

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра фармакогнозії та нутриціології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ФІТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ
(*TRIFOLIUM REPENS L.*)»**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи ТПКЗм20(5,5з)-01 спеціальності 226 Фармація, промислова фармація освітньо-професійної програми Технологія парфумерно-косметичних засобів

Дарія СЕМЕНЮК

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри фармакогнозії та нутриціології, к. фарм. н., доцент

Андрій ПОПИК

Рецензент: завідувач кафедри фармацевтичної хімії, д. фарм. н., професор

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена фітохімічному вивченню листя та трави конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Перший розділ кваліфікаційної роботи містить дані літератури щодо ботанічної характеристики, поширення, хімічного складу, застосування у медицині конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*). У другому розділі присвячений результатам визначення кількісного вмісту та якісному складу біологічно активних речовин у сировині, конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Третій розділ кваліфікаційної роботи містить кількісний аналіз показників якості сировини конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Кваліфікаційна робота містить 43 сторінок, 11 таблиць, 61 рисуноків. Список літератури налічує 32 джерела.

Ключові слова: Конюшина повзучої (*Trifolium repens L.*), листя, трава, хімічний склад.

ANNOTATION

The thesis is devoted to the phytochemical study of the leaves and grass of white clover (*Trifolium repens L.*).

The first chapter of the thesis contains literature data on the botanical characteristics, distribution, chemical composition, and medicinal use of white clover (*Trifolium repens L.*). The second chapter is devoted to the results of determining the quantitative content and qualitative composition of biologically active substances in the raw materials of white clover (*Trifolium repens L.*).

The third chapter of the thesis contains a quantitative analysis of the quality indicators of white clover (*Trifolium repens L.*) raw materials.

The thesis contains 43 pages, 11 tables, and 61 figures. The list of references includes 32 sources.

Keywords: white clover (*Trifolium repens L.*), leaves, grass, chemical composition.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ (огляд літератури)	8
1.1 Ботанічний опис конюшини повзучої.....	8
1.2 Хімічний склад конюшини повзучої.....	10
1.3 Фармакологічні властивості конюшини повзучої	14
Висновки до розділу 1	15
РОЗДІЛ 2 ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ СИРОВИНИ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ	16
2.1 Характеристика об'єктів дослідження.....	16
2.2 Визначення органічних кислот	17
2.3 Визначення флавоноїдів	20
2.4 Визначення гідроксикоричних кислот.....	23
2.5 Визначення амінокислот	27
2.6 Визначення антоціанів.....	30
2.7 Визначення полісахаридів.....	31
2.8 Вивчення танінів	33
Висновки до розділу 2	35
РОЗДІЛ 3 ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ СИРОВИНИ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ	36
3.1 Визначення втрати в масі при висушуванні.....	36
3.2 Визначення вмісту загальної золи.....	37
3.3 Визначення вмісту екстрактивних речовин	39
Висновки до розділу 3	42
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини;

ДФУ – Державна фармакопея України;

ЛРС – лікарська рослинна сировина;

ПХ – паперова хроматографія;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

СЗ – стандартний зразок.

ВСТУП

Актуальність теми. У сучасних умовах розвитку фітохімії залишається актуальним напрямком проведення ґрунтового вивчення різних сільськогосподарських рослин, які поширені на території України з метою визначення можливості та перспективності застосування цих рослин у фармацевтичній, медичній та косметологічній практиці та з метою розширення переліку безпечних, препаратів рослинного походження.

До таких рослин належать, зокрема конюшина повзуча (*Trifolium repens L.*), родини *Fabaceae*, яка широко використовується в сільському господарстві та добре адаптована до природно-кліматичних умов України.

З давніх часів рослина використовується у кормовиробництві, озелененні та народній медицині різних країн. В народній медицині рослину використовують як протизапальний, антибактеріальний та спазмолітичний засіб.

Проте рослина на теперішній час є недостатньо дослідженою у хімічному напрямку, і потребує більш поглибленого фітохімічного дослідження сировини для можливості подальшого створення нових безпечних фітозасобів. Тому проведення фітохімічного дослідження сировини конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*) є актуальним завданням сучасної фітохімії.

Мета дослідження. Метою кваліфікаційної роботи було фітохімічне вивчення листя та трави конюшини конюшина повзучої (*Trifolium repens L.*).

Завдання дослідження. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести аналіз різних літературних джерел щодо ботанічної характеристики, поширення, хімічного складу, застосування у медицині конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*);
- дослідити якісний склад БАР листя та трави конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*);

– встановити кількісний вміст БАР у досліджуваній сировині.

Предмет дослідження – вивчення якісного складу та визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин у листях та траві, конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Об’єкт дослідження – фітохімічне вивчення листя та трави, конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Методи дослідження. Використані методи аналізу, інформаційного пошуку літературних джерел. Для вивчення якісного складу біологічно активних речовин використовували хімічні реакції ідентифікації, хроматографію у тонкому шарі сорбенту (ТШХ) та на папері (ПХ). Кількісне визначення БАР проводилося з використанням гравіметричних та спектральних методів. Результати експериментальних досліджень обробляли статистично.

Практичне значення отриманих результатів. У кваліфікаційній роботі наведені результати фітохімічного дослідження листя та трави конюшини повзучої (*Trifolium repens L.*).

Ідентифіковано різні групи БАР у листях та траві конюшини повзучої: амінокислот та гідроксикоричних кислот, органічних кислот, флавоноїдів, антоціанів, танінів, полісахаридів.

Визначено показники якості сировини конюшини червоної повзучої: втрата в масі при висушуванні, вміст золи загальної та золи.

Встановлено кількісний вміст основних груп БАР у листях та траві, конюшини повзучої: антоціанів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, танінів, аміно- та органічних кислот, полісахаридів.

Результати дослідження можуть бути використані в подальшому для стандартизації та розробки методів контролю якості на листя та траву конюшини повзучої.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 43 сторінках, складається із анотації, вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел. Робота проілюстрована 11

таблицями та 61 рисунками. Список використаних джерел налічує 32 джерела.

РОЗДІЛ 1

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ (огляд літератури)

1.1 Ботанічний опис конюшини повзучої

Конюшина повзуча (*Trifolium repens* L.) належить до родини Бобові (*Fabaceae*) і є відомою, цінною сільськогосподарською та медоносною рослиною [1,2,6,7,8].



Рис. 1.1 Зовнішній вигляд конюшини повзучої



Рис.1.2 Зовнішній вигляд
листової пластинки конюшини
повзучої



Рис.1.3 Зовнішній вигляд квіток конюшини
повзучої

Конюшина повзуча (*Trifolium repens* L.) представляє собою багаторічну трав'янисту рослину, що має повзучу форму росту (Рис. 1.1.). Горизонтальні стебла конюшини повзучої ростуть біля поверхні ґрунту та здатні вкорінюватися у вузлах, що дозволяє рослині утворювати щільні килими та стабільний покрив. Така морфологічна особливість конюшини повзучої є однією з маркерних ознак, що дозволяє відрізнити конюшину повзучу від інших видів цього роду, які мають у своїй будові прямостоячі або висхідні стебла [1,24,31].

Листя *Trifolium repens* має трьорхлисту будову (Рис. 1.2)., і складається з трьох листочків, що прикріплені до довгого черешка. Листова пластинка має яйцеподібну або оберненояйцеподібну форму, з гладкими або зубчастими краями. На верхній поверхні листової пластинки присутні бліді або білуваті плями, слід зазначити, що їх кількість може змінюватися залежно від умов навколишнього середовища. Рослина має прилистки, які досить добре розвинені та пливчасті, частково супроводжуються зрощеним з ними черешком, що є характерною діагностичною особливістю роду *Trifolium* [1,25,31].

Суцвіття *Trifolium repens* мають кулясту форму і розташовані на довгих квітконосах, що виростають з пазух листя. Кожне суцвіття *Trifolium repens* складається з дрібних та численних метеликових квіток (Рис. 1.3), Віночок має білий або блідо-рожевий колір і після цвітіння може змінювати його на коричневий. Чашечка має трубчасту будову з п'ятьма зубцями і зберігається після цвітіння, охоплюючи плоди, що розвиваються [1,11,13,25].

Квіти конюшини повзучої (*Trifolium repens*), як правило, ентомофільні і відіграють важливу роль у залученні комах-запилювачів.

Плід конюшини повзучої представляє собою невеликий бобовий плід, зазвичай оточений стійкою чашечкою. Він містить від одного до декількох насінин, які є невеликими і мають ниркоподібну форму. Морфологія насіння є відносно однорідною і вважається додатковою діагностичною ознакою для ідентифікації видів у межах роду *Trifolium*.

1.2 Хімічний склад конюшини повзучої

Конюшина повзуча (*Trifolium repens*) характеризується різноманітним фітохімічним складом БАР [2,8,9,10,14,15]. До складу рослини входять фенольні сполуки, зокрема флавоноїди: 5,6,7,8-тетрагідрокси-4'-метоксифлафон (рис. 1.4), тетрагідрокси-3-метоксифлафон (рис. 1.5), кверцетин (рис. 1.6), мірицетин-3-галактозид (рис. 1.7), ізорамнетин (рис. 1.8), 7,4-дигідроксифлафон (рис. 1.9), 5,6,7,8-пентагідроксифлафон (рис.1.10), 3,5,6,7,8-пентегідрокси-4'-метоксифлафон (рис. 1.11), кемпферол (рис. 1.12), лютеолін-4-О-глюкозид (рис. 1.13), лютеутолін-3',7-диглюкозидолін-3',7-диглюкозид (рис. 1.14), 3,4'-диметоксикемпферол (рис. 1.16), 6-гідроксикемпферол (рис. 1.17), кверцетин-3-О-галактозид (рис. 1.18), 3,7-дигідрокси-4'-метоксифлафон (рис. 1.19), рамнетин (рис. 1.20), геністеїн (рис. 1.21). Окрім того до хімічного складу квіток конюшини повзучої входять гідроксикоричні та оксибензойні кислоти: галова, хінна, протокатехова, хлорогенова, 2,5-дигідроксибензойна, *n*-гідроксибензойна, ванілінова, кавова, *n*-кумарова, ферулова, синапінова, кумарини: репенсин В (7,5'-дигідрокси-3,6'-біокумаринил), репенсин А (7-метокси-7',8'-дигідрокси-8,6'-біокумаринил). Також квітки рослини багаті на ефірну олію, було ідентифіковано 61 компонент, основними складовими є диметилсукцинат (рис. 1.22), метил-2-метоксибензоат (рис. 1.23), метилкаприлат, метилбензоат, метилінолеат, пентакозан, диметил-2-декендіоат, метил-3,5-диметоксибензоат (рис. 1.25), метил-3,4-диметоксибензоат (рис. 1.24). Крім того рослина містить: полісахариди, жирну олію, вітаміни, амінокислоти, каротиноїди та дубильні речовини [12,19,20,21,24,32].

