

На правах рукописи

ЗИМЕНКИНА НАТАЛЬЯ ИГОРЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ОРЕХ (*JUGLANS L.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2022

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор *Куркин Владимир Александрович*

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел фитохимии, главный научный сотрудник;

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<https://samsmu.ru/scientists/science/referats/2022/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В условиях современного функционирования фармацевтической отрасли на различных этапах производственного процесса представлено многочисленное количество лекарственных средств (ЛС). Среди всего ассортимента ЛС особое место занимает группа лекарственных растительных препаратов (ЛРП). Указанная категория фармацевтических агентов сочетает в себе широту терапевтического действия и минимальный риск появления побочных эффектов. Значительное место занимают растительные препараты при терапии хронических нозологий, так как в данном случае требуется длительный приём лекарственных средств (Куркин В.А., 2009; Куркин В.А., 2019; Самылина И.А., 2016).

Указанная группа лекарственных средств является перспективной для дальнейшего изучения, что подтверждается Приказом МЗ РФ от 13.02.2013 г. № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года», а также Постановлением Правительства РФ № 305 от 15.04.2014 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности"» (с изменениями на 31 марта 2021 года). Ведущее направление стратегий указанных программ заключается в лекарственном импортозамещении отечественными аналогами.

Современное состояние фармацевтической науки в области фармакогнозии характеризуется определенным исчерпанием потенциала известных официальных лекарственных растений. Одной из причин этого является недостаточное внимание, уделяемое учеными в области фармакогнозии новым и малоизученным видам растительного сырья (РС).

Одним из перспективных видов сырья растительного происхождения являются представители рода Орех (*Juglans* L.) семейства Ореховые (*Juglandaceae*). На территории Российской Федерации культивируется около восьми видов растений рода *Juglans*, но представляющими интерес являются орех грецкий (*Juglans regia* L.), орех черный (*Juglans nigra* L.) и орех серый (*Juglans cinerea* L.). Представители рода Орех являются потенциальными источниками важного класса биологически активных соединений (БАС) – нафтохинонов, представители которого (юглон, гидроюглон) обуславливают высокую антибактериальную, противогрибковую и противовоспалительную активность (Зилфикаров И.Н. и др., 2020; Cruz-Vega D.E. et al., 2008; Hosseinzadeh H. et al., 2011; Peng X. et al., 2015, Zhou Y., et al., 2015).

Представители рода Орех являются ценными растениями и широко применяются в деревообрабатывающей и пищевой промышленности. Однако указанные виды пока не нашли широкого применения в научной медицине. В настоящий момент для растительного сырья видов рода Орех отсутствует нормативная документация (НД), регламентирующая его качество, как в Российской Федерации (РФ), так и за рубежом. Единственным исключением является Фармакопея Китайской Народной Республики 2020 года, в которую включена фармакопейная статья (ФС) на плоды ореха грецкого (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020). Ранее перикарпий и листья ореха грецкого были включены в I-IV издания отечественной фармакопеи (Куркин В.А., 2019). Перспективным источником также могут являться другие морфологические органы ореха грецкого и других видов данного рода.

Таким образом, проведение комплексного фармакогностического изучения особенностей анатоми-морфологической диагностики, а также идентификации и количественного определения основных групп БАС сырья представителей рода Орех, отвечающих современным требованиям фармакопейного анализа, является актуальной научной задачей специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень разработанности темы. В настоящий момент сырье рода *Juglans* не является официальным, его качество не регламентируется нормативной документацией отечественной фармакопеи. На РС листья и перикарпий ореха грецкого были разработаны соответствующие ФС в III и IV Фармакопеях нашей страны (Куркин В.А., 2019). Качество плодов ореха грецкого регламентируется только соответствующим ГОСТом (Дайронас Ж.В., 2017). В действующую XIV Государственную Фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) включена ФС.2.6.0054.18 на настойку гомеопатическую матричную Югланс региа (*Juglans regia* L.). Единственным зарубежным регламентирующим документом, определяющим основные показатели качества плодов ореха грецкого, является фармакопейная статья Фармакопеи Китайской Народной Республики 2020 года (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020).

В настоящий момент в литературных источниках содержатся данные микроскопического анализа видов рода Орех: проведены исследования морфолого-анатомического строения коры, листьев и околоплодников ореха грецкого, ореха черного и ореха серого (Дайронас Ж.В. и др., 2015; 2019; Еникеева Р.А. и др., 2007). Однако существует необходимость выявления отдельных диагностических признаков растительного сырья с использованием метода люминесцентной микроскопии.

