

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2006

А. В. Ложкин, Е. И. Саканян

ПРИРОДНЫЕ КУМАРИНЫ: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА (ОБЗОР)

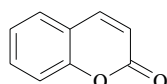
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

С целью усовершенствования методов контроля качества травы донника лекарственного, содержащего в качестве одной из групп действующих веществ кумарины, экстрактов и препаратов на его основе представляет интерес обзор методов выделения и анализа веществ данного класса. Рассмотрены способы выделения и очистки, основные методы анализа производных кумарина и фурукумарина. Среди последних возможно использование гравиметрии, титриметрии, колориметрии, полярографии и более современных УФ-, ИК-спектроскопии, флуориметрии, хроматографии (ГЖХ и ВЭЖХ).

Кумарины представляют собой производные 2Н-1-бензопиран-2-она. Они наиболее широко распространены в семействах *Ariaceae* Lindl., *Rutaceae* Juss., *Fabaceae* Lindl., *Hippocastanaceae* DC [1, 2], при этом место их локализации различно: плоды, подземные органы, кора, листья, стебли и т.д. Количественное содержание кумаринов в растениях колеблется от 0,5 до 2 %, нередко достигая 5 – 6 % [3, 4].

Производные кумарина принято делить на несколько групп:

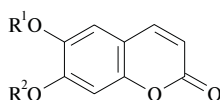
1. Незамещенные кумарины



кумарин

2. Гидрокси-, метокси(алкокси)- и метилendigидроксикумарины и их гликозиды:

2.1. С гидроксильными или алкоксильными группами в бензольном кольце;



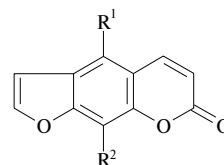
$R^1 = H, R^2 = OH$ умбеллиферон
 $R^1, R^2 = OH$ эскулетин
 $R^1 = OCH_3, R^2 = OH$ скополетин

2.2. С гидроксильными или алкоксильными группами в пирановом кольце (галфордин);

2.3. Алкилированные в бензольном или пирановом кольце гидрокси- или метоксикумарины.

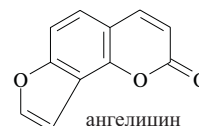
3. Фурукумарины:

3.1. Производные псоралена:



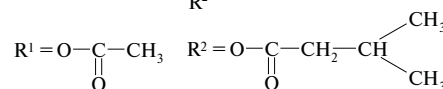
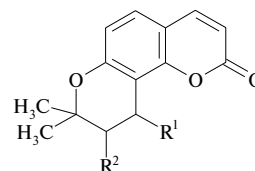
$R^1 = H, R^2 = H$ псорален
 $R^1 = H, R^2 = OCH_3$ ксантотоксин
 $R^1 = OCH_3, R^2 = H$ бергаптен
 $R^1 = OCH_3, R^2 = OCH_3$ изопимпинеллин

3.2. Производные ангелицина:

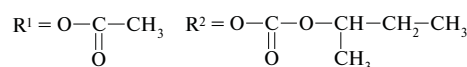


ангелицин

4. Пиранокумарины:

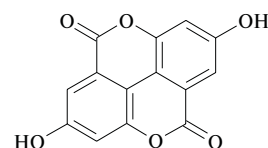


дигидросамидин



виснадин

5. 3,4-бензокумарины:



эллаговая кислота

6. Куместаны: куместрол и др.

7. Другие более сложные соединения, в состав которых входит кумариновая система (новобиоцин, афлатоксин и др.).

Физиологическая роль веществ этого класса до конца не установлена. Известно, что они участвуют в регуляции роста растений, являясь антагонистами ауксинов; поглощают ультрафиолетовые лучи, защищая молодые растения от чрезмерного солнечного облучения [5]; предохраняют растения от вирусных заболеваний [6].

Одним из характерных фармакологических свойств производных кумарина является антикоагулирующее действие [7 – 10], также известны коронарорасширяющие, β -блокирующие и желчегонные свойства кумаринов [11]. Многие фурукумарины обладают фотосенсибилизирующей способностью [3, 7] и спазмолитической активностью. Ряд кумаринов и фурукумаринов проявляют бактериостатические и антимиотозные свойства [1, 3, 7]. У куместрола и родственных ему соединений отмечено выраженное эстрогенное действие. Имеются литературные данные об анти-ВИЧ активности некоторых синтетических и природных производных кумарина [12].

Собственно кумарин (лактон *цис-о*-гидроксикоричной кислоты) широко применяется в парфюмерной промышленности. Установлена его эффективность при некоторых видах лимфедемы [13], почечной карциноме [14] и меланоме [15]. Однако известно, что в экспериментах на печени крыс кумарин проявляет гепатотоксичность, а при длительном применении в высоких дозах сам является канцерогеном [16].

Вместе с тем, для производных кумарина также характерны достаточно серьезные побочные эффекты. В частности, их высокие дозы способны вызывать головную боль, тошноту, рвоту, сонливость, вплоть до поражения печени и массивных кровоизлияний, обусловленных глубокой гипопротромбинемией [9, 17]. Не рекомендуется применение препаратов на их основе лицам, чья профессиональная деятельность связана с повышенной концентрацией внимания. Данное обстоятельство делает обязательной стандартизацию растительных объектов, в состав которых входят кумарины, по содержанию этого класса БАВ. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [18] и Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для человека (ICH) [19, 20] необходимо проводить валидацию испытаний на подлинность, чистоту и количественное содержание действующих веществ, что предполагает использование стандартных образцов.

К числу растительных объектов, содержащих кумарин, следует отнести донник лекарственный (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.). Исследованиями, проводимыми в Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии (СПХФА), установлено наличие у травы донника лекарственного антигипоксической, антиишемической и других видов кардиотропной активности [21 – 23], что явилось основанием для разработки технологии и методов стандартизации сухого экстракта,

таблеток [24 – 26], мази и суппозиторийев [27] на его основе, а также жидкого экстракта травы донника лекарственного и препарата “Флокрамел” [28]. Однако все предложенные методы оценки качества разработанных препаратов (УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ, ТСХ) требуют наличия стандартного образца веществ класса кумаринов [29, 30].

При изучении НД на стандартные образцы, применяемые в РФ для оценки качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фитопрепаратов, установлено, что стандартные образцы на производные собственно кумарина отсутствуют. Существующие стандартные образцы фурукумаринов псоралена, ксантотоксина, фловерина (сумма пиранокумаринов — дигидросамидина и виснадина) неприемлемы для оценки качества лекарственного растительного сырья, содержащего лактон *цис-о*-гидроксикоричной кислоты и его замещенные аналоги.

В связи с этим представляет интерес обзор возможных методов выделения, а также синтеза и последующего анализа данного класса природных веществ с целью разработки адекватных методов получения стандартного образца и использования его для оценки качества ЛРС, фитосубстанций и препаратов, содержащих экстракты травы донника лекарственного.