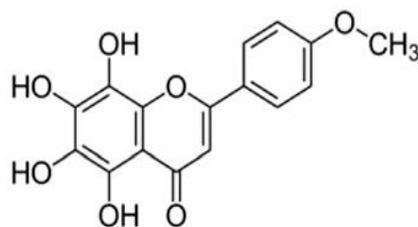


Рис. 1.4 Хімічна формула 5,6,7,8-тетрагідрокси-4'-метоксифлавону

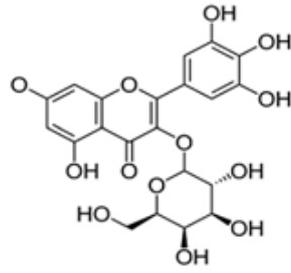


Рис. 1.5 Хімічна формула тетрагідрокси-3-метоксифлавону

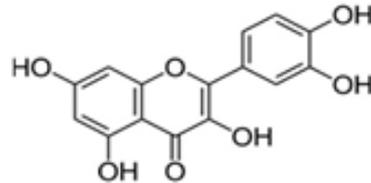


Рис. 1.6 Хімічна формула кверцетину

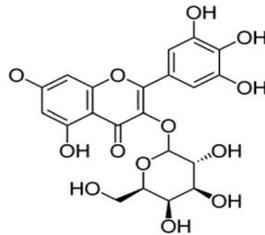


Рис. 1.7 Хімічна формула мірицетин-3-галактозиду

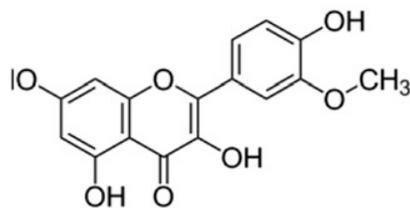


Рис. 1.8 Хімічна формула ізорамнетину

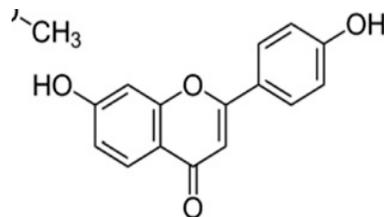


Рис. 1.9 Хімічна формула 7,4-дигідроксифлавону

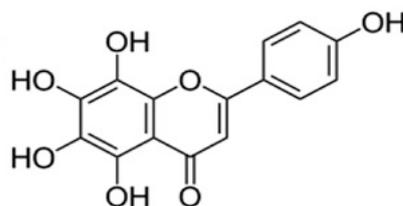


Рис. 1.10. Хімічна формула 5,6,7,8-пентагідроксифлавону

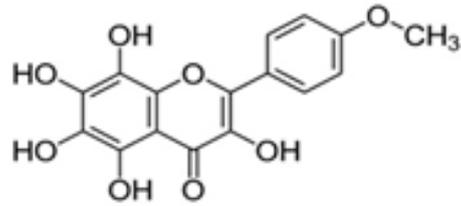


Рис. 1.11 Хімічна формула 3,5,6,7,8-пентегідрокси-4'-метоксифлаво́н

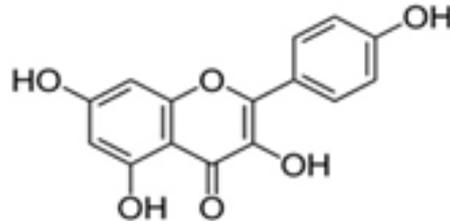


Рис. 1.12 Хімічна формула кемпферолу

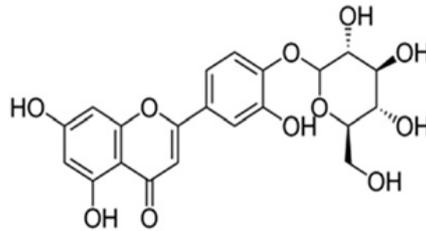


Рис. 1.13 Хімічна формула лютеоліну-4-О-глюкозиду

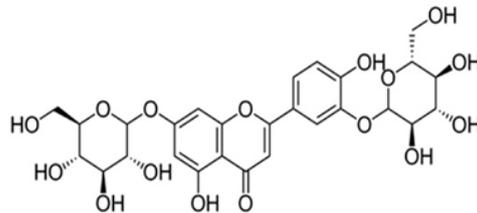


Рис. 1.14 Хімічна формула лютеутеоліну-3',7-диглюкозидоліну-3',7-диглюкозиду

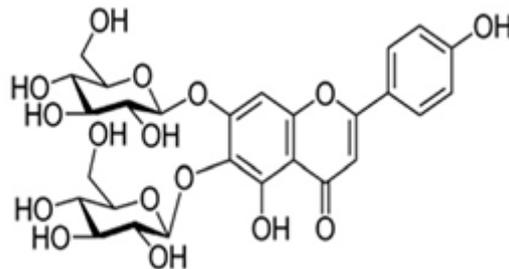


Рис. 1.15 Хімічна формула ізовітексину-7-глюкозиду

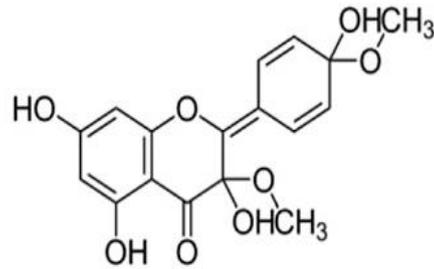


Рис. 1.16 Хімічна формула 3,4'-диметокси кемпферол

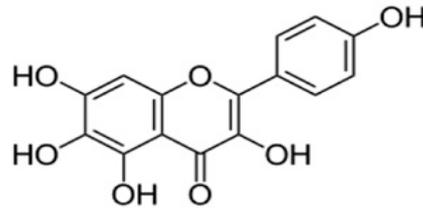


Рис. 1.17 Хімічна формула 6-гідроксикемпферол

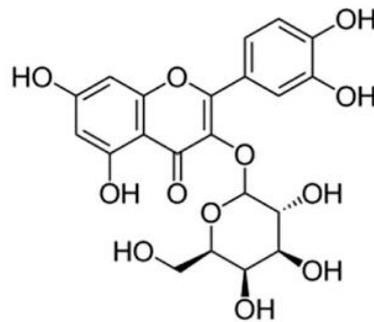


Рис. 1.18 Хімічна формула кверцетин-3-О-галактозиду

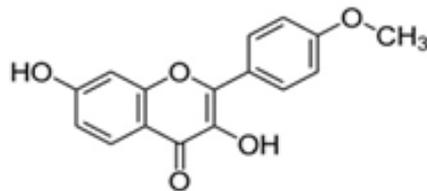


Рис. 1.19 Хімічна формула 3,7-дигідрокси-4'-метоксифлавоноу

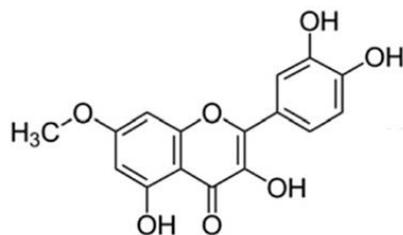


Рис. 1.20 Хімічна формула рамнетину

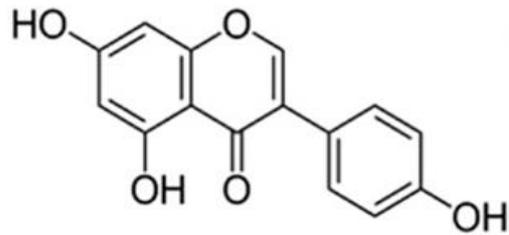


Рис. 1.21 Хімічна формула геністеїну

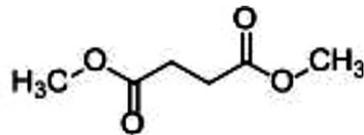


Рис. 1.22 Хімічна формула диметилсукцинату.

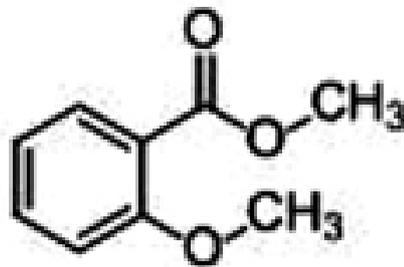


Рис. 1.23 Хімічна формула метил-2-метоксибензоату.

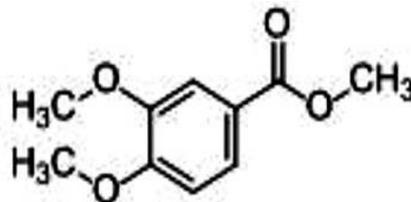


Рис. 1.24 Хімічна формула метил-3,4-диметоксибензоату

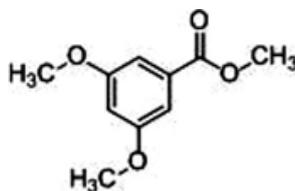


Рис. 1.25 Хімічна формула метил-3,5-диметоксибензоату

1.3 Фармакологічні властивості конюшини повзучої

З давніх часів представники роду *Trifolium* використовуються як цінні кормі та лікувальні рослини в народній медицині різних країн світу

[16,18,26,27,32].

На даний час рослини роду *Trifolium* використовуються як терапевтичні засоби. Завдяки наявності цінних сполук деякі представники роду *Trifolium* та конюшина повзуча використовуються як антисептики, анальгетики, протизапальні та протиракові засоби, а також для лікування ангіогенезу. Проведені наукові дослідження конюшини повзучої підтверджують високий рівень антиоксидантної, протизапальної, антисептичної, знеболюючої, протиревматичної та антимікробної дії рослинних екстрактів а також рослина є потужним інгібітором холінестерази. На теперішній час проводяться експериментальні дослідження гепатопротекторної дії екстрактів рослини [6,7,16,18,22,29].

Висновки до розділу 1

Проведений структурований пошук різних джерел літератури відносно ботанічної характеристики, розповсюдження, хімічного складу та застосування у медицині конюшини повзучої. За результатами аналізу визначено, що конюшина повзуча має значний хімічний та фармакологічний потенціал і може бути перспективним джерелом нових БАР.

Тому актуальним є поглиблене та змістовне фітохімічне дослідження сировини конюшини повзучої, яка поширена на території України.

РОЗДІЛ 2 ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ СИРОВИНИ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ

2.1 Характеристика об'єктів дослідження



Рис. 2.1 Зовнішній вигляд висушеної та подрібненої сировини конюшини повзучої

Для дослідження використовували висушену протягом 3-4 днів, сировину листя та траву конюшини повзучої, що зростала на території Харківської області. Заготівлю сировини проводили під час цвітіння травень-червень 2025 року. Сировину сушили у сушильній шафі при постійній температурі (20-30 °С), постійно помішуючи листя та траву конюшини повзучої. Висушену сировину просіювали та подрібнювали до порошкоподібного стану і використовували для проведення якісного та кількісного аналізу БАР (рис. 2.1).

2.2 Визначення органічних кислот

Вивчення різних органічних кислот у листі та траві конюшини повзучої проводили хроматографічними методами. Рухома фаза – 96 % етанол–хлороформ–аміак концентрований – вода (70:40:20:2). Використовували: в якості СЗ: лимонну, винну, оксалатну, аскорбінову, яблучну кислоти.

Для проявлення органічних кислот на хроматограмах використовували розчин бромтимолового синього та нагрівали у сушильній шафі за температури від 100 – 105 °С. Схема хроматограми наведена на рис. 2.2.

