

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

На правах рукописи

ЧЕРЕДНИК МАРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БУТОНОВ И
ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA L.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Куркин Владимир Александрович,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Самара – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	17
1.1. Историческая справка	17
1.2. Токсономическое положение софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.)	18
1.3. Ботаническое описание софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.)	19
1.4. Применение софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.) в традиционной китайской медицине (ТКМ) и народной медицине	19
1.5. Применение софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.) в официальной медицине	20
1.6. Химический состав бутонов и плодов софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.)	21
1.7. Лекарственное растительное сырье из растения софора японская (<i>Sophora japonica</i> L.) и некоторые аспекты его стандартизации	29
1.7.1. Софоры японской бутоны	29
1.7.2. Софоры японской плоды	30
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	31
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1. Объекты исследования	32
2.2. Оборудование и материалы, использованные при исследовании	33
2.3. Методы исследования	35
2.3.1. Морфолого-анатомические методы	35
2.3.2. Хроматографические методы	37
2.3.2.1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)	37
2.3.2.2. Колоночная и высокоэффективная жидкостная хроматография.	41
2.3.3. Физико-химические методы	43
2.3.4. Технологические методы	44
2.3.5. Биологические методы	45
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ <i>SOPHORA JAPONICA</i> L.	46
3.1. Морфолого-анатомический анализ цветков и соцветий	46
софоры японской <i>Sophora japonica</i> L.	46
3.2. Морфолого-анатомический анализ плодов софоры японской <i>Sophora japonica</i> L.	62
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.	76
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ <i>SOPHORA JAPONICA</i> L.	77
4.1. Извлечение индивидуальных веществ из плодов софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.)	77

4.2. Идентификация индивидуальных веществ из плодов софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.).....	82
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	92
ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СТАНДАРТИЗАЦИИ БУТОНОВ И ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (<i>SOPHORA JAPONICA</i> L.)	93
5.1. Определение подлинности бутонов софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.).....	93
5.2. Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской.....	95
5.3. Методика количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской.....	105
5.4. Определение подлинности плодов софоры японской (<i>Sophora japonica</i> L.).....	113
5.5. Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской.....	114
5.6. Методика количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской.....	123
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	134
ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ И ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ	136
6.1. Исследование нейротропной активности.....	136
6.2. Диуретическая активность	138
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
Список литературы:	145
Приложение 1. Акты внедрения результатов диссертационной работы	163
Приложение 2. Патент на изобретение «Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской»	169
Приложение 3. ¹H- и ¹³C-ЯМР спектры веществ, выделенных из плодов софоры японской	170
Приложение 4. Проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны»	178
Приложение 5. Проект дополнений к фармакопейной статье «Софоры японской плоды»	198
Приложение 6. Методики определения нейротропной и диуретической фармакологической активности	213

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность темы. В современной медицине позиции лекарственных растений с каждым годом только укрепляются. Благодаря комплексному воздействию на организм, относительной безопасности, широкому фармакологическому спектру применение лекарственных растений часто предпочтительнее (Куркин В.А., 2016; Zhang J., 2022). Фармацевтическая промышленность требует инноваций, новых субстанций, в том числе растительного происхождения, а также замены импортных фармацевтических субстанций отечественными (Андреева Д.М., 2016; Варина Н.Р., 2023; Дайронас Ж.В., 2022; Киселева Т.Л., 2009; Куркин В.А., 2025; Самбукова Б.В., 2017). Особый интерес в этой связи представляют флавоноиды, объединяющие многочисленную группу растительных метаболитов, которые встречаются во многих лекарственных растениях (Георгиевский В.П., 1990; Корулькин Д.Ю., 2007; Куркин В.А., 2002, 2023; Куркина А.В., 2012; Лавренов В.К., 1999, Сампиев А.М., 2020; Сидельников Н.И., 2024; Фенольные ..., 2025). Перспективные в отношении флавоноидов лекарственные растения изучают крупнейшие ученые фармацевтического сообщества (Авдеева Е.В., 2025; Белоногова В.Д., 2023; Зилфикаров И.Н., 2023; Киселева Т.Л., 2024; Кудашкина Н.В., 2024; Куркин В.А., 2025; Мизина П.Г., 2025; Правдивцева О.Е., 2025; Пупыкина К.А., 2023; Самылина И.А., 2024; Ханина М.А., 2025; Шмыгарева А.А., 2024). Среди лекарственных растений софора японская (*Sophora japonica* L.) является рекордсменом по содержанию флавоноидов. Так, содержание рутина в бутонах софоры японской достигает 20-30% (Алеутский Н.Н., 2010; Европейская фармакопея, 2024; Куркин В.А., 2020, 2025; Насудари А.А., 1994; Яковлев Г.П., 2020). Флавоноидные соединения обладают высокой антиоксидантной, противоаллергической, противовоспалительной, спазмолитической, кардиопротекторной и противоопухолевой активностью (Сампиев А.М., 2020; Аляутдин Р.Н., 2022; Gábor M., 1988; Panche A. N. 2016; Ratnayake S.

М. К., 2022). Рутин (3-*O*-рутинозид кверцетина), представитель флавоноидов, как фармацевтическая субстанция известен давно своими ангиопротекторными свойствами (Справочник Видаль, 2025; Békési A., 2012; Bensky D., 2004; Enogieru M. M. A. R., 2021; Szent-Györgyi A., 1936). В настоящее время в медицинской практике применяются бутоны и плоды софоры японской, однако по-прежнему актуальной проблемой является необходимость совершенствования стандартизации данных видов сырья. ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны» не лишена недостатков: идентификация сырья проводится только по качественной реакции на флавоноиды, спектрофотометрическая методика количественного определения рутина нуждается в совершенствовании, отсутствует ВЭЖХ. ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» в разделе «Количественное определение» предусматривает определение суммы фенольных соединений, однако, на наш взгляд, используемая методика является недостаточно селективной, так как в плодах софоры японской наряду с флавоноидами содержатся такие фенольные соединения, как хлорогеновая, кофейная и галловая кислоты (Куркин В.А., 2024; Chen L., 2021).

Степень разработанности темы.

В Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания (ГФ РФ XV) включена фармакопейная статья на сырье «*Sophorae japonicae fructus*» ФС.2.5.0130 (взамен ФС 42-452-72). В отношении бутонов софоры японской действует ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны».

В ГФ РФ XV в ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» в разделе «Количественное определение» регламентировано определение содержания суммы фенольных соединений в пересчете на генистеин.

В Европейской фармакопее 8, 10, 11 изданий, как и в Американской фармакопее, плоды софоры японской не упоминаются. Несмотря на высокое содержание биологических активных веществ, плоды софоры японской в нашей стране применялись только для получения настойки для наружного

применения, которая в настоящее время отсутствует в Государственном реестре лекарственных средств (Государственный ..., 2025).

Бутоны софоры японской включены в составы многих биоактивных добавок (БАД) в качестве источника витамина Р (Машковский М.Д., 2012). Подлинность бутонов софоры японской в соответствии с ВФС 42-341-74 определяют в спиртовом извлечении из сырья качественной реакцией на флавоноидные соединения (вишнево-красное окрашивание при взаимодействии с цинковой пылью в присутствии концентрированной хлористоводородной кислоты), а содержание рутина определяют хроматоспектрофотометрическим методом. Содержание рутина в бутонах софоры японской в соответствии ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны» должно быть не менее 16%, что значительно отличается от требований Европейской фармакопеи и подтверждает актуальность исследования с целью стандартизации ЛРС софоры японской.

Цель работы и основные задачи исследования.

Цель диссертационной работы - проведение комплексного фармакогностического исследования бутонов и плодов софоры японской в плане совершенствования стандартизации сырья данного растения

В связи с поставленной целью работы были определены следующие задачи:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования бутонов и плодов софоры японской методом световой, люминесцентной и поляризационной микроскопии.
2. Проведение фитохимического исследования бутонов и плодов софоры японской.
3. Изучение флавоноидного состава плодов софоры японской.
4. Разработка методик определения подлинности бутонов и плодов софоры японской методом ТСХ.
5. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской методом УФ-спектроскопии.

6. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской методом УФ-спектроскопии.
7. Разработка методики количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ.
8. Разработка методики количественного определения софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ.
9. Выделение и идентификация доминирующие вещества плодов софоры японской методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.
10. Изучение диуретической и нейротропной активности густого экстракта плодов софоры японской и доминирующих веществ софорикозида и кемпферол-3-О-софорозида.
11. Разработка проекта фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны» и проекта дополнений фармакопейной статьи ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*».

Научная новизна. С использованием методов световой, люминесцентной и поляризационной микроскопии при исследования гистологических срезов плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) впервые выявлены такие морфолого-анатомические особенности строения плодов софоры японской, как энциклоцитный тип устьичного аппарата, ладьевидные замыкающие клетки устьичного аппарата, коллатеральный и пара коллатеральных бобовидной формы проводящих пучков в области спинки и брюшного шва боба, кристаллизация тканей вокруг коллатеральных пучков, люминесценция тканей боба и семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм и 420-530 нм, наличие поверхностного адаптационного слоя воска на створках боба, наличие крахмальных зерен в устьичном аппарате, отсутствие слизи в паренхиме семени, наличие капель жира в паренхиме семени, аморфные скопления кристаллоидов флавоноидов, склереиды кожуры семени. При морфолого-анатомическом исследовании бутонов софоры японской впервые выявлены диагностические особенности тычиночных нитей и гинецея цветка.

Впервые разработана методика определения подлинности сырья «Софоры японской бутоны» методом ТСХ со стандартными образцами рутина и кверцетина, что позволяет использовать хроматографический профиль сырья «Бутоны софоры японской» для идентификации и стандартизации экстракционных препаратов из данного сырья.

Впервые разработана методика определения подлинности сырья «*Sophorae japonicae fructus*» методом ТСХ с использованием стандартных образцов кемпферол-3-*O*-софорозида и софорикозида.

В результате проведённых фитохимических исследований из плодов софоры японской выделены впервые 4'-*O*- α -L-рамнопиранозид генистеина) и 4'-*O*-рутинозид генистеина [генистеин-4'-*O*-(6''- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозида], химическая структуры которых установлена с применением методов УФ-спектроскопии, ^1H -ЯМР-спектроскопии, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и результатов химических превращений.

Научно обоснована целесообразность стандартизации бутонов софоры японской по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом дифференциальной УФ-спектроскопии, а также по содержанию рутина методом ВЭЖХ.

Научно обоснована целесообразность стандартизации плодов софоры японской по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид методом дифференциальной УФ-спектроскопии, а также по содержанию софорикозида методом ВЭЖХ.

Обнаружена антикреатининурезная активность (в опытах на животных) густого экстракта плодов софоры японской.

Обнаружено выраженное антидепрессантное действие кемпферол-3-*O*-софорозида и густого экстракта плодов софоры японской, которые повышают двигательную активность животных (по сравнению с контрольными группами) соответственно до 144% и 202%.

Разработаны проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны» и проект дополнений фармакопейной статьи ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды».

Научная новизна диссертационного исследования подтверждается получением патента на изобретение № 2850387 «Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской» (Приложение 2). Также научную новизну подтверждает решение о выдаче патентов на изобретение «Методика идентификации бутонов софоры японской» и «Способ количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ», а также приоритетная справка по заявке на изобретение «Способ применения кемпферол-3-О-софорозида в качестве антидепрессантного средства».

Теоретическая и практическая значимость.

Выявленные морфолого-анатомические признаки бутонов и плодов софоры японской включены в разделы «Идентификация» соответствующих проектов фармакопейных статей.

Научно обоснована целесообразность определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской методом дифференциальной УФ-спектроскопии при длине волны 414 нм в пересчете на рутин. Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин варьирует от $16,12 \pm 1,33\%$ до $22,37 \pm 1,33\%$, что позволило обосновать нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в бутонах – не менее 16%. Полученные данные включены в проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны».

Разработана методика количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования с использованием фармакопейного стандартного образца рутина. Определено, что содержание рутина в образцах бутонов софоры японской варьирует от $10,96 \pm 0,40\%$ до $15,20 \pm 0,51\%$, что позволило

обосновать нижний предел содержания рутина в бутонах – не менее 10,0%. Полученные данные внесены в проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны».

Научно обосновано применение в качестве стандартного образца цинарозида и аналитической длины волны 400 нм при определении суммы флавоноидов в плодах софоры японской методом дифференциальной спектрофотометрии. Определено содержание суммы флавоноидов в плодах софоры японской в пересчете на цинарозид варьирует в пределах от $8,52 \pm 0,21\%$ до $13,45 \pm 0,33\%$, что позволило обосновать нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид - не менее 8,0%. Полученные результаты исследования использованы при разработке раздела «Количественное определение» проекта дополнений к фармакопейной статье ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды».

Разработана методика количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования с использованием стандартного образца софорикозида. Определено, что содержание софорикозида в плодах софоры японской варьирует в диапазоне от $5,45 \pm 0,22\%$ до $6,67 \pm 0,75\%$, что позволило обосновать нижний предел содержания софорикозида в плодах софоры японской – не менее 5,0%. Полученные данные включены в проект дополнений к фармакопейной статье ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды».

Результаты диссертационного исследования использованы для стандартизации лекарственного растительного сырья софоры японской (*Sophora japonica* L.) и включены в проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны» и проект дополнений к фармакопейной статье ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» (разделов «Идентификация» и «Количественное определение») с целью внедрения в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Внедрение результатов исследования. Институт фармации ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», Средне-Волжский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных ароматических растений» внедрили результаты диссертационного исследования в учебно-образовательные и научно-исследовательские процессы. Акты о внедрении прилагаются (Приложение 1).

Личный вклад автора. Автором лично проведено фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской. В ходе исследования автором идентифицированы образцы ЛРС, проведены микроскопические и гистохимические исследования, в результате обнаружены новые морфологические признаки бутонов и плодов софоры японской. Автором лично проведены исследования, в результате которых были определены оптимальные условия экстрагирования и получены водно-спиртовые извлечения бутонов и плодов софоры японской. Лично разработаны методики исследования методами ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ и определены предельные показатели доминирующих веществ в бутонах и плодах софоры японской. Автором выделены, очищены и идентифицированы 6 флавоноидов, оценена диуретическая, нейротропная активность двух выделенных веществ и густого экстракта плодов софоры японской.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные включены в проект ФС «Софоры японской бутоны» и проект дополнений разделов «Идентификация», «Микроскопические признаки», «Количественное определение» ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» (Приложения 4 и 5).

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры

японской проводилось в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России в рамках НИР «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ АААА-А19-119051490148-7 от 14.05.2019 г.).

Методология и методы исследования. В соответствии с общепринятыми практиками, методология исследования заключается в детальном и систематизированном изучении доступных литературных и электронных источников, комплексном анализе данных, касающихся фармакогностического исследования бутонов и плодов софоры японской, оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования, определении цели исследования, формулировании ключевых задач для её достижения, выборе объектов и методов исследования, разработке дизайна диссертационного исследования и его выполнении (Казакова М.А., 2025; Калашникова О.А., 2023).

Исследования проводились с использованием морфолого-анатомических, химических, хроматографических, спектральных (УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) методов анализа в соответствии с ГФ РФ XV.

Объекты исследования: промышленные образцы цветков нераспустившихся (бутонов) и плодов софоры японской различных регионов России.

В исследовании использовали стандартные образцы рутина, кверцетина, генистеина, цинарозида, софорикозида, кемпферол-3-О-софорозида, кемпферола.

Статистическую обработку полученных данных, осуществляли по регламенту Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка

результатов физических, физико-химических и химических испытаний» и ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Степень достоверности. Исследования проведены высокотехнологичными методами с использованием современной аппаратуры. Результаты исследования были обработаны с применением математических методов анализа данных. Объективность и достоверность полученных в исследовании результатов подтверждены валидационной оценкой по показателям специфичность, линейность, проведенной в соответствии с ГФ РФ XV. Полученные результаты представлены профессиональному фармацевтическому сообществу на всероссийских и международных конференциях и опубликованы в рецензируемых источниках.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует пп. 2, 3, 5, 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты морфолого-анатомического и фитохимического исследования бутонов и плодов софоры японской.
2. Результаты разработки методики определения подлинности бутонов и плодов софоры японской методом ТСХ.
3. Результаты разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в бутонах софоры японской методом дифференциальной УФ-спектроскопии.
4. Результаты исследований по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в плодах софоры японской методом дифференциальной УФ-спектроскопии.

5. Результаты исследований по разработке методики количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

6. Результаты исследований по разработке методики количественного определения софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ.

7. Результаты исследований по выделению, очистке, идентификации индивидуальных флавоноидов плодов софоры японской.

8. Результаты изучения диуретической и нейротропной активности густого экстракта плодов софоры японской и индивидуальных веществ указанного ЛРС.

9. Проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутонны».

10. Проект дополнений к фармакопейной статье ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды».

Публикации. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, представлены автором в 12 публикациях, в том числе в 7 статьях, из них 5 печатных работ в журналах, включенных в перечень ВАК, 2 публикации на английском языке в журнале, индексируемом Scopus. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение № 2850387 «Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской» (Приложение 2). Получено решение о выдаче 2-х патентов на изобретение «Методика идентификации бутонов софоры японской» и «Способ количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ». Получена 1 приоритетная справка по заявке на изобретение «Способ применения кемпферол-3-*O*-софорозида в качестве антидепрессантного средства».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики» (Кемерово, 2024), III Научно-практической онлайн-конференции с

международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета «Современные проблемы фармации» (Самара, 2024), IV Научно-практическая онлайн-конференция с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора А.А. Лебедева и 70-летию со дня рождения заслуженного работника высшей школы РФ профессора В.А. Егорова (Самара, 2025), XII Всероссийском симпозиуме «Фенольные соединения» (Москва, 2025), Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарств – приоритетное направление развития фармацевтической науки» (Пермь, 2025).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 214 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследования, 4 глав результатов экспериментальных исследований с выводами по каждой главе. Работа иллюстрирована 32 таблицами и 46 рисунками. Далее приведен список 138 литературных и иных источников, использованных при написании, в том числе 52 на иностранных, а также приложения.

Введение содержит описание актуальности темы диссертационного исследования, цель, задачи, научную новизну и практическую значимость работы, методологию исследования и личный вклад автора, положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 содержит обзор литературы в области фармакогностического исследования бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), включая историческую справку о растении, ботаническое описание, применение, химический состав, фармакологические свойства бутонов и плодов, информацию о стандартизации бутонов и плодов.

Глава 2 описывает объекты и методы исследования.

Глава 3 описывает результаты морфолого-анатомического анализа бутонов и плодов софоры японской в плане выявления новых идентификационных признаков растительного сырья.

В главе 4 отражены результаты выделения и установления структуры индивидуальных веществ из плодов софоры японской. Приведены формулы выделенных из плодов веществ, два из которых являются новыми природными соединениями.

Глава 5 содержит результаты разработки методик, способствующих усовершенствованию стандартизации бутонов и плодов софоры японской в области идентификации и определения количественных показателей доминирующих веществ (суммы флавоноидов, количества рутина в бутонах и количества софорикозида в плодах) с применением методов ТСХ, УФ-спектроскопии и ВЭЖХ.

В главе 6 приведены результаты исследования нейротропной и диуретической активности густого экстракта плодов софоры японской, софорикозида и кемпферол-3-*O*-софорозида.

Завершает работу заключение, в котором содержатся выводы по работе, практические рекомендации по применению результатов исследования, описание перспектив дальнейшего исследования.

Далее приведен список использованных литературных и других источников и приложения.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Историческая справка

Софора японская (син. Стифнолобия японская, японская акация), семейство - Бобовые *Fabaceae* (*Leguminosae*), род - *Styphnolobium* или *Sophora*, вид - *Styphnolobium japonicum* L. (в Российской научной медицинской литературе, в том числе в Государственной фармакопее Российской Федерации XV издания сохранено название *Sophora japonica* L.) [8, 40, 65, 66, 69, 86].

Род Софора (*Sophora* L.) очень многообразен - деревья, кустарники, травы, которых объединяет высокая декоративность, медоносность, высокое содержание биоактивных веществ, в том числе ядовитых и сильнодействующих [66, 75, 104, 108, 114].

Термин «Софора» — латинизированное арабское название, закрепившееся в научной классификации растений. Его смысловое значение - «жёлтое дерево» [73]. Название «софора японская» (*Sophora japonica* L.) возникло исторически и связано с развитием науки в области классификации растений и развитием торговых и культурных связей Азии и Европы [126]. Несмотря на то, что растение родом из Китая, в Европу софора попала 1747 году из Японии. По одной из версий, семена растения прислал японский миссионер-ботаник Инкарвиль Бернару Жюссье, садовнику королевского сада в Париже. В Парижском Ботаническом саду до сих пор сохранился экземпляр, выращенный из тех семян [105]. Поэтому в 1753 году Карл Линней, основоположник биологической систематики, впервые систематизировал и описал это растение в составе рода *Sophora* вид *japonica* (японская). В то время растение было хорошо известно в Японии и активно использовалось в культуре и медицине. В то же время упоминания о софоре встречаются в древнекитайских текстах, например, в «Цзо чжуань» (около 400 г. до н. э.) [90].

Софора быстро завоевала популярность в Европе благодаря своей декоративности. Её высаживали в парках и садах, а позже начали использовать в медицине и фитомелиорации (улучшении почвы) [126].

В Россию софора японская попала в 1814 году — её посадили в Никитском ботаническом саду в Крыму [52]. Оттуда растение распространилось по Херсонской, Запорожской областям, Краснодарскому краю и Каспийскому региону [67, 68]. В Крыму софору японскую активно использовали для озеленения и в лесоразведении на песках, так как она устойчива к засухе и способна фиксировать азот в почве [30, 66]. Со временем софора японская распространилась по многим регионам: Средняя Азия и Закавказье: растение культивируют в Узбекистане, Таджикистане, Туркмении, Азербайджане, Армении и Грузии [30, 49, 126]. Софору японскую можно встретить в Северной Америке, в некоторых странах Африки и Европы, например, в Испании и на Канарских островах [66, 126].

Сегодня софора японская широко распространена в умеренных и субтропических зонах по всему миру, культивируется и растет в дикой природе [66].

1.2. Таксономическое положение софоры японской (*Sophora japonica* L.)

Софора японская исторически классифицировалась в роде *Sophora* [121]. Однако анализ ДНК указывает на его генетическую обособленность от других видов рода *Sophora* [103].

Полная научная классификация растения сегодня выглядит так:

Царство: Растения (*Plantae*)

Подцарство: Сосудистые растения (*Tracheophyta*)

Отдел: Покрытосеменные (*Angiosperms*)

Класс: Двудольные (*Eudicots*)

Порядок: Бобовоцветные (*Fabales*)

Семейство: Бобовые (*Fabaceae*)

Подсемейство: Мотыльковые (*Faboideae*)

Триба: Софоровые (*Sophoreae*)

Род: Стифнолобий (*Styphnolobium*)

Вид: Стифнолобий японский (*Styphnolobium japonicum* (L.) Schott, 1830)

Однако историческое название *Sophora japonica* L. допустимо и по-прежнему широко используется в садоводстве, литературе и особенно в медицинском контексте [8, 40, 65, 66, 69, 86].

1.3. Ботаническое описание софоры японской (*Sophora japonica* L.)

В 1954 в издании «Флора СССР» софора японская описана так: «Листопадное дерево высотой до 25 м, с широкой шаровидной кроной.

Кора на старых стволах тёмно-серая с трещинами, молодые ветви зелёные. Листья сложные непарноперистые, длиной 11–25 см. Листочки (9–17 штук) продолговато-яйцевидные, длиной 2–5 см. Цветки желтовато-белые, мотылькового типа, ароматные, собраны в рыхлые метёлки до 35 см длиной»[75]. Цветёт раз в два года в июне — августе. Отдельные цветки живут 3–4 дня. Плоды - сочные невскрывающиеся бобы с чётковидными утолщениями, содержащими семена разной степени зрелости, длина боба 1–8 см, зеленовато-бурого цвета, при созревании — красноватые. Созревают в сентябре — октябре и сохраняются на дереве всю зиму [66, 75].

Софора японская предпочитает суглинистые и супесчаные почвы, переносит засоление, засуху загрязнение воздуха, теневынослива, но чувствительна к морозам [66, 75].

1.4. Применение софоры японской (*Sophora japonica* L.) в традиционной китайской медицине (ТКМ) и народной медицине

Софора японская широко применяется в традиционной китайской медицине [1, 90, 95]. Упоминания об этом можно найти в трудах «Бэнь Цао Ган Му» (Компендиум лекарственных веществ, 1596 г.) Ли Шичжэня и в современных учебниках по ТКМ. Используются в основном бутоны и, реже, плоды софоры японской [1]. Бутоны софоры японской используются при кровотечениях различной локализации и этиологии: при геморрое,

дизентерии, кишечных кровотечениях, инфекциях мочевыводящих путей, маточные кровотечениях, туберкулезе, носовых кровотечениях [95]. Плоды софоры японской применяются при кожных болезнях, а в комбинациях с другими традиционными китайскими средствами - при гипертонической болезни, головных болях, головокружении, для улучшения зрения [95].

Применение софоры, описанное в ТКМ, получило распространение во всем мире и сегодня имеет научное обоснование. Бутоны софоры японской включены в составы многих биоактивных добавок (БАД) в качестве источника витамина Р [19, 45, 65].

1.5. Применение софоры японской (*Sophora japonica* L.) в официальной медицине

Софора японская - одно из старейших и важнейших растений в Фармакопее Китая [90, 95]. Бутоны софоры японской и цветки софоры японской включены в Европейскую фармакопею 8 издания [13]. Плоды и бутоны софоры японской относятся к лекарственному растительному сырью в Российской Федерации [63, 64].

Бутоны применяются для получения доминирующего в них флавоноида — рутина, количество которого достигает 30% в ЛРС [13, 109]. Рутин (3-*O*-рутинозид кверцетина) уменьшает ломкость и проницаемость капилляров, в качестве ангиопротектора применяется с 50-х годов XX века [4, 14, 17, 115]. Кроме того, клинически доказано гипотензивное и вентонизирующее действие рутина [106, 119, 120]. Этот флавоноид обладает противовоспалительными и антиоксидантными свойствами [22, 44, 50, 101]. Современные исследования направлены на изучение молекулярных взаимодействий рутина: взаимодействие с ферментами, влияние на экспрессию генов, повышение биодоступности антибактериальных средств и цитостатиков [43, 91, 125]. В XXI веке в научной литературе появились данные о нейропротекторном, кардиопротекторном, противоопухолевом эффекте применения рутина [91, 123]. Рутин применяется в качестве фармацевтической субстанции и входит в состав комбинированных

препаратов «Аскорутин», «Венорутон», «Венолайф», «Анавенол», «Рутозид» [9, 45, 65]. Так же рутин служит сырьем для получения агликона рутина - флавонола кверцетина [5, 28, 31, 34]. Кверцетин – один из наиболее изученных флавоноидов (флавонолов) [3, 10, 21]. Он обладает антиоксидантным и мембранопротекторным действием, что лежит в основе антиатеросклеротического, гепатопротекторного и нейропротекторного эффектов [88, 96, 132]. Кверцетин относят к сильнейшим природным антигистаминным, иммуномодулирующим, противовоспалительным препаратам [12, 118].

Плоды софоры японской в нашей стране применялись только для получения настойки для наружного применения. В настоящее время «Настойки плодов софоры японской» в Государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) нет [9].

Доминирующие вещества плодов – софорикозид и кемпферол-3-О-софорозид применяются в зарубежной практической медицине.

Кемпферол-3-О-софорозид обладает противовоспалительным эффектом [112].

Софорикозид по своей структуре относится к изофлавоноидам и используется в комплексной терапии в качестве фитостероида, в том числе для профилактики и лечения остеопороза в период менопаузы [54].

1.6. Химический состав бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)

В качестве источника природных биологически активных субстанций и с точки зрения научной новизны, плоды и бутоны софоры японской имеют большой потенциал [20, 78, 102, 109]. Нераскрывшиеся цветки софоры японской (по некоторым данным и листья, и зеленые побеги растения) наиболее интересны в качестве сырья для получения рутина [49, 111]. Содержание рутина в бутонах, по данным Европейской фармакопеи 8 издания достигает 20% [13]. В научных трудах имеется информация об

обнаружении в плодах софоры японской различных флавоноидов, включая софорикозид, генистин, генистеин, рутин, кверцетин [7, 122, 127]. Упомянуты также кемпферол-3-софорозид и генистеин-4-софоробиозид [38, 92, 93]. Помимо флавоноидов в плодах и бутонах (значительно меньше) содержатся алкалоиды, определяющие их токсичность: матрин, оксиматрин, софокарпин, софорамин, цитизин, N-метилцитизин, пахикарпин [11, 42, 116, 117, 133, 136]. Обнаружены в плодах софоры японской фенольные кислоты (кофейная кислота, хлорогеновая кислота, феруловая, синаповая, кумаровая кислоты) [20, 93]. Выделены из плодов тритерпеновые сапонины (софорасапонины I, II, III, IV) и фитостерин (стигмастерин) [124]. Кроме того, плоды содержат значительные количества углеводов и полисахаридов (слизи, пектиновые вещества, сахара) [18, 20, 51, 131, 138], органические кислоты (яблочная, лимонная, янтарная кислоты) в различных соотношениях, в зависимости от степени зрелости плодов [107]. Содержание жирного масла и липидов в семенах достигает 10-18%, при этом высокое содержание линолевой кислоты (до 50%) и токоферола [68, 107, 129]. Кроме витамина E в плодах содержатся аскорбиновая кислота (витамин C), каротиноиды (провитамин A), витамин K [107]. В плодах обнаружено пять из восьми незаменимых аминокислот [18]. В зольном остатке плодов обнаружены макро- и микроэлементы: калий, кальций, магний, железо, цинк, селен, марганец, медь [107]. Важнейшие биологические активные вещества бутонов и плодов софоры японской представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Важнейшие флавоноиды бутонов софоры японской

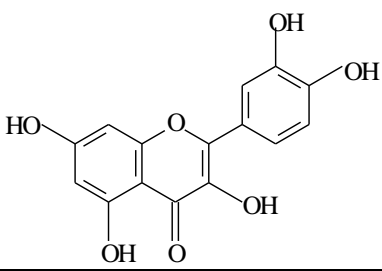
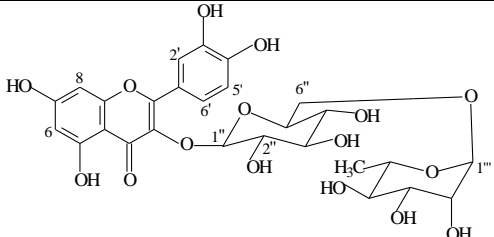
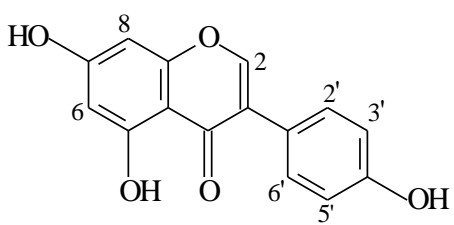
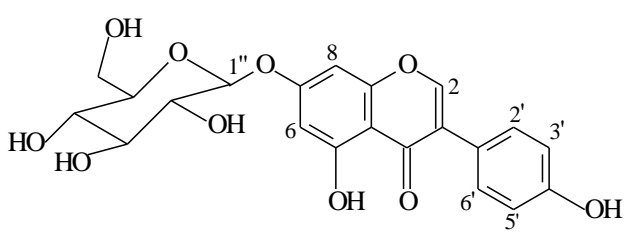
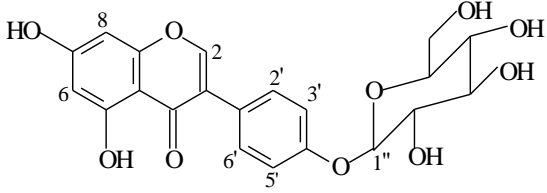
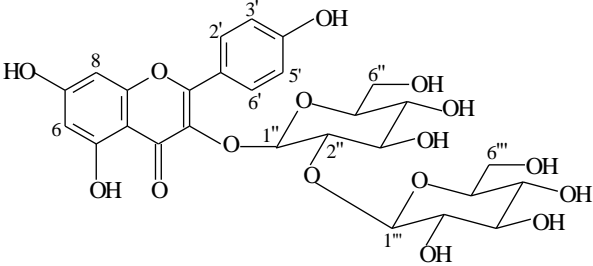
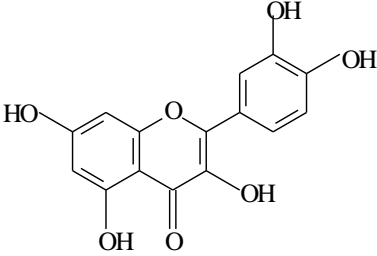
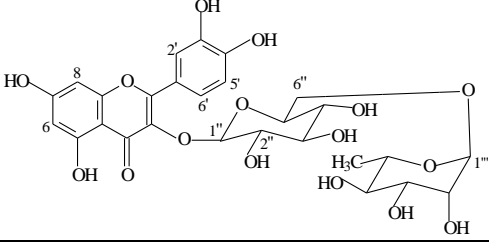
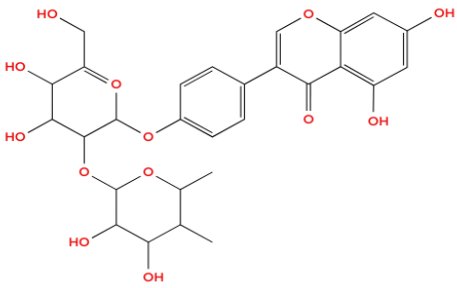
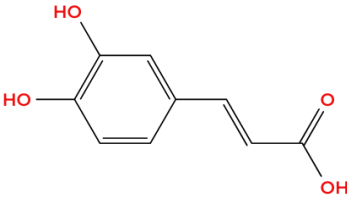
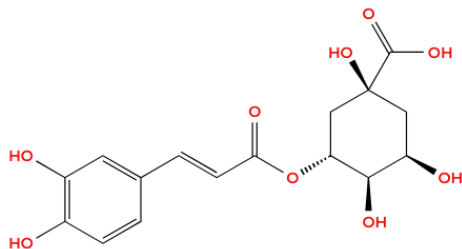
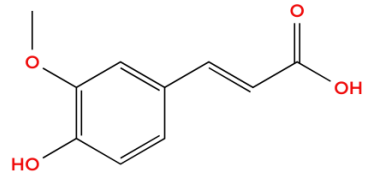
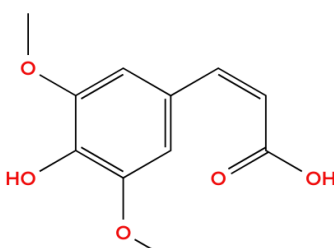
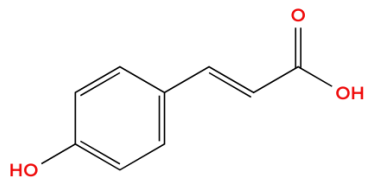
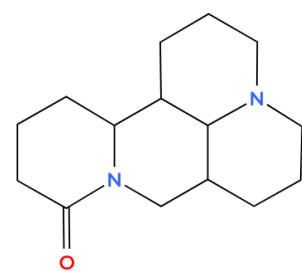
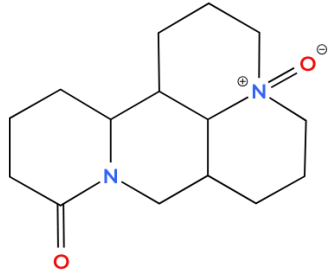
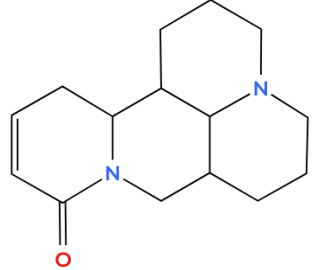
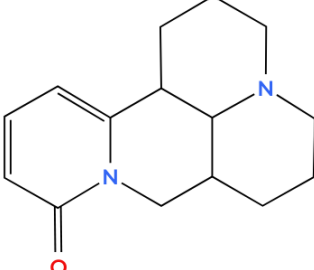
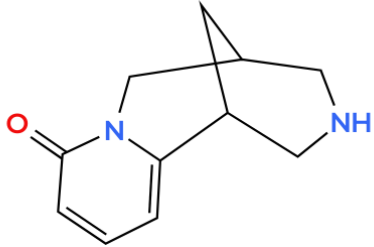
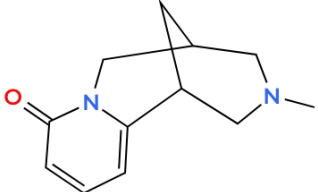
№ пп	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
1	кверцетин		$C_{15}H_{10}O_7$
2	3- <i>O</i> -рутинозид кверцетина (рутозид, рутин)		$C_{27}H_{30}O_{16}$

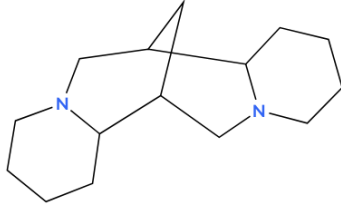
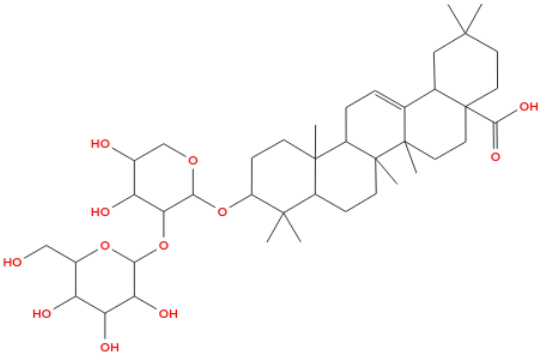
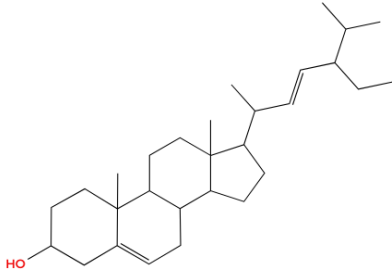
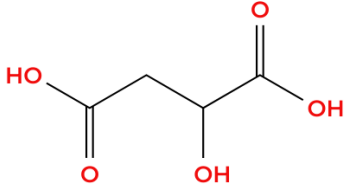
Таблица 2 – Биологические активные вещества плодов софоры японской.

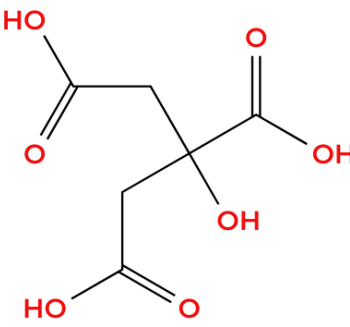
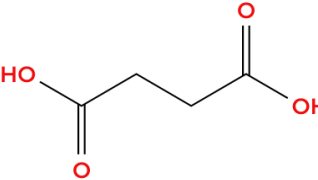
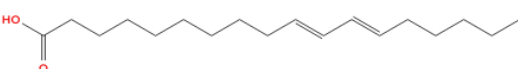
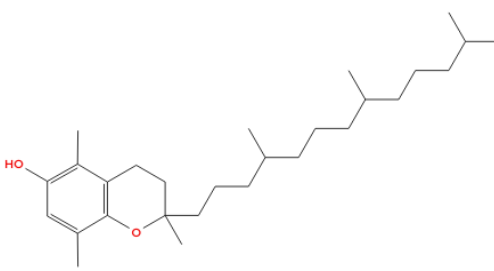
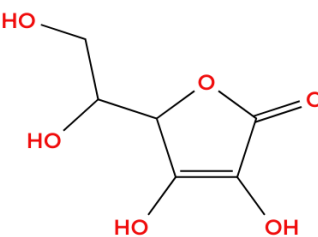
№ п/п	Соединение	Структурная формула соединения	Брутто - формула соединения
Флавоноиды			
1.	генистеин		$C_{15}H_{10}O_5$
2.	7- <i>O</i> -глюкозид генистеина (генистин)		$C_{21}H_{18}O_{11}$

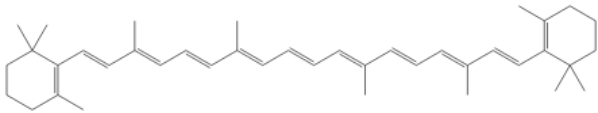
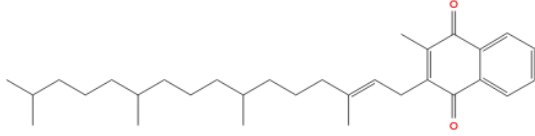
3.	софорикозид		$C_{21}H_{20}O_{10}$
4.	кемпферол-3- <i>O</i> -софорозид		$C_{27}H_{30}O_{16}$
5.	кверцетин		$C_{15}H_{10}O_7$
6.	3- <i>O</i> -рутинозид кверцетина (рутозид, рутин)		$C_{27}H_{30}O_{16}$
7.	генистеин-4-софорабиозид (софоробиозид)		$C_{27}H_{30}O_{14}$
Фенольные кислоты			
8.	кофейная		$C_9H_8O_4$

9..	хлорогеновая		$C_{16}H_{18}O_9$
10.	феруловая		$C_{10}H_{10}O_4$
11.	синапиновая (синаповая)		$C_{11}H_{12}O_5$
12.	п-кумаровая		$C_9H_8O_3$
Алкалоиды			
13.	Матрин (софокарпидин)		$C_{15}H_{24}N_2O$

14.	оксиматрин		$C_{15}H_{24}N_2O_2$
15.	софокарпин		$C_{15}H_{22}N_2O$
16.	софорамин		$C_{15}H_{20}N_2O$
17.	цитизин		$C_{11}H_{14}N_2O$
18.	N-метилцитизин		$C_{12}H_{16}N_2O$

19.	пахикарпин		$C_{15}H_{26}N_2$
Тритерпеновые сапонины			
20.	софорасапонины I, II, III, IV		$C_{30}H_{48}R$
Фитостерины			
21.	стигмастерин		$C_{29}H_{48}O$
Органические кислоты			
22.	яблочная		$C_4H_6O_5$

23.	лимонная		$C_6H_8O_7$
24.	янтарная		$C_4H_6O_4$
Витамины и витаминоподобные вещества			
25.	линолевая кислота		$C_{18}H_{32}O_2$
26.	Бета-токоферол		$C_{28}H_{48}O_2$
27.	аскорбиновая кислота		$C_6H_8O_6$

28.	Бета-каротин		$C_{40}H_{56}$
29.	витами́н К ₁ (фитонадион)		$C_{31}H_{46}O_2$

1.7. Лекарственное растительное сырье из растения софора японская (*Sophora japonica* L.) и некоторые аспекты его стандартизации

1.7.1. Софоры японской бутоны

В Российской Федерации и во всем мире бутоны софоры японской являются основным источником промышленного получения рутина [30, 36, 49]. В нашей стране качество бутонов софоры японской на протяжении многих десятилетий определяли в соответствии ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны», в соответствии с которой была разработана и часто упоминается в научных источниках Фармакопейная статья предприятия (ФСП) 42-0338-3380-07 «Софоры японской бутоны». Само появление указанной ФСП свидетельствует о том, что на 2007 год промышленная переработка бутонов софоры японской в стране была актуальной. На сегодняшний день в стране нет предприятий, получающих природный рутин из софоры для реализации, но стандартизация бутонов требуется, так как есть предприятия, выпускающие настойки и экстракты со стандартизированным количеством рутина из бутонов софоры японской [45, 65]. По ВФС 42-341-74 подлинность бутонов определяют в спиртовом извлечении из сырья качественной реакцией на флавоноиды (вишнево-красное окрашивание при взаимодействии с цинковой пылью в присутствии концентрированной

хлористоводородной кислоты), а содержание рутина определяют хромато-спектрофотометрическим методом [63]. Количество доминирующего вещества в бутонах софоры японской по ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутонны» должно быть не менее 16%, ФСП 42-0338-3380-07 расширяло это значение 16-20%, что приближено к требованиям Европейской фармакопеи 8 издания (ЕФ), где закреплены две статьи: «Софоры японской цветки» и «Софоры японской бутонны» [63, 13]. Для распустившихся цветков по ЕФ норма рутина не менее 6% (всего флавоноидов не менее 8% по рутину), для бутоннов - не менее 16% рутина (всего флавоноидов не менее 20% по рутину).

1.7.2. Софоры японской плоды

В Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания включена фармакопейная статья на сырье «Софоры японской плоды» ФС.2.5.0130 (взамен ФС 42-452-72) [8]. Нами проведены исследования плодов софоры японской методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [78, 80]. На хроматографическом профиле водно-спиртовых извлечений плодов софоры японской, обнаружены зоны минимум пяти веществ, отличающихся от федерального стандартного образца (ФСО), рутина, стандартных образцов (СО) кверцетина и генистеина, примененных нами в качестве веществ сравнения. Два вещества содержатся в равнозначно доминирующих количествах, остальные – в значительных количествах. Одно доминирующее вещество соответствует софорикозиду, что соответствует ФС.2.5.0130 [64]. В разделе «Количественное определение» данной фармакопейной статьи предусмотрено определение суммы фенольных соединений, на наш взгляд, недостаточно селективной методикой, так как в плодах софоры японской наряду с флавоноидами содержатся такие фенольные соединения, как хлорогеновая, кофейная и галловая кислоты, которые по спектральным характеристикам отличаются от флавоноидов. Кроме того, расчет содержания суммы фенольных соединений осуществляют на генистеин, имеющий агликоновую природу, в то время как в плодах софоры японской

преобладают флавоноидные гликозиды. При проведении морфолого-анатомического исследования плодов нами выявлены характерные для плодов софоры японской структуры, не отраженные в разделе «Микроскопические признаки» и некоторые особенности строения, противоречащих ФС.2.5.0130 [81, 83].

В Европейской фармакопее 8 издания плоды софоры японской не упоминаются [13].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Софора японская (*Sophora japonica* L.) – уникальное растение, содержащее огромное количество различных групп биологических активных веществ, что может затруднять выделение и идентификацию веществ, особенно из плодов. Доминирующими веществами являются флавоноиды.

2. Имеется большое количество информации о химическом составе и фармакологическом эффекте применения софоры японской. Изучение фармакологии отдельных веществ, например, рутина и кверцетина, переходит на уровень межмолекулярных взаимодействий. Софора японская перспективна для выделения и других флавоноидов и их изучения.

3. Морфолого-анатомические микроскопические исследования плодов и бутонов софоры японской с применением люминесценции или поляризации не описаны.

4. ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» Государственной фармакопее Российской Федерации XV требует внесения поправок.

5. ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны» требует обновления с использованием современных аналитических методов

6. Бутоны софоры японской – единственное известное ЛРС с содержанием рутина до 30%. Информация о количестве рутина в бутонах противоречива, требуется проверить и стандартизировать

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Исследование проводилось на промышленных образцах воздушно-сухих плодов и бутонов софоры японской, заготовленных в различных регионах Российской Федерации в 2022-2023 годах. Все образцы продавались в качестве пищевых добавок. Только один производитель предоставил декларацию о соответствии своей продукции ГОСТ Р 51074-2023 «Продукты пищевые. Информация для потребителей. Общие требования» и СТО 01195840763-001-2020 «Напитки чайные фасованные (из растительного сырья)». Также мы приобрели промышленные образцы экстрактов плодов софоры японской ООО «Казанский Завод Экстрактов»: 1) водно-пропиленгликолевый экстракт Софоры (плоды); 2) сухой экстракт Софоры (плоды). Объекты исследования были приобретены через розничные сети и идентифицированы на момент приобретения по гербарным образцам. Информация об объектах исследования приведена в таблице 3. Порядковые номера закреплены за объектами до завершения исследования.

Таблица 3 - Объекты исследования

№ п/п	Торговое название объекта исследования	Информация о производителе	Сроки заготовки	Соответствие гербарным образцам по макроскопическим признакам
1	Софора японская цветки	ООО «РТ» - ООО «Родные травы», Республика Адыгея, г. Майкоп	06.2023 г.	Соответствует
2	Софора японская цветки, травяной сбор	ИП Гордеев М.В. – «Травник Гордеев», г. Уфа	07.2022 г.	Соответствует
3	Софора японская	ООО «Старослав», Новосибирская	06.2023 г.	Соответствует

	цветки	область, г. Бердск		
4	Софора японская цветки	ООО «Азбука трав», Алтайский край, г. Барнаул	06.2023 г.	Соответствует
5	Софора японская цветки, чайный напиток	«ФитоКонтинент» ИП Лукьянов (г. Барнаул)	06.2023 г.	Соответствует
6	Софора японская плоды	ООО «РТ» - ООО «Родные травы», Республика Адыгея, г. Майкоп	06.2023 г.	Соответствует
7	Софора японская плоды	ИП Гордеев М.В. – «Травник Гордеев», г. Уфа	07.2022 г.	Соответствует
8	Софора японская плоды	ООО «Старослав», Новосибирская область, г. Бердск	06.2023 г.	Соответствует
9	Софора японская плоды	ООО «Азбука трав», Алтайский край, г. Барнаул	06.2023 г.	Соответствует
10	Софора японская плоды	«ФитоКонтинент» ИП Лукьянов (г. Барнаул)	06.2023 г.	Соответствует

2.2. Оборудование и материалы, использованные при исследовании

Согласно принятой практике подготовки научных кадров на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, в данной диссертационно-исследовательской работе использованы приборы, лабораторное оборудование и материалы исследовательской лаборатории кафедры, а именно:

1. Приборы и оборудование: весы аптечные для сыпучих материалов (ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20) (ЗАО НТМИЗ, Россия); весы аналитические «Metler Toledo XS 204» (Metler Toledo, Швейцария); электроплитки «ПЭ» (АО «Электроприбор», Россия); спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena AG, Germany); роторный испаритель «Labtex ИР-

1 ЛТ» (Лабтех, Россия); высокоэффективный жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор», Россия); люминесцентный микроскоп марки «Альтами» ЛЮМ-2 (Россия); микроскоп «Motic» DM-39C-N9GO-A (Digital Microscopy, Корея); микроскоп «Motic» DM-1802 (Digital Microscopy, Корея); поляризационный микроскоп учебный «ПЛМ-213» (Россия); источник света - высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); голубой светофильтр (420-550 нм); желтым светофильтром (330-400 нм); источник света – лампа галогенная 6В, 20Вт; ЯМР-спектрометр Jeol «JNM-ECX 400» (Jeol, Япония); хромато-масс-спектрометр жидкостной «EXPEC L-Chrom MS WR» (Hangzhou EXPEC Technology Co., Ltd., Китай); ротационный микротом Rotary 3002 PFM (Германия); аква-дистиллятор электрический ДЭ-50 (Россия); сушильный шкаф;

2. Реактивы и материалы: пластины хроматографические марки «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия); силикагель КСК 50/100 мкм (ООО «ИМИД», Россия); полиамид (MN Polyamid SC 6, Германия); ацетонитрил для ВЭЖХ (ООО «Компонент- Реактив», Россия); хлороформ ХЧ (ООО «Компонент-Реактив», Россия); спирт этиловый медицинский 96% ХЧ (ООО "Сканди", Россия); *n*-бутанол (ООО «Компонент-Реактив», Россия); ледяная уксусная кислота (ООО «Компонент-Реактив», Россия); β -Глюкозидаза из миндаля, лиофилизированный порошок, 100ед (Sigma-Aldrich, США); фильтры обеззоленные «Красная лента» (ООО «МЕЛИОР XXI», Россия); фильтры обеззоленные «Синяя лента» (ООО «МЕЛИОР XXI», Россия); вода дистиллированная; лабораторная посуда (пикнометры на 2 и 5 мл, колбы на 25, 50, 100 мл, колбы 1000 мл для перколяции, хроматографические колонки, хроматографические камеры, цилиндры, пипетки, чашки керамические для выпаривания и др.) [14, 15, 58].

В ходе структурных исследований выделенных флавоноидов нами использованы такие базы данных, как CAS Common Chemistry, PubChem, ChemSynthesis и другие источники.

