

**НАО «Медицинский университет Астана»
Кафедра фармацевтических дисциплин**

МПК: А61К36/48, G01N30/90
УДК: 543.544.943.3:582.736(574.42)

Уразбаева Асель Саятовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КОПЕЕЧНИКА
ЗАБЫТОГО, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ВОСТОЧНО-
КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

7М10104 – «ФАРМАЦИЯ»

Магистерская диссертация на соискание академической
степени магистра медицинских наук

Научный руководитель: к.фарм.н., доцент Смагулова Ф. М.
Рецензенты: д.х.н., профессор Сейтембетова А.Ж.,
д.м.н., профессор Гуляев А.Е.

Астана 2024 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1	10
1.1 Копеечник забытый – макроскопические и микроскопические признаки.....	10
1.2 Систематическое положение, ареал, местообитание, запасы сырьевых ресурсов.....	17
1.3 Характеристика основных биологически активных веществ, содержащихся в копеечниках.....	22
1.4 Применение растения копеечника забытого в народной медицине.....	25
ГЛАВА 2	35
2.1 Характеристика объекта исследования.....	35
2.2 Методы исследования.....	35
ГЛАВА 3	36
3.1 Методы экстракции БАВ из растительного сырья.....	36
3.2 Общий фитохимический скрининг основных групп БАВ.....	39
3.3 Статистические методы анализа.....	51
ВЫВОДЫ	52
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	53

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Государственная фармакопея Республики Казахстан.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации использованы следующие термины с соответствующими определениями:

Государственная фармакопея (ГФ) – это основной нормативный документ, сборник стандартов и положений, определяющий показатели качества выпускаемых лекарственных субстанций и изготовленных из них препаратов.

Фармацевтическая субстанция – лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность.

Лекарственное растительное сырье – это цельные лекарственные растения или их части, не подвергнутые химической переработке и разрешенные для применения в медицине.

Экстракт – концентрированные извлечения из лекарственного растительного сырья.

Экстракция – это метод выделения, разделения и концентрирования, основанный на распределении растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами (обычно между водой и органическим растворителем).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БАВ – биологически активные вещества.

ФП – фитопрепарат.

ТСХ – тонкослойная хроматография.

ЛС – лекарственное сырье.

УФ – спектрофотометрия в ультрафиолетовом свете.

ВЭЖХ – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1. Распространение видов копеечника.

Таблица 2. Сравнительная ботаническая характеристика представителей рода копеечник флоры Казахстана и России.

Таблица 3. Основные группы действующих веществ копеечников.

Таблица 4. Результаты исследования мангиферина методом ТСХ в различных системах растворителей.

Таблица 5. Сравнительная характеристика Копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*), произрастающего на территории Казахстана и России.

Рисунок 1. Соцветия копеечника забытого.

Рисунок 2. Корни Копеечника забытого.

Рисунок 3. Микроскопические признаки надземных органов *Hedysarum neglectum* L.

Рисунок 4. Хроматограмма смеси флавоноидов.

Рисунок 5. Циркуляционный аппарат типа Сокслета.

Рисунок 6. Корни копеечника забытого.

Рисунок 7. Получение экстракта копеечника забытого.

Рисунок 8. Цианидиновая реакция.

Рисунок 9. Реакция с хлоридом алюминия.

Рисунок 10. Реакция с хлоридом железа (III).

Рисунок 11. Реакция с треххлористой сурьмой.

Рисунок 12. Борно-лимонная реакция.

Рисунок 13. Лактонная проба на кумарины.

Рисунок 14. Реакция азосочетания

Рисунок 15. Реакция Реакция Фонтан–Кендаля.

Рисунок 16. Реакция Либермана-Бурхарда.

Рисунок 17. Реакция с концентрированной серной кислотой.

Рисунок 18. Формула мангиферина.

Рисунок 19. Пластина с проявленными пятнами.

Рисунок 20. УФ-спектр.

Рисунок 21. Спектрофотометр марки Evolution 201 Thermo Scientific.

Рисунок 22. Роторный испаритель.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

В настоящее время в контексте развития здравоохранения в стране привлекают внимание вопросы применения лекарственных растительных средств, что подтверждают последние тенденции к расширению ассортимента отечественной растительной продукции. По этой причине актуальным становится вопрос поиска и изучения новых лекарственных растений.

Одним из наименее изученных растений в фитохимическом отношении является растение Копеечник забытый (*Hedysarum neglectum*) сем. Бобовые (Fabaceae), произрастающее в Восточно-Казахстанской области. При этом химический состав этого растения весьма богат и разнообразен. Он включает различные аминокислоты, углеводы, фенольные соединения (флавоноиды, изофлавоны, ксантоны, дубильные вещества и др.), эфирные масла и т.д.

В народной медицине, как известно, отвар подземной части копеечника забытого используется для лечения желудочно-кишечных расстройств, диареи, головных болей, анемии, нервных расстройств, гинекологических заболеваний, а также как мочегонное и тонизирующее средство.

Однако, несмотря на наличие в составе копеечника забытого ценных биологически активных соединений, отсутствуют нормативные документы, регламентирующие подлинность и качество сырья. В частности нет утвержденных методик качественного и количественного определения основных действующих веществ копеечника забытого.

В связи с этим необходимо осуществить исследование химического состава сырья, что позволит обосновать возможность его внедрения в медицинскую практику в качестве источника БАВ.

Цель исследования.

Определить химический состав подземной части копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*), произрастающего в Казахстане.

Задачи исследования.

1. Определить качественное содержание биологически активных веществ в копеечнике забытом (*Hedysarum neglectum*).
2. Определить количественное содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин.
3. Сравнить полученные данные с существующими аналогами исследований на территории Российской Федерации.

Объект и предмет исследования.

Лекарственное растительное сырье – Копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*) корни, сбор которых произведен в Катон-Карагайском заповеднике.

Методы исследования.

1. Качественные методы идентификации БАВ, выделенных из спиртового извлечения корней копеечника забытого.
2. Количественные методы определения основных классов БАВ (спектрофотометрия в УФ-свете).

Научная новизна исследования.

Впервые проведено исследование химического копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*), произрастающего в Казахстане.

Практическая значимость.

Результаты исследований будут рекомендованы для включения в проект нормативно-технической документации на лекарственное растительное сырье (ЛРС) – копеечника забытого корни (*Hedysari neglecti radices*). Внедренные учебно-методические рекомендации могут быть использованы в учебном процессе студентов на кафедре фармацевтических дисциплин по курсу «Фармакогнозия».

База проведенных исследований.

Кафедра фармацевтических дисциплин, НАО «Медицинский университет Астана», г. Астана.

Лаборатория токсикологии и фармакологии, ТОО «Национальный центр биотехнологии».

Положения, выносимые на защиту.

1. Определение качественного содержания биологически активных веществ в копеечнике забытом.
2. Определение количественного содержания суммы ксантонов в пересчете на мангиферин.
3. Сравнение полученных данных с существующими аналогами исследований в России.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на шестидесяти страницах текста компьютерного набора и включает введение, литературный обзор, характеристики материала и методов исследования, выводы и список литературы, состоящий из 117 источников, 47 из них – на иностранном языке. Диссертация проиллюстрирована 22 рисунками и 5 таблицами.

В первой главе рассматриваются данные литературных источников: положение в систематике, ареал, распространение растения, местообитание, ресурсы лекарственного растительного сырья копеечника забытого, разбор важнейших групп биологически активных веществ химического состава,

проведенные до этого исследования рода копеечник, использование в медицине.

В главе 2 подробно описываются объект и методы его исследования. Приводятся качественные реакции и методы качественного и количественного анализа основных классов действующих веществ копеечника забытого.

Глава 3 характеризует экспериментальную часть, содержит подробные методики качественного определения основных классов действующих веществ копеечника забытого, расчеты количественного содержания суммы ксантонов, а также сравнение полученных результатов с исследованиями в России.

В части выводов приводятся итоговые результаты проведенных исследований – качественного и количественного определения биологически активных веществ растения копеечник забытый.

Полученные в ходе исследовательской работы результаты обрабатывались статистическими методами. Эти результаты приведены далее в табличном виде, изображаются на соответствующих рисунках, а также выражены в расчётах и формулах, приведенных в содержании данной диссертации.

Апробация работы.

Апробация была проведена в НАО «Медицинский университет Астана», кафедры фармацевтических дисциплин.

По материалам диссертации опубликованы 3 работы, в том числе 1 доклад на международной конференции.

- X Международный медико-фармацевтический конгресс студентов и молодых ученых ВМСО 2023, г. Черниговцы. «Phytochemical study of the *Hedysarum neglectum*». Публикация тезиса.

- IV Международная научно-практическая конференция, "Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы", посвященной памяти профессора С.Н. Аминова, г. Ташкент. «Химический состав копеечника забытого». Публикация тезиса

- IV Международная научно-практическая конференция, "Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы", посвященной памяти профессора С.Н. Аминова, г. Ташкент. «Химический состав копеечника забытого». Публикация статьи, а также выступление с докладом.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Копеечник забытый – макроскопические и микроскопические признаки

Копеечник забытый (лат. *Hedysarum neglectum*; нар. медвежий корень, красный корень) – растение из семейства бобовых (Fabaceae). Род *Hedysarum* широко распространен. В России насчитывается 126 видов, из которых 13 встречаются в западной части Сибири и восемь – на Алтае: копеечник забытый, родственный, южно-сибирский, Гмелина, ферганский, минусинский, чайный и сибирский (альпийский). [1] В Казахстане произрастает в Восточно-Казахстанской области.

Также этот вид растения изредка можно встретить во флоре Европы, Северной Африки, Северной Америки, Азии и Дальнего Востока. Большинство видов обитает в Азии, главным центром распространения являются восточные Гималаи, а вторым – горы Центральной Азии. [2]

Происхождение латинского названия рода точно не известно, но подобные названия растений использовали Теофраст и Диоскорид (*Theophrasti...*, 1483; *Dioscoridis...*, 1554; *A general history...*, 1832). Латинское название растения рода *Hedysarum* получили благодаря своему приятному запаху – от греческих слов «*hedis aroma*» – приятно пахнущий. Цветки многих видов действительно обладают запахом. Русское наименование род получил за необычную форму частей плода, похожих на маленькие монеты. [3]

Копеечники – долголетние травы, реже невысокие кустарники или полукустарники. Вид – копеечник забытый – травянистое многолетнее растение, достигающее в высоту 30–60 см. Множество прямостоячих стеблей расположены близко друг к другу и образуют плотный куст. [4]

Стебли обычно сильно развиты и разветвлены, но иногда менее развиты, стебли образуются из укороченных побегов, отходящих от шейки корневища. У растения данного вида листья непарноперистые, которые состоят из 11–25 листочков, сидячих, почковидных, обратнойцевидной или эллиптической формы, иногда 1-3 или только с одним непарноперистым листом. Края листочков гладкие или зубчатые. Листочки обычно ярко зеленого цвета и могут быть покрыты множественными короткими волосками. [4,5,6] Доли обычно пунктированные, всегда без долей. Прицветники кожистые, обычно сросшиеся у видов, встречающихся в России и Казахстане. [7,8]

Корень — красного цвета, отсюда и возникло название. Корень копеечника забытого отдает выраженным красным цветом, поэтому его

называют в простонародье багряно-красным или кровавым. Чай, отвары, настои из копеечника получаются так же красного цвета. Корневая система мощная, одеревенелая, может достигать в длину до 5 и более метров. [7]

Цветки копеечника забытого густо собраны в пазушные соцветия – кисти – длиной до 10 см и имеют разнообразную окраску, включая белую, розовую, бледно-желтую, пурпурную и красную. Цветки, как правило, имеют форму горошины. После цветения при успешном опылении образуются длинные, наполненные семенами, похожие на стручки плоды. Сезон цветения длится с июня по июль. [8] Чашечка в виде колокола, с пятью не в точности одинаковыми зубцами, которые по обыкновению длиннее, чем трубка. Венчик по размерам больше чашечки, флаг обратно-яйцевидный, в основании суженный; крылышки продолговатые, в два – четыре раза короче лодочки, реже – длиннее ее. Лодочка меньше или длиннее флага, тупая в верхушке. Андроцей цветка состоит из девяти сросшихся тычинок и одной свободной. Завязь сидячая или на короткой ножке с четырьмя - пятью (реже до восьми) семязачатками. Боб в средней степени сплюснутый с боков, распадающийся на членики по числу семяпочек, между члеником иногда перетянутый. Иногда одна из этих семяпочек не развита, в результате чего во внутренней части боба появляется от одного до трех сегментов; сегменты будут уплощенными или имеют легкую форму, гладкие, голые, опушенные, имеют сетчатый или трансребристый рисунок, большей частью покрыты короткими или длинными щетинками. [9,11]

Таблица 1. Распространение видов копеечника.

Виды	Ареал	Местообитание
1. <i>H. grandiflorum</i> Pall. – Копеечник крупноцветковый	В России встречается на Среднем и Нижнем Дону, на Приволжской возвышенности, в Заволжье, в Ергенях, на Южном Урале, в Республиках Башкортостан, Татарстан, Калмыкия. За пределами России встречается в Болгарии, Румынии и на Украине.	Растет на глинисто-известняковых склонах, на обнажениях мела и мергеля, реже на известняках в тимьянниковых степях. Встречается в каменистых ковыльных и типчаковых степях.

--	--	--

Продолжение таблицы 1.

<p>2. Н. neglectum Ledeb. – Копеечник забытый</p>	<p>Средняя Азия, Западная и Восточная Сибирь, Северная Монголия, Северо-западный Китай.</p>	<p>Предпочитает альпийские и субальпийские луга, травянистые и каменистые склоны и галечники рек. [19,20]</p>
<p>3. Н. alpinum L. – Копеечник альпийский</p>	<p>Евро-азиатский вид. В России встречается на севере и северо-востоке европейской части, на Кавказе, в Приуралье, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке. [13]</p>	<p>Рос на сухих кочкарных участках в разных частях болота и в кустарниковых зарослях на полуосушенных местах. [13]</p>
<p>4. Н. Caucasicum M.Vieb – Копеечник кавказский</p>	<p>Предкавказье, Западное и Восточное Закавказье. [17]</p>	<p>Высокогорные луга на высоте 2000-3000 м н.ур.м. [17]</p>

--	--	--

Продолжение таблицы 1.

<p>5. <i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss. – Копеечник дагестанский</p>	<p>Встречается только в России, в Республике Дагестан. [14]</p>	<p>Растет на сухих известняковых склонах, на каменистых местах в среднем горном поясе на высоте 800-1500 м н. ур. м. [14]</p>
<p>6. <i>H. austrosibiricum</i> – Копеечник южносибирский</p>	<p>Районы Сибири: Алтайский край. Республика Алтай. Красноярский край. Хакасия. Тыва. Иркутская обл.</p>	<p>Произрастает на высотах 700-2850 м над ур. моря. [22]</p>
<p>7. <i>H. razoumowianum</i> – Копеечник Разумовского</p>	<p>В России на Южном Урале и Заволжье; Республика Башкортостан; на востоке Республики Татарстан; Западный Казахстан. [15]</p>	<p>Степные зоны с холмисто-увалистым рельефом, слаборазвитые маломощных щебенчатые чернозёмы на известняках, мелах, мергелях, обнажениях карбонатных пород в местах выхода родников. Встречается в плакорных каменистых и ковыльно-разнотравных степях. [16]</p>
<p>8. <i>Hedysarum acutifolium</i> – Копеечник</p>	<p>Центральная Азия – Казахстан, Кыргызстан.</p>	<p>Растет в основном в умеренном биоме. [20,21]</p>

остролистны й		
------------------	--	--



Рисунок 1. Соцветия копеечника забытого.



Рисунок 2. Корни Копеечника забытого.

