,86	0,83	0,85	0,88	0,82
Среднее значение содержа- ния изофлавоноидов в пересчете на биоханин А, X_{cp}		0,84	0,85	0,82	0,85	0,86	0,83	0,86	0,87	0,81	
Метрологические характеристики											
лаборатория	уровни	X_{cp}	S^*	S	S_{rel}	$S_{rel}, \%$	$P_{rel}, \%$	$t(P, f)$	RSD, %		
1	1	0,85	0,000049999988	0,007071067	0,0040826	0,58	95	2,57	1,25		
1	2	0,88	0,000049999988	0,0070710678	0,0040826	0,58	95	2,57	1,23		
1	3	0,89	0,000049999988	0,0070710678	0,0040826	0,58	95	2,57	1,28		
2	1	0,83	0,000049999988	0,0070710678	0,0040826	0,58	95	2,57	1,23		
2	2	0,90	0,0001	0,01	0,00577367	0,57	95	2,57	1,72		
2	3	0,90	0,000049999988	0,0070710678	0,0040826	0,58	95	2,57	1,26		
№ лаборатор	уровни	X_{cp}	S^*	S	S_{rel}	$S_{rel}, \%$	$P_{rel}, \%$	$t(P, f)$	RSD, %		
3	1	0,83	0,0001499978	0,01224744	0,00707128	0,58	95	2,57	2,11		
3	2	0,88	0,0001	0,01	0,00577367	0,57	95	2,57	1,70		
3	3	0,91	0,000049999988	0,0070710678	0,0040826	0,58	95	2,57	1,29		
Результаты оценки межлабораторной воспроизводимости по уровням											
Уровень	p	m	S^*	S	S_{rel}	$S_{rel}, \%$	$P_{rel}, \%$	$t(P, f)$	RSD, %		
1	3		0,0001499978	0,01224744	0,00707	0,58	95	2,57	2,16		
2	3		0,0001499978	0,01224744	0,00707	0,58	95	2,57	2,04		
3	3		0,0001	0,01	0,00577367	0,57	95	2,57	1,65		
Результаты оценки межлабораторной воспроизводимости методики: S_{rel} метода 0,58%; ошибка метода 1,95%											

Таблица 13. Результаты определения правильности методики

Уровни	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>A</i>	0,246313	0,25421	0,25341	0,234553	0,26041	0,25977	0,24036	0,24861	0,26252
Содержание ГКК ожидаемое	0,87	0,90	0,90	0,83	0,92	0,92	0,85	0,88	0,93
Добавлено РСО кофейной кислоты, г	0,005	0,005	0,005	0,010	0,010	0,010	0,015	0,015	0,015
Оптическая плотность, A_{λ}	0,25478	0,260242	0,25042	0,23753	0,26984	0,25248	0,24433	0,26325	0,2575
Содержание ГКК полученное	0,90	0,92	0,90	0,84	0,95	0,89	0,87	0,92	0,91
Ошибка, % (отношение $M_{\text{полученное}} * 100\%$ / $M_{\text{ожидаемое}}$)	103,4	102,2	100	101,2	103,2	96,7	102,3	104,5	97,8
Уровни	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Оптическая плотность, <i>A</i>	0,317773	0,32246	0,30821	0,32252	0,32765	0,313522	0,32153	0,32945	0,30551
Содержание изофлавоноидов ожидаемое	0,84	0,85	0,82	0,85	0,87	0,83	0,85	0,87	0,81
Добавлено РСО биоханина A_{λ} , г	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
Оптическая плотность, A_{λ}	0,321510	0,319785	0,31462	0,32436	0,32546	0,32370	0,32433	0,33012	0,30235
Содержание изофлавоноидов полученное	0,85	0,84	0,83	0,86	0,86	0,85	0,86	0,87	0,80
Ошибка, % (отношение $M_{\text{полученное}} * 100\%$ / $M_{\text{ожидаемое}}$)	101,2	98,8	101,2	101,2	98,8	102,4	101,2	100	98,7

Примечание: $\bar{X}_{\text{ср}}$ - среднее выборки, S^2 - дисперсия, S - стандартное отклонение, S_x стандартное отклонение среднего результата, S_r - относительное стандартное отклонение расчетной величины, P - доверительная вероятность, m - общее среднее значение величины по уровню; t - критерий Стьюдента, p - количество лабораторий, S_p - стандартное отклонение повторяемости методики, S_A - стандартное отклонение воспроизводимости методики f - число степеней свободы.

Оценку воспроизводимости методики определяли в трех лабораториях на разных приборах (СФ-2000, СФ-56, ПЭ-5400 УФ) разными операторами, на разных концентрациях. Результаты оценки воспроизводимости методики представлены в таблице 12. Как следует из представленных данных методика является воспроизводимой, правильной, линейной.

Разработанная методика апробирована нами на 30 образцах сырья, полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14. Содержание изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве лядвенца рогатого, %

Характеристика образца	Значение оптической плотности	Содержание, ГКК, %	Значение оптической плотности	Содержание изофлавоноидов, %
1	2	3	4	5
01.06.2017	0,1187	0,41	0,10595	0,28
12.06.2017	0,14052	0,50	0,13802	0,36
22.06.2017	0,1607	0,57	0,16001	0,42
01.07.2017	0,17659	0,63	0,18051	0,48
11.07.2017	0,1989	0,70	0,20494	0,54
21.07.2017	0,21043	0,74	0,22479	0,61
31.07.2017	0,23037	0,81	0,27590	0,73
10.08.2017	0,2359	0,84	0,30551	0,8
20.08.2017	0,22335	0,79	0,26978	0,71
31.08.2017	0,15946	0,56	0,22785	0,6
01.06.2018	0,11910	0,41	0,13798	0,36
11.06.2018	0,13954	0,49	0,168047	0,44
21.06.2018	0,14507	0,55	0,19996	0,53
01.07.2018	0,17501	0,62	0,22485	0,59
11.07.2018	0,19082	0,68	0,24995	0,66
21.07.2018	0,20553	0,73	0,27583	0,73
31.07.2018	0,22489	0,8	0,29951	0,79

10.08.2018	0,24036	0,85	0,32730	0,86
20.08.2018	0,21777	0,77	0,3052	0,81
31.08.2018	0,14597	0,52	0,26003	0,69
01.06.2019	0,14056	0,50	0,188476	0,49
11.06.2019	0,15435	0,55	0,21560	0,57
21.06.2019	0,17707	0,63	0,22905	0,61
01.07.2019	0,19376	0,69	0,24585	0,65
11.07.2019	0,21756	0,77	0,27007	0,71
21.07.2019	0,234553	0,83	0,27589	0,73
31.07.2019	0,24579	0,87	0,317773	0,84
10.08.2019	0,26252	0,93	0,36311	0,96
20.08.2019	0,28055	0,99	0,42542	1,12
31.08.2019	0,19001	0,66	0,27883	0,74

Таким образом, результаты валидации показывают, что предлагаемая методика определения гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов в траве лядвенца рогатого методом прямой спектрофотометрии является правильной, воспроизводимой и линейной.

5.4. Изучение динамики накопления изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот

Получение информации о динамике накопления БАВ в растениях представляет фундаментальный и практический интерес для науки и практики. Разработчикам лекарственных средств данная информация необходима для обоснования группы действующих биологически активных веществ, рациональных сроков заготовки сырья, связи химического состава с фармакологическим действием [97,140,151,184,205].

Как было отмечено в обзоре литературы, для лядвенца рогатого разными исследователями отмечается его крайне вариабельный химический

состав, зависящий от целого ряда экологических факторов. При этом основными группами БАВ в изученных видах лядвенца исследователи называют флавоноиды, сапонины, танины. В нашем исследовании к доминирующим группам БАВ в траве лядвенца рогатого культивируемого в Томской области относятся изофлавоноиды и ГКК, о динамике накопления которых в литературе сведений нами не обнаружено.

Поэтому далее нами была изучена сезонная изменчивость накопления изофлавоноидов и ГКК в траве лядвенца рогатого культивируемого, заготовленного с мая по август включительно (с интервалом 10 дней) в 2017 – 1 год вегетации, 2018 – 2-ой год вегетации и 2019 гг. – 3-ий год вегетации в сухую солнечную погоду (рис. 5.4.1).

Как видно из данных на рисунке 5.4.1 трава лядвенца рогатого в начале вегетационного периода содержит от 0,09 до 0,17% изофлавоноидов, постепенно их количество увеличивается, достигая максимума (0,6-1,1%) к середине – концу августа. Также очевидно, что содержание данной группы БАВ увеличивается в образцах 3-го года вегетации.

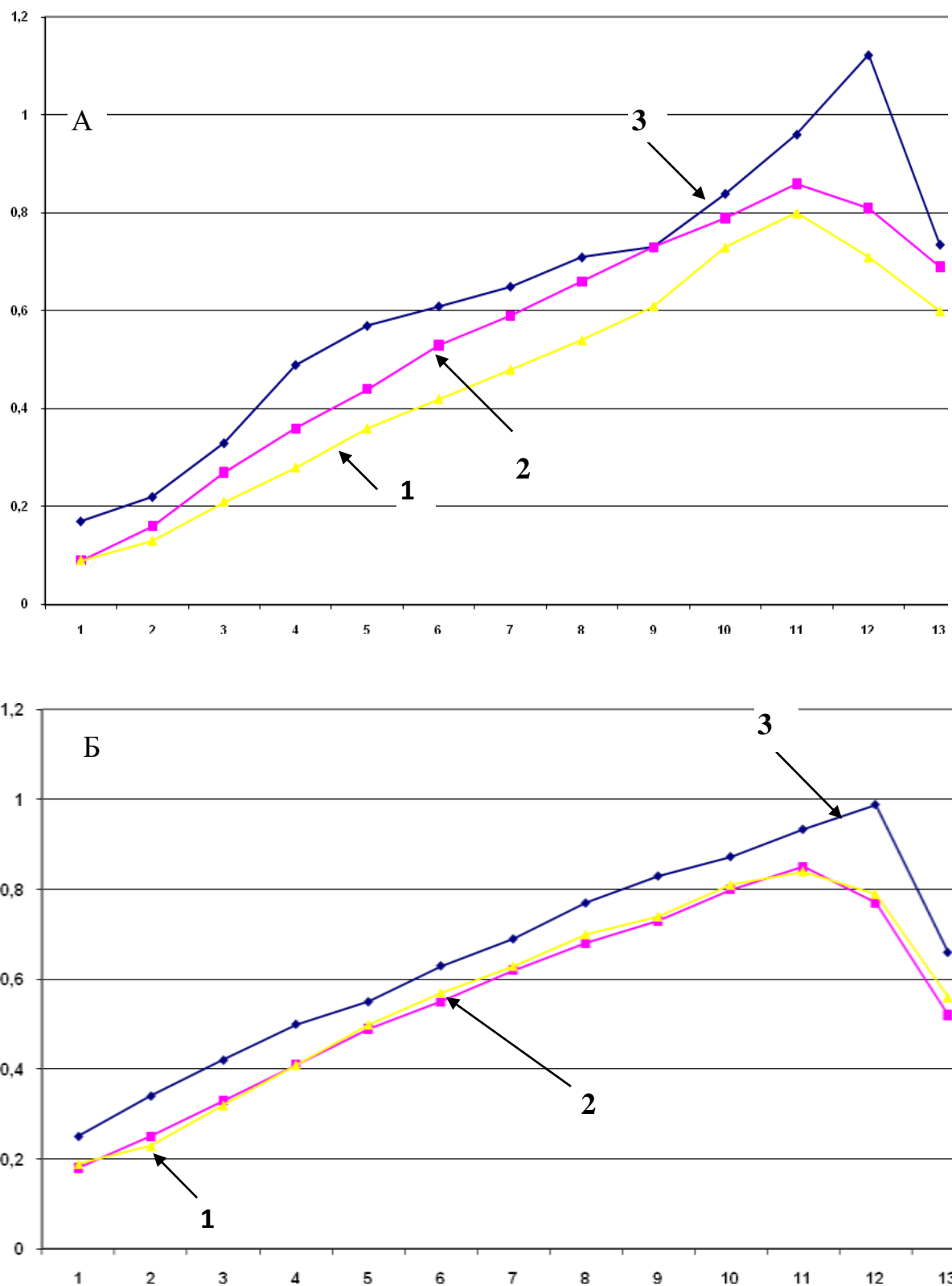
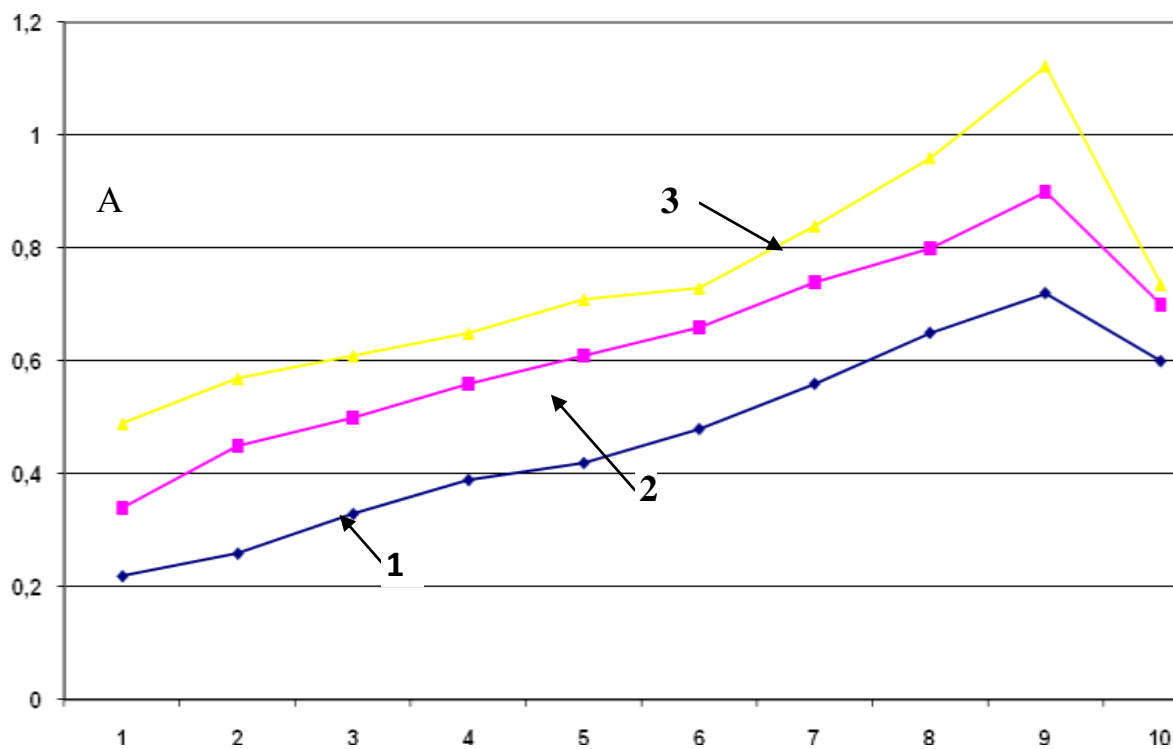