В отечественной и зарубежной литературе широко описывается химический состав растительного сырья ореха грецкого. В качестве ведущей группы БАС устанавливаются нафтохиноны. Однако в РФ и за рубежом отсутствуют фармакопейные методики стандартизации для различных видов растительного сырья представителей рода Орех. В работах по разработке подходов к стандартизации растительного сырья видов рода Орех приводятся различные анализируемые группы БАС (нафтохиноны, фенольные соединения), условия пробоподготовки, методы качественного и количественного определения, а также условия анализа растительного сырья (Дайронас Ж.В., 2017; Еникеева Р.А., 2008; Kale Hu A.A. et al., 2012; Matławska I. et al., 2015, 145. Nour V. et al. 2013; Regueiro J. et al. 2014). Недостатки указанных подходов заключаются в выборе в качестве анализируемой группы соединений с низким содержанием (юглон), трудоемкости пробоподготовки проводимого исследования (двух- трехкратная экстракция растительного сырья с использованием широкого ассортимента органических растворителей), некорректном подборе метода исследования (прямая спектрофотометрия при анализе многокомпонентных систем, фотоэлектроколориметрия). Общей проблемой в данных исследованиях является отсутствие единого подхода к контролю качества растительного сырья рода Орех.

В связи с этим актуальность приобретают исследования в области разработки подходов к контролю качества растительного сырья видов рода Орех (*Juglans* L.).

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей диссертационной работы является разработка комплексных подходов к стандартизации отдельных представителей рода Орех (*Juglans* L.) для использования в качестве лекарственного растительного сырья.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Сравнительное фитохимическое исследование некоторых видов растительного сырья рода Орех: коры, листьев и околоплодников ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) методом тонкослойной хроматографии.

2. Сравнительное фитохимическое исследование некоторых видов растительного сырья рода Орех: коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L. и *Juglans cinerea* L. методом спектрофотометрии.

3. Разработка методик качественного анализа коры и листьев *Juglans nigra* L. методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.

4. Разработка методик количественного определения флавоноидов в коре и листьях *Juglans nigra* L. с использованием дифференциальной спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

5. Морфолого-анатомическое исследование листьев и коры ореха черного.

6. Подготовка проектов фармакопейной статьи на новые виды растительного сырья – «Ореха черного кора», «Ореха черного листья».

7. Адаптация методик идентификации и количественного определения флавоноидов для ЛРП «Ореха черного листьев настойка», «Ореха черного коры настойка».

8. Обоснование фармакологической активности некоторых видов растительного сырья рода *Juglans*. Изучение нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного. Обоснование фармакологической активности некоторых видов растений рода *Juglans*. Изучение нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного.

Научная новизна. Проведенное сравнительное фитохимическое исследование коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L. позволило установить наиболее перспективный вид растительного сырья – орех черный (*Juglans nigra* L.). В ходе изучения химического состава коры ореха черного впервые выделены и идентифицированы: мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона), его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон), сакуранин (сакуранетин-5-О- β -D-глюкопиранозид; 5-О- β -D-глюкопиранозид 5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванона) и его агликон сакуранетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон). Из листьев ореха черного впервые выделен и идентифицирован этоксиюглон (2-этокси-5-гидрокси-1,4-нафтохинон).

Разработаны методики определения подлинности и количественного анализа коры и листьев ореха черного, основанные на определении диагностически значимых соединений – мирицитрина и кверцитрина методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии в прямом и дифференциальном варианте и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

С использованием метода люминесцентной микроскопии выявлены места локализации доминирующих и диагностически значимых соединений коры и листьев ореха черного. Выявлено, что наибольшая концентрация фенольных соединений (юглон, мирицитрин) соответствует локализации тканей основной паренхимы мягкого луба коры *Juglans nigra* L. В листьях коры и листьев *Juglans nigra* L. кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализуются кристаллические включения мирицитрина.

Методики качественного и количественного анализа коры и листьев ореха черного были адаптированы для препаратов «Ореха черного листьев настойка» и «Ореха черного коры настойка».

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена полученными патентами Российской Федерации на изобретение № 2747417 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного» (регистрационный № 2020129429, от 04.09.2020 г., решение о выдаче патента 04.05.2021 г.) (приложение № 3), а также № 2747482 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого» (регистрационный № 2020129431, от 04.09.2020 г., решение о выдаче патента 05.05.2021 г.) (приложение № 4). Получен приоритет на изобретение «Способ получения мирицитрина из коры ореха черного, обладающего нейротропной активностью» (регистрационный № 2021111 от 23.04.2021).