Кумарины представляют собой бесцветные или окрашенные в желтый цвет кристаллические вещества, хорошо растворимые в органических растворителях — хлороформе, диэтиловом эфире, этиловом спирте, а также в жирах и жирных маслах. При нагревании до 100° С возгоняются.

Методы выделения кумаринов

Для выделения кумаринов из растений обычно применяются различные растворители: этанол, метанол, бензол, хлороформ, диэтиловый и петролейный эфиры или их комбинации [31 – 33]. Наиболее полная экстракция кумаринов (в свободной форме и в форме гликозидов) достигается при использовании спирта этилового различных концентраций, как на холоду, так и при нагревании. Для очистки суммы кумаринов от сопутствующих веществ густой экстракт, полученный после отгонки экстрагента, обрабатывают хлороформом, диэтиловым или петролейным эфиром. При использовании в качестве экстрагента петролейного эфира хорошо извлекается смесь фурукумаринов, которые после концентрирования экстракта можно выделить в кристаллическом состоянии [3]. В ряде случаев дополнительно проводится обработка экстракта активированным углем [34], кипящей водой с последующим сгущением и дальнейшим извлечением гидроксилорированных и метоксилированных кумаринов хлороформом [35], этилацетатом и бутанолом [36], непосредственная обработка сухого остатка смесью хлороформа — этилового спирта (97:3) (для выделения аналогичных производных) [37] или же используется само спиртовое извлечение [32, 38 – 41]. Например, для извлечения суммы 7-гидроксилированных кумаринов из корней *Helianthus annuus* L. предложено проводить последовательную экстракцию ацетоном, смесью

ацетон — метанол (1:1) с последующим освобождением от пигментов в делительной воронке смесью гексан — эфир (6:4) [42]. Иногда целесообразно растительный материал обрабатывать петролейным эфиром, а затем исчерпывающе экстрагировать хлороформом или метанолом [3]. Для выделения пецеданина [43] применяют экстракцию метанолом в аппарате Сокслета, аналогичным способом с использованием последовательной экстракции семян *Angelica archangelica* L. *n*-гексаном, дихлорметаном и метанолом и последующей препаративной ТСХ были выделены шесть производных фурукумарина [44]. Эти же экстрагенты позволяют получить сумму кумаринов и фурукумаринов из растения *Metrodorea flavida* [45]. Для выделения гидрокси-, алкоксикумаринов и их гликозидов из семян *Aesculus hippocastanum* L. применяется экстракция 80 % этиловым спиртом с последующей обработкой горячей водой, фильтрованием и многократным извлечением веществ хлороформом, этилацетатом и бутанолом [46]. Эскулин и фраксин из коры каштана получали путем экстракции из метанола [33]. В гексановых и метанольных извлечениях из побегов *Kielmeyera reticulata* Saad., полученных последовательно, обнаружены 4-фенилкумарины и 4-*n*-пропилкумарины [47].

Для очистки кумаринов от сопутствующих веществ возможно использование метода омыления, подробно описанного в литературе [3, 48]. Основой данного метода является способность лактонного (α -пиронового) кольца раскрываться под действием щелочи с образованием кумаринов — солей *o*-кумариновой кислоты — и вновь замыкаться при последующем подкислении. Существенными недостатками этого метода являются возможность образования вторичных продуктов распада кумаринов, дегидратации и изомеризации некоторых оксикумаринов.

Дальнейшие операции, как правило, направлены на разделение суммы кумаринов и выделение индивидуальных соединений. В ранних исследованиях использовались кристаллизация, фракционная перегонка или сублимация в высоком вакууме [3]. Однако многие кумарины обладают сходной растворимостью в органических растворителях, поэтому даже многократная перекристаллизация не позволяет достичь надежного результата.

Поэтому дальнейшее развитие химии кумаринов привело к использованию для этих целей различных видов хроматографии, лишенных вышеуказанных недостатков.

В этом случае, в первую очередь, проводят колоночную хроматографию с использованием различных сорбентов и систем растворителей.

Так, для разделения гидрокси- и алкоксикумаринов, замещенных в бензольном цикле, предлагается применять колонку, заполненную силикагелем, и проводить последовательное элюирование гексаном, смесью гексан — хлороформ (с увеличением концентрации хлороформа), смесью хлороформ — метанол (9:1; 8:2; 7:3) [35] или смесью хлороформ — этанол (97:3) [37]. В других случаях для этих же целей берут оксид алю-

миния и смесь этилацетат — бензол (2:1) [36] или бензол [40], силикагель и системы: хлороформ — бензол (1:1), хлороформ, хлороформ — этанол (98:2; 99:1; и т.д. до 90:10), бензол — бутанол (4:1; 3:1) [46]. Для разделения 4-фенил, 4-*n*-пропилкумаринов и 4-*n*-пропилпиранокумаринов используют силикагель и элюируют последовательно системами гексан — этилацетат (градиент), метанол — вода — дихлорэтан, гексан — ацетон [47].

Фурукумарины фракционируют на оксиде алюминия (III степень активности) при помощи петролейного эфира, смеси петролейный эфир — хлороформ (2:1), хлороформа, смеси хлороформ — этанол (9:1, 4:1, 2:1), а также на силикагеле — смеси гексан — хлороформ и хлороформ — этанол с постепенным увеличением содержания более гидрофильного компонента [38].

О присутствии кумаринов свидетельствует характерная флуоресценция в УФ-свете отдельных зон сорбента, содержащих эти соединения, или же положительный эффект химических реакций, проводимых с элюатами.

Общие закономерности поведения кумаринов при хроматографировании достаточно хорошо изучены [3, 31, 49, 50]. При этом оказывается справедливым правило, согласно которому при слабом сродстве вещества к сорбенту необходимо использовать активные слои и слабополярные растворители, а при сильном — малоактивные слои и сильнополярные растворители. В частности, кумарины с фенольными или спиртовыми гидроксилами активнее сорбируются на окиси алюминия и элюируются большими объемами полярных растворителей (этанол), иногда с добавлением 0,5 % уксусной или хлористоводородной кислоты; метилированные производные и пиранокумарины слабее удерживаются на сорбенте. В процессе элюирования целесообразно постепенно заменять гидрофобные растворители гидрофильными [3, 51].

Для разделения суммы кумаринов, в том числе при их сочетании с другими низкомолекулярными БАВ, их очистки и анализа в настоящее время предложена колоночная хроматография с использованием сорбентов аффинного типа на основе фенольных и полифенольных лигандов. Рекомендованы эпоксиактивированные сорбенты с матрицей HW-35, содержащей резорциновые и катехиновые лиганды. В качестве подвижной фазы используются вода, водные растворы этанола, минеральных кислот, нейтральных солей и различных их сочетаний. Установлено, что при использовании данных типов сорбентов результаты значительно превосходят те, которые были получены при использовании классических кремнеземных, полиамидных и декстрановых сорбентов [52].