Рисунок 5.4.1 Сезонная динамика накопления изофлавоноидов и ГКК. Обозначения: А – содержание изофлавоноидов; Б – содержание ГКК; 1- 2017 год сбора; 2-2018 год сбора; 3-2019 год сбора.

Динамика содержания ГКК в траве лядвенца рогатого аналогична изфлавоноидам, и это несколько противоречит приводимым в литературе сведениям о преимущественном накоплении фенолокислот в растениях в начале вегетационного периода [41].

Также было изучено содержание изофлавоноидов и ГКК в траве лядвенца в зависимости от частоты укуса сырья на примере образцов 2019 года сбора. Как показывают результаты с увеличением кратности укуса сырья, увеличивается содержание БАВ (рис. 5.4.2). Полученные результаты соотносятся с данными литературы по другим культивируемым видам семейства *Fabaceae* [138].



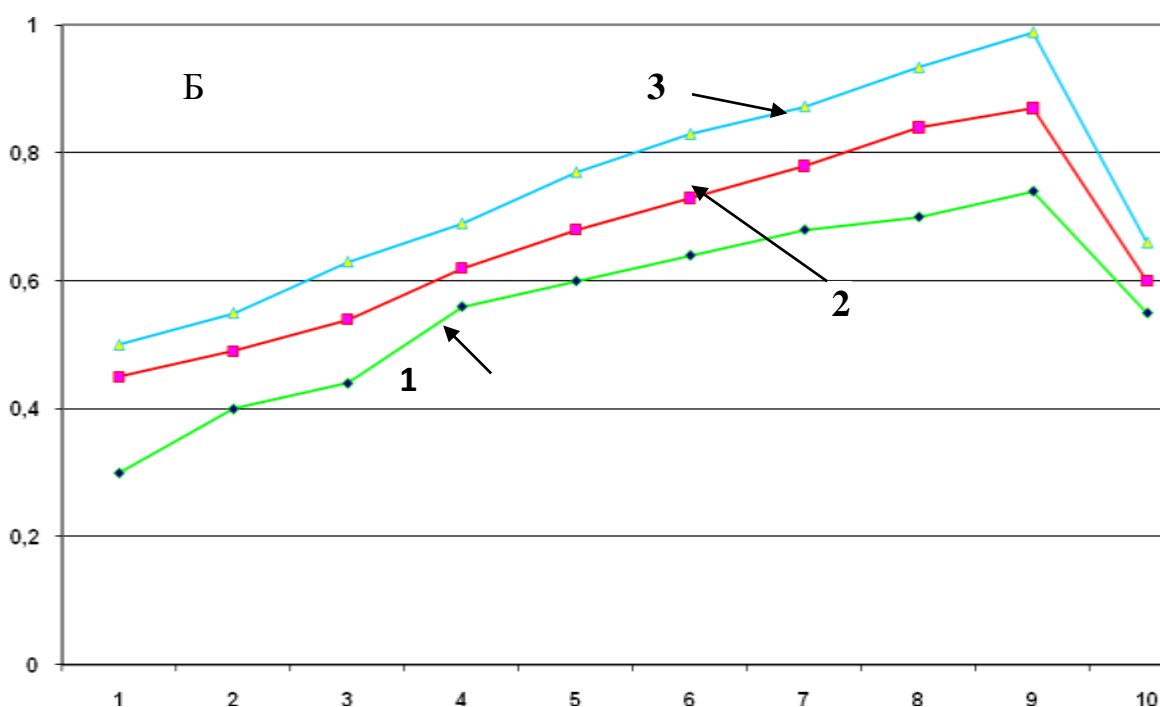


Рисунок 5.4.2 Содержание изофлавоноидов и ГКК в зависимости от количества укусов травы люцерны рогового. *Обозначения:* А – содержание изофлавоноидов; Б – содержание ГКК; 1- 1-ый укос; 2- 2 –ой укос; 3- 3-ий укос.

Расчетные коэффициенты вариации по полученным результатам содержания изофлавоноидов и ГКК составляют: у образца №1 6,23% и 6,35% соответственно; у образца №2 – 5,11% и 6,94%; у образца №3 – 7,83% и 8,11%; у образца №4 – 8,14% и 8,23%; у образца №5 – 8,36% и 5,11%; у образца №6 – 5,42% и 6,77%, у образца №7 – 5,93% и 6,77%, у образца №8 – 6,14% и 6,84%, у образца №9 – 5,38% и 8,02%, у образца №10 – 4,36% и 6,93%, у образца №11 - 6,18% и 5,72%, у образца №12 – 11,75% и 8,54%, у образца №13 – 11,75% и 8,54%. В соответствии с полученными нами результатами можно утверждать о том, что сезонная изменчивость содержания изофлавоноидов и ГКК является очень низкой и низкой, при достоверности полученных данных не менее 95%.

Проведенные исследования позволили рекомендовать к заготовке сырья 3 года вегетации, заготовку сырья осуществлять, начиная с середины июня.

Также на основании проведенных исследований в проект ФС для стандартизации травы лядвенца рогатого введены нормативные значения показателей «содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту», и «содержание суммы изофлавоноидов в пересчете на биоханин А», установленные на уровне «не менее 0,5%».

5.5. Разработка товароведческих показателей

Для оценки качества сырья лядвенца рогатого нами определены показатели качества по методикам ГФ XIV издания [24].

Измельченность сырья, определенная нами, позволяет рекомендовать для внесения в проект ФС для *цельного сырья* - частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %; для *измельченного сырья* - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %; и для *порошка* - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Влажность определенная согласно методике ОФС ГФ 14 колебалась от 3,49% до 9,20% в связи с чем в проект ФС внесен показатель влажности на уровне не более 12%.

Зола. Экспериментально при анализе образцов травы лядвенца рогатого установлены следующие значения показателей золы общей от 5,55 до 10,92%, что позволяет внести ограничение в проект ФС для цельного и измельченного сырья на уровне не более 12%. Содержание золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной в разных образцах лядвенца составило от 3,89 до 8,20% и на основании чего в проект ФС внесено ограничение данного показателя для цельного и измельченного сырья на уровне не более 10%.

Органические и минеральные примеси. Верхний предел содержания органических примесей в разных образцах не превышал 3,85%, в связи в проекте ФС данный показатель установлен на уровне не более 4,0 %. Содержание минеральной примеси не превышало 1,42%, поэтому в проект ФС данный показатель предлагается на уровне не более 2%.

5.6. Определение микробиологической чистоты

Провели на 5 образцах травы лядвенца рогатого по методике, изложенной в ГФ XIV издания, том I, стр. 1128, ОФС.1.2.4.0002.18. Полученные нами результаты показывают, что трава лядвенца рогатого соответствует требованиям нормативных документов и является безопасным.

5.7. Определение содержания остаточных пестицидов

Уровень развития технического прогресса во всех отраслях промышленности, а также и сельского хозяйства привели к тому, что одним из важных разделов современной нормативной документации является определение содержания остаточных пестицидов [29].

Исследование на содержание остаточных пестицидов в траве лядвенца рогатого проводились на базе аттестованной испытательной лаборатории «Качество», ФБУ «Томский ЦСМ», ИЛ («Качество»). Результаты, приведенные в таблице 15, демонстрируют безопасность культивируемого сырья. Содержание остаточных пестицидов ГХЦГ (сумма изомеров α, β, γ) и ДДТ с его метаболитами в культивируемых образцах травы лядвенца рогатого в разы ниже предельного допустимого уровня, регламентируемого ГФ XIV.

Таблица 15. Содержание остаточных пестицидов в траве лядвенца рогатого

Наименование показателей	Нормы, допускаемого	Результат измерений,	Погрешность измерений
--------------------------	---------------------	----------------------	-----------------------

	предельного содержания, мг/кг	ед, мг/кг	(ПГ), ед, мг/кг
Содержание пестицидов: ГХЦГ (сумма изомеров α, β, γ)	0,1	Менее 0,02	< 0,001
Содержание пестицидов: ДДТ и его метаболиты	0,1	Менее 0,02 м	< 0,001

5.8. Определение содержания радионуклидов

Отбор проб травы лядвенца рогатого, подготовку и измерение счетных образцов для радиационного контроля проводили в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ IV, Том II.

Содержание радионуклидов Sr-90 и Cs-137, определенное на гамма-бета-спектрометрическом комплексе «Прогресс БГ» [5] в образцах травы лядвенца рогатого (табл.16) соответствуют допустимым нормам безопасности.

Таблица 16. Содержание радионуклидов в траве лядвенца рогатого.

Радионуклиды	Удельная активность радионуклидов, Бк /кг
Cs-137 (геометрия чашка Петри)	353,0
Sr-90 (геометрия Маринелли)	1,564

Выводы к Главе 5

Проведенные в данной главе исследования позволили обосновать и разработать методики определения подлинности и качества сырья, внесенные в проект ФС «Лядвенца рогатого трава», представленный в Приложении 1.

Так, в проект ФС «Лядвенца рогатого трава» в раздел «Подлинность» внесена методика определения подлинности сырья по изофлавонодам

(биоханин А и формононетин) и гидроксикоричным кислотам (кофейная кислота) методом ТСХ.