В исследовании использованы СО рутин, СО кверцетин, генистеин, софорикозид, кемпферол-3-*O*-софорозид кемпферол, цинарозид.

2.3. Методы исследования

Исследования проводились с использованием морфолого-анатомических, химических, хроматографических, спектральных (УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) методов анализа в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации 15 издания (ГФ РФ XV издания) [8].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XV изданий [8].

При разработке плана диссертационного исследования был изучен опыт подобных исследований в мире [15, 27, 55, 56, 58, 76, 85, 137].

2.3.1. Морфолого-анатомические методы.

Исследование образцов осуществляли аналогично проводимым ранее исследованиям: методом световой микроскопии в проходящем и отраженном свете с увеличением кратным 40, 100, 400 с помощью микроскопов марки «Motic» DM-39C-N9GO-A и DM-1802 -Digital Microscopy (Корея); методом люминесцентной микроскопии с использованием люминесцентного микроскопа марки «Альтами» ЛЮМ-2 (Россия) и применением голубого и жёлтого светофильтров 32 мм и источника света - высоковольтной ртутной лампы (НВО 100Вт) [14, 15, 39, 41, 58]. Спектральный диапазон возбуждения люминесценции при голубом светофильтре – 420-550 нм; при желтом светофильтре – 330-400 нм. Для поляризационной микроскопии использовали учебный поляризационный микроскоп ПЛМ-213 с диапазоном увеличения от х40 до х630 и источником света (галогенная лампа 6В).

Приготовление и окраска микропрепаратов осуществлялись в соответствии с требованиями ГФ РФ XV ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного

растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» [8].

В итоге были приготовлены продольные, поперечные и поверхностные срезы плодов софоры японской, поперечные срезы плода в области условного черешка, продольные, поперечные и поверхностные срезы семян, «давленные» препараты целых цветков, препараты элементов цветков и соцветий. Надо отметить, что элементов соцветий в сырье с цветками софоры японской встречается много, так же встречается рахис листа и лист (< 10%), что должно быть отражено в новой ФС.

Для просветления срезов нами использовано прогревание в водно-глицериновом растворе хлоралгидрата, применение для этих целей гидроксида натрия не рекомендуем, так как и плоды, и семена, и бутоны содержат большое количество флавоноидов, которые растворялись и окрашивали весь препарат в желтый цвет, и большое количество полисахаридов (тоже дают желтое окрашивание). Размягчение плодов перед нарезкой мы проводили во влажной камере. Все исследуемые объекты запаривали в парафиновые блоки.

При проведении гистохимических исследований мы использовали качественные реакции в соответствии с Государственной фармакопеей XV издания: «Раствор Судан III для выявления липофильных веществ, реакцию с серноокислым анилином для выявления лигнина, спиртовой раствор хлорида алюминия 3% для выявления флавоноидов, раствор гидроксида натрия 10% для выявления полисахаридов, раствор молочной кислоты 80% в присутствии глицерина для выявления лигнина и крахмала, раствор Люголя для выявления крахмала и жиров» [8].

Новые диагностические признаки плодов и семян софоры японской - расположение аморфных скоплений флавоноидов, распределение фенольных соединений в структурах плода софоры японской – выявлены в нашем исследовании впервые, благодаря применению люминесцентной и поляризационной микроскопии.

2.3.2. Хроматографические методы

2.3.2.1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Методом тонкослойной хроматографии исследовали водные и спиртовые извлечения из объектов исследования с применением СО рутина, СО кверцетина, генистеина, софорикозида, кемпферол-3-*O*-софорозида, кемпферола, цинарозида. Исследование проводили в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0003 «Тонкослойная хроматография» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания [8]. Метод использовался при идентификации объектов исследования по доминирующим веществам. Подлинности бутонов и плодов софоры японской и их экстракционных препаратов устанавливали методом ТСХ с применением двух стандартных образцов: для бутонов мы применили рутин и кверцетин, а для плодов софорикозид и кемпферол-3-*O*-софорозида. Проходит регистрацию патент «Методика идентификации бутонов софоры японской», где использован метод ТСХ.

Для идентификации образцов приготовили их водно-спиртовые извлечения в 40% и 70% спирте. Для этого небольшое количество цветков или измельченных на кофемолке плодов помещали на дно пенициллинового флакона и заливали 40% и 70% этиловым спиртом до «зеркала». Экстрагировали 10 минут на водяной бане. Полученные извлечения наносили на хроматографические пластины марки «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ. Для цветков в качестве контроля использовали растворы СО рутин и СО кверцетин в 70% спирте. Параллельно исследовали водно-пропиленгликолевый экстракт Софоры (плоды), раствор сухого экстракта софоры (плоды) в 70% спирте этиловом. Для плодов контролем ставили также растворы рутин и кверцетин в 70% спирте этиловом и извлечение измельченных гербарных образцов плодов софоры японской в 40% и 70% спирте этиловом.

В камеру для ТСХ заливали систему растворителей и оставляли для насыщения на 8-12 часов.

Предварительно просушили хроматографические пластины в прогретом до 100-105 °С в сушильном шкафу. Отметили линию старта на расстоянии 1,5 см от нижнего старта. На старте сделали разметку: 1 см от края и 1,5 см между пробами. Линию финиша (фронта растворителя) отметили, отступив 1 см от верхнего края.

Пробы наносили тонким стеклянным капилляром в соответствии с таблицами 2 и 3. После каждого образца капилляр промывали 3 раза 70% спиртом. Перед нанесением образца капилляр промывали 2 раза самим образцом, чтоб исключить контаминацию. Первую каплю с капилляра промокивали фильтровальной бумагой, затем наносили одним касанием образец на линию старта на пластину для хроматограммы. Между касаниями необходимо дождаться высыхания ранее нанесенных точек. В конце закрепляли 2-3 раза все пробы 96% спиртом. Дожидались высыхания (можно на 3-5 сек поместить в теплое место). Аккуратно, чтоб пластинка ровно коснулась нижним краем раствора, помещали пластинку в камеру для хроматографии. Использовали две системы растворителей: хлороформ-этиловый спирт 96%-вода (25:18:2); *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2). Система растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) лучше разделял вещества и в дальнейшем мы использовали только ее.

Время прохождения подвижной фазы на ТСХ 1,0 - 1,5 часа. Когда фронт растворителя доходил до верхней линии (1 см от верхнего края), доставали пластину, полностью высушивали на воздухе. просматривали в видимом свете; далее - в УФ-свете при $\lambda=254$ и $\lambda=365$ нм. Проявляли хроматограммы напылением 3% спиртового раствора хлорида алюминия (III) и (или) раствор диазобензолсульфокислоты в щелочной среде. Проводили детекцию веществ, как указано выше, интерпретировали и фиксировали результаты в протоколах исследования (Таблица 4 и 5) На этом исследование методом ТСХ завершено.

Таблица 4. Протокол ТСХ идентификации цветков и экстрактов.

Обозначение пробы на пластине	образец	спирт	Кол-во повторений	Вещества в зоне ФСО рутина	Вещества в зоне ФСО кверцетина
рут	ФСО рутина	70	3	Обнаружено	Слабо
кверц	ФСО кверцетина	70	3	Обнаружено	Обнаружено
1	1	40	5	Обнаружено	Обнаружено
2	2	40	5	Обнаружено	Обнаружено
3	3	40	5	Обнаружено	Обнаружено
4	4	40	5	Обнаружено	Обнаружено
5	5	40	5	Обнаружено	Обнаружено
6	1	70	5	Обнаружено	Обнаружено
7	2	70	5	Обнаружено	Обнаружено
8	3	70	5	Обнаружено	Обнаружено
9	Водно- проп экстракт	водно- проп	3	Обнаружено	Слабо
1	сухой экстракта	40	3	Обнаружено	Обнаружено
11	сухого экстракта	70	3	Обнаружено	Обнаружено
12 рут	ФСО рутина	70	3	Обнаружено	Слабо

Таблица 5. Протокол ТСХ идентификации плодов.

Обозначение пробы на пластине	образец	спирт	Кол-во повторений	Вещества в зоне ФСО рутина	Вещества в зоне ФСО кверцетина
Рут	ФСО	70	3	Обнаружено	Слабо

	рутина				
Кв	ФСО кверцетина	70	3	Обнаружено	Обнаружено
1	6	40	3	Обнаружено	Обнаружено
2	7	40	3	Обнаружено	Обнаружено
3	8	40	3	Обнаружено	Обнаружено
4	9	40	3	Обнаружено	Обнаружено
5	10	40	3	Обнаружено	Обнаружено
бК	Гербарный образец плодов Софоры яп.	40	3	Обнаружено	Обнаружено
7	6	70	3	Обнаружено	Обнаружено
8	7	70	3	Обнаружено	Обнаружено
9	8	70	3	Обнаружено	Обнаружено
10	9	70	3	Обнаружено	Обнаружено
11	6	70	3	Обнаружено	Обнаружено
12К	Гербарный образец плодов софоры яп.	70	3	Обнаружено	Обнаружено

Наблюдения:

- 1) Экстрагирование 70% спиртом этиловым идет активнее.
- 2) Рутин в 40% спирте этиловом не растворяется или плохо растворяется
- 3) В хроматограммах плодов различаются зоны 5-6 веществ, RF двух веществ соответствует рутину и кверцетину.
- 4) В водно-пропиленгликолевом экстракте зона кверцетина проявилась слабо.
- 5) Качественные реакции с 3% хлоридом алюминия (III) указывают на наличие фенольных соединений.
- 6) Реакция с ДСК подтверждает наличие фенольных соединений.

На основании проведенных ТСХ были сделаны выводы:

- 1) Экстракция рутина и кверцетина 40% спиртом этиловым из плодов и цветков Софоры японской идет хуже, чем 70% спиртом этиловым,
- 2) Рутин и кверцетин обнаружены во всех образцах растительного сырья.
- 3) В цветках содержание рутина и кверцетина выше, чем в плодах. В плодах доминируют другие флавоноиды.
- 4) Концентрация флавоноидов высокая, для лучшего разделения выявляющихся 5-6 веществ плодов извлечение надо разводить и наносить на пластину один раз.

Метод ТСХ применяли в ходе диссертационного исследования более 100 раз.

2.3.2.2. Колоночная и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Для препаративного выделения веществ, содержащихся в плодах софоры японской, была применена колоночная хроматография на силикагеле с последующей рехроматографией. Для элюирования веществ на силикагеле использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в соотношениях 99:1, 98:2, 97:3, 95:5; 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 и 50:50. Выбранные перспективные фракции элюата подвергали рехроматографии на полиамиде или силикагеле до получения растворов чистых веществ.

Вариантом обращенно-фазовой хроматографии является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Исследования методом ВЭЖХ проводили в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания [8]. Метод использовался при идентификации выделенных веществ, для количественного определения доминирующих флавоноидов (рутина бутонов, софорикозида плодов).

С целью разработки методики количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ подобрали элюентную систему, исключая влияние кверцетина. Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме на высокоэффективной жидкостной хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор», Россия). Исследовали водно-спиртовое извлечение бутонов софоры японской, полученное в оптимальных условиях, водно-спиртовой раствор стандартного образца рутина, водно-спиртовой раствор стандартного образца кверцетина, модельную смесь рутина и кверцетина, извлечение бутонов софоры японской с добавками рутина и кверцетина. Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме, профиль которого приведен в таблице 6.

Таблица 6. Профиль градиента хроматографического разделения рутина и кверцетина в водно-спиртовом извлечении из бутонов софоры японской.

Время, мин	Подвижная фаза	
	А, %	Б, %
0-5	62	38
5-15	62→50	38→50
15-24	50→0	50→100

Условия разделения: колонка - стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм); элюентная система - подвижная фаза А (ПФА) ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, объем 1500 мкл; подвижная фаза Б (ПФБ) ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 6:4, объем 900 мкл. Скорость потока – 100 мкл/мин. Суммарный объем элюента (ПФА и ПФБ) - 2400 мкл. Детекция - при λ 360 нм. Объемы проб - 4 мкл;

В результате проведения ВЭЖХ-анализа выявлено, в примененной градиентной системе при исследовании водно-спиртового извлечения из бутонов софоры японской обнаруживаются два пика, соответствующие времени удерживания рутина и кверцетина.

Разработали методику количественного определения содержания софорикозида (4'-О-β-D-глюкопиранозид генистеина) в плодах софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» с использованием стандартного образца софорикозида, выделенного нами из исследуемого сырья с использованием колоночной хроматографии и идентифицированного с помощью УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии.

2.3.3. Физико-химические методы

Изучение химического строения выделенных из плодов софоры японской индивидуальных веществ проводили на основании данных УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов кислотного и ферментативного гидролиза. Спектры ЯМР ¹H получали на приборе «JNM-ECX 400» (399.78 МГц), спектры ЯМР ¹³C – на приборе «JNM-ECX 400» (100.52 МГц). Масс-спектры были зарегистрированы с применением электро-распылительной ионизации (ESI) на хромато-масс-спектрометре жидкостном «EXPEC L-Chrom MS WR». УФ-спектроскопию проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190-500 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм и раствором сравнения спиртом этиловым 96%. Использовали прямой и дифференциальный варианты спектрофотометрии.

Кислотный гидролиз гликозидов осуществляли в присутствии 2 % хлористоводородной кислоты на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Ферментативный гидролиз гликозидов осуществляли в водном растворе β-глюкозидазы («Sigma»).

2.3.4. Технологические методы

Для наиболее полного извлечения веществ из плодов софоры японской было определено, что оптимальным измельчением является фракция, проходящая через сито с отверстием 2 мм, оптимальный экстрагент - спирт этиловый 70%, соотношение «сырье-экстрагент» -1:50. Для выделения веществ использовали метод ремацерации (дробной мацерации).

Нами было запланировано получить и в итоге получено 1050 мл жидкого экстракта. 1000 мл для получения густого экстракта и 50 мл для фармакологических и микробиологических исследований. Для приготовления взяли 210 г измельченных плодов софоры, которые поместили в 3 экстракционные колбы (по 70 г в каждую). Из общего количества экстрагента добавили 490 мл в первую колбу, учли соотношение 1:5 и то, что часть экстрагента останется в жоме. Далее проводили экстрагирование веществ по общей схеме: «Настаивали сырье в первой колбе с первой частью экстрагента 3 суток, слили через марлевый фильтр 410 мл извлечения во вторую колбу, оставили на 3 суток. В первую колбу добавили двойной объем 70% спирта (140 мл) на 3 суток. Через три дня последовательно перенесли извлечения из второй колбы в третью (замочили сырье), из первой – во вторую, в первую добавили 250 мл 70% спирта, оставили на 3 суток. По истечении времени слили из третьей колбы извлечение в емкость для сбора готового жидкого экстракта и повторили процедуру переноса вытяжки, в первую колбу залили последний объем 70% спирта 250 мл, все оставили на 3 дня» [8, 14, 33, 58]. Процедуру повторяли, каждый раз собирая вытяжку из третьей колбы. Такое проведение процесса экстрагирования позволило максимально истощить сырье, так как постоянно создавалась высокая разность концентраций в сырье и экстрагенте.

Полученную вытяжку поставили в темное место на 24 часа для отстаивания, затем аккуратно слили надосадочную жидкость в выпарительную чашку, остаток жидкости с осадка отжали через марлю туда же. Поместили чашку на кипящую водную баню и упарили содержимое до

состояния густого экстракта. 10,0 г густого экстракта отложили для исследований нейротропной и диуретической активности, остальной смешали с 1,5 кратным количеством силикагелем, высушили на воздухе и перенесли на хроматографическую колонку для выделения веществ.

2.3.5. Биологические методы

В рамках настоящей диссертационной работы определяли диуретический и нейротропный эффекты водно-спиртового извлечения (сгущенного) плодов софоры японской, а также выделенных индивидуальных биоактивных веществ (БАВ) – кемпферол-3-*O*-софорозида и софорикозида.

Исследования проводили на кафедре фармакологии имени ЗДН РФ, профессора А. А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Методики определения диуретической и нейротропной фармакологической активности приведены в Приложении 6.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ *SOPHORA* *JAPONICA* L.

В настоящее время стандартизация бутонов (цветков) софоры японской осуществляется в соответствии с ВФС 42-341-74, а плодов данного растения – в соответствии с ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания [8].

Принимая во внимание современные требования к разделу «Микроскопические признаки», включенные в ОФС 1.5.1.0004 «Цветки» ОФС.1.5.1.0007 «Плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания, актуальным являются исследования в плане совершенствования идентификация бутонов и плодов софоры японской путем выявления новых диагностических признаков данных видов сырья [8].

3.1. Морфолого-анатомический анализ цветков и соцветий софоры японской *Sophora japonica* L.

Морфолого-анатомическое исследование цветков софоры японской проводили в соответствии с ОФС 1.5.1.0004 «Цветки» и ОФС.1.5.1.0007 «Плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания и архивной ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны» [8, 63].

Цветки софоры японской (*Sophora japonica* L.) в фармацевтической практике особенно ценятся за высокое содержание рутина, который достигает максимума в фазе бутонизации. Поэтому для исследования мы выбрали растительное сырье, содержащее только бутоны на разных этапах вегетации, собранных в фазу бутонизации (*Alabastra*). Бутоны софоры японской собирают целыми соцветиями. Соцветие – рыхлая кисть – в процессе заготовки и сушки изламывается, в результате в сырье мы увидели только отдельные бутоны с короткими цветоножками и элементы соцветия и, как потом выяснилось, элементы листа (рис. 1 и 2).

Цветочные бутоны софоры японской эллипсоидной формы, с тонкой короткой цветоножкой, длина с цветоножкой 5-7 мм и диаметром 2-4 мм. Нижняя часть бутонов покрыта плотно прилегающей чашечкой темно-зеленого или коричневого цвета, высота чашечки около 3-4 мм, состоит из 5 сросшихся чашелистиков с продольными полосками у основания. Венчик бледно-желтый или коричневато-желтый, нераскрытый, нежный, выходит за пределы чашечки и содержит 10 свободных тычинок, окружающих опушённый гинецей (пестик) (рис. 1, 2) [13, 66, 86].

Раскрывшийся цветок софоры японской неправильный двусимметричный на короткой цветоножке, состоит из непадающей сросшейся пятичашелистиковой чашечки и пятилепестного венчика мотылькового типа, размер цветка около 10-15 мм; верхний лепесток самый крупный, округлый с загнутой вершиной и ярко-желтым ноготком у внутреннего основания. Остальные 4 лепестка продолговатые. Цвет венчика бледно-желтый. Чашелистики в месте срастания образуют хорошо заметные ребра, в верхней части чашечки чашелистики расходятся и слегка отгибаются. Вокруг цилиндрического и изогнутого опушённого пестика расположено 10 свободных тычинок. В сухом растительном сырье раскрывшийся цветок смят, скручен, венчик бледно-желтый или светло-желтовато-коричневый часто ломаный (рис. 1) [13, 66, 86].

В давленных препаратах цветков софоры японской были обнаружены все описанные диагностические признаки: пыльцевые зерна округлые или треугольные с 3 порами и гладкой экзиной; изолированные кроющие трихомы различной длины (60-660 мкм), слегка изогнутые, обычно состоящие из 1-2 базальных клеток и длинной заостренной дистальной клетки, с гладкими или слегка бородавчатыми стенками; особенности чашелистиков - имеют аномоцитные устья с 4-8 дочерними клетками, покрывающие чашелистики трихомы или их рубцы, паренхима чашелистиков содержит призмы оксалата кальция и аморфные массы рутина; особенности лепестков - покрыты мелкобороздчатой кутикулой, иногда

сопровожаемые тонкими кольцевидными или спиральными сосудами, клетки паренхимы содержат буровато-желтые кристаллические массы рутина, буровато-желтые кристаллы рутина, свободные или включенные в клетки, в виде кристаллических масс или веерообразных агрегатов очень тонких иголок; свободные призмы оксалата кальция (рис. 3).

Ранее не описанными элементами цветка, имеющими диагностическое значение в определении видовой специфичности софоры японской, являются тычиночные нити.

В структуре цветка андроцей представлен десятью свободными тычинками, диагностируемыми при морфологическом анализе (рис. 1 В-Д). При анализе микропрепаратов цветков софоры японской тычиночные нити имеют форму вытянутого конуса с остроконечной верхушкой в области связника (Рис. 4). Структура тычиночной нити сильно паренхимизирована. На просвете диагностируются два проводящих пучка. С поверхности тычиночные нити голые. В структуре заметны клетки паренхимы с кристаллическими включениями бурого цвета (рис. 4). Эпидермис тычиночных нитей мелкоклеточный. Клетки эпидермы изодиаметрические неправильной угловатой формы. Клеточные стенки целлюлозные с малозаметными простыми порами. Протопласты аморфные слабо пигментированные. Устьичных аппаратов на поверхности нет.

Гинецей апокарпный, состоящий из одного плодолистика узколанцетной формы с небольшим слабо развитым рыльцем. С поверхности гинецей густоопушен простыми кроющими, бичевидными волосками. Степень опушения варьирует: у основания опушение выражено сильнее, верхушка гинецея опушена слабо (рис. 5 Б). При детальном рассмотрении (x400) диагностируется бурая пигментация протопласта конечных клеток, кроющих трихом (рис. 5).

Анализ промышленного образца цветков софоры японской выявил, что в сырьё встречаются элементы листа (до 10%). В частности, обнаружены фрагменты листовых пластинок (рис. 2 Д) причем чаще всего встречаются

рахисы сложного листа (рис. 2Е). Исходя из общеботанической теории известно, что петиолярная анатомия – анатомия листовых черешков и рахисов цветковых растений является узко специфическим признаком и используется в таксации видов [8, 57]. В виду того, что в сырье встречаются, как правило, фрагменты рахисов, сложно трактовать локализацию среза. Поэтому нами изучены поперечные сечения только медиальной части рахиса (рис. 6).

На поперечном сечении рахиса в медиальной части видна его овальная форма с широко-треугольным усечением с адаксиальной стороны (рис. 6 Б). Проводящая система черешка представлена двумя округлыми сосудисто-волокнистыми пучками коллатерального типа, расположенными по рёбрам с адаксиальной части среза. По периферии пучки армированы непрерывным кольцом плотно сомкнутых склеренхимных волокон с лигнифицированными клеточными стенками (рис. 6 В, Д).

В основном объеме рахиса диагностируется непучковое строение, представляющее замкнутое кольцо ксилемных и флоэмных клеток, повторяющих очертание поперечного сечения. Аналогично пучкам в рёбрах рахиса центральная часть армирована непрерывным кольцом склеренхимных волокон (рис. 6 Г).

В центре среза локализована основная паренхима мезофилла, составленная округлыми клетками. Клетки средней части пустотелые, протопласт не диагностируется. Клеточные стенки их часто лигнифицированы (рис. 6 Е-Ж).

Рахис с поверхности покрыт эпидермисом с выраженной кутикулой, окрашивающейся раствором Судана III в розовый цвет (рис. 6 Г).

Под эпидермой локализован слой хлорофиллоносной ткани до семи клеток в толщину. Клетки хлорофиллоносной ткани мелкопросветные. С заметно утолщенной целлюлозной клеточной стенкой (рис. 6 В, Г).



Рисунок 1 - Морфологические элементы в промышленном образце цветков софоры японской: А – общий вид сырья, Б - гинецей, В – отгиб венчика, Г – совокупность тычиночных нитей, Д – андроцей и гинецей цветка на цветоложе.



Рисунок 2 - Морфологические элементы в промышленном образце бутонов софоры японской: А – общий вид сырья, Б, В, Г – бутоны разной степени развитости, Д – фрагмент листочка сложного листа, Е – стеблевые части соцветий.

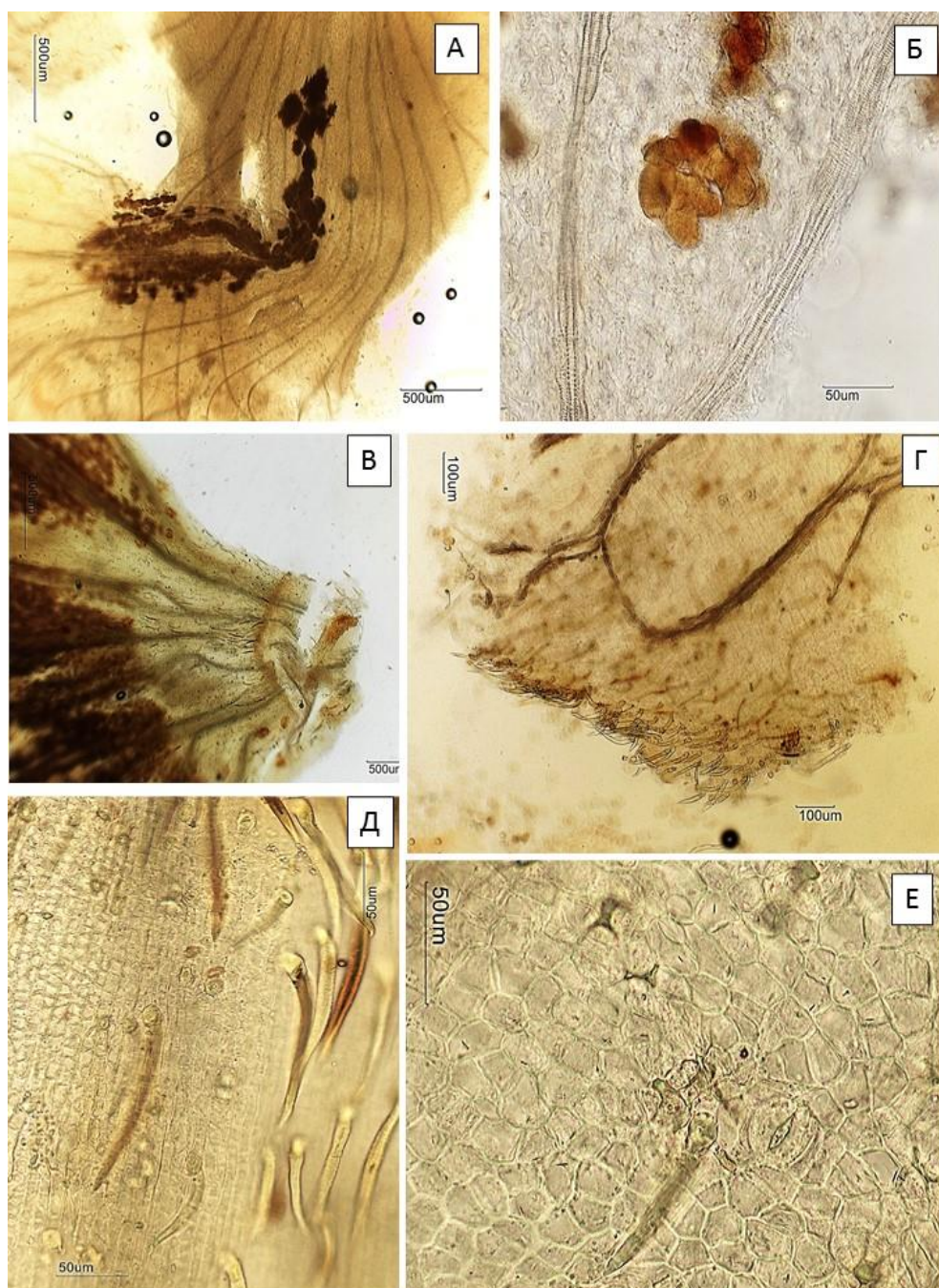


Рисунок 3 - Гистологические особенности лепестков венчика: А – фрагмент лепестка цветка с бурыми клетками, заполненными кристаллическим песком(×40), Б – сосуды ксилемы и клетки с бурым протопластом лепестков (×400), В – фрагмент основания лепестка (×40), Г – отгиб венчика с кроющими трихомами (×40), Д – простые многоклеточные бичевидные волоски с бурым пигментом в протопласте в области основания венчика (×400), Е – устьичные аппараты аномоцитного типа эпидермы венчика(×400).

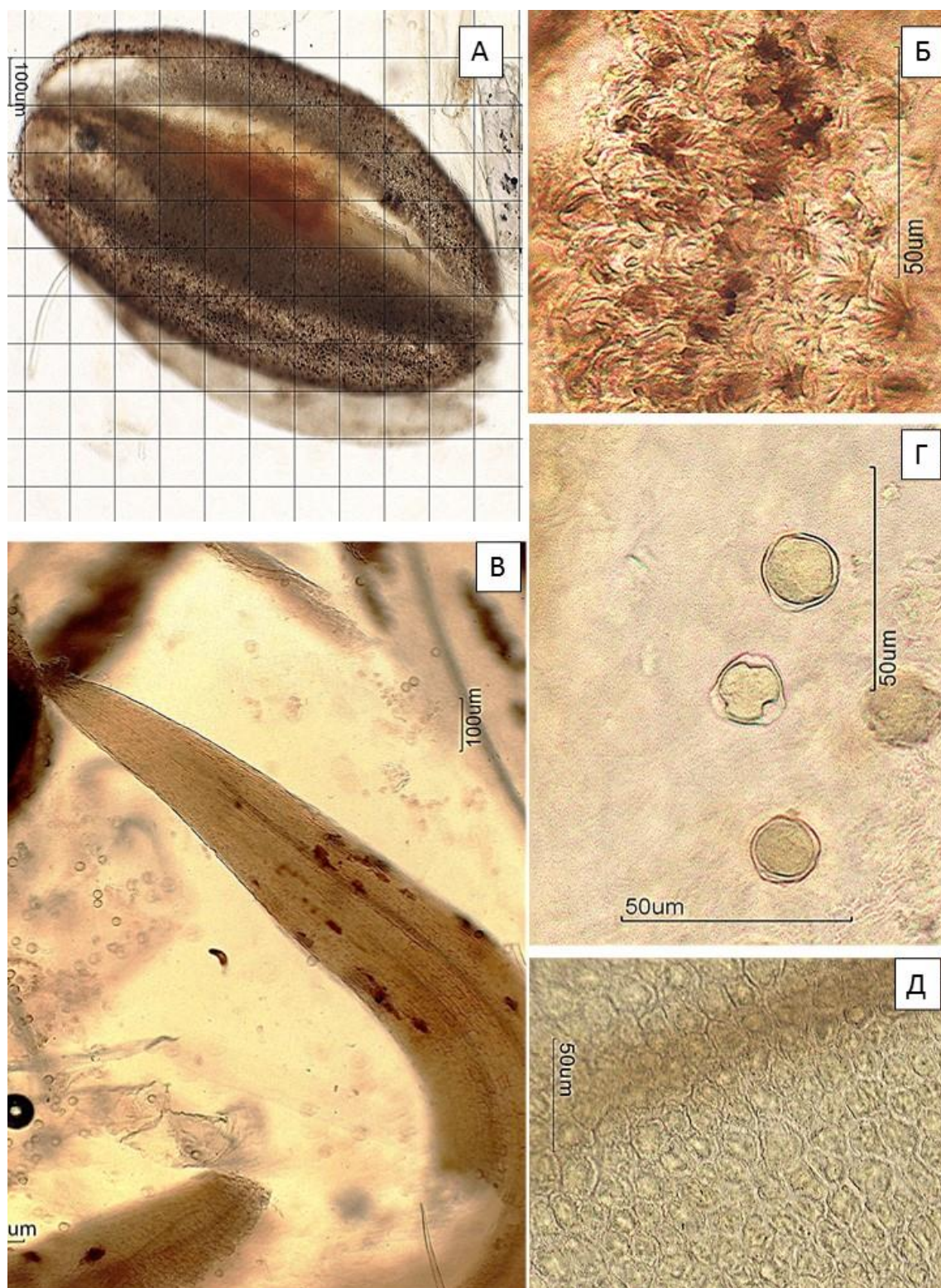


Рисунок 4 - Гистологические особенности андроеца цветка: А – тека пыльника ($\times 100$), Б – поверхность теки пыльника с морщинистой кутикулой ($\times 1000$), В – тычиночная нить ($\times 100$), Г – пыльцевые зёрна в различных проекциях ($\times 400$), Д – эпидермальная поверхность тычиночной нити ($\times 400$).



Рисунок 5 - Гистологические особенности гинецея цветка: А – основание гинецея ($\times 100$), Б – морфология гинецея, В – основание гинецея на поперечном сечении в структуре цветка ($\times 100$), Г – густое опушение поверхности гинецея бичевидными волосками с бурой пигментацией протопласта ($\times 400$).

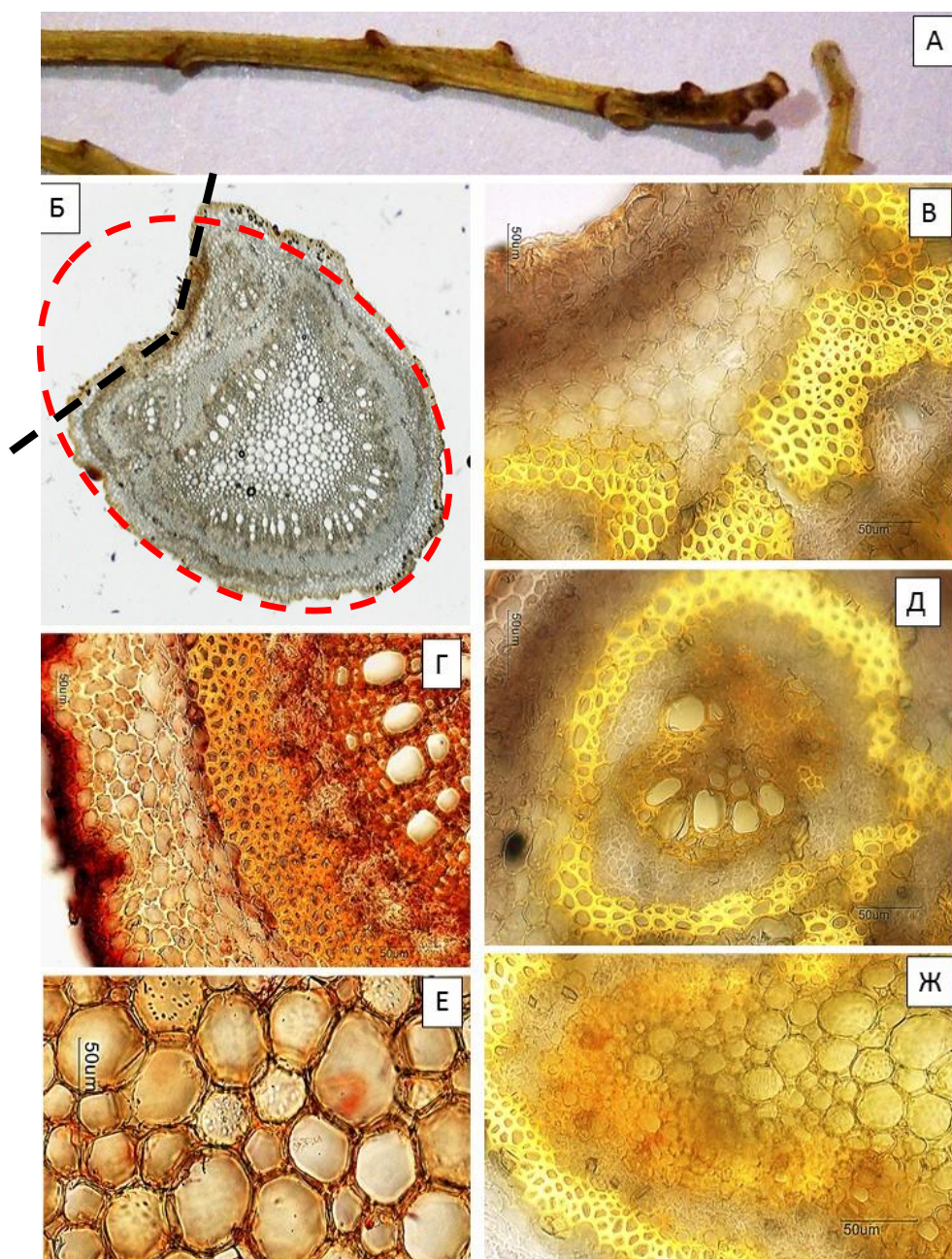


Рисунок 6 - Гистологические особенности осевой части соцветия: А – осевая часть соцветия как элемент сырья, Б – общий вид поперечного сечения осевой части соцветия ($\times 100$), В – склеренхима осевой части соцветия. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$), Г – окраска кутикулы и элементов флоэмной и ксилемной тканей раствором Судана III ($\times 400$), Д – сосудисто-волокнистый пучок. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$), Е – основная паренхима сердцевины. Окраска раствором Судана III ($\times 400$), Ж – непучковые элементы проводящих тканей. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$).

Критический анализ имеющихся стандартов (ФС) по подтверждению подлинности цветков и бутонов софоры японской методом микроскопии выявил отсутствие ряда признаков в современных нормативных документах [13, 63]. В частности, в диагностике цветков в фундаментальной ботанике трактуется анатомия цветоножек, которая наряду с петиолярными признаками зачастую является видовой специфичностью и позволяет проводить селективную диагностику таксонов [8, 32, 33, 53, 57].

Учитывая, что у цветков и бутонов цветоножка, имеющая размеры около 3 мм, является устойчивым морфологическим элементом, её анатомические особенности могут служить дополнительным диагностическим признаком в том числе в анализе измельченного сырья.

В процессе анализа нами проводилось микромирование плодоножки от её основания в направлении фертильных частей цветка и околоцветника. Анатомио-гистологические особенности цветоноса в разных частях среза, в том числе в области прикрепления завязи к цветоложу, представлены на рисунке 7.

Поперечное сечение плодоножки имеет округлое очертание с выраженной однородной волнистой ребристостью (рис. 7).

Анатомия поперечных сечений цветоножки на разных уровнях среза отличается по степени развитости тканей.

Так, в области прикрепления завязи к цветоложу отмечается большая полость в центре с местом прикрепления гинецея (рис. 8 АВ). Выше, в области завязи, полость расширяется, место прикрепления не диагностируется, а анатомическая структура принципиально схожа.

С поверхности цветоножка покрыта эпидермой, сложенной из тонкостенных паренхимных клеток со слабо выраженной кутикулой. На поверхности эпидермы изредка встречаются простые бичевидные волоски, описанные ранее для других частей растения (рис. 8 Б).

Под эпидермой локализован слой уголково-пластинчатой колленхимы, залегающий непрерывным кольцом и достигающий трёх слоёв клеток.

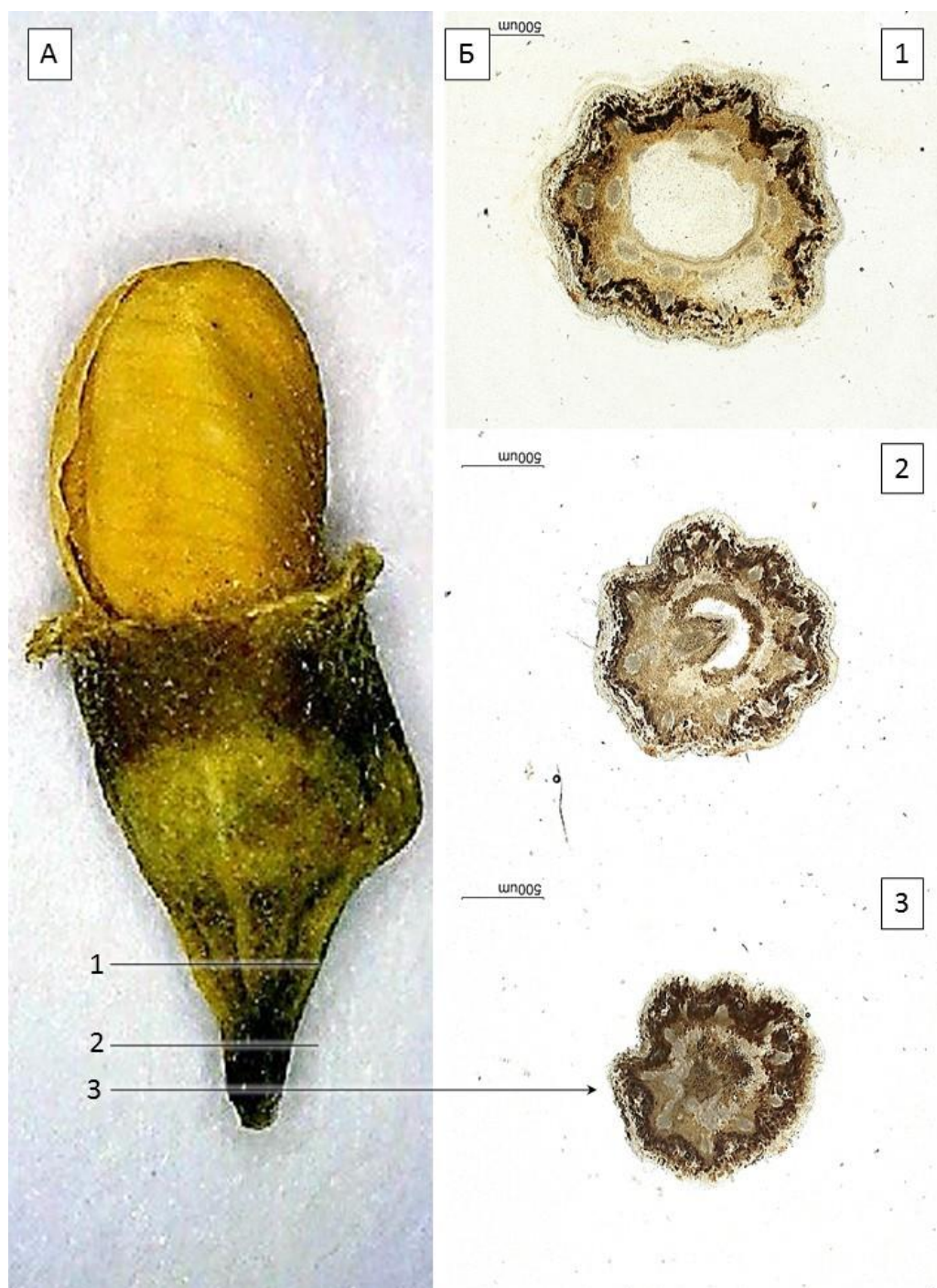


Рисунок 7 - Гистологические особенности цветоноса: А – общий вид бутона, Б – анатомические срезы цветоножки и части околоцветника ($\times 40$).

Обозначения: 1 – поперечное сечение в области завязи гинецея, 2 – поперечное сечение в области прикрепления гинецея, 3 – поперечное сечение в области цветоножки.

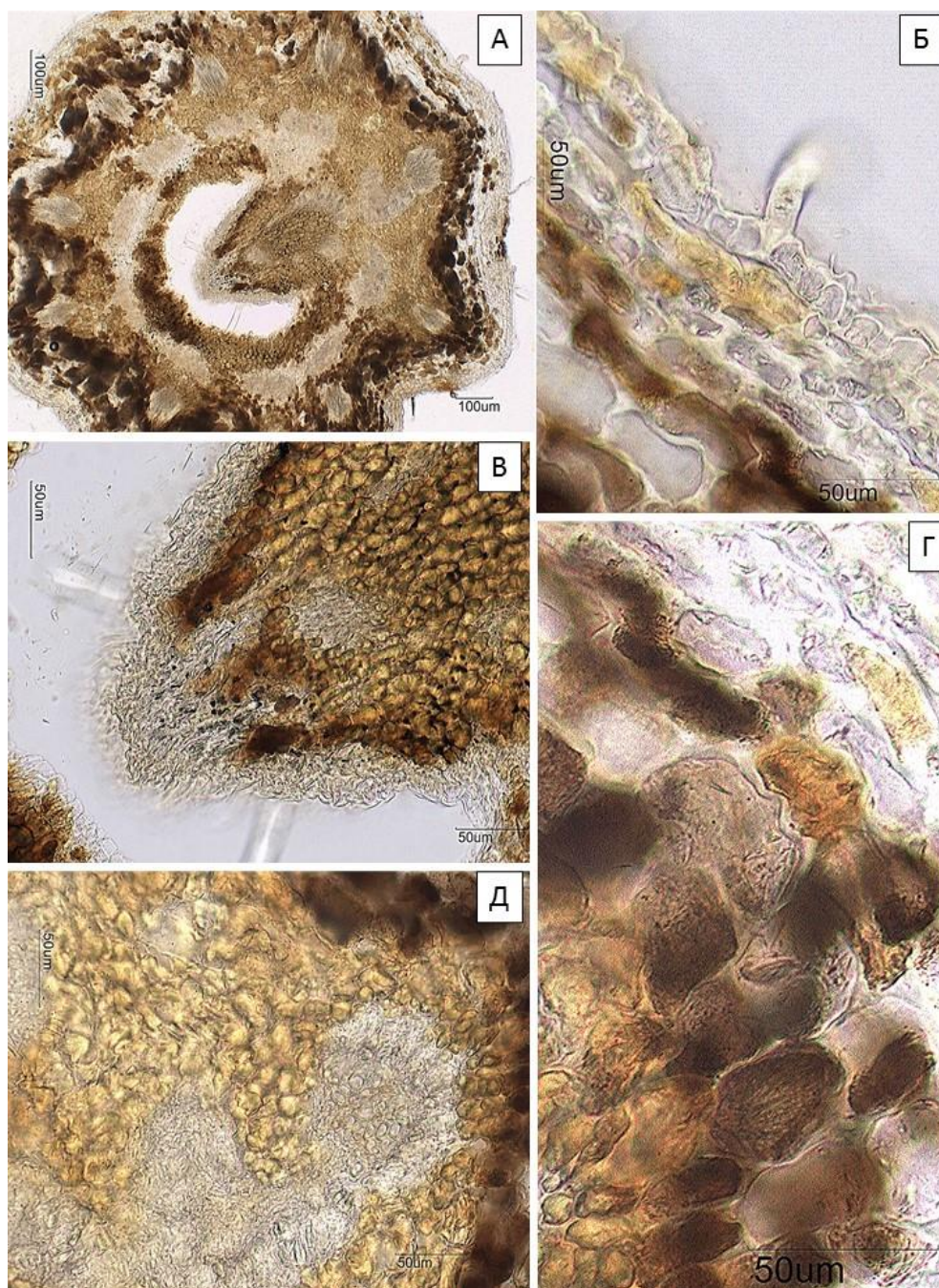


Рисунок 8 - Гистологические особенности околоцветника на поперечном сечении в области прикрепления завязи к цветоложу: А – общий вид поперечного сечения с местом прикрепления гинецея ($\times 100$), Б – уголков-пластинчатая колленхима под эпидермальной поверхностью ($\times 400$), В – ткани места прикрепления гинецея ($\times 400$), Г – клетки паренхимы с бурым кристаллическим песком ($\times 400$), Д – проводящие пучки в области чашечки околоцветника ($\times 400$).

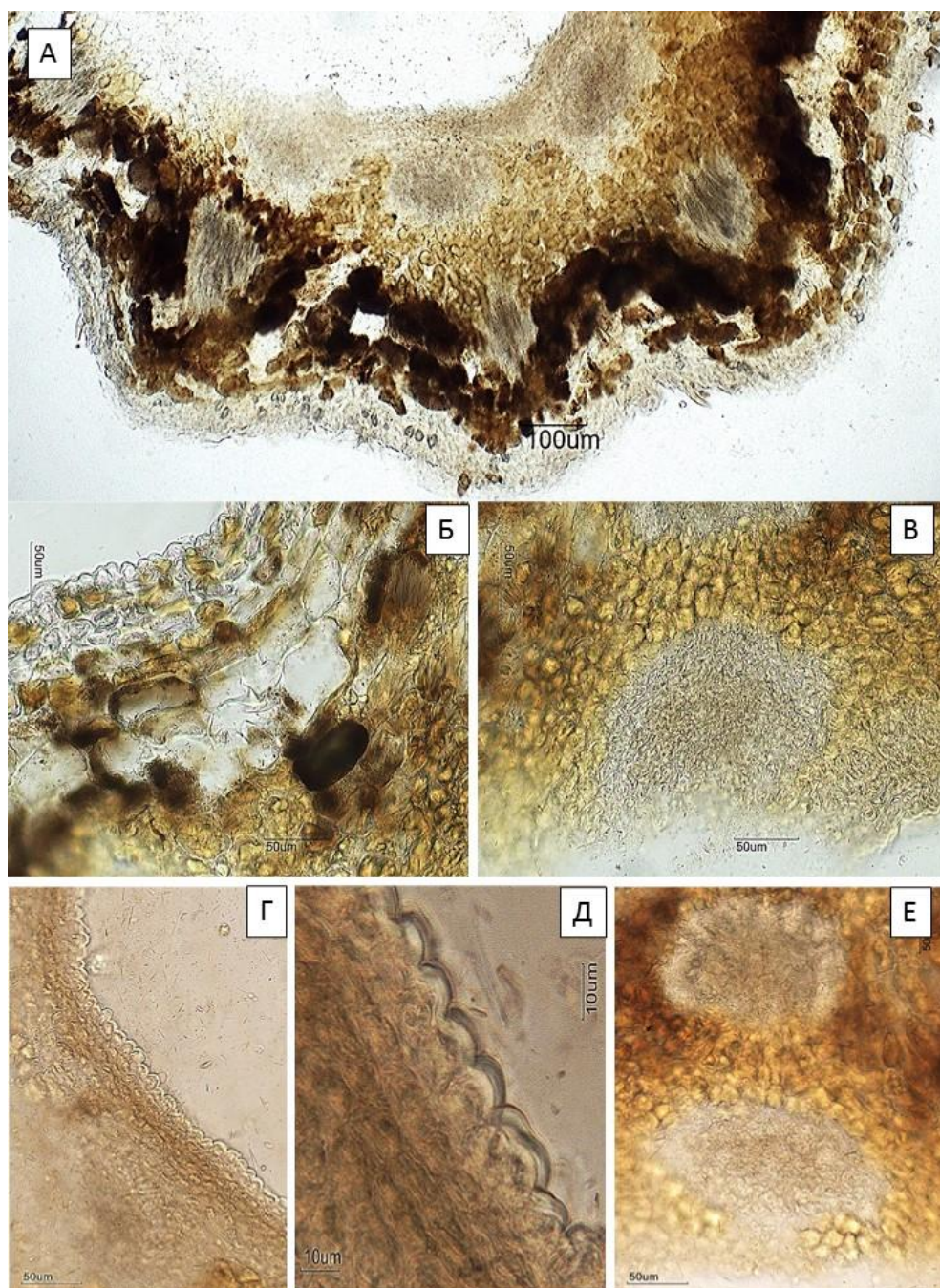


Рисунок 9 - Гистологические особенности околоцветника на поперечном сечении в области завязи: А – фрагмент поперечного сечения чашечки и венчика в области завязи ($\times 100$), Б – эпидермис и колленхима ($\times 400$), В – проводящий пучок центральной оси стебля ($\times 400$), Г – внутренний эпидермис околоцветника со стороны завязи ($\times 400$), Д – эпидермальные клетки внутренней эпидермы с кутикулой ($\times 1000$), Е – двойной ряд проводящих пучков за счет жилок чашелистиков ($\times 400$).