Контроль за эффективностью колоночной хроматографии осуществляется с использованием бумажной (БХ), а чаще — тонкослойной (ТСХ) хроматографии, что позволяет быстро устанавливать однородность исследуемых веществ и обнаруживать даже незначительные их количества. Для ТСХ наиболее часто приме-

няются пластинки Силуфол или Сорбфил [35, 53], иногда используется оксид алюминия II степени активности [41], силикагель [46, 55, 56, 57], а в качестве систем растворителей — смеси бензола и ацетона (1:2), бензола, метанола и ацетона (8:2:10), гексана и хлороформа, толуола и *n*-бутанола (гидрокси- и метоксикумарины) [35, 46], спирта этилового и хлороформа (5,5:4,5), хлороформа и формамида (скополетин) [36, 54], этилацетата и бензола (1:2), диэтилового и петролейного эфира (фурокумарины) [54] и другие.

Наилучшим сорбентом для разделения суммы кумаринов методом ТСХ считается оксид алюминия, при этом в качестве элюентов используют смеси: петролейный эфир — этилацетат (2:1), петролейный эфир — хлороформ, циклогексан — этилацетат (3:1), бензол — этилацетат в различных соотношениях и бензол.

В бумажной хроматографии используются различные марки бумаги [24, 38, 58, 59]. Следует отметить, что ввиду избирательной растворимости кумаринов в водных и неполярных растворителях, применяется метод импрегнирования хроматографической бумаги 20 % водными растворами этиленгликоля или пропиленгликоля, раствором формамида (или диметилформамида) в метаноле или ацетоне, растворами бората или фосфата натрия. В первом случае гидроксилсодержащие кумарины остаются на линии старта, поэтому используется пропитывание бумаги другими растворами [3] или проводится хроматографирование в системе БУВ без импрегнирования бумаги [60].

Детекция кумаринов на хроматограммах чаще всего проводится по флуоресценции в УФ-свете при характерных длинах волн до и после обработки хроматограммы водно-спиртовыми растворами гидроксида калия, параамиака, а также по другим цветным реакциям. Цвет флуоресценции не позволяет с достаточной степенью точности определить структуру кумаринов, но в ряде случаев по нему можно судить о наличии и примерном расположении функциональных группировок [3, 57, 59].

Индивидуальные вещества выделяют с использованием препаративной ТСХ. Идентичность выделенного вещества устанавливают по таким характеристикам, как температура плавления, ИК-, ЯМР- [44, 61] и масс-спектры [51, 62]. ИК-спектры кумаринов имеют характерные полосы поглощения при $1750 - 1700 \text{ см}^{-1}$ ($-\text{C}=\text{O}$ группы) и при $1620 - 1470 \text{ см}^{-1}$ (для $-\text{C}=\text{C}-$ ароматического кольца) [3, 62 - 64]. При исследовании кристаллической структуры синтетических веществ данного класса возможно использование кристаллографического анализа с применением программного обеспечения SHELXL97 [65]. В качестве характеристики кумаринов с боковой цепью, содержащей асимметрические атомы углерода [47, 51], хиральных атомов углерода фуранового цикла замещенного дигидроангелицина и пиранового цикла замещенного келлактона может использоваться величина удельного вращения [44].

Для подтверждения структуры выделенных из растений кумаринов возможно использование встречного

синтеза. Среди методов синтеза следует отметить конденсацию Перкина (из салицилового альдегида и уксусного ангидрида), реакции Пехмана (из фенола и яблочной кислоты или β -кетоксиэфиров), реакцию Кневенагеля (конденсация *o*-гидроксибензальдегидов с эфирами малоновой и других кислот) и другие методы, описанные в [3].

Методы анализа кумаринов

Титриметрический метод количественного определения производных кумарина основан на способности α -пиронового кольца раскрываться под действием щелочи [66], но в настоящее время он практически не используется. Избыток щелочи затем оттитровывают хлороводородной или серной кислотой. В связи с получением заниженных результатов была разработана модифицированная методика с использованием оксида ртути, которая исключает преждевременное замыкание лактонного кольца [67]. Существенным достоинством титриметрического метода является отсутствие потребности в стандартных образцах кумаринов, недостатком — низкая специфичность и токсичность соединений ртути. Тем не менее, эта методика использовалась в нормативной документации на псорален и его лекарственные формы [60].

Одним из вариантов применения лактонной пробы является гравиметрический метод [34, 66]. Несмотря на несомненное достоинство — высокую точность, сравнимую со спектрофотометрическим определением [24], — он не получил широкого применения из-за трудоемкости и длительности.

Имеются литературные данные о применении перманганатометрии при количественном определении кумарина, однако этот метод дает недостаточно точные результаты [66].

Кислотные свойства природных гидроксикумаринов были изучены при помощи метода потенциометрического титрования в воде и некоторых неводных растворителях. Влияние строения кумаринов на характер кривых потенциометрического титрования позволяет использовать последние для установления структуры соединений наряду со спектрами их поглощения [68].

Колориметрические методы количественного определения кумаринов основаны на их способности образовывать с солями диазония устойчивые окрашенные соединения (от слабо-коричневого до вишневого цвета) [3, 32, 60]. Данный метод был применен для анализа кумаринов *Heracleum sp.*, бергаптена в плодах *Pastinaca sativa* L., псоралена в субстанции и лекарственных препаратах [60], атамантина в корнях *Peucedanum oreoselinum* L. (Moench.), ксантотоксина и бергаптена в плодах *Ammi majus* L. и в препарате “Амифурин” [3]. Имеются данные о применении фотоколориметрического метода для количественного определения синтетического антикоагулянта синкумара [69]. Однако необходимо отметить, что реакция азосочетания не является специфичной для кумаринов и их производных (сходные эффекты способны давать фенолы, ароматические амины и флавоноиды). Перед

проведением фотоколориметрии необходима тщательная очистка от сопутствующих веществ. Кроме того, диазопроизводные кумаринов имеют различия в спектрах поглощения, обусловленные спецификой строения исходного вещества [70].

Спектрофотометрический метод основан на способности кумаринов к поглощению в УФ-области спектра. Показано, что основные полосы поглощения в спектрах кумаринов и фурукумаринов обусловлены переходами π -электронов со связанных молекулярных орбиталей на разрыхляющие [48]. Наличие нескольких характерных полос высокой интенсивности в диапазоне 220 – 350 нм позволяет использовать УФ-спектрофотометрию для количественного определения содержания кумаринов. Характерные максимумы поглощения приведены, в частности, в работах отечественных исследователей [3, 62, 63, 64, 69, 71].