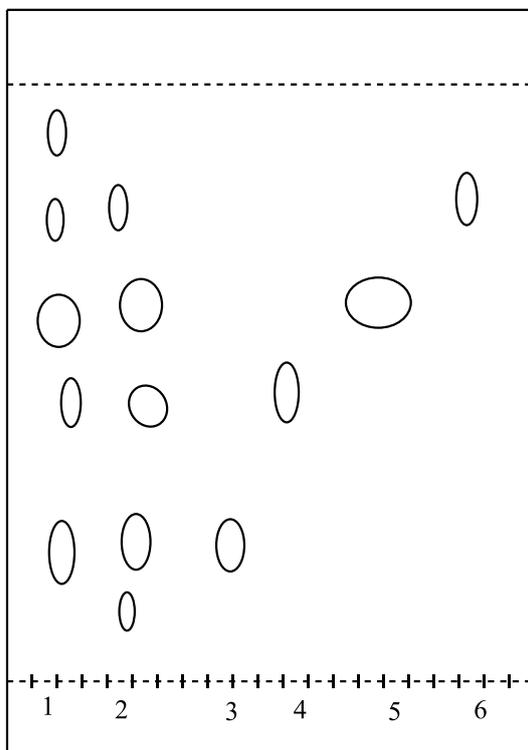


Рис. 2.2 Схема хроматограми виявлення органічних кислот у квітках та листі *Trifolium repens*: 1 – водна витяжка листя конюшини повзучої; 2 – водна витяжка трави конюшини повзучої; 3 – яблучна кислота; 4 – аскорбінова кислота; 5 – лимонна кислота; 6 – щавлева кислота

При аналізі хроматограми (рис. 2.2) в листі та траві конюшини повзучої встановлено наявність яблучної (рис. 2.3), аскорбінової (рис. 2.4), лимонної (рис. 2.5) та щавлева кислоти (рис. 2.6).

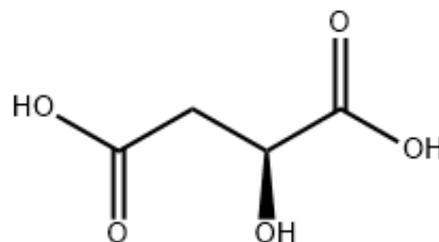


Рис. 2.3 Хімічна формула яблучної кислоти

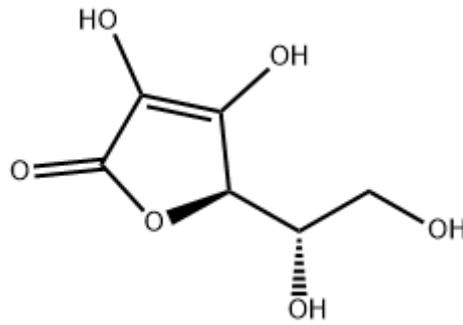


Рис. 2.4 Хімічна формула аскорбінової кислоти

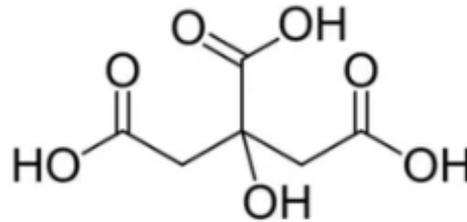


Рис. 2.5 Хімічна формула лимонної кислоти

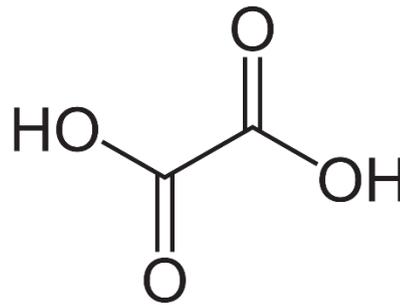


Рис. 2.6 Хімічна формула щавлевої кислоти

За монографією «Шипшини плоди» методом алкаліметричного титрування, за методикою ДФУ 2.0. проводили кількісне визначення вмісту органічних кислот у листі та траві конюшини повзучої [5]. Вміст органічних кислот (X, %) у у листі та траві конюшини повзучої, у перерахунку на яблучну кислоту та суху сировину розраховували за формулою:

$$X = (V \times 0,0067 \times 2500 \times 100) / (m \times (100 - W)),$$

де 0,0067 – кількість кислоти яблучної, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, г;

V – об'єм 0,1 М розчину натрію гідроксиду, витраченого на титрування, мл;

m – маса наважки випробуваної сировини, г;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, % [4].

Результати кількісного визначення органічних кислот у листі та траві конюшини повзучої наведені у табл. 2.1 та рис. 2.7.

Таблиця 2.1

Результати кількісного визначення органічних кислот у конюшини повзучої листі та траві

m	n	X_i	$X_{сер.}$	S^2	$S_{сер.}$	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	ϵ , %
Листя									
5	4	1,40	1,20	0,23257	0,2302	0,95	2,78	1,20±0,08	4,56
		1,51							
		1,49							
		1,23							
		1,05							
Трава									
5	4	2,07	2,14	0,23003	0,2089	0,95	2,78	2,14± 0,10	3,16
		2,12							
		2,05							
		1,93							
		1,84							

Визначено (табл. 2.1), що вміст органічних кислот в листі конюшини повзучої становить 1,20±0,08 %, у траві – 2,14±0,10 %.

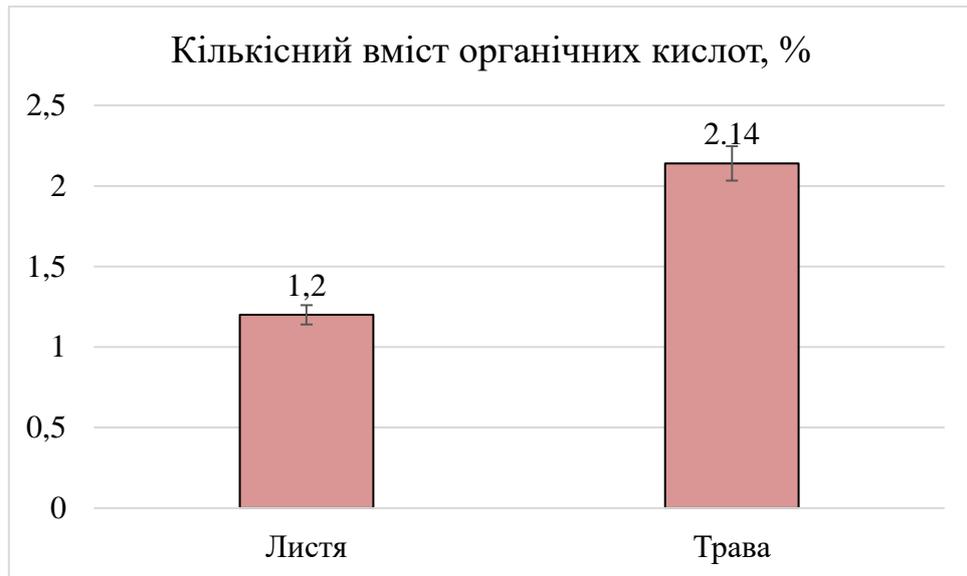


Рис. 2.7 Кількісний вміст органічних кислот у сировині конюшини повзучої

2.3 Визначення флавоноїдів

З метою ідентифікації речовин флавоноїдної природи у листях та траві конюшини повзучої проводили різні якісні реакції (з розчином натрію гідроксиду, з розчином алюмінію хлориду, ціанідинова реакція, реакція Вільсона). Внаслідок проведених хімічних реакцій було підтверджена наявність флавоноїдів в листі та траві конюшини повзучої.

Для більш детального аналізу речовин флавоноїдної структури використовували хроматографію (ТШХ та ПХ, рис. 2.8).

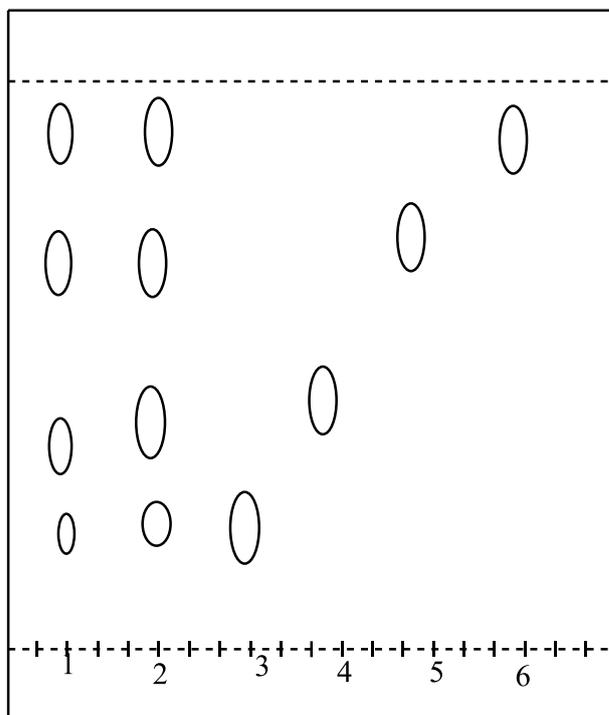


Рис. 2.8 Схема хроматограми виявлення флавоноїдів у листі та траві конюшини повзучої: 1 – 40 % етанольна витяжка листа, 2 – 40 % етанольна витяжка трави конюшини повзучої; 3 – рутин; 4 – кверцетин; 5 – ізорамнетин, 6 – кемпферол.

Рухома фаза: н-бутанол R – ацетатна льодяна кислота R – вода очищена R, у співвідношенні 4:1:2.

Реактив проявлення: 5% етанольний розчин $AlCl_3$.

Одержанні хроматограми висушували та обробляли парами аміаку та 5 % етанольний розчин алюмінію хлориду.

Ідентифікацію проводили порівнюючи значення R_f флавоноїдів випробуваних розчинів та СЗ, і за забарвленням зон адсорбції. За результатами хроматографічного аналізу в листі та траві конюшини повзучої були виявлені кемпферол (рис. 2.9), кверцетин (рис. 2.10), ізорамнетин (рис. 2.11), рутин (рис. 2.12).

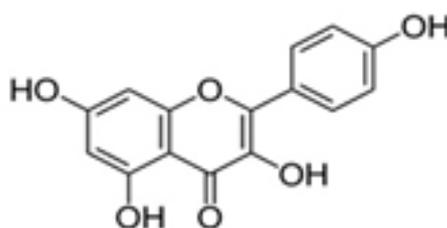


Рис. 2.9 Хімічна формула кемпферолу

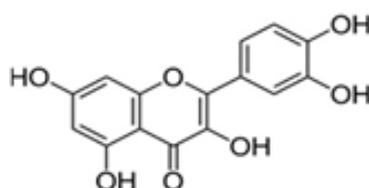


Рис. 2.10 Хімічна формула кверцетину

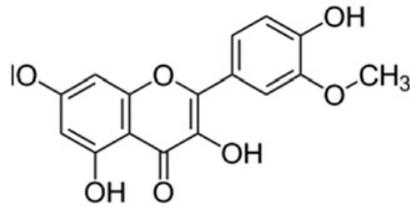


Рис. 2.11 Хімічна формула ізорамнетину

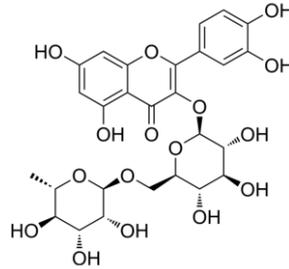


Рис. 2.12 Хімічна формула рутину

За методикою, що наведена у монографії «Софори квітки», за ДФУ 2.0, доповнення 1 у перерахунку на рутин, при довжина хвилі 415 нм. проводили визначення кількісного вмісту флавоноїдів у сировині конюшини повзучої. Результати дослідження наведені у табл. 2.2 та рис. 2.13.