В раздел «Испытания» внесены показатели качества для цельного и измельченного сырья и порошка: содержание влаги не более 12%; содержание золы общей не более 12%; содержание золы н/р в 10% р-ре хлористоводородной кислоты не более 10%; органической примеси не более 4%; минеральной примеси не более 2%; для цельного сырья установлено содержание частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм на уровне не более 5 %; для измельченного сырья ограничено содержание частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5 %; и частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %; для порошка - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Стандартизацию лядвенца рогатого предложено проводить спектрофотометрическим методом по двум группам БАВ: изофлавоноидам (в пересчете на биоханин А) и гидроксикоричным кислотам (в пересчете на кофейную кислоту). При этом количественные пределы их содержания установлены на уровне не менее 0,5%.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучение макроскопических и микроскопических признаков лядвенца рогатого, культивируемого в Томской области, позволило определить диагностические признаки: стебель имеет форму – от круглой снизу до 8-12-ти гранной в верхней его части; разную степень опушенности - от полного отсутствия снизу, до слабой опушенности в верхней его части; цвет стебля - от однотонного зеленого к чередованию полос темно-, светло-зеленого цвета; междоузлия во всех частях стебля имеют редкое опушение; характерны разворачивающиеся листовые пластинки из почки с черешочками, которые имеют высокую степень опушения; впервые установлено наличие устьичного аппарата двух типов (анизоцитный и аномоцитный), булавовидных железистых волосков с одноклеточной ножкой и многоклеточной головкой на обеих сторонах и краю листовой пластинки, по жилкам - многорядной кристаллоносной обкладки.

2. В лядвенце рогатом, культивируемом в Томской области, хроматографическими, физико-химическими и спектральными методами идентифицировано 34 соединения, из них 26 веществ фенольной природы, относящихся к кумаринам (изоскополетин, скополетин, умбеллиферон, эскулетин, скимин, скополин), флавоноидам (популнин, астрагалин, трифолин, изокверцитрин, кверцитрин, гиперозид, морин-3-О-Д-галактопиранозид, кемпферол-3-О-7-О-диглюкозид, кверцетин), изофлавоноидам (формонетин, генистеин, биоханин А, ононин), фенолкарбоновым кислотам (протокатеховая, п-кумаровая, галловая, кофейная, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая), 1 вещество тритерпеновой природы (олеаноловая кислота), 4 аминокислоты (валин, аргинин, лизин и глицин) и 3 моносахарида (D-галактоза, D-глюкоза и L-рамноза).

3. Установлена низкая сезонная изменчивость содержания изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот в лядвенце рогатом,

культивируемом в Томской области, что подтверждает обоснованность выбора указанных групп БАВ для стандартизации данного сырья; содержание изофлавоноидов и гидроксикоричных кислот увеличивается в период с середины июня и до конца августа, который можно считать рациональным для заготовки данного сырья.

4. Оценка экологической чистоты указанного сырья по содержанию тяжелых металлов и радионуклидов показала его соответствие требованиям ГФ, СанПиН для лекарственных препаратов и БАД; вместе с тем установлено, что содержание Zn и Co в сырье не соответствует требованиям МДУ и ВСНиТ, что должно учитываться производителями кормов и кормовых добавок для животных.

5. На основании проведенного комплексного исследования разработан и предложен проект нормативной документации на новый вид лекарственного сырья «Лядвенца рогатого трава», в который включены параметры определения подлинности и качества сырья по макроскопическим и микроскопическим признакам, результатам хроматографического исследования, числовым показателям, в том числе по содержанию гидроксикоричных кислот и изофлавоноидов, определяемых экстракционно - спектрофотометрическим и прямым спектрофотометрическим методами.

6. Урожайность *Lotus corniculatus* в природно-климатических условиях Томской области на примере участка 0,8 га составляет $4865 \pm 253,6$ г/м², эксплуатационный запас - 3361 кг, возможный ежегодный объем заготовок - 610 кг сырья; сравнение урожайности сорта «Солнышко», возделываемого в Томской области и других областях европейской части России, показало его высокую продуктивность по зеленой массе и сухому веществу, превосходящие аналогичные показатели этого сорта, возделываемого в других регионах на 6,6 – 69,9%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ:

- ФС – фармакопейная статья;
- ГЖХ – газожидкостная хроматография;
- ГКК – гидроксикоричные кислоты;
- ГХЦГ – гексахлорциклогексан;
- ДДТ – дихлордифенилтрихлорметилметан;
- ТСХ – хроматография в тонком слое сорбента;
- ГФ – Государственная фармакопея;
- ОФС – общая фармакопейная статья;
- РФ – рентгено-флуоресцентный анализ;
- СФ – спектрофотометрия, спектрофотометр;
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
- р-р – раствор;
- УФ – ультрафиолетовый;
- ФС – фармакопейная статья;
- ГОСТ – государственный отраслевой стандарт;
- ТМ – тяжелые металлы;
- СССР – Союз Советских Социалистических Республик;
- ИК – инфракрасный;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ПМР – протонный магнитный резонанс;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- СанПин – санитарно-эпидемиологические правила и нормы;
- МДУ – максимально допустимый уровень;
- ВСНиТ – Ветеринарно – Санитарные Нормы и Требования;
- БАД – биологически активные добавки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова, Е.М. Флора северных лесостепей Средней Сибири: конспект/ Е.М. Антипова. – Красноярск: РИО КГПУ, 2003. – 464 с.
2. Афонин, А.Н. Грин, С.Л. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран/[Электронный ресурс]: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения/интернет-версия 2.0. – 2008. – режим доступа: <http://www.agroatlas.ru> (18.08.2019)
3. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. – Москва: Наука, 1975. – 175 с.
4. Александрова, Э. А. Тяжелые металлы в почвах и растениях и их аналитический контроль/ Э. А. Александрова. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет, 2001. – 166 с.
5. Бондарчук, Р.А. К вопросу о радиоактивной чистоте некоторых видов, произрастающих в районе ОАО «Сибирский химический комбинат» / Р.А.Бондарчук ,Н.Э. Коломиец, А.А. Марьин, Н.Ю. Абрамец // «Проблемы современной биологии»: материалы VII международной научно-практической конференции (15.01.2013). – Москва, 2013. – С. 50–54.
6. Бандюкова, В.А. Исследование химии флавоноидных соединений и закономерности их распределения в растениях: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.04/ Бандюкова В. А. – Ереван,1975. – 41 с.
7. Бандюкова, В.А. Фенолокислоты их эфиры и гликозиды / В.А. Бандюкова. Химия природных соединений. – 1983. – № 3. – С. 263–273.
8. Бандюкова, В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов/ В.А.Бандюкова, А.А.Шинкаренко. Химия природных соединений. – 1983. – №1. – С. 20–24 .

9. Бандюкова, В.А. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографирования на бумаге / В.А.Бандюкова. Растительные ресурсы. – 1965. – Т.1. – Вып.4. – С.591–597.
10. Бекишева, И.В. Лядвенец украинский. Красная книга Омской области./ Бекишева И.В// Издательство: Ом ГПУ. – 2005. – С. 331.
11. Белоусов, М.В. Фармакогностическая характеристика и биологическая активность представителей семейства вересковые (Ericaceae) флоры Сибири и Дальнего Востока: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук: 15.00.02 / М.В. Белоусов. – Томск, 2004. – 336с.
12. Биотехнология в сельском и лесном хозяйстве: Бобовые и масличные культуры/ Прыгун – Верлаг. I изд. – Т. 10. – США, Берлин Гейдельберг, 1990. – 318 с.
13. Блажей, Л. Фенольные соединения растительного происхождения/ Л.Блажей, А.Шутый// - Москва, - 1977. – 240 с.
14. Бондарь, Д.А., Бондарь А.А. Флавоноидный состав травы лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) по фазам онтогенеза/ Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов// Пятигорск. – 2012. – Вып. 67. – С. 16–17.
15. Браславский, В.Б. Количественное определение суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в почках некоторых видов *Populus L.* / В.Б. Браславский, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Н.А. Безрукова// Растительные ресурсы. – 1991. – Вып.3. – С.130–134.
16. Великая, Т. В. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica Dioica L.*) методом ТСХ / Т. В. Великая, К. К. Кожанова, С. К. Жетерова и др. // Международный научно-исследовательский журнал. — 2016. — № 1 (43) Часть 3. — С. 78—80.
17. Великая, Т. В. Создание и исследование пролонгированных лекарственных форм на основе интерполимерного комплекса для

- лечения сердечно-сосудистых заболеваний: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: 15.00.01 / Т.В. Великая. – Москва, – 2005. – 201 с.
18. Высочина, Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных / Г.И. Высочина. – Новосибирск: Наука, 2004. – 240с.
 19. Генри, Т.А. Химия растительных алкалоидов/ Т.А. Генри. – Москва: Государственное научно-техническое изд-во химической литературы, 1956. – 807 с.
 20. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.
 21. Гейсман, Т. А. Биохимические методы анализа растений/ Антоцианы, халконы, ауроны, флавоны и родственные им водорастворимые растительные пигменты// Ленинград: Медицина. – 1960. – С. 453 – 519.
 22. Глушко, М.П. Изучение тритерпеновых сапонинов травы тысячелистника широколопастного *Achillea latiloba* Ledeb / М.П. Глушко // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион: Естественные науки. 2006. – №7. – С. 47–50.
 23. Государственная Фармакопея Российской Федерации: Т. 4. [Электронный ресурс]/ под ред. С.В. Емшанова, О.Г. Потанин, Е.В. Буданова, В.В. Чистякова. – 14 – е изд. Москва, 2018. – режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html (07.06.2019)
 24. Государственная Фармакопея Российской Федерации: Т. 2. [Электронный ресурс]/ под ред. С.В. Емшанова, О.Г. Потанин, Е.В. Буданова, В.В. Чистякова. – 14 – е изд. Москва, 2018. – режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/index.html (07.06.2019)

25. Государственный реестр селекционных достижений, допущенный к использованию. Т. 1, 2019.– С. 60. – режим доступа: http://www.chelagro.ru/farming_industry/plant-growing/gosreestr_selekts_dostizh_russia_2019.pdf (18.10.2019)
26. Горохова, В.Г. Высокоэффективная жидкостная хроматография растительных фенольных соединений / В.Г. Горохова, Н.А. Тюкавкина, В.А. Бабкин // Четвертый всесоюзный симпозиум по фенольным соединениям: тез. докл. – Ташкент: ФАН, 1982. – С. 21.
27. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы. – режим доступа: <http://government.ru/programs/208/about/> (12.12.2019)
28. Государственная программа «Охрана окружающей среды» на 2013–2020 годы. – режим доступа: <http://www.mnr.gov.ru/regulatory/detail.php?ID=134258> (01.03.2019)
29. Гравель, И. В. Определение остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье/ И. В. Гравель, И. А. Самылина, О. И. Терешкина, И. П. Рудакова, С. В. Морозов, Г. П. Яковлев//Традиционная медицина. – 2011. – № 4. – С. 60–64.
30. Гравель, И.В. Гармонизация подходов к оценке безопасности состава лекарственных растительных препаратов / О.И.Терешкина, И.А Самылина, И.П.Рудакова, И.В. Гравель // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 80 – 86.
31. Гравель, И.В. Региональные проблемы экологической оценки лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на примере Алтайского края: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук: 15.00.02/ И. В. Гравель. – Москва, 2005. – 363 с.