Из групповых методов анализа кумаринов УФ-спектрофотометрический метод является наиболее перспективным, т.к. позволяет проводить компонентный анализ на основе различий спектров поглощения, не требует предварительного разделения и относительно прост в аппаратном оформлении. Однако при его применении желательны наличие стандартных образцов, позволяющих более точно, чем в случае использования калибровочных графиков и удельных показателей поглощения, устанавливать содержание целевых компонентов.

Методом УФ-спектрофотометрии установлено, что в спектрах поглощения синтетических антикоагулянтов — дикумарина, фепромарона и синкумара — наблюдаются две характерные полосы в области 280 и 306 нм, первая из которых имеет колебательную природу, а вторая соответствует p - π -сопряжению бензольного и пиридинового циклов [72].

Прямая спектрофотометрия при длине волны 352 нм с использованием рабочего стандартного образца ксантотоксина была предложена для оценки качества препарата “Аммифурин”. Совместное применение ТСХ и спектрофотометрии делает методику более точной. Возможно использование ТСХ на силикагеле КСК₂₅₄ 5/40 в системе петролейный эфир — этилацетат (1:1), после элюирования пятен этиловым спиртом определяется оптическая плотность [32, 73]. Применим аналогичный метод с использованием бумажной хроматографии на бумаге, импрегнированной метанольным раствором формамида в системе растворителей гептан — бензол (4:1). В работе [43] рассмотрена возможность проведения количественного определения пецуданина в растительном сырье и препарате с использованием ТСХ на пластинке с незакрепленным силикагелем в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (1:2). Элюирование пятен осуществляют этанолом. При длине волны 298 нм проводят определение удельного показателя поглощения вещества, который используют для расчета его содержания. Существенным преимуществом применения спектрофотометрии в данном случае стала возможность определения примеси ореозелона,

поглощающего при 345 нм [74]. Количественное содержание птериксина в корнях *Libanotis densiflora* и в препарате “Либоверин” предложено определять по следующей методике: ТСХ на силикагеле КСК в системе n -гексан — бензол — метанол (5:4:1), элюирование пятен этиловым спиртом и измерение оптической плотности элюата при длине волны 322 нм. Расчет проводят по удельному показателю поглощения птериксина.

Хроматоспектрофотометрические методики разработаны также для определения количественного содержания псоралена и суммы фурукумаринов в плодах *Psoralea drupacea* Vge. с использованием стандартных образцов псоралена и ангелицина. С использованием удельного показателя поглощения ксантотоксина возможен и спектрофотометрический метод оценки качества плодов *Pastinaca sativa* L. [32].

Псорален и бергаптен в препарате “Фурален” можно определить количественно, без разделения суммы кумаринов, при длине волны 297,5 нм [43], либо при двух длинах волн [75]. Последний принцип положен в основу анализа листьев *Ficus carica* L., субстанции псоралена и его препаратов [76]. Предложенный метод основан на модификации хроматоспектрофотометрического метода: при 298 нм определяется сумма фурукумаринов, а при 246 и 268 нм, где наблюдается наибольшая разность в интенсивности поглощения — содержание псоралена. Количество бергаптена определяется по разности. В качестве стандартного образца используется псорален.

При помощи УФ-спектрофотометрии возможно также определение молекулярной массы кумаринов и фурукумаринов [75, 77]. УФ-спектры могут быть использованы как один из методов идентификации выделенных из растения кумаринов [44, 48], а также при исследовании их физиологической роли [78]. Описано использование данного метода для оценки биодоступности дикумарола [79].

Полярографический метод применяется для анализа готовых лекарственных форм фурукумаринов и обусловлен их восстановлением на ртутно-капельном электроде в α -пириновом кольце по двойной связи в положении 3,4 [80]. На основании изучения физико-химических свойств природных кумаринов предложены методики качественного, количественного и функционального анализа, которые вошли в фармакопейные статьи на келлин, псорален, виснадин, пастинацин, некоторые виды лекарственного растительного сырья и лекарственные формы. В частности, для контроля качества плодов *Pastinaca sativa* L. были использованы полярографический и хроматополярографический методы с использованием стандартного образца ксантотоксина [32]. При сочетании полярографии и хроматографии изучался химический состав кумаринов ряда растений и природных продуктов [81]. Имеются литературные данные о методике количественного определения кумарина и коричной кислоты, применяемых в качестве стабилизаторов в инъекционном растворе ФиБС [82]. Несомненным достоинством ме-

тогда является возможность быстро и точно анализировать сумму кумаринов без предварительного выделения отдельных компонентов, однако следует учитывать, что из-за высокой чувствительности к электрохимически активным примесям требуется тщательная предварительная подготовка.

В настоящее время для анализа кумаринов метод полярографии практически не используется.

Флуоресцентный анализ

Многие кумарины и фурукумарины проявляют характерную (желтую, зеленую, голубую или фиолетовую) флуоресценцию при УФ-возбуждении в нейтральных спиртовых растворах, в растворах щелочей и концентрированной серной кислоте в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Флуоресценция усиливается в щелочной среде за счет образования хиноидной структуры, в кислой среде флуоресценция менее выражена. По величине стоксового сдвига и максимуму флуоресценции предлагается проводить идентификацию фитохимических препаратов [83]. Для кумаринов и фурукумаринов получены спектры флуоресценции и установлена линейная зависимость ее интенсивности от концентрации, что позволило применить метод флуороденситометрии для количественного определения фурукумаринов псоралена и ангелицина в препарате псорален [84, 85]. Образование флуоресцирующих соединений компонентов препаратов “Аммифурин”, “Бероксан” и “Пастинацин” с насыщенным раствором брома в щелочной среде позволило идентифицировать их на основании одинаковых максимумов возбуждения (380 нм) и флуоресценции (480 нм) [86].

Предложен флуориметрический метод определения количественного содержания фурукумаринов в плодах *Pastinaca sativa* L. при длине волны возбуждения 350 нм и флуоресценции 470 нм. Аналогичная методика приведена и для близкого структурного аналога кумаринов, келлина, в плодах *Ammi visnaga* L. (Lam.) [32].

Также предложен селективный способ количественного определения неодикумарина путем последовательной обработки анализируемой пробы в диметилформамиде раствором аммиака и насыщенным раствором магния хлорида в этом же растворителе [87].

Флуоресценция производных кумарина зависит от концентрации водородных ионов, поэтому данные об изменении окраски и интенсивности флуоресценции в различных пределах рН, а также в зависимости от строения кумаринов могут оказаться необходимыми при использовании флуориметрических методов. В работе [88] изучен характер флуоресценции 98 различных производных кумарина. Количественный анализ с использованием данного метода не получил широкого распространения из-за не всегда проявляющейся линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации.

В литературе имеются данные об использовании 7-(2-бромэтокси)кумарина в качестве флуоресцентной

метки для количественного флуориметрического анализа лекарственных препаратов, содержащих третичный атом азота [89].