Таблиця 2.2

**Результати кількісного визначення флавоноїдів у конюшини
повзучої листі та траві**

m	n	Xi	Xсер.	S ²	Sсер.	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	ε, %
Листя									
5	4	1,05	1,35	0,08966	0,13390	0,95	2,78	1,35±0,37	2,64
		1,26							
		1,41							
		1,65							
		1,81							
Трава									
5	4	1,08	1,23	0,01450	0,05385	0,95	2,78	1,23±0,15	2,17
		1,16							
		1,22							
		1,30							
		1,39							

Визначено (табл. 2.2), що вміст органічних кислот в листі конюшини повзучої становить $1,35 \pm 0,37$ %, у траві – $1,23 \pm 0,15$ %.

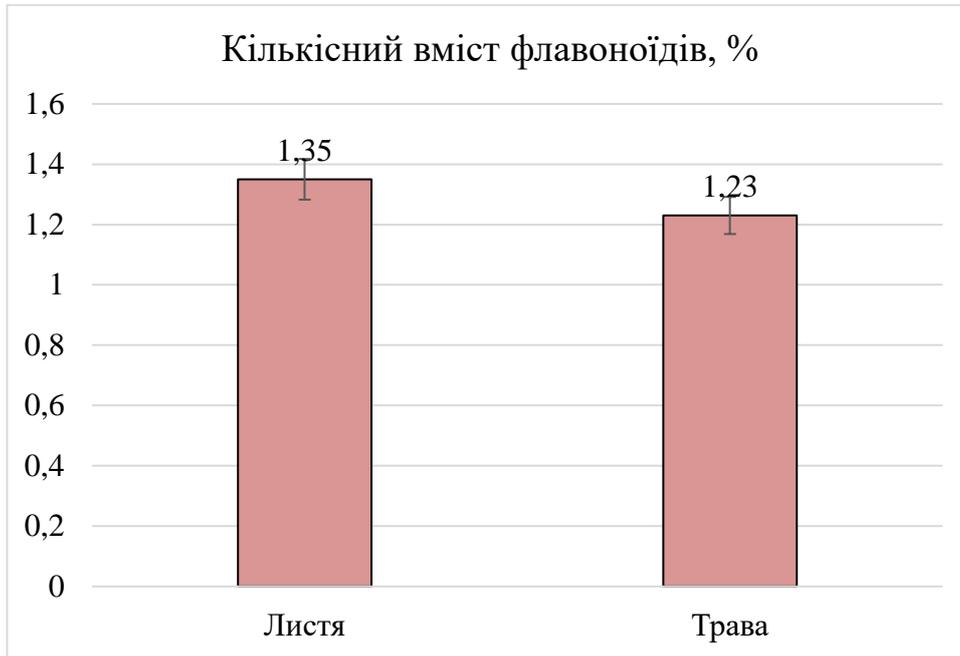


Рис. 2.13 Кількісний вміст флавоноїдів у сировині конюшини повзучої

2.4 Визначення гідроксикоричних кислот

Для виявлення гідроксикоричних кислот використовували водні витяжки листків та трави конюшини повзучої. Для проведення аналізу використовували хроматографію, рухому фазу –15% кислота оцтова та ФСЗ гідроксикоричних кислот. ПХ та ТШХ висушували у витяжній шафі при кімнатній температурі та переглядали в УФ-світлі, використовуючи пари амоніаку а також розчин феруму (III) хлориду для підсилення флуоресценції.

Схема хроматограми виявлення гідроксикоричних кислот у листі та траві конюшини повзучої наведена на рис. 2.14.

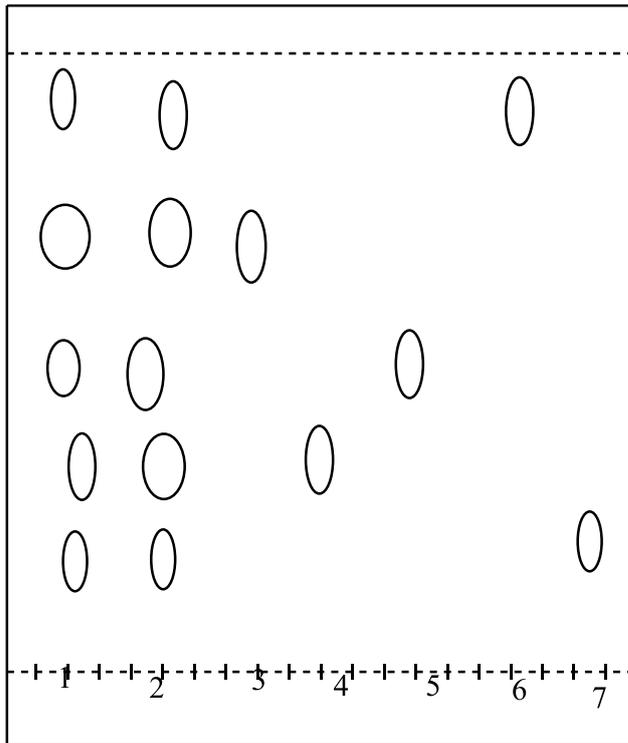


Рис. 2.14 Схема хроматограми гідроксикоричних кислот листя та трави конюшини повзучої: 1 – водний екстракт листя, 2 – водний екстракт трави, 3 – хлорогенова кислота 4 – кофейна кислота, 5 – неохлорогенова кислота, 6, ферулова кислота 7 – *n*-кумарова кислота

За результатами хроматографічного аналізу в листі та траві конюшини повзучої ідентифіковані хлорогенова кислота (рис. 2.15), кофейна кислота (рис. 2.16), неохлорогенова кислота (рис. 2.17), ферулова кислота (рис. 2.18) та *n*-кумарова кислота (рис. 2.19).

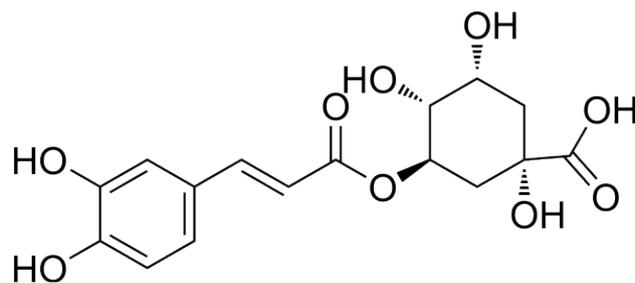


Рис. 2.15 Хімічна формула хлорогенової кислоти

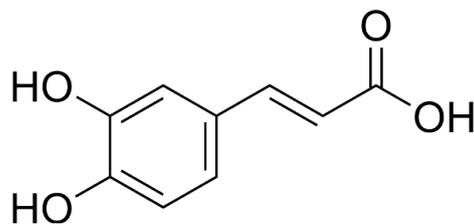


Рис. 2.16 Хімічна формула кофейної кислоти

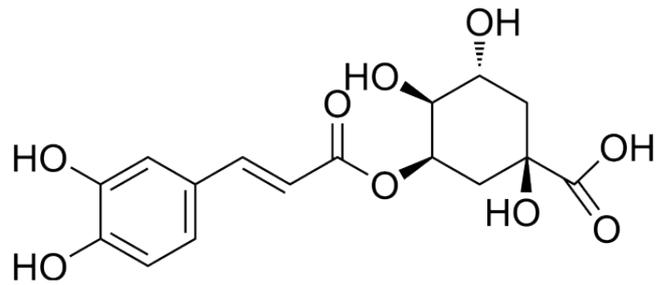


Рис. 2.17 Хімічна формула неохлорогенової кислоти

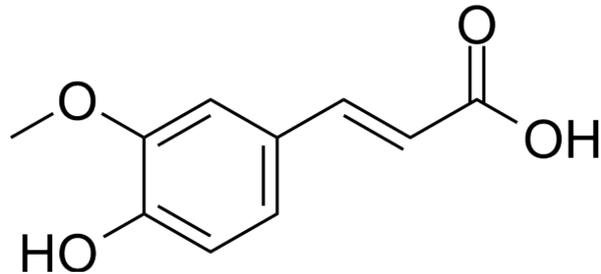
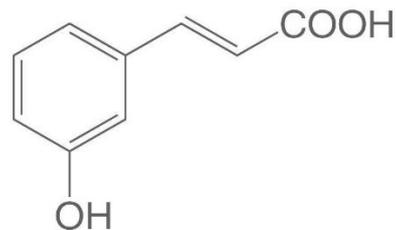


Рис. 2.18 Хімічна формула ферулової кислоти

Рис. 2.19 Хімічна формула *p*-кумарової кислоти

Кількісне визначення вмісту гідроксикоричних кислот в листі та траві конюшини повзучої визначали використовуючи монографію «Кропиви листя^N» за методикою ДФУ 2.0, т. 3 [3]. Кількісний вміст гідроксикоричних кислот у квітках та траві конюшини повзучої (X, %) у перерахунку на хлорогенову кислоту розраховували за формулою:

$$X = (A \times 1000) / (188 \times m),$$

де A – оптична густина випробовуваного розчину при $\lambda = 525$ нм;

m – маса наважки випробовуваної сировини, г [5].

Результати кількісного визначення гідроксикоричних кислот у траві та листі конюшини повзучої наведено в табл. 2.3 та рис. 2.20.

Таблиця 2.3

**Результати кількісного визначення гідроксикоричних кислот у
листі та траві конюшини повзучої**

m	n	X_i	$\bar{X}_{сер.}$	S^2	$S_{сер.}$	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	$\epsilon, \%$
Листя									
5	4	1,20	1,25	0,00122	0,01562	0,95	2,78	1,25±0,04	1,48
		1,23							
		1,25							
		1,27							
		1,29							
Трава									
5	4	1,34	1,70	0,06017	0,10969	0,95	2,78	1,70±0,31	2,92
		1,59							
		1,76							
		1,85							
		1,97							

Визначено (табл. 2.3), що вміст гідроксикоричних кислот в листі конюшини повзучої становить $1,25 \pm 0,04\%$, у траві – $1,70 \pm 0,31\%$.