32. Гринкевич, Н.И., Сафронич, Л.Н. Химический анализ лекарственных растений/Учебное пособие для фармацевтических вузов //Сафронич Л. Н., Отряшенкова В. Э. и др. Под ред. Гринкевич Н. И., Сафронич Л. Н. — Москва, 1983.— 176 с.
33. Губанов, И.А., Киселев К.В., Новиков К.В., Тихомиров В.Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России в 3т./ И.А. Губанов. — Москва, — 2003. — 3Т. — 521 с.
34. Давыдов, В.С., Флавоноиды надземной части *Scutellaria polyodon Juz.* / В.С. Давыдов, Г.К. Никитина, В.А. Бандюкова // Растительные ресурсы. — 1991. — Вып. 2. — С. 54–58.
35. Девятнин, В.А. Методы химического анализа в производстве витаминов/ В.А. Девятнин// Москва. — 1964. — С. 308–309.
36. Дзюба, Н.П. Установление качественного и количественного состава полисахаридов в растительном сырье и препаратах физико-химическими методами / Н.П. Дзюба, Г.Я. Хант, В.Н. Цушенко // Фармацевтический журнал. — 1975. — № 6. — С. 54–58.
37. Долгова, А.А., Ладыгина Е.Я. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии/А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. — Москва: Медицина, 1976. — 256 с.
38. Драницина, В.Б. Микроэлементы - химически и фармакологически активные ингредиенты лекарственных растений: автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук: 14.00.25/ В. Б.Драницина. — Ярославль, 1975. — 28 с.
39. Дубовая, А.В. Влияние химических элементов на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (обзор литературы) /А.В. Дубовая// Мать и дитя в Кузбассе. — 2016. — Вып. №4 (67). — С. 10 – 14.
40. Евдокимова, О.В. Определение содержания суммы фосфолипидов и каротиноидов в плодах некоторых видов боярышника / О.В.

- Евдокимова, И.А. Самылина, О.В. Нестерова// Фармация. – 1992. – Вып. № 6. – С. 70–72.
41. Жидкостная хроматография растительных фенольных соединений. Обращенно-фазовая хроматография фенолокислот / Н.А. Тюкавкина, В.Г. Горохова, В.А. Бабкин и др. // Химия древесины. – 1979. – Вып. №4. – С. 76–80.
42. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения. Метаболизм распространение и функции./ М.Н. Запрометов. – Москва: Медицина, – 1993. – 272 с.
43. Запесочная, Г.Г. О флавоноидах некоторых лекарственных растений / Г.Г. Запесочная, А.И. Баньковский // научные Труды ВНИИ лекарственных растений. – 1969. – Т. 15. – С. 629–639.
44. Запесочная, Г.Г. Полифенолы растений. Изучение химического состава листьев *Rhododendron aureum Georgi.* / Г.Г. Запесочная, А.И. Баньковский // Химия природных соединений. – 1965. – Вып. № 4. – С. 289–292.
45. Зарубин, А.М. Флористические находки в Прибайкалье/ А.М. Зарубин, М.М. Иванов и др.// Ботанический журнал. – 1993. – Т. 78. – Вып. № 8. – С. 93–101.
46. Зекич, Н., Симич А., Вукович С. Влияние сроков хранения на качество семян лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus L.*) / Н. Зекич, А. Симич, С. Вукович//Кормопроизводство. – 2012. – С. 25–26.
47. Змеева, О.Н., Коломиец Н.Э., Абрамец Н.Ю., Бондарчук Р.А. *Lotus corniculatus L.* перспективный вид рода *Lotus L.* /О.Н. Змеева, Н.Э. Коломиец, Н.Ю. Абрамец, Р.А. Бондарчук // Химия растительного сырья. – 2017. – Вып. №4. – С. 5–14.
48. Иванов, В.П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов / В.П.Иванов. – Москва: Наука, - 1973. – 295 с.

49. Кабата-Пендиас, А., Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – Москва: Мир, 1989. – 440 с.
50. Качественный анализ флавоноидов в растительном материале при помощи хроматографии на бумаге: Метод. рекомендации / Сост. В.А.Бандюкова, А. Л. Шинкаренко. – Пятигорск, 1972. – 21 с.
51. Киселева, Т.Л. Фитотерапия: Методические рекомендации. / Москва: ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2006. – 42 с.
52. Клокова, М.В. Кумарины рода *Ledum* L. / М.В. Клокова, Е.А. Серых, Т.П. Березовская // Химия природных соединений. – 1982. – Вып. № 4. – С. 517.
53. Клышев, Л.К. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования) / Алма-Ата: Наука, 1978. – 220 с.
54. Король, В.В. Фармакогностичне вивчення *Lotus corniculatus*: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: 15.00.02/ В. В. Король. – Харьков. – 1999. – 18 с.
55. Коломиец, Н.Э. Фармакогностическое исследование рода *Equisetum* L. флоры Сибири как источника лекарственных средств: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук: 14.04.02 / Н. Э. Коломиец. – Москва. – 2010. – 414 с.
56. Коломиец, Н.Э., Агеева Л.Д., Абрамец Н.Ю. Элементный состав видов рода *Equisetum* L./ Н.Э. Коломиец, Л.Д. Агеева, Н.Ю. Абрамец // Фундаментальные исследования. – 2014. – Вып. № 8 – 6. С. 1418 – 1421.
57. Коломиец, Н.Э. Стандартизация листьев крапивы двудомной Коломиец Н.Э., Калинкина Г.И., Сапронова Н.Н. / Фармация. – 2011. – Вып. № 6. – С. 22–24.

58. Косман, В.М., Зенкевич И.Г. Количественное экстрационно-спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В.М.Косман, И.Г. Зенкевич // Растительные ресурсы. – 2001. – Вып. №4. – С.123–129.
59. Кочетков, Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков. – Москва: Химия, 1967. – 674 с.
60. Кошелева, Л.И. Оксикумарины и их гликозиды / Л.И. Кошелева, Г.К. Никонов // Фармация. – 1969. – Вып. № 4. – С. 79–85.
61. Краснов, Е.А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ. / Е.А. Краснов. – Томск, 1987. – 184 с.
62. Крисс, Е.Е., Волченкова И.И., Григорьева А.С., Коханович Н.Ф. Координационные соединения металлов в медицине / Киев. – 1986. – 216 с.
63. Крупникова, Т.А. Количественное определение оксикоричных кислот в листьях кукурузы / Т.А. Крупникова, Л.И. Драник, В.Н. Давыдова. Растительные ресурсы. – 1971. – Вып.3. – С. 449–452.
64. Крылов, П.Н. Флора Западной Сибири. Т. 12. Ч. 2. / сост. Л.П. Сергиевская. – Томск, 1964. – С. 3255–3550.
65. Кузнецова, Г.А., Природные кумарины и фурукумарины / Г.А. Кузнецова. – Москва: Наука, 1967. – 247 с.
66. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин. – Самара, 1996. – 80 с.
67. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для высшей школы/ В.А. Куркин. – Министерство образования и науки Российской Федерации. 2-е изд. перераб. и доп. – Самара: Офорт, 2007. – 1239 с.
68. Кшникаткина, А. Н. Энергетическая и экономическая эффективность возделывания новых, малораспространенных кормовых культур и

- лекарственных растений./ Проблемы рационального использования растительных ресурсов. Сб. науч. тр. Горский ГАУ// Владикавказ. – 2004. – С. 87–88.
69. Лавренов, В.К., Лавренова Г.В. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины/ В.К. Лавренов, Г.В. Лавренова. – Санкт-Петербург: Нева, 2003. – 501 с.
70. Ларина, И.В. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР/ Т. 2. // Москва, Л.: Сельхозгиз. – 1951. – С. 663–667.
71. Ловкова, М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Дервяго Л.Н. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний/ Микроэлементы в медицине. – Москва, 2005. – Вып. № 6(4). – С. 3–10.
72. Максютин, Н.П. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений / Н.П. Максютин, В.И. Литвиненко // Фенольные соединения и их биологические функции. – Москва. – 1968. – С. 7–26.
73. Малышева, Л.И. Конспект флоры Иркутской области (сосудистые растения). – Иркутск: ИГУ, 2008. – 327 с.
74. Мамаев, С.А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений / С.А. Мамаев. – Москва: Медицина, 1973. – 284 с.
75. Маркелова, В.Н., Фомичев Ю.П., Клейманов Р.В., Никанова Л.А. Морфология и химический состав зеленой массы кукурузы при применении биоудобрения «Никфан» / Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – Вып. № 4(78). – С.28–33.
76. Медведев, П.Ф. Новые кормовые культуры СССР. Москва, 1948. – 324с.
77. Меликян, А.П. Опыление цветковых растений. Москва: ВИНТИ, 1991. - Вып. № 12. – 278 с.

78. Методы исследования углеводов: Пер. с англ. В.А. Несмеянова / Под ред. проф. Харлина. – Москва: Мир, 1975. – 445 с.
79. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.Е. Аросимович, М.И. Смирнов-Иконников и др. – Ленинград: Колос, 1972. – 456 с.
80. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – Москва: Колос, 1985. – 194 с.
81. Морозова, Е.В., Благоразумная Н.В. Разработка методики количественного определения кумаринов в комплексном экстракте противогрибкового действия, полученного различными экстрагентами / Е.В.Морозова, Н.В. Благоразумная // Фундаментальные исследования. – 2008. – Вып. № 8 – С. 147–149.
82. Минаева, В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование / В.Г. Минаева. – Новосибирск: Наука СО АН СССР, 1978. – 253 с.
83. Мухина, Н. А. Культурная флора: Т. XIII. /Многолетние травы. – Москва. Колос, 1993. – 335 с.
84. Науменко, Н.И. Флора и растительность Южного Зауралья: монография./ Курган. – Курганский государственный университет, 2008. – 512 с.
85. Науменко, Н.И., Волков Д.Б. Определитель сосудистых растений Южного Зауралья./ Н.И. Науменко, Д.Б Волкова. Вып. № 2. – Курган, 2001. – 87 с.
86. Нелюбина, Ж. С, Касаткина, Н. И. Формирование кормовой продуктивности лядвенца рогатого в зависимости от приемов возделывания в условиях Удмуртской Республики/ Нива Поволжья – Вып. № 1 (42) февраль. – 2017. С. 47–52.
87. Нелюбина, Ж. С, Касаткина, Н. И. Фатыхов, И.Ш. Агрофитоценозы многолетних трав второго года жизни/ Адаптивные технологии в

- растениеводстве// Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 50-летию агрономического факультета ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА. – Ижевск, 2005. – С. 190–194.
88. Новоселов, М.Ю., Толмачева Е.В., Зятчина Г.П., Дробышева Л.В. Оценка новых селекционных номеров лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) по хозяйственно-полезным признакам. / Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. - 2016. – Вып. №12. – С. 371–374.
89. Образцов, В. Н. Лядвенец рогатый в черноземной лесостепи: монография / В. Н. Образцов, Д. И. Щедрина; под ред. В. А. Федотова. //Воронеж: ФГБОУ ВПО Воронежский ГАУ, 2012. – 233 с.
90. Оразбаева, П.З., Ишмуратова М.Ю., Ивасенко С.А., Марченко А.Б., Лосева И.В. Сравнительное фармакогностическое изучение двух хемотипов *Thymus serpyllum* L.s.l. Центрального Казахстана. /Научная конференция «Фитонириг – единство силы природы и научных достижений. Возможности и перспективы» // Алтаты. – 2018. – Т. 2. – С.43.
91. Паранько, Н.М. Гигиеническая характеристика загрязнения тяжелыми металлами окружающей среды промышленного региона и иммунный статус у детей / Н.М. Паранько, Н.И. Рублевская // Гигиена и санитария. – 1999. – Вып. № 2. – С. 51 – 53.
92. Пат. № 2425688, Российская Федерация, МПК А61К 36/48 Растительное антигельминтное средство/ В.В. Горчаков, В.В. Зайцев, В.Н. Скира, В.П. Воротников: заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны РФ Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 2009136584/10; заяв. 2009.10.02; опуб. 10.08.2011.