Возможно применение флуоресцентной микроскопии для локализации и определения количества гидроксилированных производных кумарина, выполняющих роль фотопротекторов, в зеленых водорослях *Dasycladis vermicularis* (Scopoli) Krasser [5].

Интерес представляет флуоресцентный экспресс-метод обнаружения кумарина в топливе, основанный на реакции его щелочного гидролиза с образованием *o*-кумаринат-ионов и последующим их превращением в *o*-кумарат-ионы, обладающие интенсивной флуоресценцией [90].

Бумажная хроматография чаще всего сочетается с другими физико-химическими методами. Например, после разделения суммы кумаринов на бумаге (петролейный эфир; ДМФА в ацетоне) возможно полярографическое определение суммы фурукумаринов в плодах *Pastinaca sativa* L. и в препарате “Бероксан” [32]. Сочетание бумажной хроматографии с фотоколориметрическим определением на основе реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой используют для анализа фурукумаринов *Psoralea drupacea* Vge. [91], псоралена и бергаптена в листьях *Ficus carica* L. [92]. Этот же метод использован для определения фурукумаринов в некоторых видах зонтичных. К существенным недостаткам БХ относятся длительность проведения анализа и необходимость концентрирования вытяжки из-за малой сорбционной емкости бумаги [60].

Метод **тонкослойной хроматографии** в значительной степени лишен указанных недостатков, т.к. позволяет относительно быстро производить разделение компонентов смеси. Как и БХ, его можно использовать для идентификации кумаринов в исследуемых препаратах.

Имеются данные о колориметрических методах количественного определения пецеданина в корнях *Pezucedanum morrisonii* Bess., основанных на реакции азосочетания, с разделением на тонком слое оксида алюминия в системе гексан — бензол — метанол (5:4:1) [93], и для анализа бероксана, пастинацина и псоралена [31]. Также описано колориметрическое определение ксантотоксина, императорина и бергаптена в *Ammi majus* L. после хроматографирования на силикагеле, импрегнированном формамидом, в системе дибутилового эфира. Предложена методика определения псоралена и суммы псоралена и бергаптена, по отдельности, в листьях *Ficus carica* L. [60]. При этом очищенный от балластных веществ экстракт хроматографируют в тонком слое оксида алюминия в диэтиловом эфире, а затем при помощи УФ-спектрофотометрии устанавливают содержание кумаринов. Имеются литературные данные о возможности использования двумерной хроматографии в слое силикагеля для определения бергаптена в системах гексан — четыреххлористый углерод — *трет*-бутиламин (180:12:9) и гексан — толуол — этилацетат — уксус-

ная кислота (100:10:10:0,5) в сочетании со спектрофлуориметрией.

Последнее десятилетие характеризуется широким использованием ГЖХ и ВЭЖХ для решения задач, связанных с разделением и оценкой качества различных соединений класса кумаринов.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) применяется в основном для идентификации и количественного анализа фурукумаринов в препаратах и растительном сырье. Установлено различие во временах удерживания для замещенных фурукумаринов. Из общих закономерностей следует упомянуть следующие: при переходе от гидроксидов к метоксикумаринам время удерживания уменьшается (снижается возможность сорбции за счет водородных связей), а фурукумарины с О-алкильным заместителем при С5 регистрируются позже, чем 8-гидроксиизомеры. Кроме того, отмечено, что величина десятичного логарифма относительного времени удерживания линейно зависит от молекулярной массы вещества [73]. Полученные данные могут быть использованы при определении структуры или времени удерживания сходных кумаринов [94].

Описано также определение псоберана в субстанции методом ГЖХ [95].

Для анализа корней *Phlojodicarpus sibiricus* и фловерина предлагается ГЖХ методом абсолютной калибровки после экстракции кумаринов хлороформом в сравнении со стандартным образцом фловерина. При этом дигидросамидин и виснадин выходят одним симметричным пиком. Сравнение проводят со стандартным образцом фловерина. Раздельное определение виснадина и дигидросамидина возможно после предварительного переведения солей, образовавшихся при щелочном гидролизе, в свободные кислоты. Кислоты экстрагируют эфиром и хроматографируют [32]. Аналогичный метод применяют для анализа аммифурина и плодов *Ammi majus* L. после экстракции их этиловым спиртом. В качестве внутреннего стандарта используют стандартный образец ксантотоксина [73].

Метод газовой хроматографии также применяется для обнаружения кумарина и его метаболитов в печени животных и человека [96].

Широкое распространение в анализе производных кумарина и фурукумаринов в настоящее время получила **высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)**. Описано одновременное количественное определение методом ВЭЖХ действующих веществ семян *Coronilla varia* L. (кумаринов — скополетина, дафноретина и умбеллиферона и кардиотонических гликозидов) [97]. Влияние метоксалена (ксантотоксина) на метаболизм никотина также проводилось при помощи этого метода [98].

Имеются данные об исследовании содержания кумарина в зависимости от времени заготовки южноамериканского растения *Mikania laevigata*, применяемого метода экстракции и экстрагента [41]. Предложено использовать ВЭЖХ в изократическом режиме для разделения, одновременного качественного и количественного анализа кумаринов коры *Aesculus hippocasta-*

num L. без предварительной очистки [33], для количественной оценки кумарина в листьях *Mikania glomerata* Spreng [57]. Известна методика определения кумаринов с помощью ВЭЖХ в градиентном режиме (флуоресцентный детектор) при изучении биохимических функций кумаринов в корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) [42].

Весьма перспективным методом является сочетание ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Предложены соответствующие методики определения антикоагулянтов непрямого действия [99] и родентицидов кумаринового ряда [100] (производные 4-гидроксикумаринов) в плазме крови в практике токсикологического анализа. Определенный интерес представляет использование хроматомасс-спектрометрии для определения наличия кумарина в табачной продукции [101].

Методы анализа производных кумарина, включенных в зарубежные фармакопеи

Обзор некоторых зарубежных фармакопей, в частности — Американской Фармакопеи 23-го издания, Европейской Фармакопеи 3-го издания (Дополнение 2001 г.) и Британской фармакопеи 16-го издания (1998 г.) показал, что препараты на основе кумаринов сравнительно немногочисленны.

В USP XXIII включены субстанции фурукумаринов метоксалена и триоксалена, производного 4-гидроксикумаринов варфарин-натрия и лекарственные формы на их основе, а также антибиотик новобиоцин, стандартизация которого проводится биологическими методами. Для всех вышеперечисленных веществ приводятся соответствующие стандартные образцы.

Для подтверждения подлинности препаратов используются ИК- и УФ-спектры, ВЭЖХ, ТСХ с использованием стандартных образцов, температура плавления и реакция на ион натрия. Количественное определение указанных препаратов проводится методом ВЭЖХ. Тест “Растворение” для капсул и раствора метоксалена проводится с использованием УФ-спектрофотометрии при длине волны 252 нм [102].