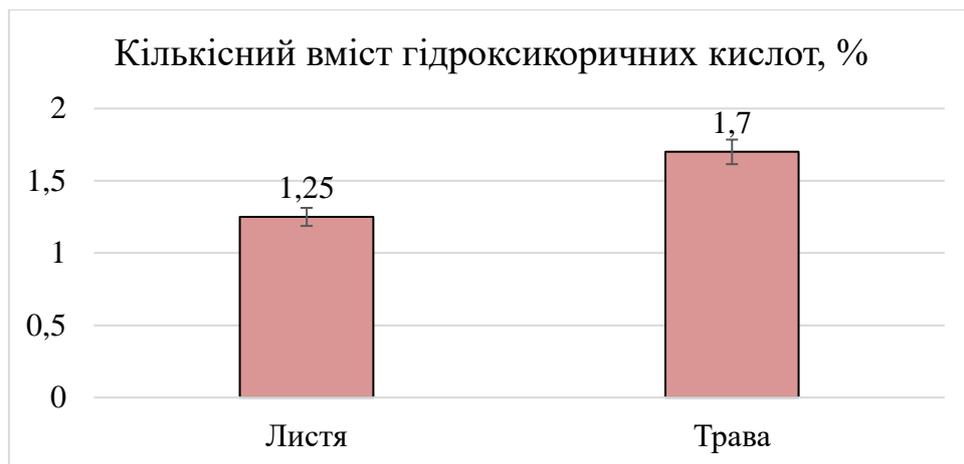


Рис. 2.20 Кількісний вміст гідроксикоричних кислот у сировині конюшини повзучої

2.5 Визначення амінокислот

Попереднє виявлення амінокислот у сировині конюшини повзучої проводили використовуючи 0,2 % розчину нінгідрину (червоно-фіолетове забарвлення).

Виявлення амінокислот у сировині також проводили хроматографічним методом (ПХ, ТШХ). в якості рухомої фази застосовували суміш н-бутанол – кислота оцтова льодяна – вода (4:1:2). Схема хроматографічного аналізу амінокислот у сировині конюшини повзучої наведена на рис. 2.21.

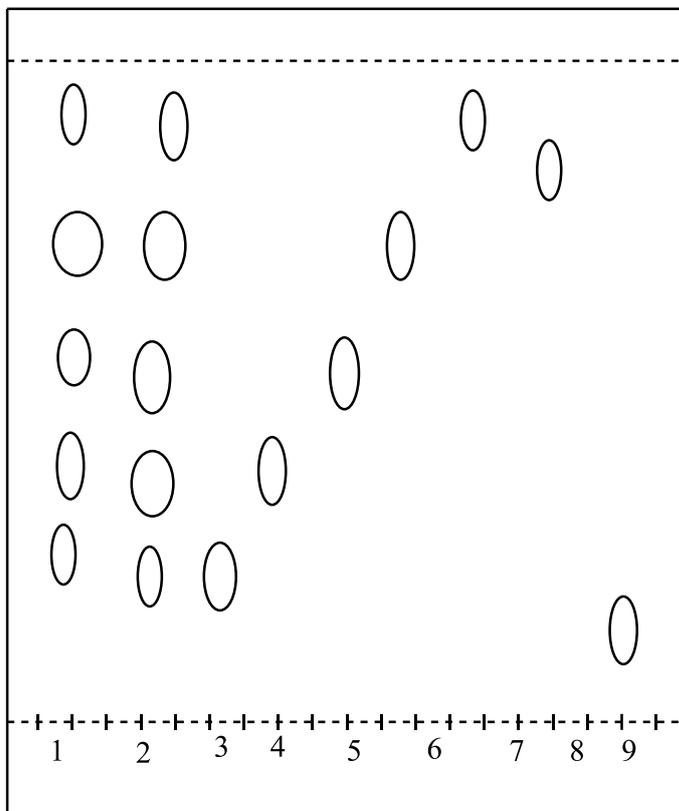


Рис. 2.21 Схема хроматограми виявлення амінокислот у квітках та листі калачиків непомітних: 1 – водна витяжка квіток, 2 – водна витяжка листя; 3 – глютамінова кислота; 4 – аргінін; 5 – валін; 6 – лейцин; 7 – метіонін; 8 – фенілаланін; 9 – треонін

За результатами хроматографічного аналізу, було ідентифіковано 4 амінокислоти у листі та траві конюшини повзучої – аргінін (рис. 2.22), валін (рис. 2.23), глютамінова кислота (рис. 2.24), та лейцин (рис. 2.25).

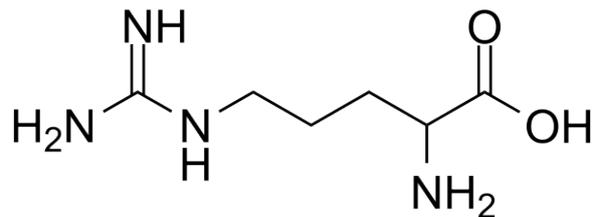


Рис. 2.22 Хімічна формула аргініну

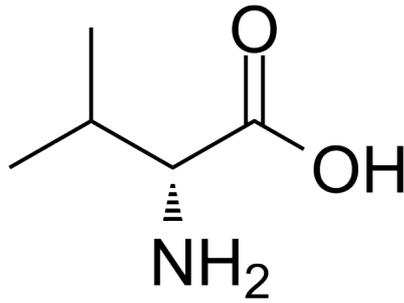


Рис. 2.23 Хімічна формула валіну

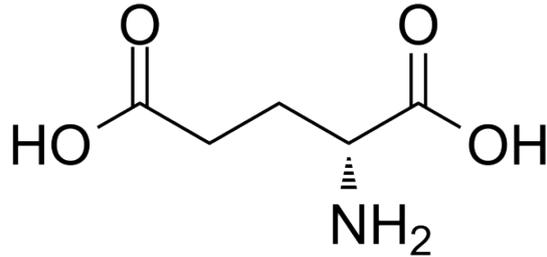


Рис. 2.24 Хімічна формула глутамінової кислоти

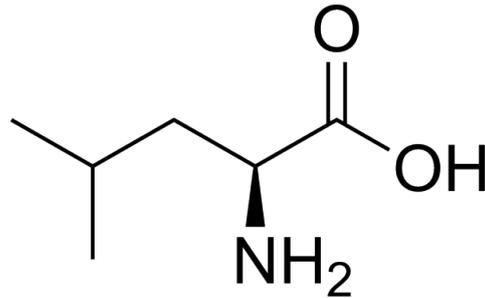


Рис. 2.25 Хімічна формула лейцину

Визначення вмісту амінокислот у сировині конюшини повзучої проводили спектрофотометричним методом.

Вміст амінокислот (X, %) у перерахунку на лейцин і абсолютно суху сировину розраховували за формулою:

$$X = (A \times 50 \times 25 \times 100) / (E_{1\%}^{1\text{cm}} \times m \times 1 \times (100 - W)) ,$$

де :

W – втрата в масі при висушуванні сировини, %;

A – оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 573 нм;

m – маса наважки випробовуваної сировини, г;

$E_{1\%}^{1\text{см}}$ – питомий показник поглинання комплексу лейцину з нінгідрином у спирті ізопропіловому за довжини хвилі 573 нм, який дорівнює 862.

Результати кількісного визначення амінокислот у листях та траві конюшини повзучої наведені у табл. 2.4 та рис. 2.26.

Таблиця 2.4

**Результати кількісного визначення амінокислот у листі та траві
конюшини повзучої**

m	n	X_i	$X_{\text{сер.}}$	S^2	$S_{\text{сер.}}$	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	$\epsilon, \%$
Листя									
5	4	0,34	0,34	0,00055	0,0105	0,95	2,78	0,34±0,02	4,12
		0,35							
		0,36							
		0,37							
		0,34							
Трава									
5	4	1,24	1,14	0,25702	0,2272	0,95	2,78	1,14±0,07	2,54
		1,38							
		1,33							
		1,06							
		0,84							

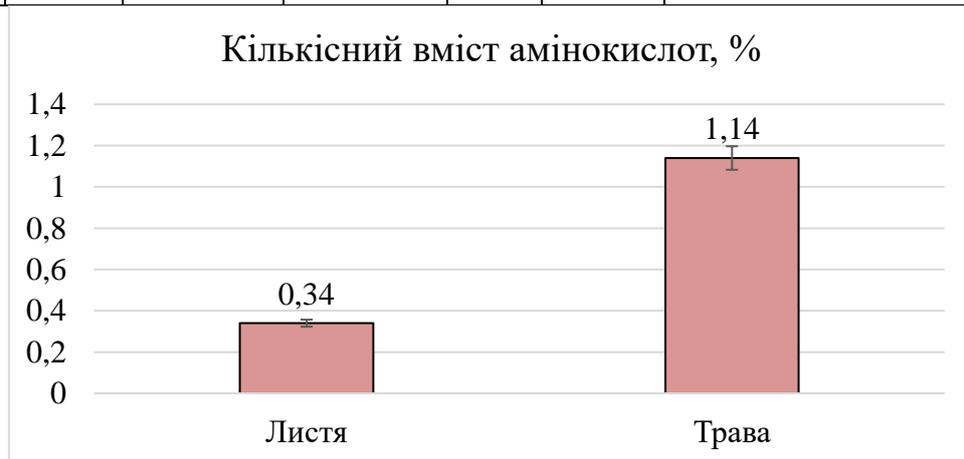


Рис. 2.26 Кількісний вміст амінокислот у сировині конюшини повзучої

Визначено (табл. 2.4), що вміст амінокислот в листі конюшини повзучої становить 0,34±0,02%, у траві – 1,14±0,07 %.

2.6 Визначення антоціанів

За монографією «Чорниці плоди, свіжі», за методикою ДФУ 2.0, т. 3. проводили кількісний аналіз антоціанів у сировині конюшини [3].

Вміст антоціанів (X, %) для сировини конюшини повзучої у перерахунку на ціанідин-3-О-глюкозиду хлорид розраховували за формулою:

$$X = (A * 5000) / (718 * m),$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину при довжини хвилі 528 нм;

m – маса наважки випробовуваної сировини, г.

Результати визначення антоціанів у сировині конюшини повзучої наведені у табл. 2.5 та рис. 2.27.

Таблиця 2.5

Результати кількісного визначення антоціанів у листі та траві конюшини повзучої

m	n	Xi	Xсер.	S ²	Sсер.	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	ε, %
Листя									
5	4	0,17	0,16	0,00079	0,0135	0,95	2,78	0,16±0,01	2,45
		0,18							
		0,19							
		0,14							
		0,15							
Трава									
5	4	0,10	0,08	0,00174	0,0191	0,95	2,78	0,08±0,01	4,20
		0,11							
		0,12							
		0,04							
		0,05							

Визначено (табл. 2.5), що вміст антоціанів у листі конюшини повзучої становить $0,16 \pm 0,01$ %, у траві – $0,08 \pm 0,01$ %.