93. Пат. № 2601588, Российская Федерация, МПК А 01С 1/ 00. Способ стимулирования прорастания семян бобовых и твердо-семенных растений и устройство для его осуществления/ О.Н. Змеева, Л.Д. Проскурина, Л.В. Петрова: заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН). – № 2015118265/13; заяв. 2015.05.15; опуб.11.10.2016.
94. Пат. № 2686990, Российской Федерации, МПК А01В 79/02, А01G 22/40. Способ возделывания многолетней кормовой культуры лядвенца рогатого *Lotus corniculatus*»/ О.Н. Шплис, Н.Э. Коломиец, Н.Ю. Абрамец, Е.Б. Дайбова, Н.И. Каракчиева: заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН), Шплис О. Н., Проскурина Л. Д., Зенков С. В., Дайбова Е.Б., Каракчиева Н. И., Коломиец Н. Э., Абрамец Н. Ю. – № 2018137365; заяв. 2018.10.23; опуб. 05.06.2019.
95. Печенникова, Е.В. О биологическом значении микроэлементов (обзор зарубежной литературы) / Е.В. Печенникова, В.В. Вашкова, Е.А. Можаяев // Гигиена и санитария. – 1997. – Вып. № 4. – С. 41–43.
96. Пикун, П.Т. Пикун, М.Ф. Чекель, Е.И. Боровик, А.А. Довнар, И.А. Кормопроизводство: нетрадиционные культуры, проблемы и пути их решения/ П. Т. Пикун [и др.]//Полесский филиал РНИУП "Институт земледелия и селекции НАН Беларуси". – Мозырь: Белый Ветер, 2005. – 111 с.
97. Пименов, М.Г. Хемосистематика / М.Г.Пименов, Л.Ф.Борисова // Итоги науки и техники. Ботаника. – 1987. – Т.6. – Вып.№1. – С.7 – 95.

98. Писковацкая, Р. Г. Особенности селекции лугопастбищных трав./ Р.Г. Писковацкая// Кормопроизводство. – 1997. – Вып. №10. – С. 21–25.
99. Писковацкая, Р. Г. Внутривидовая гибридизация и скрининг в создании лугопастбищных сортов многолетних бобовых трав./ Новые методы селекции и создание адаптивных сортов сельскохозяйственных культур/. Северо-Восточный центр РАСХН: Киров. – 1998. – С. 54 – 55.
100. Писковацкая, Р. Г. Основные результаты селекции лугопастбищных бобовых трав./ НИИСХ Северо-Востока: Киров. – 1992. – С. 20–24.
101. Писковецкая, Р. Г. Новые сорта лугопастбищных бобовых трав – залог продуктивности кормовых угодий./ Адаптивное кормопроизводство.// Москва: Росинформагротех. – 2002. – С. 278.
102. Положий, А.В., Малышева Л. И. Флора Сибири. Т. 9. – Новосибирск: Наука, 1994б. – 280 с.
103. Полуэктова, Т.В. Хроматографическое исследование изофлавоноидов климактерического сбора /Т.В. Полуэктова, Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2011. – Вып. №2. – С.141–144.
104. Полуэктов, И.С. Методы анализа по фотометрии пламени / И.С. Полуэктов. – Москва: Медицина, 1988. – 145 с.
105. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование./ Семейства *Hydrangeaceae-Haloragaceae. L.* – Москва, 1987. – 326 с.
106. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность./ Т. 3. Семейства *Fabaceae-Ariaceae.* – СПб.: Москва 2018.10.23, 2010. – 601 с.
107. Ревенский, В.А. Агрохимические основы оптимизации минерального питания растений и воспроизводства плодородия почв Забайкалья: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук: 06.01.04/ В. А. Ревенский. – Улан-Удэ. – 2002. – 329 с.

108. Рышкель, О.С., Крюкова Л.И., Тыновец С.В. Лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus*) перспективная культура для антропогенно преобразованных почв Припятского Полесья. – Вестник ПолесГУ. – 2010. – С. 50–54.
109. Самбукова, Т.В., Овчинников Б.В., Ганапольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д./ Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии// Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – Т. 2. – Вып. № 15. – 2017. – С. 56–63.
110. Самылина, И.А. Сердечные гликозиды: Учебное пособие./ И.А. Самылина. – Москва: Медицинское информационное агентство. – 2011. – 228 с.
111. СанПиН 2.3.2.1078 – 01: [Электронный ресурс]/Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов// для биологически активных добавок к пище на растительной основе. – режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> (13.03.2019)
112. Силантьева, М.М. Адвентивные виды растений во флоре Алтайского края./ Флора и растительность антропогенно нарушенных территорий.// Всерос. науч. конф. с междунар. участием. – Кемерово. – Вып. № 6. – 2010. – С. 45–47.
113. Скальный, А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение): Практическое руководство для врачей и студентов медицинских вузов. – Москва, 2001. – 96 с.
114. Стандартизация климактерического сбора / Полуэктова Т.В., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э. // Фармация. – 2012. - Вып. № 6. – С. 23–26.
115. Стрелков, В. Г. Культура лядвенца рогатого в условиях северо-восточной части Белоруссии: диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук: 06.01.09/ В.Г. Стрелков. – Горки, 1974. – 381 с., ил.

116. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е. Л. Стыскин, Л. Б. Ициксон, Е. В. Браудэ. – Москва: Химия, 1986. – 288 с.
117. Судыко, А.Ф. Определение урана, тория, скандия и некоторых редкоземельных элементов в двадцати четырех стандартных образцах сравнения инструментальным нейтронно-активационным методом / Материалы V Международной конференции // Томск. – 2016. – С. 620 – 624.
118. Тихонова, Л.А. Флавоновые гликозиды из *Gentiana macrophylla* / Л.А. Тихонова, Н.Ф. Комисаренко, Т.П. Березовская // Химия природных соединений. – Вып. № 2. – 1989. – С. 321–322.
119. Тонкослойная хроматография флавоноидов: Метод. рекомендации / Сост. В.А. Бандюкова, А.Л. Шинкаренко. – Пятигорск, 1973. – 15 с.
120. Трухачев, В. И. Сорные, лекарственные и ядовитые растения (альбом антропофитов). / В.И. Трухачев. – Ставрополь: АРГУС, 2006. – 264 с.
121. Тумасова, М. И. Новые сорта и виды многолетних бобовых трав в биологической системе земледелия и кормопроизводства (в условиях зоны Северо-Востока)./ Производство экологически безопасной продукции растениеводства. – Пущино. – 1996. – С. 193–196.
122. Тумасова, М. И. Технология возделывания лядвенца рогатого на корм и семена. – НИИСХ Северо-Востока: Киров, 2004. – 50 с.
123. Тыновец, С.В., Флиппенко В.С. Продуктивность и кормовая ценность *Lotus corniculatus* на антропогенно преобразованных почвах // Вестник ПолесГУ. – 2012. – С. 36–40.
124. Флора СССР. Под ред. Комарова В. Л., 1945. – Т. 11. Бобовые. – С. 291.
125. Флора Сибири. т. 9: Fabaceae (*Leguminosae*). – Новосибирск, 1994. – 280 с.
126. Филиппова, И. Рынок растительных средств: проблемы, перспективы, приоритеты / И.Филиппова // Ремедиум. – 2016. – С. 15–16.

127. Цвелев, Н.Н. Новые комбинации таксонов сосудистых растений. Новости систематики высших растений. Н.Н. Цвелев. – Москва, 2000б. – Т.32. – С.181–185.
128. Шаршунова, М.В. Тонкослойная хроматография в фармации и биохимии / М.В. Шаршунова, В. Шварц, И. Михалец. – Москва, 1980. – 260 с.
129. Шталь, Э. И. Хроматография в тонком слое / Э.И. Шталь. – Москва: Мир, 1965. – 481 с.
130. Эбель, А.Л. О флоре северо-восточных окрестностей города Томска/ Проблемы изучения растительного покрова Сибири. А.Л. Эбель. – Томск, 2005б. – С. 108–109.
131. Эбель, А.Л. Новые находки адвентивных растений в Томской области./Ботанический журнал. А.Л. Эбель – 2007. – Т. 92. – Вып. № 5. – С . 764–774.
132. [Электронный ресурс]/ Лекарственные растения. – режим доступа: http://lecrast.ru/index.php?option=com_content&task=view&id=28 (16.04.2019)
133. [Электронный ресурс]/ Лядвенец рогатый. – режим доступа: <http://samsay.ru/narodrasti/2393-lyadvenec-rogatyj.html> (12.12.2019)
134. [Электронный ресурс]/Лядвенец рогатый, сорт «Луч». Москва/ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса. – режим доступа: <https://www.vniikormov.ru/sorta/katalog-sortov-kormovykh-kultur-37.php> (03.11.2019)
135. [Электронный ресурс] /Республика Беларусь/Лядвенец рогатый. – режим доступа: http://fhfortuna.com/tehnologii-vozdelyvaniya/article_post/lyadvenets-rogatyj (22.02.2019)
136. [Электронный ресурс]/ Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных (утв. 15 июля 1997).

– № 13 – 7 – 2/1010). – режим доступа:

<http://docs.cntd.ru/document/1200102836> (02.02.2019)

137. Эффективность препаратов растительного происхождения в терапии тревожных расстройств/[Электронный ресурс]/ О.А. Шавловская// ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России: Российский Международный Журнал. – 2012.– №8. – С. 436 – режим доступа:
https://www.rmj.ru/articles/psikhiatriya/Effektivnosty_preparatov_rastitelnogo_proishozhdeniya_v_terapii_trevoghnnyh_rasstroystv/ (07.04.2020)
138. Abderrahmane, M., Bouheroum M., Malafronte N., Ambola M.D, Meriem A., Severino L. Phytochemical investigation and cytotoxic activity of *Lotus corniculatus*. Pharmacology online. – 2014. – Vol. 3. – P. 222–225.
139. Abdallah, R.M., Hammouda H.M., Mohamed M Radwan, Wanas A.S., Sallam S.M., ElSohly M.A., El-Gazza N.S. Phytochemical investigation of *Lotus corniculatus* growing in Egypt. Planta Medica. – 2016. – Vol. 2. – 81 p.
140. Alston, M.R.E. Perspectives in chemotaxonomy plants / M.R.E. Alston, T.J.Mabry, B.L.Tiurner // Scien. – 1963. – Vol.145. – P. 654 – 659.
141. Alston, R.E. Perspectives in chemotaxonomy / R.E. Alston, T.J.Mabry, B.L.Turner // Science. – 1963. – Vol.142. – P. 545–552.
142. A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*. Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T / G. Brunner, U. Burger, P. Castioni, I. Kapetanidis, P. Christen // Phytochemical Analysis. – 2000. – 11. – P. 29–33.
143. Asadbegi, M., Mirazi N., Vatanjian M., Gharib A. Comparing the healing effect of *Lotus corniculatus* hydroethanolic extract and phenytoin cream 1% on the rat's skin wound: A Morphometrical and Histopathological Study. Journal of Chemical and Pharmaceutical. – 2016. – Vol. 9, N2. –P.746–752.

144. Arin, M.J. High-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection / M.J. Arin, M.T. Diez, J.A. Resines // J. Chromatogr. – 1995. – A 849(2): – P. 341–348.
145. Banwart, W.L. HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoids / W.L. Banwart, P.M. Porter, T.C. Granato, I.I. Hassett // J. Chem. Ecol. – 1985. – Vol. 11, N 3. – P. 383–395.
146. Barykina, R. P., Kramina T.E. A comparative morphological and anatomical study of the model legume *Lotus japonicus* and related species/ *Wulfenia* 13. – 2006. – P. 33–56.
147. Bate – Smith, E.C. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance./1. Dicotyledons. //Journal of Linnean Society of Botany, 58. – 1965. – P. 95–173.
148. Bisby, F.A., Buckingham J., Harborne J.B. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae./ ILDIS, International Leg-ume Database and Information Service and CHCD.//Chapman & Hall Chemical Database. //Vol. 1. Plants and their Constituents. – London; New York, 1994. – 1180 p.
149. Chemical and chemotaxonomical studies on filices. LI. Chemical studies on the constituents of Costa Rican Ferns / T.Satake, T. Murakami, Y. Saiki, C.M. Chen, P.L.D. Gomez // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1984. – 32. – P. 4620–4624.
150. Ebata, N. Et. Al. Saponins from the root of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 41. – P. 895–901.
151. Erdtman, E. Chemical principles in chemosystematics/ Rec. adv. in phytochemistry // Edetiona by T.J.Mabry, R.E.Alston, V.C.Runeckles. – New-York. – 1972. – Vol.11. P. 263–268.
152. Efeovbokhan, N., Bhattacharaya S.K., Ahokas R.A Zinc and the prooxidant heart failure phenotype / *J.Cardiovasc.Pharmacol.* – 2014. – №64 (4). – P. 393–400.