В Британскую Фармакопею 16-го издания [56] включены плоды инжира, содержащие различные замещенные фурукумарины, и три субстанции препаратов — синтетических производных кумарина (аценокумарол-никумалон, варфарин-натрий и варфарин-натрий клатрат).

Идентификацию аценокумарола в субстанции и в таблетках проводят методом ИК-спектроскопии в сравнении со стандартным ИК-спектром. Для анализа таблеток применяют УФ-спектрофотометрию, реакции диазотирования и азосочетания. Испытания по показателю “Родственные соединения” проводят методом ТСХ. Количественное определение субстанции проводят алкалиметрически. Для этих таблеток также применяется УФ-спектрофотометрия при длине волны 306 нм.

При оценке качества плодов инжира определяется содержание экстрактивных веществ, растворимых в воде.

Для контроля качества препаратов варфарина-натрия Британская Фармакопея использует методы Европейской Фармакопеи [103]. Здесь же приводится частная статья на кумарин как реактив (Coumarin R).

Методы анализа кумаринов травы донника лекарственного

Для выделения суммы кумаринов из травы *Melilotus officinalis* (L.) Pall. было предложено использовать экстракцию этиловым спиртом различных концентраций с последующей очисткой хлороформом. Изучение качественного состава кумаринов проводили с использованием различных методов хроматографии — бумажной, тонкослойной и ВЭЖХ, которые позволили установить, что в траве донника лекарственного содержится не менее 6 производных класса кумаринов, среди которых следует отметить наличие 2Н-1-бензопиран-2-она, умбеллиферона, скополетина и других соединений. Анализ качественного состава кумаринов, присутствующих в сухом экстракте, показал, что они представлены четырьмя производными. При этом кумарин является преобладающим как в ЛРС, так и в сухом экстракте [29, 104].

Качественный анализ производных кумарина, содержащихся как в экстракте, так и в лекарственных формах на его основе: в таблетках “Мелилотин”, мази, препарате “Флокрамел” можно проводить, используя для этих целей как химические, так и физико-химические методы.

В качестве химических методов идентификации кумаринов травы *Melilotus officinalis* (L.) Pall. используется общепринятая реакция азосочетания с диазокомпонентом, лактонная проба [4], а также другие цветные реакции. Эти способы могут быть использованы в методах ТСХ и БХ, а также непосредственно путем проведения химических реакций с извлечением.

Качественное определение суммы кумаринов предложено проводить методом ТСХ на пластинках Сорбфил в системе бензол – этилацетат (1:2) с последующей обработкой раствора спиртовым раствором щелочи и свежеприготовленным раствором диазотированной сульфаниловой кислоты. Пятна идентифицируют по величине R_f и желтой окраске. Однако как уже было отмечено, реакция с диазореактивами неспецифична для кумаринов, к тому же значения R_f не всегда воспроизводимы, поэтому целесообразно применение ТСХ со стандартным образцом преобладающих соединений данного класса.

При использовании УФ-спектрофотометрии идентификацию кумаринов проводят по наличию полос поглощения при определенных длинах волн. ВЭЖХ предполагает нахождение параметров удерживания, на основании чего предложен метод одновременного качественного и количественного анализа сухого экстракта и таблеток “Мелилотин”.

Для количественного определения суммы кумаринов в указанном сырье были предложены такие методы, как титриметрия, гравиметрия, фотоколориметрия, УФ-спектрофотометрия и ВЭЖХ [104].

Для оценки содержания кумаринов в траве *Melilotus officinalis* (L.) Pall. может быть также рекомендован УФ-спектрофотометрический метод. Извлечение проводят этиловым спиртом без предварительной очистки. Содержание суммы кумаринов определяют в пересчете на удельный показатель поглощения кумарина при длине волны 275 нм. Для экстрактов донника разработаны спектрофотометрические методики определения содержания суммы кумаринов при длине волны 305 нм с использованием удельного показателя поглощения скополетина [24] и при 330 нм после нагревания со щелочью и реакции со свежеприготовленной диазотированной сульфаниловой кислотой [105].

Для сухого экстракта донника и таблеток “Мелилотин” испытание подлинности может быть совмещено с количественным определением кумаринов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве внутреннего стандарта предложено использовать кумарин. Для идентификации используют хроматографические спектры удерживания в сочетании со значениями относительных оптических плотностей A254/220, A317/254, A317/220 [106].

ЛИТЕРАТУРА

1. А. З. Абышев, Э. М. Агаев, Ю. Б. Керимов, *Химия и фармакология природных кумаринов*, Б.и., Баку (2003), сс. 5 – 8.
2. С. К. Черепанов, *Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР)*, Мир и семья-95, Санкт-Петербург (1995).
3. Г. А. Кузнецова, *Природные кумарины и фурукумарины*, Наука, Ленинград (1967).
4. М. И. Габышев, *Материалы к изучению лекарственной флоры Якутии*, ЯГУ, Якутск (1977), сс. 140 – 152.
5. E. Pérez-Rodríguez, J. Aguilera, and F. L. Figueroa, *J. Exp. Bot.*, **54**(384), 1093 – 1100 (2003).
6. R. H. Goodwin and C. Taves, *Am. J. Bot.*, No. 37, p. 3 (1950).
7. Я. И. Хаджай, *Терпеноиды и кумарины*, Труды Ботан. ин-та им. В. Л. Комарова, серия V, Растительное сырье, № 12, БИН им. В. Л. Комарова, Ленинград (1965), сс. 25 – 30.
8. К. М. Лакин, Т. В. Смирнова, Г. М. Вишнякова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **23**(10), 1212 – 1213 (1989).
9. Н. М. Вавилова, *Гомеопатическая фармакодинамика*, Т. 1, Медицинский центр “Эверест”, Москва (1994), сс. 318 – 321.
10. Ю. Ф. Крылов (ред.), *Регистр лекарственных средств России*, РЛС — Энциклопедия лекарств, ООО “РЛС-2004”, Москва (2003).
11. *Pharmaceutical Substances. Syntheses, Patents, Applications* (4th edition), Vol. 1, Thieme, Stuttgart — New York (2001), pp. 280, 346, 530, 1035.
12. W. Ch. Evans, *Trease and Evans' Pharmacognosy* (14th Edition), Saunders, London — Philadelphia (1996), p. 455.
13. S. Jamal and J. R. Casley-Smith, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, No. 83, 287 – 290 (1989).
14. M. E. Marshall, J. L. Mohler, K. Edmonds, et al., *Cancer Res. Clin. Oncol.*, No. 120, 39 – 42 (1994).
15. M. E. Marshall, K. Butler, J. Cantrell, et al., *J. Cancer Chemoter. Pharmacol.*, No. 24, 65 – 66 (1989).
16. B. D. Carlton, J.-C. Aubrun, and G. S. Simon, *Fund. Appl. Toxicol.*, No. 30, 145 – 151 (1996).
17. Л. В. Пастушенков, Е. Е. Лесяевская, *Растения — антигипоксанты (фитотерапия)*, СПХФИ, Санкт-Петербург (1991), сс. 26 – 27.

18. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations (34th report), Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 885), WHO, Geneva (1999).
19. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Text on Validation of Analytical Procedures (Q2A), (1994).
20. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology (Q2B), (1996).
21. Е. Е. Лесиновская, О. М. Локтева, Н. Ю. Фролова, Б. К. Котовский, Тез. докл. Всеросс. науч. конф. "Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств", Санкт-Петербург (1996), сс. 143 – 144.
22. О. М. Локтева, Тез. докл. Межд. конф. "Фармация в XXI веке: Инновации и традиции", Санкт-Петербург (1999), сс. 174 – 176.
23. О. М. Локтева, Автореф. дис. канд. биол. наук, Санкт-Петербург (1999).
24. И. И. Чемесова, С. Л. Чубарова, Е. И. Саканян и др., Раст. ресурсы, **36**(1), 86 – 91 (2000).
25. Н. А. Громова, Б. К. Котовский, С. А. Минина, Материалы Всеросс. науч. конф. "Химия и технология лекарственных веществ", Санкт-Петербург (1994), сс. 22 – 23.
26. В. М. Косман, И. И. Чемесова, Б. К. Котовский, С. Л. Чубарова, Тез. докл. Межд. конф. "Фармация в XXI веке: Инновации и традиции", Санкт-Петербург (1999), сс. 236 – 237.
27. Л. М. Маркова, Б. К. Котовский, Н. К. Боровская и др., Тез. докл. Межд. конф. "Фармация в XXI веке: Инновации и традиции", Санкт-Петербург (1999), сс. 60 – 61.
28. Н. В. Марченко, Автореф. дис. канд. фарм. наук, Санкт-Петербург (2002).
29. А. В. Ложкин, Б. К. Котовский, Е. И. Саканян, С. Л. Петрова, Материалы Межд. науч.-практ. конф., посв. 85-летию академии, Санкт-Петербург (2004), сс. 286 – 287.
30. А. В. Ложкин, Е. И. Саканян, Л. Ф. Стрелкова и др., Материалы IX Межд. Съезда "Фитофарм 2005" и конф. молодых ученых Европ. Фитохим. Общ-ва "Растение и здоровье", Санкт-Петербург (2005), сс. 264 – 268.
31. В. П. Георгиевский, Г. В. Федорин, Раст. ресурсы, **7**(2), 275 – 279 (1972).
32. В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук, Биологически активные вещества лекарственных растений, Наука СО РАН, Новосибирск (1990), сс. 9 – 11, 14 – 34, 152 – 191.
33. G. Stanić, V. Jurišić, and D. Brkić, *Croat. Chem. Acta*, **72**(4), 827 – 834 (1999).
34. Г. К. Никонов, Автореф. дис. канд. хим. наук, Москва (1964).
35. С. В. Терентьева, Е. А. Краснов, Раст. ресурсы, **39**(1), 55 – 63 (2003).
36. Л. В. Лнгай, А. А. Акопов, С. В. Меньков, Материалы 56-й регион. конф. по фармации, фармакологии и подготовке кадров: сборн. науч. тр., Пятигорск (2001), сс. 30 – 31.
37. А. И. Дергач, А. Г. Котов, С. Н. Комиссаренко и др., Раст. ресурсы, **35**(3), 81 – 85 (1999).
38. А. Л. Шаварда, Т. Ю. Данчул, Л. И. Шагова и др., Раст. ресурсы, **37**(4), 62 – 64 (2001).
39. Н. Ф. Комиссаренко, Химия природ. соедин., № 3, 141 – 144 (1969).
40. Н. Ф. Комиссаренко, Химия природ. соедин., № 3, 624 – 628 (1970).
41. M. W. Biavatti, C. A. Koerich, C. H. Henck, et al., *Z. Naturforsch.*, No. 59c, 197 – 200 (2004).
42. K. Serghini, A. Pérez de Luque, M. Castejón-Muñoz, et al., *J. Exp. Bot.*, **52**(364), 2227 – 2234 (2001).
43. Б. А. Кривут, Автореф. дис. канд. биол. наук, Ташкент (1973).
44. M. Müller, M. Byres, M. Jaspars, et al., *Acta Pharm.*, No. 54, 277 – 285 (2004).
45. A. C. S. Baetas, M. S. P. Arruda, A. H. Müller, and A. C. Arguda, *J. Braz. Chem. Soc.*, **10**(3), 181 – 183 (1999).
46. Н. Ф. Комиссаренко, А. И. Дергач, А. Н. Комиссаренко и др., Раст. ресурсы, **29**(3), 53 – 59 (1994).
47. F. G. Cruz, L. de M. Moreira, N. A. S. Santos, and M. L. S. Guedes, *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(5), 704 – 707 (2002).
48. Г. К. Никонов, М. Е. Перельсон, Лекарственные растения, № 15, 87 – 125 (1969).
49. А. А. Ахрем, А. М. Кузнецова, Тонкослойная хроматография, Наука, Москва (1965), сс. 83 – 84.
50. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии, Мир, Москва (1980), сс. 301 – 621, 430 – 434.
51. J. Kitajima, Ch. Ocamura, T. Ishikawa, and Y. Tanako, *J. Pharm. Sci.*, **88**(12), 1939 – 1940 (1998).
52. В. В. Шкаренда, Автореф. дис. канд. фарм. наук, Санкт-Петербург (1992).
53. Н. А. Тюкавкина, И. А. Руленко, Н. Н. Колесникова, Ю. А. Колесник, Фармация, № 3, 22 – 23 (1997).
54. Г. А. Кузнецова, Л. В. Кузьмина, Раст. ресурсы, **1**(1), 149 – 151 (1965).
55. В. И. Дихтярев, В. Н. Ковалев, Н. Ф. Комиссаренко, Химия природ. соедин., № 2, 258 – 259 (1982).
56. British Pharmacopoeia CD 1998, Version 2.1, © Crown Copyright (1998).
57. R. M. S. Celeghini, J. H. Y. Vilegas, and F. M. Lancas, *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**(6), 706 – 709 (2001).
58. Г. А. Денисова, С. Ш. Керимов, Раст. ресурсы, **2**(2), 182 (1966).
59. Л. И. Кошелева, Г. К. Никонов, М. Г. Пименов, Лекарственные растения, № 15, 140 – 148 (1969).
60. Г. Л. Генкина, Хим.-фарм. журн., **15**(11), 108 – 115 (1981).
61. V. de F. F. Monteiro, L. Mathias, J. C. Vieira Ivo, et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(2), 281 – 287 (2002).
62. В. М. Маликов, А. И. Саидходжаев, Химия природ. соедин., № 2, 250 – 281 (1998).
63. В. М. Маликов, А. И. Саидходжаев, Химия природ. соедин., № 3, 384 – 432 (1998).
64. В. М. Маликов, А. И. Саидходжаев, Химия природ. соедин., № 4, 560 – 593 (1998).
65. R. Krishna, D. Velmuragan, S. Shanmuga Sundara Raj, et al., *Cryst. Res. Technol.*, **36**(11), 1289 – 1294 (2001).
66. В. В. Суворов, Культурная флора СССР, Т. 13, Сельхозгиз, Москва-Ленинград (1950), сс. 345 – 502.
67. Н. А. Валяшко, Э. Г. Бердичевский, Ж. общ. химии, **27**(8), 2302 – 2303 (1957).
68. В. П. Георгиевский, Н. А. Казаринов, М. О. Каррыев, Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения, Ылым, Ашхабад (1976), с. 50.
69. П. П. Луцко, В. В. Михно, И. Г. Постригань, Тез. докл. IV Съезда фармацевтов Укр. ССР, Запорожье (1984), с. 237.
70. М. Г. Пименов, Перечень растений-источников кумариновых соединений, Наука, Ленинград (1971), с. 9.
71. М. Е. Перельсон, Ю. Н. Шейнкер, А. А. Савина, Спектры и строение кумаринов, хромонов и ксантонов, Медицина, Москва (1975), сс. 9 – 35.
72. В. В. Буряк, Н. К. Старчевская, Фармация, № 5, 26 – 31 (1981).
73. А. И. Громакова, Автореферат дис. канд. фарм. наук, Москва (1982).
74. Б. А. Кривут, М. Е. Перельсон, Химия природ. соедин., № 2, 183 – 185 (1970).
75. Б. А. Кривут, М. Е. Перельсон, Химия природ. соедин., № 1, 3 – 6 (1970).
76. Я. И. Эйдлер, Г. Л. Генкина, Т. Т. Шакиров, Химия природ. соедин., № 1, 86 – 87 (1974).
77. М. Е. Перельсон, А. И. Баньковский, А. А. Кирьянов, Химия природ. соедин., № 6, 381 – 383 (1966).
78. V. A. Katz, O. U. Thulke, and U. Conrath, *Plant Physiol.*, No. 117, 1333 – 1339 (1998).
79. C. Thanos, Z. Liw, M. Goddard, et al., *J. Pharm. Sci.*, **92**(8), 1677 – 1689 (2003).
80. Ю. Е. Орлов, Р. В. Пискарева, Химия природ. соедин., № 1, 87 (1974).