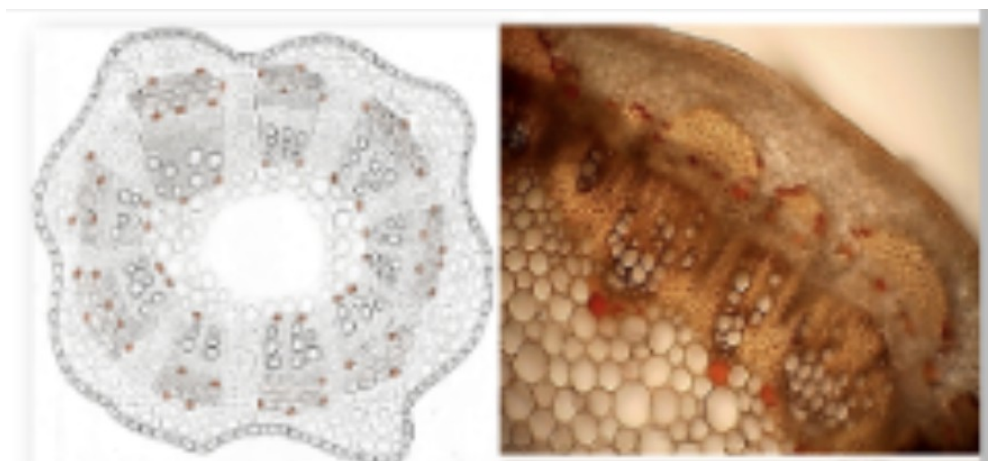
Микроскопические признаки надземных органов *Hedysarum neglectum* L.

Анатомическое строение стебля включает: многогранную форму стебля на поперечном сечении, опушение простыми двуклеточными волосками, которые имеют зауженное основание и расширенную структуру, характерной особенностью волосков является бородавчатость кутикулы.

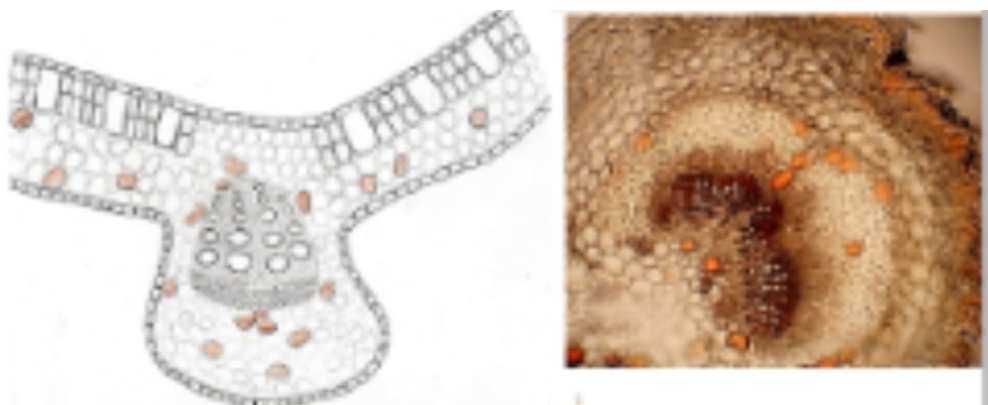
Все проводящие пучки имеют выраженное коллатеральное строение, при этом один крупный, дорзальный проводящий пучок, расположен на адаксиальной стороне, он имеет характерную округлую или полулунную форму и армирован склеренхимными волокнами со стороны флоэмы. Два вентральных проводящих пучка более мелкие и располагаются обычно в зоне ребер, также армированы склеренхимой со стороны флоэмы. Количество и расположение дополнительных мелких проводящих пучков в зависимости от той зоны черешка или рахиса, в которой выполнен срез может изменяться. Так, для зоны рахиса характерно обычно 2-4 дополнительных проводящих пучка, либо они полностью отсутствуют(рис. 3). [26-33]

Тип строения листа – дорзовентральный. Палисадный мезофилл под верхней эпидермой в 2 слоя. Имеются отдельные вместилища с содержимым оранжевого цвета. Проводящая система пучкового типа, 6 проводящих пучков, 1 расположен на дорзальной стороне, а 5 – на вентральной. проводящие

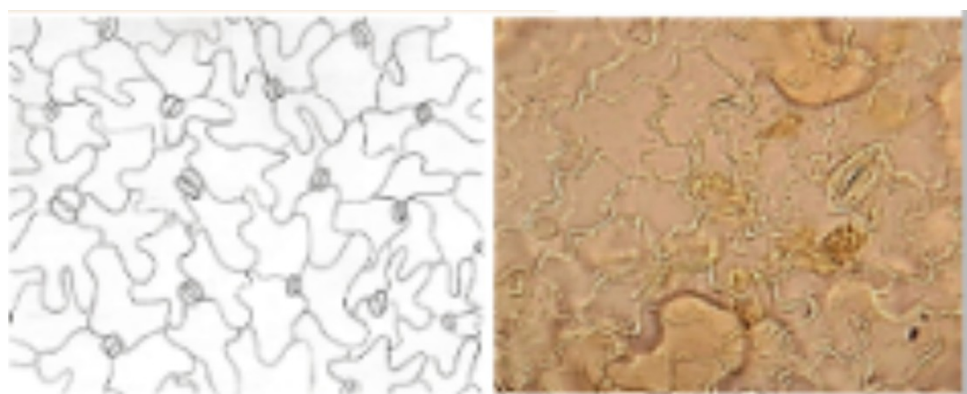
пучки открытые коллатеральные, в количестве 13-15. Форма стебля на поперечном сечении многогранная или ребристая.



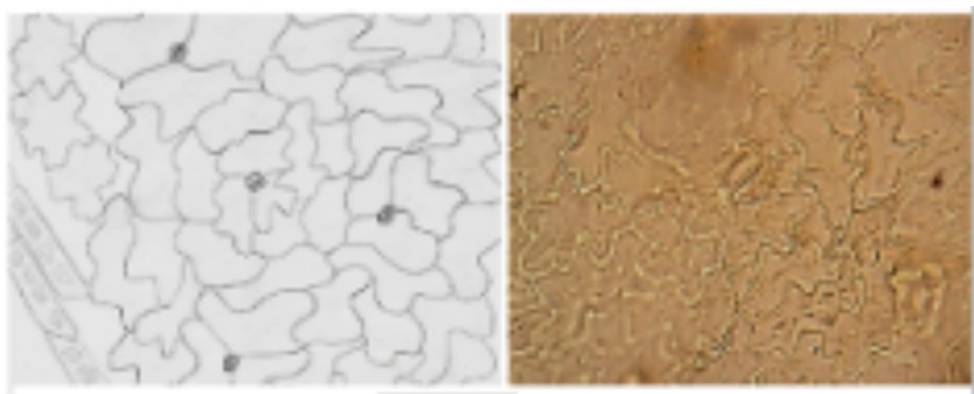
А) Поперечный срез стебля в нижней части;



Б) Поперечный срез листовой пластинки;



В) Верхняя эпидерма листовой пластинки;



Г) Нижняя эпидерма листовой пластинки;

Рисунок 3. Микроскопические признаки надземных органов *Hedysarum neglectum* L.

1.2 Систематическое положение, ареал, местообитание, запасы сырьевых ресурсов.

На территории Казахстана наиболее благоприятные условия для произрастания копеечника забытого отмечаются на травянистых склонах Алтая и Табагатая, а также на Джунгарском, Заилийском, Киргизском, Кунгей и Терской Алатау, хр. Кетмень.

Данный вид встречается на горных склонах, включая луга, степи, леса, тундру, долины рек и альпийские склоны. Он чувствителен к влажности и затенению. Распространен на кустарниковых лугах на хорошо дренированных возвышенностях центральной части поймы. Хорошо растет на открытых, доступных для солнца участках и песчаных суглинистых почвах.

Также подходит для выращивания в каменистых садах. Элегантный кустарник с плавнониспадающими лепестками, этот вид можно высаживать в небольших садах.

При культивировании рекомендуется регулярная обрезка старых ветвей для стимулирования цветения.

Несмотря на не очень высокую всхожесть, растить их из семян не представляет труда, так как они часто повреждаются насекомыми. Семена следует высевать непосредственно на постоянное место, в силу их чувствительности к пересадке. Сеянцы зацветают на второй или третий год с момента высевания.

В культурных условиях в разных регионах копеечник забытый ведет себя по-разному, адаптируясь тем самым к новым фитоценотическим условиям.

Систематическое положение *Hedysarum neglectum* Ledeb (по А. Л. Тахтаджяну) [29]

Надцарство: Eucaryota – Ядерные организмы (эукариоты).

Царство: Plantae – Растения.

Подцарство: Embryobionta (Embryophyta, Cormophyta, Cormobionta, Telomophyta, Telomobionta) - Высшие растения (зародышевые, побеговые, листо-стебельные, теломные).

Надотдел: Spermatophyta – Семенные растения.

Отдел: Magnoliophyta (Angiospermae) - Покрытосеменные, или цветковые растения.

Класс: Magnoliopsida (Dicotyledones) - МагнолиоПСиды, или двудольные.

Подкласс: Rosidae – Розиды.

Надпорядок: Rosanae – Розаны.

Порядок: Fabales – Бобовые.

Семейство: Fabaceae – Бобовые (Мотыльковые).

Род: Hedysarum – Копеечник.

Вид: Hedysarum neglectum Ledeb, - Копеечник забытый.

Полезнее собирать сырье копеечника на стадиях бутонизации и цветения растения, когда присутствует наибольшее количество мангиферина и достигается наибольший объем сырья. Во время сбора урожая стебли растения, а также листья удаляются ножницами или лезвиями.

Чтобы сохранить природные ресурсы этого растения, рекомендуется собирать его только на одних и тех же участках раз в два года.

Сравнение ботанических характеристик видов рода Копеечник приведено в таблице 2.

Таблица 2. Сравнительная ботаническая характеристика представителей рода копеечник флоры Казахстана и России.

Виды копеечника	Стебли	Листья	Соцветие	Цветки
Н. neglectum Ledeb.	Сильно развиты и разветвлены. Образуются из укороченных побегов, отходящих от шейки корневища.	Непарноперистые, обычно 5 – 9 и более, иногда 1-3 или только с одним непарноперистым листом. Края листочков гладкие или зубчатые. Листочки обычно ярко зеленого цвета и могут быть покрыты множественными короткими волосками.	Кисти длиной до 10 см и имеют разнообразную окраску, включая белую, розовую, бледно-желтую, пурпурную и красную.	Цветки, как правило, имеют форму горошины. Чашечка в виде колокола, с пятью не в точности одинаковыми зубцами, которые по обыкновению длиннее, чем трубка.

Продолжение таблицы 2.

<p><i>H. grandiflorum</i> Pall.</p>	<p>Стебель неразвитый, листья густо-серебристо-волосистые. Цветет в конце мая-июне.</p>	<p>Листья у копеечника корневые, в розетке, с длинными черешками, по обеим сторонам которых попарно расположены копеечного вида листочки, как у рябины, непарно-перистосложные, с прилистниками.</p>	<p>Кисти многоцветковые, с отклоненными цветками.</p>	<p>Венчик желтовато-белый. Цветки крупные, расположены в пазухах у ланцетовидных прицветников, равных половине длины крыльев [23]</p>
<p><i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.—</p>	<p>Неразвитые.</p>	<p>Непарноперистые; прилистники сросшиеся; листочки 2—4-парные, продолговатые, на верхушке суженные, заостренные, 15—18 мм длиной, 5—8 мм шириной.</p>	<p>Густые, немногочетковые кисти</p>	<p>Чашечка трубчатая, зубцы ланцетно-шиловидные; венчик мотылькового типа, фиолетовый, пурпурово-фиолетовый, желтый, или кремово-белый, 13—16 мм длиной. [24]</p>
<p><i>H. alpinum</i> L.</p>	<p>Стебли одиночные, реже в числе нескольких, голые, прямостояч</p>	<p>Сложные непарноперистые, с 6—11 парами удлинённо-эллиптических листочков</p>	<p>Густые кисти, удлиняющиеся при плодах.</p>	<p>Многочисленные лилово-розовые цветки. [12, 25]</p>

	ие.			
--	-----	--	--	--

Продолжение таблицы 2.

Н. austrosibiricum	Стебли (10)15-40(60) см в высоту, прямостоячие или восходящие, слабые, или густо опушенные или же почти голые.	Листочки в числе 4-9 пар, продолговато-эллиптически, эллиптически-ланцетные, кверху голые, снизу слабоволосистые.	Густая кисть 3-7 см длиной.	Цветки лиловые, фиолетово-лиловые. [22]
Н. caucasicum M. Bieb	Голые, прямостоячие.	Непарноперистые с 7-9 парами листочков.	Кисти расположены на длинных стеблях, диаметром примерно в 1-2 раза больше листьев, они не очень собраны в группы.	Нижний зубец чашечки наравне с трубкой. Венчик лилового цвета или темно-пурпуровый, иногда белый.
Н. gazoumowianum	Прямостоячие, прижатоволосистые.	Перистые с 4-7 парами листочков. Листочки линейно-продолговатые или линейные, по краям загнутые, сверху голые, снизу прижато-	Кисти кверху редкие, удлиненные, с 10-20 веточками.	Венчик слабо-розовый или слегка фиолетовый, флаг обратнойцевидный, на верхушке с выемками.

		волосистые.		
--	--	-------------	--	--

Таким образом, вид – копеечник забытый – отличается от своих сородичей тем, что его стебли сильнее развиты и разветвлены, листья обильно покрыты волосками. Также его цветки белого, розового, бледно-желтого, пурпурного или красного цвета, напоминающие горошек. Чашелистики образуют чашечку в форме колокола, с пятью почти одинаковыми зубцами, которые по обыкновению длиннее, чем трубка. [23-25]

1.3 Характеристика основных биологически активных веществ, содержащихся в копеечниках.

Литературные данные о биологически активных веществах в растениях рода копеечник представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные группы действующих веществ копеечников.

Виды	Группа соединений	Остальные БАВ	Проведенные исследования (источники)
<i>H. neglectum</i> Ledeb.	Мангиферин Кумарины Флавоноиды Ксантоны Дубильные вещества	Тритерпеновые сапонины Моносахара Дисахара Оксикоричные кислоты Оксибензойные кислоты	21
<i>H. grandiflorum</i> Pall.	Мангиферин Ксантоны Кумарины Катехины Дубильные вещества	Полисахариды Аскорбиновая кислота Стероидные сапонины	35,36
<i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.–	-	-	33,34,37
<i>H. alpinum</i> L.	Мангиферин Ксантоны Флавонолы	Полисахариды Аскорбиновая кислота	40,41

	Кумарины	Алкалоиды (следы)	
--	----------	----------------------	--

Продолжение таблицы 3.

Н. caucasicum M.Vieb	Мангиферин Ксантоны Дубильные вещества Катехины	-	37,38,39
Н. austrosibiricum	Ксантоны Флавонолы Катехины	-	41

Анализ таблицы 3 указывает на наличие флавонолов, ксантонов и дубильных веществ у разных видов рода Копечник.

Фундаментальные исследования химического состава этих растений, проводившиеся как в СССР, так и за рубежом во второй половине XX века, позволили существенно продвинуться в понимании биологической активности веществ, присутствующих в химическом составе.

В 2002 году эксперименты показали наличие флавоноидов, антрахинонов и катехинов в экстрактах копеечника забытого. [69, 71]

В 2011 году ученые проанализировав состав различных фракций экстракта красного корня и обнаружили присутствие антоцианов, фенольных кислот и тетрагидрополикарбоферуловой кислоты. [70]

Исследования показали, что растения рода Копечник содержат полифенольные соединения: флавоноиды (такие как гиперозид, полистахозид), ксантоны и изоксантоны (такие как мангиферин, изомангиферин, генцин) и кумарины. Дополнительно идентифицированы сапонины, моносахариды (галактоза, глюкоза, арабиноза), дубильные вещества, алкалоиды (следы), полисахариды, пектиновые вещества и аскорбиновая кислота. Базовая культура растения содержит флаваноны, крахмал, сапонины, кумарины и мангиферин. [42]

Впервые именно из копеечника альпийского был выделен мангиферин, на основе которого был создан противовирусный препарат «Алпизарин» и применяется в первую очередь для лечения различных форм герпеса у взрослого населения, лишая, папилломах, стоматитах и ОРВИ. [43] Некоторые сорта копеечника и сегодня используются в производстве БАД: «Капли

Красный корень» (Россия, Бийск, «Эвалар»), таблетки «Копечник-М» (Россия, Барнаул, Алтай-Фарм и др.). Также эти растения встречаются в различных фитосборах и др. К сожалению, эти продукты выпускаются производителями только в качестве биологически активных добавок, а химический состав и фармакологическая активность при разработке, как правило, не изучаются. Производители опираются на уже имеющиеся литературные данные.