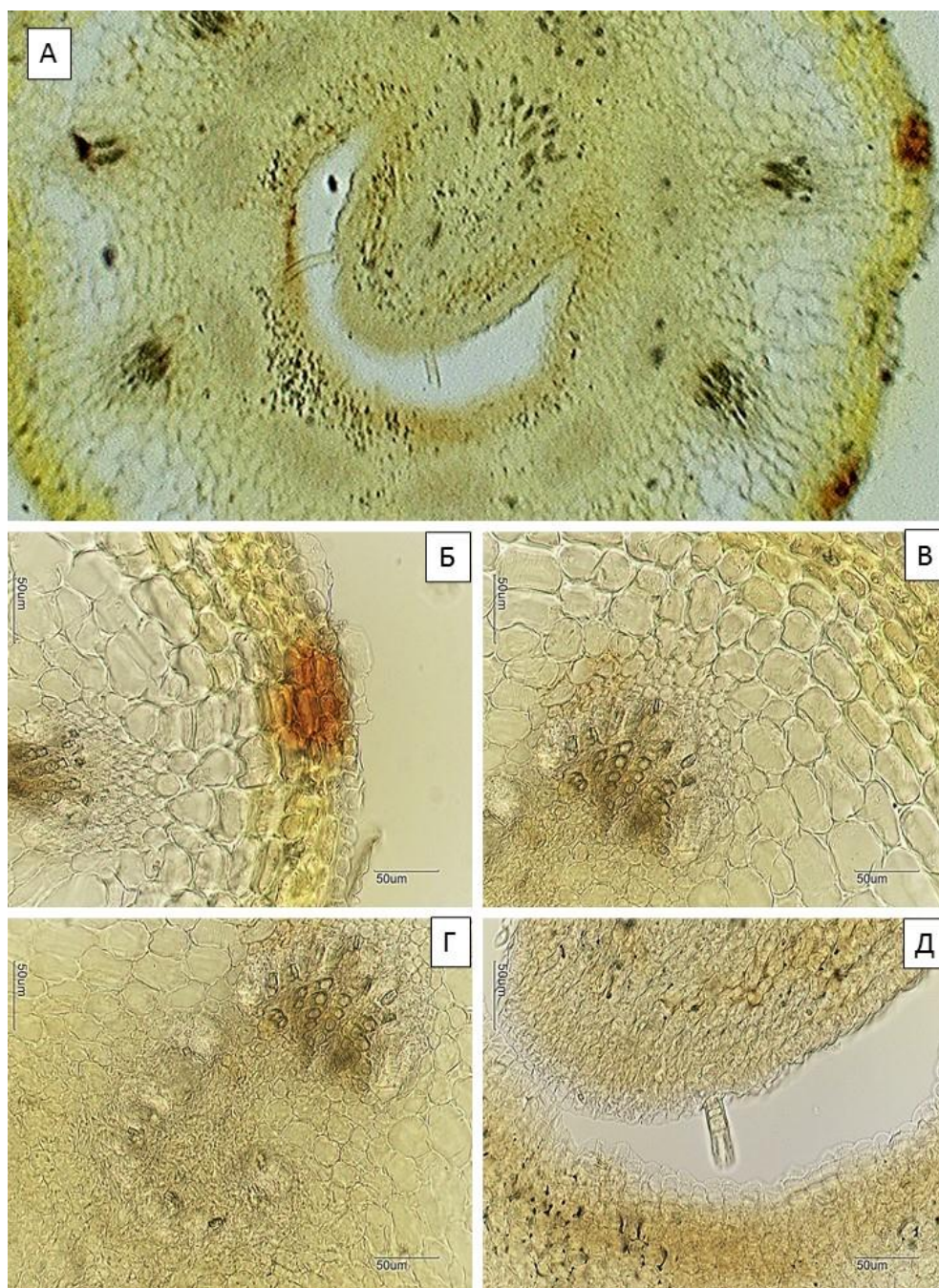


Рисунок 10 - Гистологические особенности околоцветника на поперечном сечении в области завязи при обработке раствором щёлочи: А – общий вид поперечного сечения после обработки раствором щелочи ($\times 100$), Б – бурая пигментация в области эпидермы ($\times 400$), В – колленхима и основная паренхима ($\times 400$), Г – два ряда проводящих пучков ($\times 400$), Д – опушение на месте прикрепления гинецея ($\times 400$).

Проводящая система представлена открытыми коллатеральными проводящими пучками, расположенными в два круга симметрично по отношению к рёбрам (рис. 8 А). Пучки внешнего круга мельче по размеру. По периферии пучки армированы группой склеренхимных волокон, имеющих не лигнифицированные клеточные стенки.

Внутренняя полость покрыта эпидермой околоцветника, состоящей из мелких клеток с сильно кутинизированной волнистой поверхностью (рис. 9 Г, Д). На поверхности внутренней эпидермы могут встречаться простые бичевидные волоски, особенно в месте прикрепления гинецея (рис. 10 А, Д).

Структура цветоножки сильно паренхимизирована. Клетки основной паренхимы, подстилающие уголково-пластинчатую колленхиму крупные, тонкостенные с кристаллическим порошком тёмно-бурого иногда до черного цвета (рис. 8 А, Г, 9 А). Они локализованы кольцом, включающим внешнюю группу проводящих пучков.

Внутреннее кольцо проводящих пучков окружено мелкоклеточной паренхимой. Клетки паренхимы округлой формы с плотным аморфным протопластом желтого или светло-желтого цвета (рис. 8 Д, 9 В, Е).

При обработке 0,1% раствором NaOH кристаллический порошок в клетках паренхимы полностью растворяется с характерной желтой окраской. Что говорит о фенольной природе выявленных кристаллических включений (рис. 10).

После щелочной обработки среза проявляются буропигментированные области колленхимной и эпидермальной ткани (рис. 10 Б).

Таким образом, из ранее не описанных признаков, имеющих диагностическое значение в определении видовой специфичности софоры японской, описанные нами впервые гистологические особенности тычиночных нитей и гистологические особенности гинецея цветков, цветоножек на разных уровнях среза.

К наиболее диагностичным можно отнести:

- Тычиновные нити поверхности голые, в структуре заметны клетки паренхимы с кристаллическими включениями бурого цвета (рис. 4).
- Гистологические особенности гинецея цветка софоры японской - густое опушение поверхности гинецея бичевидными волосками с бурой пигментацией протопласта (рис. 5, 10).

3.2. Морфолого-анатомический анализ плодов софоры японской *Sophora japonica* L.

Исследовались образцы воздушно-сухих плодов софоры японской. Использовали световой, поляризационный и люминесцентный микроскопы, марки и комплектность которых подробно приведены в части 2.3.1. «Морфолого-анатомические методы».

Гистологические срезы делали из запаянных в парафиновые блоки целых плодов и отдельных семян софоры японской с помощью роторного микротомы. Окраску микропрепаратов осуществляли в соответствии с общими фармакопейными статьями ГФ РФ XV: ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения», ОФС.1.5.1.0007 «Плоды», ОФС.1.5.1.0008 «Семена», ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» [13, 64].

Провели идентификацию цельного сырья приобретенных для диссертационного исследования образцов плодов по ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» по внешним признакам: «По морфологическому типу – это бобы, нераскрывающиеся, приплюснуто-цилиндрические, чётковидные, многосемянные, до 10 см длиной, 0,5–1 см шириной. Цвет плодов (околоплодника) зеленовато-коричневый с хорошо заметным швом светло-жёлтого цвета. Запах отсутствует. Внутри бобов (видно на изломе) и в цельном сырье находятся не овальные (сдавленные с боков), гладкие семена до 1 см длиной и шириной 0,4–0,7 см, тёмно-коричневые и почти чёрный. Часть семян недоразвита» (рис. 11) [13, 64].

Также были обнаружены микроскопические признаки, указанные в ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*»: «При рассмотрении микропрепаратов эпидермиса околоплодника с поверхности видны многоугольные клетки наружной стороны и с прямыми или слабоизвилистыми стенками с внутренней стороны. На наружной стороне околоплодника обнаружили устьица, погружённые, овальные или округлые, окружены несколькими клетками удлинённой формы, образующими характерную розетку. Мякоть околоплодника представлена рыхлой паренхимой, состоящей из крупных, тонкостенных клеток. В паренхиме встречаются мелкие проводящие пучки»[13, 64].

«Кольчатые сосуды», «кристаллы и друзы кальция оксалата разного размера», «устыичный комплекс парацитного типа», указанные в ФС.2.5.0130 мы не обнаружили [13, 64].

Не все внешние признаки исследуемых нами промышленных образцов воздушно-сухих плодов софоры японской соответствуют требованиям ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды». Сырьё представляло собой цельные бобы 1-10 см длиной 0,5-1,0 см шириной, нераскрывающиеся, приплюснuto-цилиндрические, чётковидные, одно и многосемянные, часто изогнутые. Также присутствуют обломки бобов, обломки околоплодников и семена (рис. 11). Семена овальной формы с боковой проекции семени и сжато-эллипсовидной формы со стороны корешкового рубчика, длиной 0,5-1,0 см, шириной 0,4-0,7 см. Поверхность плодов блестящая, бугристая. Цвет плодов от светлого до темного зеленовато-коричневого. Хорошо заметен светло-желтый брюшной шов боба (рис. 11). Внутренняя сторона околоплодника светлее наружной, блестящая, бугристая (рис. 11). Семя – тёмно-коричневое или почти чёрное, гладкое, блестящее (рис. 11, 15). Поверхность семени кожистая не одревеневшая. С одной из узких сторон семени хорошо виден вогнутый рубчик белого цвета и выпуклая корешковая лопасть (рис. 15). В поперечном разрезе семени видны две семядоли желтого цвета (рис. 11). Запах сырья характерный для растительного сырья.

Макроскопическое описание сырья в разделе «Внешние признаки» ФС.2.5.0130 мы считаем недостаточным. Например, форма семени «овальная», а мы видим «овальную с боковой проекции семени и сжато-эллипсоидную форму со стороны корешкового рубчика семени». В поперечном разрезе семя имеет форму эллипса, а не круга как овальные семена. Формулировку «шов желтого цвета» - уточняем, «брюшной шов желтого цвета», так как только с этой стороны он желтый (рис. 11Б, В). Нами приведено описание элементов сырья (обломки околоплодника, обломки боба), так как они присутствуют в сырье. В ФС.2.5.0130. недостаточно описано семя, мы считаем, что структура поверхности, описание рубчика и корешковой лопасти, количества и цвета семядолей обязательны для семени и являются диагностическими признаками [13],

По ФС.2.5.0130 «при рассмотрении микропрепаратов поперечного среза семенной кожуры должно быть видно трёхслойное строение: наружный слой состоит из одного ряда склеренхимных клеток, вытянутых перпендикулярно поверхности семени; второй («палисадный») слой – из одного ряда клеток с сильно утолщёнными стенками и прямоугольными просветами, расположенными перпендикулярно коже семени; третий слой образован клетками колленхимы удлинённой формы с равномерно утолщёнными стенками, расположенными длинными осями параллельно коже семени; ниже расположен слой паренхимы с клетками со слизью» [64]. Далее по ФС.2.5.0130 «клетки связаны между собой тонкими выростами, образующими большие межклетники» [64].

При микроскопии плодов и семян софоры японской мы обнаружили ряд неточностей. По ФС.2.5.0130. «устыца расположены только на наружной стороне эпидермиса околоплодника, погружённые, овальные или округлые, окружены несколькими клетками удлинённой формы, образующими характерную розетку, устьичный комплекс парацитного типа» [64].

Мы предпочитаем и считаем правильное для описания створок боба применять «экзокарпий», «мезокарпий», «эндокарпий» вместо «эпидермис», хотя этот термин и допускается ОФС.1.5.1.0007 «Плоды», но только для описания внешних клеток околоплодника [8].

При рассмотрении среза с поверхности боба мы обнаружили покрывающий адаптационный слой воска, который заполняет межклеточные пространства, при окраске раствором Судан III образуя очень характерный рисунок (рис. 14).

На наружной стороне створок боба мы обнаружили устьица: замыкательные клетки ладьевидной формы крупного размера с сильно утолщенной стенкой, обращенной к устьичной щели; замыкательные клетки окружает более шести около-устьичных клеток (рис. 14). Такое строение устьичного аппарата соответствует энциклоцитному типу, а не парацитному. В устьицах есть хлоропласты, а также мы обнаружили крахмальные включения при окраске раствором Люголя (рис. 14).

По ФС.2.5.0130. «паренхиме встречаются мелкие проводящие пучки, состоящие из кольчатых сосудов, кристаллы и друзы кальция оксалата разного размера». В гистологических продольных и поперечных срезах боба, сделанных с помощью микротомы и в поверхностных срезах плода кольчатых сосудов мы не нашли, зато обнаружили большое количество спиральных сосудов (рис. 14).

Аморфные скопления кристаллоидов, обнаруживаемые в большом количестве, особенно в области ближе к брюшному шву боба, не имеют кристаллической структуры как игольчатые друзы кальция оксалата (рис. 11, 14). Скопления не дают голубовато-бурой люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм и желто-зеленой люминесценции в диапазоне возбуждения 420-500 нм, характерной для кальция оксалата. Кроме того, скопления кристаллоидов легко растворяются в спиртовом растворе хлорида алюминия 3%, дают при этом желтое окрашивание, что не характерно для друз оксалатов, но свойственно фенольным соединениям (рис. 12 E).

Крупных характерных кристаллов кальция оксалата в плодах мы не обнаружили, однако возможно присутствие мелких кристаллов, так как мы видим мелкие точки голубого свечения при люминесцентной микроскопии.

При изучении поперечных гистологических срезов на разных уровнях боба - на поперечном сечении в области верхушки, в медиальной области боба в перемычке (между семенами) и в области условной ножки - мы обнаружили анатомически схожие, характерные для софоры японской структуры: наличие коллатерального пучка почковидной формы со стороны спинного шва и пары коллатеральных пучков со стороны брюшного шва, которые проявляются окраской раствором Судана III (рис. 13 А, Б, В).

При детектировании кристаллической обкладки в тканях вокруг пучка почковидной формы со стороны спинного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром определяется высокая плотность, так же как в кристаллической обкладке в тканях вокруг пары пучков со стороны брюшного шва и в области эндокарпия в месте смыкания створок.

При микроскопическом исследовании семени софоры японской мы обнаружили кристаллические включения в клетках эпидермы семени.

Структура семенной кожуры на поперечном сечении хорошо прокрашивается раствором Судана III. Отчетливо видно механический слой склереид (гиподерма), паренхима, сдавленный слой (рис.15). Боковые стенки склереид имеют округлость в районе смыкания, соответственно и просветы клеток уже нельзя назвать прямоугольными и отнести к характерным для «палисадного» слоя [64].

Также в ФС.2.5.0130 в описании семенной кожуры написано: «третий слой образован клетками колленхимы удлинённой формы». Термин «колленхима» по отношению к семени употреблен неверно, применим только для стеблей.

Нам не удалось обнаружить слизь в семенах, так как сине-голубое свечение в УФ-спектре, по которому можно предположить присутствие слизи, дают только стенки клеток (рис.16). Так же, при постановке

микрoхимической реакции с раствором натрия гидроксида 10 % (реакция на полисахариды) мы получили желтое окрашивание только клеточных стенок.

Реакция с йодом не показала наличия в семядолях крахмала, но с большой вероятностью указывает на наличие алейронового белка в нехарактерном для него аморфном состоянии (окрасился в коричневый цвет, дает голубое с розовым оттенком свечение при 360-400 нм и желто-зеленое при 500 нм).

Все микропрепараты были нами исследованы в диапазоне возбуждения люминесценции с голубым светофильтром (420-550 нм) и желтым светофильтром (330-400 нм), что позволило выявить распределение в тканях плода софоры японской фенольных соединений, в том числе флавоноидов (таблица 7, рис.11, 14-16).

Таблица 7 - Цвет люминесценции микропрепаратов плодов софоры японской

место локализации свечения	цвет люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм	цвет люминесценции в диапазоне возбуждения 420-550 нм	вещества, для которых специфично наблюдаемое свечение
поверхности брюшного шва	голубая	желто-зеленая	фенольные соединения
Семядоли	голубые вкрапления	желто-зеленая	фенольные соединения
клеточных стенок и протопластов клеток энциклоцитного устьичного	голубой	желто-зеленой	фенольные соединения

аппарата			
скопления аморфных кристаллоидов клеток экзокарпия	голубовато-бурый	желто-зеленой	фенольные соединения
клетки и включения эпидермы семени	буровато-голубой	буро-зеленым	фенольные соединения
протопласт клеток эндосперма	буро-голубой	желто-зеленая	фенольные соединения
ткани зародыша: кожуры, эндосперма и семядоли	послойная голубая люминесценции	желто-зеленая	фенольные соединения

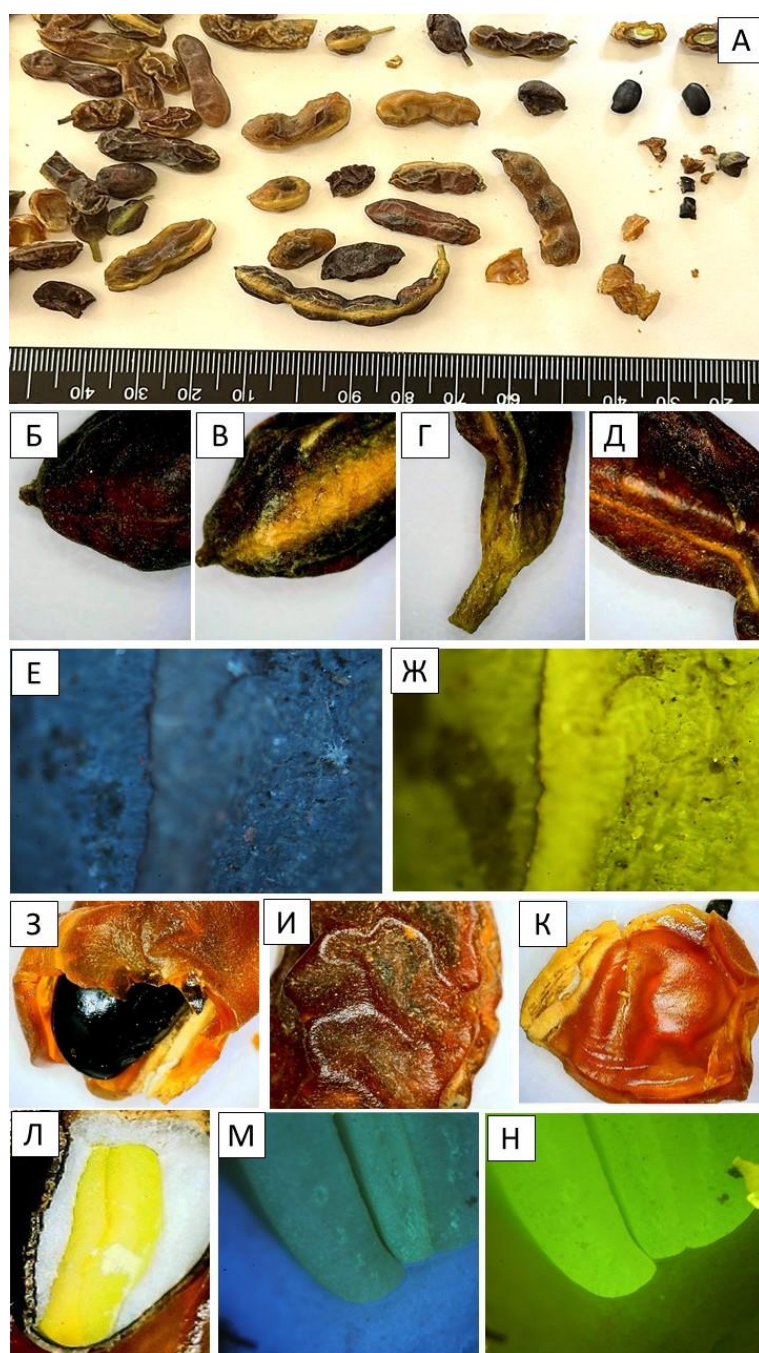


Рисунок 11 – **Морфология бобов софоры японской**: А – общий вид сырья, Б – верхушка боба со стороны спинного шва, В - верхушка боба со стороны брюшного шва, Г – ножка боба со стороны брюшного шва, Д – спинной шов в медиальной части боба, Е – люминесценция поверхности брюшного шва в диапазоне возбуждения 330-400 нм, Ж - люминесценция поверхности брюшного шва в диапазоне возбуждения 420-530 нм, З – излом боба в области семени, И – поверхность створки боба со стороны экзокарпия, К - поверхность створки боба со стороны эндокарпия, Л – разрез семени через зародыш, М - люминесценция тканей семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм, Н - люминесценция тканей семени в диапазоне возбуждения 420-530 нм.



Рисунок 12 – Анатомия створок боба софоры японской на поперечном сечении: А – общий вид боба, Б – поперечное сечение в области верхушки, В – поперечное сечение в медиальной области боба в перемычке (между семенами), Г – поперечное сечение боба в области условной ножки.

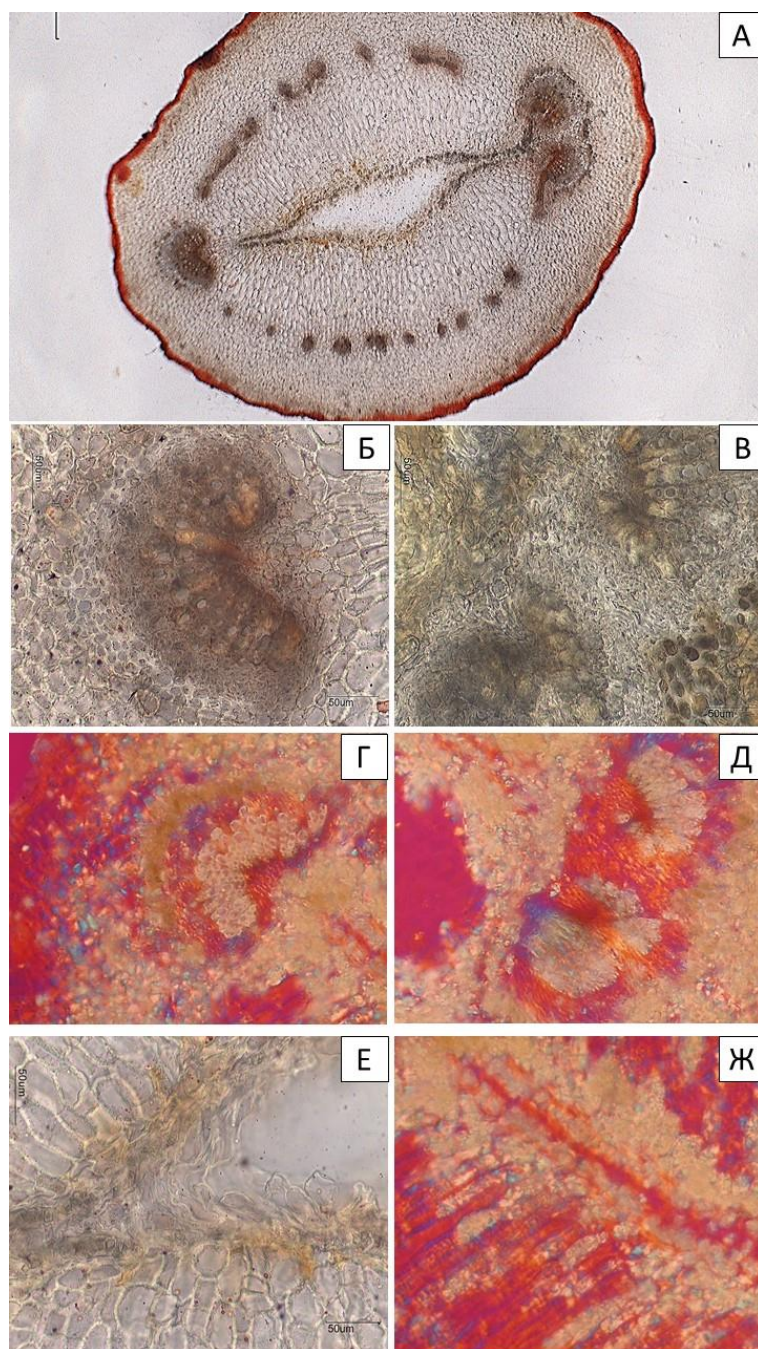


Рисунок 13 – **Анатомо-гистологическая структура створок**: А – Поперечный разрез створок боба в базальной части. Окраска раствором Судана III, Б – коллатеральный пучок почковидной формы со стороны спинного шва ($\times 400$), В – пара коллатеральных пучков со стороны брюшного шва ($\times 400$), Г – детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг пучка почковидной формы со стороны спинного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром ($\times 400$), Д - детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг пары пучков со стороны брюшного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром ($\times 400$), Е – место смыкания створок. Область эндокарпия ($\times 400$), Ж - детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг места смыкания створок в область эндокарпия ($\times 400$).

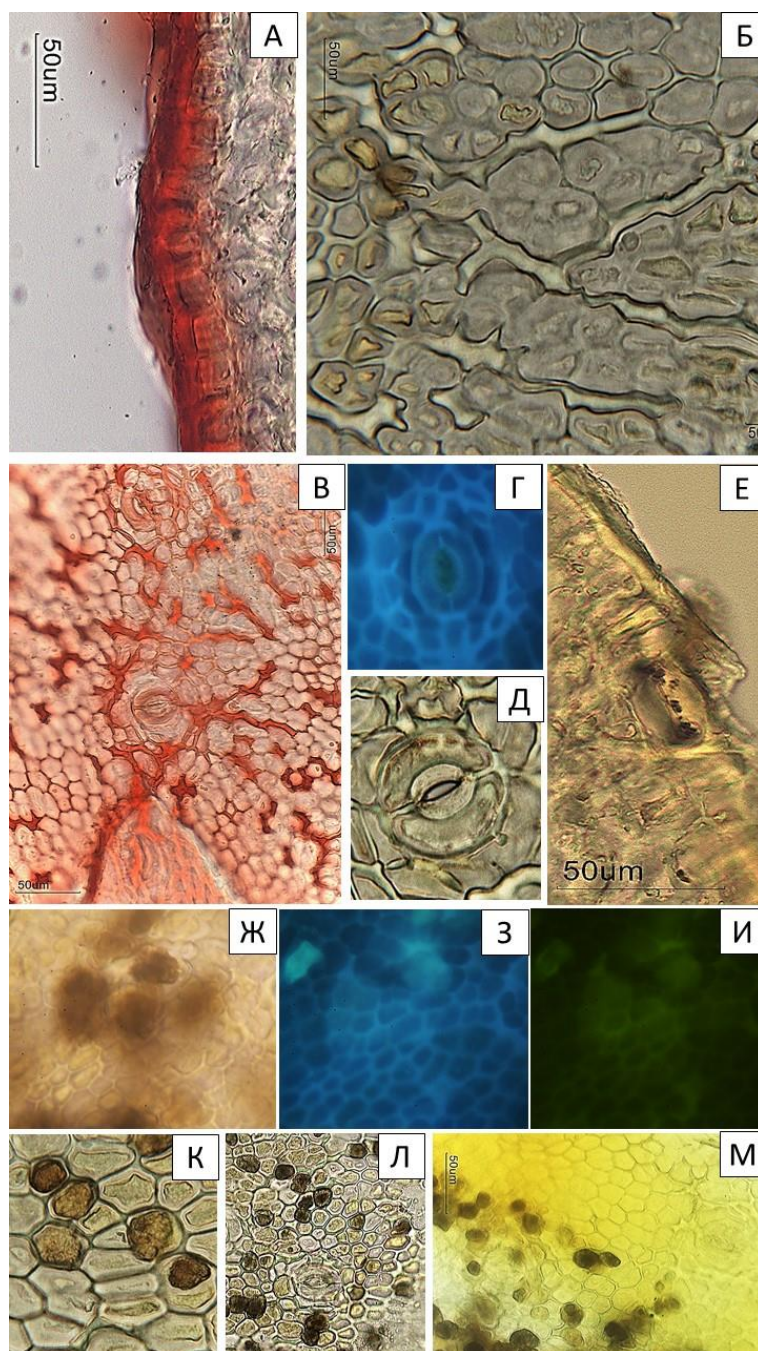


Рисунок 14 – **Диагностические особенности экзокарпия**: А – экзокарпий на поперечном сечении. Окраска раствором Судана III ($\times 400$), Б – Экзокарпий. Вид с поверхности ($\times 400$), В – окраска воскового слоя экзокарпия раствором Судана III, Г – люминесценция клеточных стенок и протопластов клеток энциклоцитного устьичного аппарата в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), Д – Ладьевидная структура замыкающих клеток устьичного аппарата ($\times 1000$), Е - крахмальные зерна в структуре замыкающих клеток устьиц на поперечном сечении экзокарпия ($\times 400$), Ж – кристаллические включения в клетках экзокарпия. Вид с поверхности ($\times 400$), З – люминесценция клеток экзокарпия и кристаллических включений в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), И - люминесценция клеток экзокарпия и кристаллических

включений в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$), К – внутриклеточное расположение амморфных скоплений в клетках экзокарпия со стороны брюшного шва ($\times 1000$) Л – скопление аморфных кристаллоидов в клетках экзокарпия со стороны брюшного шва до обработки реактивом ($\times 400$), М – реакция растворения аморфных скоплений с окрашиванием в желтый цвет при обработке спиртовым раствором хлорида алюминия 3% ($\times 400$).

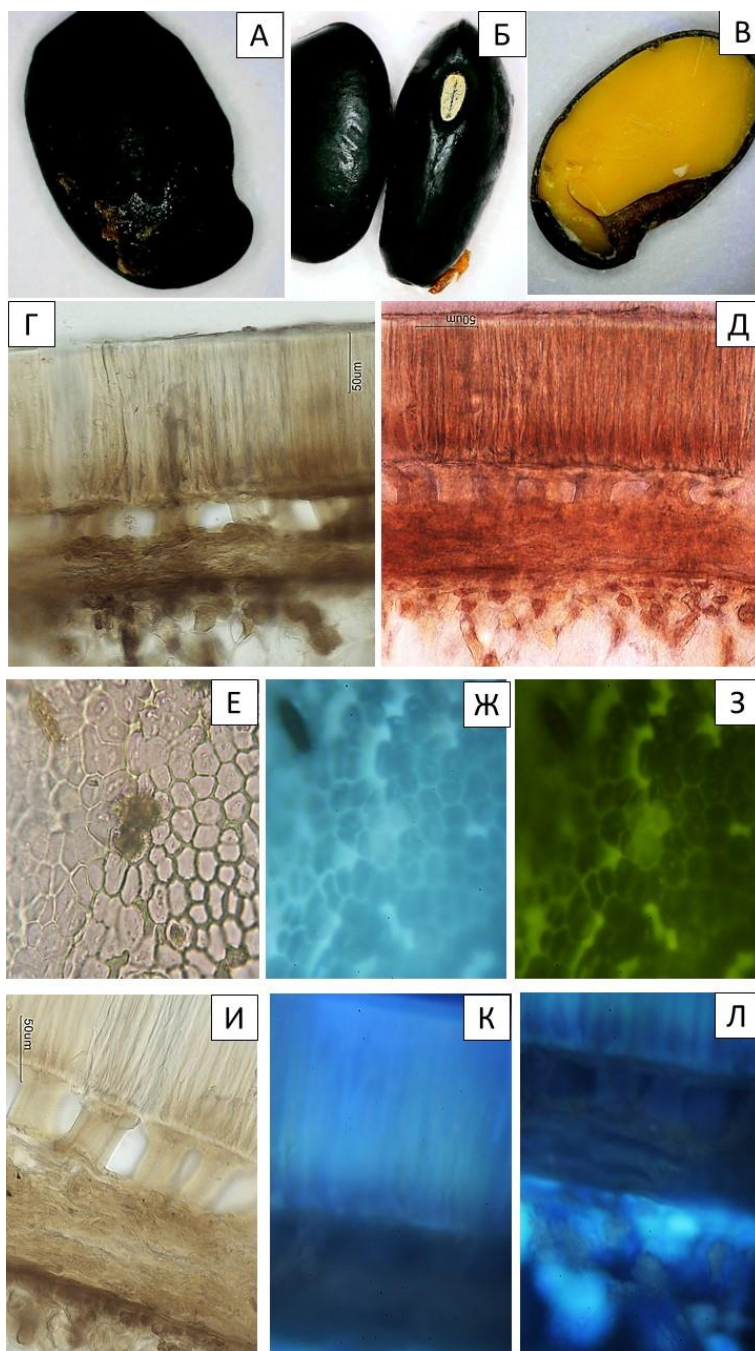


Рисунок 15 – **Морфолого-анатомические особенности семенной кожуры:** А – овальная форма с боковой проекции семени, Б – сжато-эллипсоидная форма с стороны корешкового рубчика, В – желтые семядоли в продольном разрезе семени, Г – структура семенной кожуры на поперечном сечении, Д – окраска семенной кожуры раствором судана III, Е – Клетки эпидермы семени

с поверхности с кристаллическими включениями, Ж – Люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), З - Люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$), И - механический слой склереид (гиподерма), паренхима, сдавленный слой, К – люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), Л – свечение протопластов клеток эндосперма в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$).

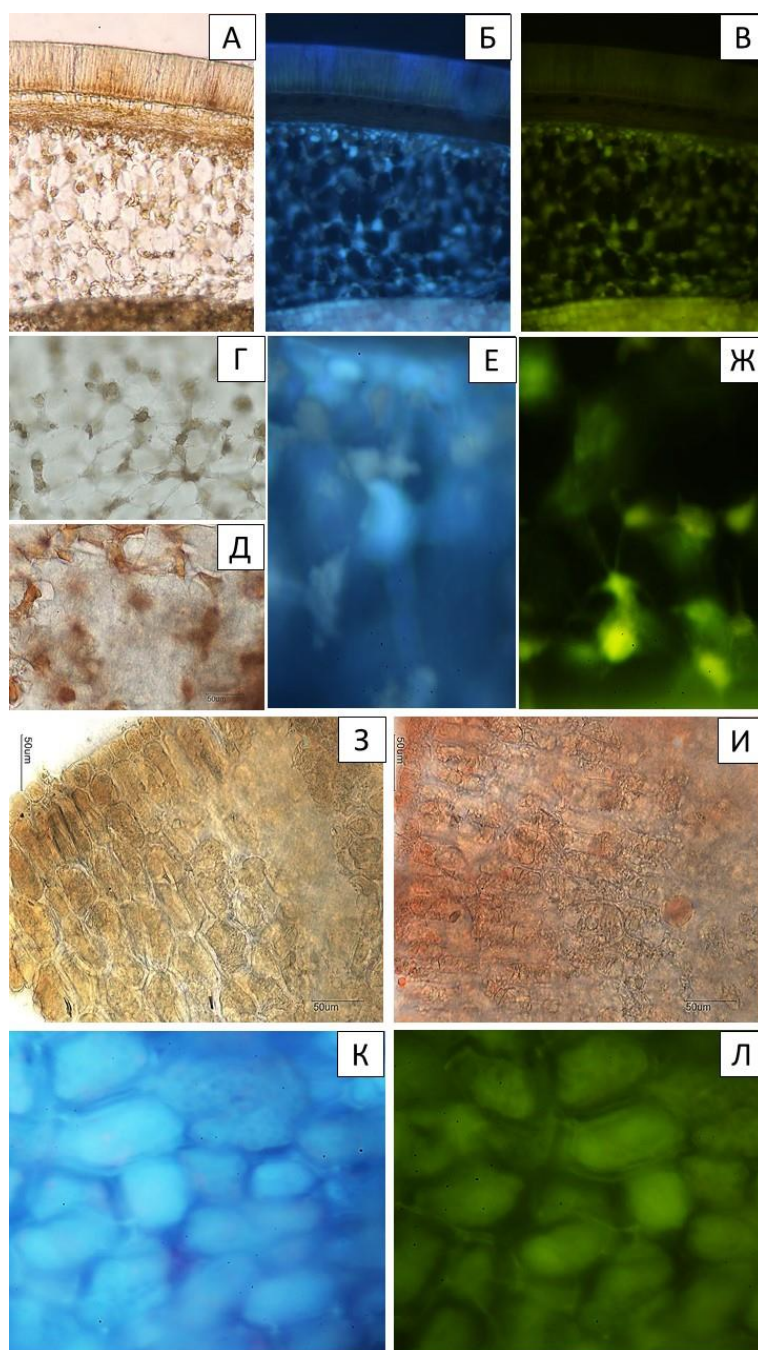


Рисунок 16 – Гистологические особенности тканей зародыша: А – Общий вид на слой эндосперма семени ($\times 40$), Б – особенность послойного люминесценции семенной кожуры, эндосперма и семядоли в диапазоне возбуждения 360-400 нм ($\times 40$), В - особенность послойного люминесценции

семенной кожуры, эндосперма и семядоли в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 40$), Г – элементы протопласта клеток эндосперма до окраски, Д - элементы протопласта клеток эндосперма окрашенные раствором Судана III, Е – Люминесценция элементов протопласта клеток эндосперма в диапазоне возбуждения 360-400 нм ($\times 400$), Ж - Люминесценция элементов протопласта клеток эндосперма в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$), З – клетки семядоли на поперечном сечении. Окраска раствором Люголя ($\times 400$), И - клетки семядоли на поперечном сечении. Окраска раствором Судана III ($\times 400$), К - Люминесценция элементов протопласта клеток семядолей в диапазоне возбуждения 360-400 нм ($\times 400$), Л - Люминесценция элементов протопласта клеток семядолей в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$).

Таким образом:

1. Из ранее не описанных признаков, имеющих диагностическое значение в определении видовой специфичности плодов софоры японской, мы считаем наиболее значимым доказательство микрохимическими реакциями и с помощью люминесцентной микроскопии содержания большого количества фенольных соединений, в том числе флавоноидов.

2. ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» содержит неточности, которые следует устранить: строение устьичного аппарата соответствует энциклоцитному типу, а не парацитному; термин «колленхима» по отношению к семени употреблен неверно, применим только для стеблей; при микроскопии семенной кожуры видны механический слой склерид (гиподерма), паренхима, сдавленный слой; не обнаружены друзы оксалатов кальция;

3. Выявлены новые диагностические признаки: расположение аморфных скоплений флавоноидов, распределение фенольных соединений в структурах плода софоры японской.

4. Обнаружены анатомически схожие, характерные для софоры японской структуры в строении боба (наличие коллатерального пучка почковидной формы со стороны спинного шва и пары коллатеральных пучков со стороны брюшного шва).

5. Применение поляризационной микроскопии показало перспективность метода для детектирования кристаллических веществ в тканях растений.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.

В ходе диссертационного исследования выявлены новые диагностические признаки бутонов и плодов софоры японской:

1. Тычиночные нити с поверхности голые, в структуре заметны клетки паренхимы с кристаллическими включениями бурого цвета.

2. Гистологические особенности гинецея цветка софоры японской - густое опушение поверхности гинецея бичевидными волосками с бурой пигментацией протопласта.

3. Проведены микрохимические реакции на доминирующие вещества.

4. Применена впервые люминесцентная микроскопия, подтверждающая распределение фенольных соединений, в том числе флавоноидов, в сырье.

5. Выявлено, что ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» содержит неточности в терминологии и в некоторых диагностических признаках (форма устьичного аппарата).

6. Обнаружены и описаны анатомически схожие, характерные для софоры японской структуры в строении боба (наличие коллатерального пучка почковидной формы со стороны спинного шва и пары коллатеральных пучков со стороны брюшного шва).

7. Впервые примененная поляризационная микроскопия для детектирования кристаллических веществ в тканях плодов софоры японской указывает на кристаллизацию тканей вдоль проводящих пучков и в области брюшного шва.

8. Полученные результаты исследования могут быть применены для стандартизации бутонов и плодов софоры японской.

ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ *SOPHORA JAPONICA L.*

В настоящее время качество плодов софоры японской стандартизировано ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV [8, 64]. В ФС.2.5.0130 указано, что плоды «содержат не менее 8,0 % суммы фенольных соединений в пересчёте на генистеин в сухом сырье». В разделе «Идентификация» в части «Определение основных групп биологически активных веществ» применяется «фармакопейный стандартный образец софориозида» как доминирующее вещество. В этой связи целесообразным представляется научное обоснование стандартизации плодов софоры японской по содержанию флавоноидов в обоих разделах. С этой целью, а также принимая во внимание противоречивые данные о химическом составе плодов софоры японской и перспективность применения флавоноидов в медицине, о чем уже говорилось в главе 1, мы провели серию адсорбционных колоночных хроматографий, изучив компонентный состав плодов. В ходе исследования было выделено 6 индивидуальных веществ, 2 из которых выделены из растительного сырья впервые.

4.1. Извлечение индивидуальных веществ из плодов софоры японской (*Sophora japonica L.*)

Для наиболее полного извлечения веществ из плодов софоры японской было определено, что оптимальным измельчением является фракция, проходящая через сито с отверстием 2 мм, оптимальный экстрагент - спирт этиловый 70%, соотношение «сырье-экстрагент» - 1:5. Для выделения веществ использовали метод ремацерации (дробной мацерации).

Этапы получения водно-спиртового извлечения из плодов софоры японской подробно описаны в части 2.3.4. «Технологические методы» данной работы. 1000 г готового извлечения упаривали на водяной бане до густого остатка (50 г), наносили на примерно двойной объем силикагеля КСК

50/100 (Россия), высушивали при комнатной температуре до состояния сыпучести и переносили на хроматографическую колонку, заполненную силикагелем той же марки. Далее проводили хроматографическое разделение. В качестве элюентов использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в соотношениях 99:1, 98:2, 97:3, 95:5; 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 и 50:50. Элюаты делили на фракции, примерно одинакового объема (по 200 мл), ориентируясь на изменении интенсивности окраски фракций (определяли визуально). Рехроматографию полученных фракций веществ осуществляли на полиамиде, элюаты делили на фракции, примерно одинакового объема (по 10 мл), Подробно этапы элюирования отражены на рисунке 17 и в таблицах 8-12.

Контроль за разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах хлороформ-этанол-вода (26:16:3) и *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

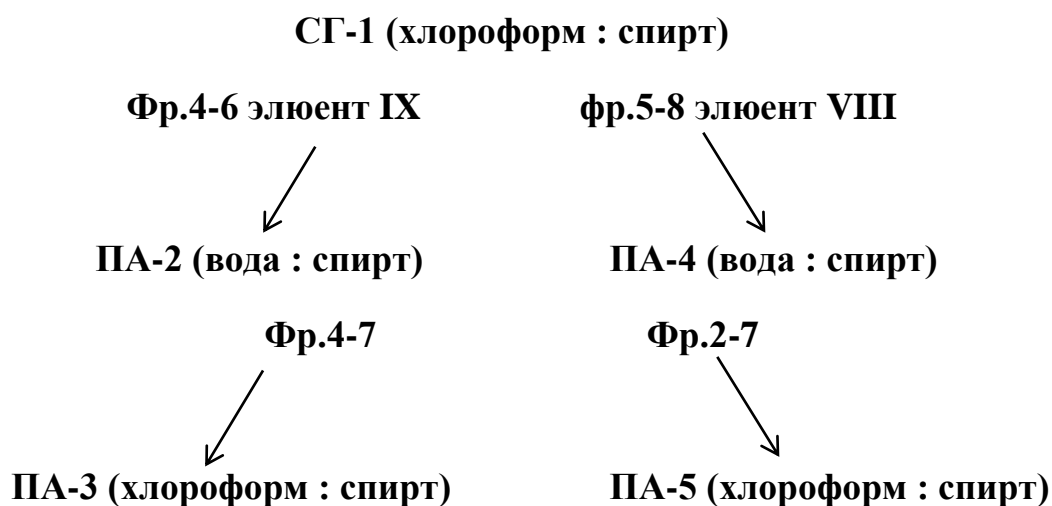


Рисунок 17 - Схема рехроматографического разделения веществ

Таблица 8 - Этапы элюирования на колонке СГ-1 (силикагель, хлороформ : спирт)

Элюентная смесь		Объем элюента, мл	№ фракции и шифры выделенных веществ
Спирт этиловый, %	Хлороформ, %		
0	100	1000	I /1-5
5	95	1000	II /1-8 (SJ-1- II.8)
7	93	1000	III /1- 9 (SJ-2-III.3 ; SJ-3-III.4)
10	90	1000	IV /1-7
15	85	1000	V /1-5
20	80	1500	VI /1-8 (SJ-6-VI.6)
30	70	1500	VII / 1-8 (SJ-7-VII.8)
40	60	1000	VIII / 1-10 (фракции 5-8 перенесли на колонку ПА-4 вода:спирт)
50	50	1000	IX / 1-10 (фракции 4-6 перенесли на колонку ПА-2 вода:спирт)
Итого:		10000	70 фракций

Таблица 9 - Этапы элюирования на колонке ПА-2 (полиамид, вода : спирт)

Элюентная смесь		Объем элюента, мл	№ фракции и шифры выделенных веществ
Вода дистиллированная, %	Спирт этиловый, %		
100	0	50	1-8 (фракции 4-7 перенесли на колонку ПА-3 хлороформ:спирт)
80	20	50	9-16
60	40	100	17-24 (SJ-9-ПА2,19-20) (фракции 21-23 выпали кристаллы, SJ-4-ПА2,21-23 определили как софоригозид)

30	70	100	25-32 (25-27 выпали кристаллы) (SJ-5-ПА2,26-27)
4	96	50	33-36
Итого:		350	36 фракций
Объединяли: Σ 8-12, Σ 13-18, Σ 19-21м, Σ 21-23, Σ 25м-27м, Σ 30-31, Σ 32-33, Σ 34-36			

Таблица 10 - Этапы элюирования на колонке ПА-3 (полиамид, хлороформ : спирт)

Элюентная смесь		Объем элюента, мл	№ фракции и шифры выделенных веществ
Спирт этиловый, %	Хлороформ, %		
0	100	50	1-5
5	95	100	Σ 6-10, Σ 11-15
10	90	100	16, Σ 17-21, Σ 22-26
20	80	100	Σ 27-31, Σ 32-35
30	70	200	Σ 36-39, Σ 40-44
40	40	200	45-49
50	50	200	50-54
96		200	55-58
Вода		100	59-60
Итого:		1250	60 фракций

Таблица 11 - Этапы элюирования на колонке ПА-4 (полиамид, вода : спирт)

Элюентная смесь		Объем элюента, мл	№ фракции и шифры выделенных веществ
Спирт этиловый, %	Вода, %		

-	100	150	1-9 (ярко-желтые фракции 2-7 объединили и поместили на колонку ПА-5)
20	80	100	10-16
40	60	100	17-30 (SJ-8-ПА4,24)
70	30	100	31-43
96	4	50	44-48
Итого:		500	48 фракций
Объединяли фракции: Σ 2-7, Σ 8-11, Σ 12-17, Σ 18-23, Σ 24-27, Σ 29-30, Σ 31-35, Σ 36-37, Σ 38-48			

Таблица 12 - Этапы элюирования на колонке ПА-5 (полиамид, хлороформ : спирт)

Элюентная смесь		Объем элюента, мл	№ фракции и шифры выделенных веществ
Спирт этиловый, %	Хлороформ, %		
-	100	50	Σ 1-5
5	95	100	Σ 6-8, Σ 9-11
10	90	200	Σ 12-13, Σ 14-18, Σ 19-20, Σ 21-22, Σ 23-24, Σ 25-26
15	85	100	Σ 27-28, 29,30, Σ 31-32,33, Σ 34-35, Σ 36-37, Σ 38-40
20	80	170	41, Σ 42-43, Σ 44-45, Σ 46-47, Σ 48-49, 50,51, Σ 52-53 (SJ-10-ПА5,44-45 кемпферол-3-О-софорозид)
30	70	200	54, Σ 55-56, 57-60
40	40	200	61-66
50	50	200	67-70
96	4	300	71-75
вода		100	76-78
Итого		1620	78 фракций

Таким образом, в результате препаративного разделения экстрактивных веществ плодов софоры японской методом

колоночной хроматографии на силикагеле выделено 6 соединений флавоноидной природы.

4.2. Идентификация индивидуальных веществ из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)

Всего было получено и проверено методом ТСХ 292 фракции элюата. Наиболее перспективные фракции в плане чистоты веществ были исследованы УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопией, масс-спектрометрией, а также с помощью различных химических превращений (кислотный и ферментативный гидролиз).

В результате проведенных исследований из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) наряду с известными для данного растения флавоноидами - генистеином (4',5,7-тригидроксиизофлавоон), софорикозидом (4'-O- β -D-глюкопиранозид генистеина), генистином (7-O- β -O-глюкопиранозид генистеина) и кемпферол-3-O-софорозидом [кемпферол-3-O-(2''- β -D-глюкопиранозил)- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона] впервые выделены 4'-O- α -L-рамнопиранозид генистеина) и 4'-O-рутинозид генистеина [генистеин-4'-O-(6''- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозид], которые являются новыми природными соединениями. История веществ и наблюдаемые экспериментальные физико-химические характеристики отражены в таблицах 8-13.

Таблица 13 - История веществ, отобранных для ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии

№ п/п	шифры выделенных веществ	История вещества	Наблюдаемые физико-химические характеристики вещества
1	SJ-1- П.8	Колонка СГ-1 (хлороформ-спирт), элюент П, фракция 8	На ТСХ на уровне 1 полосы. 254 нм -темно-фиолетовое пятно. 365 нм - темно-синее пятно. После проявления AlCl_3 : Желтого

			окрашивания не дает! 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-светится желто-зеленым. Нерастворимо в воде, растворимо при нагревании в спирте, растворимы в ацетоне. Вещество темно-бурого цвета, кристаллы оседают на стенках в виде шариков.
2	SJ-2-III.3	Колонка СГ-1 (хлороформ-спирт), элюент III, фракция 3	На ТСХ на уровне 1 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-темно-синее пятно. <i>После проявления $AlCl_3$:</i> Желтого окрашивания не дает! 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-светится желто-зеленым. Нерастворимо в воде, растворимо при нагревании в спирте, растворимо в ацетоне. Вещество светло-бежевого цвета
3	SJ-3-III.4	Колонка СГ-1 (хлороформ-спирт), элюент III, фракция 4	На ТСХ на уровне 1 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-темно-синее пятно. <i>После проявления $AlCl_3$:</i> Желтого окрашивания не дает! 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-светится желто-зеленым. Нерастворимо в воде, растворимо при нагревании в спирте, растворимы в ацетоне. Вещество бурого цвета.
4	SJ-4-ПА2,21-23 (элюент 40% спирт)	Колонка ПА-2 (вода-спирт), элюент 3 (40% этиловый спирт), объединенные фракции 21-23	На ТСХ на уровне 1 полосы. 254 нм -темно-фиолетовое пятно. 365 нм - светится желто-зеленым. Вещество белое (слегка желтоватое)
5	SJ-5-ПА2,26-27	Колонка ПА-2 (вода-спирт), элюент 4 (70% этиловый спирт), объединенные фракции 26-27	На ТСХ на уровне 1 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365- светится желто-зеленым. Нерастворимо в воде. Вещество в виде тонких бежевых мелких пластинок
6	SJ-6-VI.6	Колонка СГ-1	На ТСХ на уровне верхней части 2

		(хлороформ-спирт), элюент VI, фракция 6	полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-темно-синеепятно. <i>После проявления AlCl₃</i> : Желтого окрашивания не дает! 254 нм- темно-фиолетовое пятно. 365 нм- светится желто-зеленым. Вещество слегка сероватого цвета
7	SJ-7-VII.8	Колонка СГ-1 (хлороформ-спирт), элюент VII, фракция 8	На ТСХ на уровне верхней части 2 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-зеленое свечение. <i>После проявления AlCl₃</i> : Желтого окрашивания НЕ.Т Вещество бежевого цвета
8	SJ-8-ПА4,24	ПА-4 (вода-спирт), элюент 3 (40% этиловый спирт), фракция 24-	На ТСХ на уровне 3 полосы 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-зеленое свечение. <i>После проявления AlCl₃</i> : Желтого окрашивания НЕТ Вещество белого цвета
9	SJ-9-ПА2,19- 20	Колонка ПА-2 (вода-спирт), элюент 3 (40% этиловый спирт), объединенные фракции 19-20	На ТСХ на уровне 3 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-зеленое свечение. <i>НЕ проявлено AlCl₃</i> : Вещество жетовато-бежевого цвета
10	SJ-10- ПА5,44-45	Колонка ПА-5 (хлороформ-спирт), элюент 5 (20% этилового спирта), объединенные фракции 44-45	На ТСХ на уровне 3 полосы. 254нм-темно-фиолетовое пятно. 365-темно-бурое. <i>После проявления AlCl₃</i> : Желтого окрашивания ЕСТЬ. 254нм-темно- фиолетовое пятно. 365- желтое свечение. Вещество желтого цвета, гигроскопично, вспенивали в вакууме, растворимо в воде
11	SJ-11-ПА3,45	Колонка ПА-3 (хлороформ-спирт), элюент 6 (40% этилового спирта), фракция 45	На ТСХ на уровне 3 полосы. Вещество желтого цвета, гигроскопично, вспенивали в вакууме, растворимо в воде
12	SJ-12-Rut	ФСО рутина	На ТСХ на уровне 3 полосы .

Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 80:20, выделили вещество **1 (SJ-6-VI.6)**, очищали рехроматографией на полиамиде, используя в качестве элюента воду, а также 20 %, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт (выход 0.05 %). Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 60:40, выделили вещество **2 (SJ-8-ПА4,24)**, очистили перекристаллизацией из этилового спирта (выход 0.1 %).

Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 70:30, выделили вещество **3 (SJ-7-VII.8)**, очищали рехроматографией на полиамиде, используя в качестве элюента воду, а также 20 %, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт (выход 0.4 %).

Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 95:5, выделили вещество **4 (SJ-1- II.8)**, очищали перекристаллизацией из этилового спирта (выход 0.05 %).

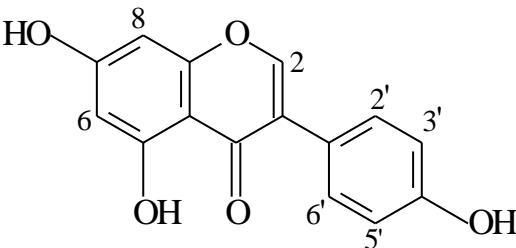
Из маточных растворов фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 70:30, выделили вещество **5 (SJ-7-VII.8)**, очищали рехроматографией на полиамиде, используя в качестве элюента воду, а также 20 %, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт, а затем повторной рехроматографией фракций, содержащих вещество 5, на силикагеле, используя в качестве элюента смесь хлороформа и этилового спирта в градиентном режиме (выход 0.03 %).

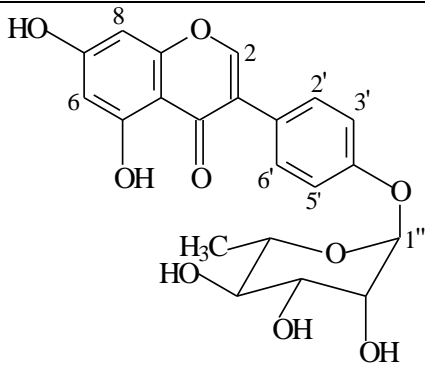
Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта в соотношении 50:50, выделили вещество **6 (SJ-4-ПА2,21-23)**, очищали рехроматографией на полиамиде, используя в качестве элюента воду и 20 %, 40 %, 70 % и 96 % этиловый спирт (выход 0.3 %).

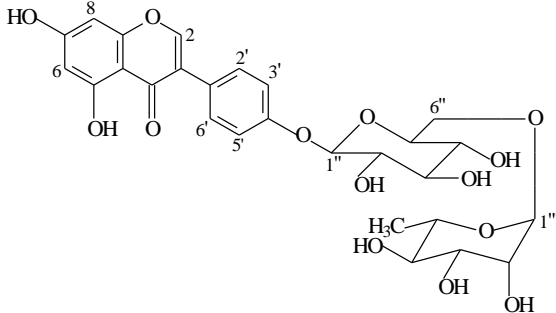
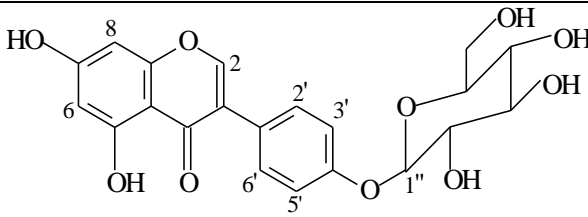
По результатам ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии были сделаны выводы, что мы выделили из плодов софоры японской 6 веществ из группы флавоноидов, 4 вещества из которых описаны ранее в научной литературе, а 2 вещества, идентифицированы нами как 4'-O- α -L-рамнопиранозид генистеина) и 4'-O-рутинозид генистеина [генистеин-4'-

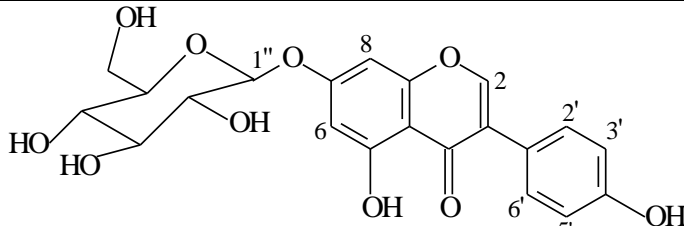
O-(6''- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозида], являются новыми природными соединениями. Характеристики выделенных веществ приведены в таблице 14.

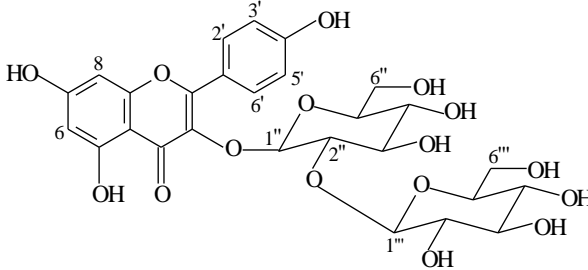
Таблица 14 – Характеристики веществ, выделенных из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) , произрастающей в Краснодарском крае Российской Федерации.

№ п/п	Структурная формула и название вещества	Характеристики
1	 <p style="text-align: center;">генистеин</p>	<p>Генистеин</p> <p>(4',5,7-тригидроксиизофлавонон)</p> <p>Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{15}H_{10}O_5$ с т.пл. 297-298 °С (этиловый спирт); УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 262, 326 нм.</p> <p>1H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.92 (1H, с, 5-OH), 10.84 (1H, уш. с, 7-OH), 9.55 (1H, уш. с, 4'-OH), 8.28 (1H, с, H-2), 7.33 (1H, д, J = 9.0, H-2',6'), 6.78 (1H, д, 9.0, H-3',5'), 6.35 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.18(1H, д, J = 2.5, H-6).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): 180.72 (C-4), 164.77 (C-7), 162.49 (C-5), 158.09 (C-9), 157.91 (C-4'), 154.51 (C-2), 130.66 (C-2', C-6'), 122.77 (C-3), 121.69 (C-1'), 115.55 (C-3', C-5'), 104.96 (C-10), 99,46 (C-6), 94.17 (C-8)</p> <p>Масс-спектр: HR-ESI-MS m/z 269.19 [M-H]⁻.</p>

2	 <p>4'-O-рамнозид генистеина</p>	<p>4'-O-α-L-рамнопиранозид 4',5,7- тригидроксиизофлавона</p> <p>Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{21}H_{20}O_9$. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 262, 326 пл.</p> <p>1H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.86 (1H, с, 5-OH), 10.88 (1H, уш. с, 7-OH), 8.35 (1H, с, H-2), 7.45 (1H, д, J = 9.0, H-2',6'), 7.00 (1H, д, J =9.0, H-3',5'), 6.36(1H, д, J = 2.5, H-8), 6.19 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.10 (1H, уш.с, H-1'' рамнозы), 3.10-4.68 (м, 4H рамнозы), 1.16 (3H, д, J = 6.0, CH_3 рамнозы).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d_6, δ_c, м.д.): 180.56 (C-4), 164.89 (C-7), 162.48 (C-5), 158.09 (C-9), 157.50 (C-4'), 154.98 (C-2), 130.70 (C-2', C-6'), 124.75 (C-3), 122.40 (C-1'), 116.17 (C-3', C-5'), 104.78 (C-10), 100.81 (C-1'' глюкозы), 99,56 (C-6), 94.25 (C-8), 100.96 (C-1'' рамнозы), 99.57 (C-6), 94.26 (C-8), 72.41 (C-3''), 70.98 (C-5''), 70.30 (C-4''), 70.20 (C-2''), 18.59 (C-6'' рамнозы).</p>
3		<p>4'-O-рутинозид генистеина [генистеин-4'- O-(6''-α-L-рамнопиранозил)- β-D-глюкопиранозид]</p> <p>Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{27}H_{30}O_{14}$, т. пл. 257-260° (водный спирт). УФ-спектр</p>

	 <p>4'-<i>O</i>-рутинозид генистеина</p>	<p>(EtOH, λ_{max}, нм): 262, 326 пл.</p> <p>^1H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.86 (1H, с, 5-OH), 10.80 (1H, уш. с, 7-OH), 8.34 (1H, с, H-2), 7.44 (1H, д, J = 9.0, H-2',6'), 7.07 (1H, д, 9.0, H-3',5'), 6.34 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.19 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.30 (1H, д, J = 7.0 Гц, H-1'' глюкозы), 4.35 (1H, уш.с, H-1''' рамнозы), 2.80-5.03 (10H, м, 6H глюкозы + 4H рамнозы), 0.96 (3H, д, J = 6.0, CH₃ рамнозы).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d_6, δ_{C}, м.д.): 180.62 (C-4), 164.65 (C-7), 162.54 (C-5), 158.17 (C-9), 157.84 (C-4'), 154.99 (C-2), 130.63 (C-2', C-6'), 121.45 (C-1'), 116.61 (C-3', C-5'), 104.49 (C-10), 98.47 (C-6), 94.43 (C-8), 101.30 (C-1'' глюкозы), 77.18 (C-5'''), 76.95 (C-3'''), 72.46 (C-2'''), 70.93 (C-4'''), 67.56 (C-6'''), 101.74 (C-1''' рамнозы), 73.76 (C-4'''), 70.54 (C-2'''), 70.10 (C-3'''), 68.80 (C-5'''), 18.30 (C-6''' CH₃ рамнозы).</p> <p>Масс-спектр: HR-ESI-MS m/z 577.13 [M-H]⁻.</p>
4	 <p>Софорикозид</p>	<p>Софорикозид (4'-<i>O</i>-β-D-глюкопиранозид 4',5,7-тригидроксиизофлавона) Кристаллическое вещество белого цвета состава C₂₁H₂₀O₁₀ с т.пл. 296-298 °C (водный спирт); УФ-спектр</p>

		<p>(EtOH, λ_{\max}, нм): 262, 326 пл.</p> <p>^1H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.87 (1H, с, 5-OH), 10.86 (1H, уш. с, 7-OH), 8.34 (1H, с, H-2), 7.45 (1H, д, J = 9.0, H-2',6'), 7.06 (1H, д, J = 9.0, H-3',5'), 6.35 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.19 (1H, д, J = 2.5, H-6), 4.87 (1H, д, 7.0 Гц, H-1''), 3.22-4.53 (6H, м, 6H глюкозы).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δC, м.д.): 180.56 (C-4), 164.89 (C-7), 162.49 (C-5), 158.11 (C-9), 157.79 (C-4'), 154.95 (C-2), 130.57 (C-2', C-6'), 124.71 (C-3), 122.42 (C-1'), 116.54 (C-3', C-5'), 104.95 (C-10), 100.81 (C-1'' глюкозы), 99.56 (C-6), 94.25 (C-8), 77.54 (C-5'' глюкозы), 77.14 (C-3'' глюкозы), 73.74 (C-2'' глюкозы), 70.12 (C-4'' глюкозы), 61.20 (C-6'' глюкозы).</p> <p>Масс-спектр: HR-ESI-MS m/z 430.91 [M-H]⁻.</p>
5	 <p>7-O-глюкозид генистеина</p>	<p>Генистин (7-O-β-O-глюкопиранозид 4',5,7-тригидроксиизофлавона) Кристаллическое вещество белого цвета состава C₂₁H₂₀O₁₀ с т.пл. 252-254 °С (водный спирт); УФ-спектр (EtOH, λ_{\max}, нм): 262, 326 пл.</p> <p>^1H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.90 (1H, с, 5-OH), 9.65 (1H, уш. с, 4'-OH), 8.38</p>

		<p>(1H, с, Н-2), 7.35 (1H, д, J = 9.0, Н-2',6'), 6.79 (1H, д, 9.0, Н-3',5'), 6.68 (1H, д, J = 2.5, Н-8), 6.43 (1H, д, J = 2.5, Н-6), 5.05 (1H, д, 7.0 Гц, Н-1''), 3.2-3.7 (6H, м, 6H глюкозы).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δC, м.д.): 181.04 (C-4), 164.96 (C-7), 162.17 (C-5), 158.12 (C-9), 157.81 (C-4'), 154.94 (C-2), 130.71 (C-2', C-6'), 123.09 (C-3), 122.41 (C-1'), 115.63 (C-3', C-5'), 106.61 (C-10), 100.83 (C-1'' глюкозы), 99,60 (C-6), 95.05 (C-8), 100.81 (C-1'' глюкозы), 77,58 (C-5'' глюкозы), 77.16 (C-3'' глюкозы), 73.76 (C-2'' глюкозы), 70.22 (C-4'' глюкозы), 61.14 (C-6'' глюкозы).</p> <p>Масс-спектр: HR-ESI-MS <i>m/z</i> 431.08 [M-H]-.</p>
6	 <p>кемпферол-3-<i>O</i>-софорозид</p>	<p>Кемпферол-3-<i>O</i>-софорозид [3-<i>O</i>-(2''-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона] (6). Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₂₇H₃₀O₁₆ с т.пл. 193-195 °С (водный спирт), λ_{max} EtOH 267, 355 нм; + NaOAc 274, 368 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 272, 356 нм; +AlCl₃ и +AlCl₃ + HCl 275, 306, 345, 396 нм.</p> <p>¹H-ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.56 (1H, с, 5-OH), 10.79 (1H, уш. с, 7-OH), 10.15 (1H, уш. с, 4'-OH),</p>

		<p>7.99(1H, д, J = 9.0, H-2',6'), 6.86 (1H, д, 9.0, H-3',5'), 6.39 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.15 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.64 (1H, д, J = 7.0 Гц, H-1'' глюкозы), 4.58 (1H, д, J =7.0, H-1''' глюкозы), 3.22- 5.33 (12H, м, 12H двух молекул глюкозы).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δC, м.д.): 178.27 (C-4), 164.81 (C-7), 162.01 (C-5), 160.71 (C-9), 157.09 (C-2), 156.43 (C-4'), 133.65 (C-3), 131.75 (C-2' и C-6'), 121.69(C-1'), 116.11 (C-3' и C-5'), 104.94 (C-10), 98.84 (C-6), 94.43 (C-8), 102.75 (C-1'' глюкозы), 82.59 (C-2''), 77.71 (C-3''), 76.56 (C-5''), 71.02 (C-4''), 61.98 (C-6''), 102.75 (C-1''' глюкозы), 77.31 (C-3'''), 76.02 (C-5'''), 73.89 (C-2'''), 70.00 (C-4'''), 61.82 (C-6''').</p> <p>Масс-спектр: HR-ESI-MS <i>m/z</i> 609.13 [M-H]-.</p>
--	--	---

Среди выделенных флавоноидов доминируют софорикозид (изофлавоноид) и кемпферол-3-*O*-софорозид (флавоноид), что доказывает кривая поглощения УФ-спектра на рисунке 18.

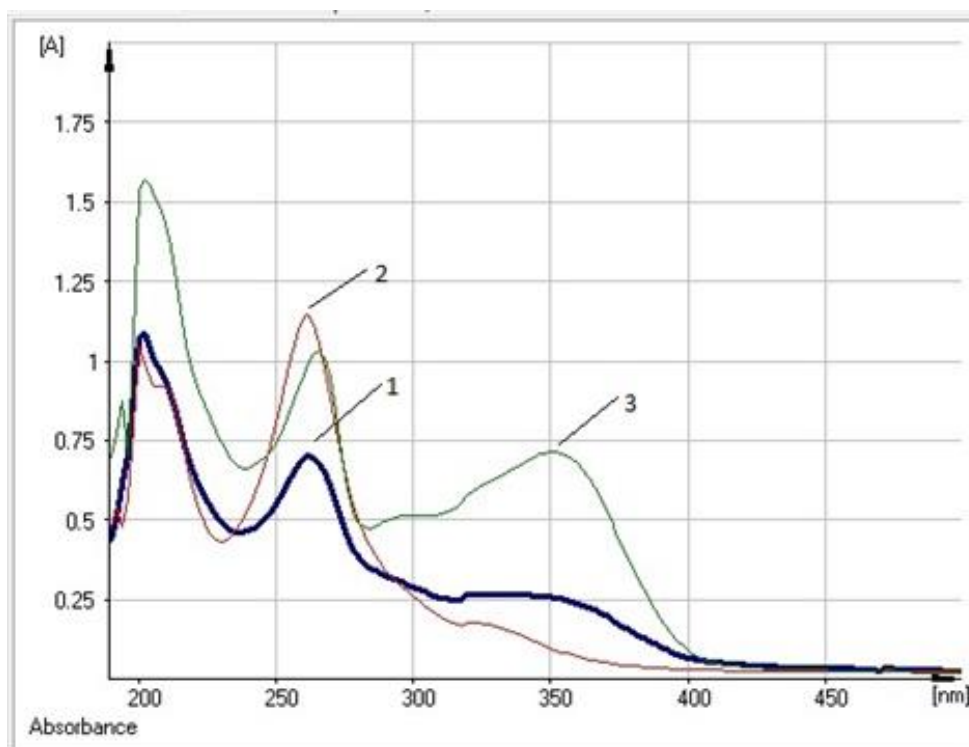


Рисунок 18 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения плодов софоры японской (1), раствора софорикозида (2) и раствора кемпферол-3-*O*-софорозида (3).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.

1. В результате проведенных фитохимических исследований из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) выделены 6 флавоноидов, среди которых 4'-*O*- α -L-рамнопиранозид генистеина) и 4'-*O*-рутинозид генистеина [генистеин-4'-*O*-(6''- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозида] являются новыми природными соединениями.

2. Принимая во внимание то обстоятельство, что софорикозид является доминирующим и диагностически значимым изофлавоном, считаем целесообразным использовать данный флавоноид в качестве стандартного образца в разделе «Количественное определение».

ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СТАНДАРТИЗАЦИИ БУТОНОВ И ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA* L.)

В Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания включена фармакопейная статья на сырье «Софоры японской плоды» ФС.2.5.0130 (взамен ФС 42-452-72). В отношении цветков действует ВФС 42-341-74 «Софоры японской бутоны», которая на сегодняшний день не пересматривалась. В ходе представленного диссертационного исследования были получены данные, позволяющие научно обосновать ошибочность некоторых имеющихся положений в разделах «Идентификация», «Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение» обеих фармакопейных статей. Принимая во внимание перспективность растительного сырья софоры японской в плане получения флавоноидов природного происхождения и учитывая требования основного регламентирующего документа для фармацевтических субстанций и лекарственного растительного сырья - Государственной фармакопеи Российской Федерации, - целесообразным представляется совершенствование стандартизации бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.).

5.1. Определение подлинности бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.).

В соответствии ВФС 42-341-74. подлинность бутонов софоры японской определяют качественной реакцией на флавоноиды: вишнево-красное окрашивание при добавлении цинковой пыли и концентрированной кислоты хлористоводородной к спиртовому извлечению сырья. Нами разработана методика ТСХ-идентификации бутонов софоры японской по двум стандартам: рутину и кверцетину.

Для идентификации растительного сырья использовали свойство флавоноидов флуоресцировать в УФ свете при длине волны 254 нм и 365 нм

(после проявления хлоридом алюминия(III)) и их разную хроматографическую подвижность.

ТСХ-анализ и полученные нами УФ-спектры водно-спиртовых извлечений бутонов софоры японской подтвердили, что доминирующим флавоноидом бутонов является именно рутин (вещество третьей полосы ТСХ). Вещество верхней полосы ТСХ кверцетин содержится в минорных количествах. Учитывая то обстоятельство, что кверцетин является агликоном рутина, целесообразным представляется использованием его в качестве СО для целей идентификации бутонов. Факт отсутствия кверцетина позволит утверждать, что в сырье не прошли процессы расщепления рутина, что считаем значимым признаком для стандартизации бутонов софоры японской и может применяться для отличия экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской.

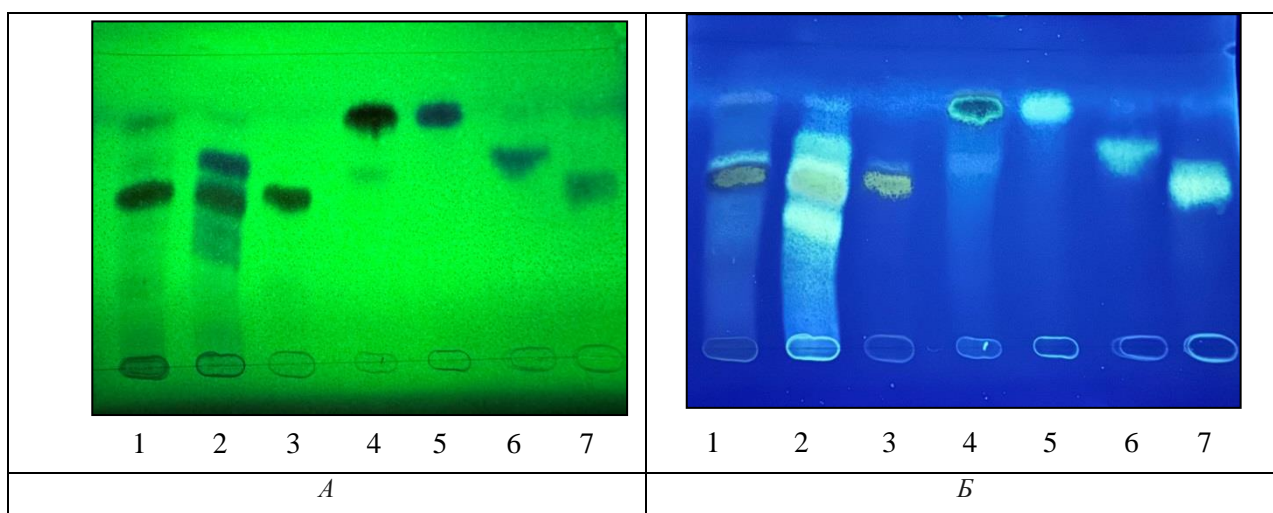


Рисунок 19 - ТСХ в УФ-свете при длине волны 254 нм (А) и при длине волны 365 нм после проявления алюминия хлоридом (Б): водно-спиртовое извлечение из бутонов софоры японской (1), водно-спиртовое извлечение из плодов софоры японской (2), СО рутин (3), СО кверцетин (4), СО софориозида (5), СО кемпферол-3-О-софориозида (6), СО генистеина (7).

Методика ТСХ-анализа бутонов софоры японской.

На линию старта хроматографической пластины «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-А-УФ», предварительно активированной при 100-105°C наносят в виде полос шириной 1 см по 0,03 мл испытуемого раствора, а также растворов ФСО рутина и кверцетина. Полученную ТСХ-хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254нм, а затем проявляют 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III) и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются флуоресцирующие зоны, соответствующие СО рутина (доминирующее вещество) и кверцетина. При этом обнаруживаются также и другие вещества в минорных количествах.

5.2. Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской.

По ВФС 42-341-74 содержание в ЛРС «Софоры японской бутоны» флавоноидов определяется хроматоспектрофотометрическим методом и должно быть не менее 16% при влажности сырья до 12%.

В ходе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов определены оптимальные условия экстракции флавоноидов из цветков софоры японской: экстрагент 70% этиловый спирт; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 45 мин, степень измельчения сырья – фракция, проходящая через сито с диаметром отверстия 2 мм (табл. 15). Сопоставимые значения получены и в случае использования этилового спирта в диапазоне концентраций 40 % - 60 %, однако погрешность определения меньше при использовании 70% спирта. Увеличение времени экстракции более 45 минут, более тонкое измельчение (1 мм) и увеличение соотношения более 1:50 не дает значимого повышения полноты извлечения флавоноидов. Фильтрация извлечения фракции 1 мм затруднена. При условиях извлечения,

предложенных производителями ЛРС (экстрагирование горячей водой цельного сырья), теряется до 50% флавоноидов.

Таблица 15 - Влияние различных факторов на полноту водно-спиртового извлечения флавоноидов из бутонов софоры японской

Экстрагент	Соотношение «сырье-экстрагент»	Время экстракции, мин	Степень измельчения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
вода очищенная	1:50	45	2	11,35±0,20
30 % спирт	1:50	45	2	20,54±0,23
40 % спирт	1:50	45	2	20,58 ± 0,25
50 % спирт	1:50	45	2	21,44 ±0,25
60 % спирт	1:50	45	2	21,53 ± 0,23
70 % спирт	1:50	45	2	21,68 ± 0,29
80 % спирт	1:50	45	2	20,79 ± 0,29
96 % спирт	1:50	45	2	13,48 ± 0,21
Время экстракции				
70 % спирт	1:50	5	2	17,23 ± 0,29
70 % спирт	1:50	15	2	20,38 ± 0,29
70 % спирт	1:50	30	2	22,17 ± 0,29
70 % спирт	1:50	45	2	22,97 ± 0,29
70 % спирт	1:50	60	2	21,43 ± 0,29
70 % спирт	1:50	90	2	20,04 ± 0,29
70 % спирт	1:50	120	2	20,37 ± 0,29
Степень измельчения				
70 % спирт	1:50	45	1	23,05 ± 0,29
70 % спирт	1:50	45	2	22,97 ± 0,29
70 % спирт	1:50	45	3	21,95 ± 0,29
70 % спирт	1:50	45	цельное сырье	17,81± 0,29
Соотношение «сырье: экстрагент»				
70 % спирт	1:30	45	2	19,82± 0,29
70 % спирт	1:50	45	2	22,87 ± 0,29
70 % спирт	1:100	45	2	22,95 ± 0,29

Нами в качестве метода исследования использована прямая и дифференциальная спектрофотометрия в соответствии ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» ГФ Российской Федерации XV издания. Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений оценивали на спектрофотометре Specord 40 (AnalytikJena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190-500 нм, кюветы с толщиной слоя 10 мм.

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской нами учитывалось свойство флавоноидов (флавонов и их производных – флавонолов) образовывать комплекс с раствором алюминия хлорида, что проявляется в образовании батохромного сдвига длинноволновой полосы в электронном спектре испытуемого раствора. При изучении электронных спектров водно-спиртовых извлечений бутонов софоры японской обнаружено два максимума поглощения в области 257 нм и 362 нм, характерные для флавонолов с замещенной 3-ОН-группой. Присутствие флавоноидов подтверждается батохромным сдвигом максимума поглощения длинноволновой полосы в электронном спектре водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской в присутствии алюминия хлорида в область 414 ± 2 нм. Максимум поглощения в электронном спектре водно-спиртового извлечения плодов софоры японской при 414 ± 2 нм обнаруживается также и в дифференциальном варианте (рисунок 20, 21).

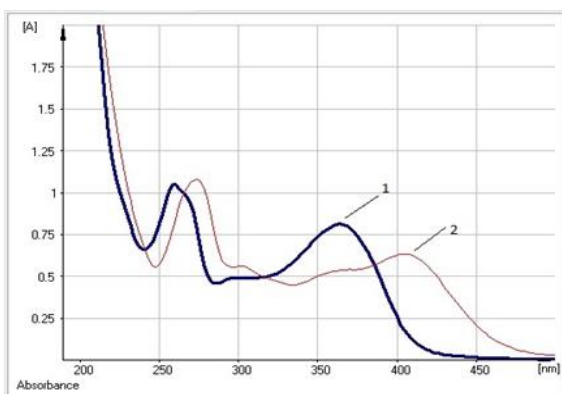


Рисунок 20 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской (1) и водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской в присутствии алюминия хлорида (2)

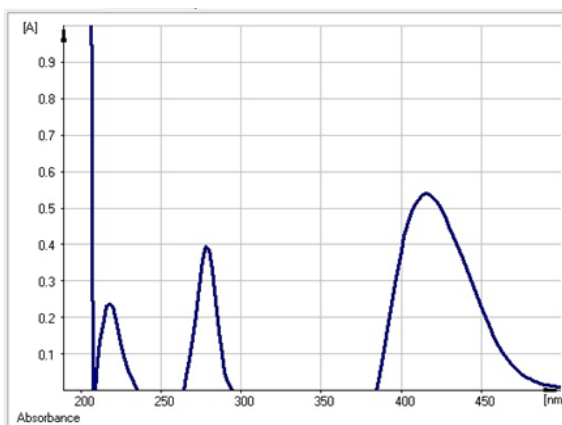


Рисунок 21 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской (дифференциальный вариант).

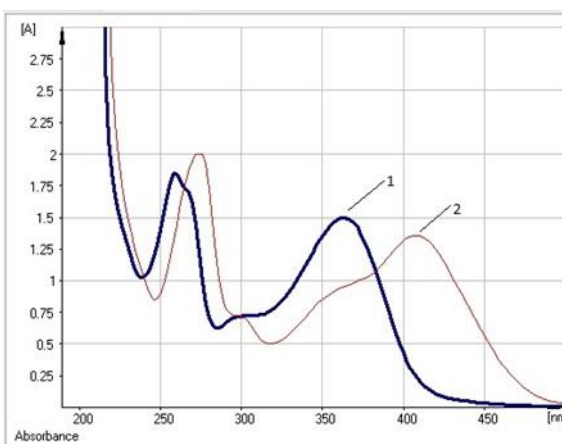


Рисунок 22. Электронные спектры спиртового раствора ФСО рутина (1) и спиртового раствора рутина в присутствии алюминия хлорида (2).

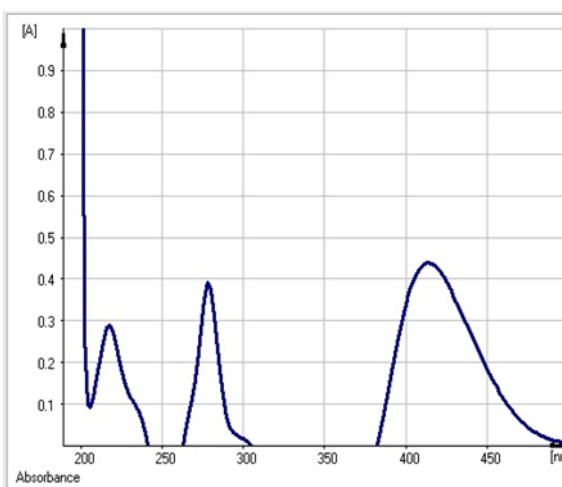


Рисунок 23. Электронный спектр раствора спиртового раствора ФСО рутина (дифференциальный вариант).

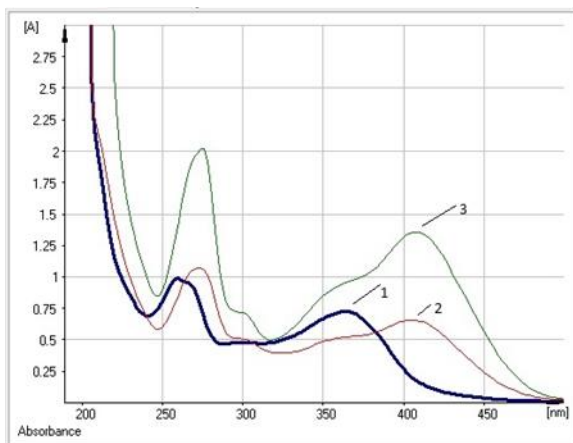


Рисунок 24. Электронные спектры водно-спиртового извлечения бутенов софоры японской (1), водно-спиртового извлечения бутенов софоры японской в присутствии алюминия хлорида (2) и спиртового раствора ФСО рутина в присутствии алюминия хлорида (3).

Изучение УФ-спектров водно-спиртового раствора ФСО рутина в условиях прямой спектрофотометрии в присутствии $AlCl_3$ также показало наличие батохромного сдвига максимума поглощения длинноволновой полосы в область 414 ± 2 нм и максимума поглощения в условиях дифференциальной спектрофотометрии при 414 ± 2 нм (рисунок 22, 23).

Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из бутенов софоры японской и раствора ФСО рутина в условиях прямой спектрофотометрии в присутствии $AlCl_3$ показало, что максимумы длинноволновых полос поглощения в обоих случаях находятся при длине волны 414 ± 2 нм. Следовательно, именно рутин определяет спектральные характеристики водно-спиртового извлечения бутенов софоры японской (рисунок 24).

Это позволяет рекомендовать использование в методике количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской в качестве ФСО рутин, имеющий в условиях дифференциальной спектрофотометрии, как и водно-спиртовое извлечение плодов софоры японской, максимум поглощения при 414 ± 2 нм (рисунок 21, 23).

Также наше исследование доказывает, что предлагаемая Европейской Фармакопеей длина волны 425 нм будет недостаточно селективной, так как более соответствует кверцетину, минорному в бутонах веществу, имеющему максимумом поглощения при длине волны 428 ± 2 нм, а значит и расчет там идет в плече, а не на максимуме УФ-спектра.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (синяя полоса).

Испытуемый раствор: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (раствор А), тщательно перемешивают. Далее 2 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого

раствора Б на спектрофотометре при длине волны 414 нм на фоне раствора сравнения.

Раствор сравнения: 2 мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Приготовление раствора стандартного образца рутина:

около 0,0050 г (точная навеска) ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 70 % этилового спирта при нагревании. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А ФСО рутина). Далее 2 мл полученного раствор А ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б ФСО рутина), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов рутина с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б ФСО рутина на спектрофотометре при длине волны 414 нм на фоне раствора сравнения ФСО рутина.

Раствор сравнения рутина: 2 мл раствор А ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора Б извлечения сырья;

D₀ – оптическая плотность раствора ФСО рутина;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса ФСО рутина, г.

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия ФСО рутина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 414 нм – **226**:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 226 \cdot (100 - W)},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

226 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) ФСО рутина при 414 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XV.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов в водно-спиртовом извлечении бутонов софоры японской и раствора ФСО рутина.

Линейность методики определяли для серии водно-спиртовых растворов ФСО рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,0052 до 0,0520 мг/мл) при длине волны 414 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности от концентрации водно-спиртовых растворов ФСО рутина и рассчитывали уравнение линейной регрессии (рис. 25; табл. 16).

Таблица 16 - Исходные данные для оценки линейности методики по раствору ФСО рутина

Концентрация водно-спиртового раствора рутина, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из четырех последовательных измерений)
0,0052	0,1051
0,0104	0,2196
0,0208	0,4386
0,0520	1,1640

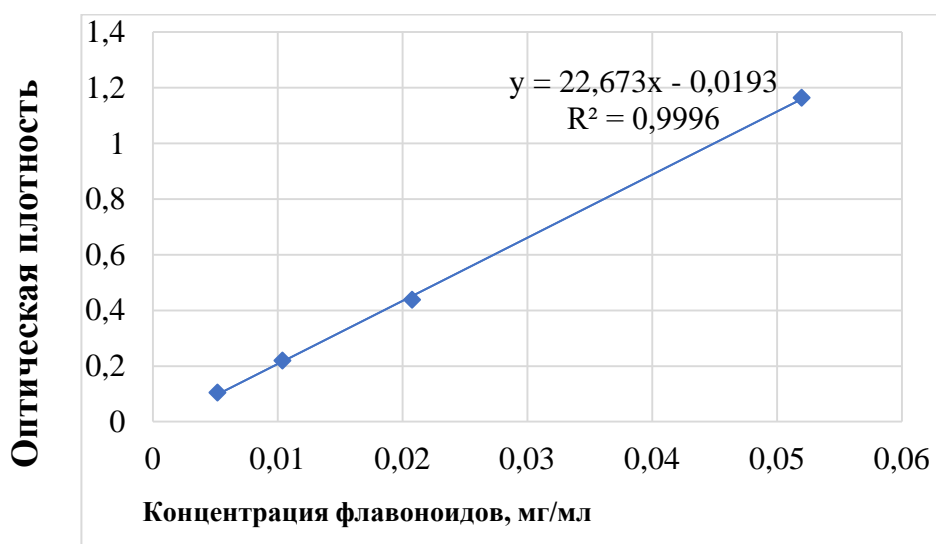


Рисунок 25 - Зависимость оптической плотности от концентрации водно-спиртовых растворов ФСО рутина.

Также линейность методики определили для серии извлечений бутонов софоры японской 70% спиртом (с концентрациями флавоноидов по рутину в диапазоне от 0,0108 до 0,0395 мг/мл) при длине волны 414 нм (рис. 26; табл. 17).

Таблица 17. Исходные данные для оценки линейности методики по серии извлечений бутонов софоры японской 70% спиртом.

Концентрация флавоноидов водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из четырех последовательных измерений)
0,0395	0,8212
0,024	0,498
0,0108	0,224

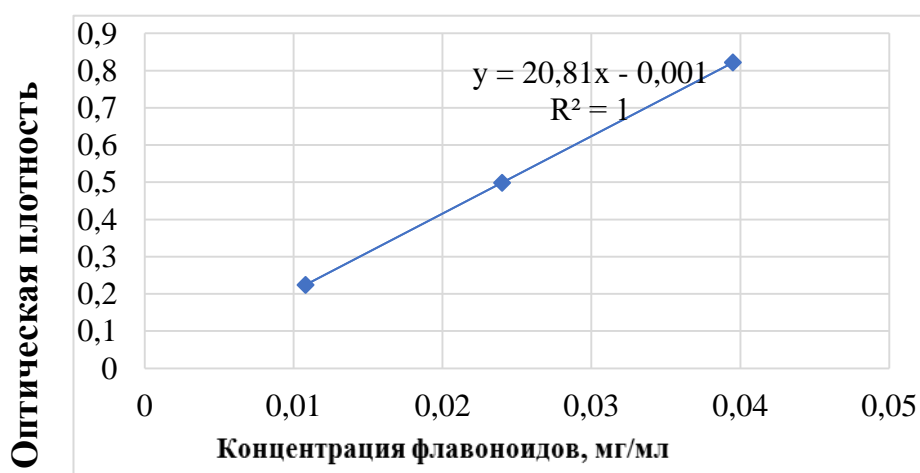


Рисунок 26 - Зависимость оптической плотности от концентрации флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях бутонов софоры японской.

Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской представлены в таблице 18.

Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,40\%$ (табл. 18).

Таблица 18. Результаты оценки прецизионности методики количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской (уровень повторяемости)

Метрологическая характеристика	n	f	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	T(P,t) (табл.)	Δx	$\Delta \bar{x}$	E, %	$\bar{\varepsilon}, \%$
Значение	1	1	21,1	0,4	0,1	95	2,23	$\pm 0,9$	$\pm 0,2$	$\pm 4,4$	$\pm 1,3$
	1	0	8	2	3			3	8	0	3

Установлено, что среднее содержание суммы флавоноидов в исследуемом образце сырья составило 21,18% (относительная погрешность определения составила $\pm 0,28\%$).

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, мы сделали вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы флавоноидов в пересчете на ФСО рутин в бутонах софоры японской.

Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин в образцах цветков софоры японской различных регионов и заготовителей варьирует от $16,12 \pm 1,33\%$ до $22,37 \pm 1,33\%$.

5.3. Методика количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской

В соответствии с ВФС 42-341-74 содержание рутина в лекарственном растительном сырье «Софоры японской бутоны» определяется хроматоспектрофотометрическим методом (должно быть не менее 16%). Европейская фармакопея Количественное содержание рутина определяют методом ВЭЖХ с использованием тригидрата рутозида (рутина) и апигенина-7-глюкозида (космосин). На наш взгляд, использование стандартного образца космосина, не содержащегося в бутонах софоры японской, для целей стандартизации бутонов является нецелесообразным. Следовательно, исследования по совершенствованию методов стандартизации данного сырья являются актуальными.

Нами разработана методика количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» с использованием фармакопейного стандартного образца рутина (3-*O*-рутинозид кверцетина). Определено, что содержание рутина в бутонах софоры японской варьирует от $10,96 \pm 0,40$ % до $15,20 \pm 0,51$ %. Мы использовали микроколоночный жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор»), СО рутина (степень чистоты - 95,44 %, соответствовал требованиям ФС 42-2508-87) и СО кверцетина (полученный в результате кислотного гидролиза СО рутина, соответствовал требованиям ФС 42-1290-79, степень чистоты - 98,20 %). Исследование и валидацию методики проводили в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» и ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического анализа» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Изначально при разработке методики хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме. В результате проведения ВЭЖХ-анализа выявлено, что в условиях градиентного режима в водно-спиртовом извлечении из бутонов софоры японской обнаруживаются два пика, соответствующие времени удерживания пиков рутина и кверцетина. Время удерживания рутина составляет около 6 мин, кверцетина - около 16 мин, что подтверждается добавками к извлечению из бутонов софоры японской СО рутина и СО кверцетина, а также исследованием растворов СО рутина, кверцетина и модельной смеси, содержащей рутин и кверцетин (рисунки 27-30).

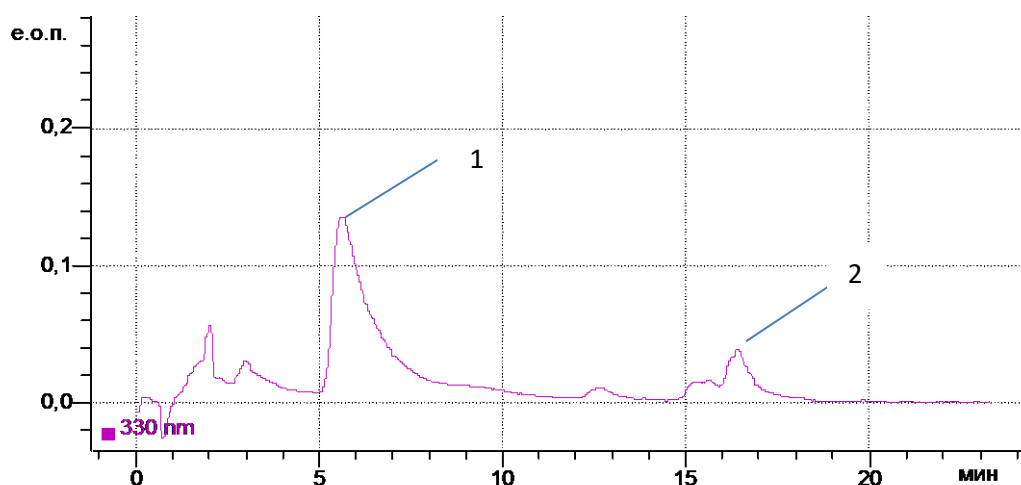


Рисунок 27 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из бутонов софоры японской в градиентном режиме. Обозначения: 1 – рутин; 2 – кверцетин

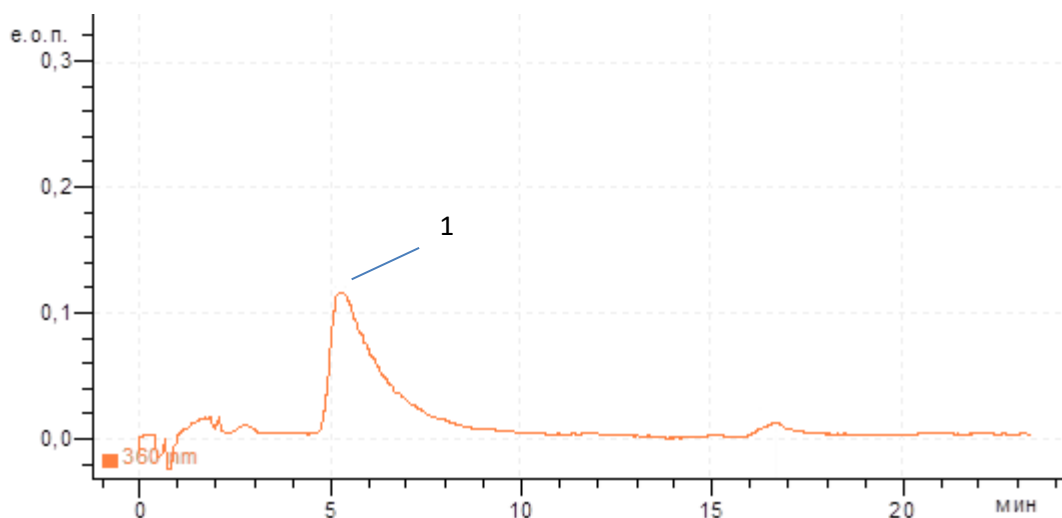


Рисунок 28 - ВЭЖХ-хроматограмма СО рутина (1) в градиентном режиме

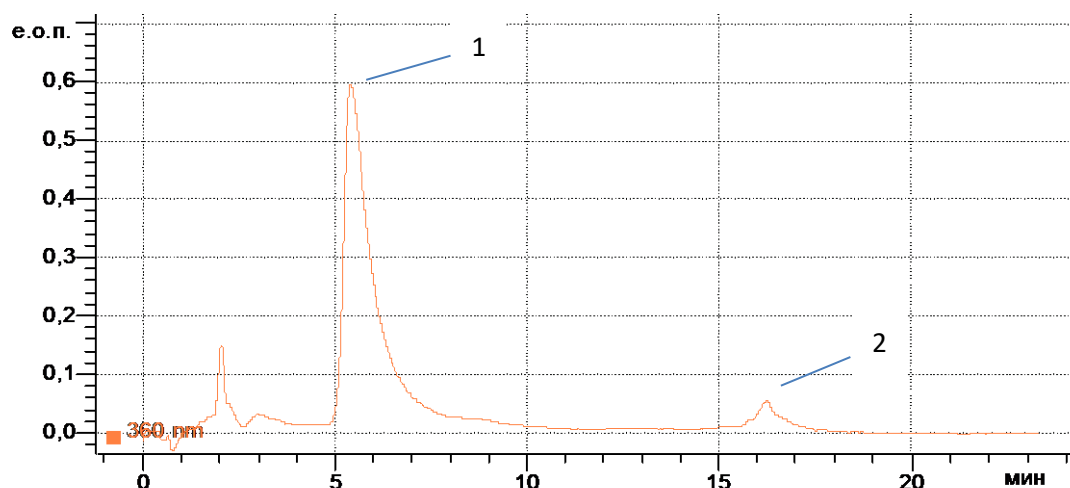


Рисунок 29 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из бутонов софоры японской с добавкой рутина в градиентном режиме

Обозначения: 1 – рутин; 2 – кверцетин.

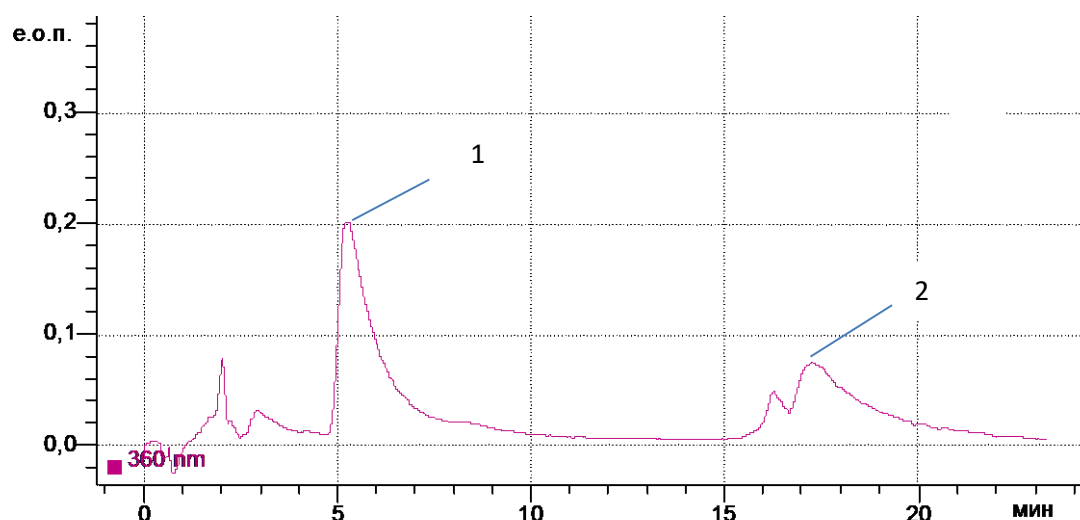


Рисунок 30 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из бутонов софоры японской с добавкой кверцетина в градиентном режиме

Обозначения: 1 – рутин; 2 – кверцетин.

Принимая во внимание то обстоятельство, что кверцетин выходит лишь после 15-ой минуты, при чем при смене элюентной системы в градиентном режиме, мы посчитали целесообразным определение содержания рутина в водно-спиртовом извлечении бутонов софоры японской проводить в изократическом режиме. Полученные ВЭЖХ-спектры приведены на рисунках 31-33.

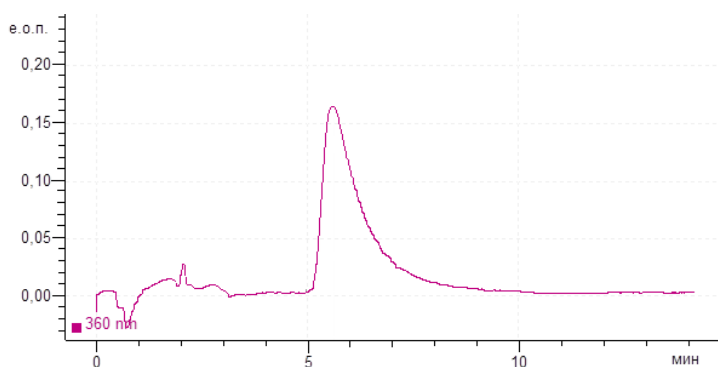


Рисунок 31 - ВЭЖХ-хроматограмма СО рутина в изократическом режиме.

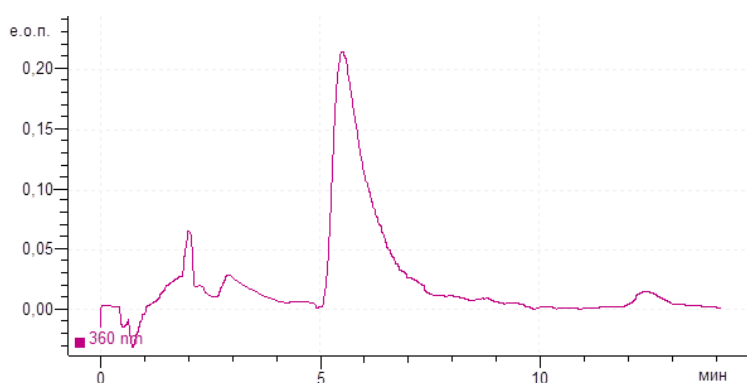


Рисунок 32 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из бутонов софоры японской в изократическом режиме.

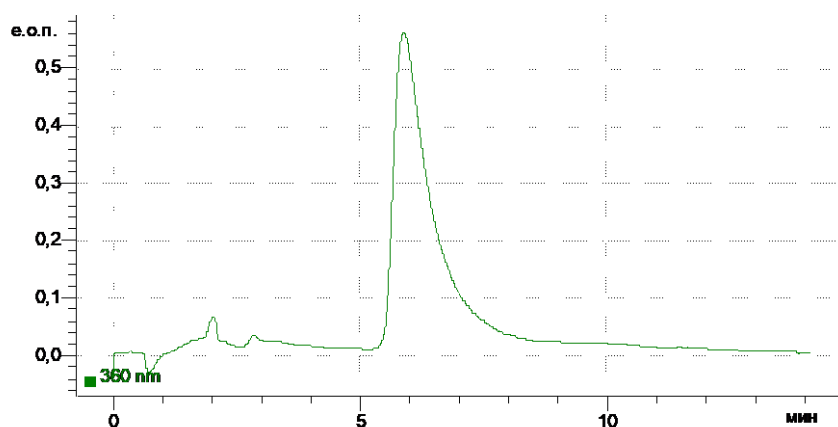


Рисунок 33 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из бутонов софоры японской с добавлением СО рутина в изократическом режиме.

В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов были получены следующие результаты (табл. 19).

Таблица 19 - Определение пригодности хроматографической системы

Параметр колонки	Полученное значение	Нормативное значение
Эффективность колонки	5051	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	2,66	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,48	Не более 1,5

Полученные значения показателей позволили сделать заключение о том, что данная система пригодна для количественного определения рутина в бутонах софоры японской.

Специфичность методики оценивали по соответствию времени удерживания стандартного рабочего раствора рутина и пика на хроматограмме извлечения. Для определения линейности строили градуировочный график серии разведения рутина (в диапазоне концентраций от 0,125 до 0,5 мг/мл) (табл. 20, рис. 34). На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (R^2).