153. Escaray, F.J., Menendez A.B., Gárriz A., Pieckenstain F.L., Estrella M.J., Castagno L.N., Carrasco P., Sanjuán J., Ruiz O.A. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils.// *Plant Science*. – 2012. – Vol. 182. – P. 121–133.
154. Foo, L.Y., Newman R., Waghorn G., McNabb W.C., Ulyatt M.J. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*/ *Phytochemistry*. – 1996. Vol. 41. – P. 617–624.
155. Fumić, B. Development of horn *Lotus* extract based on cyclodextrin as a potential substrate for restorative therapy for type III mucopolysaccharidoses./ *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2018, Volume 92. – P. 369–379.
156. Fumić, B., Jablan, J., Cinčić, D., Zovko Končić, M., Jug, M. Cyclodextrin encapsulation of daidzein and genistein by grinding: implication on the glycosaminoglycan accumulation in mucopolysaccharidosis type II and III fibroblasts / *J. Microencapsul* 35. – 2017. – P. 1–12.
157. Fumić, B., Mario, J. Phytochemical investigation citotoxicactivity of *Lotus corniculatus*./ *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2018. – P. 369–379.
158. Галузінська, Л. В. Експериментальне вивчення протизапально • активності поліфенольного екстракту з надземного частини лядвенцю рогатого: автореф. дисс. канд. фарм. наук: 14.03.05 / Л. В. Галузінська. Харків. – 2008. – 20 с.
159. Golea, L., Haba H., Lavaud C., Long C., Benkhaled M. Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik. // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2012. – Vol. 45. – P. 12–15.
160. Grant, W. F. A chromosome atlas and interspecific hybridization index for genus *Lotus* (Leguminosae)./ *Can. J. Genet.// Cytol.* 7(3). – 1965. *Cytol.* – P. 457– 471.

161. Grant, W. F. A chromosome atlas and interspecific-intergeneric index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). /Can. J. //Bot. 73. – 1995. – P. 1787–1809.
162. Grant, W. F. & Marten G. C. Chapter 11. Birdsfoot Trefoil. – In: Heath M. E., Barnes R. F. & Metcalfe D. S. [eds.]: Forages: The Science of Grassland Agriculture [4th ed.]:Ames:Iowa State Univ. Press. – 1985. – P. 98 – 108.
163. Gruber's, M. Y., Skadhauge B. Variation in morphology, plant habit, proanthocyanidins, and flavonoids within a *Lotus* germplasm collection/ Canadian Journal of Plant Science. – 2008. – P.121–132.
164. Harborne, J.B. , Baxter H. The handbook of natural flavonoids. /John Wiley and sons//New York. – 1999. Vol.2. – P. 2
165. Harney, P.M., Grant W.F. Chromatographic study of the phenolics of species of *Lotus* closely related to *L. corniculatus* and their taxonomic significance/ American Journal of Botany. – 1964. Vol. 51. – P. 621–627.
166. Harbom, J. B. The Flavonoids: advances in research since. //London, New York. – 1988. – P. 621.
167. Hegnauer, R. Comparative phytochemistry and plant taxonomy / R. Hegnauer // J.bot.ital. – 1986. – Vol.120. – №.1- 6. – P.15–26.
168. Jay, M., Hasan A., Voirin B., Viricel M-R. Les flavonoïdes du *Lotus corniculatus*./ Phytochemistry. – 1978. Vol. 17. N4. – P. 827–829.
169. Jay, M., De Luca V., Ibrahim K.. Purification, properties and kinetic mechanism of flavonol 8-O-methyltransferase from *Lotus corniculatus* L.// European Journal of Biochemistry. – 1986. Vol. 153 (2). – P. 321–325.
170. Jones, D.A., Crawford T.J. Variation of the colour of the keel petals in *Lotus corniculatus* L./ T.1. The polymorphism in Western Europe.// Heredity. – 1977. N 39. – P. 313–325.
171. Khan, H. Medicinal Plants: Economic Perspective and Recent Developments / H.Khan, A.Rauf // World Applied Sciences Journal . – 2014. Vol. 31(11). – P. 1925–1929.

172. Khalighi-Sigarodi, F., Ahvazi, M., Taghizadeh, M., Yazdani, D., Khalighi-Sigarodi, S., Bidel, S. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family/ Iranian Journal Pharmaceutical Research. – 2012. Vol.11, Issue 1. – P.295–302.
173. Koelzer, J., Pereira D.A., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Frode T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. //Food Chemistry. – 2009. Vol. 117. – P. 444–450.
174. Kramina, T. E. A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (Leguminosae, Loteae) in the European part of the former USSR./ Syst. Geogr. //Pl. 68. – 1999. – P. 265–279.
175. Molan, A.L., Waghorn G.C., Min B.R., McNabb W.C. The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. /Folia Parasitologica. – 2000. – Vol. 47. – P. 39–44.
176. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas: New York-Heidelberg-Berlin.(1970. – 354 p.). Chromatography. – 1995. – A 849(2): – P. 341 – 348.
177. Markham, K.R. Analysis and identification of flavonoids in practice / K.R. Markham, S.J. Bloor // In: Flavonoids in health and disease. – 1998. – P.1–34.
178. Markham, K.R. Carbon – 13 NMR Spectroscopy of flavonoids / K.R.Markham, V.M. Chari, T.J.Mabry / In: Harborne, J.B., Mabry, T.J. (Eds.), The Flavonoids: Advances in Research. Chapman & Hall, London. – 1982. – P.19–134.
179. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J.Mabry, K.R.Markham, M.B.Thomas. – New York-Heidelberg – Berlin. – 1970. – 354p.
180. McLafferty, F.W., The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data / F.W. McLafferty, D.B. Stauffer. – Wiley – Interscience. –1989. – Vol. – P.1–7.

181. Maroso, R. P., Carneiro C. M., Scheffer-Basso S. M., Favero D. Morphological and anatomical aspects of birdsfoot trefoil and big trefoil. R.Bras. //Zootec. – 2009; 38 (9): P. 1663–1667.
182. Mrozikiewicz, PM. Molecular mechanisms in phytotherapy/ Acta Biochim Pol.// – 2007. – PP. 54,144.
183. Nakaoki, T., Morita N., Hiraki A., Kurakawa Y. Medical resources. /V. Components of the leaves of *Lotus corniculatus* var. japonicas, *Microlespedeza striata*, *Magnolia obovata*, and *Abutilon avicennae*.// Yakugaku Zasshi – Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 76. – 1956. – P. 347–349.
184. Phytochemical phylogeny / Edited by J.B.Harborne. – New York . – 1970. – P. 335.
185. Phylogenetic relationships and evolution of equisetum, base on sequence data (rbcL and trnL – F) / D.R. Des Marrais, A. L. Smith, D.N. Britton, K.A. Pryier // Intern. Jour. of Plant Sc. - Chicago. – 2003. – Vol.163. – P. 735–749.
186. Popov, P. L. Plant species, using against viroous infection of man and animals // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2008. – Vol. 4, No. 3. – P. 17 – 64.
187. Pavelkovskaja, G.P., Ushakova L.Ju. Biotehnologii i fitopreparaty. (Conference proceedings) Jekologija i zdorov'e./ Kaliningrad: Izdatel'stvo Baltijskogo federal'nogo universiteta im. I. Kanta. – 2012. – P. 92–94.
188. Rafiq, S, Majeed R, Qazi AK, Ganai BA, Wani I, Rakhshanda S, Qurishi Y, Sharma PR, Hamid A, Masood A, Hamid R. Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines // Phytomedicine. – 2013, Vol. 15. – Iss. 21(1). – P. 30–38.
189. Rammrez – Restrepo, C.A. Nutritional studies on *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive rate and lamb growth

- under commercial dryland farming conditions/ the thesis of doctor of philosophy// – 2004. – 335 p.
190. Ramirez-Restrepo, C.A., Barry T.N., Lo´pez-Villalobos N., Kemp P.D. Harvey T.G. /Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. *Animal Feed Science and Technology*. – 2005. N121. – P. 23–43.
 191. Ramirez–Restrepo, C.A., Kemp P.D., Barry T.N., Lo´pez–Villalobos N. Production of *Lotus corniculatus* L.under grazing in a dryland farming environment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. – 2006. Vol. 49 (1). – P. 89–100.
 192. Reynaud, J., Jam M., Blaise S. 1991. Evolution and differentiation of populations of *Lotus corniculatus* s.l. (*FABACEAE*) from Southern French Alps (Massif du Ventoux and Montagne de Lure)./ *Canadian Journal of Botany*// 69. – 1991. – P. 2286–2290.
 193. Reynaud, J., Lussignol M. The Flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter*. – 2005. – Vol. 35 (1). – P.75–82.
 194. Reynaud J., Jay M., Raynaud J. Flavonoid glycosides of *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*. – 1982. – Vol. 21. – P. 2604.
 195. Robson, T. An introduction to complementary medicine / T.Robson. – Victoria //Australia: Griffin Press, South Australia. – 2003. – 75 p.
 196. Russo, R., Autore G., Severino L. Pharmaco-toxicological aspects of herbal drugs used in domestic animals. *Natural product communications*. – 2009. – Vol. 4. – P. 1–8.
 197. Scriber, J.M. Cyanogenic glycosides in *Lotus corniculatus*. *Oecologia* (Berl.). – 1978. – Vol. 34. – P. 143–155.
 198. Sarelli, L., Tuori M., Saastamoinen I., Syrjala-Qvist L, Saloniemi H. Phytoestrogen content of birdsfoot trefoil and red clover: effects of growth

- stage and ensiling method./ *Acta Agriculturae Scandinavica*// Section A – Animal Science. – 2003. – Vol. 53. – P. 58–63.
199. Salman, S.M., Ali S., Ahmed A., Afridi M.S., Rehman A.U. Preliminary phytochemical, essential element analysis and antimicrobial activities of ethanolic extract of *Lotus corniculatus*// *International journal of biosciences*. – 2015. – Vol. 7. N2. – P. 106–115.
 200. Saklani, A. Plant-derived compounds in clinical trials / A.Saklani, S.Kutty // *Drug discovery today*. – 2008. – 13. – P.16–171.
 201. Scott, D., Charlton J.F.L. Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) as a potential dryland herbage Legume in New Zeland Proceeding of the New Zeland Grassland Association. – 1983. – Vol. 44. – P. 98–105.
 202. Skalniy, A.V. Microelementoses person (diagnosis and treatment): A practical guide for doctors and medical students. // M. – 2001. – 96 p.
 203. *The Flavonoids: Advances in Research* / Eds J.B.Harborne and T.J.Mabry.- London: New York: Champan and Hall . – 1982.-xii. – 744 p.
 204. *The Plant List Version 1.1* [Electronic resource]. – access mode: <http://provisor.com.ua/arhive/1998/N22/perspect.php> (08.02.2020)
 205. Tschirch, A. *Angewandte Pflanzenanatomie/ ein Handbuch zur Studium des anatomischen Baues der in der Pharmacie, den Gewerben, der Landwirthschaft und dem Haushalte benutzten pflanzlichen Rohstoffe*// German. – 1889. – 570 p.
 206. *Validation of analytical procedures: methodology Q2B* / Intern, conf. on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. – Geneva: ICH Secretariat. – 1996. – 8p.
 207. Viden, I. T. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of very-long-chain α,ω -dicarboxylic acid dimethyl esters from *equisetum* (horsetail) / I. VidenT. // *J. of Chromatography A*. – 1989. – Vol. 465. – Issue 3. – P. 390–394.

208. Walter, E.D. Isolation of Oleanolic Acid and Saponin from Trefoil (*Lotus corniculatus*, var. *viking*). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1961. – Vol. 50. – N2. – 173 p.
209. Wei, B. – p., Zhang Y.-m., Cao Z. – z. Accumulation Patterns of Total Flavonoids and Saponins in Nine Legume Species. *Acta Agrestia Sinica*. – 2012. – Vol. 20 (1). – P. 88–95.
210. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization/ Geneva. – 2003. – 80 p.
211. Yan, S., Ren, W., Liu, Z. – P., (...), Liu, X. – B., Ma, W. In silico cloning and bioinformatics analysis of cyclophilin from *Lotus corniculatus*/Chinese Traditional and Herbal Drugs 47(19). – 2016. – P. 3481–3485.