Копеечник забытый первый раз был описан Каспаром Баухиным в 1620 году под названием *H. obscurum* и отнесен к роду *Onobryschis* [53, 54]. Позже в 1753 г. Карлом Линнеем данный вид растения был по ошибке отнесен к роду *Astragalus* [53, 55], но в 1759 г. автор исправляет свою ошибку и переносит *H. obscurum* в род *Hedysarum*. В литературных источниках в период с 1824 г. по 1901 г. копеечник забытый также упоминается как *H. lasiocarpum* Ledeb., *H. genuinum*, *H. typicum* и *H. neglectum* Ledeb. [53]. В народной медицине копеечник забытый известен под названиями «белошный корень», так как корень растения имеет излом белого цвета; «медвежий корень» - такое своеобразное название дали копеечнику жители Горного Алтая. Согласно некоторым местным легендам, именно медведь открыл людям секрет своей силы, заключенной в данном растении [56].

Ксантон мангиферин обладает противотуберкулезным, цитотоксичным [44], гепатопротекторным [45], противомикробным [46], иммуностимулирующим [47], стимулирующим центральную нервную систему, диуретическим [48], желчегонным [49], сахароснижающим [50, 51] действием, что показали немалочисленные исследования.

Все эти свойства мангиферина основаны на его способности антиоксиданта стабилизировать лизосомальные мембраны, оказывать противовоспалительное действие, противоопухолевую и иммуностимулирующую активность.

Из подземной части чайного и забытого копеечников достигнуты биологически активные вещества с сильным действием на слизистую оболочку, обезболивающими и седативными свойствами. [58]. Одни из видов копеечника обладают сенолитической активностью, также укрепляют защитные механизмы иммунитета благодаря полисахаридам, экстрагированным из корней [59, 60, 61, 62].

Поскольку эти растения широко используются в народной медицине и здравоохранении, исследования в этой области чрезвычайно важны и своевременны. [52]

Обилие ценных биологически активных веществ в химическом составе и повсеместное применение в народной медицине, а также большие запасы растительного сырья дают право рекомендовать копеечники в качестве важных для медико-биологических исследований растения. [57]

1.4 Применение растения копеечника забытого в народной медицине

Растения рода Копеечник издавна ценятся и широко применяются в народной медицине как желудочно-кишечное, кроветворное, болеутоляющее, противоопухолевое, противовоспалительное и мочегонное, а также при воспалении предстательной железы. [63]

Применение препаратов растительного происхождения для лечения болезней предстательной железы истоками уходит далеко в прошлое. Информация о воздействии их на организм и отсутствии побочных эффектов в фитотерапии носят экспериментальный характер. Сегодня возможное использование фитопрепаратов должно основываться на современных понятиях об этиологии и течении патологических процессов, особенно в предстательной железе. Такие процессы, как функциональная обструкция, развитие турбулентности в простатической части уретры, патологическое воздействие местных микроорганизмов и иммунные изменения пагубно влияют на обмен веществ здорового человека. За одними нарушениями неизбежно последуют другие. Например, хроническое воспаление приводит к повреждению клеток и травмам. В нормальном организме постоянно образуются продукты неполного окисления, называемые свободными радикалами, но их количество увеличивается при различных патологических состояниях, особенно при воспалении. Состояние, когда ткани испытывают кислородное голодание, а скорость накопления активных радикальных соединений (кислородных, азотных и хлорных радикалов) во много раз выше скорости их нейтрализации, называется окислительным стрессом. В результате окислительный стресс впоследствии вызывает повреждение тканей, в том числе предстательной железы.

Специалистами биохимии давным-давно открыты натуральные антиоксиданты, такие как витамин Е, витамин С, некоторые каротиноиды, но окислительному стрессу они серьезным образом не препятствуют [64]. Согласно нынешней тенденции все больше внимания уделяют биофлавоноидам, не отличающиеся по своей антиоксидантной активности от витамина Е, витамина С и каротиноидов. В общем известно около 5000 биофлавоноидов, из которых две трети флавонов и более 700 изофлавонов. Около 2 процентов общего содержания органического углерода, образующегося в процессе фотосинтеза, синтезируется растениями в флавоноиды и другие полифенолы. Флавоноиды защищают растения от радиации, ультрафиолетового излучения, окислительных процессов, инфекций, вирусов и бактерий. Представителем лекарственных растений, произрастающих в странах СНГ и содержащих биофлавоноиды, является копеечник забытый (*Hedysarum neglectum*). Экстракт корня копеечника содержит флавоноид кверцетин, сапонины и другие активные вещества. Только производные кверцетина обладают антиоксидантной активностью и оказались

эффективными у пациентов с хроническим простатитом, что подтверждено результатами клинических исследований [65, 66]. Помимо этих свойств, катехины в корнях копеечника забытого обладают высокой Р-витаминной активностью, укрепляют сосудистую стенку и улучшают микроциркуляцию. Адаптогенные свойства корня копеечника забытого, помимо прочего, определили также ценность включения этой травы в комбинированную терапию пациентов с хроническим простатитом.

Некоторым представителям этого рода травянистых свойственны противовирусная и противомикробная активности [66]. По данным неоднократных исследований М. Kubo и других соавторов, птерокарпан, выделенный из бензольной фракции корневой культуры *H. polybotrys* проявил свои антибактериальные свойства. Пороговая концентрация ингибирования у *Mycobacterium tuberculosis* составляет 10 мкг/мл. Исследования показали, что экстракт копеечника забытого может помочь бороться с различными видами бактерий, включая *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Это свойство делает его полезным в лечении инфекций мочевых путей, инфекций кожи и других инфекционных заболеваний. [68]

В то же время у данных растений их тонизирующее действие обуславливается высоким процентом содержания в корнях соединений фенольной природы. Исследователями также обнаружено содержание катехинов и лейкоцианов – фенольных остатков, которые, как известно, обладают Р-витаминной активностью. [65]

Несмотря на высокое содержание в подземной части Копеечника дубильных веществ, флавоноидов и гликозидов [1], которые определяют присущий специфический вкус его водно-спиртовым настоям, Копеечники широко не применяют в изготовлении алкогольных и безалкогольных тонизирующих напитков, как, например, пантогематоген или экстракты других видов лекарственных растений — мяты перечной, родиолы розовой, женьшеня, левзеи сафлоровидной и др. [67]

Хотя копеечник забытый имеет потенциал в медицине, следует отметить, большинство исследований было проведено на клеточном и животном уровне, и требуются дальнейшие исследования для подтверждения его эффективности и безопасности при использовании у людей.

1.5 Качественные и количественные методы, проводимые на растении – копеечник забытый.

Учеными Кемеровской государственной медицинской академии в 2010 году совокупностью разделительных методов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и газожидкостной хроматографии с детектированием на масс-спектрометре (ГЖХ-МС), было установлено наличие многих биологически активных классов соединений, содержащихся в фитопрепаратах, которые были изготовлены на основе растительного сырья многих видов копеечников (копеечник забытый,

копеечник чайный, копеечник альпийский). Ими так же были установлены видовые отличия в химическом составе трех представителей. [72]

Позднее исследователи Кемеровского Государственного университета в своей работе для определения оптимальных условий экстракции (тип экстрагирующего вещества, его концентрация) выбрали подборку различных экстрагентов. Эффективность экстракции была определена по двум главным параметрам: экстрактивность и выход биологически активных веществ. Максимальная экстрактивность отмечалась при концентрации этанола 50%. Для установления оптимальной концентрации раствора вода-этанол провели определение готовых экстрактов на содержание флавоноидов, таннинов и аскорбиновой кислоты. Максимальный выход биологически активных веществ отмечался при экстракции 50%-ной водно-этанольной смесью. Экстракция проводилась при комнатной температуре с помощью обратного холодильника на протяжении двух часов. По завершении экстракции раствор отфильтровали и подвергли анализу химического состава. [75,76]

Качественный и количественный состав биологически активных соединений, которые содержит в себе подземная часть копеечника забытого, был обследован с помощью общепринятых и соответствующих данному растению специфичных химических методов. [73,74]

Объемные методы количественного определения флавоноидов

Объёмный анализ - это совокупность методов химического количественного анализа, основанного на измерении объёмов для установления концентрации (содержания) определяемого вещества. К объёмным методам анализа относят распространённые в лабораторной практике различные варианты титриметрического анализа, основанного на измерении объёма израсходованного раствора реагента известной концентрации, необходимого для достижения точки эквивалентности.

Комплексометрия - метод титриметрического анализа, который основан на образовании прочных комплексных соединений ионов металлов (всех, кроме одновалентных) с комплексоном III (двунатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты), при этом изменяются концентрации ионов металлов в титруемом растворе.

Метод комплексометрического титрования избытка ацетата свинца, не вступившего в реакцию осаждения с флавонолами, обладает достаточной избирательностью по отношению к флавоноидам и позволяет проводить определение флавонолов в присутствии ацетилсалициловой кислоты, антрахинонов, кумаринов.

К титриметрическому методу анализа также относится метод окисления флавоноидов ферроцианидом калия по п-фенил-аптрониловой кислоте. Однако метод длителен и не обладает избирательностью [77].

Оптические методы определения флавоноидов

Спектрофотометрический и фотоколориметрический анализы являются разновидностями молекулярно-абсорбционного спектрального анализа. Сущность молекулярно-абсорбционного спектрального анализа заключается в качественном и количественном определении веществ по их спектрам поглощения. Физической основой спектрального анализа является взаимодействие электромагнитного излучения с веществом.

Основной закон спектрофотометрии - закон Бугера-Ламберта-Бера.

Количественное определение исследуемых флавоноидных соединений в УФ- и видимой области спектров основано на измерении оптической плотности при длине волны в максимумах поглощения как растворов анализируемых веществ, так и растворов их окрашенных комплексов.

Спектрофотометрическое определение по максимумам собственного поглощения в разновидности прямой спектрофотометрии или дифференциальной спектрофотометрии является одним из наиболее распространенных методов анализа флавоноидов. При этом рабочими диапазонами длин волн служат как длинноволновые максимумы для флавоноидов - 330-370 нм, так и коротковолновые. Коротковолновые максимумы, хотя и более интенсивны, но в ряде случаев менее пригодны для аналитических целей из-за малой «площади» вершины пика, что приводит к большим ошибкам определения. Относительная ошибка прямого спектрофотометрического определения составляет $\pm 2-5\%$ и может быть снижена при дифференциальной методике анализа до 0.5-1.0 %. Рабочий интервал концентраций спиртовых, спиртоводных растворов составляет от 5 до 20 мкг вещества в 1 мл раствора. Обладая высокой чувствительностью, метод не селективен, так как не контролирует содержание каждого из веществ одного класса соединений и не позволяет судить о их количестве.

Спектрофотометрические или фотометрические определения по реакции диазотирования ранее были широко распространены в анализе. Реакция чувствительна, но не избирательна, так как наряду с флавоноидами эту реакцию дают фенольные соединения, пиразолоны и другие классы соединений. Применение данного метода ограничено неспецифичностью его и внутри каждого из классов соединений из-за прохождения реакции у флавоноидов только по кольцу А при наличии свободного ортоположения по отношению к фенольному гидроксилу у 7-го углеродного атома. Поэтому даже суммарные определения с данным реактивом не показывают истинного содержания исследуемых веществ как в суммарных фитохимических препаратах, так и в растительном сырье.

Большой специфичностью обладают, хотя и не лишены недостатков, методики определения флавонолов по цветным комплексным соединениям с хлоридом алюминия, хлорокисью циркония (хлористым цирконилом), азотнокислым галлием. Окрашенные растворы имеют максимумы в интервалах: 385-460 нм с хлористым алюминием, 385-500 нм с хлористым цирконилом, 400-455 нм с азотнокислым галлием. Наибольшей чувствительностью обладает методика с применением азотнокислого галлия, позволяющая количественно

определять 0.5 мкг в 1 мл раствора, затем с хлорокисью циркония - 0.9-1.0 мкг и с хлористым алюминием - 1-2 мкг.

Описаны методики анализа флавоноидов с нитритом кобальта в среде уксусной кислоты при длине волны 575 нм, а также с цинком и мышьяком. Получить истинное суммарное содержание флавоноидов по образованию цветных комплексов с металлами возможно лишь при наличии у соединений одинакового количества комплексообразующих центров. Отсутствие таковых у целого ряда соединений приводит к отрицательной реакции с данными реактивами.

Несмотря на указанные недостатки, метод нашел широкое применение при установлении суммарного содержания флавоноидов в сырье и суммарных фитохимических препаратах. В качестве стандарта используют кверцетин, кемпферол или их гликозиды.

Широко распространена при определении общего количества флавоноидных соединений в растениях методика фотометрического определения по реакции комплексообразования с борной кислотой при длине волны 470 нм. Методика обладает теми же недостатками, что и методика комплексообразования с солями металлов, и дает завышенные результаты, но простота проведения и доступность реактива дают возможность использовать их для ориентировочных определений. В качестве образцов используют как агликоны, так и гликозиды флавонов, флавонолов, халконов. Рабочая концентрация растворов 1-10 мкг/мл. Относительная ошибка определения $\pm 3.35\%$.

Одним из методов определения флавоноидных соединений по оптической плотности является также анализ продуктов взаимодействия с 4-аминоантипириновым реактивом. Однако, данный анализ требует соблюдения ряда условий, как и при реакции диазотирования, и не является избирательным.

В ряду спектрофотометрических методов анализа флаванонов наиболее чувствителен боргидридный метод (до 0.5-1 мкг/мл при длинах воли 535-560 нм). Несмотря на значительную селективность, он не имеет широкого применения из-за малого времени устойчивости окрашенного комплекса и плохой воспроизводимости результатов.

Комплексообразующие свойства флавоноидов положены в основу флуорометрического метода, являющегося на порядок более чувствительным, чем спектрофотометрический. Количественно оценить флавоноиды этим методом возможно при наличии 0.05-1 мкг вещества в 1 мл раствора. Высокая чувствительность флуорометрического метода раскрывает широкие возможности его применения для предварительной идентификации биологически активных веществ в тканях растений. Однако получить объективные результаты при анализе сырья и фитохимических препаратов можно только после разделения веществ с помощью различных видов хроматографии. [78]

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является быстрым, хорошо воспроизводимым методом, который требует малого количества анализируемого вещества и используется для количественного, качественного анализа и препаративного выделения [77].

Для флавоноидов более употребительны колонки с обращенно-фазными сорбентами (RP-8; RP-18) и детектирование с помощью УФ-видимого детектора с переменной длиной волны. В настоящее время широко используется фотодиодный детектор, позволяющий одновременно с выделением пика на хроматограмме получать УФ-видимый спектр вещества, соответствующего этому пику. Такой экспериментальный прием значительно облегчает задачу идентификации веществ.

Подвижные фазы (элюентные системы), как правило, бывают бинарными и содержат подкисленный полярный компонент (водные растворы уксусной, перхлорной, фосфорной или муравьиной кислот) и менее полярный органический растворитель (метанол или ацетонитрил). Подвижная фаза может поступать в колонку как в изократическом, так и в градиентном режиме, когда в ходе процесса хроматографирования происходит во времени изменение соотношения компонентов подвижной фазы [78,79].

Градиентный режим наиболее подходит для разделения сложных смесей флавоноидов. Для колонок с обращенно-фазными сорбентами типичные градиентные программы основаны на использовании подвижных фаз с преобладанием на старте доли полярного растворителя с дальнейшим постепенным возрастанием доли менее полярного растворителя.

Соотнесение пика на хроматограмме с «принадлежащим» ему веществом является наиболее трудной задачей. Удобным приемом является использование параллельного хроматографирования хорошо известных, так называемых стандартных образцов и сравнение с ними хроматограммы исследуемого объекта. Стандартное вещество в идеале должно быть наиболее родственно флавоноидам и иметь подобные хроматографические свойства. В тех случаях, когда стандартное вещество хроматографируется в равных условиях, но параллельно, его называют внешним стандартом. Внутренний стандарт (добавляется в исследуемую пробу перед вводом в хроматограф) должен отвечать следующим условиям: в исследуемой смеси не должно содержаться аналогичное вещество и пик стандарта не должен перекрываться с каким-либо соединением в смеси. Такие ограничения отсутствуют в случае применения внешнего стандарта.