Таблица 20 - Параметры для определения линейности методики по разведениям СО рутина

Концентрация рутина, мг/мл	Площадь пика
0,5	405,76
0,25	191,65
0,125	95,15

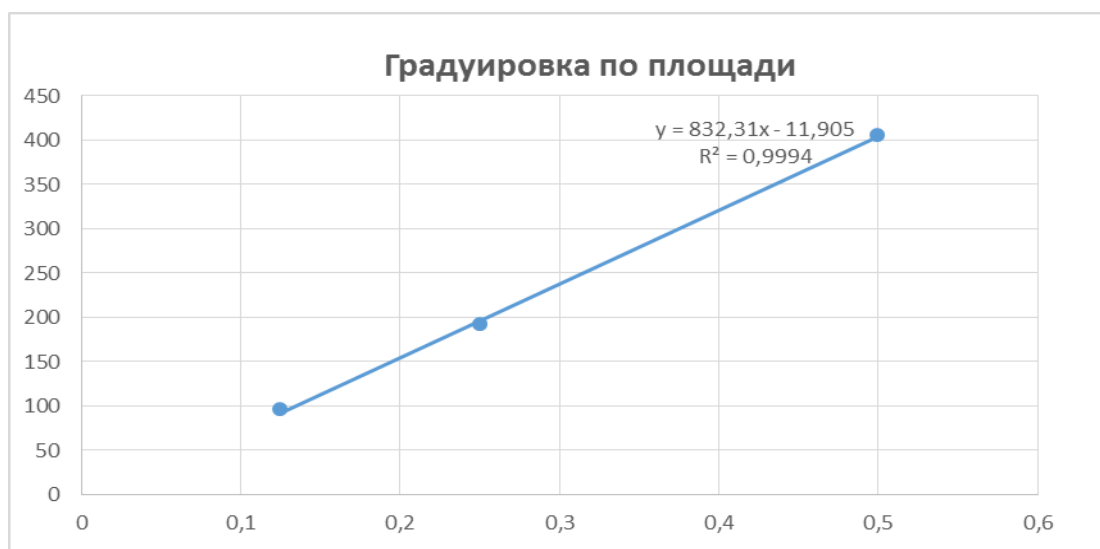


Рисунок 34 - График зависимости площади пика от концентрации рутина. Уравнение линейной регрессии.

Правильность и линейность методики подтверждали на образце извлечения бутонов софоры японской введением аликвоты образца раствора стандартного образца рутина в количестве от 80% до 120% от исходного содержания.

Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ представлены в таблице 4.

Определено, что ошибка единичного определения содержания рутина в бутонах софоры японской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 6,49\%$ (табл. 21).

Таблица 21 - Метрологические характеристики методики количественного определения рутина в бутонах софоры японской

n	f	\bar{x}	s^2	S	$S_{\bar{x}}$	$P, \%$	$t (P, f)$	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$E, \%$
11	10	14,43	0,1765	0,4201	0,1850	95	2,23	$\pm 0,94$	$\pm 0,41$	$\pm 2,86$	$\pm 6,49$

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности

разработанной методики для количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской.

Методика количественного определения содержания рутина в бутонах софоры японской. Аналитическую пробу сырья измельчить до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) поместить в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрыть пробкой и взвесить на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединить к обратному холодильнику и нагревать на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 минут. Затем колбу охладить в течение 30 минут, закрыть той же пробкой, снова взвесить и восполнить недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение профильтровать через бумажный фильтр («Синяя лента»). Перед хроматографическим анализом 1 мл полученного фильтрата поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, довести объем раствора до метки спиртом этиловым 96 %, перемешать и профильтровать через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводить 4 мкл полученного испытуемого раствора. Хроматографировать в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем подвижной фазы - 1500 мкл; объем пробы испытуемого раствора 4 мкл.

УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводить не менее 3 параллельных определений.

В этой же системе исследовать 4 мкл раствора СО рутина. Определить время удерживания и идентифицировать пик рутина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычислить площадь пика рутина на хроматограмме и рассчитать среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание рутина в бутонах софоры японской в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляется по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 4 \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 4} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

Где S – среднее значение площади пика рутина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО рутина, вычисленное из хроматограмм раствора СО рутина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО рутина г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление раствора СО рутина. Точную навеску (0,005 г) предварительно высушенного рутина (содержание основного вещества $\geq 95\%$) перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в 15 мл 70% этилового спирта при нагревании и после охлаждения довести объем раствора до метки тем же растворителем.

Определено, что содержание рутина в образцах бутонов софоры японской варьирует от $10,96 \pm 0,40 \%$ до $15,20 \pm 0,51 \%$

Результаты исследований использованы при разработке проекта ФС «Софоры японской бутонны» в разделах «Идентификация» (Определение основных групп биологическим активных веществ) и «Количественное определение» (Приложение №4).

5.4. Определение подлинности плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.).

В ФС.2.5.0130 «*Sophorae japonicae fructus*» ГФ РФ XV в разделе «Идентификация» регламентировано: «Определение основных групп биологически активных веществ определять методом ТСХ на пластинках со слоем силикагеля. В качестве подвижной фазы применять смеси муравьиной кислоты-воды-метанола-этилацетата (2:5:13:80). В качестве стандарта использовать раствор СО софорикозида. Идентификацию проводить по обнаружению темной зоны адсорбции на уровне софорикозида и трех темных зон адсорбции ниже» [8].

Доминирующими флавоноидами плодов софоры японской является софорикозид (4'-*O*- β -D-глюкопиранозид генистеина) и кемпферол-3-*O*-софорозид. Указанные вещества были нами выделены методом колоночной хроматографии. Применив ферментативный и кислотный гидролиз, УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию мы изучили их химического состава, что подробно описано в Главе 4 диссертационной работы. Проводя идентификацию плодов методом ТСХ (наблюдая интенсивность окраски зон), исходя из выхода софорикозида и кемпферол-3-*O*-софорозид при выделении, а также из полученных в исследовании УФ-спектров веществ полосы 2 и 3 (элюированны с хроматографической пластины), мы можем утверждать, что софорикозид и кемпферол-3-*O*-софорозид являются равнозначно доминирующими. Принимая во внимание равнозначность доминирования веществ и учитывая требования Государственной фармакопеи Российской Федерации целесообразным представляется совершенствование стандартизации плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) в разделе «Идентификация» в части «Определение основных групп биологически активных веществ». С этой целью нами разработан способ идентификации плодов софоры японской методом ТСХ с применением двух стандартов: софорикозида (вещества второй полосы ТСХ) и кемпферол-3-*O*-софорозид (вещества третьей полосы ТСХ).

Как и при идентификации бутонов, для плодов использовали свойство флавоноидов флуоресцировать в УФ свете при длине волны 254 нм и 365 нм, а также давать желтое окрашивание с хлоридом алюминия(III). Идентификацию осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

Методика ТСХ-анализа плодов софоры японской.

На линию старта хроматографической пластины «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированной при 100-105° С, наносят в виде полос шириной 1 см (по 0,03 мл) испытуемого водно-спиртового извлечения, а также растворов СО софорикозида и кемпферол-3-*O*-софорозида. Полученную ТСХ-хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254нм, и после проявления 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III) - в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются флуоресцирующие зоны, соответствующие СО софорикозиду (доминирующее вещество полосы 2) и кемпферол-3-*O*-софорозиду (доминирующее вещество полосы 3). При этом обнаруживаются так же и другие вещества в минорных количествах.

5.5. Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской.

В ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания регламентировано количественное определение суммы фенольных соединений методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 260 нм . В пересчете на генистеин содержание фенольных соединений должно быть не менее 8,0%.

Нами в качестве метода исследования использована прямая и дифференциальная спектрофотометрия в соответствии ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»

ГФРоссийской Федерации XV издания. Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений оценивали на спектрофотометре Specord 40 (AnalytikJena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190-500 нм, кюветы с толщиной слоя 10 мм.

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской нами учитывалось свойство флавоноидов (флавоны и их производные – флавонолы) образовывать комплекс с раствором алюминия хлорида, что проявляется в образовании батохромного сдвига длинноволновой полосы в электронном спектре испытуемого раствора. При изучении электронных спектров водно-спиртовых извлечений плодов софоры японской, приведенных на рисунках 35-39, обнаружены два максимума поглощения, характерные для флавонов и флавонолов с замещенной 3-ОН-группой (265 ± 2 нм и 350 ± 2 нм) [26]. В дифференциальном варианте максимум поглощения в электронном спектре водно-спиртового извлечения плодов софоры японской обнаруживается при 400 ± 2 нм. УФ-спектр раствора ФСО цинарозида имеет аналогичный батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения в присутствии $AlCl_3$ в условиях прямой спектрофотометрии в область 396 ± 2 нм и максимум поглощения в дифференциальном варианте в области 400 ± 2 нм (рис. 38, 39). Следовательно, именно флавоны и их производные (флавонолы) определяют спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений плодов софоры японской.

Изучение УФ-спектральных характеристик позволило рекомендовать цинарозид в качестве СО в условиях дифференциальной спектрофотометрии суммы флавоноидов в плодах софоры японской при аналитической волне при 400 ± 2 нм.

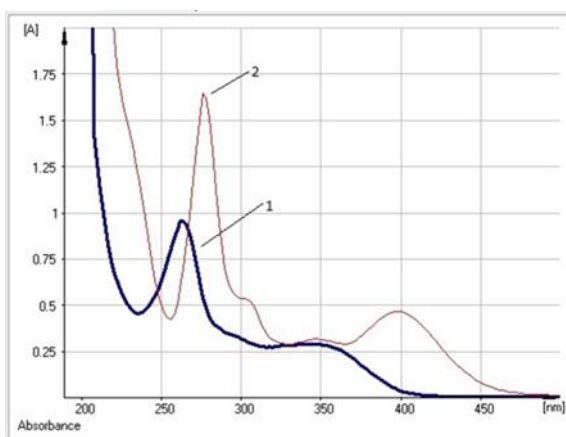


Рисунок 35 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения плодов софоры японской (1) и водно-спиртового извлечения плодов софоры японской в присутствии алюминия хлорида (2).

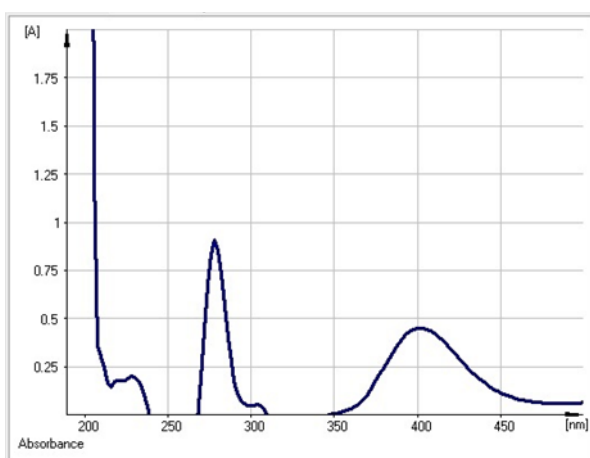


Рисунок 36 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения плодов софоры японской (дифференциальный вариант).

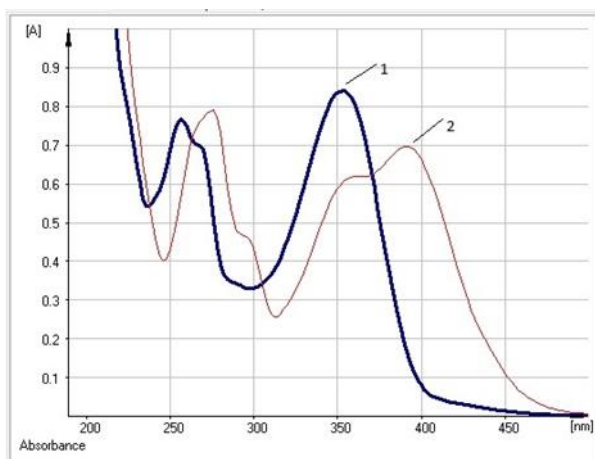


Рисунок 37 - Электронные спектры спиртового раствора ФСО цинарозида (1) и спиртового раствора цинарозида в присутствии алюминия хлорида (2).

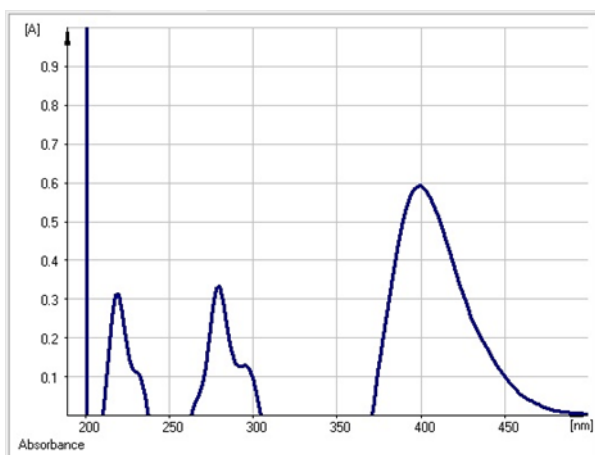


Рисунок 38 - Электронный спектр раствора спиртового раствора ФСО цинарозида (дифференциальный вариант).

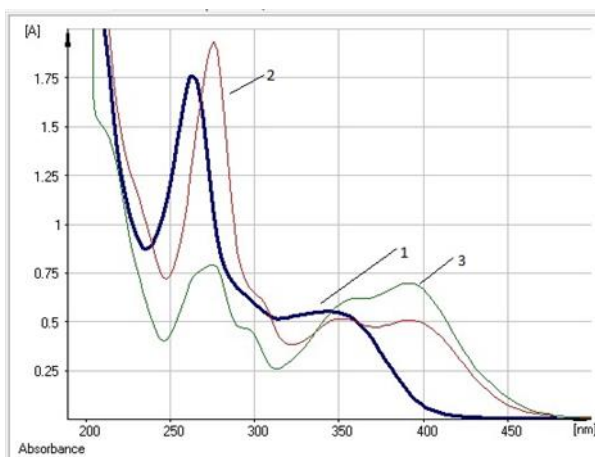


Рисунок 39 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения плодов софоры японской (1), водно-спиртового извлечения плодов софоры японской в присутствии алюминия хлорида (2) и спиртового раствора ФСО цинарозида в присутствии алюминия хлорида (3).

Испытуемый раствор готовили в соответствии с разделом «Количественное определение» ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» (степень измельчения – фракция, проходящая через сито с отверстиями 2 мм, экстрагент - 70 % этиловый спирт в извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 минут), используя соотношение «сырье – экстрагент» - 1:50. Предварительно проверили влияние различных факторов на полноту водно-спиртового извлечения флавоноидов из плодов софоры японской японской представлено в Таблице 22.

Таблица 22 - Влияние различных факторов на полноту водно-спиртового извлечения флавоноидов из плодов софоры японской

Экстрагент	Соотношение «сырье- экстрагент»	Время экстракции, мин	Степень измельчения, мм	Содержание суммы флавонолов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
40	1:50	60	2	13,46 ± 0,74
50	1:50	60	2	12,96 ± 0,72
60	1:50	60	2	13,17 ± 0,76
70	1:50	60	2	13,93 ± 0,75
80	1:50	60	2	13,33 ± 0,73
90	1:50	60	2	10,02 ± 0,74
96	1:50	60	2	9,73 ± 0,74
Время экстракции				
70	1:50	5	2	11,87 ± 0,76
70	1:50	15	2	12,13 ± 0,74
70	1:50	30	2	12,17 ± 0,74
70	1:50	45	2	12,46 ± 0,73
70	1:50	60	2	13,93 ± 0,74
70	1:50	90	2	12,57 ± 0,73
70	1:50	120	2	13,23 ± 0,74
Степень измельчения				
70	1:50	60	1	12,47 ± 0,76

70	1:50	60	2	13,32 ± 0,73
70	1:50	60	3	13,12 ± 0,73
Соотношение сырье : экстрагент				
70	1:30	60	2	12,24± 0,76
70	1:50	60	2	13,94± 0,74
70	1:100	60	2	13,98± 0,73

Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до ±0,01. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (синяя полоса).

Испытуемый раствор: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (раствор А), тщательно перемешивают. Далее 2 мл полученного раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого

раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 нм на фоне раствора сравнения.

Раствор сравнения: 2 мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида.

Около 0,0050 г (точная навеска) ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 70 % этилового спирта при нагревании. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А ФСО цинарозида). Далее 2 мл полученного раствор А ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б ФСО цинарозида), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов цинарозида с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б ФСО цинарозида на спектрофотометре при длине волны 400 нм на фоне раствора сравнения ФСО цинарозида.

Раствор сравнения цинарозида: 2 мл раствор А ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора Б извлечения сырья;

D_0 – оптическая плотность раствора ФСО цинарозида;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса ФСО цинарозида, г.

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия ФСО цинарозида целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 400 нм – **340**:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 340 \cdot (100 - W)},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

340 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) ФСО цинарозида при 400 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XV издания [24].

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов в водно-спиртовом извлечении плодов софоры японской и раствора ФСО цинарозида.

Линейность методики определяли для серии водно-спиртовых растворов ФСО цинарозид (с концентрациями в диапазоне от 0,00424 до 0,0424 мг/мл) при длине волны 400 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности от

концентрации водно-спиртовых растворов ФСО цинарозида и рассчитывали уравнение линейной регрессии (рис. 40; табл. 23).

Таблица 23 - Исходные данные для оценки линейности методики по раствору ФСО цинарозида

Концентрация водно-спиртового раствора цинарозида, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из четырех последовательных измерений)
0,0042	0,1639
0,0084	0,2982
0,0169	0,5921
0,0424	1,5745

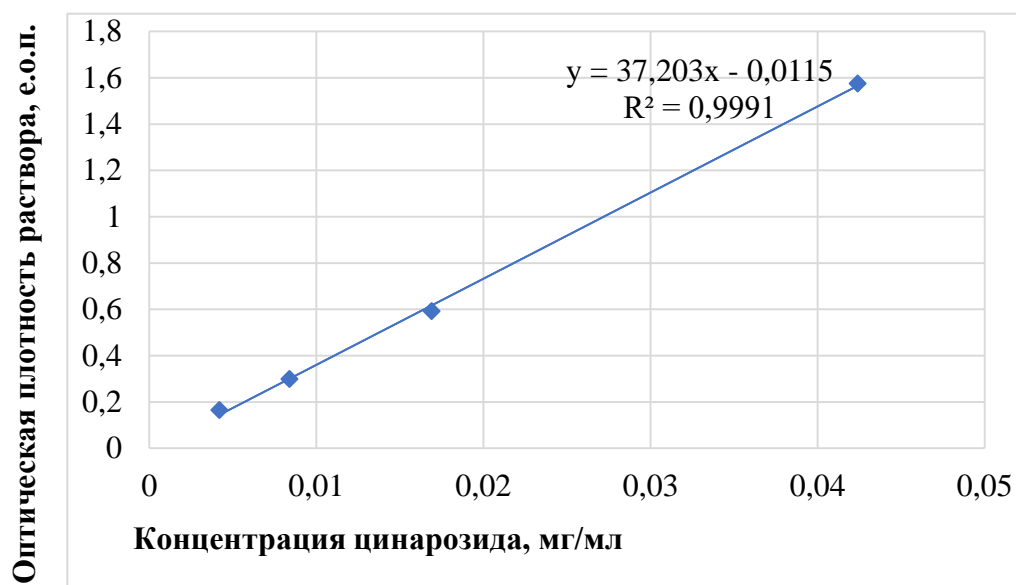


Рисунок 40 - Зависимости оптической плотности от концентрации водно-спиртовых растворов ФСО цинарозида

Как видно из таблицы 24, ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,48\%$, данная методика для количественной оценки суммы флавоноидов в плодах софоры японской пригодна для использования и может

быть рекомендована для внесения изменений в ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Таблица 24 - Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской

Метрологические характеристики	n	f	\bar{X} , %	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	T (P,t) (табл.)	$\Delta\bar{X}$	E, %
Значения	11	10	13,36	0,4351	0,1312	95	2,23	$\pm 0,33$	$\pm 2,48$

Установлено, что среднее содержание суммы флавоноидов в исследуемом образце сырья составило 13,36% (относительная погрешность определения составила $\pm 2,48\%$).

Таким образом, нами определено, что сумма флавоноидов в пересчете на цинарозид в образцах плодов софоры японской различных регионов и заготовителей варьирует от $8,52 \pm 0,21\%$ до $13,45 \pm 0,33\%$.

5.6. Методика количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской

В ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания не стандартизирует указанное ЛРС по содержанию софорикозида.

В Главе 1 мы уже обратили внимание, что софорикозид показал свою высокую эффективность при лечении диабета, остеопороза, остеоартрита, при этом акцентируется, что наиболее активен софорозикозид, полученный из софоры японской. Исходя из этого мы считаем, что плоды софоры японской перспективны в отношении получения из них не только фармацевтических субстанций, содержащих суммы флавоноидов, но и

софорикозида как основного биологически активного соединения изофлавоновой (фитостероидной) природы данного сырья. В этой связи актуальной представляется стандартизация плодов софоры японской по содержанию софорикозида с использованием метода ВЭЖХ.

Разработана методика количественного определения содержания софорикозида (4'-*O*- β -D-глюкопиранозид генистеина) в плодах софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» с использованием стандартного образца софорикозида, выделенного нами из исследуемого сырья с использованием колоночной хроматографии и идентифицированного с помощью УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Определено, что содержание софорикозида в плодах софоры японской варьирует от $5,45 \pm 0,22\%$ до $6,67 \pm 0,25\%$. Ошибка единичного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,51\%$.

Испытуемый раствор готовили в соответствии с разделом «Количественное определение» ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» (степень измельчения – фракция, проходящая через сито с отверстиями 2 мм, экстрагент - 70 % этиловый спирт, извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 минут, соотношение «сырье – экстрагент» - 1:50).

Для ВЭЖХ были использованы ацетонитрил и вода многоступенчатой системы очистки (адсорбция, обратный осмос, мембранное фильтрование), которые мы проверили на чистоту в условиях хроматографического анализа. Реактивы для ТСХ, спектрофотометрии, проведения качественных реакций на флавоноиды имели степень чистоты х.ч. Химическое строение выделенного софорикозида изучали с использованием УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии на приборах «JNM-ESX 400» (399.78 МГц), «JNM-ESX 400» (100.52 МГц). Выделенный софорикозид степенью чистоты $\geq 98\%$ применяли в качестве стандартного образца для ВЭЖХ. Кроме того, в

качестве стандартных образцов использовали выделенный нами ранее генистеин, кемпферол-3-*O*-софорозид (ChemWhat, степень чистоты $\geq 95\%$) и ФСО рутина (степень чистоты 97,3%).

Были соблюдены требования ОФС 1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» и ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического анализа» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

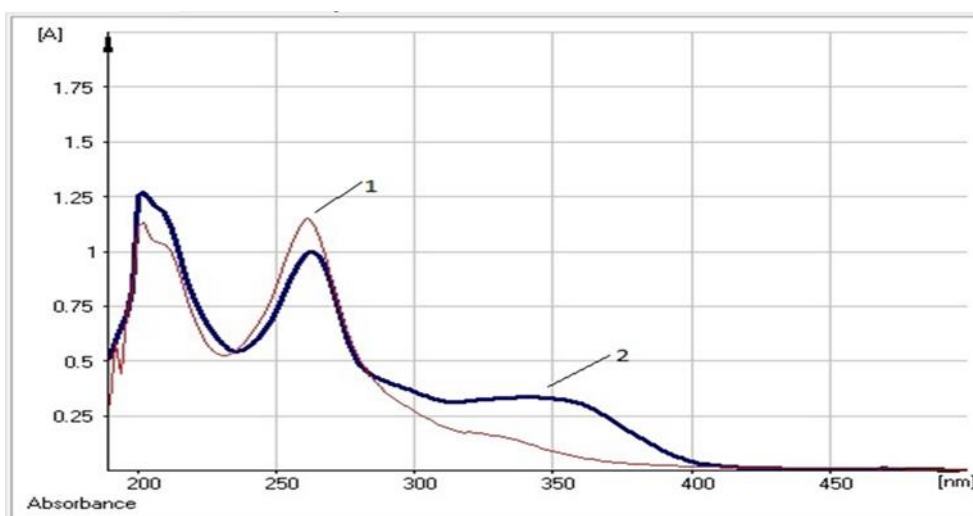


Рисунок 41 - Электронные спектры спиртового раствора софорикозида (1) и водно-спиртового извлечения (2)

Предварительно были изучены УФ-спектры водно-спиртового извлечения из данного сырья и спиртового раствора софорикозида приведенные на рисунке 41. Было определено, что софорикозид имеет максимум поглощения при длине волны 262 ± 2 нм, как и водно-спиртовое извлечение из плодов софоры японской; софорикозид вносит существенный вклад в кривую поглощения УФ-спектров извлечения из плодов софоры японской; оптимальная аналитическая длина волны для проведения ВЭЖХ-анализа 262 нм.

Условия хроматографического разделения.

Исследовали:

- водно-спиртовое извлечение плодов софоры японской, полученное в оптимальных условиях;
- спиртовой раствор СО софорикозида;
- извлечение из плодов софоры японской с добавкой софорикозида.

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях:

колонка - стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм);

элюентная система:

- подвижная фаза А (ПФА): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, объем 1500 мкл;

- подвижная фаза Б (ПФБ): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 6:4, объем 900 мкл;

скорость потока – 100 мкл/мин;

суммарный объем элюента (ПФА и ПФБ) - 2400 мкл;

детекция - при длине волны 262 нм;

объемы проб – 2 мкл.

Пригодность системы устанавливали по стандартному раствору софорикозида. *Стандартный раствор софорикозида* получали путем растворения 5 мг (точная навеска) в 25 мл 96 % этилового спирта при нагревании.

Время удерживания софорикозида около 16 минут.

В результате проведения ВЭЖХ-анализа выявлено, что в условиях градиентного режима в водно-спиртовом извлечении из плодов софоры японской обнаруживаются девять пиков (рис. 42). Доминирующий по высоте и площади пик соответствует времени удерживания СО софорикозида - около 16 мин (рис. 43; табл. 25), что подтверждается добавками к извлечению из плодов софоры японской СО софорикозида (рис. 44).

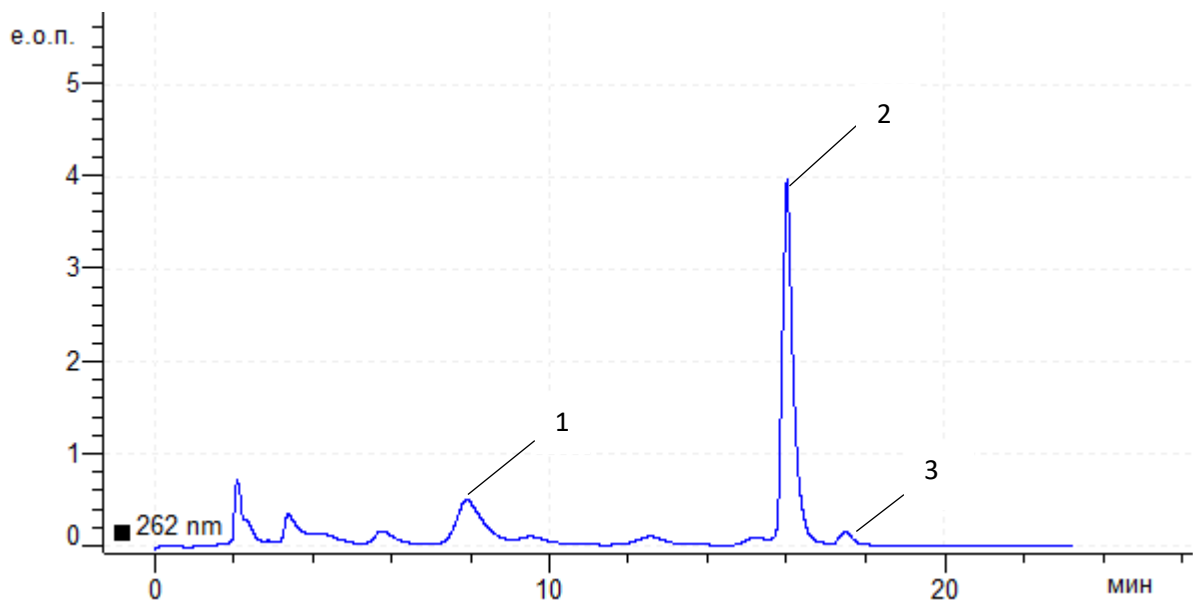


Рисунок 42 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из плодов софоры японской.

Обозначения: кемпферол-3-О-софорозид (1); софорикозид (2); генистеин (3).

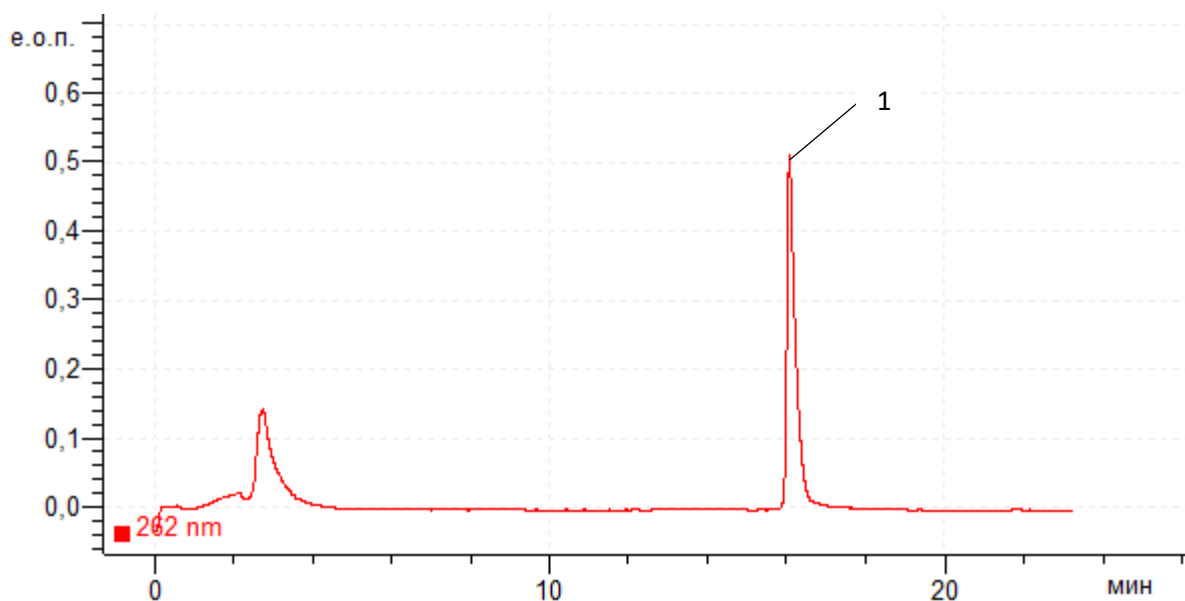


Рисунок 43 - ВЭЖХ-хроматограмма СО софорикозида (1).

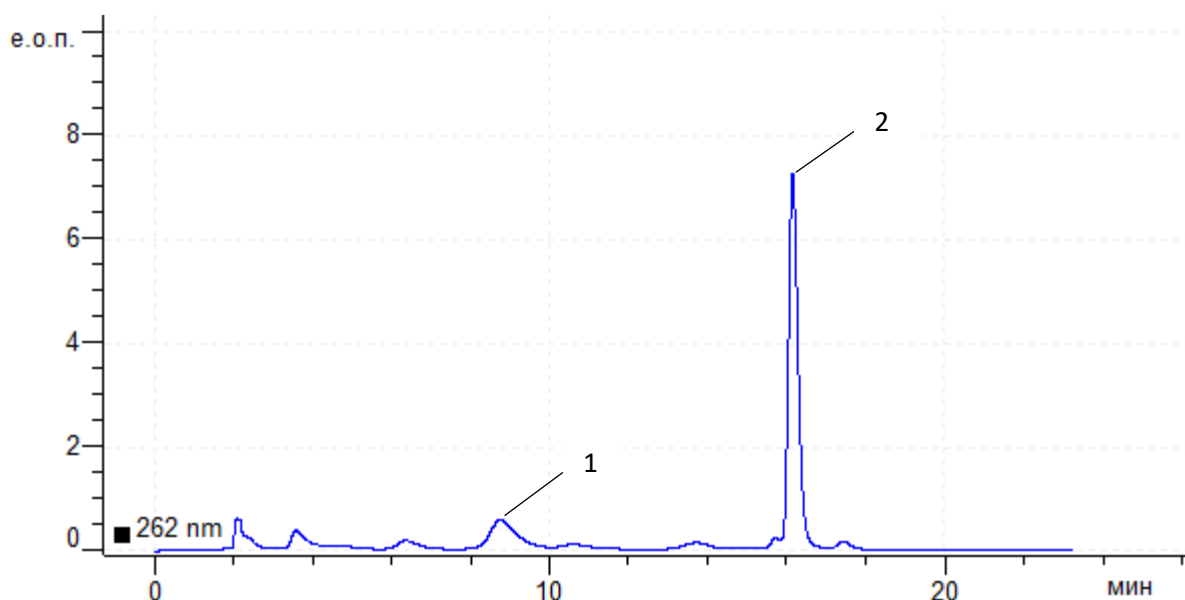


Рисунок 44 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из плодов софоры японской с добавкой софорикозида. Обозначения: кемпферол-3-О-софорозид (1); софорикозид (2).

Также в ходе эксперимента было определено время удерживания СО генистеина и определено положение пика, соответствующего генистеину на ВЭЖХ-хроматограмме извлечения из плодов софоры японской (рис. 45), что позволило доказать, что генистеин является минорным компонентом в плодах софоры японской.

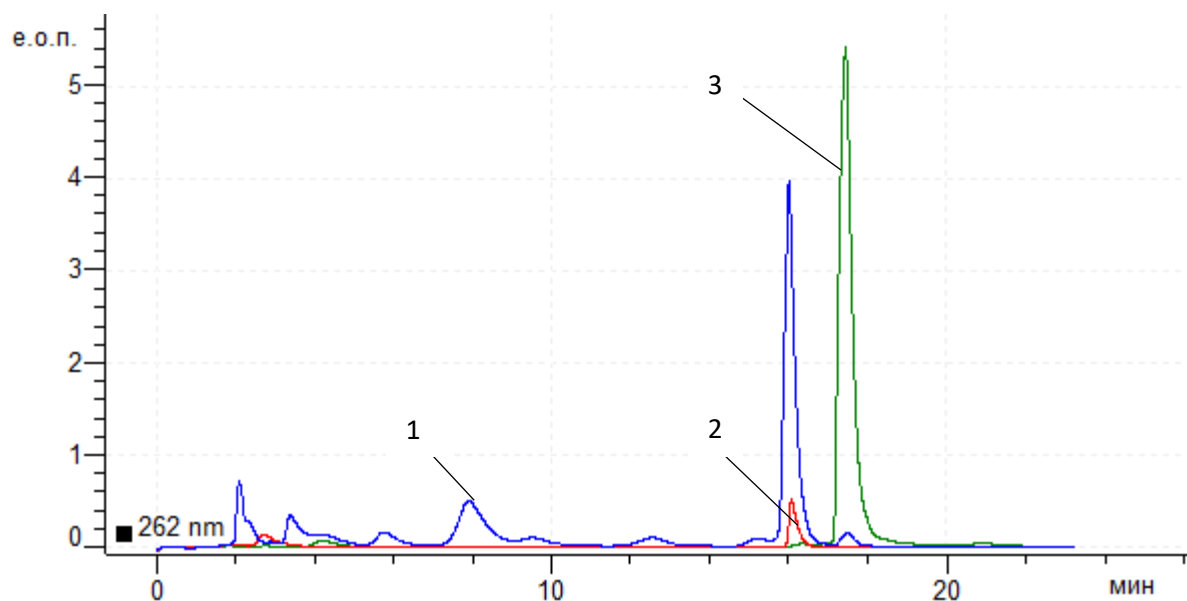


Рисунок 45 - Наложение ВЭЖХ-хроматограмм извлечения из плодов софоры японской (1), СО софоригозида (2) и СО генистеина (3).

Таблица 25 - Время удерживания пиков на хроматограммах извлечения и стандартных образцов (среднее из 3-х измерений)

Вещество (номер пика)	Время удерживания на хроматограмме (среднее по трем измерениям), мин.	
	Стандартный образец	Извлечение
Софоригозид	15,90	15,92
Генистеин	17,394	17,40
Рутин	5,70	-
Кемпферол-3-О-софорозид	7,85	7,88

В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов были получены следующие результаты (табл. 26).

Таблица 26 - Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	5204	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	2,28	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,16	Не более 1,5

Данные хроматограмм позволяют оценить пригодность подобранной хроматографической системы. Система может быть использована для количественного определения софорикозида.

Валидационный анализ.

Специфичность методики оценивали по соответствию времени удерживания софорикозида в хроматограмме стандартного раствора софорикозида и извлечения из плодов софоры японской.

Для определения линейности определения софорикозида исследовали пробы стандартного раствора софорикозида в диапазоне от 0,248 мг/мл до 0,992 мг/мл (табл. 27; рис.46). На основании полученных данных строили график зависимости «концентрация, мг/мл – площадь пика», рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$) и коэффициент детерминации (R^2).

Правильность методики подтверждали на образце извлечения из плодов софоры японской введением аликвоты образца раствора стандартного

образца софорикозида в количестве от 80% до 120% от исходного содержания.

Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ представлены в таблице 28.

Ошибка единичного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,51\%$ (табл. 27).

Таблица 27 - Зависимость площади пика от концентрации софорикозида

Площадь пика	Концентрация софорикозида, мг/мл
127,208708	0,248
263,272121	0,496
478,603200	0,992

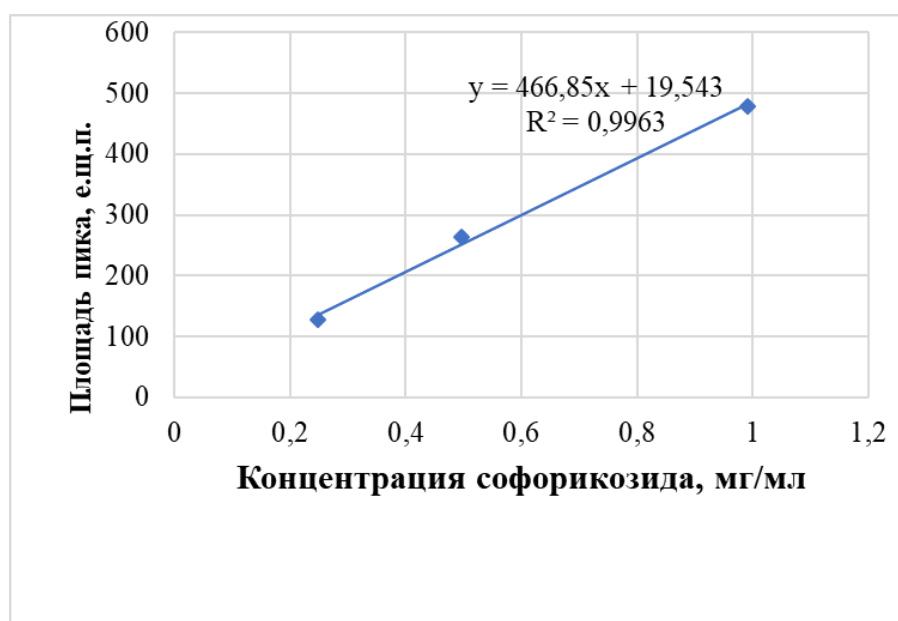


Рисунок 46 - График зависимости площади пика от концентрации спиртового раствора софорикозида. Уравнение линейной регрессии. Коэффициент детерминации.

Таблица 28 - Метрологические характеристики методики количественного определения софорикозида в плодах софоры японской

n	f	\bar{x}	s^2	S	$S_{\bar{x}}$	P,%	t (P, f)	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon},\%$	E,%
11	10	5,47	0,0123	0,1108	0,0334	95,0	2,23	$\pm 0,25$	$\pm 0,07$	$\pm 1,36$	$\pm 4,51$

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности разработанной методики для количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской.

Методика количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Синяя лента»). Перед хроматографическим анализом 1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостный хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 2 мкл полученного испытуемого раствора.

Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система:

подвижная фаза А (ПФА): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, объем 1500 мкл;

подвижная фаза Б (ПФБ): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 6:4, объем 900 мкл; скорость потока – 100 мкл/мин; суммарный объем элюента (ПФА и ПФБ) - 2400 мкл; детекция - при длине волны 262 нм.

УФ-детектирование для расчета количества софорикозида осуществляют при длине волне 262 нм. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Содержание софорикозида в плодах софоры японской в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 2 \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 2} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

Где S – среднее значение площади пика софорикозида в водно-спиртовом извлечении из плодов софоры японской; S_0 – среднее значение площади пика софорикозида, вычисленное из хроматограммы раствора СО софорикозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО софорикозида, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление стандартного раствора софорикозида. Точную навеску (0,005 г) СО софорикозида (содержание основного вещества ≥ 98 %) перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в 15 мл 96% этилового спирта при нагревании и после охлаждения довести объем раствора до метки тем же растворителем.

Определено содержание софорикозида (от $5,45 \pm 0,22\%$ до $6,67 \pm 0,75\%$) в образцах плодов софоры японской различных регионов

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана и научно обоснована методика определения подлинности бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) и их экстракционных препаратов методом ТСХ с применением ФСО рутина и СО кверцетина.
2. Разработана и научно обоснована методика определения подлинности плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) и их экстракционных препаратов методом ТСХ с применением СО софорикозида и СО кемпферол-3-*O*-софорозида.
3. Разработана и научно обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом дифференциальной спектрофотометрии на аналитической волне 414 нм с расчетом на ФСО рутин. Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин в образцах цветков софоры японской различных регионов Российской Федерации варьирует от $16,12 \pm 1,33\%$ до $22,37 \pm 1,33\%$.
4. Разработана и научно обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом дифференциальной спектрофотометрии на аналитической волне 400 нм с расчетом на СО цинарозид. Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на цинарозид в образцах плодов софоры различных регионов Российской Федерации варьирует от $8,52 \pm 0,21\%$ до $13,45 \pm 0,33\%$.
5. Разработана и научно обоснована методика количественного определения рутина в бутонах софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом ВЭЖХ в изократическом режиме. Определено, что содержание рутина в образцах бутонов софоры японской различных регионов Российской Федерации варьирует от $10,96 \pm 0,40\%$ до $15,20 \pm 0,51\%$.

6. Разработана и научно обоснована методика количественного определения софорикозида в плодах софоры японской (*Sophora japonica* L.) методом ВЭЖХ в градиентном режиме. Определено, что содержание софорикозида в образцах плодов софоры японской различных регионов Российской Федерации варьирует от $5,45 \pm 0,22\%$ до $6,67 \pm 0,75\%$.

ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ И ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ

6.1. Исследование нейротропной активности

Исследование нейротропной активности (тест Порсолта) проводили на кафедре фармакологии имени ЗДН РФ, профессора А.А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Анализ нейротропной активности густого экстракта плодов софоры японской и индивидуальных соединений (софорикозид и 3-*O*-софорозид кемпферола) проводили с использованием теста Порсолта. Данный тест предусматривает оценку двигательной активности крыс, помещенных в стеклянный цилиндр диаметром 20 см и высотой 40 см, на 1/3 заполненный водой с температурой 27 ± 1 °С. Животное помещали в цилиндр на 5 мин, регистрировали время активного и пассивного плавания, время иммобилизации. Увеличение времени активного плавания и уменьшение времени иммобилизации рассматривали как антидепрессантный эффект. Тест проводили спустя 2 ч после введения густого экстракта и БАС.

Густой экстракт и индивидуальные соединения вводили однократно внутрижелудочно через зонд на фоне 1% водной нагрузки. Дозы (табл. 29), исследуемых образцов подбирались экспериментальным путем.

Тест Порсолта

однократное внутрижелудочное введение густого экстракта плодов софоры японской – в дозе 10 мг/кг

При однократном внутрижелудочном введении ГЭ софоры японской в дозе 10 мг/кг отмечалось достоверное повышение двигательной активности опытных животных относительно водного контроля до 202% ($p < 0,05$) что свидетельствует о наличии антидепрессантной активности у экспериментального препарата.

Таблица 29 – Исследование нейротропной активности густого экстракта плодов софоры японской.

Двигательная активность животных за 5 мин, с	
Контроль	Опыт 1
Вода	ГЭ софоры японской, 10 мг/кг
25,71±5,69	51,86±9,88
100%	202%
О/К	p=0,041

Примечание:

здесь и далее * - $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы

Тест Порсолта

однократное внутрижелудочное введение БАВ плодов софоры японской – SJ-4 и SJ-10 - в дозе 1 мг/кг

При однократном внутрижелудочном введении **БАВ плодов софоры японской – SJ-4 в дозе 1 мг/кг** не отмечалось достоверных изменений двигательной активности опытных животных относительно водного контроля ($p \geq 0,05$) (табл.30).

При однократном внутрижелудочном введении **БАВ плодов софоры японской – SJ-10 в дозе 1 мг/кг** отмечалось достоверное повышение двигательной активности опытных животных относительно водного

контроля до 144% ($p < 0,05$) (табл. 30), что свидетельствует о наличии антидепрессантной активности у экспериментального препарата.

Таблица 30 - Исследование нейротропной активности БАВ плодов софоры японской.

Двигательная активность животных за 5 мин, с		
Контроль	Опыт 1	Опыт 2
Вода	БАВ плодов софоры японской SJ-4 , 1 мг/кг	БАВ плодов софоры японской SJ-10 , 1 мг/кг
48,29±3,56	45,57±8,50	69,71±6,39
100%	94%	144%
О/К	$p=0,773$	$p=0,013$

Примечание:

здесь и далее * - $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы

БАВ **SJ-4** – софорикозид; БАВ **SJ-10** - кемпферол-3-*O*-софорозид.

6.2. Диуретическая активность

Исследование проводили на белых беспородных крысах обоего пола, помимо исследуемых образцов животные получали водную нагрузку внутрижелудочно в объеме 3% от массы тела. Густой экстракт плодов софоры японской был использован в дозе 10 мг/кг. Препараты сравнения: фуросемид в дозе 1 мг/кг (препарат сравнения для 4-х ч опытов) и гипотиазид в дозе 20 мг/кг (препарат сравнения для 24-х ч опытов). В опыте были использованы обменные клетки. Собранные порции мочи по истечении 4 и 24 ч подвергали анализу. Измеряли почечную экскрецию воды, а также концентрацию креатинина колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3.

Таблица 31 – Влияние внутрижелудочного введения ГЭ плодов софоры японской в дозе 10 мг/кг на экскреторную функцию почек интактных крыс в 4 ч и 24 ч эксперименте ($M \pm m$, $n = 7$)

Время, ч	Показатели	Контроль	ГЭ плодов софоры японской, 10 мг/кг
4	Диурез, мл/4 ч	2,13±0,11	2,00±0,12
	О/К	-	p=0,456
	Экскреция креатинина, мг/4 ч	0,14±0,03	0,12±0,01
	О/К	-	p=0,506
24	Диурез, мл/4 ч	2,75±0,16	2,62±0,29
	О/К	-	p=0,511
	Экскреция креатинина, мг/4 ч	3,17±0,32	1,78±0,27
	О/К	-	p=0,006

Примечание:

здесь и далее * - $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.

Таблица 32 - Влияние внутрижелудочного введения ГЭ плодов софоры японской в дозе 10 мг/кг на экскреторную функцию почек интактных крыс в 4 ч и 24 ч эксперименте, %

Время, ч	Показатели, %	Контроль, %	ГЭ плодов софоры японской, 10 мг/кг
4	Диурез	100%	94%
	Экскреция креатинина	100%	86%
24	Диурез	100%	95%
	Экскреция креатинина,	100%	56%

Результаты:

В 4-х часовых экспериментах при однократном внутривенном введении ГЭ плодов софоры японской в дозе 10 мг/кг *не отмечалось* достоверных изменений почечной экскреции воды (диурез) и креатинина (креатининурез) (табл. 31 и 32).

В 24-х часовых экспериментах при однократном внутривенном введении ГЭ плодов софоры японской в дозе 10 мг/кг отмечалось изолированное достоверное снижение креатининуреза на 44% ($p < 0,05$), что свидетельствует о снижении клубочковой фильтрации под действием экспериментального препарата.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Густой экстракт плодов софоры обладает антикреатининурезной активностью, диуретической активности не выявлено (в опытах на животных).

2. Густой экстракт плодов софоры обладает выраженной антидепрессантной активностью (в опытах на животных).

3. Кемпферол-3-О-софорозид обладает выраженной антидепрессантной активностью (в опытах на животных).

4. Софорикозид, диуретической и антидепрессантной активности не проявил (в опытах на животных).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного фармакогностического исследования бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) позволили сделать следующие общие выводы:

1. В результате морфолого-анатомического исследования бутонов софоры японской методом световой микроскопии выявлены ранее не описанные признаки, имеющие диагностическое значение в определении видовой специфичности софоры японской, а именно: поверхности тычиночных нитей голые, в структуре заметны клетки паренхимы с кристаллическими включениями бурого цвета; густое опушение поверхности гинецея бичевидными волосками с бурой пигментацией протопласта, - которые внесены в раздел «Идентификация» проекта фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны».

2. С использованием методов световой, люминесцентной и поляризационной микроскопии при исследовании гистологических срезов плодов софоры японской впервые выявлены такие морфолого-анатомические особенности строения, как энциклоцитный тип устьичного аппарата, ладьевидные замыкающие клетки устьичного аппарата, коллатеральный и пара коллатеральных бобовидной формы проводящих пучков в области спинки и брюшного шва боба, кристаллическая обкладка тканей вокруг коллатеральных пучков, люминесценция тканей боба и семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм и 420-530 нм, наличие поверхностного адаптационного слоя воска на створках боба, наличие крахмальных зерен в устьичном аппарате, отсутствие слизи в паренхиме семени, наличие капель жира в паренхиме семени, аморфные скопления кристаллоидов флавоноидов, склереиды кожуры семени. Выявленные признаки внесены в раздел «Идентификация» проекта дополнений фармакопейной статьи «Софоры японской плоды».

3. В результате проведенных фитохимических исследований из плодов софоры японской выделены и изучены с использованием данных

УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов химических превращений (кислотный и ферментативный гидролиз) 6 флавоноидов, среди которых 4'-*O*- α -L-рамнопиранозид генистеина) и 4'-*O*-рутинозид генистеина [генистеин-4'-*O*-(6''- α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозид] являются новыми природными соединениями.

4. Разработана методика ТСХ-анализа бутонов софоры японской с применением стандартных образцов рутина и кверцетина в системе растворителей *n*-бутанол - уксусная кислота – вода (4:1:2) с идентификацией в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм. Методика включена в раздел «Идентификация» подраздел «Определение основных групп биологически активных веществ» проекта фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны».

5. Разработана методика ТСХ-анализа плодов софоры японской с применением стандартных образцов софорикозида и кемпферол-3-*O*-софорозида в системе растворителей *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2) с идентификацией в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм. Методика включена в проект дополнений к фармакопейной статье «Софоры японской плоды» в разделе «Идентификация» подраздел «Определение основных групп биологически активных веществ».

6. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов бутонов софоры японской методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 414 нм в пересчете на рутин. Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на рутин в бутонах софоры японской варьирует от $16,12 \pm 1,33\%$ до $22,37 \pm 1,33\%$, что позволило обосновать нижний предел содержания флавоноидов в бутонах - «не менее 16,0%».

7. Разработана методика количественного определения рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ в изократическом режиме. Определено, что содержание рутина в образцах бутонов софоры японской

различных регионов Российской Федерации варьирует от $10,96 \pm 0,40$ % до $15,20 \pm 0,51$ %, что позволило обосновать числовой показатель для данного сырья - нижний предел содержания рутина «не менее 10,0%».

8. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов плодов софоры японской методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 400 нм в пересчете на цинарозид. Определено, что сумма флавоноидов в пересчете на цинарозид в плодах софоры японской варьирует от $8,52 \pm 0,21$ % до $13,45 \pm 0,33$ % что позволило обосновать числовой показатель для данного сырья - нижний предел содержания флавоноидов «не менее 8,0 %»

9. Разработана методика количественного определения содержания софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ в градиентном режиме. Определено, что содержание софорикозида в плодах софоры японской варьирует от $5,45 \pm 0,22$ % до $6,67 \pm 0,25$ %, что позволило обосновать числовой показатель для данного сырья - нижний предел содержания «не менее 5,0%».

10. Обнаружено выраженное антидепрессантное действие кемпферол-3-*O*-софорозида и густого экстракта плодов софоры японской, которые повышают двигательную активность животных (по сравнению с контрольными группами) соответственно до 144% и до 202%.

11. Разработан проект фармакопейной статьи «Софоры японской бутоны» для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации.

12. Разработан проект дополнений к разделам «Определение» «Идентификация» и «Количественное определение» ФС.2.5.0130 «Софоры японской плоды» для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Практические рекомендации. Результаты диссертационной работы способствуют совершенствованию подходов стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды, могут быть использованы в организации

образовательного процесса по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях, принимающих участие в создании, стандартизации, сертификации и проведении контроля качества ЛС и ЛП.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведенное фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской позволит внедрить это ценное ЛРС в фармацевтическую практику. Результаты исследований бутонов и плодов софоры японской могут быть использованы при разработке подходов стандартизации других видов лекарственного растительного сырья.

Список литературы:

1. Алеутский, Н.Н. Атлас лекарственных растений китайской медицины [Текст] / Н.Н. Алеутский, С.М. Николаев, В.С. Ахмедов - М.: Научный мир, 2010. – 319 с. – ISBN 978-5-91522-140-7
2. Андреева, Д.М. Эректильная дисфункция: преимущества и недостатки регуляторов растительного происхождения [Текст] / Д.М. Андреева, Е.Е. Лесковская, С.Д. Марченко, Т.Н. Саватеева-Любимова, К.В. Сивак, К.И. Стосман // Эффективная фармакотерапия. - 2016. - № 2. - С. 24-31.
3. Артюхов, В.Г. Биофлавоноиды [Текст] / В.Г. Артюхов, А.А. Рябухин - Воронеж: Изд-во Воронежского гос. Университета, 2013. – 280 с. – ISBN 978-5-9273-1980-3.
4. Аслонова, И.Ж. Лечебные свойства растения софора японская [Текст] / И.Ж. Аслонова, И.Д. Кароматов // Биология и интегративная медицина. - 2017. - №11. - С. 179-190.
5. Беликов, В.В. Фармацевтическая химия: 5-е изд., перераб. и доп. [Текст] / В.В. Беликов – Москва: МИА, 2020. – Ч. 2: Специальная фармацевтическая химия. – 768 с. – ISBN 978-5-9986-0408-5.
6. Варина, Н.Р. Некоторые аспекты использования лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, в качестве экопротекторов [Текст] // Н.Р. Варина, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // Интеграционные связи фармацевтической экологии – 2023: сборник материалов Первой международной конференции. – Москва, 2024. - С. 25-27.
7. Георгиевский В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений [Текст] / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука, Сибирское отд., 1990. - 336 с.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс] URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>

9. Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС) [электронный ресурс] / Минздрав России, Росздравнадзор. – Москва, 2024. – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения: 13.01.2026). – Текст : электронный.
10. Дайронас, Ж.В. Биологически активные вещества природного происхождения. Учебное пособие для студентов III-V курсов, обучающихся по специальности 330501 «Фармация» по дисциплине Б1.Б.25 – Фармакогнозия [Текст] / Ж.В. Дайронас - Пятигорск, 2022.
11. Дорохина, О.А. Лекарственные растения, содержащие алкалоиды и флавоноиды [Текст] / О.А. Дорохина, А.А. Шмыгарева, М.В. Лабковская // Оренбург. - 2024.
12. Дрозд, Г.А. Фармакогностическо-иммунологическое изучение плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) [Текст] / Г.А. Дрозд, Л.А. Горбачева // Фармация. - 1994. - № 1. - С. 34-37.
13. Зайцева, Е.Н. Анализ влияния рутина и гравитационного воздействия на выделительную функцию почек [Текст] / Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, В.А. Куркин // Наука и инновации в медицине. - 2016. - Т. 1, № 4. - С. 47-50.
14. Казакова, М.А. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов и сортов рода мята (*Mentha* L.) : 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Казакова Мария Александровна. – Самара, 2025. – 24 с.
15. Калашникова, О.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской [Текст] / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. - 2023. - Т. 57, № 3. - С. 29-34. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-3-29-34
16. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества [Текст] / Т. Л. Киселева, Ю.А. Смирнова - М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. - 295 с.

17. Клиническая фармакология [Текст]: учебник под ред. В. Г. Кукеса ; 5-е изд., перераб. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 1056 с. – ISBN 978-5-9704-5458-4.
18. Ковалева, Л.Г. Исследование свободных аминокислот плодов софоры японской [Электронный ресурс] / Л.Г. Ковалева, Е.Б. Никифорова // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 10-11. - С. 2487-2490. URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32820> (дата обращения: 17.07.2024).
19. Ковалева, Л.Г. Совершенствование технологии переработки плодов софоры японской в суммарный фитопрепарат [Электронный ресурс] / Л.Г. Ковалева, А.М. Сампиев // Разработка и регистрация лекарственных средств.- 2014. - №4(9). - С. 46-54. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23587040> (дата обращения: 17.07.2024)..
20. Ковалева, Л.Г. Современное состояние и перспективы дальнейшего исследования плодов софоры японской [Текст] / Л.Г. Ковалева, А.М. Сампиева, М.Р. Ховача, Е.Б. Никифорова // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2012. - №22 (141). - Выпуск 20. - С.163.
21. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды [Текст] / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстиков; Российская академия наук, Сибирское отделение. Новосибирский институт органической химии. - Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. - 232 с.
22. Кулагин, О.Л. Антиоксидантная активность некоторых фитопрепаратов, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды [Текст] / О.Л. Кулагин [и др.] // Фармация. - 2007. - № 2. - С. 30-32.
23. Куркин, В.А. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации [Текст] // В.А. Куркин, И.К. Петрухина, А.С. Акушская // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 8 (часть 4). - С. 898-902.

24. Куркин, В.А. Возможности фитотерапии при заболеваниях системы пищеварения [Текст] / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, В.Р. Галямова // Фармация и фармакология. - 2016. - Т. 4, № 2. - С. 26–40.
25. Куркин, В.А. Место и роль фармакогнозии в совершенствовании стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов [Текст] / В.А. Куркин // Современные проблемы фармации. Сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета. – Самара. - 2024. - С. 276-279.
26. Куркин, В.А. Место и роль фармакогнозии в формировании государственной фармакопеи российской федерации [Текст] / Куркин В.А. // Интеграционные связи фармацевтической экологии - 2023. Сборник материалов Первой международной конференции. Москва. - 2024. - С. 47-48.
27. Куркин, В.А. Определение содержания пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ [Текст] / В.А. Куркин, О.А. Белова, А.Р. Мубинов, М.В. Егоров // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57, № 10. – С. 32-36.
28. Куркин, В.А. Определение содержания рутина в бутонах софоры японской методом ВЭЖХ [Текст] / В.А. Куркин, М.К.Чередник // Химико-фармацевтический журнал. - 2025. - Т. 59, № 5. - С. 39-44.
29. Куркин, В.А. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах софоры японской [Текст] / В.А. Куркин, М.К. Чередник // Химия растительного сырья. - 2025. - № 3. - С. 157-166.
30. Куркин, В.А. Ресурсоведение лекарственных растений: сырьевая база и рациональное природопользование [Текст] / В.А. Куркин, В.Г. Лужанин, В.Д. Белоногова, А.Ю. Турышев, О.Е. Правдивцева, А.В. Курицын, В.Б. Браславский, Д.К. Гуляев, М.В. Егоров, В.М. Рыжов, В.В. Стеняева, Н.Р. Варина: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов (факультетов) - Самара, 2025.

31. Куркин, В. А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений [Текст] / В. А. Куркин // Фармация. - 2002. - № 2. - С 8-16.
32. Куркин, В.А. Фармакогнозия [Текст]: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов): 5-е изд. перераб. и доп. - Самара: ООО «Полиграфическое объединение “Стандарт”», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. - 1278 с.
33. Куркин, В.А. Фармакогнозия [Текст]: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов): 6-е изд. перераб. и доп. - Самара: ООО «Полиграфическое объединение «Стандарт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (2024).
34. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды как класс природных биологически активных соединений – органопротекторов [Текст] / В.А. Куркин, Н.Р. Варина, Е.В. Авдеева, И.В. Рузаева // Фармация и фармакология. – 2023. – Т. 11, № 5. – С. 399–411.
35. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений [Текст] / В.А.Куркин, Г.Г. Запесочная, Е. В. Авдеева, В. Н. Ежков // Самара: ООО "Офорт"; ГОУ ВПО СамГМУ. - 2005. - 128 с.
36. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения [Текст] / В.А. Куркин // Самара: СамГМУ. - 1996.
37. Куркин, В.А. Флавоноиды плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) / В.А. Куркин, М.К. Чередник [Электронный ресурс] // Фармация, 2026; 75 (1): 5–11. <https://doi.org/10.29296/25419218-2026-01-01>. <https://elibrary.ru/yomkpc>
38. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений [Текст]: монография / В.А. Куркин - Самара: издательство ОФОРТ, 2012. - 290 с.
39. Куркин, В.А. Химическая природа биологически активных соединений как методологическая основа фармакопейного анализа лекарственного

растительного сырья [Текст] / В.А. Куркин // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024. Сборник тезисов. - Санкт-Петербург. - 2024. - С. 7-9.

40. Лавренов, В.К. Полная энциклопедия лекарственных растений. В двух томах. [Текст] / В.К. Лавренов, Г.В. Лавренов - М.: Олма-Пресс, 1999. - 267 с.

41. Лабковская, М.В. Предмет и задачи фармакогнозии, стандартизация лекарственного сырья [Текст]: учебно-методическое пособие / М.В. Лабковская, А.А. Шмыгарева, А.А. Кочукова // Оренбург. - 2025.

42. Лагерь, А.А. Токсикологическая химия [Текст]: учебник для вузов: 3-е изд., перераб. и доп. / А.А. Лагерь, С.А. Величко – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 560 с. – ISBN 978-5-9704-4520-0.

43. Леонтьева, Н.В. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности дигидрокверцетина, витамина С, нефромона плюс, валемидина плюс полиоксидония [Текст] / Н.В. Леонтьева, О.В. Ветровой // Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины. - 2022. - № 2 (36). - С. 41-47.

44. Леонтьева, Н.В. Флавоноиды-природные антиоксиданты [Текст] / Н.В. Леонтьева // Журнал Казахско-Российского медицинского университета. - 2024. - С. 44-50. DOI: 10.24412/2790-1289-2024-1-44-50.

45. Машковский, М.Д., Лекарственные средства [Текст]: 16-е изд., перераб., испр. и доп. - М.: Новая волна, 2012.

46. Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской. Чередник М.К., Куркин В.А.- патент на изобретение - RU 2850387, Россия, 2025.

47. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия [Текст] / Д.А. Муравьева - М.: Медицина, 1981. - 656 с.

48. Муравьева, Д. А. Фармакогнозия [Текст]: учебник: 5-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2020. – 656 с. – ISBN 978-5-225-04816-9.

49. Насудари, А.А. Использование софоры японской, произрастающей в Азербайджане, для получения рутина, софорина и сока [Текст] / А.А. Насудари, Д.Д. Саилова // Традиционная медицина и питание. - М. - 1994.- С.188.
50. Охременко, О.С. Амперометрическое определение антиоксидантной активности флавоноидов в различных извлечениях, полученных из плодов софоры японской [Текст] / О.С. Охременко, В.В. Верещагина, И.И. Павлюченко, А.А. Басов, А.Э. Моргоев // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск. Фармакология.- 2006. - С. 27-28.
51. Охременко, О.С. Полисахариды плодов софоры японской [Текст] / О.С. Охременко, О.И. Попова // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск. Фармакология. - 2006. - С.52.
52. Палий, А.Е. Биологически активные вещества пряно-ароматических и лекарственных растений коллекции Никитского ботанического сада [Текст] / А.Е. Палий, О.А. Гребенникова, В.Д. Работягов, И.Н. Палий // Биология растений и садоводство: теория, инновации. - 2014. - №139.
53. Полная иллюстрированная энциклопедия лекарственных растений России [Текст]: под ред. Н. В. Беспаловой. – М.: Эксмо, 2020. – 296 с. – ISBN 978-5-699-55421-6.
54. Применение софорикозида для получения лекарственных средств. <https://patents.google.com/patent/RU2454236C1/ru>
55. Радомская, Т.Г. Разработка методики определения подлинности корней алтея лекарственного и компонентов грудного сбора № 1 методом ТСХ [Текст] / Т.Г. Радомская, В.М. Рыжов, В.А. Куркин // Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики. Материалы V Международной научно-практической конференции, посвященной 45-летию фармацевтического факультета. – Кемерово. - 2024. - С. 277-281.
56. Разницына, В.М. Исследование хроматографического поведения флавоноидов методом ОФ ВЭЖХ [Текст] / В.М. Разницына, Р.В. Шафигулин, В.А. Куркин, А.В. Буланова // Инновации и "зелёные" технологии. IV

Всероссийская научно-практическая конференция : сборник материалов и докладов. - Самара. - 2024. - С. 141-144.

57. Рыжов, В.М. Микроскопия растительного материала на люминесцентном микроскопе АЛЬТАМИ ЛЮМ 2: принципы работы и перспективы использования в фармацевтическом анализе [Текст] / В.М. Рыжов, Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко // Современные проблемы фармации. Сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета. - Самара. - 2024. - С. 228-233.

58. Савельева, А.Е. Фармакогностическое исследование бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L) : 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Савельева Анна Евгеньевна. – Самара, 2023. – 24 с.

59. Самбукова, Б.В. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии [Текст] / Б.В. Самбукова, Б.В. Овчинников, В.П. Ганапольский, А.Н. Ятманов, П.Д. Шабанов // Обзоры клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – №2. – С. 56-63.

60. Сампиев, А.М. Актуальность исследований по созданию лекарственных средств полифункционального действия, сочетающих фармацевтические субстанции природного и синтетического происхождения [Текст] / А.М. Сампиев, Е.Б. Никифорова, М.В. Гамагина // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». - 2020. - Т. 22, № 1. - С. 80-85.

61. Сидельников, Н.И. Актуальные направления изучения перспективных видов лекарственных растений [Электронный ресурс] / Н.И. Сидельников // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. - 2024. - 14(2). - С. 128–131. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-2-128-131>.

62. Самылина, И.А. Фармакогнозия [Текст]: учебник / И.А. Самылина, Г.П. Яковлев - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 976 с.
63. Софоры японской бутоны. ВФС 42-341-74.
64. Софоры японской плоды. ФС ФС.2.5.0130.
65. Справочник Видаль «Лекарственные препараты в России» [Электронный ресурс] URL: <https://www.vidal.ru>
66. Справочник растений. [Электронный ресурс] URL: https://plant_directory.academic.ru/2386/SOPHORA_JAPONICA_L. (дата обращения: 10.09.2024).
67. Сухенко, Л.Т. Перспективы создания профилактических препаратов с антиоксидантной активностью из растений Каспийского региона [Текст] / Л.Т. Сухенко, А.Р. Умерова // Прикаспийский вестник медицины и фармации. - 2023. - Т. 4, № 3. - С. 39–44.DOI: 10.29039/2712-8164-2023-3-39-44
68. Тырков, А.Г. Химический состав и противогрибковая активность масла софоры японской из астраханского региона [Текст] / А.Г. Тырков, О.В. Дегтярев, Э.Р. Акмаев, С.Б. Носачев // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2012. - № 6 (92). - С. 50-53.
69. Фармакогнозия [Текст]. Атлас : в 3 т. / под ред. Н.В. Беспаловой, В.А. Куркина. – М.: ГЭОТАР-Медиа. - 2020. – Т. 2. – 512 с. – ISBN 978-5-9704-5480-6.
70. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения [Текст]: учебник, 3-е изд., испр. и доп. / под ред. Г.П. Яковлева – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2020. – 863 с. – ISBN 978-5-299-00936-4.
71. Фармакогнозия [Текст]: учебник, 2-е изд., перераб. и доп. / под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева – М.: Медицина - 2013. – 976 с. – ISBN 978-5-225-04347-8.

72. Фармакология [Текст]: учебник, 6-е изд., перераб. и доп. / под ред. Р.Н. Аляутдина – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 1104 с. – ISBN 978-5-9704-6480-4.
73. Фасмер, М. Этимологический словарь русского языка [Текст]: в 4 т. / М. Фасмер; пер. с нем и доп. члена-корреспондента АН СССР О. Н. Трубачева; под ред. и с предисл. проф. Б. А. Ларина. - Изд. 2-е, стер. - Москва: Прогресс. - 1986-1987.
74. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов XII Всероссийского симпозиума с международным участием (Москва, 13-17 октября 2025 г.) [Электронный ресурс]: М.: ИФР РАН, 2025. – М.: Издательство «Перо», 2025. – 230 с. – 4,72 Мб Мб. ISBN 978-5-00270-203-9 (дата обращения: 10.12.2025).
75. Флора СССР, под ред. Б.К. Шишкина. Издательство: Академия наук СССР. Москва, Ленинград. 1954. Т. 21. 23 с.
76. Халиуллина, А.С. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе качества лекарственного растительного сырья: современные проблемы и перспективы применения метода [Текст] / А.С. Халиуллина, В.А. Куркин, А.А. Фархутдинов, И.А. Конева // Инновационные технологии в фармации. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Иркутск. - 2024. - С. 77-80.
77. Хасанова, С.Р. Экспериментально-теоретическое обоснование создания и стандартизации лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью [Текст]: дис. ... д. фарм. наук: 14.04.02 / Хасанова Светлана Рашитовна. — Уфа. - 2016. – С. 462.
78. Чередник, М.К. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья (софоры японской плоды) и (софоры японской бутоны) [Текст] / М.К. Чередник, В.А. Куркин // Современные проблемы фармации. Сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета. - Самара. -2024. - С. 217-220.

79. Чередник, М.К. Количественное определение суммы флавоноидов в плодах софоры японской (*Sophora japonica* L.) [Текст] / М.К. Чередник, В.А. Куркин // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов XII Всероссийского симпозиума с международным участием. М.: ИФР РАН, 2025. – М.: Издательство «Перо», 2025. – С. 135. - [Электронное издание]. ISBN 978-5-00270-203-9 (дата обращения: 10.12.2025).
80. Чередник, М.К. Методика определения подлинности плодов софоры японской [Текст] / М.К. Чередник // Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики. Материалы V Международной научно-практической конференции, посвящённой 45-летию фармацевтического факультета. - Кемерово. - 2024. - стр. 426-429.
81. Чередник, М.К. Морфолого-анатомическое исследование плодов софоры японской [Текст] / М.К. Чередник, В.А. Куркин // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарств – приоритетное направление развития фармацевтической науки»: Сборник материалов – Пермь, ПГФА. - 2025. – с. 193-198.
82. Чередник, М.К. Определение содержания софорикозида в плодах софоры японской методом ВЭЖХ [Текст] / М.К. Чередник, В.А. Куркин, А.А. Андреев // Химико-фармацевтический журнал. - 2025. - Т. 59, № 8. - С. 42-47.
83. Чередник, М.К. Современные аспекты морфолого-анатомического анализа плодов софоры японской [Электронный ресурс] / М.К. Чередник, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, А.В. Жданова // Современные проблемы фармации. Сборник научных трудов IV Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященная 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора А.А. Лебедева и 70-летию со дня рождения заслуженного работника высшей школы РФ,

профессора В.А. Егорова. - Самара. – 2025. – С. 154-156 - Электронные материалы конференции https://t.me/MOD_PRO_PHARM (дата обращения: 20.12.2025).

84. Чередник, М.К. Стандартизация бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) [Текст] / М.К. Чередник, В.А. Куркин, А.Р. Мубинов // Химия растительного сырья. - 2025. - № 4. - С. 279-290.

85. Шмыгарева, А. А. Разработка методики получения и стандартизации настойки на основе лекарственного растительного сырья / А.А. Шмыгарева, В.А. Куркин, М.В. Лабковская [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 223-228.

86. Яковлев, Г.П. Бобовые земного шара / Г.П. Яковлев – Л.: Наука, 1991. – 144 с.

87. American Herbal Pharmacopoeia. Botanical Pharmacognosy – Microscopic Characterization of Botanical Medicines [Электронный ресурс]: - 2011. URL: <https://archive.org/details/AmericanHerbalPharmacopoeiaBotanicalPharmacognosyMicroscopicCharacterizationOfBotanicalMedicines/page/n1/mode/2up>

88. Anand, David A. V. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid [Текст] / A. V. Anand David, R. Arulmoli, S. Parasuraman // Pharmacognosy Reviews. – 2016. – Vol. 10, № 20. – P. 84–89. – DOI: 10.4103/0973-7847.194044.

89. Békési, A. Albert Szent-Györgyi and the discovery of vitamin P [Текст] / A. Békési, B. Rácz, G. B. Sánta // Orvosi Hetilap. – 2012. – Vol. 153, № 37. – P. 1465-1470. – DOI: 10.1556/OH.2012.29459.

90. Bensky, D. Chinese herbal medicine: materia medica [Текст] / D. Bensky, S. Clavey, E. Stöger // 3rd ed. – Seattle : Eastland Press. - 2004. – XXVII, 1254 p. – ISBN 0-939616-42-4.

91. Chagas, M. V. N. L. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability [Текст] / M. V. N. L. Chagas, R. S. G. de França, L.

- M. R. Chow [et al.] // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 19, № 5. – P. 592–602. – DOI: 10.2174/1871520619666181122111807.
92. Chang, L., Simultaneous Quantification of Six Major Flavonoids From *Fructus sophorae* by LC-ESI-MS [Текст] / L. Chang, X. X. Zhang, Y. P. Ren, L. Cao, X. R. Zhi, L. T. Zhang L. T. // *MS and Statistical Analysis Indian J Pharm Sci*. 2013. May-Jun;75(3):330–338. doi: 10.4103/0250-474X.117437.
93. Chen, L. Analysis of phenolic compounds in different parts of *Sophora japonica* L. by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [Текст] / L. Chen, Y. Zhang, M. Liu // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2021. – Vol. 204. – Art. № 114268. – DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114268.
94. Cherednik, M.K. HPLC determination of sophoricoside content in japanese sophora fruit [Текст] / M.K. Cherednik, V.A. Kurkin, A.A. Andreev // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. - 2025. - Т. 59. № 8. - С. 888-893.
95. Chinese pharmacopoeia = Фармакопея Китая [Текст]: в 4 т. / ed. by the Pharmacopoeia Commission of PRC. – 2020 ed. – Beijing : China Medical Science Press, 2020. – Vol. 1. – P. 378-379.
96. D'Andrea, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? [Текст] / G. D'Andrea // *Fitoterapia*. – 2015. – Vol. 106. – P. 256–271. – DOI: 10.1016/j.fitote.2015.09.018.
97. 11.0. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (2022) [Электронный ресурс]; URL: [https:// www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition](https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition) (дата обращения: 17.07.2024).
98. Enogieru, M. M. A. R. Rutin : therapeutic potential and recent advances in drug delivery [Текст] / M. M. A. R. Enogieru [et al.] // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2021. – Vol. 30, № 9. – P. 965-977. – DOI: 10.1080/13543784.2021.1956912.
99. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition [Электронный ресурс]. EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines. Accessed October 13; 2021. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. (дата обращения: 17.07.2024).

100. European Pharmacopoeia = Европейская фармакопея [Электронный ресурс]: [официальное издание] / ed. by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). – 11th ed. – Strasbourg : Council of Europe, 2022.
101. Fialova, P. M. Anti-inflammatory activity of quercetin and its glucosides from *Onobrychis viciifolia* [Текст] / P. M. Fialova [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2022. – Vol. 85, № 6. – P. 1627–1635. – DOI: 10.1021/acs.jnatprod.2c00269.
102. Gábor, M. The pharmacology of benzopyrone derivatives and related compounds [Текст] / M. Gábor. – Budapest : Akadémiai Kiadó, 1988. – P. 450 – ISBN 963-05-4563-8.
103. Heenan, P. B. Relationships of the New Zealand species of *Sophora* (Fabaceae) based on DNA sequence analyses [Текст] / P. B. Heenan, M. I. Dawson, G. P. Lewis, J. T. Kang // *New Zealand Journal of Botany*. – 2004. – Vol. 42, № 5. – P. 923–933. – DOI: 10.1080/0028825X.2004.9512942.
104. He, M. Analysis of alkaloids in *Sophora flavescens* and *Sophora japonica* by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [Текст] / M. He, Y. Li, H. Wang // *Journal of Separation Science*. – 2008. – Vol. 31, № 2. – P. 290–297. – DOI: 10.1002/jssc.200700365.
105. Jardin des Plantes (Paris), Muséum national d'histoire naturelle (France).
Catalogue des plantes du Jardin de l'École de médecine de Paris. – Paris : De l'imprimerie de Crapelet, 1804. – 59 с.
106. Japanese Pharmacopoeia = Японская фармакопея [Электронный ресурс]: [официальное издание] / ed. by the Ministry of Health, Labour and Welfare. – 18th ed. – Tokyo : Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), 2021.
107. Jin, J. A comprehensive metabolomics study of *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott fruits using UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS [Текст] / J. Jin, M. Li, Y. Wang [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2020. – Vol. 158. – Art. № 113017. – DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113017.

108. Jin, J. Metabolic profiling of alkaloids in the fruits of *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott (*Sophora japonica* L.) [Текст] / J. Jin, M. Li, Y. Wang [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – Vol. 159. – P. 405–413. – DOI: 10.1016/j.jpba.2018.07.012.
109. Jin, J. Metabolic profiling of fruits of *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott (*Sophora japonica* L.) at different growth stages [Текст] / J. Jin, M. Li, Y. Wang // Food Research International. – 2018. – Vol. 114. – P. 123–131. – DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.050.
110. Kim, J. M. Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica* [Текст] / J. M. Kim, H. S. Yun-Choi // Arch. Pharm. Res. 2008. - 31(7). – p. 886-890. DOI: 10.1007/s12272-001-1242-1
111. Kim, S. K. Comparative study on the chemical constituents and bioactivities of different parts of *Sophora japonica* L. [Текст] / S. K. Kim, H. J. Jung, Y. S. Kim // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 21. – Art. № 3866. – DOI: 10.3390/molecules24213866.
112. Kim, T.H. Anti-inflammatory effects of kaempferol-3-O-sophoroside in human endothelial cells [Текст] / T.H. Kim, S.K. Ku, Ch. Lee, J. S. Bae // Inflammation Research. 2012. Vol. 61, No. 3. - pp. 217-24. doi: 10.1007/ s00011-011-0403-9.
113. Kurkin, V.A. HPLC determination of rutin content in japanese sophora buds [Текст] / V.A. Kurkin, M.K. Cherednik // Pharmaceutical Chemistry Journal. - 2025. - T. 59. № 5. - C. 563-569.
114. Lee, H.M. Alkaloid profiling and antimicrobial activity of *Sophora* species [Текст] / H. M. Lee, E. J. Park, S. Y. Kim [et al.] // Phytochemical Analysis. – 2017. – Vol. 28, № 6. – P. 520–528. – DOI: 10.1002/pca.2700.
115. Lee, H. W. Anti-inflammatory and anti-hemorrhoidal activity of *Sophora japonica* fruit extract [Текст] / H. W. Lee, S. Y. Ryu, M. H. Park // Journal of Ethnopharmacology. – 2019. – Vol. 234. – P. 193-199. – DOI: 10.1016/j.jep.2019.01.022.

116. Liang, X. Simultaneous determination of flavonoids and alkaloids in *Sophora japonica* by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [Текст] / X. Liang, Y. Tian, H. Wang // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2018. – Vol. 2018. – Art. № 9794626. – DOI: 10.1155/2018/9794626.
117. Li, Y. Acute and subacute toxicity evaluation of *Sophora japonica* L. fruits in rodents [Текст] / Y. Li, J. Chen, S. Zhang [et al.] // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2019. – Vol. 108. – Art. № 104457. – DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.104457.
118. Li, Y. Quercetin, inflammation and immunity [Текст] / Y. Li, J. Yao, C. Han [et al.] // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8, № 3. – Art. № 167. – DOI: 10.3390/nu8030167.
119. Panche, A. N. The pharmacological activity of the flavonoids [Текст] / A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra // *Fitoterapia*. – 2016. – Vol. 113. – P. 56-78. – DOI: 10.1016/j.fitote.2016.06.021.
120. Pharmacopoeia of the Republic of Korea = Корейская фармакопея [Электронный ресурс]: [официальное издание] / Ministry of Food and Drug Safety. – 12th ed. – Cheongju : MFDS, 2021. (дата обращения: 17.07.2024).
121. Plants of the World Online : [электронный ресурс] / Royal Botanic Gardens, Kew. – London : Kew Science, 2023. – URL: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60446405-2> (дата обращения: 13.01.2026). – Текст : электронный. (дата обращения: 10.12.2025).
122. Qi, Y. Isolation and purification of flavonoid and isoflavonoid compounds from the pericarp of *Sophora japonica* L. by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media [Текст] / Y. Qi, A. Sun, R. Renmin Liu, Zh. Meng, H. Xie // *Journal of Chromatography A*. – 2007. – Vol. 1140. No. 1-2. – Pp. 219-224. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.12.002.

123. Ratnayake, S. M. K. Pharmacology and preclinical profile of quercetin in cardiometabolic disease [Текст] / S. M. K. Ratnayake [et al.] // *Obesity Reviews*. – 2022. – Vol. 23, № 7. – Art. № e13455. – DOI: 10.1111/obr.13455.
124. Singh, R. Phytochemical and pharmacological review of *Sophora japonica* L. (*Fabaceae*) [Текст] / R. Singh, P. K. Sharma, R. Malviya // *Pharmacognosy Journal*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 1450–1456. – DOI: 10.5530/pj.2020.12.200.
125. Singh, S. K. Rutin and quercetin: biopharmaceutics, biological activity and nanotechnology [Текст] / S. K. Singh, P. K. Giri // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2023. – Vol. 75, № 3. – P. 301–328. – DOI: 10.1093/jpp/rgac091.
126. Spongberg S. A. *A Reunion of Trees : The Discovery of Exotic Plants and Their Introduction into North American and European Landscapes*. – Cambridge, Mass. : Harvard University Press, 1990. – viii, 270 с. – ISBN 0674766948.
127. Sun, A.A., Sun Q., Liu R. Preparative isolation and purification of flavone compounds from *Sophora japonica* L. by highspeed counter-current chromatography combined with macroporous resin column separation[Текст]. *J. Sep. Sci.* 2007; 30(7): 1013-1018. DOI: 10.1002/jssc.200600334
128. Szent-Györgyi, A. Vitamin P: flavonols as vitamins [Текст] / A. Szent-Györgyi // *Nature*. – 1936. – Vol. 138, № 3479. – P. 27. – DOI: 10.1038/138027a0. – Текст : непосредственный.
129. Szopa, A. Fatty acid composition and tocopherol content of *Sophora japonica* seed oil [Текст] / A. Szopa, M. Dziurka, H. Ekiert // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2017. – Vol. 94, № 8. – P. 1049–1056. – DOI: 10.1007/s11746-017-3011-1.
130. Tang, Y.P. Isolation and identification of antioxidants from *Sophora japonica* [Текст] / Y.P. Tang, Y.F. Li., J. Hu, F.C. Lou // *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2002; 4(2): 123-128. doi:10.1080/10286020290027407.
131. Wang, H. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the fruits of *Sophora japonica* L. [Текст] / H. Wang, X. Li, J. Zhang // *Carbohydrate Polymers*. – 2022. – Vol. 291. – Art. № 119560. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.119560.

132. Wang, L. A review on the potential benefits of flavonoids against atherosclerosis [Текст] / L. Wang, J. Li, Y. Chen // *Current Pharmaceutical Design*. – 2020. – Vol. 26, № 19. – P. 2256-2269. – DOI: 10.2174/1381612826666200316150236.
133. Wang, X. Simultaneous determination of seven alkaloids in *Sophora japonica* by HPLC-DAD [Текст] / X. Wang, Y. Sun, H. Li // *Journal of Chromatographic Science*. – 2010. – Vol. 48, № 8. – P. 654–658. – DOI: 10.1093/chromsci/48.8.654.
134. Wang, Z. One-Step Preparative Separation of Flavone and Isoflavone Glycosides from *Sophora Japonica* Fruit by High-Speed Counter-Current Chromatography Based on COSMO-RS Model [Текст]. / Z. Wang, Y. Liu, C. Fan, X. Cao // *Int. J. Nutr Sci.* 2021 ;6(3):148-154. doi: 10.30476/IJNS.2021.92070.1146.
135. Zhang, J. The toxicology and pharmacology of active compounds from *Sophora japonica* L. [Текст] / J. Zhang, M. Li, Y. Wang [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2022. – Vol. 36, № 9. – P. 3445-3463. – DOI: 10.1002/ptr.7548.
136. Zhang, Y. Cytisine-type alkaloids and flavonoids from the fruits of *Sophora japonica* L. [Текст] / Y. Zhang, M. Li, J. Wang [et al.] // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2015. – Vol. 61. – P. 472–475. – DOI: 10.1016/j.bse.2015.07.022.
137. Zhao, L. Determination of quinolizidine alkaloids in *Sophora japonica* L. by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [Текст] / L. Zhao, J. Wang, Y. Liu [et al.] // *Analytical Methods*. – 2021. – Vol. 13, № 15. – P. 1868–1876. – DOI: 10.1039/D1AY00185A.
138. Zhong, W. The chemical profiling and anticancer potential of functional polysaccharides from flos sophorae immaturus [Текст] / W. Zhong, C. Yang, Y. Zhang, Y. Liu, D. Yang // *Molecules*. - 27 (18), 5978. - 2022. doi: 10.3390/molecules27185978.

Приложение 1. Акты внедрения результатов диссертационной работы

Утверждаю»
 Директор
 Средне-Волжского филиала ФГБНУ
 "Всероссийский научно-исследовательский
 институт лекарственных и ароматических
 растений"

 В.Н. Сетин
 2025 г.
 АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в Средне-Волжском филиале ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений"

Комиссия в составе сотрудников Средне-Волжского филиала ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений": научного сотрудника Акутиной С.Ю., научного сотрудника Загорянского А.Н. подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.К. Чередник, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации растительного сырья – «Софоры японской бутоны» и «Софоры японской плоды» в работе Средне-Волжского филиала ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений"

Разработанные методики качественного и количественного анализа растительного сырья и экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» апробированы в процессе работы Средне-Волжского филиала ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений".

Внедренные результаты способствуют решению вопроса стандартизации растительного сырья и лекарственных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)».

Члены комиссии:

Научный сотрудник Средне-Волжского филиала ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений"



С.Ю. Акутина

Научный сотрудник Средне-Волжского филиала ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений"



А.Н. Загорянский

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.А. Обходская

2025 г.



о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»: начальника Центра Обходской О.А., провизора-аналитика Мироновой Е.Е., провизора-аналитика Шарымовой О.А., подтверждает использование материалов исследования М.К. Чередник, посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации растительного сырья и экстракционных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы Центра. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ, ВЭЖХ и УФ-спектроскопии в присутствии стандартных образцов биологически активных соединений. Методики определения подлинности сырья и препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской, а также методики определения суммы флавоноидов в бутонах и плодах софоры японской воспроизводимы и удобны в работе.

Внедрение результатов диссертационного исследования М.К. Чередник будет способствовать решению вопроса стандартизации бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), а также растительных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Начальник ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»

О.А. Обходская

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»

Е.Е. Миронова

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»

О.А. Шарымова

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И. Д. Давыдкин

« 09 / 12 / 2025 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики»: зав. кафедрой, д. фарм. н., профессора Куркиной А.В., доцента кафедры, к. фарм. н. Желонкина Н.Н., доцента кафедры, к. фарм. н., доцента Климовой Л.Д. подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.К. Чередник, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации растительного сырья – «Софоры японской бутоны» и «Софоры японской плоды» в работе кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики».

Разработанные методики качественного и количественного анализа растительного сырья и экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) апробированы в процессе работы кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики».

Внедренные результаты способствуют решению вопроса стандартизации растительного сырья и лекарственных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)».

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедрой «Озон Фармацевтики», д.фарм.н., профессор

 А.В. Куркина

Доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики», к.фарм.н.

 Н.Н. Желонкин

Доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий — базовой кафедры «Озон Фармацевтики», к.фарм.н., доцент

 Л.Д. Климова

Директор Института фармации, д.фарм.н., профессор

 А.В. Воронин

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
 ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
 лауреат премии Правительства РФ,
 доктор медицинских наук, профессор
 _____ И. Л. Давыдкин
 «09» _____ 2025 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии Института фармации: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора Воронина А.В., доцента кафедры, к.хим.н., доцента Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.биол.н., доцента Расцветовой Н.В. подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.К. Чередник, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации растительного сырья – «Софоры японской бутоны» и «Софоры японской плоды», в работе кафедры химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Разработанные методики качественного и количественного анализа растительного сырья и экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.) апробированы в процессе работы кафедры химии Института фармации

Внедренные результаты способствуют решению вопроса стандартизации растительного сырья и экстракционных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.).

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии Института фармации,
 д.фарм.н., профессор

 А.В. Воронин

Доцент кафедры химии Института фармации,
 к.хим.н., доцент

 С.Х. Шарипова

Доцент кафедры химии Института фармации,
 к.биол.н., доцент

 Н.В. Расцветова

Директор Института фармации, д.фарм.н., профессор

 А.В. Воронин

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

« 09 » 2025 г.

АКТ


о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора Куркина В.А., профессора кафедры, д.фарм.н., профессора Правдивцевой О.Е., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Рыжова В.М. подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.К. Чередник, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации растительного сырья – «Софоры японской бутоны» и «Софоры японской плоды», в работе кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Разработанные методики качественного и количественного анализа растительного сырья и экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» апробированы в процессе работы кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. Внедренные результаты способствуют решению вопроса стандартизации растительного сырья и лекарственных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)».

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н., профессор

 В.А. Куркин

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н., профессор

 О.Е. Правдивцева

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н., доцент

 В.М. Рыжов

Директор Института фармации, д.фарм.н., профессор

 А.В. Воронин

«Утверждаю»

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Пермская
государственная фармацевтическая
академия» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, д.фарм.н., доцент
В.Г. ЛУЖАНИН



2025 г.

о внедрении результатов диссертационной работы Чередник Марии Константиновны «Фармакогностическое исследование бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия в Пермской государственной фармацевтической академии

Комиссия в составе сотрудников Пермской государственной фармацевтической академии заведующего кафедрой фармакогнозии, д.фарм.н., доцента В.Д. Белоноговой, профессора кафедры фармакогнозии, д.фарм.н., доцента А.Ю. Турьшева подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.К. Чередник, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации растительного сырья – «Софоры японской бутоны» и «Софоры японской плоды» в работе кафедры фармакогнозии Пермской государственной фармацевтической академии.

Разработанные методики качественного и количественного анализа растительного сырья и экстракционных препаратов из бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)» апробированы в процессе работы кафедры фармакогнозии Пермской государственной фармацевтической академии. Внедренные результаты способствуют решению вопроса стандартизации растительного сырья и лекарственных препаратов на основе бутонов и плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.)».

Члены комиссии:

Заведующий кафедрой фармакогнозии,
д.фарм.н., доцент

В.Д. Белоногова

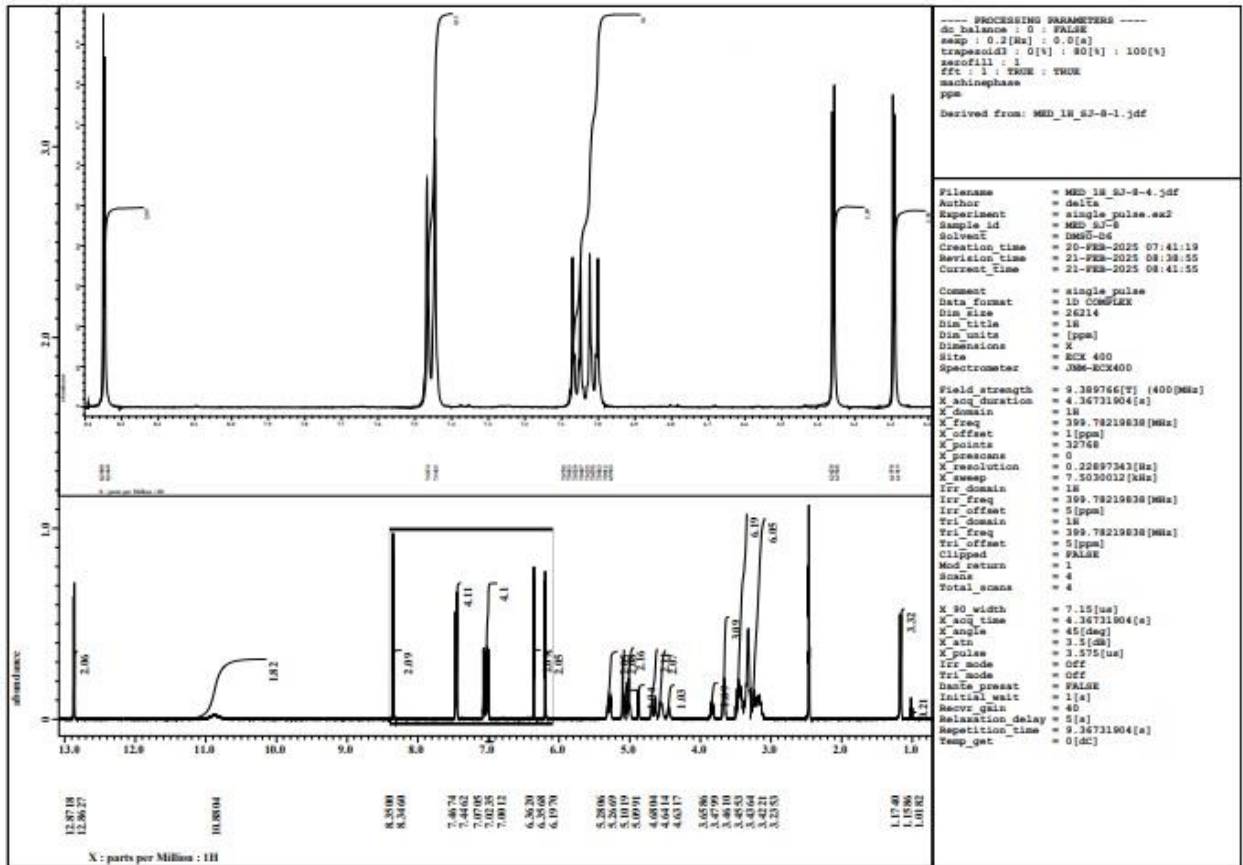
Профессор кафедры фармакогнозии,
д.фарм.н., доцент

А.Ю. Турьшев

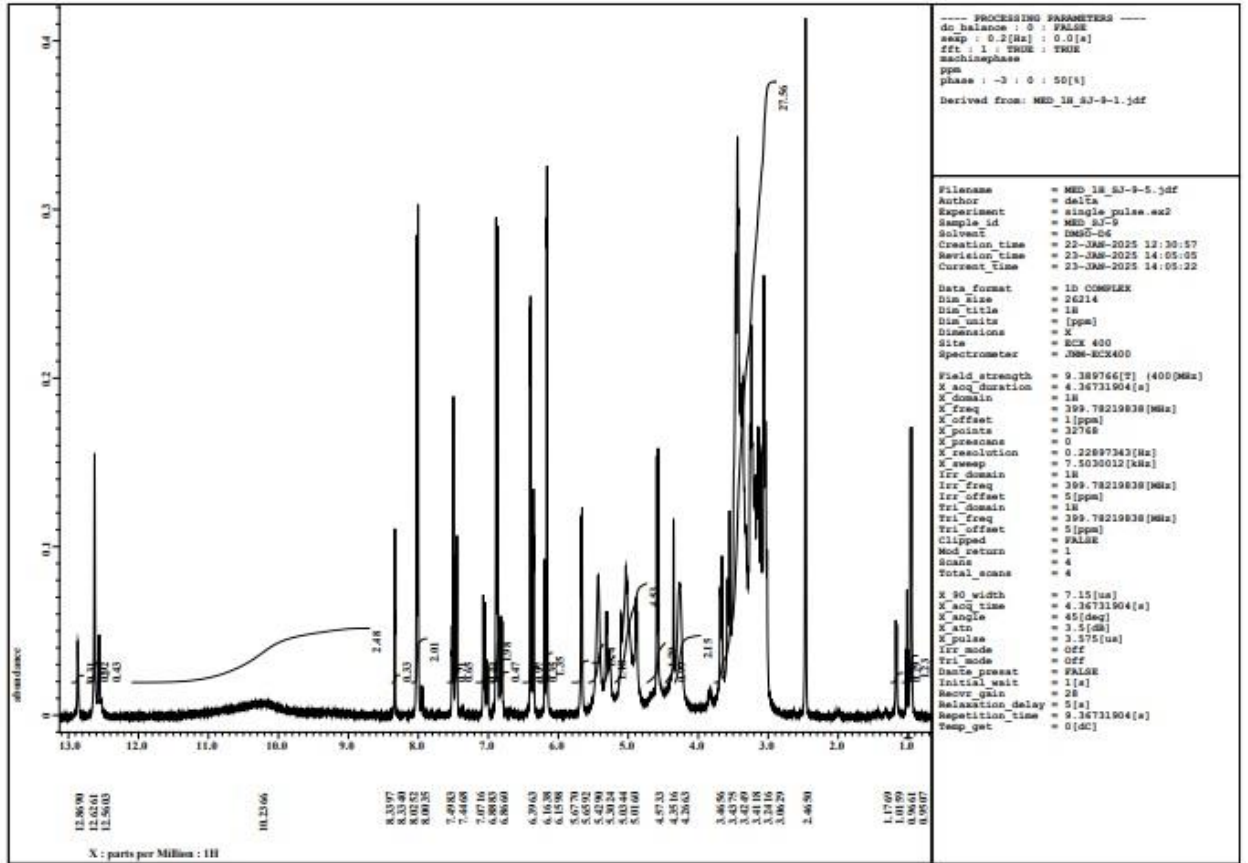
Приложение 2. Патент на изобретение «Методика количественного определения суммы флавоноидов в бутонах софоры японской»



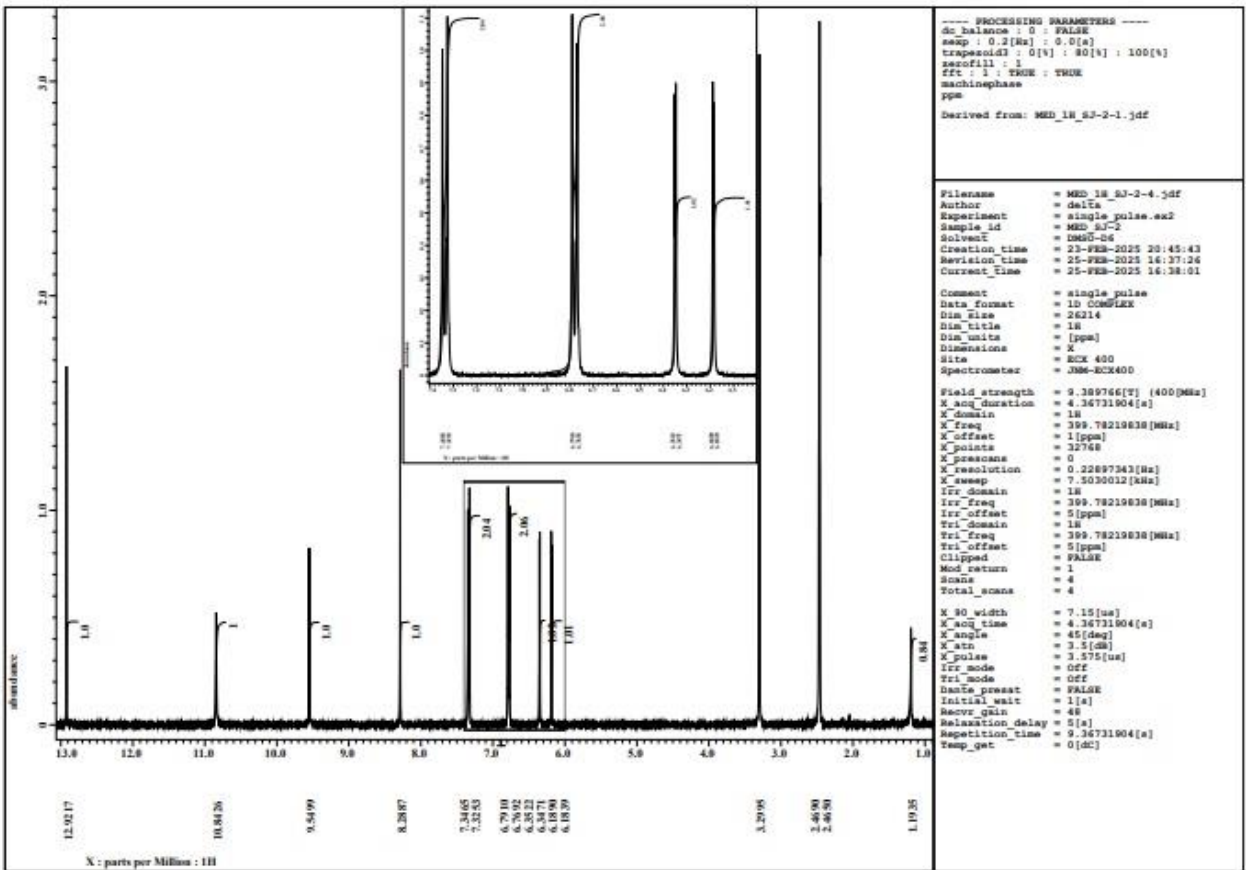
Приложение 3. ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектры веществ, выделенных из плодов софоры японской