Приложения

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ
 Руководитель Департамента
 государственного контроля качества,
 эффективности, безопасности
 лекарственных средств и медицинской
 техники Минздрава России
 _____ Ф.И.О.
 « ____ » _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
 СРЕДСТВА
 ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ
 (Проект)

Лядвенца рогатого трава
Loti corniculatis herba

ФС
 Вводится впервые

Срок введения установлен
 с « ____ » _____ г.
 до « ____ » _____ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на собранную в период цветения и высушенную траву культивируемого многолетнего травянистого растения лядвенца рогатого – *Lotus corniculatus L.*, сем. бобовых – *Fabaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Цельные или частично измельченные стебли, цилиндрические в поперечном сечении, с гладкой почти голой поверхностью, опушение встречается только в междоузлиях и узлах. Листья черешковые, тройчатые, состоящие из пяти листочков – 3-х верхних широко обратнойцевидных или обратноузкойцевидных ланцетных (два боковых

верхних слегка косые) и нижней пары косойцевидных. Нижние 2 листочка отставлены от верхних, находятся у основания черешка и напоминают прилистники. Черешок крылатый, голый, различной длины. Поверхность в месте обрыва черешка ровная. Листья цельнокрайние. Размер верхнего листка составляет 12,4-13,8 × 6,5-7,4 мм на листьях в средней части побега и 10-12, 7 × 4,7-5,4 мм на листьях в верхней части побега, непарно-перистые, сверху голые, снизу слабоопушенные или почти голые. Цвет листовых пластинок от бледно-серо-зеленого до темно-зеленого. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый.

Измельченное сырьё. Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) видны кусочки листьев, черешков, цветков. Цвет от бледно-серо-зеленого до темно-зеленого цвета с ярко-желтыми или бледно – желтыми вкраплениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый.

Порошок. Кусочки стеблей, цветоносов, листовых пластинок, соцветий, черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) видны кусочки листовых пластинок с ровной поверхностью, от светло-зеленого до зеленого и темно-зеленого цвета голые, кусочки черешков светло-зеленого цвета, фрагменты цветков или их части не крупные ярко-желтого или бледно – желтого цвета с коричневыми вкраплениями, на поперечном сечении которых могут быть видны темно-серые дугообразные пятна (сосудисто-волокнистые пучки).

Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого или серовато-зеленого с ярко-желтыми или бледно – желтыми включениями. Запах слабый. Вкус водного извлечения сладковатый.

Микроскопические признаки

Цельное и измельченное сырьё. При рассмотрении листа с поверхности на верхней стороне листовой пластинки видны клетки эпидермиса с

извилистыми стенками и характерными четковидными утолщениями на углах. Устьица погруженные, анизацитного типа, реже аномоцитного. Большое количество устьиц встречается на нижней стороне листа. По краю листа отмечается утолщение клеточных стенок эпидермиса покрытым толстым кутикулярным слоем. По главной жилке локализуется многорядная кристаллоносная обкладка, встречаются млечников. Клетки-идиобласты с флобафенами, располагаются однослойно непосредственно под эпидермой, по краю листа располагаются клетки с содержимым в виде антоцианов. По краю листовой пластинки с обеих сторон располагаются булавовидные железистые волоски с одноклеточной ножкой и многоклеточной головкой. На эпидерме листа имеются выросты сосочковидной формы, на некоторых листьях верхушка листа оканчивается простыми одноклеточными волосками. На поверхности листьев, чашечке и стеблях располагаются одно-, реже двухклеточные толстостенные простые волоски с гладкой или слабо-бородавчатой поверхностью. Кусочки черешка имеют четкую крыловидную форму, в каждом крыле имеется по одному сосудистому пучку, клетки покровной ткани покрыты тонкой однослойной кутикулой, присутствуют клетки-идиобласты и друзы. Эпидермис венчика цветка состоит из прямостенных клеток вытянутых вдоль оси. Жилки четко выражены, имеются многочисленные выросты сосочковидной формы. В эпидермисе стебля и чашечки установлено наличие минеральных включений оксалата кальция в виде друз. Фрагменты стебля покрыты плотно сомкнутыми овальными клетками эпидермиса, с утолщением в местах смыкания; присутствует тонкая 3 – 5 хлорофиллоносная первичная кора, в которой обнаружены многочисленные клетки – идиобласты с флобафенами; в эндодермисе встречается наличие крахмальных зерен. Сосудистые пучки открытые коллатеральные расположенные волнообразно по кругу.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты клеток эпидермиса с извилистыми стенками и четковидными утолщениями

на углах; фрагменты устьиц с 3-4 околоустьичными клетками; волоски (или фрагменты) простые одноклеточные, реже двухклеточные толстостенные с гладкой или слабо-бородавчатой поверхностью; булавовидные железистые волоски с одноклеточной ножкой и многоклеточной головкой; фрагменты эпидермиса с розеткой в месте прикрепления волосков; фрагменты эпидермиса с клетками идиобластами; фрагменты эпидермиса цветка с прямостенными клетками и выростами сосочковидной формы; фрагменты черешка, стебля с сосудистыми пучками, идиобластами и крахмальными зернами.

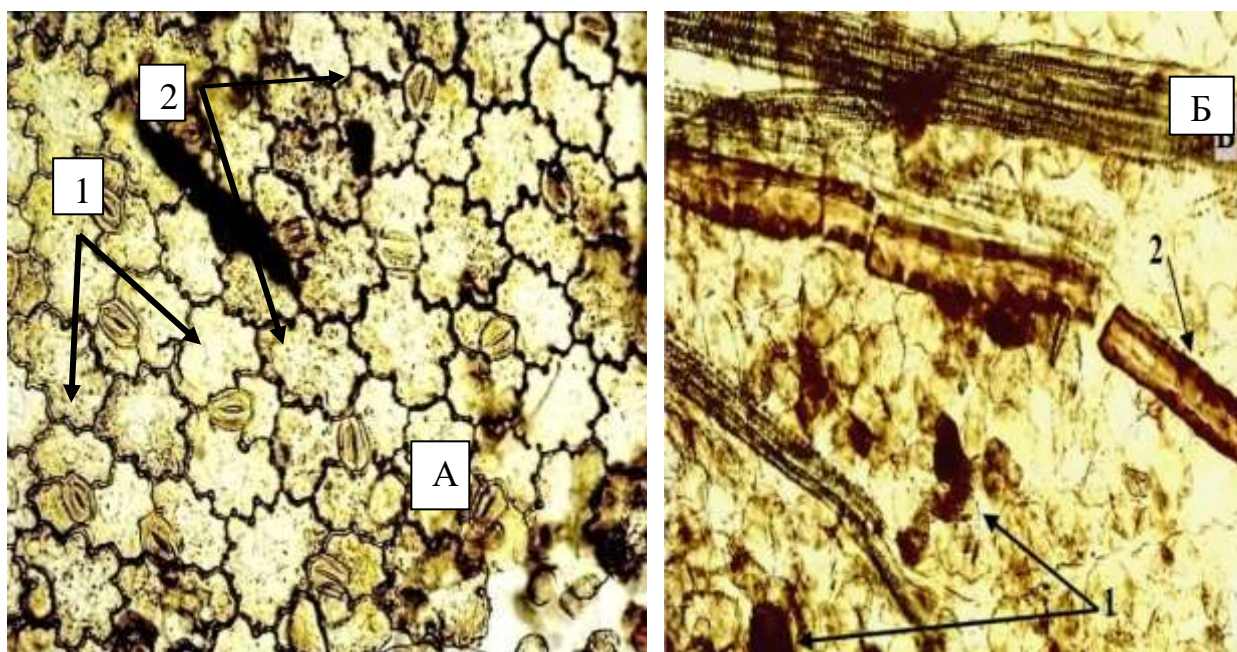


Рисунок 1 – Лядвенца рогатого трава. Фрагмент плоскостного препарата листа: А 1-анизоцитный тип устьичного аппарата; 2-аномоцитный тип устьичного аппарата; Б 1-клетки – идиобласты с флобафенами; 2-млечники.

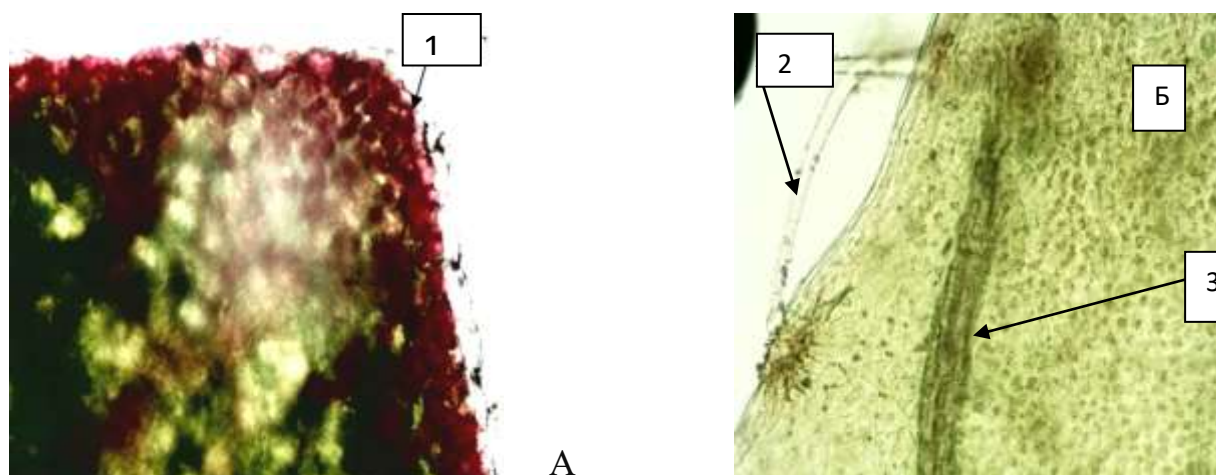


Рисунок 2 – Лядвенца рогатого трава. Фрагмент плоскостного препарата листа: А 1-антоцианы; Б 2-простой волосок; 3-многорядная кристаллоносная обкладка.

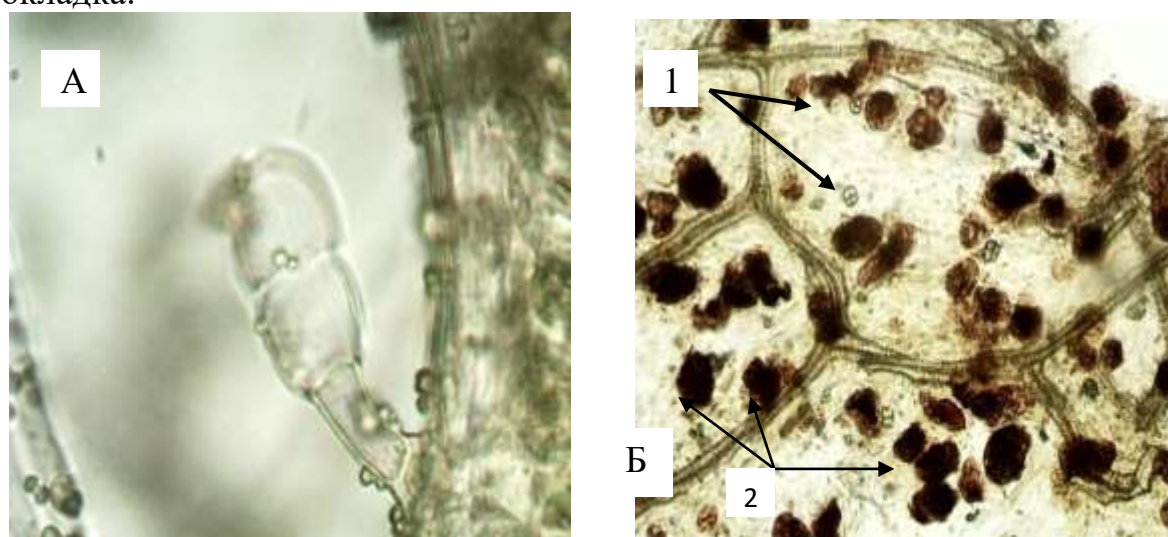


Рисунок 3 – Лядвенца рогатого трава. Фрагмент плоскостного препарата листа: А булавовидный железистый волосок; Б 1-железки, 2-клетки – идиобласты с флавофенами