Преимуществами внутреннего стандарта является подтверждение достоверности экстракции, подготовки образца, хроматографической процедуры. В качестве стандартного вещества для флавоноидов часто используется рутин, являющийся коммерчески доступным продуктом. Он хорошо подходит для количественного анализа флавоноловых гликозидов. Для содержащихся в смеси других флавоноидов могут быть использованы такие коммерчески доступные стандарты, как апигенин-7-глюкозид - для флавоновых

гликозидов, катехин - для флаван-3-олов, нарингенин - для дигидрофлавонов, дигидрокверцетин - для дигидрофлавонолов, даидзеин - для изофлавонов [78,79].

Для количественного анализа строится кривая зависимости концентрации флавоноида от площади пика для каждого стандарта в тех же самых хроматографических условиях (длина волны, растворитель), которые применяются по отношению к исследуемой смеси. Соответствующие калибровочные кривые могут быть использованы для расчета количества флавоноида, представляемого каждым пиком ВЭЖХ хроматограммы. В настоящее время практически исчезла надобность в построении калибровочных кривых в связи с обеспечением хроматографов компьютерной системой обсчета площадей пиков [78,79].

На примере хроматографирования смеси флавонов и флавонолов в обращенно-фазном варианте (рисунок) показано, что порядок выхода флавоноидов коррелирует с числом гидроксильных групп, а именно: время удерживания возрастает по мере снижения числа гидроксильных групп в молекуле.

Хроматографические условия: колонка Sep-Pak C-18, градиентный режим: метанол - 5 мМ, НЗРО₄

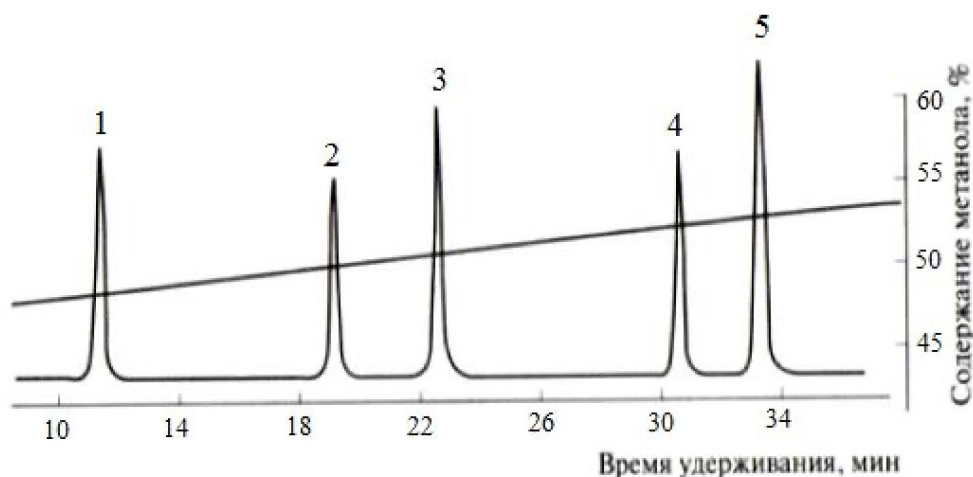


Рисунок 4. Хроматограмма смеси флавоноидов.

Комбинированные методы исследования флавоноидов

Широкое распространение в анализе получили комбинированные методы, включающие предварительное хроматографическое разделение на бумаге, в тонком слое с последующим определением веществ в элюатах из пятен хроматограмм, а также непосредственным сканированием оптической плотности или определением площади пятна на хроматограмме [80].

Хроматомасспектрометрическое определение флавоноидов

Хроматомасспектрометрия - метод анализа смесей, преимущественно органических веществ, и определения следовых количеств веществ в объеме жидкости. Метод основан на комбинации двух самостоятельных методов - хроматографии и масс-спектрометрии. С помощью первого осуществляют

разделение смеси на компоненты, с помощью второго - идентификацию и определение строения вещества, количественного анализа. Известны два варианта хроматомасспектрометрии, представляющие собой комбинацию масс-спектрометрии либо с газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ), либо с ВЭЖХ.

При сочетании ГЖХ и масс-спектрометрии совместимость этих двух приборов обусловлена тем, что в обоих случаях анализируемое вещество находится в газовой фазе, рабочие температурные интервалы одинаковы, пределы обнаружения (чувствительность) близки. Различие состоит в том, что в ионном источнике масс-спектрометра поддерживается высокий вакуум (10^{-5} - 10^{-6} Па), тогда как давление в хроматографической колонке 105 Па. Для понижения давления используют молекулярный сепаратор, который одним концом соединен с выходом хроматографической колонки, а другим - с ионным источником масс-спектрометра. Молекулярный сепаратор удаляет из газового потока, выходящего из колонки, основную часть газа-носителя, а органическое вещество пропускает в масс-спектрометр. При этом давление на выходе колонки понижается до рабочего давления в масс-спектрометре.

Принцип действия молекулярных сепараторов основан либо на различии подвижности молекул газа-носителя и анализируемого вещества, либо на их различной проницаемости через полупроницаемую мембрану. Чаще всего применяют энжекторные сепараторы, работающие по первому принципу. Одностадийные сепараторы этого типа содержат две форсунки с отверстиями небольшого диаметра, которые установлены точно напротив друг друга. В объеме между форсунками создается давление 1.33 Па. Газовый поток из хроматографической колонки через первую форсунку со сверхзвуковой скоростью попадает в область вакуума, где молекулы распространяются со скоростями, обратно пропорциональными их массе. В результате более легкие и быстрые молекулы газа-носителя откачиваются насосом, а более медленные молекулы органического вещества попадают в отверстие второй форсунки, а затем в ионный источник масс-спектрометра. Некоторые приборы снабжены двухстадийным молекулярным сепаратором, снабженным еще одним подобным блоком форсунок. В объеме между ними создается высокий вакуум. Чем легче молекулы газа-носителя, тем эффективнее они удаляются из газового потока и тем выше обогащение органическим веществом.

Наиболее удобный для хроматомасспектрометрии газ-носитель - гелий. Эффективность работы сепаратора, то есть отношение количества органического вещества в газовом потоке, выходящем из колонки, к его количеству, поступающему в масс-спектрометр, в значительной степени зависит от расхода газа-носителя, попадающего в сепаратор. При оптимальном расходе 20-30 мл/мин удаляется до 93% газа-носителя, а в масс-спектрометр поступает более 60% анализируемого вещества. Такой расход газа-носителя типичен для насадочных колонок. В случае использования капиллярной хроматографической колонки расход газа-носителя не превышает 2-3 мл/мин, поэтому на ее выходе в газовый поток добавляют дополнительное количество газа-носителя, чтобы скорость потока, поступающего в молярный сепаратор,

достигла 20-30 мл/мин. Тем самым обеспечивается наилучшая эффективность молекулярного сепаратора. Гибкие кварцевые капиллярные колонки могут вводиться непосредственно в ионный источник. В этом случае ионный источник должен быть обеспечен мощной откачивающей системой, поддерживающей высокий вакуум.

В масспектрометрах, соединенных с газовыми хроматографами, применяется ионизация электронным ударом, химическая или полевая. Хроматографические колонки должны содержать труднолетучие и термостабильные стационарные жидкие фазы, чтобы масс-спектр их паров не налагался на спектр анализируемого вещества.

Анализируемое вещество (обычно в растворе) вводится в испаритель хроматографа, где мгновенно испаряется, а пары в смеси с газом-носителем под давлением поступают в колонку. Здесь происходит разделение смеси, и каждый компонент в токе газа-носителя по мере элюирования из колонки поступает в молекулярный сепаратор. В сепараторе газ-носитель в основном удаляется и обогащенный органическим веществом газовый поток поступает в ионный источник масс-спектрометра, где молекулы ионизируются. Число образующихся при этом ионов пропорционально количеству поступающего вещества. С помощью установленного в масс-спектрометре датчика, реагирующего на изменение полного ионного тока, записывают хроматограммы. Таким образом, масс-спектрометр можно рассматривать как универсальный детектор к хроматографу. Одновременно с записью хроматограммы в любой ее точке, обычно на вершине хроматографического пика, может быть зарегистрирован масс-спектр, позволяющий установить строение вещества [80,81].

Важное условие работы прибора - быстрая запись масс-спектра, который должен регистрироваться за время, гораздо меньшее, чем время выхода хроматографического пика. Медленная запись масс-спектра может исказить соотношение интенсивностей пиков в нем. Скорость регистрации масс-спектра (скорость сканирования) определяется масс-анализатором. Наименьшее время сканирования полного масс-спектра (несколько миллисекунд) обеспечивает квадрупольный анализатор. В современных масс-спектрометрах, снабженных ЭВМ, построение хроматограмм и обработка масс-спектров производится автоматически. Через равные промежутки времени по мере элюирования компонентов смеси регистрируются масс-спектры, количественные характеристики которых накапливаются в памяти ЭВМ. Для каждого сканирования производится сложение интенсивностей всех регистрируемых ионов. Так как эта суммарная величина (полный ионный ток) пропорциональна концентрации вещества в ионном источнике, то ее используют для построения хроматограммы (эта величина откладывается по оси ординат, по оси абсцисс - время удерживания и номер сканирования). Задавая номер сканирования, можно вызвать из памяти масс-спектр в любой точке хроматограммы. Как описано выше, может быть проанализированы смеси веществ, достаточно хорошо разделяемые на подходящих колонках. Иногда удается исследовать и

неразрешенные хроматографические пики. Исследуемые вещества должны быть термически стабильны, хроматографически подвижны в интервале рабочих температур колонки, легко переводиться в паровую фазу при температуре испарителя. Если вещества не удовлетворяют этим требованиям, их можно химически модифицировать, например силилированием, алкилированием или ацилированием гидрокси-, карбокси-, меркапто-, аминогрупп.

Чувствительность хроматомасспектрометрии (обычно 10^{-6} - 10^{-9} г) определяется чувствительностью детектора масс-спектрометра. Более чувствительна (10^{-12} - 10^{-15} г) разновидность хроматомасспектрометрии - массфрагментография, называемая также селективным ионным или многоионным детектированием. Суть ее состоит в том, что запись хроматограмм осуществляется не по полному ионному току, а по наиболее характерным для данного вещества ионам. Этот вид хроматомасспектрометрии используют для поиска, идентификации и количественного анализа вещества с известным масс-спектром в составе сложной смеси, например при количественном определении следов веществ в больших объемах биологических жидкостей (медицина, фармакология, токсикология, допинг-контроль, биохимия). Осуществляют масс-фрагментографию на хромато-масс-спектрометрах с использованием специального устройства - многоионного детектора либо с помощью ЭВМ, которая может строить хроматограммы по одному или нескольким ионам. Такая хроматограмма, в отличие от обычной, содержит пики лишь тех компонентов, в масс-спектрах которых есть такие ионы. Анализ проводят с применением внутреннего стандарта, в качестве которого часто используют аналог искомого вещества, меченный стабильными изотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O).

Другой вариант хроматомасспектрометрии заключается в сочетании ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Метод предназначен для анализа смесей труднолетучих, полярных веществ, не поддающихся анализу методом ГЖХ. Для сохранения вакуума в ионном источнике масс-спектрометра необходимо удалять растворитель, поступающий из хроматографа со скоростью 0.5-5 мл/мин. Для этого часть жидкого потока пропускают через отверстие в несколько мкм, в результате чего образуются капли, которые далее попадают в обогреваемую зону, где большая часть растворителя испаряется, а оставшаяся вместе с веществом попадает в ионный источник и ионизируется химически.

В ряде промышленных приборов реализован принцип ленточного транспортера. Эллют из колонки попадает на движущуюся ленту, которая проходит через обогреваемую ИК излучением камеру, где испаряется растворитель. Затем лента с веществом проходит через область, обогреваемую другим нагревателем, где испаряется анализируемое вещество, после чего оно поступает в ионный источник и ионизируется. Более эффективный способ сочетания высокоэффективного газо-жидкостного хроматографа и масс-спектрометра основан на электро- и термораспылении. В этом случае элюат пропускают через капилляр, нагретый до $150\text{ }^\circ\text{C}$, и распыляют в вакуумную

камеру. Ионы буфера, присутствующие в растворе, участвуют в ионообразовании. Образовавшиеся капли несут положительный, или отрицательный заряд. Вдоль капли из-за малого ее диаметра создается высокий градиент электрического поля, причем по мере распада капель этот градиент возрастает. При этом происходит десорбция из капель протонированных молекулярных ионов или кластеров (молекула вещества + катион буфера). [78,80].

ГЛАВА 2

Экспериментальная часть

2.1 Характеристика объекта исследования

В качестве объекта исследования использовали высушенные образцы подземной части копеечника забытого *Hedysarum neglectum* Ledeb. на территории Катон-Карагайского государственного национального парка, сбор 2023 года. Следуя соответствующим инструкциям по правилам сбора и сушки лекарственных растений изначально проведена заготовка необходимого растительного сырья.

Хранение лекарственного растительного сырья соответствовало требованиям общей фармакопейной статьи по хранению. На качество растительного сырья в первую очередь влияют способ сбора, техника заготовки и способ сушки. В процессе сбора урожая крайне важно учитывать морфологические различия между лекарственными растениями и избегать потенциального заражения близлежащих растений. Другие соображения включают в себя период сбора, соответствующий накоплению активных веществ в желаемых частях растения, с учетом конкретного календарного периода для каждого вида. Принимая во внимание эти факторы, человек может эффективно сохранять и улучшать качество видов лекарственных растений.

2.2 Методы исследования

Фитохимические методы анализа:

1. Качественные методы идентификации БАВ, выделенных из спиртового извлечения корней копеечника забытого: цветные и осадительные реакции, тонкослойная хроматография.

2. Количественные методы определения основных классов БАВ: спектрофотометрия в УФ-свете.

ГЛАВА 3

Результаты испытаний. Обсуждение.

3.1 Методы экстракции БАВ из растительного сырья

Выделение биологически активных соединений проводили на базе кафедры фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана», дополнительные исследования проводились в лаборатории токсикологии и фармакологии, ТОО «Национальный центр биотехнологии».

Экстракты получали методом циркуляционного экстрагирования. Для работы мы взяли прибор Сокслета, при помощи которого возможно провести непрерывную экстракцию в течение продолжительного времени при необходимости.

Методика представляет собой постоянное многократное экстрагирование частей растения одним и тем же объемом летучего экстрагента в замкнутом цикле.

Применяется в том случае, когда используется летучий экстрагент и термически устойчивые действующие вещества.

Реагенты и оборудование:

- аппарат Сокслета;
- Колба круглодонная, V=250 мл;
- Нагревательное устройство;
- Резервуары для хранения;
- Рукав;
- Весы лабораторные, имеющие погрешность не более 0,01 грамма;
- Обратный холодильник;
- этанол 70 %.

Получение экстракта на аппарате Сокслета (экстрагент – этанол 70 %).

Методика. 50 г предварительно измельченных частей растения в порошок поместили в рукав и поставили в резервуар. В круглодонную колбу налили 200 мл экстрагента этанол 70 %. Включили нагревательный аппарат и поставили температурный режим на максимальную мощность, затем после кипения немного снизили. Подключили обратный холодильник. После восьмичасового процесса экстракции полученный экстракт остудили и переместили в колбу из стекла.

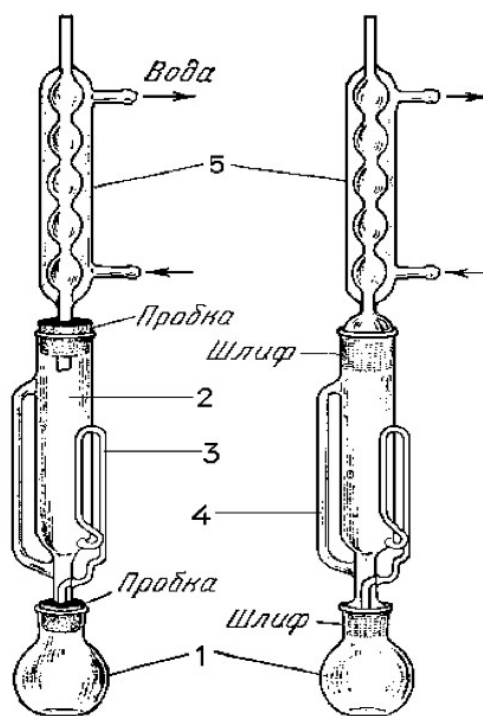


Рисунок 5. Циркуляционный аппарат типа Сокслета: 1 – испаритель-сборник; 2 – экстрактор; 3 – сифонная трубка; 4 – трубка для паров экстрагента; 5 – конденсатор. [78]

Экстрактор Сокслета - это устройство для циркуляционной экстракции, способное извлекать наибольшее количество необходимого вещества из твердой или жидкой фазы с использованием летучих растворителей. По сравнению с инфузией время экстракции значительно сокращается благодаря непрерывному повторению процесса.