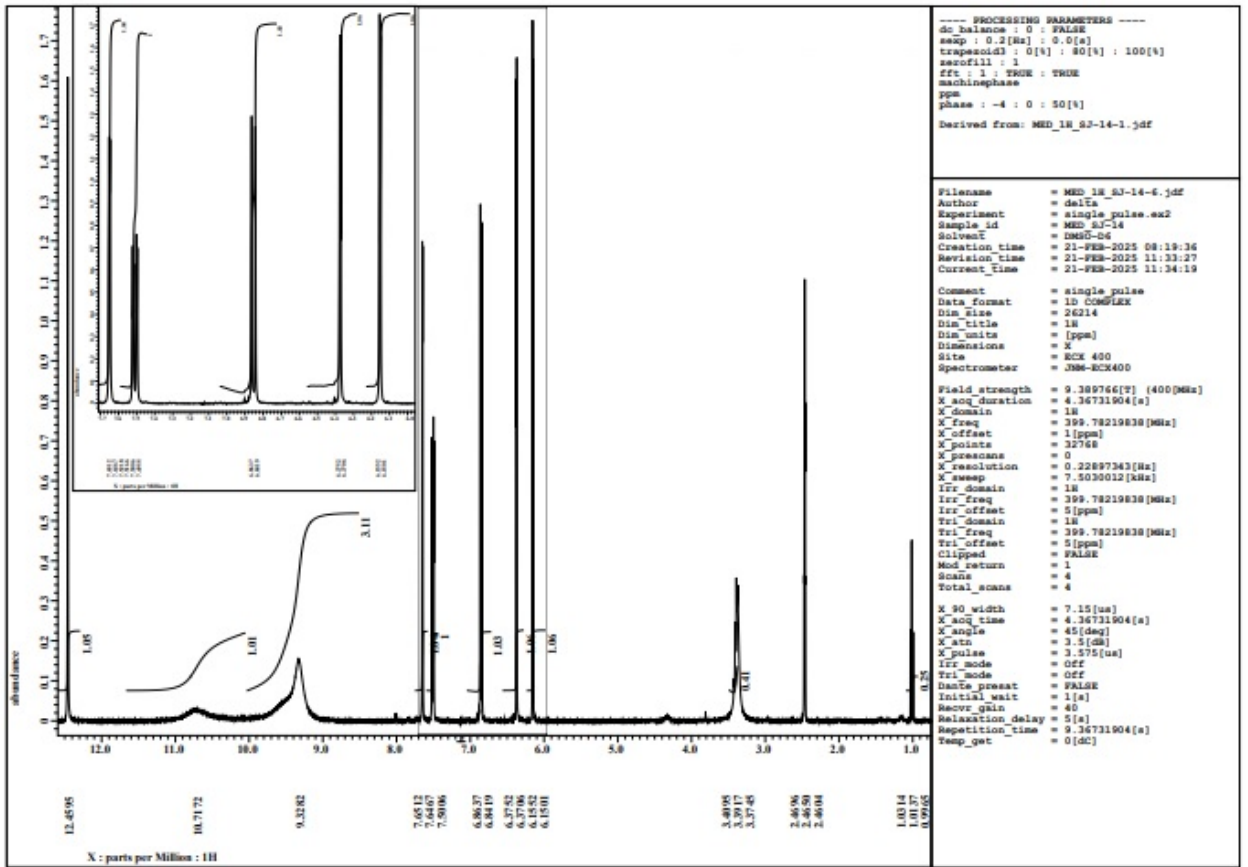
^1H -ЯМР-Спектр 4-рамнозида генистеина_SJ_8



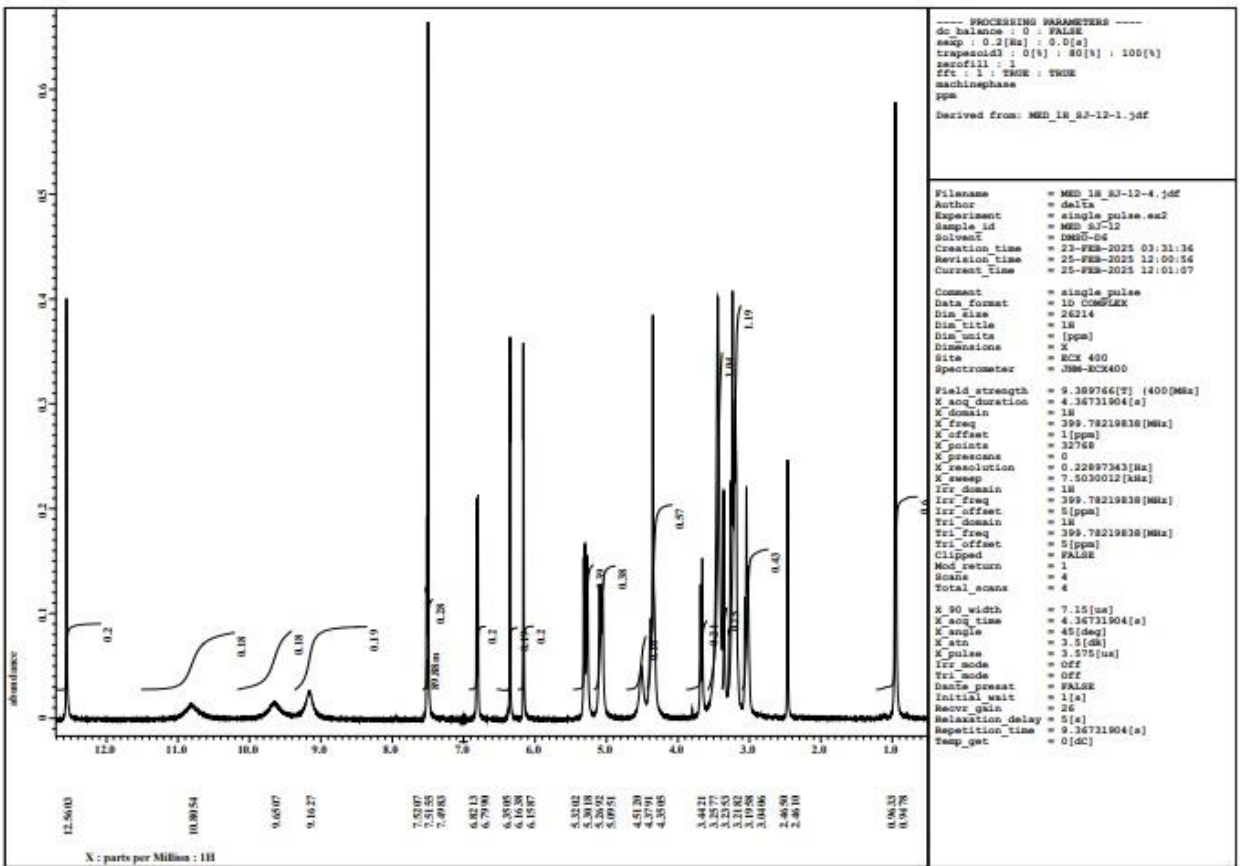
¹H_ЯМР_Спектр 4-рутинозида генистеина_SJ_9



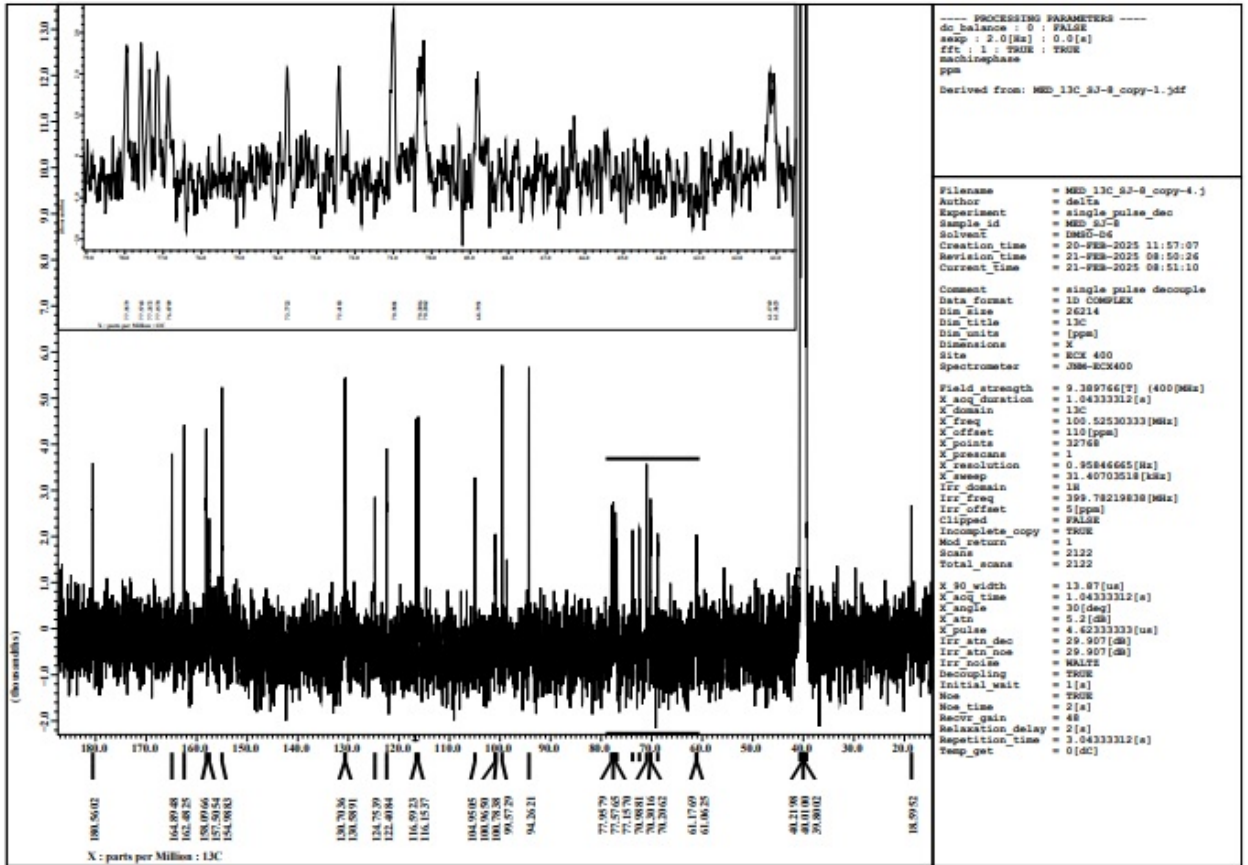
¹H_ЯМР_Спектр генистеина_SJ_2



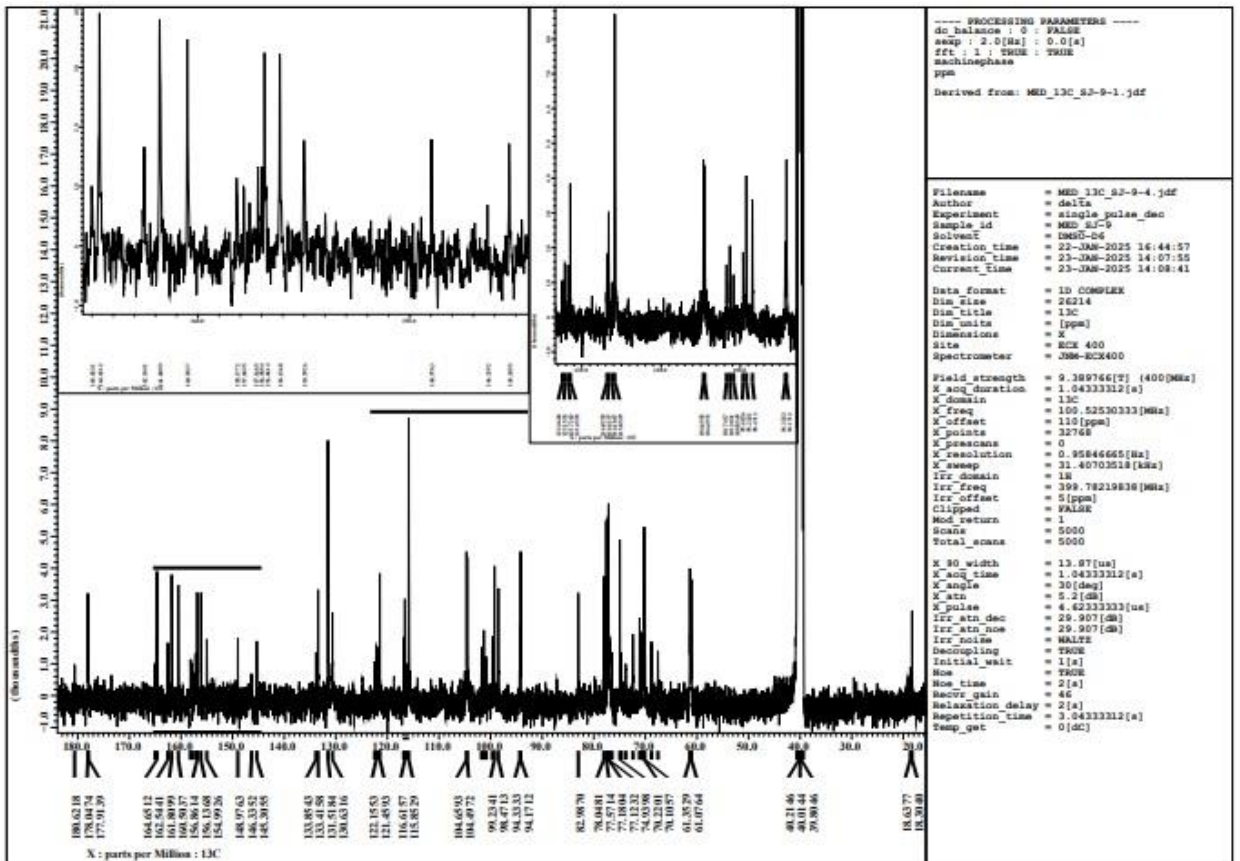
¹H-ЯМР-Спектр кверцетина_SJ_14



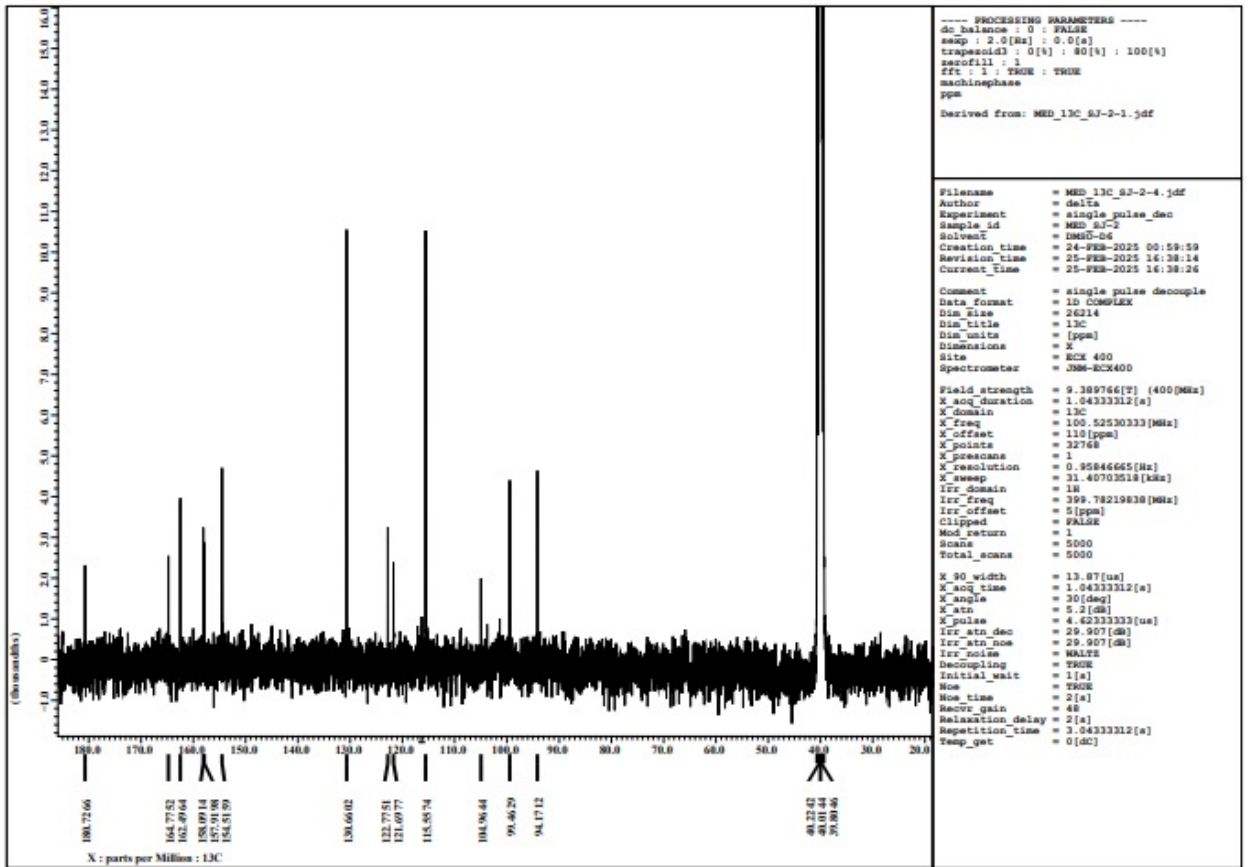
¹H-ЯМР-Спектр рутина_SJ_12



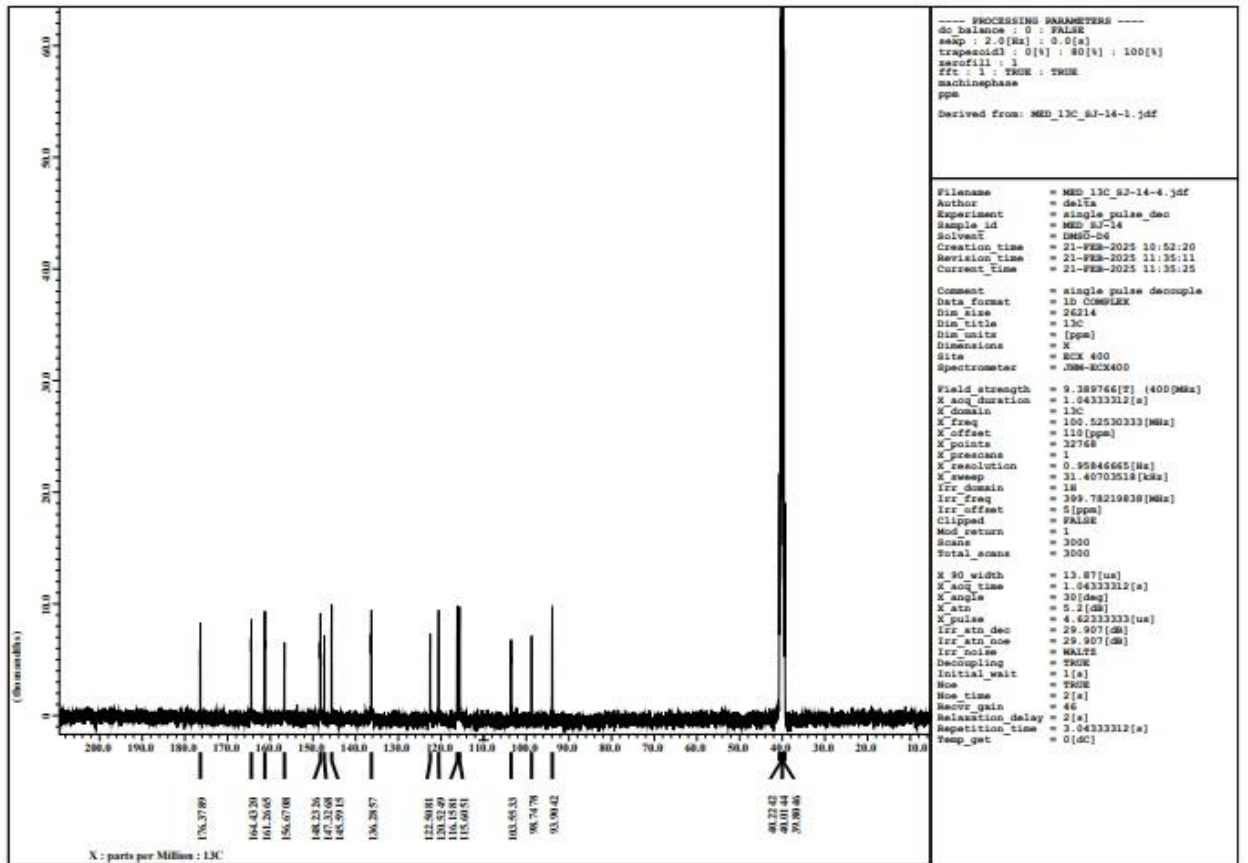
¹³C-ЯМР-Спектр 4'-O-рамнозида генистеина_SJ_8



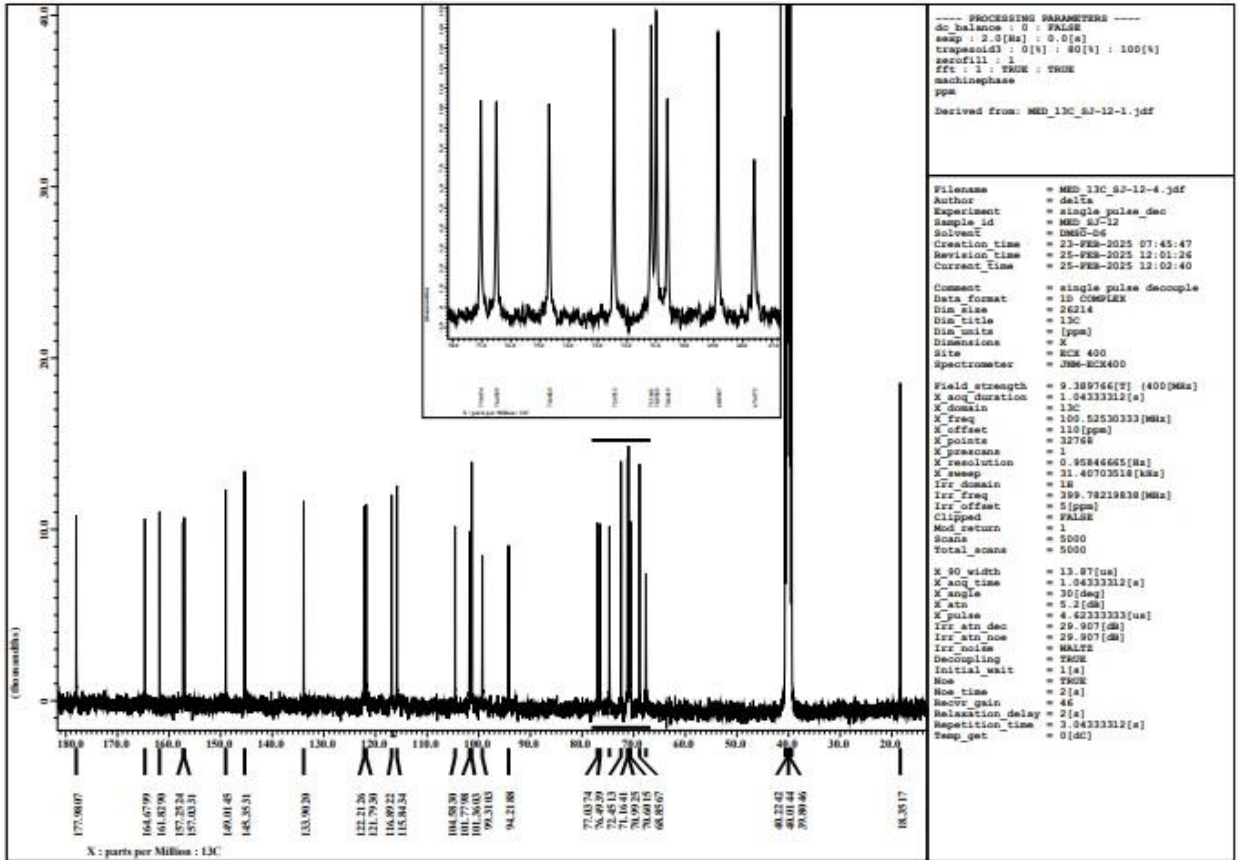
¹³C-ЯМР-Спектр 4'-O-рутинозида генистеина_SJ_9



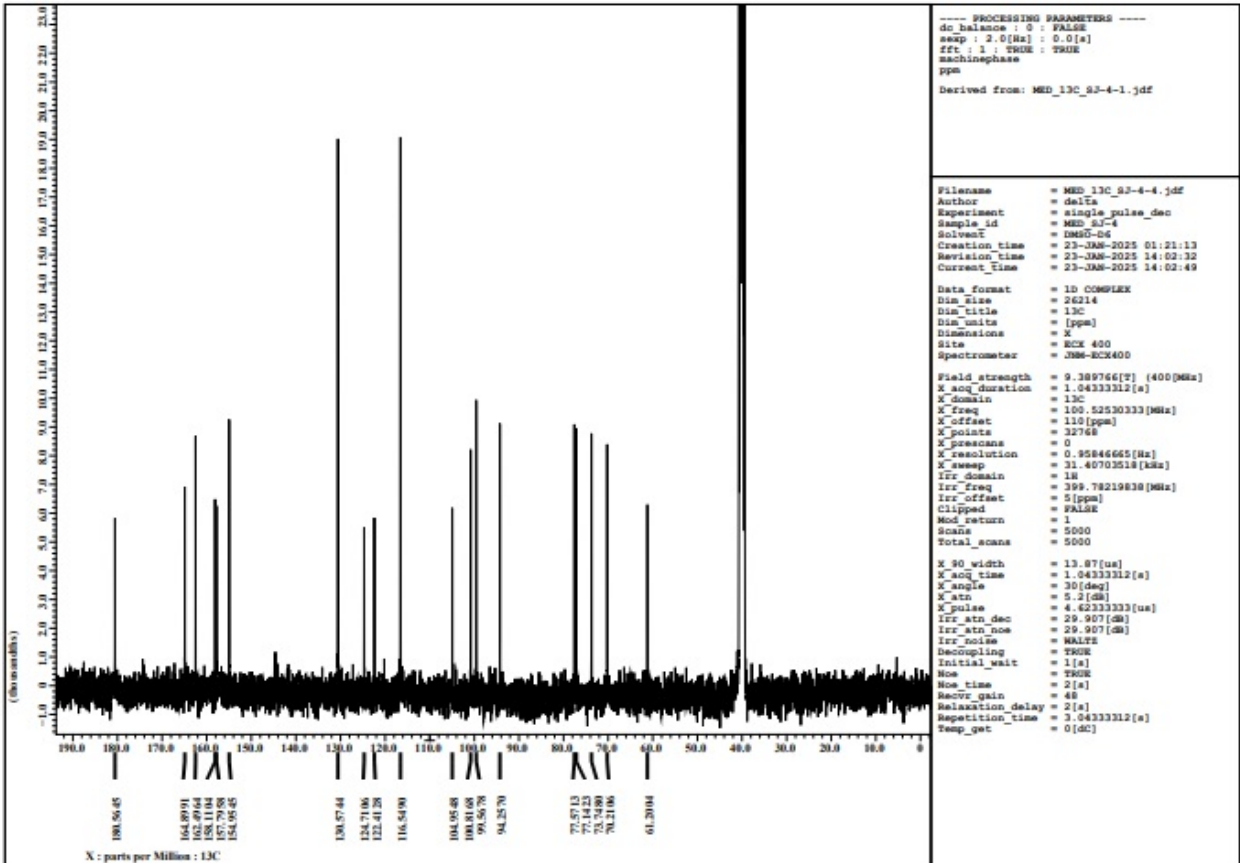
¹³C-ЯМР-Спектр генистеина_SJ_2



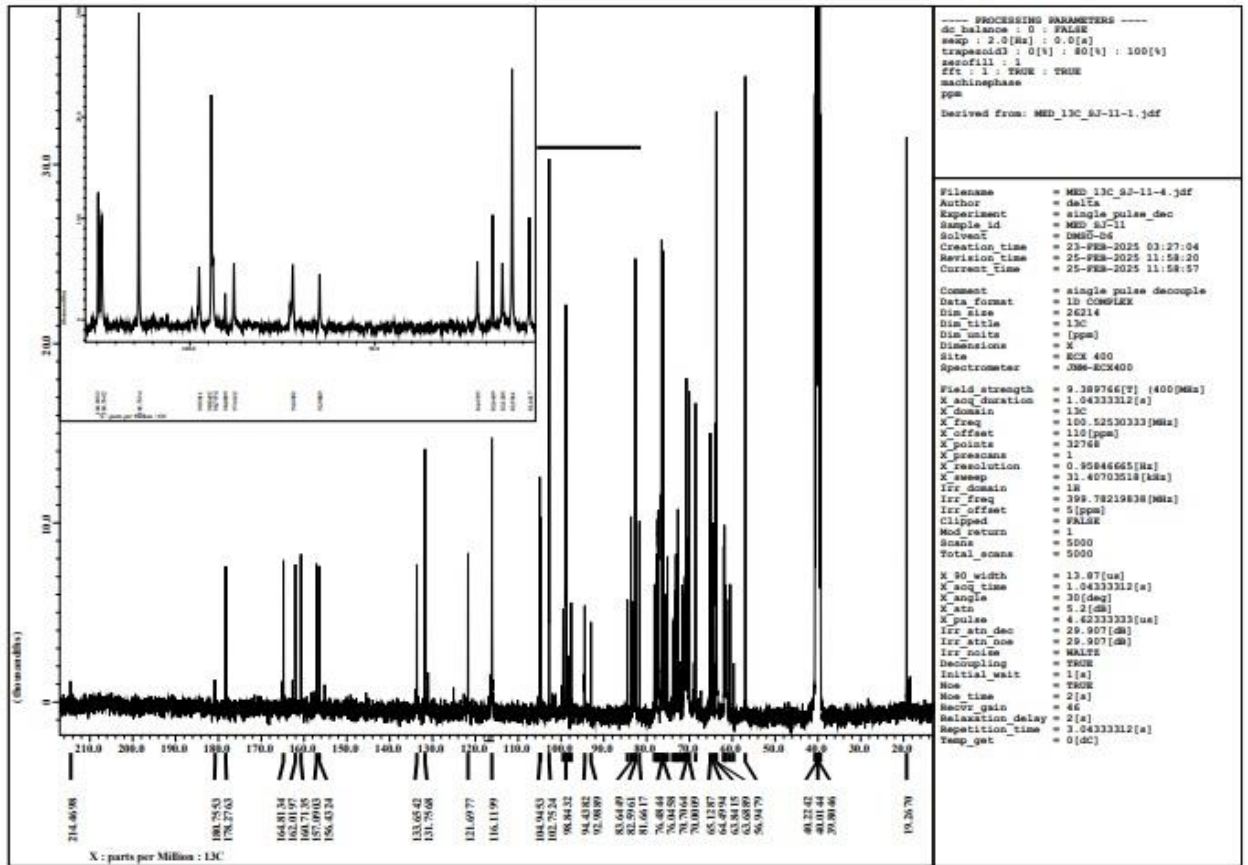
¹³C-ЯМР-Спектр кверцетина_SJ_14



¹³C-ЯМР-Спектр рутина_SJ_12



¹³C-ЯМР-Спектр софоригозида_SJ_4


 ^{13}C -ЯМР-Спектр 3-*O*-софорозида кемпферола_SJ_11

**Приложение 4. Проект фармакопейной статьи «Софоры японской
бутоны»**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»,
кандидат фармацевтических наук

В.В. КОСЕНКО

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Софоры японской бутоны

Взамен ВФС 42-341-74

Sophorae japonicae alabastra

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

Целые высушенные бутоны софоры японской – *Sophora japonica* Linn.
(син. *Styphnolobium japonicum* L.), сем. Бобовые – *Fabaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Собранные в июне-августе и высушенные бутоны софоры японской – *Sophora japonica* Linn. (син. *Styphnolobium japonicum* L.), сем. Бобовые – *Fabaceae*.

Содержит:

цельное сырье, измельченное сырье:

- не менее 10,0% рутина в пересчете на сухое сырье;
- не менее 16,0% суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом сырье;

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Внешние признаки. Сырье рассматривается невооруженным глазом с помощью лупы (10×) или под микроскопом (8×, 16×, 20×, 40×) в соответствии с ОФС «Методы анализа лекарственного растительного сырья, лекарственных средств растительного происхождения».

Цельное сырье. Цельные или частично измельченные бутоны эллипсоидной формы, с тонкой короткой цветоножкой, длина с цветоножкой 5-7 мм и диаметром 2-4 мм. Нижняя часть бутонов покрыта плотно прилегающей чашечкой темно-зеленого или коричневого цвета, высота чашечки около 3-4 мм, состоит из 5 сросшихся чашелистиков с продольными полосками у основания. Венчик бледно-желтый или коричневато-желтый, нераскрытый, нежный, выходит за пределы чашечки и содержит 10 свободных тычинок, окружающих опушённый гинецей (пестик) (рис. 1, 2)

Измельченное сырье. Кусочки бутонов, проходящие сквозь сито с отверстиями 2 мм.

Микроскопические признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения».

Цельное, измельченное сырье. В давленных препаратах цветков софоры японской были обнаруживаются следующие диагностические признаки: пыльцевые зерна округлые или треугольные с 3 порами и гладкой

эксиной; изолированные кроющие трихомы различной длины (60-660 мкм), слегка изогнутые, обычно состоящие из 1-2 базальных клеток и длинной заостренной дистальной клетки, с гладкими или слегка бородавчатыми стенками; особенности чашелистиков - имеют аномоцитные устья с 4-8 дочерними клетками, покрывающие чашелистики трихомы или их рубцы, паренхима чашелистиков содержит призмы оксалата кальция и аморфные массы рутина; особенности лепестков - покрыты мелкобороздчатой кутикулой, иногда сопровождаемые тонкими кольцевидными или спиральными сосудами, клетки паренхимы содержат буровато-желтые кристаллические массы рутина, буровато-желтые кристаллы рутина, свободные или включенные в клетки, в виде кристаллических масс или веерообразных агрегатов очень тонких иголок; свободные призмы оксалата кальция (рис. 3). Тычиночные нити имеют форму вытянутого конуса с остроконечной верхушкой в области связника (Рис. 4). Структура тычиночной нити сильно паренхимизирована. На просвете диагностируются два проводящих пучка. С поверхности тычиночные нити голые. В структуре заметны клетки паренхимы с кристаллическими включениями бурого цвета (рис. 4). Эпидермис тычиночных нитей мелкоклеточный. Клетки эпидермы изодиаметрические неправильной угловатой формы. Клеточные стенки целлюлозные с малозаметными простыми порами. Протопласты аморфные слабо пигментированные. Устьичных аппаратов на поверхности нет.

Гинецей апокарпный, состоящий из одного плодолистика узколанцетной формы с небольшим слабо развитым рыльцем. С поверхности гинецей густоопушен простыми кроющими, бичевидными волосками. Степень опушения варьирует: у основания опушение выражено сильнее, верхушка гинецея опушена слабо (рис. 5 Б). При детальном рассмотрении (x400) диагностируется бурая пигментация протопласта конечных клеток, кроющих трихом (рис. 5).



Рисунок 1 - Морфологические элементы цветков софоры японской: А - общий вид сырья, Б - гинецей, В - отгиб венчика, Г - совокупность тычиночных нитей, Д - андроцей и гинецей цветка на цветоножке.

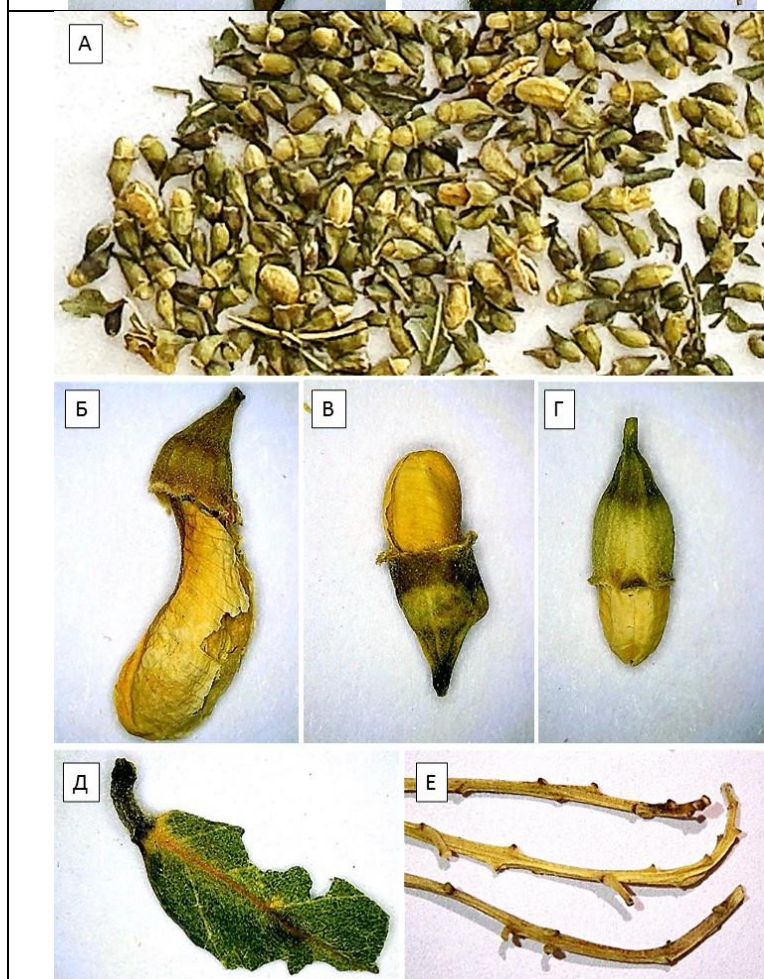


Рисунок 2 - Морфологические элементы бутонов софоры японской: А - общий вид сырья, Б, В, Г - бутоны разной степени развитости, Д - фрагмент листочка сложного листа, Е - стеблевые части соцветий.

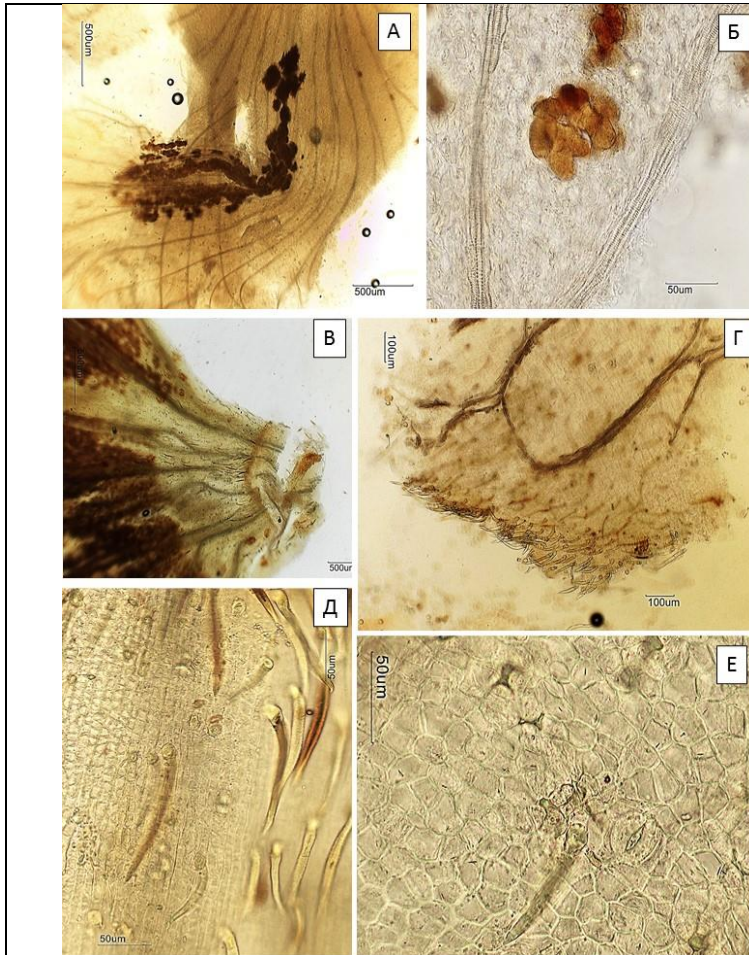


Рисунок 3 - Гистологические особенности лепестков венчика: А – фрагмент лепестка цветка с бурыми клетками, заполненными кристаллическим песком($\times 40$), Б – сосуды ксилемы и клетки с бурым протопластом лепестков ($\times 400$), В – фрагмент основания лепестка ($\times 40$), Г – отгиб венчика с кроющими трихомами ($\times 40$), Д – простые многоклеточные бичевидные волоски с бурым пигментом в протопласте в области основания венчика ($\times 400$), Е – устьичные аппараты аномоцитного типа эпидермы венчика($\times 400$).

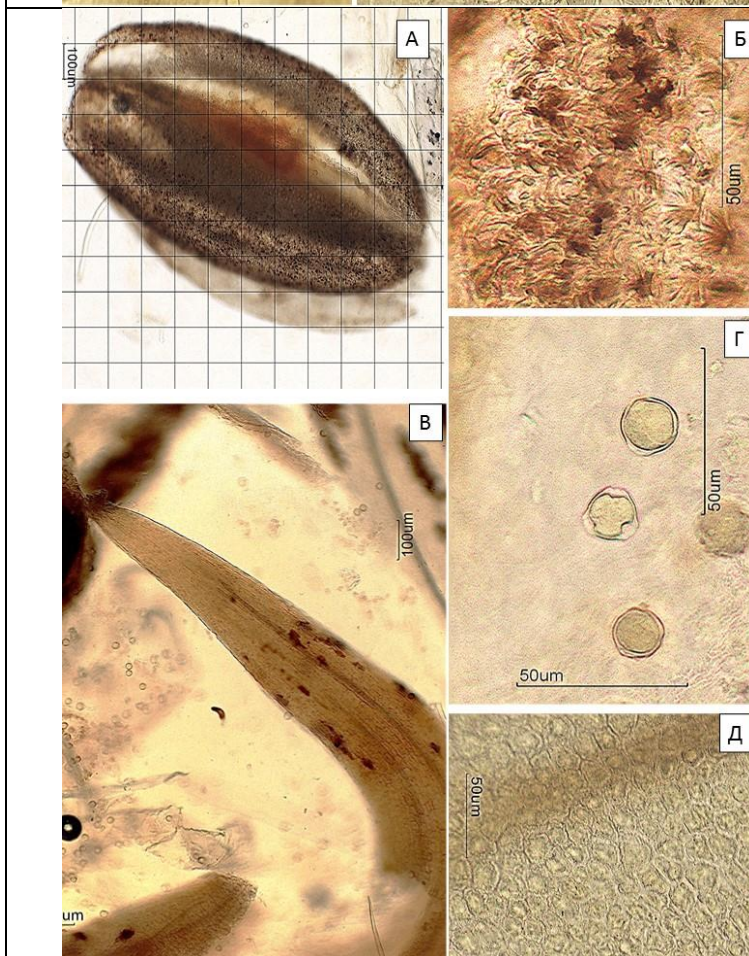


Рисунок 4 - Гистологические особенности андроеца цветка: А – тека пыльника ($\times 100$), Б – поверхность теки пыльника с морщинистой кутикулой ($\times 1000$), В – тычиночная нить ($\times 100$), Г – пыльцевые зёрна в различных проекциях ($\times 400$), Д – эпидермальная поверхность тычиночной нити ($\times 400$).

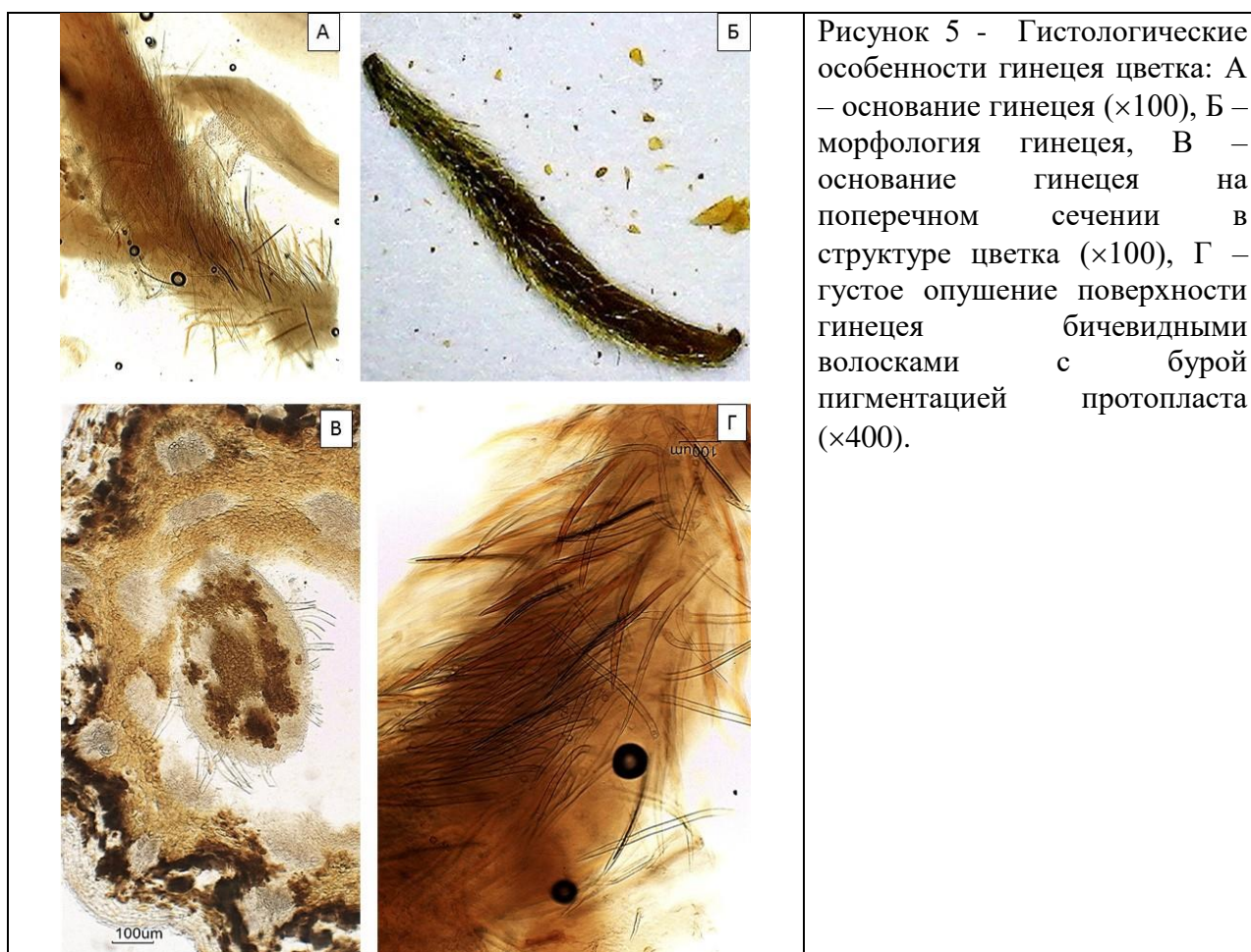


Рисунок 5 - Гистологические особенности гинецея цветка: А – основание гинецея ($\times 100$), Б – морфология гинецея, В – основание гинецея на поперечном сечении в структуре цветка ($\times 100$), Г – густое опушение поверхности гинецея бичевидными волосками с бурой пигментацией протопласта ($\times 400$).

Анатомия рахиса. На поперечном сечении рахиса в медиальной части видна его овальная форма с широко-треугольным усечением с адаксиальной стороны (рис. 6 Б). Проводящая система черешка представлена двумя округлыми сосудисто-волокнистыми пучками коллатерального типа, расположенными по рёбрам с адаксиальной части среза. По периферии пучки армированы непрерывным кольцом плотно сомкнутых склеренхимных волокон с лигнифицированными клеточными стенками (рис. 6 В, Д).

В основном объеме рахиса диагностируется непучковое строение, представляющее замкнутое кольцо ксилемных и флоэмных клеток, повторяющих очертание поперечного сечения. Аналогично пучкам в рёбрах рахиса центральная часть армирована непрерывным кольцом склеренхимных волокон (рис. 6 Г).

В центре среза локализована основная паренхима мезофилла, составленная округлыми клетками. Клетки средней части пустотелые

протопласт не диагностируется. Клеточные стенки их часто лигнифицированы (рис. 6 Е-Ж).

Рахис с поверхности покрыт эпидермисом с выраженной кутикулой, окрашивающейся раствором Судана III в розовый цвет (рис. 6 Г).

Под эпидермой локализован слой хлорофиллоносной ткани до семи клеток в толщину. Клетки хлорофиллоносной ткани мелкопросветные. С заметно утолщенной целлюлозной клеточной стенкой (рис. 6 В, Г).

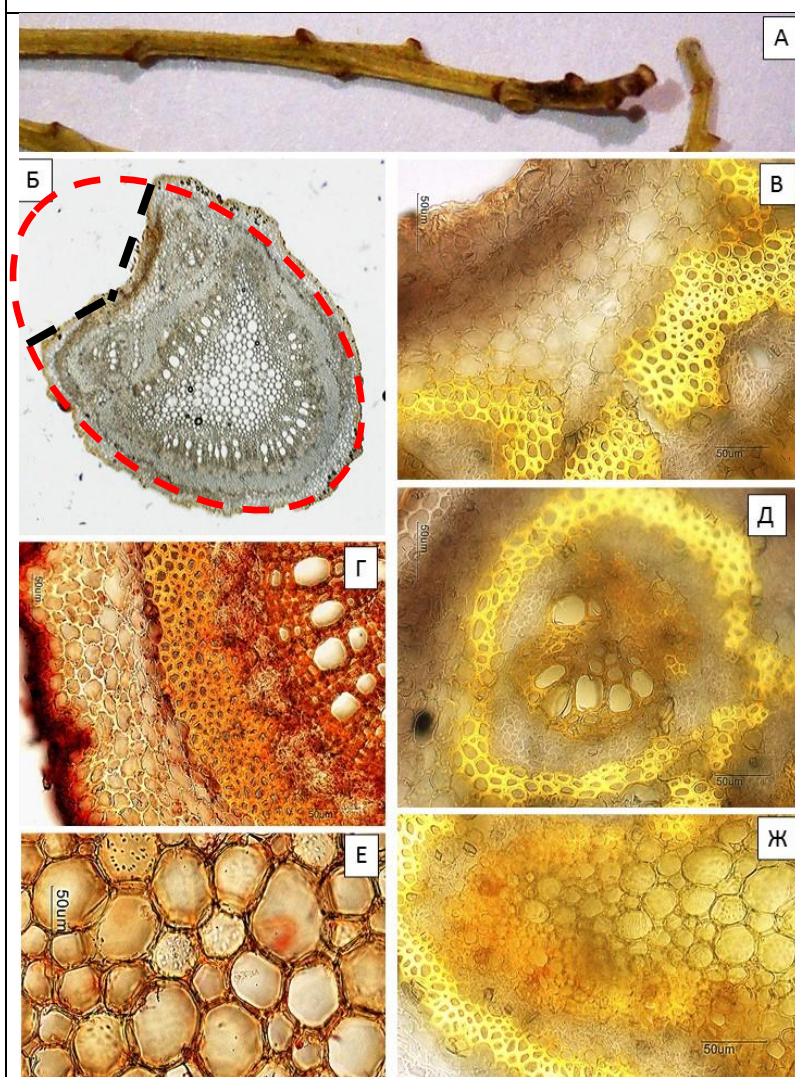


Рисунок 6 - Гистологические особенности осевой части соцветия: А – осевая часть соцветия как элемент сырья, Б – общий вид поперечного сечения осевой части соцветия ($\times 100$), В – склеренхима осевой части соцветия. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$), Г – окраска кутикулы и элементов флоэмной и ксилемной тканей раствором Судана III ($\times 400$), Д – сосудисто-волокнистый пучок. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$), Е – основная паренхима сердцевины. Окраска раствором Судана III ($\times 400$), Ж – непучковые элементы проводящих тканей. Окраска раствором сернокислого анилина ($\times 400$).

Анатомия цветоножки. Поперечное сечение цветоножки имеет округлое очертание с выраженной однородной волнистой ребристостью (рис. 7). Анатомия поперечных сечений цветоножки на разных уровнях среза отличается по степени развитости тканей: в области прикрепления завязи к

цветоложу отмечается большая полость в центре с местом прикрепления гинецея (рис. 8 АВ); в области завязи, полость расширяется, место прикрепления не диагностируется, а анатомическая структура принципиально схожа.

С поверхности цветоножка покрыта эпидермой, сложенной из тонкостенных паренхимных клеток со слабо выраженной кутикулой. На поверхности эпидермы изредка встречаются простые бичевидные волоски, описанные ранее для других частей растения (рис. 8 Б).

Под эпидермой локализован слой уголково-пластинчатой колленхимы, залегающий непрерывным кольцом и достигающий трёх слоёв клеток.

Проводящая система представлена открытыми коллатеральными проводящими пучками, расположенными в два круга симметрично по отношению к рёбрам (рис. 8 А). Пучки внешнего круга мельче по размеру. По периферии пучки армированы группой склеренхимных волокон, имеющих не лигнифицированные клеточные стенки.

Внутренняя полость покрыта эпидермой околоцветника, состоящей из мелких клеток с сильно кутинизированной волнистой поверхностью (рис. 9 Г, Д). На поверхности внутренней эпидермы могут встречаться простые бичевидные волоски, особенно в месте прикрепления гинецея (рис. 10 А, Д).

Структура цветоножки сильно паренхимизирована. Клетки основной паренхимы, подстилающие уголково-пластинчатую колленхиму крупные, тонкостенные с кристаллическим порошком тёмно-бурого иногда до черного цвета (рис. 8 А, Г, 9 А). Они локализованы кольцом, включающим внешнюю группу проводящих пучков.