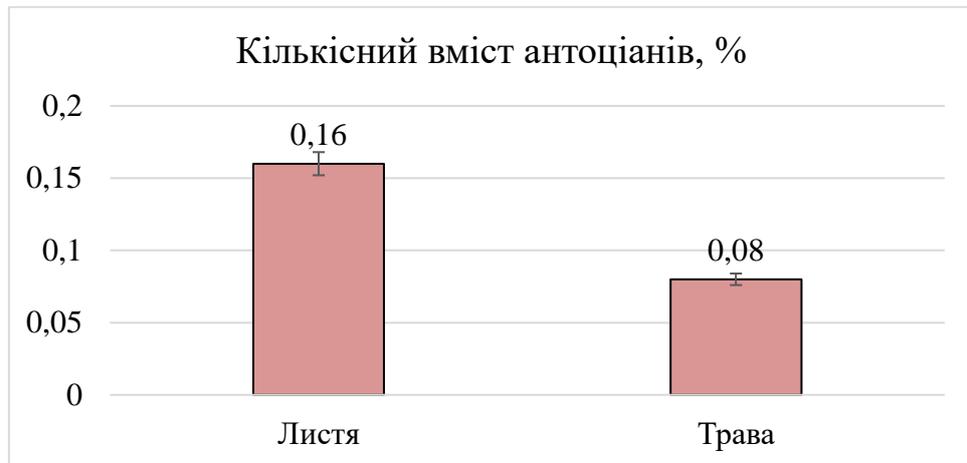


Рис. 2.27 Кількісний вміст антоціанів у сировині конюшини повзучої

2.7 Визначення полісахаридів

Дослідження полісахаридів у листі та траві конюшини повзучої проводили хроматографічним методом. Також наявність полісахаридів у сировині визначалась якісною реакцією з купрум тартратним реактивом, (спостерігали осаді цегельно-червоного кольору).

Схема хроматограми дослідження вуглеводів у листі та траві конюшини повзучої наведена на рис. 2.28.

В результаті хроматографічного аналізу у листі та траві конюшини повзучої були ідентифіковані: глюкоза та галактоза.

Визначення кількісного складу полісахаридів у листі та траві конюшини повзучої проводили гравіметричним методом, за методикою «Подорожника великого листя» наведеною у ДФУ 2.0, т. 3, [5].

Результати кількісного визначення полісахаридів наведені у табл. 2.6 та рис. 2.29.

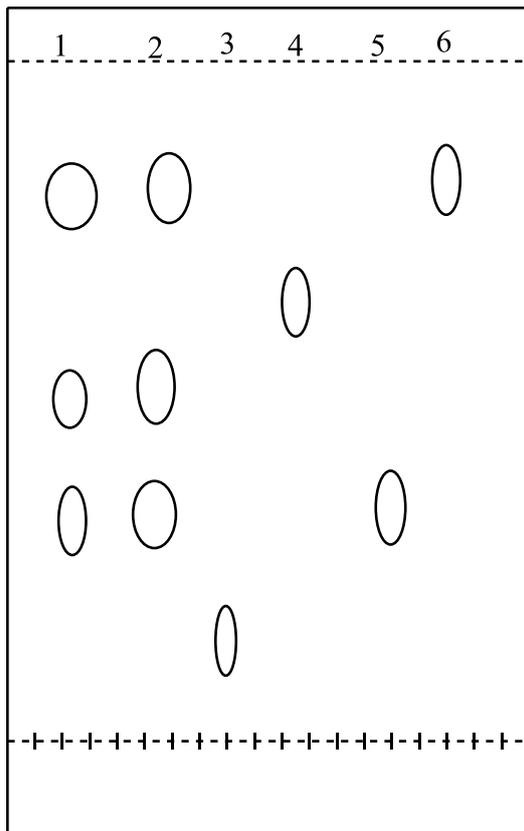


Рис. 2.28 Схема хроматограми дослідження полісахаридного складу сировини конюшини повзучої: 1 – водна витяжка листя; 2 – водна витяжка трави; 3 – арабіноза; 4 – маноза; 5 – глюкоза, 6 – галактоза

Рухомо фаза: ацетон-бутанол-вода у співвідношенні (7:2:1).

Спосіб хроматографування: низхідний.

Реактив проявлення: анілінфталат.

Таблиця 2.6

Результати кількісного визначення полісахаридів у листі та траві конюшини повзучої

m	n	X_i	$X_{\text{ср.}}$	S^2	$S_{\text{ср.}}$	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	ϵ , %
Листя									
5	4	3,60	3,66	0,00198	0,01994	0,95	2,78	3,66±0,26	1,50
		3,63							
		3,66							
		3,70							
		3,72							
Трава									
5	4	7,80	8,51	0,405030	0,28462	0,95	2,78	8,51±0,79	2,30
		8,06							
		8,35							
		8,93							
		9,37							

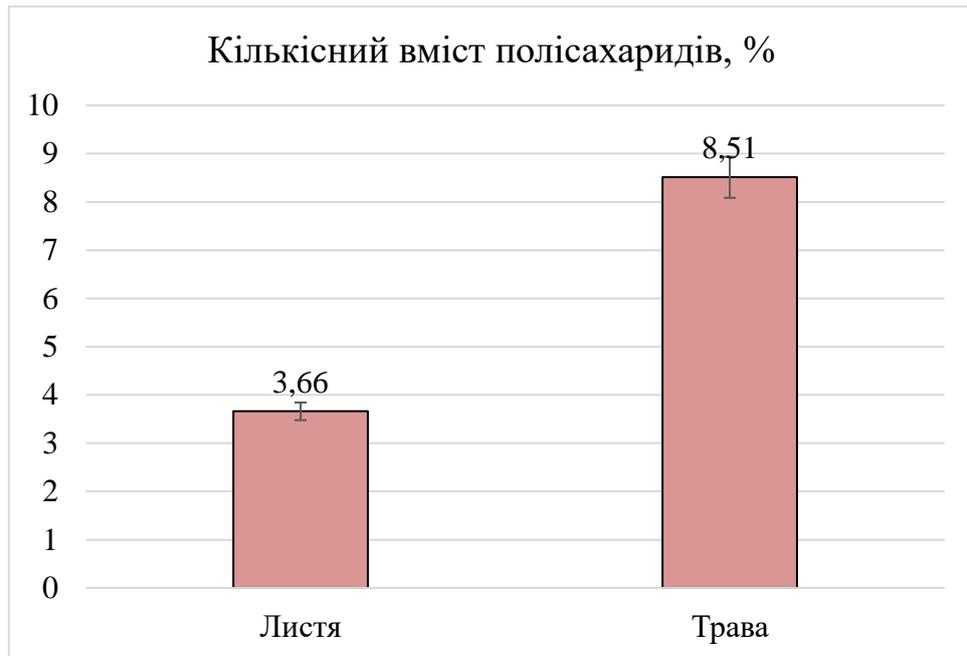


Рис. 2.29 Кількісний вміст полісахаридів у сировині конюшини повзучої

2.8 Вивчення танінів

Наявність танінів в досліджуваній сировині виявляли різними якісними реакціями (1 % етанольним розчином феруму (III) хлориду, розчин хініну хлориду, розчином желатини). Проведені реакції підтверджують наявність танінів у листі та траві конюшини повзучої.

Кількісний вміст танінів у листі та траві конюшини повзучої визначали за методикою ДФУ спектрофотометричним методом за довжини хвилі 760 нм у перерахунку на пірогалол. Результати дослідження наведено у табл. 2.7 та рис. 2.30.

**Результати кількісного визначення танінів у листі та траві
конюшини повзучої**

m	n	X_i	\bar{X}	S^2	$S_{\text{сер.}}$	P	t (P,n)	Довірчий інтервал	ϵ , %
Листя									
5	4	1,08	1,23	0,01450	0,05385	0,95	2,78	1,23±0,15	2,17
		1,16							
		1,22							
		1,30							
		1,39							
Трава									
5	4	1,30	1,69	0,06017	0,10970	0,95	2,78	1,69±0,28	2,90
		1,60							
		1,75							
		1,84							
		1,96							

Визначено, що вміст танінів у листі конюшини повзучої становить $1,23 \pm 0,15$ %, у траві $1,69 \pm 0,28$ %.



Рис. 2.30 Кількісний вміст танінів у сировині конюшини повзучої

На рис. 2.31 наведений вміст досліджуваних БАР у листі та траві конюшини повзучої.

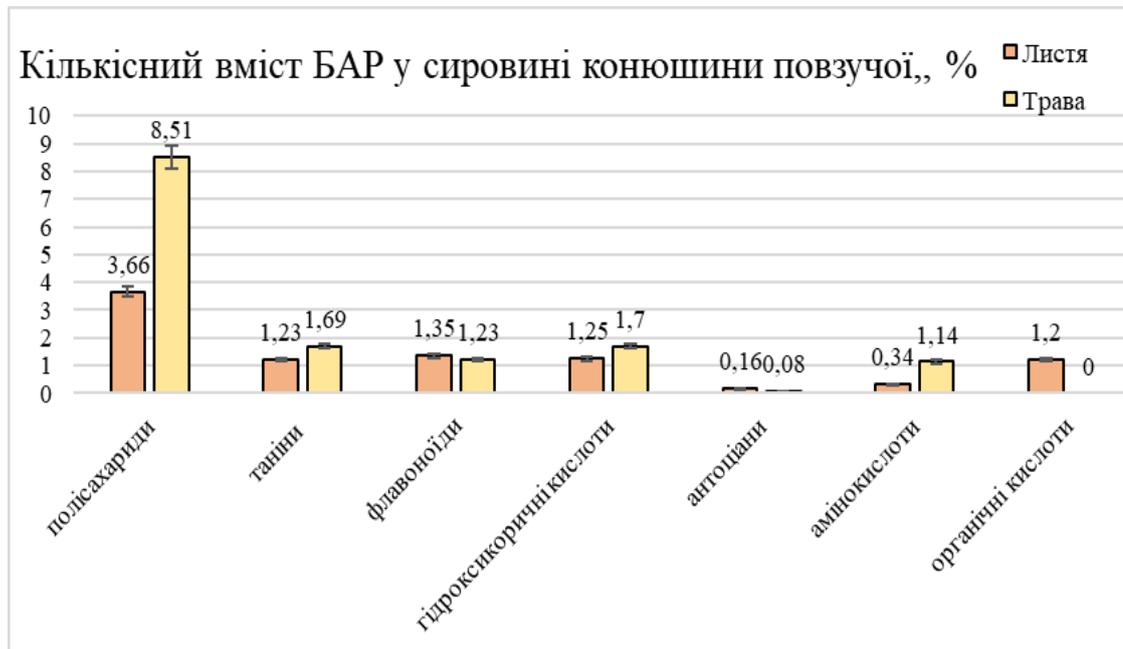


Рис. 2.31 Загальний вміст різних БАР, у сировині конюшини повзучої

Висновки до розділу 2

1. З використання хімічних реакцій у траві та листях конюшини повзучої були ідентифіковані полісахариди, амінокислоти, флавоноїди, таніни.
2. Проведене хроматографічне дослідження сировини конюшини повзучої, були ідентифіковані методом ТШХ та ПХ: флавоноїди, органічні, гідроксикоричні та амінокислоти, полісахариди.
3. Визначено кількісний вміст основних груп БАР у листях та траві конюшини повзучої: полісахаридів, антоціанів, флавоноїдів, танінів, органічних, гідроксикоричних та амінокислот.

РОЗДІЛ 3 ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ СИРОВИНИ КОНЮШИНИ ПОВЗУЧОЇ

3.1 Визначення втрати в масі при висушуванні

Втрату в масі при висушуванні у сировині конюшини повзучої визначали за методикою монографії ДФУ 2.0, тому 1, «Втрата в масі при висушуванні» [5]. Використовували за методикою гравіметричний метод. Розрахунок показників вологості проводили за формулою (X, %):

$$X = \frac{(m - m_1) \times 100}{m},$$

де:

m – маса сировини до висушування, г;

m₁ – маса сировини після висушування, г.