81. Ю. Е. Орлов, *Тез. докл. IV Съезда фармацевтов Укр. ССР*, Запорожье (1984), с. 230.
82. Ю. Е. Орлов, Л. Я. Сиренко, *Химия природ. соедин.*, № 5, 717 – 718 (1991).
83. В. П. Георгиевский, *Тез. докл. III Всес. съезда фармацевтов*, Кишинев (1980), с. 242.
84. Г. Ф. Федорин, *Тез. докл. III Всес. съезда фармацевтов*, Кишинев (1980), сс. 242 – 243.
85. Г. Ф. Федорин, *Тез. докл. IV Съезда фармацевтов Укр. ССР*, Запорожье (1984), с. 172.
86. А. А. Хабаров, Н. П. Хабарова, *Тез. докл. III Всес. съезда фармацевтов*, Кишинев (1980), с. 278.
87. А. А. Хабаров, О. А. Григорьев, С. И. Кобелев, *Бюл. изобрет.*, № 46 (1985).
88. R. H. Goodwin and F. Kavanagh, *Arch. Biochem.*, **27**(1), 152 – 173 (1950).
89. А. З. Абышев, В. Г. Климов, С. С. Крылов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **19**(6), 756 – 759 (1985).
90. S. Kurata, N. Aizawa, H. Hirano, and M. Nagai, *Bunseki Kagaku Abstr.*, **52**(3), 187 – 195 (2003).
91. Б. З. Усманов, Н. К. Абубакиров, *Хим.-фарм. журн.*, **1**(5), 42 – 46 (1967).
92. Б. З. Усманов, Н. К. Абубакиров, *Хим.-фарм. журн.*, **1**(5), 295 – 298 (1967).
93. А. В. Ананичев, Д. А. Пакалн, *Мед. пром. СССР*, № 11, 51 – 53 (1966).
94. M. de Freitas Soares, F. Delle Monache, V. E. Fonseca Heinzena, and R. A. Yunes, *J. Braz. Chem. Soc.*, **10**(3), 189 – 196 (1999).
95. Я. И. Эйдлер, Г. Л. Генкина, Т. Т. Шакиров, *Химия природ. соедин.*, № 2, 155 – 156 (1974).
96. S. L. Born, D. Caudill, B. J. Smith, and L. D. Lehmann-McKee-eman, *Tox. Sci.*, No. 58, 23 – 31 (2000).
97. L. Opletal, K. Vockac, V. Hanus, et al., *Folia Pharm. Univ. Carol.*, № 21 – 22, 89 – 94 (1998).
98. W. Zhang, T. Kilicarslan, R. F. Tyndale, and E. M. Sellers, *Drug Metabolism and Disposition*, No. 26, 892 – 902 (2001).
99. M. Kollroser and C. Schober, *Clin. Chem.*, **48**(1), 84 – 91 (2002).
100. T. Grobosch, B. Angelow, D. Lampe, *T + K*, **72**(1), 46 – 55 (2005).
101. M. A. Givel, *Tobacco Control*, No. 12, 401 – 405 (2003).
102. *The Pharmacopoeia of the United States of America*, XXIII Rev. The National Formulary, XVIII Rev., New-York (1995).
103. *European Pharmacopoeia. Third Edition. Supplement 2001*, Council of Europe, Strasbourg (2000).
104. В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(4), 24 – 25 (2004).
105. В. Ю. Мясников, Н. В. Марченко, Е. В. Иванов и др., *Материалы V Межд. Съезда “Актуальн. проблемы создания лек. средств раст. происх.”*, Санкт-Петербург (2001), сс. 336 – 340.
106. В. М. Косман, И. Г. Зенкевич, Н. Ф. Комиссаренко, *Раст. ресурсы*, **33**(3), 32 – 37 (1997).

Поступила 22.11.04

NATURAL COUMARINS: METHODS OF EXTRACTION

A. V. Lozhkin and E. I. Sakanyan

St. Petersburg State Chemo-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, Russia

With a view to optimization of the quality control of sweetclover herbs and the related preparations, which contain coumarins among the active substances, methods used for the isolation and analysis of the compounds of this class — in particular, coumarin and furocoumarin — have been reviewed. The group of recommended analytical techniques includes gravimetric titrimetric, and colorimetric analysis; UV and IR spectroscopy; and chromatography (GC and HPLC).