Устройство содержит:

- вытяжка: широкий цилиндр, имеющий два входа (нижний и верхний), также оснащен дренажной системой, ведущей к низкому входу;
- круглодонные колбы;
- водонагреватель.

Дополнительно источник тепла и холодной воды.

Эти компоненты состоят из термолабильного, химически инертного стекла и измельчаются друг с другом.

Чуть более ста лет назад одна немецкая газета описала установку, которая позволяла извлекать жиры из молочных продуктов методом экстракции. Этой конструкции было присвоено имя автора статьи – Сокслет.



Рисунок 6. Корни копеечника забытого.

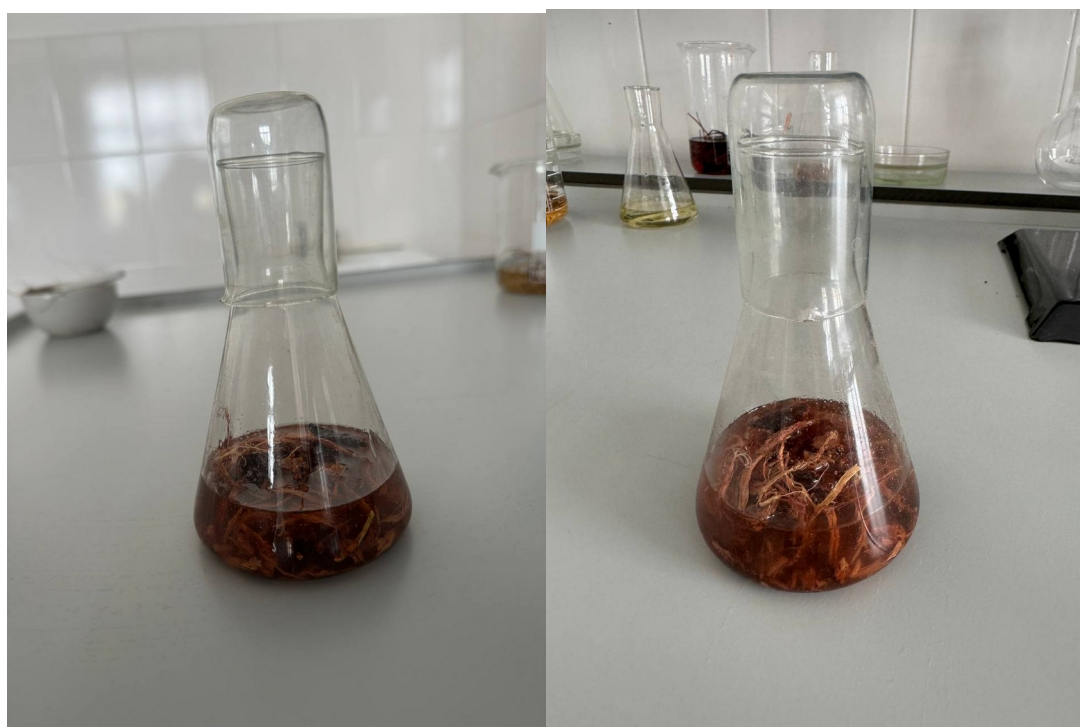


Рисунок 7. Получение экстракта копеечника забытого.

Преимущества экстрактора Сокслета:

- сокращение времени получения экстракта;
- увеличение выхода фенольных соединений по сравнению с настоем;

- холодная экстракция растворителем.

Важным фактором, влияющим на выход БАВ, является экстрагент. В качестве экстрагентов используются полярные и неполярные соединения: вода, этиловый спирт, метиловый спирт, диэтиловый эфир, ацетон и др.

Из результатов исследования ученых Кемеровского государственного университета следует, что наибольшее количество сухого вещества из корней копеечника забытого выделяется с помощью раствора этилового спирта концентрацией 70%. Это позволяет получить максимальный выход БАВ при экстракции с помощью обратного холодильника.

Соответственно, с учетом данных об оптимальной концентрации этилового спирта для извлечения экстрактивных веществ, экстракцию проводили 70%-ным этиловым спиртом.

3.2 Общий фитохимический скрининг основных групп БАВ

В ходе работы использованы следующие методы: качественные реакции обнаружения, хроматография в тонком слое сорбента, спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра.

Качественные реакции обнаружения

1) Обнаружение флавоноидов.

А. Цианидиновая реакция

В одну из двух пробирок была добавлена щепотка порошка магния. Затем в каждую из пробирок было добавлено несколько капель концентрированной соляной кислоты.

Результат. Наблюдали появление темно-красного окрашивания, что указывает на наличие в растворе антоциановых пигментов.

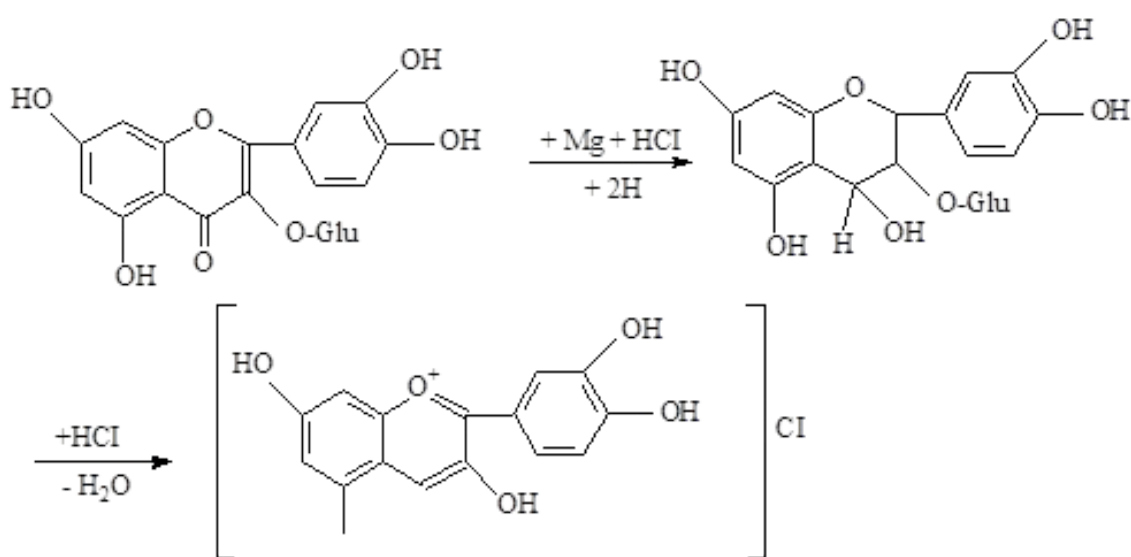


Рисунок 8. Цианидиновая реакция.

Б. Реакция с хлоридом алюминия.

К 1 мл раствора добавляли 2-3 капли 5%-ного спиртового раствора хлорида алюминия.

Результат. Наблюдала слабое лимонно-желтое окрашивание раствора.

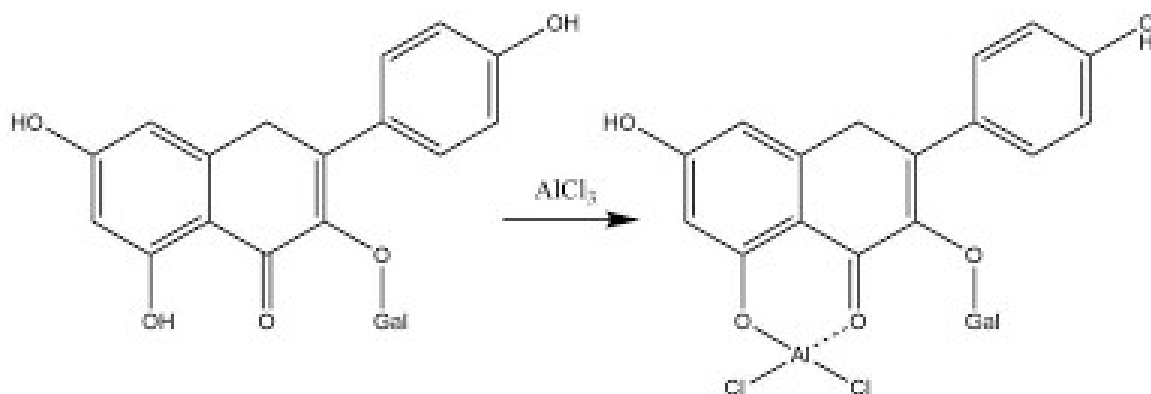


Рисунок 9. Реакция с хлоридом алюминия.

В. Реакция с хлоридом железа (III).

К 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли 1% раствора железа (III). В этой реакции участвуют и другие химические соединения с фенольной структурой.

Результат. Образовалась окраска от зеленой (флавонолы) до красновато-бурой (флавоны).

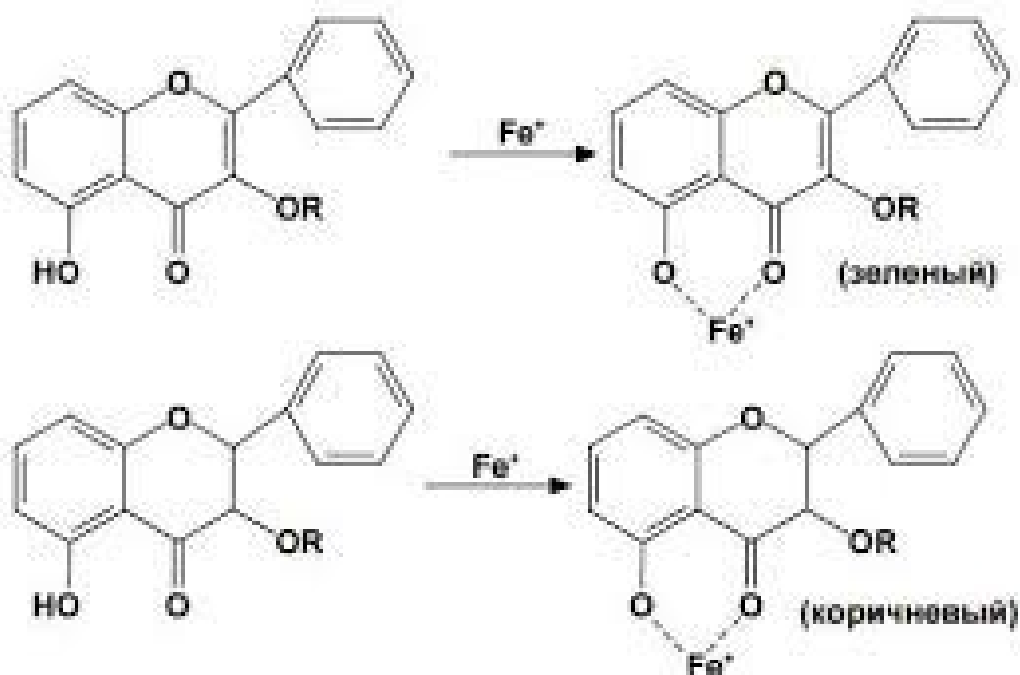


Рисунок 10. Реакция с хлоридом железа (III).

Г. Реакция с ацетатом свинца средним.

В 1 мл содержимого мерной пробирки вводили 3-5 капель ацетата свинца средней концентрации.

Результат. Характерной окраски не наблюдалось.

Д. Реакция с треххлористой сурьмой

5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, взаимодействуя с треххлористой сурьмой, образуют комплексные соединения, окрашенные в желтый или желто-оранжевый цвет - флавоны, в красный или красно-фиолетовый – халконы.

Результат. Характерной окраски не наблюдалось.

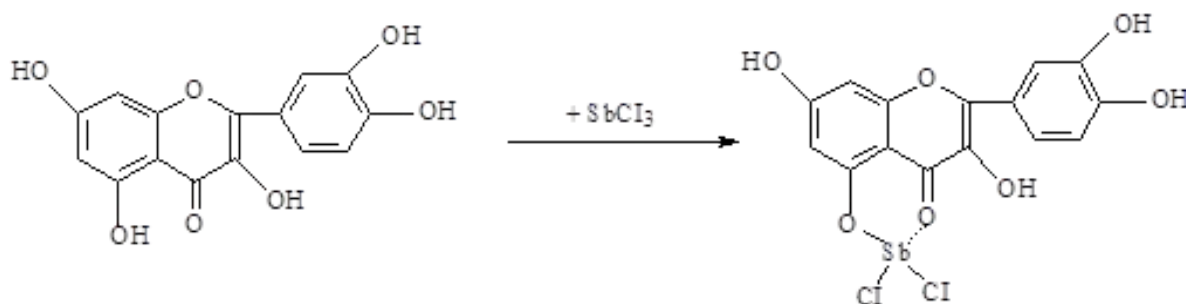


Рисунок 11. Реакция с треххлористой сурьмой

Результат. Характерной окраски не наблюдалось.

Е. Борно-лимонная реакция (реакция Вильсона-Таубека)

5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, взаимодействуя с борной кислотой в присутствии лимонной (реактив Вильсона), образуют желтую окраску с красноватой флюоресценцией в УФ-свете. При замене лимонной кислоты на щавелевую (реактив Таубека) в УФ-свете отмечается зеленая или желтая флюоресценция ().

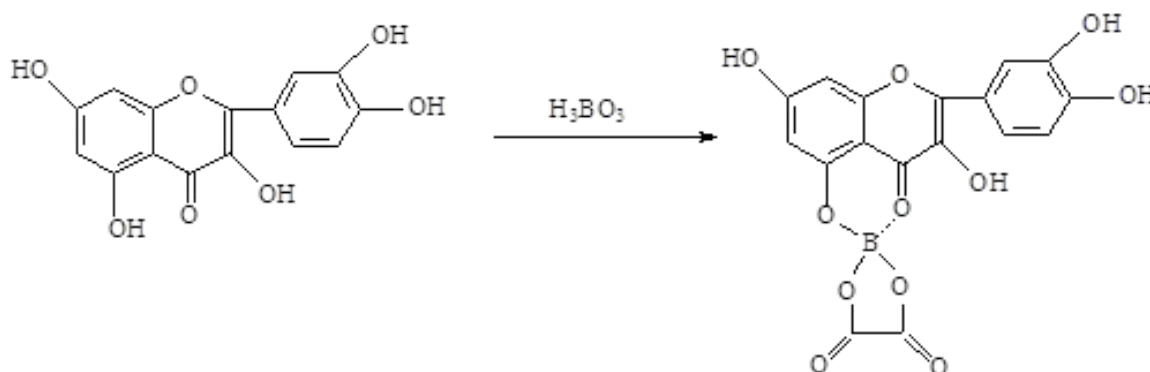


Рисунок 12. Борно-лимонная реакция.

2) Обнаружение кумаринов и хромонов.

А. Лактонная проба

В пробирку к 4 мл экстракта налили 1 мл 10%-го раствора NaOH, нагрели на водяной бане. В присутствии кумаринов появляется желтый цвет.

Охладили пробирку с содержимым и добавили раствор соляной кислоты 10% для получения кислой реакции по лакмусу.

Результат. Раствор помутнел, что указывает на возможное присутствие кумаринов в сырье.