Результати дослідження втрати в масі при висушуванні у сировині конюшини повзучої наведені у табл. 3.1 та на рис 3.1.

Таблиця 3.1

Визначення втрати в масі при висушуванні у сировині конюшини повзучої

m	n	X _i	X _{сер}	S ²	S _{сер}	P	t(P, n)	Довірчий інтервал	ε _{сер} , %
Листя									
5	4	9,05	9,61	0,21843	0,20901	0,95	2,78	9,61±0,58	3,04
		9,27							
		9,63							
		9,92							
		10,20							

m	n	X_i	$X_{\text{сер}}$	S^2	$S_{\text{сер}}$	P	t(P, n)	Довірчий інтервал	$\varepsilon_{\text{сер}}$, %
Трава									
5	4	7,12	7,47	0,08425	0,12981	0,95	2,78	7,47±0,36	2,83
		7,26							
		7,49							
		7,63							
		7,85							

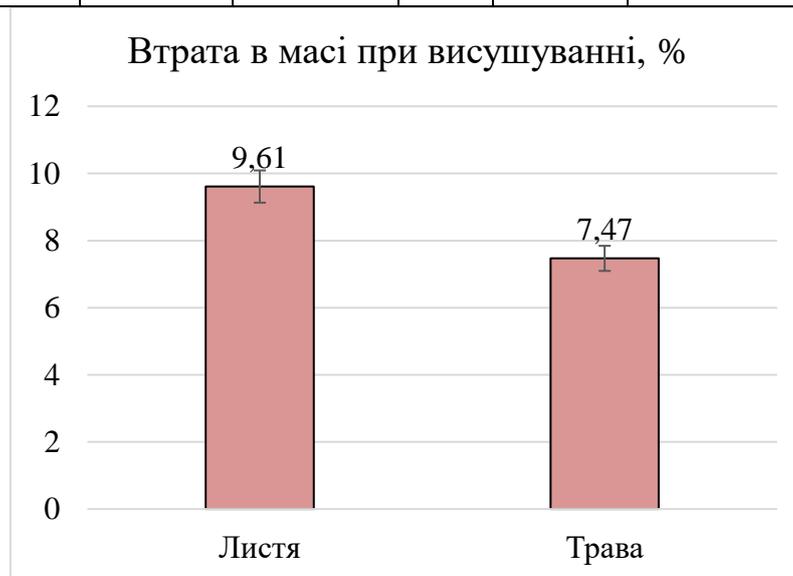


Рис. 3.1 Втрата в масі при висушуванні у сировині конюшини повзучої

В результаті проведеного дослідження Втрата в масі при висушуванні для листя конюшини повзучої становила $9,61 \pm 0,58$ %, а для трави – $7,47 \pm 0,36$ %.

3.2 Визначення вмісту загальної золи

Кількісне дослідження вмісту золи загальної проводили за методикою наведеною у монографії «Зола загальна» ДФУ 2.0, том 1, [4]. Для дослідження був використаний гравіметричний метод.

Розрахунок вмісту золи загальної у сировині конюшини повзучої проводили за формулою (X, %):

$$X = \frac{m \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)},$$

де:

m – маса золи, г;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

m_1 – маса наважки випробовуваної сировини, г;

Результати проведеного дослідження сировини конюшини повзучої представлені в табл. 3.2 і на рис. 3.2.

Таблиця 3.2

Визначення вмісту золи загальної у сировині конюшини повзучої

m	n	X_i	$X_{\text{сеп}}$	S^2	$S_{\text{сеп}}$	P	$t(P, n)$	Довірчий інтервал	$\varepsilon_{\text{сеп}}, \%$
Листя									
5	4	8,94	8,92	0,20344	0,2020	0,95	2,78	7,93 ± 0,39	2,98
		8,97							
		8,95							
		8,93							
		8,89							
Трава									
5	4	6,94	6,92	0,20454	0,2019	0,95	2,78	6,92 ± 0,40	3,10
		6,97							
		6,96							
		6,93							
		6,90							

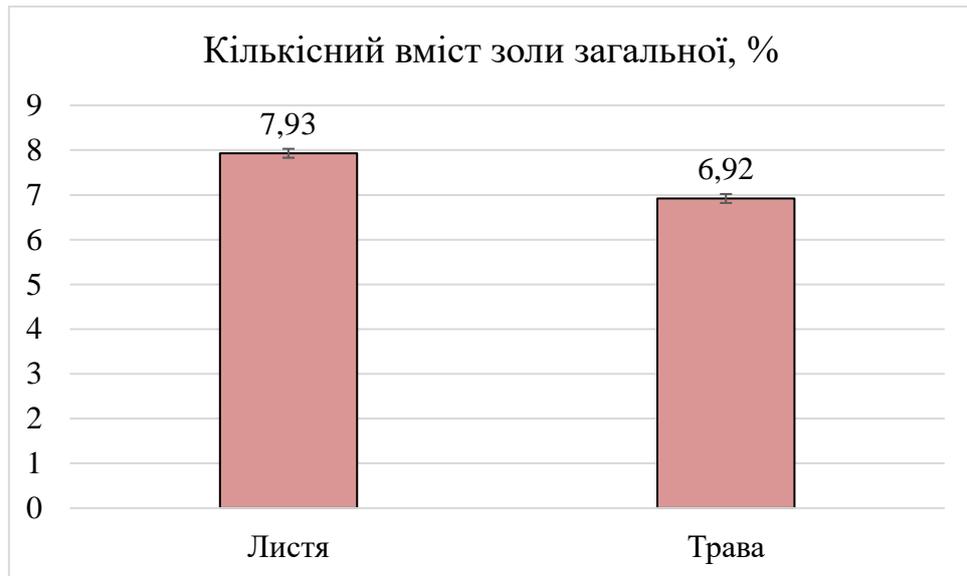


Рис. 3.2 Вміст золи загальної у конюшини повзучої сировині

Результати проведеного дослідження свідчать, що вміст золи загальної у листях конюшини повзучої складає $7,93 \pm 0,39\%$, а у траві – $6,92 \pm 0,40\%$.

3.3 Визначення вмісту екстрактивних речовин

За методикою, що наведена у монографії «Полин гіркий» ДФУ 2.0, том 3, проводили визначення екстрактивних речовин у сировині конюшини повзучої [5]. Для цього був застосований гравіметричний метод. Як екстрагент використовували воду очищену, та етанол 40 % та 70 %.

Розрахунок екстрактивних речовин у сировині конюшини повзучої проводили за формулою (X, %):

$$X = \frac{m \times 200 \times 100}{m_1 \times (100 - W)},$$

де:

m_1 – маса наважки випробовуваної сировини, г;

m – маса сухого залишку, г;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

Результати проведеного експерименту наведені у табл. 3.3-3.4 і на рис. 3.3-3.4.

Таблиця 3.3

Визначення вмісту екстрактивних речовин у листі конюшини повзучої

m	n	X_i	$X_{\text{ср}}$	S^2	$S_{\text{ср}}$	P	t(P, n)	Довірчий інтервал	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
Вода очищена									
5	4	16,52	16,50	0,20280	0,2025	0,95	2,78	16,50±0,88	3,28
		16,54							
		16,53							
		16,51							
		16,50							
40 % етанол									
5	4	25,34	25,32	0,20170	0,2014	0,95	2,78	25,32±1,32	3,11
		25,33							
		25,34							
		25,35							
		25,32							
70 % етанол									
5	4	22,14	22,13	0,20270	0,2004	0,95	2,78	22,13	±
		22,13							
		22,15							
		22,12							
		22,16							

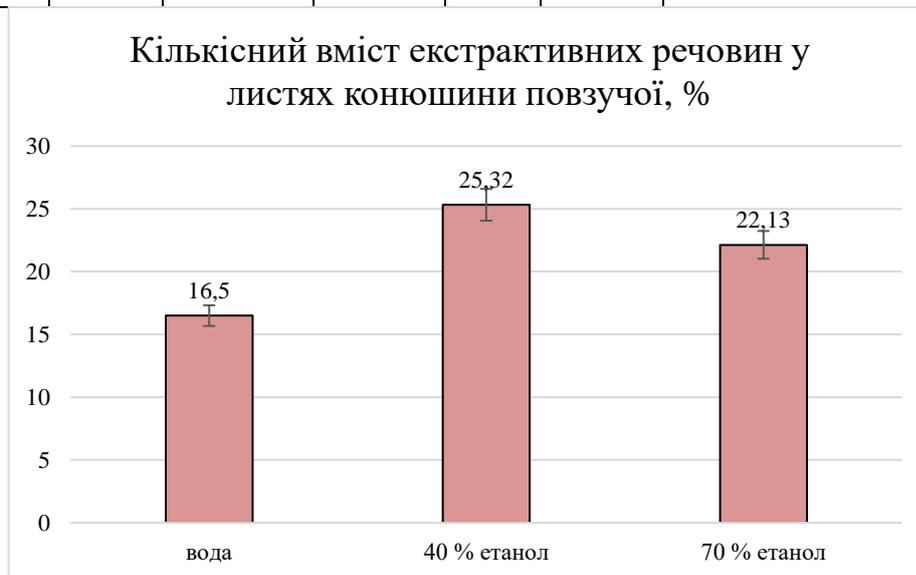


Рис. 3.3 Вміст екстрактивних речовин у листі конюшини повзучої

Таблиця 3.4

Визначення вмісту екстрактивних речовин у траві конюшини повзучої

m	n	X_i	$X_{\text{ср}}$	S^2	$S_{\text{ср}}$	P	t(P, n)	Довірчий інтервал	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
Вода очищена									
5	4	20,54	20,53	0,20263	0,2014	0,95	2,78	20,53±1,04	2,50
		20,53							
		20,52							
		20,56							
		20,53							
40 % етанол									
5	4	23,99	23,96	0,20261	0,2013	0,95	2,78	23,96±1,35	2,33
		23,97							
		23,98							
		23,97							
		23,95							
70 % етанол									
5	4	25,55	25,50	0,20270	0,2014	0,95	2,78	24,50±1,23	2,28
		25,56							
		25,54							
		25,53							
		25,51							

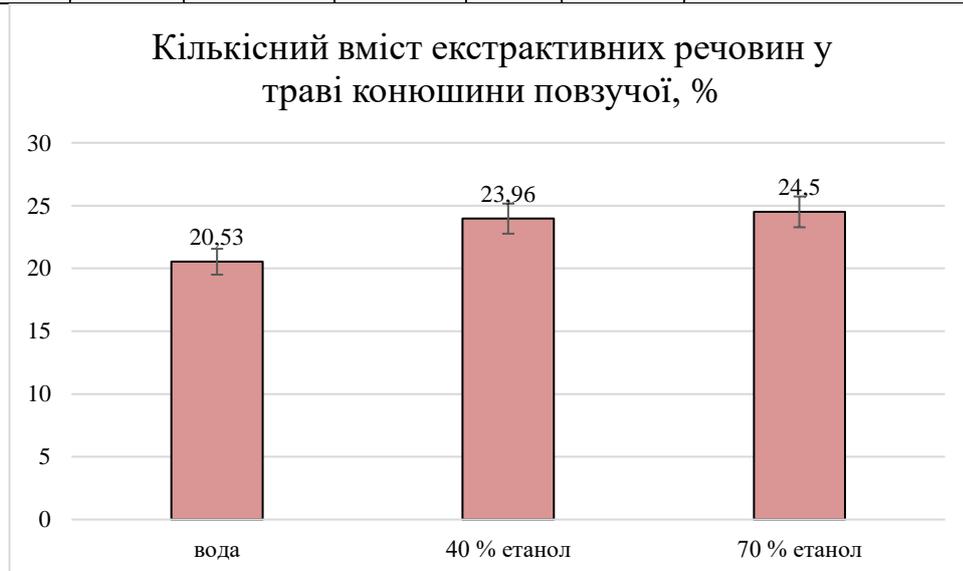


Рис. 3.4 Вміст екстрактивних речовин у траві конюшини повзучої

Таким чином проведені дослідження, свідчать що 40 % етанол є найбільш оптимальним екстрагентом для сировини конюшини повзучої (рис. 3.5).