Внутреннее кольцо проводящих пучков окружено мелкоклеточной паренхимой. Клетки паренхимы округлой формы с плотным аморфным протопластом желтого или светло-желтого цвета (рис. 8 Д, 9 В, Е).

При обработке 0,1% раствором NaOH кристаллический порошок в клетках паренхимы полностью растворяется с характерной желтой окраской. Что говорит о фенольной природе выявленных кристаллических включений

(рис. 10).

После щелочной обработки среза проявляются буропигментированные области колленхимной и эпидермальной ткани (рис. 10 Б).

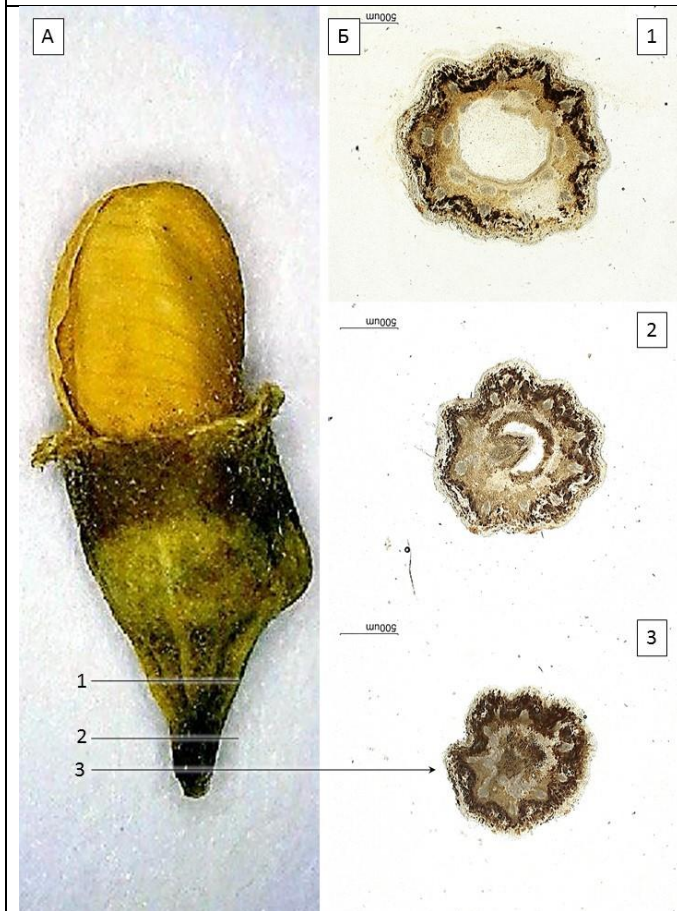


Рисунок 7 - Гистологические особенности цветоноса: А – общий вид бутона, Б – анатомические срезы цветоножки и части околоцветника ($\times 40$).

Обозначения: 1 – поперечное сечение в области завязи гинецея, 2 – поперечное сечение в области прикрепления гинецея, 3 – поперечное сечение в области цветоножки.

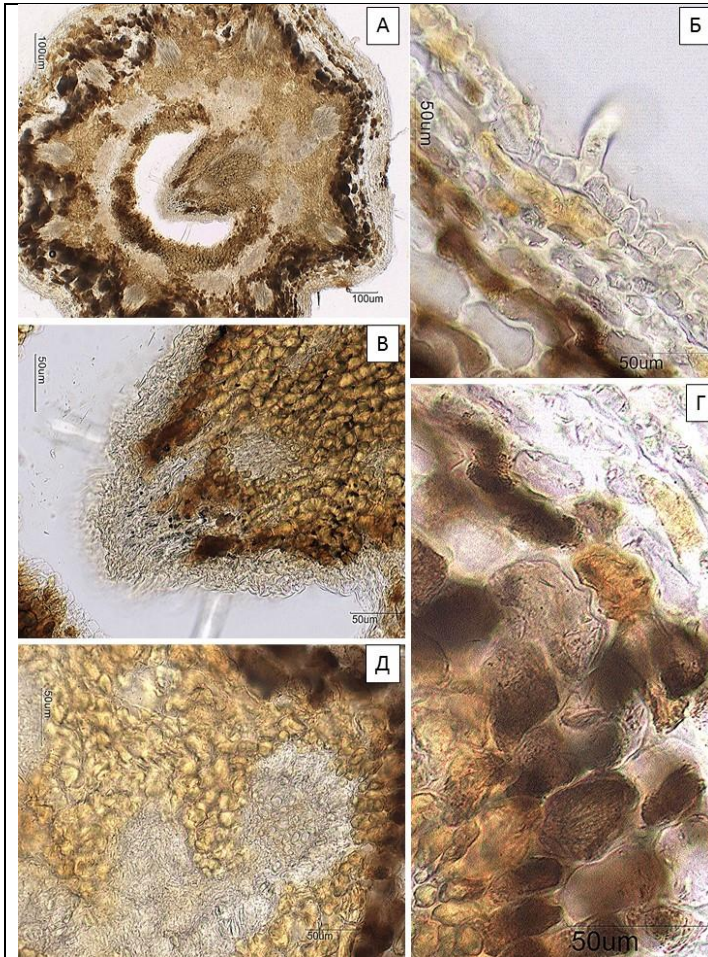


Рисунок 8 - Гистологические особенности околоцветника на поперечном сечении в области прикрепления завязи к цветоложу: А – общий вид поперечного сечения с местом прикрепления гинецея ($\times 100$), Б – уголково-пластинчатая колленхима под эпидермальную поверхность ($\times 400$), В – ткани места прикрепления гинецея ($\times 400$), Г – клетки паренхимы с бурым кристаллическим песком ($\times 400$), Д – проводящие пучки в области чашечки околоцветника ($\times 400$).

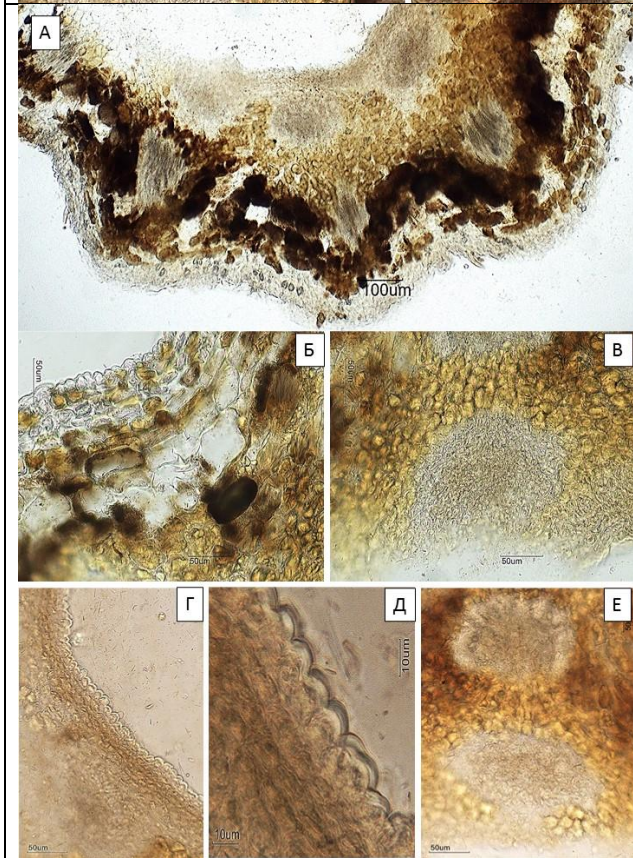
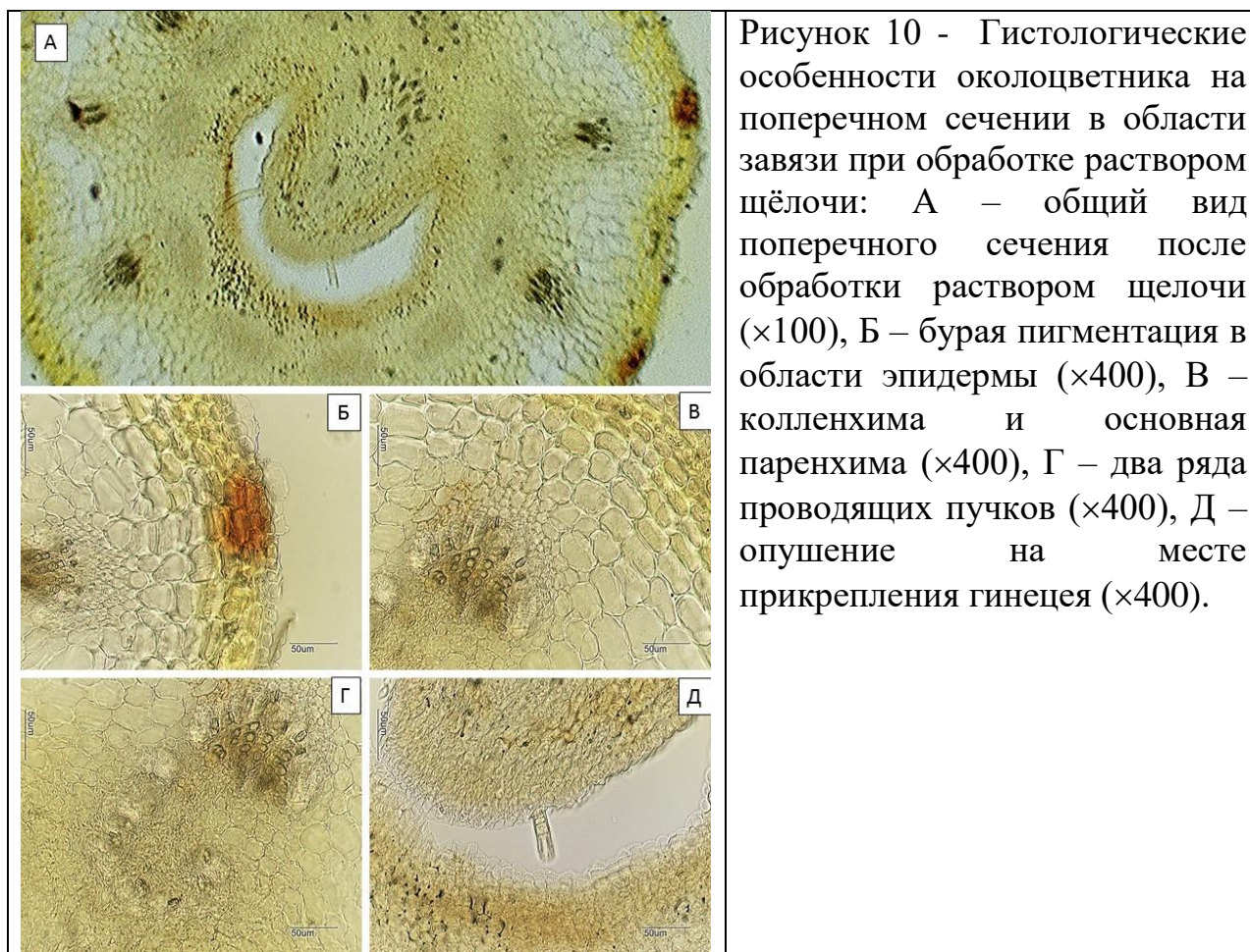


Рисунок 9 - Гистологические особенности околоцветника на поперечном сечении в области завязи: А – фрагмент поперечного сечения чашечки и венчика в области завязи ($\times 100$), Б – эпидермис и колленхима ($\times 400$), В – проводящий пучок центральной оси стебля ($\times 400$), Г – внутренний эпидермис околоцветника со стороны завязи ($\times 400$), Д – эпидермальные клетки внутренней эпидермы с кутикулой ($\times 1000$), Е – двойной ряд проводящих пучков за счет жилок чашелистиков ($\times 400$).



Определение основных групп биологически активных веществ

1. *Качественные реакции.* К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 0,1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 0,005 г цинковой пыли, через 1-2 минуты появляется вишнево-красное окрашивание (флавоноиды).

2. *УФ-спектроскопия.* Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение», имеет максимум поглощения в длинноволновой области УФ-спектра в условиях прямой (в присутствии 3% спиртового раствора $AlCl_3(III)$) и дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 414 ± 2 нм (рис. 11 и 12).

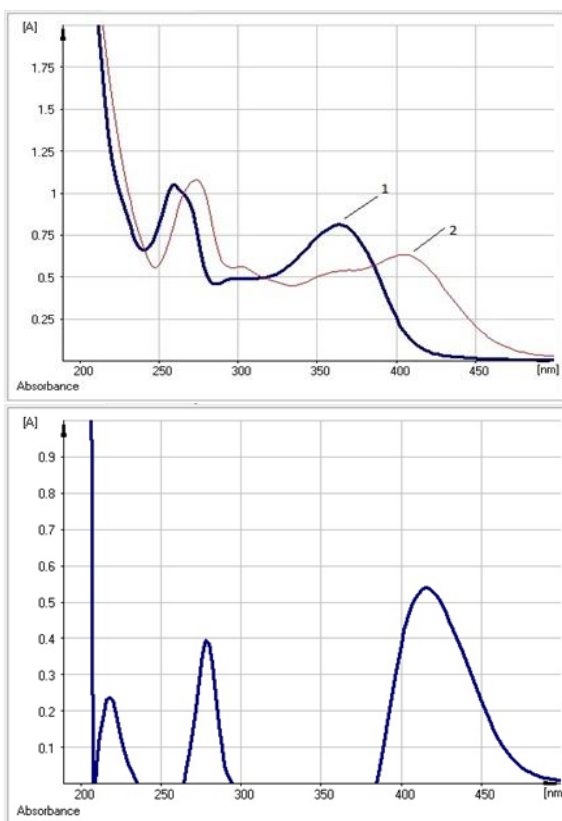


Рисунок 11 - Электронные спектры раствора водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской (1) и водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской в присутствии алюминия хлорида (2)

Рисунок 12 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения бутонов софоры японской (дифференциальный вариант).

3. *Тонкослойная хроматография.* Определение проводят методом ТСХ (ОФС «тонкослойная хроматография»)

Пластинка. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ) *n*-бутанол - уксусная кислота – вода (4:1:2)

Детектирование. Алюминия хлорид (III) раствор спиртовой 3%. Лампы с УФ-светом с длиной волны $\lambda=254$ нм и $\lambda=365$ нм.

Вещества-свидетели. Стандартные образцы (СО) рутина и кверцетина.

Испытуемый раствор. Настойка испытуемого сырья на 70% этиловом спирте.

На линию старта хроматографической пластины, предварительно активированной при 100-105°C наносят в виде полос шириной 1 см по 0,03 мл испытуемого раствора, а также растворов СО рутина и кверцетина. Хроматографируют восходящим способом. Полученную ТСХ-

хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254нм, а затем проявляют 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III) и просмотреть в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Результат. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается флуоресцирующие зоны, соответствующие СО рутина (доминирующее вещество) и кверцетина. При этом обнаруживаются также и другие вещества в минорных количествах.

Основные параметры определения и аналитические эффекты метода ТСХ при использовании физических и химических методов детекции испытуемого раствора представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Способы детектирования испытуемого раствора при ТСХ

Способ детекции	Описание и аналитический эффект
Видимый свет	Зона адсорбции рутина – желтого цвета, после реакции с $AlCl_3$ (III) – ярко-желтая Зона адсорбции кверцетина – желтого цвета, после реакции с $AlCl_3$ (III) – ярко-желтая (рис.13).
Детекция при $\lambda=254$ нм	Зона адсорбции рутина – зелено-желтое свечение, после реакции с $AlCl_3$ (III) – усиливается Зона адсорбции кверцетина – голубое свечение, после реакции с $AlCl_3$ (III) – усиливаются (рис.14).
Детекция при $\lambda=365$ нм	Зона адсорбции рутина – фиолетовое свечение, после реакции с $AlCl_3$ (III) –

	<p>усиливается</p> <p>Зона адсорбции кверцетина – бурое свечение, после реакции с $AlCl_3$ (III) – усиливаются (рис.15).</p>
--	---

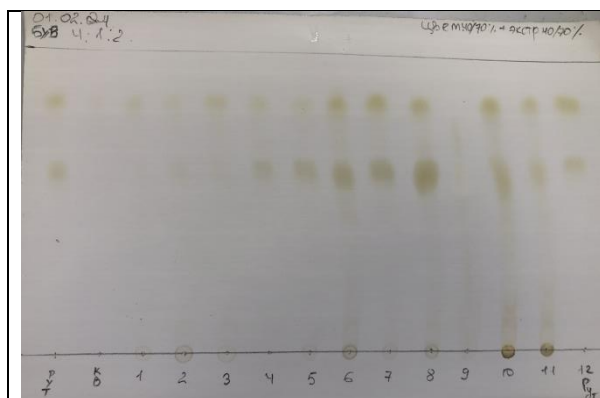


Рисунок 13. ТСХ настойки бутонов софоры японской **в видимом свете** (после обработки 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III))

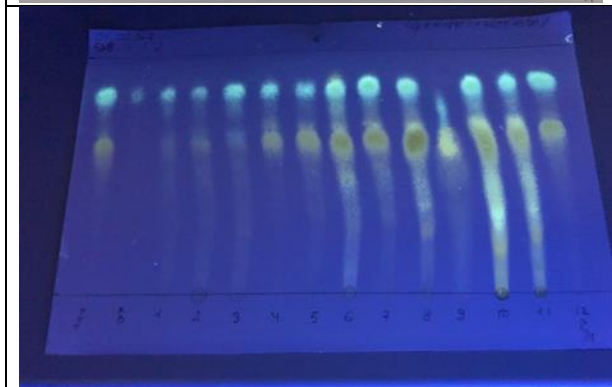


Рисунок 14. ТСХ настойки бутонов софоры японской **при $\lambda=254$ нм** (после обработки 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III))

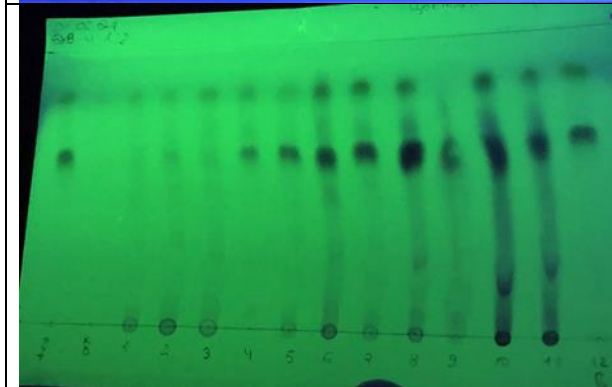


Рисунок 15. ТСХ настойки бутонов софоры японской **при $\lambda=365$ нм** (после обработки 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III))

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Не более 12,0% (ОФС «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения»).

Зола общая. Не более 5,0% (ОФС «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 2,0% (ОФС «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Измельченность сырья. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстием размером 0,5 мм, не более 5%.

Допустимые примеси. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). Не более 3%.

Другие части растения (стеблевые части соцветия, распустившиеся цветки, листья, рахис). Не более 2%.

Органическая примесь. Не более 0,5%.

Минеральная примесь. Не более 0,5%.

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

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

Зараженность вредителями запасов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов».

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

1. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (синяя полоса).

Испытуемый раствор: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (раствор А), тщательно перемешивают. Далее 2 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов флавоноидов с

алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 414 нм на фоне раствора сравнения.

Раствор сравнения: 2 мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Приготовление раствора стандартного образца рутина:

около 0,0050 г (точная навеска) ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 70 % этилового спирта при нагревании. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А ФСО рутина). Далее 2 мл полученного раствор А ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б ФСО рутина), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов рутина с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б ФСО рутина на спектрофотометре при длине волны 414 нм на фоне раствора сравнения ФСО рутина.

Раствор сравнения рутина: 2 мл раствор А ФСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора Б извлечения сырья;

D₀ – оптическая плотность раствора ФСО рутина;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса ФСО рутина, г.

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия ФСО рутина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 414 нм – **226**:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 226 \cdot (100 - W)},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

226 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) ФСО рутина при 414 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление раствора алюминия хлорида спиртового 3%. 3 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96% и доводят объем раствора тем же спиртом до метки. Срок годности раствора 3 мес.

2. Определение одержание рутина методом ВЭЖХ.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Хроматография».

Аналитическую пробу сырья измельчить до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) поместить в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрыть пробкой и взвесить на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединить к обратному холодильнику и нагревать на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 минут. Затем колбу охладить в течение 30 минут, закрыть той же пробкой, снова взвесить и восполнить недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение профильтровать через бумажный фильтр («Синяя лента»). Перед хроматографическим анализом 1 мл полученного фильтрата поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, довести объем раствора до метки спиртом этиловым 96 %, перемешать и профильтровать через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводить 4 мкл полученного испытуемого раствора.

Хроматографировать в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем подвижной фазы - 1500 мкл; объем пробы испытуемого раствора 4 мкл.

УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводить не менее 3 параллельных определений.

В этой же системе исследовать 4 мкл раствора СО рутина. Определить время удерживания и идентифицировать пик рутина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычислить площадь пика рутина на хроматограмме и рассчитать среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание рутина в бутонах софоры японской в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляется по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 4 \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 4} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

Где S – среднее значение площади пика рутина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО рутина, вычисленное из хроматограмм раствора СО рутина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО рутина г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление раствора СО рутина. Точную навеску (0,005 г) предварительно высушенного рутина (содержание основного вещества $\geq 95\%$) перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в 15 мл 70% этилового спирта при нагревании и после охлаждения довести объем раствора до метки тем же растворителем.

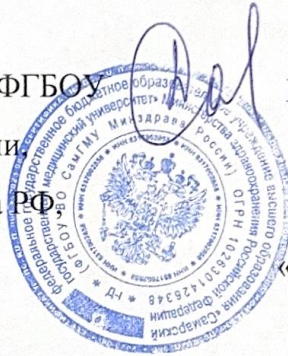
УПАКОВКА, МАРКИРОВКА И ПЕРЕВОЗКА

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

ХРАНЕНИЕ

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

Проректор по научной работе ФГБОУ
ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук



И.Л. Давыдкин

«15» 01 2026

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России, доктор фармацевтических
наук, профессор

В.А. Куркин

«15» 01 2026

Соискатель ученой степени кандидата
фармацевтических наук, старший
преподаватель кафедры
фундаментальной и клинической
биохимии с лабораторной
диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

М.К. Чередник

«15» 01 2026

Приложение 5. Проект дополнений к фармакопейной статье «Софоры японской плоды»

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского
применения», кандидат
фармацевтических наук

В.В. КОСЕНКО

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Софоры японской плоды

Дополнение к ФС.2.5.0130

Sophorae japonicae fructus

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Дополнение к разделу «Внешние признаки»:

Цельное сырьё. Плоды - бобы 1-10 см длиной 0,5-1,0 см шириной, нераскрывающиеся, приплюснуто-цилиндрические, чётковидные, одно и многосемянные, часто изогнутые. Также присутствуют обломки бобов,

обломки околоплодников и семена (рис. 1). Семена овальной формы с боковой проекции семени и сжато-эллипсоидной формы со стороны корешкового рубчика, длиной 0,5-1,0 см, шириной 0,4-0,7 см. Поверхность плодов блестящая, бугристая. Цвет плодов от светлого до темного зеленовато-коричневого. Хорошо заметен светло-желтый брюшной шов боба (рис. 1). Внутренняя сторона околоплодника светлее наружной, блестящая, бугристая (рис. 1). Семя – тёмно-коричневое или почти чёрное, гладкое, блестящее (рис. 1, 2). Поверхность семени кожистая не одревеневшая. С одной из узких сторон семени хорошо виден вогнутый рубчик белого цвета и выпуклая корешковая лопасть (рис. 2). В поперечном разрезе семени видны две семядоли желтого цвета (рис. 1).

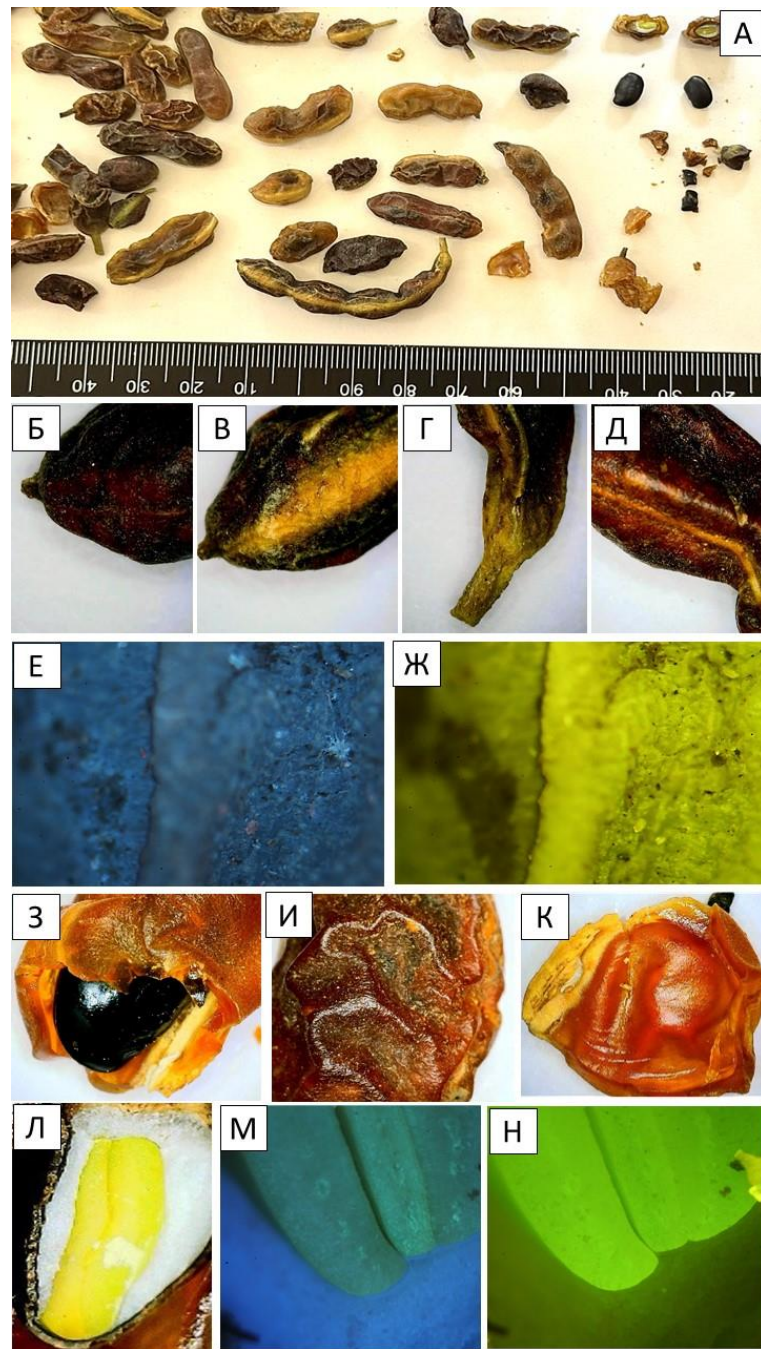


Рисунок 1 – **Морфология бобов софоры японской**: А – общий вид сырья, Б – верхушка боба со стороны спинного шва, В - верхушка боба со стороны брюшного шва, Г – ножка боба со стороны брюшного шва, Д – спинной шов в медиальной части боба, Е – люминесценция поверхности брюшного шва в диапазоне возбуждения 330-400 нм, Ж - люминесценция поверхности брюшного шва в диапазоне возбуждения 420-530 нм, З – излом боба в области семени, И – поверхность створки боба со стороны экзокарпия, К - поверхность створки боба со стороны эндокарпия, Л – разрез семени через зародыш, М - люминесценция тканей семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм, Н - люминесценция тканей семени в диапазоне возбуждения 420-530 нм.

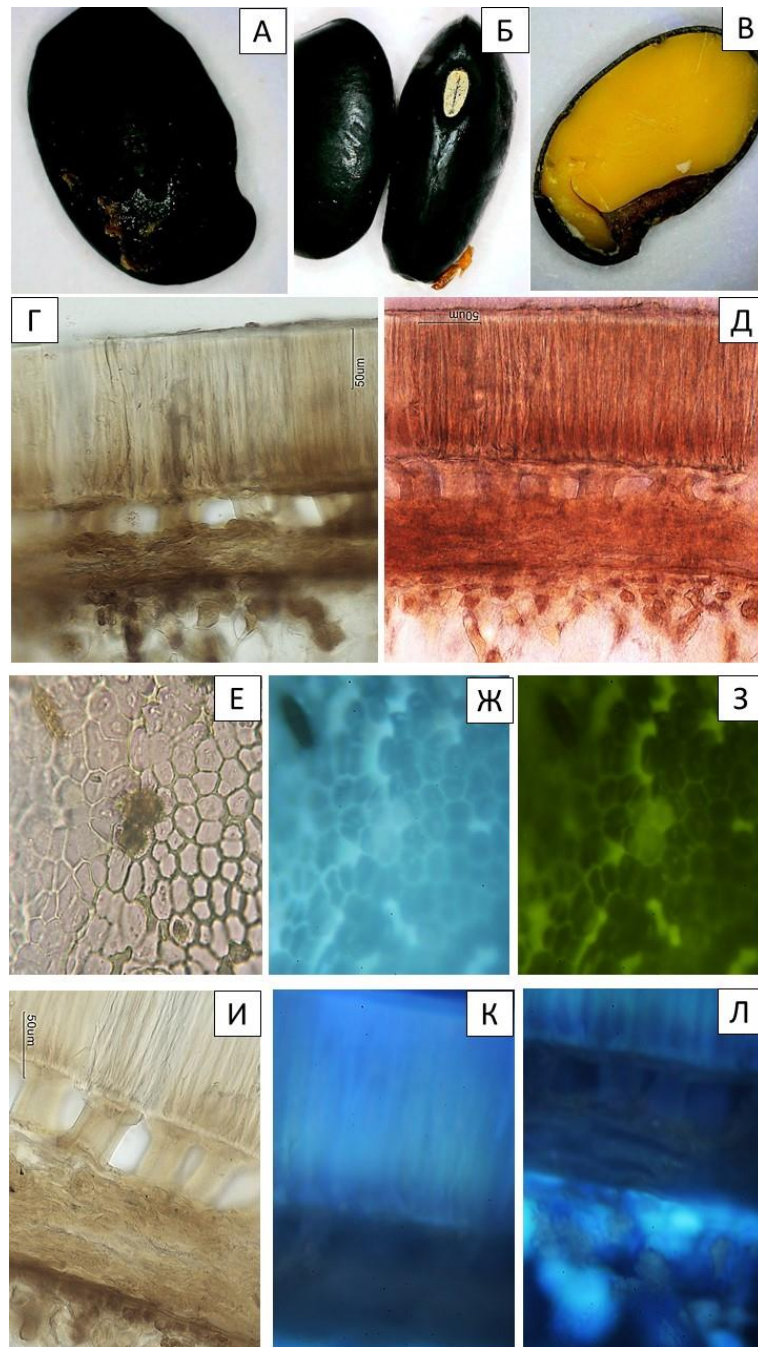


Рисунок 2 – **Морфолого-анатомические особенности семенной кожуры:** А – овальная форма с боковой проекции семени, Б – сжато-эллипсовидная форма с стороны корешкового рубчика, В – желтые семядоли в продольном разрезе семени, Г – структура семенной кожуры на поперечном сечении, Д – окраска семенной кожуры раствором судана III, Е – Клетки эпидермы семени с поверхностными кристаллическими включениями, Ж – Люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), З - Люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$), И - механический слой склереид (гиподерма), паренхима, сдавленный слой, К – люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне

возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), Л – свечение протопластов клеток эндосперма в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$).

Дополнение к разделу «Микроскопические признаки»:

1. Диагностические особенности экзокарпия

При рассмотрении среза с поверхности боба обнаруживается покрывающий адаптационный слой воска, который заполняет межклеточные пространства, при окраске раствором Судан III образуя очень характерный рисунок (рис. 3).

На наружной стороне створок боба мы обнаружили устьица энциклоцитного типа: замыкательные клетки ладьевидной формы крупного размера с сильно утолщенной стенкой, обращенной к устьичной щели; замыкательные клетки окружает более шести около-устьичных клеток (рис. 3). В устьицах есть хлоропласты, а также обнаруживаются крахмальные включения при окраске раствором Люголя (рис. 3).

Аморфные скопления кристаллоидов экзокарпия обнаруживаются в большом количестве, особенно в области ближе к брюшному шву боба (рис. 1, 3). Скопления кристаллоидов легко растворяются в спиртовом растворе хлорида алюминия 3%, дают при этом желтое окрашивание, характерное для фенольных соединений (рис. 3 Ж, К, Л, М).

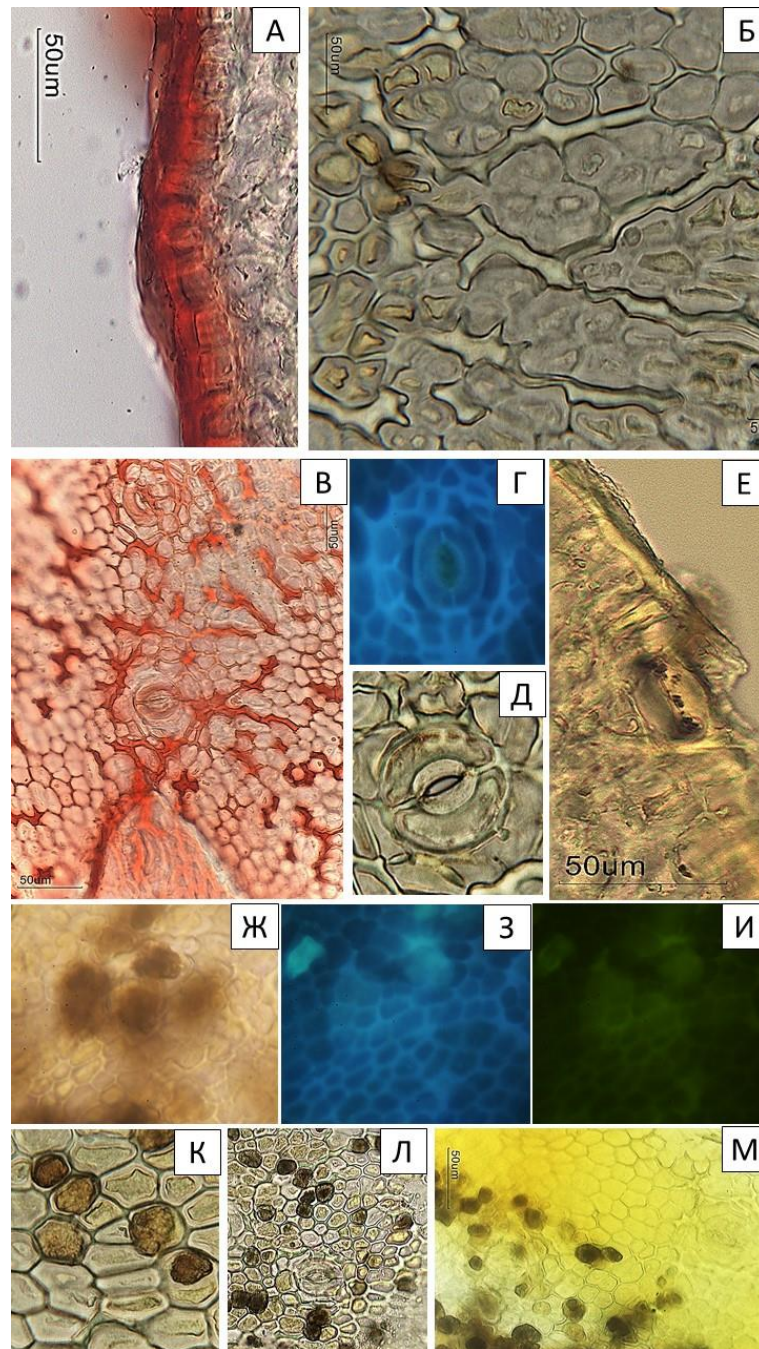


Рисунок 3 – **Диагностические особенности экзокарпия:** А – экзокарпий на поперечном сечении. Окраска раствором Судана III ($\times 400$), Б – Экзокарпий. Вид с поверхности ($\times 400$), В – окраска воскового слоя экзокарпия раствором Судана III, Г – люминесценция клеточных стенок и протопластов клеток энциклоцитного устьичного аппарата в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), Д – Ладьевидная структура замыкающих клеток устьичного аппарата ($\times 1000$), Е - крахмальные зерна в структуре замыкающих клеток устьиц на поперечном сечении экзокарпия ($\times 400$), Ж – кристаллические включения в клетках экзокарпия. Вид с поверхности ($\times 400$), З – люминесценция клеток экзокарпия и кристаллических включений в диапазоне возбуждения 330-400 нм ($\times 400$), И - люминесценция клеток

экзокарпия и кристаллических включений в диапазоне возбуждения 420-500 нм ($\times 400$), К – внутриклеточное расположение аморфных скоплений в клетках экзокарпия со стороны брюшного шва ($\times 1000$) Л – скопление аморфных кристаллоидов в клетках экзокарпия со стороны брюшного шва до обработки реактивом ($\times 400$), М – реакция растворения аморфных скоплений с окрашиванием в желтый цвет при обработке спиртовым раствором хлорида алюминия 3% ($\times 400$).

2. Морфолого-анатомические особенности семенной кожуры

При микроскопическом исследовании семени обнаруживаются кристаллические включения в клетках эпидермы семени (рис. 2Е).

В структуре семенной кожуры на поперечном сечении отчетливо определяются механический слой склереид (гиподерма), паренхима, сдавленный слой (рис. 2Г, Д, И). Боковые стенки склереид имеют округлость в районе смыкания (рис. 2И).

Обнаруживается бурая люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм (рис. 2Ж), желто-зеленая люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 420-500 нм (рис. 2З), бурая люминесценция клеток эпидермы семени в диапазоне возбуждения 330-400 нм (рис. 2К), голубое и бурое свечение протопластов клеток эндосперма в диапазоне возбуждения 330-400 нм (рис. 2Л).

3. *Анатомия створок боба софоры японской на поперечном сечении*

На поперечном сечении боба в области верхушки, в медиальной области боба в перемычке (между семенами) и в области условной ножки обнаруживаются коллатеральный пучок почковидной формы со стороны спинного шва и пара коллатеральных пучков со стороны брюшного шва, которые проявляются окраской раствором Судана III (рис. 4 А, Б, В).

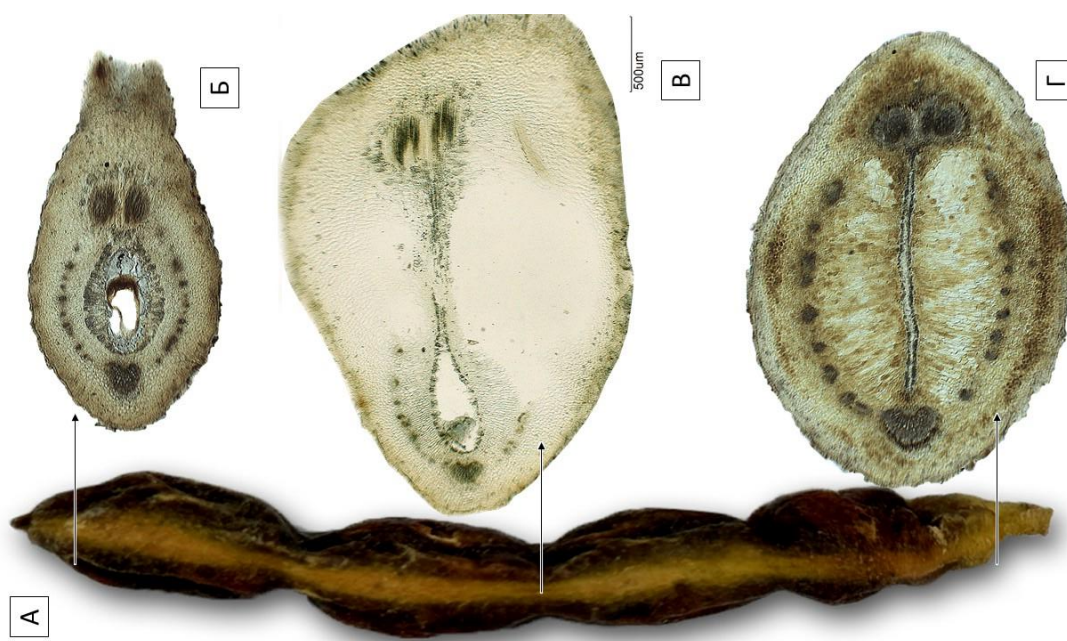


Рисунок 4 – Анатомия створок боба софоры японской на поперечном сечении: А – общий вид боба, Б – поперечное сечение в области верхушки, В – поперечное сечение в медиальной области боба в перемычке (между семенами), Г – поперечное сечение боба в области условной ножки.

При детектировании кристаллической обкладки в тканях вокруг пучка почковидной формы со стороны спинного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром определяется высокая плотность (рис. 5Б, Г), так же как в кристаллической обкладке в тканях вокруг пары пучков со стороны брюшного шва (рис. 5 В, Д) и в области эндокарпия в месте смыкания створок (рис. 5Е, Ж).

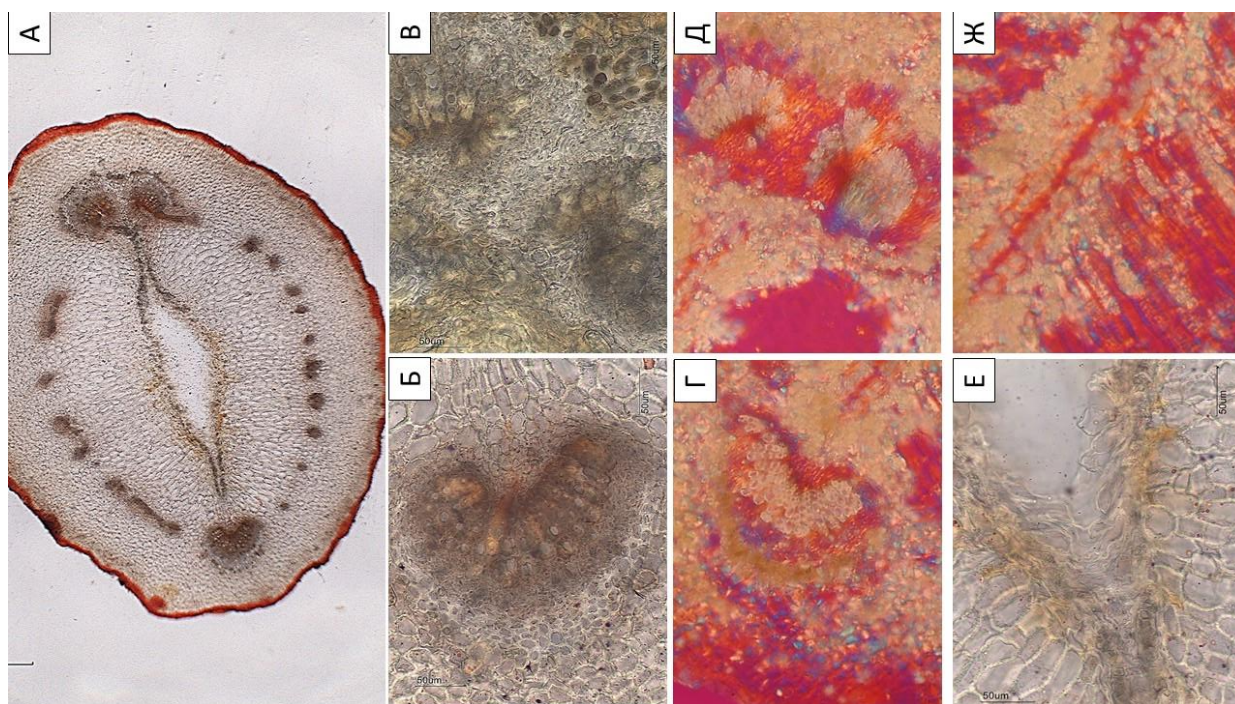


Рисунок 5 – **Анатомо-гистологическая структура створок:** А – Поперечный разрез створок боба в базальной части. Окраска раствором Судана III, Б – коллатеральный пучок почковидной формы со стороны спинного шва ($\times 400$), В – пара коллатеральных пучков со стороны брюшного шва ($\times 400$), Г – детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг пучка почковидной формы со стороны спинного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром ($\times 400$), Д - детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг пары пучков со стороны брюшного шва в поляризационном микроскопе с λ -светофильтром ($\times 400$), Е – место смыкания створок. Область эндокарпия ($\times 400$), Ж - детектирование кристаллической обкладки в тканях вокруг места смыкания створок в область эндокарпия ($\times 400$).

Дополнение к разделу «Определение основных групп биологически активных веществ»:

1. **Тонкослойная хроматография.** Испытуемый раствор и раствор стандартного образца сафорикозида приготавливают как указано в разделе «Определение основных групп биологически активных веществ». Раствор стандартного образца кемпферол-3-О-софорозида: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 0,01 мкг стандартного образца

кемпферол-3-*O*-софорозида, прибавляют 10 мл спирта 70% и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Подвижная фаза (ПФ). *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

Методика ТСХ-анализа. На линию старта хроматографической пластины «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированной при 100-105°C, наносят в виде полос шириной 1 см (по 0,03 мл) испытуемого раствора, а также растворов СО софорикозида и кемпферол-3-*O*-софорозида. Полученную ТСХ-хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм, и после проявления 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида (III) - в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются флуоресцирующие зоны, соответствующие СО софорикозиду и кемпферол-3-*O*-софорозиду. При этом обнаруживаются так же и другие вещества в минорных количествах.

2. УФ- спекроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимум электронного спектра в дифференциальном варианте УФ-спектроскопии при длине волны 400±2 нм (рис. 6).

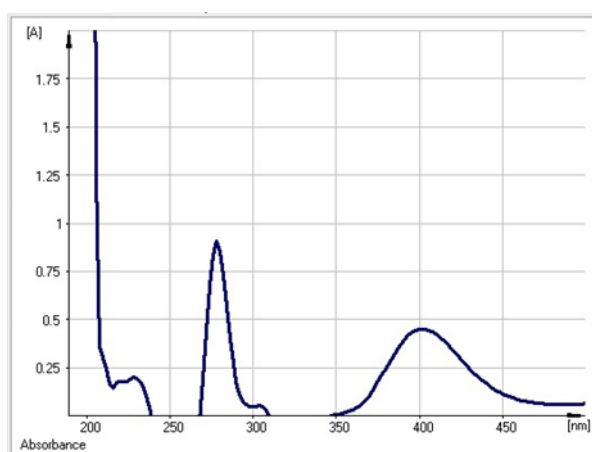


Рисунок 6 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения плодов софоры японской (дифференциальный вариант).

Дополнение к разделу «Испытания»:***Количественное определение.***

1. Нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 8,0%.

Методика количественного определения суммы флавоноидов.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (синяя полоса).

Испытуемый раствор: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (раствор А), тщательно перемешивают. Далее 2 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 нм на фоне раствора сравнения.

Раствор сравнения: 2 мл раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида.

Около 0,0050 г (точная навеска) ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 70 % этилового спирта при нагревании. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А ФСО цинарозида). Далее 2 мл полученного раствор А ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия(III) хлорида, сразу перемешивают и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б ФСО цинарозида), тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для образования окрашенных желтым цветом комплексов цинарозида с алюминия хлоридом. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б ФСО цинарозида на спектрофотометре при длине волны 400 нм на фоне раствора сравнения ФСО цинарозида.

Раствор сравнения цинарозида: 2 мл раствор А ФСО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл доводят объем до метки спиртом этиловым 96%.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 25} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора Б извлечения сырья;

D₀ – оптическая плотность раствора ФСО цинарозида;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса ФСО цинарозида, г.

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия ФСО цинарозида целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 400 нм – **340**:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 340 \cdot (100 - W)},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

340 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) ФСО цинарозида при 400 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

2. Нижний предел содержания софоригозида не менее 5,0%.

Методика количественного определения софоригозида методом ВЭЖХ.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной

массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Синяя лента»). Перед хроматографическим анализом 1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостный хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 2 мкл полученного испытуемого раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система:

подвижная фаза А (ПФА): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, объем 1500 мкл;

подвижная фаза В (ПФБ): ацетонитрил – 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 6:4, объем 900 мкл; скорость потока – 100 мкл/мин; суммарный объем элюента (ПФА и ПФБ) - 2400 мкл; детекция - при длине волны 262 нм.

УФ-детектирование для расчета количества софорикозида осуществляют при длине волне 262 нм. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Содержание софорикозида в плодах софоры японской в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 2 \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 2} \cdot \frac{100}{100 - W} ,$$

Где S – среднее значение площади пика софорикозида в водно-спиртовом извлечении из плодов софоры японской; S_0 – среднее значение площади пика софорикозида, вычисленное из хроматограммы раствора СО софорикозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО софорикозида, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление стандартного раствора софорикозида. Точную навеску (0,005 г) СО софорикозида (содержание основного вещества ≥ 98 %) перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в 15 мл 96% этилового спирта при нагревании и после охлаждения довести объем раствора до метки тем же растворителем.

<p>Проректор по научной работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, лауреат премии Правительства РФ доктор медицинских наук, профессор</p>		<p>И.Л.Давыдкин 01 2026</p>
<p>Заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор</p>		<p>В.А. Куркин «15» 01 2026</p>
<p>Соискатель кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, старший преподаватель кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России</p>		<p>М.К. Чередник «15» 01 2026</p>

Приложение 6. Методики определения нейротропной и диуретической фармакологической активности.

Анализ фармакологических эффектов определялся на белых беспородных крысах обоего пола, $m=200-220$ г. Животные размещались в виварии, рацион обычный, не ограниченный доступ к воде. Животные были поделены на группы: 1) группа, которой вводили образцы для анализа; 2) контролируемая группа; 3) группа с препаратом сравнения. Методом случайного отбора путем жеребьевки формировали контрольные и опытные группы. Образцы изучения вводились внутрижелудочно с помощью зонда. Суммарно проведено 8 серий экспериментов – 5 опытных и 3 контрольных (10 животных в каждой серии). Статистическая обработка полученных параметров проводилась с применением стандартных методов вариационной статистики при помощи программ Microsoft Excel 2019 «Пакет анализа» и Statistica 10.0 по критерию Манна – Уитни с поправкой Бонферрони.

Диуретическая активность

Первоначально, за 24 ч перед экспериментом, животные получали вводную нагрузку внутрижелудочно в объеме 3% от массы тела. В день анализа животным группы контроля аналогично давали внутрижелудочно водную нагрузку. Опытные животные внутрижелудочно получали анализируемые образцы в эквивалентном объеме воды. Сухой экстракт дан в дозе 10 мг/кг, БАВ – в дозе 1 мг/кг.

Препараты сравнения: фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (препарат сравнения для 4-х Ч опытов) и гипотиазид в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг (препарат сравнения для 24-х Ч опытов).

Животных размещали в обменные клетки на 24 ч. Собранные порции мочи по истечении 4 и 24 ч подвергали анализу. Измеряли почечную экскрецию воды, а также концентрацию креатинина колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3.

Нейротропная активность

Анализ нейротропной активности водно-спиртового извлечения (сгущенного) плодов и БАВ проводили с использованием теста Порсолта. Данный тест предусматривает оценку двигательной активности крыс, помещенных в стеклянный цилиндр диаметром 20 см и высотой 40 см, на 1/3 заполненный водой с температурой 27 ± 1 °С. Животное помещали в цилиндр на 5 мин, регистрировали время активного и пассивного плавания, время иммобилизации. Увеличение времени активного плавания и уменьшение времени иммобилизации рассматривали как антидепрессантный эффект. Тест проводили спустя 2 ч после введения водно-спиртового извлечения (сгущенного) и БАС.

При изучении нейротропной активности исследуемое водно-спиртовое извлечение (сгущенное) и индивидуальные соединения вводили однократно внутрижелудочно через зонд на фоне 1% водной нагрузки. Дозы исследуемых образцов подбирались экспериментальным путем.