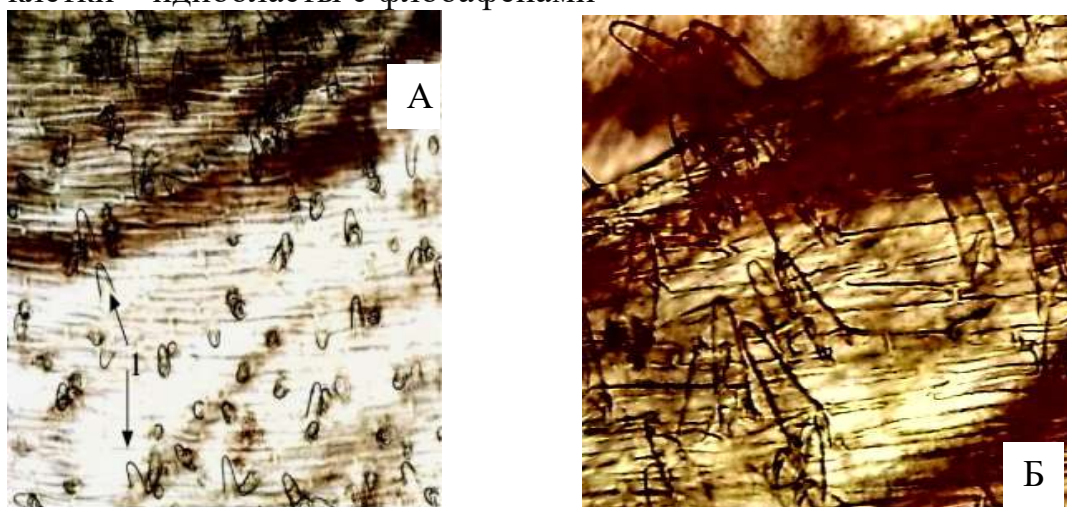


Рисунок 4 – Лядвенца рогатого трава. Фрагмент венчика цветка: А – эпидермис венчика; Б – эпидермис чашечки.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Аналитическую пробу сырья измельчают до частиц с размером 1-3 мм. Точную навеску измельченного сырья (около 1,0 г) помещают в плоскодонную коническую колбу объемом 30 мл, прибавляют 15 мл этилового спирта, и нагревают на водяной бане в течение 45 минут. По истечении времени полученное извлечение охлаждают, фильтруют. Охлажденное профильтрованное извлечение наносят на хроматографическую пластинку размером 10x20см в виде полосы длиной 15-20 мм. На расстоянии 2 см от пятна исследуемого раствора наносят в виде точки микропипеткой 1 мкл раствора известного вещества биоханина А. Пластину с нанесенными образцами подсушивают на воздухе и хроматографируют при комнатной температуре в камере для восходящей хроматографии в системе растворителей: хлороформ – этиловый спирт (93:7). После прохождения фронтом растворителя около 18 см, пластинку вытаскивают и подсушивают до удаления паров растворителя.

При просматривании на хроматограмме проявляется основная зона адсорбции с бледно-фиолетовой, фиолетовой и голубой флюоресценцией при 365/254нм, совпадающая с зоной адсорбции известных веществ генистеину, биоханину А и кофейной кислоте. На хроматограмме исследуемого экстракта могут быть видны и другие зоны адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* — не более 12%

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* — не более 12%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* — не более 10%.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси.

Сырье, изменившее окраску (почерневшее, потемневшее). *Цельное сырье* – не более 7 %.

Стебли. Цельное сырье – не более 45%.

Кусочки стеблей. Измельченное сырье – не более 45 %.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма изофлавоноидов в пересчете на биоханин А «не менее

0,5%»; сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту «не менее 0,5%».

Изофлавоноиды. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц 1-3 мм. Около 0,5 г помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл спирта 40%, и нагревают на водяной бане при температуре 80С с обратным холодильником в течение 30 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют дважды. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят до метки спиртом 40% (р-р А).

2 мл полученного р-ра А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом 40% до метки (р-р Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 260 ± 5 нм. В качестве раствора сравнения используют 40% спирт этиловый.

Содержание суммы изофлавоноидов в процентах (X) в пересчете на биоханин А и абсолютно-сухую массу сырья вычисляют по формуле;

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_2 \times 100}{m \times 695 \times (100 - W) \times V_3}, \text{ где:}$$

A – оптическая плотность р-ра Б;

m – масса сырья в гр;

V_1 – объем р-ра А (100), мл;

V_2 – объем р-ра Б (50), мл;

V_3 – объем аликвоты р-ра А (2), мл;

W – влажность сырья в %;

695 - удельный показатель поглощения ($E_{1\%}^{1\text{см}}$) биоханина А

Гидроксикоричные кислоты. Аналитическую пробу сырья измельчают до частиц с размером 1-3 мм. Точную навеску измельченного сырья, около 0,5 г помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта этилового. Колбу соединяют с обратным

холодильником и экстрагируют на водяной бане при 100°C в течение 30 мин, далее экстракт фильтруют через бумажный фильтр «черная полоса» в мерную колбу объемом 100 мл. Извлечение повторяют еще дважды в тех же условиях, используя 30 мл спирта этилового 70%, перенося при этом бумажный фильтр в колбу для экстракции. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят до метки буферным раствором (р-р А).

5 мл полученного раствора А переносят в делительную воронку и экстрагируют 10 мл этилацетата (трижды). Полученное этилацетатное извлечение фильтруют через безводный натрия сульфат в мерную колбу объемом 25 мл и доводят объем раствора в колбе до метки этиацетатом (р-р Б). Аликвоту р-ра Б (5 мл) переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят объем раствора до метки этилацетатом (р-р В).

Оптическую плотность полученного раствора В определяют на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 323±2нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения - этилацетат.

Сумму ГКК в процентах (X) в пересчете на кофейную кислоту и абсолютно-сухую массу сырья вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times V_4 \times 100}{m \times V_2 \times 735 \times (100 - W)}, \text{ где:}$$

A – оптическая плотность раствора В; m – масса сырья, г; V₁ – объем раствора А (100), мл; V₂ – объем аликвоты р-ра Б (5), мл; V₃ – объем раствора Б (25), мл; V₄ – объем раствора В (25), мл; W – влажность сырья, %; 735 - $\epsilon_{1\%}^{1\text{см}}$ удельный показатель поглощения кофейной кислоты при 325±5нм.

Примечание. Приготовление буферного раствора. 2,48г кислоты борной помещают в мерную колбу объемом 1000 мл, прибавляют 500 мл воды дистиллированной и растворяют при нагревании, охлаждают, прибавляют 2,6 мл концентрированной кислоты ортофосфорной и 2,3 мл ледяной уксусной кислоты, доводят водой дистиллированной до метки, перемешивают.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

АКТЫ ВНЕДРЕНИЙ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Общество с ограниченной ответственностью

«Фарм-Трейд»

филиал в г. Томске

г. Томск

« 11 » мая 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки (рекомендации, материалов):

- методики количественного определения в листьях подорожника хлорофилла, гидроксикоричных кислот, полисахаридов; суммы антоцианов плодах рябины обыкновенной;

- практические рекомендации по планированию и организации заготовок лекарственного растительного сырья на территории Томской области.

Авторы, адрес организации-исполнителя: старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна, профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм.наук Коломиец Наталья Эдуардовна; канд.фарм.наук Бондарчук Руслан Анатольевич; Шплис Ольга Николаевна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

Где, в каком виде внедрено: ООО «Фарм-Трейд», лаборатория контроля качества, отдел планирования. Начало внедрения – февраль 2018 года.

Заместитель директора
по качеству



А.Н. Рыбаков

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

ООО «СИБРЕСУРС»

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование предложения для внедрения (разработки):

- методики количественного определения хлорофилла, гидроксикоричных кислот, полисахаридов в листьях подорожника, суммы антоцианов плодах рябины обыкновенной;
- практические рекомендации по планированию и организации заготовок лекарственного растительного сырья на территории Томской области.

Авторы, адрес организации-исполнителя: профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д-р фарм.наук Коломиец Наталья Эдуардовна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Абрамец Наталья Юрьевна; канд.фарм.наук Бондарчук Руслан Анатольевич; Шплис Ольга Николаевна, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии. ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

Где, в каком виде внедрено: ООО «СибРесурс», физико-химическая лаборатория; питомник плодовых, декоративных лиственных, хвойных растений, оранжерея экзотических растений. Начало внедрения – май 2018 года.

« 18 » июня 2018 г.

Генеральный директор



В. В. Гольдман

Общество с ограниченной ответственностью

«Фарм-Трейд»

филиал в г. Томске

г. Томск

«09» сентября 2020 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки (рекомендации, материалов):

методика количественного определения изофлавоноидов в траве лядвенца рогатого культивируемого спектрофотометрическим методом в пересчете на биоханин А и гидроксикоричных кислот экстракционно-спектрофотометрическим методом в пересчете на кофейную кислоту.

Авторы, адрес организации-исполнителя: профессор кафедры фармацевтического анализа, доктор фармацевтических наук Коломиец Наталья Эдуардовна, старший преподаватель кафедры фармацевтического анализа Шплис Ольга Николаевна.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, 634050, г.Томск, Московский тракт, 2.

Где, в каком виде внедрено: ООО «Фарм-Трейд», лаборатория контроля качества. Начало внедрения – июнь 2020 года.

Заместитель директора
по качеству



А.Н. Рыбаков

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

УДК 631/635:633.83
ББК 41.8/41.9
К 22

Авторы:
профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
доктор фармацевтических наук Н.Э. Коломиец
старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
Н.Ю. Абрамец
кандидат фармацевтических наук Р.А. Бондарчук
старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии,
О.Н. Шплис

**Практические рекомендации по организации и планированию
K 22 заготовок дикорастущего растительного сырья на территории
Томского района Томской области. – ФГБОУ ВО СибГМУ, 2018. –
83 с.**

В практических рекомендациях отражена краткая систематическая, эколого-географическая характеристика, хозяйственное назначение основных видов лекарственных растений, произрастающих в Томском районе.

Даны рекомендации по организации, планированию сбора, переработке лекарственных растений в естественных условиях.

Приведены перспективные технологии выращивания лекарственного сырья в крестьянских (фермерских) и личных подсобных хозяйствах. Отражена экономика заготовки лекарственного сырья, приведена нормативная и правовая база обеспечения заготовительной деятельности.

Рекомендации предназначены для оказания практической помощи сельскому населению по организации альтернативной занятости в сфере заготовок и выращивания лекарственных растений, а также могут быть использованы специалистами государственных и муниципальных органов управления и информационно – консультационных и учебно – методических центров, преподавателями профильных образовательных учреждений.

УДК 631/635:633.83
ББК 41.8/41.9
© ФГБОУ ВО СибГМУ, 2018

Н.Э. Коломиец, Н.Ю. Абрамец, Р.А. Бондарчук, О.Н. Шплис

Федеральное государственное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО
ПЛАНИРОВАНИЮ И ОРГАНИЗАЦИИ ЗАГотовОК
ДИКОРАСТУЩЕГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА
ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОГО РАЙОНА
ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ**



Томск, 2018

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПАТЕНТЫ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2601588

**СПОСОБ СТИМУЛИРОВАНИЯ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН
БОБОВЫХ И ТВЕРДО-СЕМЕННЫХ РАСТЕНИЙ И
УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

Патентообладатель(и): *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015118265

Приоритет изобретения 15 мая 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 13 октября 2016 г.

Срок действия патента истекает 15 мая 2035 г.



*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Израиль

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2686990

**Способ возделывания многолетней кормовой культуры
лядвенца рогатого *Lotus corniculatus***

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU), Шлис Ольга Николаевна (RU), Проскурина Людмила Дмитриевна (RU), Зенков Станислав Валерьевич (RU), Дайбова Елена Борисовна (RU), Каракчиева Наталья Ивановна (RU), Коломиец Наталья Эдуардовна (RU), Абрамец Наталья Юрьевна (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018137365

Приоритет изобретения 23 октября 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 06 мая 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 23 октября 2038 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев