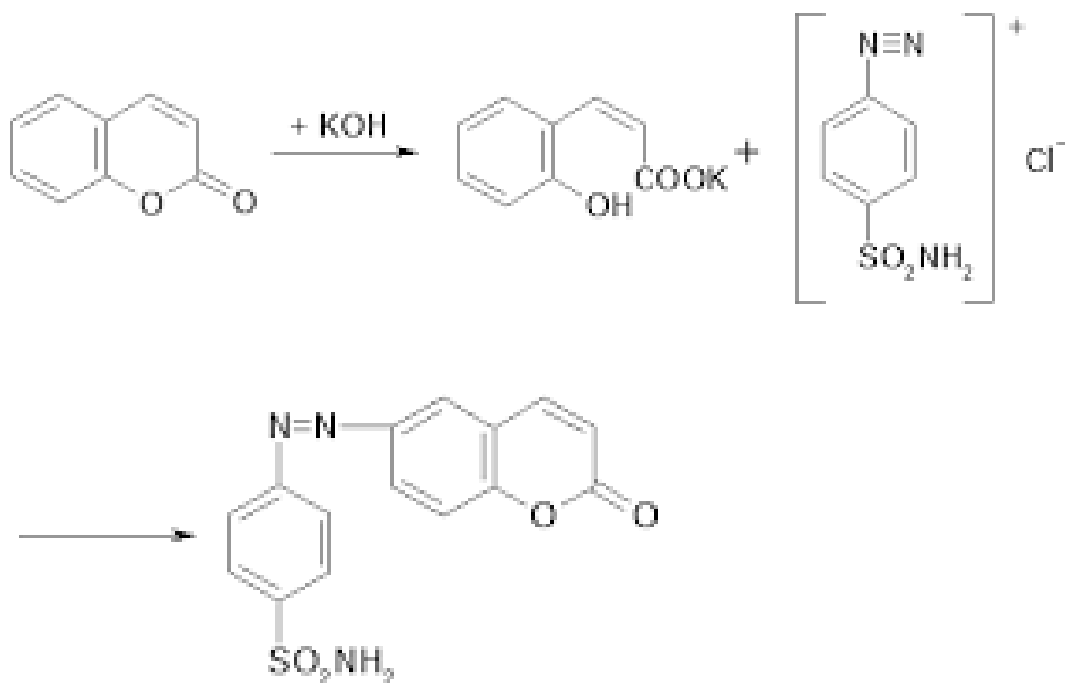


Рисунок 13. Лактонная проба на кумарины.

Б. Реакция азосочетания

К 1 мл исследуемого раствора добавили 3 мл раствора щелочного натрия (0,1M), нагревали на кипящей водяной бане в течение 3–5 мин. Полученный раствор был остужен и разбавлен с 1 мл свежеприготовленного диазотированного раствора сульфаниловой кислоты.

Результат. Вишнево-красного окрашивания раствора не наблюдалось.

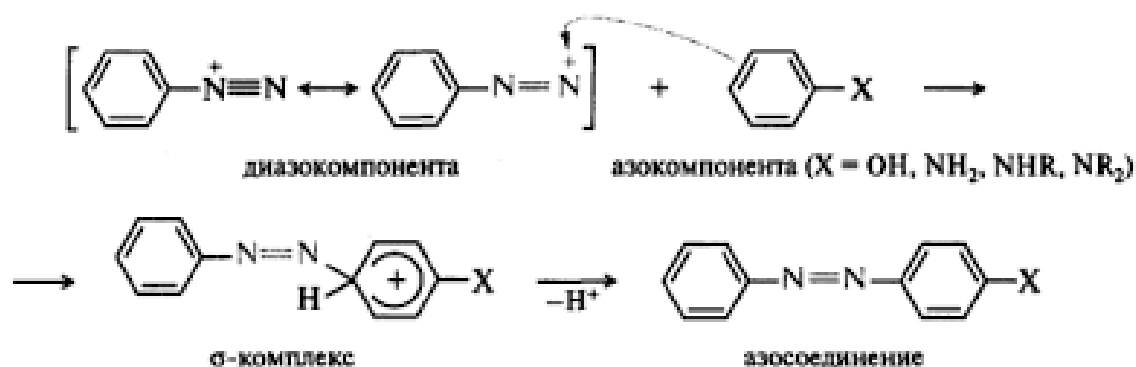


Рисунок 14. Реакция азосочетания

3) Обнаружение дубильных веществ.

А. Реакция с желатином

К 1–3 мл исследуемой смеси добавляли 3–4 капли 1%-го раствора желатина, предварительно растворенного в растворе NaCl 10%-ном.

Результат. Наблюдался белый осадок в виде таннатов желатина, которые, помимо реагента, растворимы. Результаты теста контрастировали с черным фоном и сравнивали с исходным извлечением.

Б. Реакция с калия бихроматом

К 1–3 мл исследуемого содержимого добавляли 3–5 капель 5%-го раствора калия бихромата.

Результат. Наблюдалось потемнение раствора.

В. Реакция со свинцом основным уксуснокислым

К 2–3 мл извлечения добавили 2–3 капли раствора свинца основного уксуснокислого.

Результат. Наблюдалось характерное выпадение осадка.

4) Качественные реакции на сапонины.

А. Реакция Фонтан–Кендаля

Взяв две пробирки одинакового размера, в одной из них было 5 мл 0,01 N раствора HCl, а в другой — 5 мл 0,01 N раствора NaOH. В каждую пробирку добавляли по 0,5 мл рассматриваемого экстракта и интенсивно перемешивали в течение одной-двух минут.

Результат. Образовывалась пена, примерно равная по объему и стойкости, что свидетельствует о наличии тритерпеновых сапонинов.

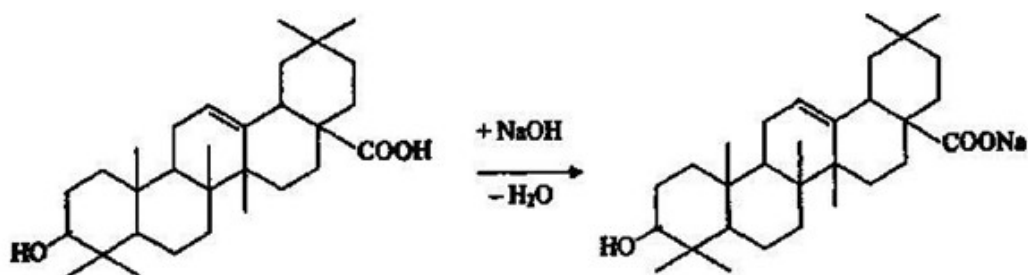


Рисунок 15. Реакция Фонтан–Кендаля.

Б. Проба на пенообразование

2–3 мл водного экстракта интенсивно перемешивали в течение 1 мин. (Это не только деликатный тест, но и довольно специфичный, ведь не существует других видов веществ, способных образовывать пену).

Результат. Зафиксирована плотная не опустившаяся пена.

Б. Осаждение сапонинов солями бария (магния)

Несколько капель раствора соли бария добавляли в 2 мл водного экстракта в пробирке.

Результат. Образовывался белый осадок.

Г. Осаждение сапонинов ацетатом свинца

В пробирку к 2 мл исследуемого раствора прибавляли некоторое количество капель 10%-го ацетата свинца.

Результат. Образовывался белый осадок.

Д. Реакция Либермана-Бурхарда (характерна для стероидных сапонинов).

Извлечение испаряли на водяной бане, сухой остаток, который был получен, растворяли в ледяной уксусной кислоте, примешивая уксусный ангидрид с концентрированной серной кислотой (50:1).

Результат. Ожидаемой розовой окраски не обнаружилось.

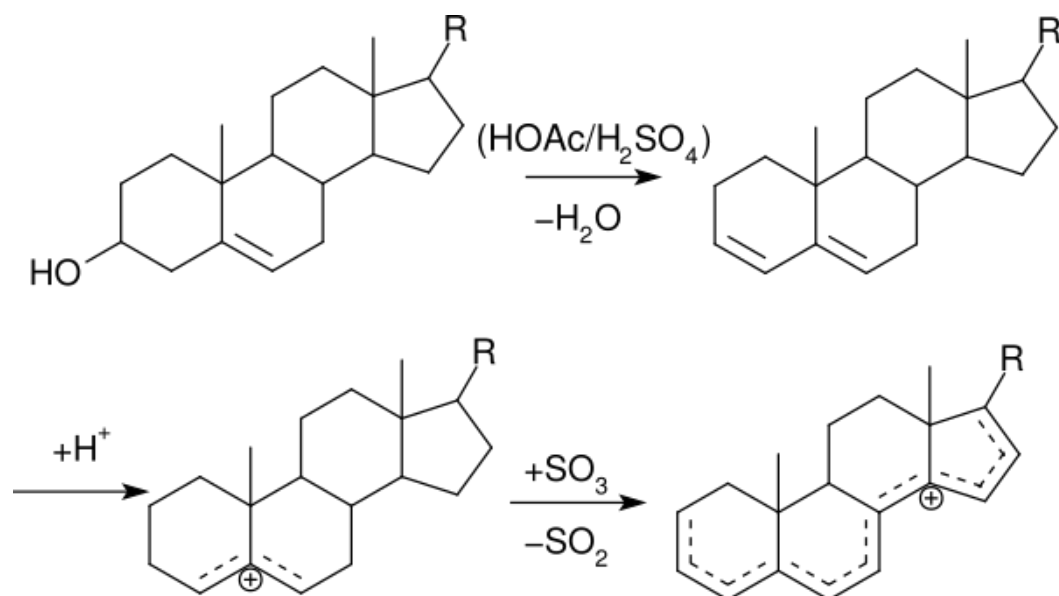


Рисунок 16. Реакция Либермана-Бурхарда.

Е. Реакция с концентрированной серной кислотой.

В пробирку с 2 мл спиртово-водного экстракта помещали 1 мл высококонцентрированной серной кислоты.

Результат. Раствор окрасился в слабо-красный цвет.

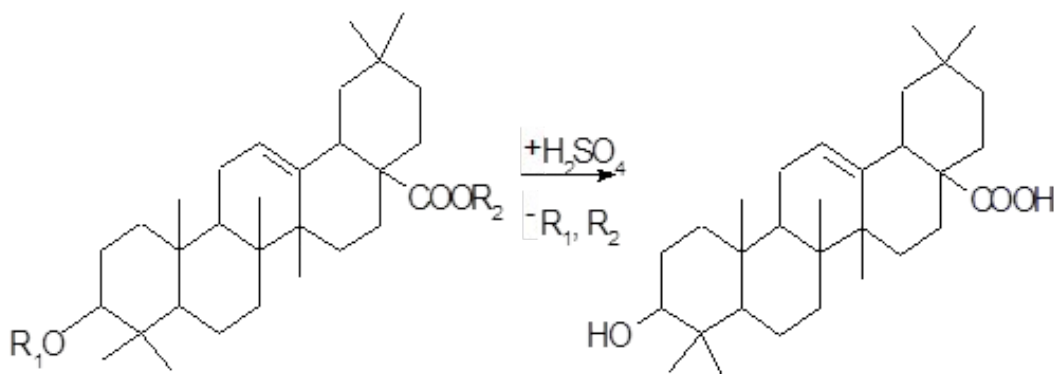


Рисунок 17. Реакция с концентрированной серной кислотой.

Ж. Проба Лафона на сапонины.

В пробирку с 2 мл спиртово-водного экстракта растворили один мл концентрированной серной кислоты и несколько капель 10%-ного раствора сернокислого железа.

Результат. Характерного зеленого окрашивания обнаружено не было.

З. Реакция Сальковского.

К 2 мл водного экстракта в пробирку добавляли 1 мл хлороформа и несколько капель концентрированной серной кислоты, не объединяя слои.

Результат. Органический слой стал оранжевым.

Качественное обнаружение методом ТСХ.

Для проведения ТСХ–анализа применяли силикагелевые пластины «Sorbfil ПТСХ-АФ-А» 10x15см.

Хроматографирование выполняли в системах растворителей:
n-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5);
15% уксусная кислота.

Приготовление стандартного образца ксантона – мангиферина.

Около 0,01 г (т.н.) мангиферина помещают в колбу емкостью 25 мл, которые растворяют в 20 мл 70% этилового спирта, затем доводят объем до нужного уровня тем же спиртом и перемешивают. Затем 1,0 мл раствора из предыдущего этапа помещают в колбу объемом 10 мл, достигают мениска 70% этилового спирта и раствор перемешивают.

На изображении хроматограммы при дневном свете должна быть видна бледно-желтая область, которая в ультрафиолетовом свете меняется на зеленоватую, это область прикрепления молекулы мангиферина. Допускаются другие области, допускающие адсорбцию.

Точную навеску 0,5 г измельченного сырья заливали 50 мл 70% этанола и кипятили на водяной бане в течение 30 минут. Затем отфильтровывали через бумажный фильтр и повторяли экстракцию еще два раза по 30 мин. Весь экстракт выпаривали досуха, а оставшийся экстракт растворяли в небольшом количестве 70% этанола (измеряли объем). Микропипеткой наносили 20 мкл спиртового экстракта на пластинки.

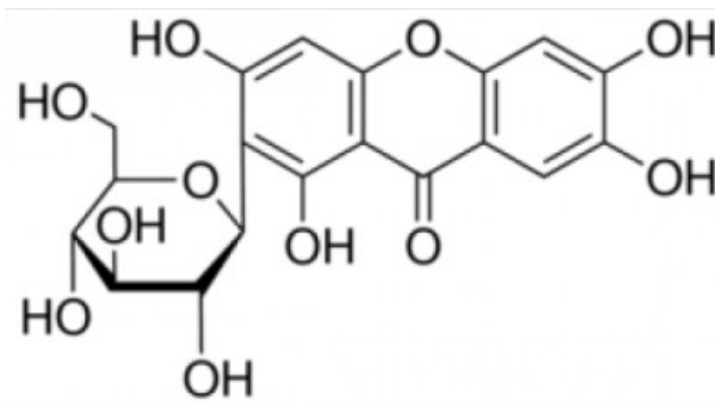


Рисунок 18. Формула мангиферина

Пластины были проявлены в ультрафиолетовом свете (люминесцентная лампа УФ-А) при двух значениях длины волн – 254 и 365 нм. Высушенную хроматограмму просмотрели под люминесцентной лампой - проявлялись два-три ярко-желтых пятна, одно из которых - мангиферин (при сравнении с образцом мангиферина фирмы “Sigma”).

Таблица 4. Результаты исследования мангиферина методом ТСХ в различных растворителях.

№	Система растворителей	Rf
1	н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5)	0,48
2	15 % уксусная кислота	0,4

Система растворителей н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) является более эффективной по сравнению с 15% уксусной кислотой, так как обеспечивает более высокий коэффициент удерживания (Rf) в хроматографическом анализе – 0,48.

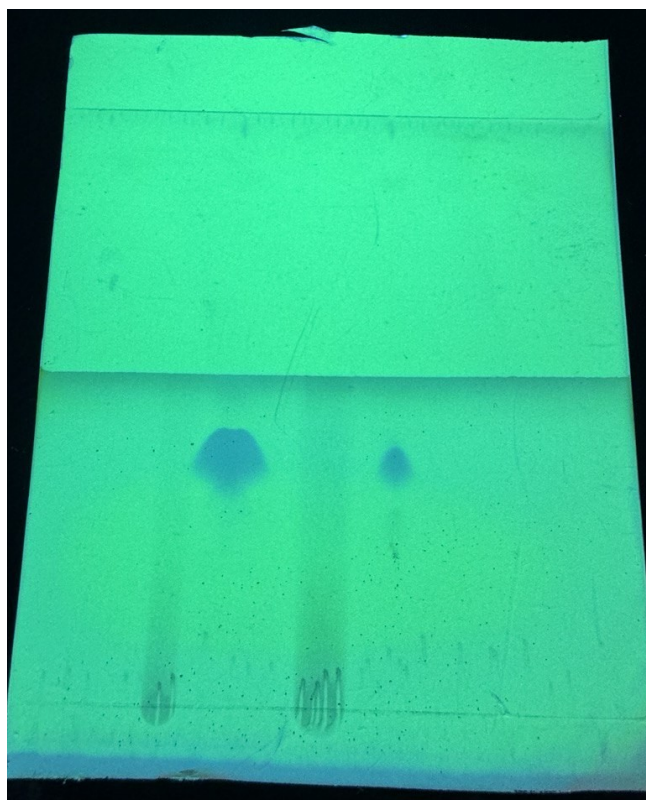


Рисунок 19. Пластина с проявленными пятнами: 1 – экстракт копеечника забытого; 2 – СО мангиферина.

При проявлении в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм было обнаружено пятно с Rf 0,48 на уровне пятна СО мангиферина. При проявлении при длине волны 365 нм пятен не наблюдалось.

В результате применения метода ТСХ экстракции из сырья *H.neglectum Ledeb.* спиртом этиловым 70 % в сравнении со стандартным образцом указывает на то, что в данном образце присутствует ксантоновый гликозид – мангиферин. [81,82,83]

Количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии

Методика анализа суммы ксантонов в пересчете на мангиферин.

Анализируемый образец растения имел размер 2 мм или менее. 1,0 г (т.н.) измельченного сырья помещают в коническую колбу, имеющую вместимость 100 мл, в колбу также помещают 40 мл 70%-ного этанола, затем держат на водяной бане с обратным холодильником 30 минут. Его охлаждали в течение 30 мин с последующим фильтрованием через ватный тампон в колбу для приема объемом 250 мл. Экстракция проводилась дважды. Полученную экстракцию выпаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 80-85°C до водного остатка объемом около 50 мл, который без охлаждения помещали в разделительную воронку на 250 мл количественно с помощью 50 мл воды очищенной, а после охлаждали до комнатной температуры.

Затем водную фазу четыре раза подвергали воздействию этилацетата дозами по 20 мл. Этилацетатные извлечения сквозь фильтр поочередно фильтровали, добавив 2 г в колбу для дистилляции на 250 мл натрия сульфата безводного, фильтр промывали 10 мл этилацетата. Упаривали извлечение до полного удаления органического растворителя на роторном испарителе под вакуумом при температуре 80-85°C. К остатку прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл, применяя тот же спирт и доводили объем до метки (раствор А).

3,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, объем раствора доводили до нижнего мениска 70 % спиртом этиловым – раствор Б, хорошо перемешивали. Делали замеры оптической плотности (absorbance) раствора Б на спектрофотометре при длине волны 365 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 70%. [83-110]

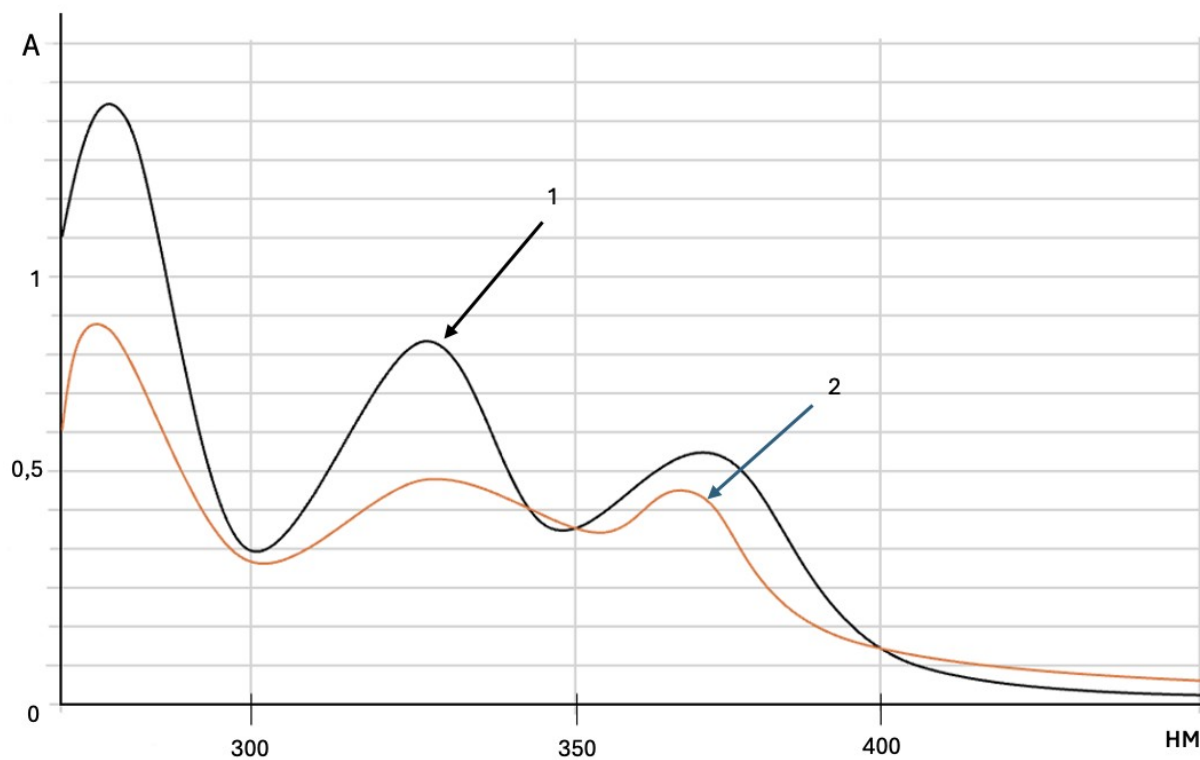


Рисунок 20. УФ-спектр: 1 – СО мангиферина, 2 – извлечения из подземной части *Hedysarum neglectum* L.



Рисунок 21. Спектрофотометр марки Evolution 201 Thermo Scientific.



Рисунок 22. Роторный испаритель

Содержание в сырье суммы ксантонов в сырье рассчитывали в пересчете на мангиферин (X , %) по формуле:

$$X = \frac{A_x \times 50 \times 25 \times 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} a_3 (100 - W)}, \text{ где:}$$

A_x – значение оптической плотности в испытуемом растворе;

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ – удельный показатель мангиферина, 325.

A_x – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

В результате исследований вида *Hedysarum neglectum* было выявлено, что максимальное содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин составляет $0,51 \pm 0,01\%$. Полученные результаты указывают нам на перспективность дальнейших исследований подземной части копеечника забытого, это позволяет рассматривать данный вид в качестве дополнительного сырьевого источника мангиферина.

Таблица 5. Сравнительная характеристика Копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*), произрастающего на территории Казахстана и России

Копеечник забытый – <i>Hedysarum neglectum</i> L.	Республика Казахстан	Российская Федерация
Количественное содержание ксантонов	0,51%	0,63%
Тонкослойная хроматография	При длине волны 254 нм было проявлено пятно зеленого цвета с Rf 0,48 в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5).	При длине волны 254 нм было проявлено 2-3 желтых пятна, с Rf 0,51 в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (13:7:2), одно из которых соответствовало мангиферину.
	При длине волны 365 нм пятен обнаружено не было.	
Качественные реакции обнаружения	Обнаружены: кумарины и хромоны, дубильные вещества, сапонины, флавоноиды.	Обнаружены: кумарины и хромоны, дубильные вещества, сапонины, флавоноиды, эфирные масла, аминокислоты.
	Не обнаружены: эфирные масла, аминокислоты.	-

3.3 Статистические методы анализа

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью прикладной программы STATISTICA/w6 с использованием критерия Стьюдента при помощи электронных таблиц Microsoft Office Excel.

Выводы

- По итогам проведенного качественного анализа цветными и осадительными реакциями были выявлены следующие группы веществ: *флавоноиды, кумарины, тритерпеновые сапонины, дубильные вещества.*

- В результате проведенных испытаний методом ТСХ было определено вещество группы ксантонов – мангиферин. Выбрана наиболее оптимальная подвижная фаза, в которой достигается селективное разделение активных компонентов – н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), $R_f=0,48$. Окраска проявленного пятна четкая, границы не размыты. В качестве стандартного образца использован мангиферин. В качестве детектирующего агента использовали УФ-свет.

- Проведено определение количественного содержания методом спектрофотометрии в УФ-свете ксантонов в пересчете на мангиферин – $0,51 \pm 0,01$ % (тогда как в России аналогичное исследование показало результаты – $0,59 \pm 0,024$ %), что позволяет нам рассматривать данный вид в качестве дополнительного сырьевого источника мангиферина.

- Был проведен сравнительный анализ копеечника забытого, произрастающего на территории России и Казахстана. Были определены различия в химическом составе этих растений.

Список литературы

1. Ляшевская Н. В., Поткина Г. Г., Кузнецова О. В., Дайбова В. Т. Некоторые данные по биохимическому составу и экологическому состоянию копеечников (*Hedysarum neglectum*) Горного Алтая. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья//Материалы Всероссийского семинара. — Барнаул, 2002.)
2. Байтенов, М. С. Новые виды рода *Hedysarum* L. / М. С. Байтенов // Вестн. АН КазССР. - 1956. - Вып. 3. - С. 99-107.
3. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск, 1991. 430 с.
4. Флора Юго-Востока Европейской части СССР. Вып. 4. Л., 1930. С. 95-123. 212. Флора СССР, 1948
5. Флора Европейской части СССР. Т. 5 / [А. И. Барбарич, Е. Г. Бобров, В. Н. Васильев и др.] ; под ред. Ан. А. Федорова ; [Акад. наук СССР, Бот. ин-т им. В. Л. Комарова]. - Ленинград : Наука, Ленинградское отделение, 1981. – 378
6. Кобахидзе М.Г., "Копеечник забытый (*Hedysarum neglectum*) - новый вид Жако, растений для флоры России", Ботанический журнал, том 92, № 2, стр. 286-291, 2007.
7. "*Hedysarum neglectum*", The Plant List, www.theplantlist.org.
8. Киясов А.Д., Камалов Ф. Г., Камалов Ч.А., Забебенцев Н.А. "Растения и животные Алтая", Алтаевское книжное издательство, 2005.
9. Природа растений: энциклопедия. - М.: АСТ: Астрель, 2008.
10. Копеечник забытый // Энциклопедия растений //URL: <https://www.plantbook.ru/plant1323.html>
11. Миронов, Е. М. Сравнительное карполого-анатомическое исследование рода *Hedysarum* Б., и трибы *Hedysareae* DC. (Leguminosae): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / Миронов Евгений Михайлович. - М., 2000. - 18 с.
12. Красная книга Московской области / отв. ред. В. А. Зубакин, В. Н. Тихомиров. — М. : Аргус : Рус. ун-т, 1998. — 560 с.
13. Флора СССР, т. 13, 1948;
14. Чумаков О.Е. Объяснинов Н.Я., Мичурин В.Г. Изменения растительности и климата на Юго-Востоке Европейской части СССР в четвертичное время // Вопр. ботаники Юго-Востока. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1988. Вып. 6. С. 53-79.
15. Красная книга Оренбургской области, 1998
16. Федченко Б. А. Род 818 Копеечник — *Hedysarum caucasicum*, вид 15 Н. *Caucasicum* // Флора СССР = Flora URSS : в 30 т. / начато при рук. и под гл. ред. В. Л. Комарова. — М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1948. — Т. 13 / ред. Тома Б. К. Шишкин, Е. Г. Бобров. — С. 277. — 588 с. — 4000 экз.
17. «Флора Сибири. Fabaceae (Leguminosae)» под ред. А.В.Положий, Л.И.Малышева, «Наука», Новосибирск, 1994 г. – с. 280 с.

18. «Флора Центральной Сибири», т.2., под ред. Л.И.Мальшева, Г.А.Пешковой. «Наука», Новосибирск, 1994 г. – с. 506
19. Bajtenov, M. S. (1961). In: Flora Kazakhstana, Vol. 5. Alma-Ata. (Rus)
20. Kovalevskaja, S. S. (1981). In: Conspectus Florae Asiae Mediae, Vol. 6. Taschkent. (Rus)
21. Определитель растений Республики Алтай / И.М. Красноборов [и др.]; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ц. сиб. бот. сад; М-во образования и науки РФ, Горно-Алт. гос. ун-т.– Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С.280 .
22. Рябина З.Н. Эталон степной растительности в заповедниках и в условиях антропогенного воздействия. // Теоретические и практические вопросы ландшафтной экологии и заповедного дела. — Екатеринбург, УИР: Наука, 1993. - С. 19-27.
23. Горчаковский П.Л., Рябина З.Н. Флора Урало-Илекского междуречья (Оренбургская область) // Растительный мир Урала и его антропогенные изменения. — Свердловск, 1985. — С.3-31.
24. Красная книга Томской области, 2013;
25. Ломоносова М.Н., Красников А.А., Артемов И.А., Байков К.С., Вибе Е.И., Власова Н.В., Герман Д.А., Гранкина В.П., Данилов М.П., Додук А.Д., Доронькин В.М., Дубровский Н.Г., Дурников Д.А., Зыкова Е.Ю., Конгар Э.Т., Коропачинский И.Ю., Короткова Е.И., Курбатский В.И., Лайдып А.М., Луферов А.Н., Молокова Н.И., Никитин В.В., Пеньковская Е.Ф., Положий А.В., Сарбаа Д.Д., Соболевская К.А., Тимохина С.А., Тупицына Н.Н., Федоровский В.Д., Ханминчун В.М. Определитель растений Республики Тывы / Под ред. Д.Н. Шауло. Новосибирск: Издательство Сибирского отделения РАН, 2007. 706 с.
26. Копеечник забытый на сайте Агрэкологический атлас России и сопредельных государств.
27. Флора Казахстана. Т.5. 1961 / Под ред. Н.В.Павлова. Алма-Ата: АН КазССР. 515 с.
28. Byng J.W., Christenhusz M.M.J. 2018. Introducing The Global Flora, a global series of botany. – In: The Global flora: A practical flora of vascular plants of the world. Bradford. Vol. 1. P. 1–3. Pubished online 18.01.2018 www.plantgateway.com/globalflora
29. Троицкий В. М. Состав, питательность культурных и природных растений Восточного Казахстана. — Семипалатинск, 1950
30. Кузнецов П.В., Фёдорова Ю.С. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. К феномену хроматографического разделения фитопрепаратов копеечника забытого на сефадексе LH-20 и его химически модифицированном аналоге // Ползуновский вестник. 2009. № 3. С. 338-340.

31. Федорова Ю.С. Кузнецов П.В. Сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ некоторых фитопрепаратов рода *Hedysarum*. / Вестник Российской Академии естественных наук (ЗСО). 2010.-183-186с.
32. Литвинская С.А., Муртазалиев Р.А. Флора Северного Кавказа: Атлас-определитель. М.: Фитон XXI, 2013. 688 с.
33. Красная книга Республики Дагестан. Часть 1: Растения // Сост. Р.А. Муртазалиев, А.А. Теймуров. – Махачкала, 2009. – 552 с.
34. Соловьева Е.В., Хоциалова Л.И., Кривут Б.А., Глызин В.И., Майсурадзе Н.И. Содержание мангиферина у видов *Hedysarum* L., выращиваемых в Московской области // Растительные ресурсы. 1983. Т. 19. Вып. 3. С. 356– 360.
35. Денисова О.А., Глызин В.И., Патудин А.В., Гавриленко Б.Д. Определение содержания ксантонового гликозида мангиферина у некоторых растений родов *Iris*, *Gentiana*, *Hedysarum* // Химико-фармацевтический журнал. 1980. Т. 14, № 12. С. 76–77.
36. Имачуева Д.Р., Серебряная Ф.К. Современное состояние изученности растений рода копеечник (*Hedysarum* L.) Флоры кавказа. *Фармация и фармакология*. 2016;4(6):4-32. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-6-4-32>
37. Имачуева, Д.Р. Перспективы изучения северокавказских видов рода копеечник (*Hedysarum* L.) семейства бобовые (*Fabaceae*) / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная, И.Н. Зилфикаров // «Человек и лекарство»: Тезисы докладов XXIV Российского национального конгресса. Москва: Видокс, 2017. - С. 98.
38. Имачуева, Д.Р. Определение общих числовых показателей копеечника кавказского (*Hedysarum caucasicum* M. Bieb.) / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Евразийский союз ученых. - 2017. - №43. - Ч.1. - С. 70-73.
39. Карнаухова Н.А. Особенности развития *Hedysarum theinum* (*Fabaceae*) Каспоб. В природных условиях и при интродукции в Центральный Сибирский ботанический сад (г. Новосибирск) // Растительные ресурсы. 2007. Т.43, вып.3. С. 14-25.
40. Кривут Б.А., Федюнина Н.А., Кочерга С.И., Русакова С.В. Спектрофотометрическое определение мангиферина // Химия природных соединений. 1976. №1. С. 44-46.
41. Маланкина Е. В. Копеечник альпийский: лекарственные свойства и выращивание [Электронный ресурс] Е. В. Маланкина. - Режим доступа: <https://www.Greeninfo.Ru/wildrmalpinumhtml/Article/a>
42. Куваев В.Б., Глызин В.И., Глызина Г.С., Баньковский А.И. Перспективы поисков мангиферина в отечественной флоре // Растительные ресурсы. 1972. Т. 8, вып. 3. С. 367-371.
43. Finnegan R.A., Merkel K.E., Patel J.K. Constituents of *Mammea americana* L. XII: Biological data for xanthenes and benzophenones // J. Pharm. Sciences. 1973. V. 62. Pp. 483-485.

44. Zhang Z. Xanthone glycosides in Gentianaceae of Qinghai-Tibet plateau // *Stud. Plant Sciences*. 2002. V. 68. Pp. 49-54.
45. Srinivasan K.K., Subramanian S.S., Kotian K.M., Shivananda P.G. Antibacterial activity of mangiferin // *Arogya*. 1982. V. 8. Pp. 84.
46. Chattopadhyay U., Chaudhuri L., Ghosal S. Immunostimulatory activity of mangiferin, a naturally occurring xan-thone-C-glucoside // *Pharm. research*. 1986. V. 3. Pp. 307-308.
47. Hostettmann K., Wagner H. Xanthone glycosides // *Phytochemistry*. 1977. V. 16. Pp. 821-829.
48. Николаев С.М. Желчегонное действие экстракта горечавки бородастой // *Фармация*. 1985. №3. С. 16-19.
49. Miura T., Ichiki H., Hashimoto I., Iwamoto N., Kato M., Kubo M., Ishihara E., Komatsu Y., Okada M., Ishida T., Ta-nigawa K. Antidiabetic Activity of a Xanthone Compound, Mangiferin // *Phytomedicine*. 2001. V. 8. N2. Pp. 85-87.
50. Miura T., Ichiki H., Iwamoto N., Kato M., Kubo M., Sasaki H., Okada M., Ishida T., Seino Y., Tanigawa K. Antidia-betic activity of the rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, Mangiferin and its glucosid // *Biol. Pharm. Bull*. 2001. V. 24. Pp. 1009-1011.
51. Федорова Ю.С., Кузнецов П.В., Сухих А.С., Карелина О.А., Герасимова Р.Н. Сравнительная оценка антибактериальной активности фитопрепаратов из некоторых видов растений рода *Hedysarum* (сем. Fabaceae) / Ю.С. Федорова, П.В. Кузнецов, А.С. Сухих, О.А. Карелина, Р.Н. Герасимова // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – №3. – С.210-214.
52. Федченко, Б.А. Копеечник - *Hedysarum L.* /Б.А. Федченко // *Флора СССР*. - М. Л., 1948. - Т. 13. - 319 с.
53. Bauhin, C. *Prodromus theatric botaniki* /Bauhin, C. - 1620. - P. 244
54. Carl von Linn. *Systema naturse per regna tria naturse, secundum classes, ordines, genera, species* /Ed. 10., reformsta Stockholm: impensis L. Salvii. -1758. - P. 74
55. Уткин, Л.А. Народные растения Сибири //Л.А. Упин //Труды нзуч.-исследоват, хим.-фэрм. института. - 1931. - Вып. 24. - С. 100–103.
56. Компонентный состав видов рода *Hedysarum* (Fabaceae) /О.В. Неретина, А.С.Громова, В.Н. Луцкий и др. // *Растительные ресурсы*. -2004. - Т.40, вып. 4. — С. 111-137.
57. Дикорастущие полезные растения России // Под ред. А.Л. Буданцева, Е.Е. Лесиовской.– СПб.: Изд-во СПХ- ФА, 2001. – 663 с.
58. Смирнова, Л.П. Изучение химиче- ского состава алпизарина из листьев манго / Л.П. Смирнова, В.И. Шейчен- ко, Г.М. Тохтабаева // *Хим.-фармац. журн.* – 2000. – Т. 34, No 2. – С. 22–25.
59. Huang Z., Cui Z., Ren Y., Zhang J., Cran M. Antiaging effect of *Hedysarum polybotrys* polysaccharide // *Zhongcaoyao*. 1992. Vol. 23, no. 9. P. 469–473.

60. Lan Z. et al. Effects of radix hedysari polysaccharides on immunological function and transplanted tumors in mice // *Zhongguo Yaoli Xuebao*. 1987. Vol. 8, no. 3. P. 275–277.

61. Zheng, H. et al. Studies on radix hedysari (RH) in the Micang mountains of Wudu, Gansu Province. II. Effects of water extracts of RH roots on the immune function of organisms // *Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*. 1991. Vol. 27, no. 1. P. 82–85.

62. Дорогина О. В., Плотников Д. А. Возможность идентификации лекарственно-технического сырья в заготовительной системе потребительской кооперации. Устойчивость и безопасность в экономике, праве, политике стран Азиатско-Тихоокеанского региона//Материалы Международного молодежного симпозиума. Ч. 3. — Хабаровск: РИЦ ХГАЭП, 2005.

63. Минаева В. Г. Лекарственные растения Сибири //Новосибирск. Наука. 1991. - С. 273-274.

64. Красноборов И. М., Азовцев Г. Р., Орлов В. П. Новый вид рода *Hedysarum* (Fabaceae) из Южной Сибири // *Ботанический журнал*. 1985. Т. 70. No 7. - С. 968- 973.]

65. Begon, M. Population ecology. A unified study of animals and plants / M.Begon, M. Mortimer. - Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1986. - 220 p.

66. Патент 2027751 РФ, 01.27.1995

67. Elmastaş M et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various extracts of *Hedysarum neglectum*. *Turk J Biol*. 2013;37(3):342-50.

68. Zaini R et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of hydroalcoholic extract of *Hedysarum neglectum*. *Avicenna J Phytomed*. 2013;3(2):115-20.

69. Gasparrini M., Forbes-Hernandez T.Y., Afrin S., Reboredo-Rodriguez P., Cianciosi D., González-Paramás A.M., et al. Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: A brief overview. In: *Nutrients*. 2019. Vol. 11. P. 1510.

70. Zheljzkov V.D., Cantrell C.L., Kremer R.J. Essential oil, soybean growth, and nematodes. In: *Bulg. J. Agric. Sci*. 2002. Vol. 8. P. 221-227.

71. Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Сравнительный фитохимический анализ биологически активных веществ некоторых фитопрепаратов рода *Hedysarum* / *Вестник РАЕН (ЗСО)*. 2010.- С.183-186.

72. Яцюк Я.К. О выделении экдистерона / Я.К. Яцюк, Г.М. Сегаль // *Химия природных соединений*. -1970. -№2. -С. 281

73. В.П. Мишуров, В.Г. Зайнуллин, Г.А. Рубан, Н.С. Савиновская, В.В. Пунегов, Л.А. Башлыкова. – Сыктывкар, – (Коми научный центр УрО РАН). Интродукция *Serratula Coronata* L. на Европейском Северо-Востоке. - 2008. – 192 с.

74. Dyshlyuk L.S., Fotina N.V., Izgarysheva N.V. Selection of an extractant for isolation of biologically active compounds from a *hedysarum neglectum*. DOI: <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2020-5S-104-106>

75. Гармашов, С.Ю. Подбор оптимальных параметров противоточной экстракции Garmashov, S. УЛ дикорастущего сырья / С.Ю. Гармашов, О.О. Бабич, К.Н. Карчин, А.В. Изгары- of wild-growing r. шев // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции студен- A.V. Izgaryshev // тов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии students, graduat и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленно- "Technologies and сти». - 2016. - С. 280-284.

76. Овчинникова С.Я.1, Орловская Т.В.2 Разработка Оптимальной Методики Экстракции Корневищ С Корнями Любистка Лекарственного // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 8-2. – С. 90-91;

URL: <https://expeducation.ru/ru/article/view?id=5899>

77. Чучалин, В.С. Технология получения экстракционных фитопрепаратов: учебное пособие / В.С. Чучалин, Н.В. Келус. Томск: Изд-во СибГМУ, 2019. - 198 с.

78. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука, 1990. - 144с.

79. Сычев, С.Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколоночных хроматографах серии «Миличром»: Монография/ С.Н. Сычев, К.С. Сычев, В.А. Гаврилина. - Орел: ОрелГТУ, 2002. - 134с.

80. Абдуллабекова, В.Н. Идентификация рутина в растительном сырье методом капиллярного электрофореза/ В.Н. Абдуллабекова// Вестник фармации. - 2009. - №3. - С.23-28.

81. Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. 2010; 2853.

82. Алпизарин. [Электронный ресурс]. Доступно на: http://www.biomedservice.ru/preparat/libr_alpizarin.pdf

83. Кукушкина Т.А, Зиннер Н.С., Высочина Г.И., Свиридова Т.П. Содержание ксантонов в надземной части растений *Hedysarum theinum* Krasnov. и *H. alpinum* L. (Fabaceae) при выращивании в сибирском ботаническом саду (Томск). Химия растительного сырья. 2011; 3: 113–6.

84. Курбатский, В.И. *Hedysarum* L. – Копеечник/ В.И. Курбатский // Флора Сибири. – Новосибирск, 1994. – Т.9. – С. 153-166;

85. Горчаковский П.Л., Рябинина З.Н. Степи южной части Оренбургской области. // Растительные сообщества Урала и их антропогенная деградация. Свердловск, 1984, с. 3-64.

86. Кукушкина Т.А., Высочина Г.И., Карнаухова Н.А., Селютина И.Ю. Содержание мангиферина и суммы ксантонов в растениях некоторых дикорастущих и интродуцированных видов *Hedysarum* (Fabaceae). Растительные ресурсы. 2011; 47 (1): 99–105.

87. Zheng H. et al. Studies on radix *hedysari* (RH) of in the Micang mountains of Wudu, Gansu Province. II. Effects of water extracts of RH roots on the

immune function of organisms. Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban. 1991. Vol.27, no1. P.82–85.

88. Smirnova L.P., Sheychenko V. I., Tokhtabayev G. M. Studying of chemical composition of an alpinarin from leaves of mango. Chemical - Pharm. journal. 2000. Vol.34, no. 2. P. 22-25.

89. Lavrentyev M. V. Antibacterial activity of water Hedysarum grandiflorum Pall. Extracts. Bulletin of medical Internet conferences. – 2013. – Vol.3, no. 2. – P. 379.

90. Kogan E. G., Yelagina E. M., Kisileva A. N. Comparative analysis of anatomical diagnostic signs of a leaf of a kopechnik shrubby (*Hedysarum fruticosum* Pall.) and kopechnik Alpine (*Hedysarum alpinum* L.). Bulletin of the Smolensk state medical academy. 2016. Vol.15, no. 1. P. 88-93.

91. Silver F.K. Ekologo-botanichesky researches of perspective resource species of flora of the North Caucasus. Development, research and marketing of new pharmaceutical production.– Pyatigorsk: Pyatigorsk GFA, 2014. – Issue 69. – P. 77-83.

92. Novikova L. A., Vasyuki V.M., Gorbushin T. V, Saksonov S. V. Family plants bean (*Fabaceae* Lindl.) in the Red List of the Penza region. Samara onions: problems of regional and global ecology. 2013. Vol.22. Issue 3. P. 116-128.

93. Lan Z. et al. Effects of radix hedysari polysaccharides on immunological function and transplanted tumors in mice. Zhongguo Yaoli Xuebao. 1987. Vol.8, no3. P.275–277.

94. Wild-growing useful plants of Russia. Under the editorship of A. L. Budantsev, E. E. Lesiovskaya. – SPb.:izd-in SPHFA, 2001. – 663 p.

95. Huang Z., Cui Z., Ren Y., Zhang J., Cran M. Antiaging effect of Hedysarum polybotrys polysaccharide. Zhongcaoyao. 1992. Vol.23, no 9. P.469-473.

96. Промышленная технология лекарств: учебник в 2-х т. Том 2 / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др.; под ред. проф. В.И. Чуешова. - Харьков, 2002. - 716 с.

97. Asadi Karam, M. R., Kargar, M., Sarvestani, N. N. and Maruf, A. H. (2014). Membranes made of N-benzoyl chitosan with mango peel extract: antibacterial and antioxidant studies. The Scientific World Magazine, 2014.

98. Prakash D., Singh B. N., Upadhyay G. and Singh H. B. (2007). Antioxidant activity of onion phenols (*Allium cepa*) and their ability to remove free radicals. Food Chemistry, 102 (4), 1389-1393.

99. Hegde, S. M., Sirsi, M., and Prasadarao, Y. L. (2014). Evaluation of the antioxidant and antibacterial properties of mango seed extract. American Journal of Advanced Drug Delivery, 2 (1), 108-116.

100. Chen, H., and Song, Z. (2016). Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from mango seeds (*Mangifera indica* L.). Food Science and Biotechnology, 25 (1), 255-260.

101. Sandoval M., Okuhama N. N., Zhang H. J., Condezo L. A., Lao J., Angeles F. M. and Miller M. J. (2008). The anti-inflammatory and antioxidant activity of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) does not depend on their alkaloid content. *Phytomedicine*, 15 (1-2), 20-30.
102. K. Chovanová, F. B. Vanek, J. Šafranek, M. Vaškova, V. Tóth, J. Muchová. Isolation of mangiferin from *Dictamnus albus* as a target compound for beneficial pharmacological effects. *Interdisciplinary Toxicology*. Volume 4, Issue 4, December 2011, Pages 181-187.
103. Sharma, B., Karki, S., Koju, K., & Neupane, S. (2018). Isolation and characterization of mangiferin from the stem bark of *Schoutenia glomerata*: An endangered medicinal plant from Nepal. *Phytochemistry Letters*, 26, 169-173.
104. Khatun, A., Rony, S. R., Sultan, M. Z., Ferdous, J., Saha, P., Islam, M. R., & Parvin, M. S. (2016). Antihyperglycemic activity of *Mangifera indica* Linn. seed kernel in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yaroslavl Pharmaceutical Engineering Bulletin*, 2(2), 6-11.
105. Lei, F., Xing, D., Xiang, L., Zhao, Y., & Wang, W. (2009). Synergistic apoptosis of Hepatocellular carcinoma MHCC97L cells induced by mangiferin combined with traditional chemotherapeutic agents. *Hepatology Research*, 39(9), 961-972.
106. Cui, H. X., Hu, Y. N., Li, J. W., Yuan, K., Guo, Y., Tang, J., ... & Cui, H. S. (2012). Identification of the active compounds and significant anticancer potential of Chinese mango seed kernel extract. *Phytotherapy Research*, 26(6), 876-881.
107. Hung, P. F., Wu, B. T., Chen, H. C., Chen, C. H., & Chen, C. L. (2009). The protective effects of mangiferin on the ischemia reperfusion brain damage. *Neurological Research*, 31(2), 207-214.
108. Gopinath K, Sudhandiran G (2012). Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signaling pathway. *Neuroscience*, 227, 134-143.
109. Hsu, K. C., Chen, Y. F., Lin, P. M., & Shi, T. M. (2013). The reshaping effects of mangiferin on the body's antioxidant defence system in old Wistar rats. *Rechtsmedizin*, 23, 265-276.
110. Uddin, S. J., Grice, I. D., Tiralongo, E., Parra, F., & Holtmann, G. (2009). A mangiferin colloidal formulation provides significant protection against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *European Journal of Pharmacology*, 465(4), 157-163.
111. Dominguez H. A., Montalvo H. G., Morales H. R. (2015). Quantitative determination of xanthenes in *Garcinia mangostana* L. by the method of high-performance liquid chromatography. *Overview of Cuban medicinal plants*, 20 (4), 517-526.
112. Bokal A.M., Rogier V., Lapeyr J., Damia K., Villeneuve P., Maken M., Maken P. (2012). Liquid chromatography–mass spectrometry method for simultaneous determination of xanthenes and glucosidase inhibitors in *Catathelasma*

ventricosum (Berk. & Broome) Sing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 196-204.

113. Wu, T. F., Ding, K. H., Tsai, Y. T., and Chen, J. T. (2019). Quantitative analysis of xanthenes and flavonoids in fruits of *Garcinia mangostana* L. *UHPLC-MS/MS Journal of Food Drug Analysis*, 27 (4), 961-969.

114. Pientchak E., Edynak L., Videlski Y. (2019). Development and validation of the UHPLC-UV method for the quantitative determination of xanthenes in the roots of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.). *Phytochemical analysis*, 30(2), 155-162.

115. Pimenta, J. A., Sena-Filho, J. G., Feitosa, I., Matos, J. R. (2017). Determination of the xanthone content in the extract of the bark of the Brazilian *calophyllum* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 55 (9), 878-884.

116. Guo, Yu., Liu, Yu., Zhang, H., and Liu, Z. (2015). Quantitative determination of xanthenes in *Swertia mussotii* (Kar. and Kir.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1003, 54-61.

117. Arni, P. R., Rivadeneira, M. F., Kass, K. B., Pilau, E. J., and Gonzaga, L. V. (2018). Assessment of xanthone content in the pericarp of *Garcinia mangostana* L. by LC-ESI-MS/MSSJOURNAL of Chromatography B, 1083, 41-47.