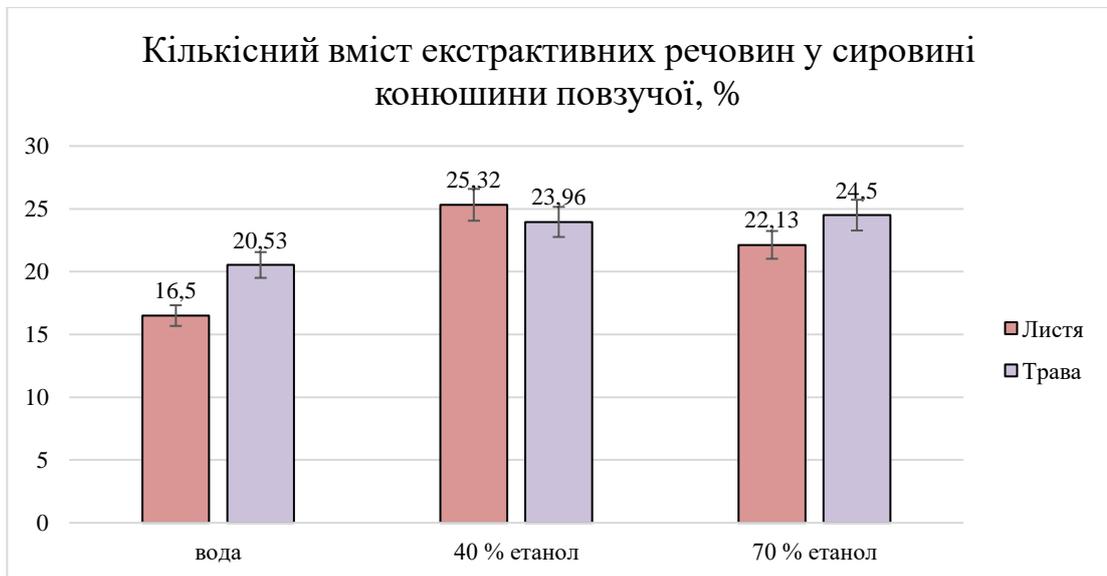


Рис. 3.5 Загальний вміст екстрактивних речовин у листі та траві конюшини повзучої

Висновки до розділу 3

1. У листях та траві, конюшини повзучої гравіметричним методом досліджено показники якості.
2. Втрата в масі при висушуванні для трави конюшини повзучої становила листя – $9,61 \pm 0,58$ % для трави – $7,47 \pm 0,36$ %.
3. Вміст золи загальної у траві конюшини повзучої складав у листях $7,93 \pm 0,39$ %, та траві – $6,92 \pm 0,40$ %.
4. Найбільш оптимальним екстрагентом для вилучення БАР із усієї досліджуваної сировини конюшини повзучої став 40 % етанол.

ВИСНОВКИ

1. Проведений структурований пошук різних джерел літератури відносно ботанічної характеристики, розповсюдження, хімічного складу та застосування у медицині конюшини повзучої. За результатами аналізу визначено, що конюшина повзуча має значний хімічний та фармакологічний потенціал і може бути перспективним джерелом нових БАР.
2. З використання хімічних реакцій у траві та листях конюшини повзучої були ідентифіковані полісахариди, амінокислоти, флавоноїди, таніни.
3. Проведене хроматографічне дослідження сировини конюшини повзучої, були ідентифіковані методом ТШХ та ПХ: флавоноїди, органічні, гідроксикоричні та амінокислоти, полісахариди.
4. Визначено кількісний вміст основних груп БАР у листях та траві конюшини повзучої: полісахаридів, антоціанів, флавоноїдів, танінів, органічних, гідроксикоричних та амінокислот.
5. У листях та траві, конюшини повзучої гравіметричним методом досліджено показники якості.
6. Втрата в масі при висушуванні для трави конюшини повзучої становила листя – $9,61 \pm 0,58$ % для трави – $7,47 \pm 0,36$ %.
7. Вміст золи загальної у траві конюшини повзучої складав у листях $7,93 \pm 0,39$ %, та траві – $6,92 \pm 0,40$ %.
8. Найбільш оптимальним екстрагентом для вилучення БАР із усієї досліджуваної сировини конюшини повзучої став 40 % етанол.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біологічні особливості розвитку багаторічних бобових трав та їх продуктивність в умовах Передкарпаття / Г. С. Коник та ін. *Селекція і насінництво*. 2008. Вип. 95. С. 255–265.
2. Гапоненко А. М., Кулик М. В., Гнатюк А. М. Вміст мікроелементів у конюшинах природної флори України. *Planta+. наука, практика та освіта* : матеріали V наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної (до 100-річчя від дня народження), м. Київ, 28-29 січ. 2025 р. Київ, 2025. Т. 2. С. 282–285.
3. Державна Фармакопея України : у 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
4. Державна Фармакопея України : у 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
5. Державна Фармакопея України. Доповнення 1 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.
6. Єлісеєва Т., Ткачова Н. Конюшина (лат. *Trifolium*). *Журнал здорового харчування та дієтології*. 2017. Т. 2, № 2. С. 18–24.
7. Саєнко М. В., Новосел О. М. Конюшина червона (*Trifolium rubens* L.) – перспективна лікарська рослина. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природнього походження* : матеріали VII Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 11 квіт. 2025 р. Харків, 2025. С. 179–180.

8. Фармакогностичні дослідження трави *Trifolium fragiferum* L. флори півдня України / О. В. Гречана та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2022. Т. 15. № 3(40). С. 241–249.
9. Ahmad S., Zeb A. Phytochemical profile and pharmacological properties of *Trifolium repens*. *J. Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2020. Vol. 10. P. 1–10.
10. Alberski J., Olszewska M. Chemical composition of *Trifolium repens* L. from permanent grasslands in relation to some chemical soil properties. *Acta Agrophysica*. 2015. Vol. 22. P. 359–356.
11. Assessment of graphene oxide toxicity on the growth and nutrient levels of white clover (*Trifolium repens* L.) / S. Zhao et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022. Vol. 234. P. 113–121.
12. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity / G. B. Junia et al. *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 147. P. 546–553.
13. Belhouala K., Benarba B. Medicinal plants used by traditional healers in Algeria: a multiregional ethnobotanical study. *Frontiers in pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 760–770.
14. Biologically active compounds from forage plants / A. Tava et al. *Phytochemistry Reviews*. 2022. Vol. 21. P. 471–501.
15. Biologically active secondary metabolites in white clover (*Trifolium repens* L.) - A review focusing on contents in the plant, plant-pest interactions and transformation / S. C. K. Carlsen et al. *Chemoecology*. 2018. Vol. 18. P. 129–170.
16. Chemo-metric analysis of carotenoids, chlorophylls, and antioxidant activity of *Trifolium hybridum* / A. Zeb et al. *Heliyon*. 2020. Vol. 6. P. 198–202.
17. Comparative analysis of qualitative anatomical characters of *Trifolium* L. (*Fabaceae*) and their taxonomic implications: Preliminary results / L. Zoric et al. *Plant Systematics and Evolution*. 2011. Vol. 298. P. 205–219.

18. Effect of hydrolysed *Trifolium repens* L. extract on menopause induced obesity and depressive symptoms: an in-vitro and in-silico approach / P. Rawat et al. *Natural Product Research*. 2025. Vol. 9. P. 256–273.
19. Effect of salinity on growth, ion accumulation and mineral nutrition of different accessions of a crop wild relative Legume species, *Trifolium fragiferum* / A. Jēkabsone et al. *Plants*. 2022. Vol. 11. P. 797–802.
20. Evaluation of stability, physicochemical and antioxidant properties of extracted chlorophyll from Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) / G. R. Mehdipoor et al. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021. Vol. 15(1). P. 327–340.
21. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* / M. A. Ponce et al. *Phytochemistry*. 2020. Vol. 65. P. 1925–1930.
22. Folk medicine in Düzce province (Turkey) / İ. Gürbüz et al. *Turkish Journal of Botany*. 2019. Vol. 43(6). P. 769–784.
23. Genetic diversity and infraspecific relationships of *Trifolium fragiferum* L. in Iran / M. Haerinasab et al. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*. 2020. Vol. 44(2). P. 345–354
24. Global Research Trends and Hotspots in White Clover (*Trifolium repens* L.) Responses to Drought Stress (1990–2024) / X. Deng et al. *Sustainability*. 2025. Vol. 17. P. 1883–1890.
25. Gnatiuk A. M., Gaponenko M. B., Gaponenko A. M. Features of *Trifolium rubens* (*Leguminosae*) ontomorphogenesis in conditions of Ukraine. *Biosystems diversity*. 2021. Vol. 29(3). P. 244 –250.
26. Herbal teas and drinks: folk medicine of the Manoor Valley, Lesser Himalaya, Pakistan / I. U. Rahman et al. *Plants*. 2019. Vol. 8. P. 581–599.
27. Incorporating white clover (*Trifolium repens* L.) into perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) swards receiving varying levels of nitrogen fertilizer: Effects on milk and herbage production / M. Egan et al. *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 101. P. 259–271.

28. Ngangom L., Venugopal D., Pandey N. Investigation of *Trifolium repens* L. from the Indian Himalayan region as a phyto-therapeutic agent. *Natural product research*. 2024. Vol. 38(24). P. 4468–4478.
29. Phenolic fractions from nine *Trifolium* species modulate the coagulant properties of blood plasma in vitro without cytotoxicity towards blood cells / J. Kolodziejczyk-Czepas et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. Vol. 70 (3). P. 413–425.
30. Structure elucidation of quercetin- and myricetin-O-glycosides from the seeds of *Trifolium repens* / O. Stężycka et al. *Journal of Molecular Structure*. 2026. Vol. 1351. P. 144–156.
31. The pastoral significance, adaptive characteristics, and grazing value of white clover (*Trifolium repens* L.) in dry land environments in Australia: a review / L. A. Lane et al. *Australian Journal of Experimental*. 2017. Vol. 40. P. 1033–1046.
32. Transcriptome analysis reveals potential genes involved in flower pigmentation in a red-flowered mutant of white clover (*Trifolium repens* L.) / H. Zhang et al. *Genomics*. 2020. Vol. 110. P. 540–552.