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость заключается в разработанном комплексном подходе к идентификации и количественному определению содержания флавоноидов в растительном сырье – коре и листьях ореха черного методами тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Предложены методики идентификации основной группы БАС – флавоноидов – методом ТСХ с использованием в качестве веществ-свидетелей стандартных образцов мирицитрина (кора и листья) и кверцитрина (листья). Установлены максимумы поглощения растворов водно-спиртовых извлечений коры и листьев ореха черного для определения подлинности сырья.

Разработаны методики количественной оценки суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии, а также методики оценки количественного содержания мирицитрина в коре, листьях *Juglans nigra* L. и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Определены основные показатели качества для растительного сырья коры и листьев ореха черного. Нижний предел содержания флавоноидов в коре ореха черного не менее 2,5%; содержание мирицитрина не менее 2,0%. Для листьев ореха черного числовой показатель минимального содержания флавоноидов составляет не менее 3,0 %; содержание мирицитрина не менее 1,5 %; содержание кверцитрина не менее 1,0 %.

По итогам исследования подготовлены проекты фармакопейной статьи на новые виды растительного сырья - «Ореха черного кора», «Ореха черного листья».

Определены показатели качества растительных препаратов «Ореха черного коры настойка», «Ореха черного листьев настойка»: нижние пределы содержания флавоноидов, а также содержания мирицитрина (для препаратов коры и листьев *Juglans nigra* L.) и кверцитрина (для препаратов листьев *Juglans nigra* L.) методом ВЭЖХ.

Проведено прогнозирование фармакологической и биологической активностей мирицитрина и кверцитрина. Выявлено наличие нейротропной, активности в отношении мирицитрина.

Внедрение результатов исследования. Представленные данные диссертационного исследования интегрированы в научно-образовательные процессы структурных подразделений Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (акты внедрения от 15.11.2021, 22.11.2021, 13.01.2022, 14.01.2022). Кроме того, методики качественного и количественного анализа растительного сырья *Juglans nigra* L. апробированы и используются в производственных, а также рабочем процессах на ООО «Лекарь» (акты внедрения от 25.05.2021) и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» (акты внедрения от 18.05.2021), ЗАО «Самаралектравы» (акты внедрения от 17.01.2022), ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (акты внедрения от 15.01.2020).

Личный вклад автора. Результаты экспериментальной работы, описанные в диссертационном исследовании, получены и подготовлены лично автором. Осуществлен анатомический и гистологический анализ коры и листьев *Juglans nigra* L. В результате установлены характерные диагностические признаки сырья *Juglans nigra* L.

Реализован сравнительный фитохимический анализ коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L. По результатам изучения фитохимического состава коры ореха черного выделены и идентифицированы 5 индивидуальных соединений (мирицитрин, мирицетин, сакурнетин, сакурнин, юглон), из листьев ореха черного выделены и

идентифицированы 5 индивидуальных соединений (мирицитрин, мирицетин, кверцитрин, кверцетин, этоксиюглон). Разработаны и обоснованы подходы к качественной и количественной оценке доброкачественности растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. Подготовлены проекты фармакопейной статьи на новые виды лекарственного растительного сырья «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья».

Разработанные методики стандартизации растительного сырья адаптированы для анализа препаратов «Ореха черного коры настойка», «Ореха черного листьев настойка». Изучена нейротропная активность мирицитрина, выделенного из коры ореха черного.

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. НИОКР – «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ Гос. регистрации АААА-А19-119051490148-7 от 14.05.2019).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изданы в 23 печатных публикациях, из которых 6 статей в рецензируемых журналах ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации; 4 работы, входящих в международные базы цитирования SCOPUS. Получено 2 патента РФ на изобретение, 1 приоритет на изобретение РФ.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования включает анализ и системное обобщение отечественных и зарубежных литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач исследования, выполнение экспериментальной работы в области сравнительного фармакогностического исследования видов рода *Juglans* L.

В начале экспериментальной работы были установлены объекты и методы исследования. Объекты работы включают виды сырья растений рода Орех, заготовленные в период с 2019 по 2021 года. Для проведения диссертационного исследования использованы методы цифровой и люминесцентной микроскопии, колоночной хроматографии, хроматографии в тонком слое сорбента, высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли в соответствии с ГФ РФ XIV издания с использованием соответствующего программного обеспечения.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты сравнительного фитохимического исследования коры, листьев и околоплодников ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) методом тонкослойной хроматографии.

2. Результаты сравнительного фитохимического исследования коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L. и *Juglans cinerea* L.

3. Результаты исследования химического состава коры и листьев *Juglans nigra* L., в том числе выделение индивидуальных соединений и их структурная идентификация.

4. Результаты исследований по разработке методик идентификации флавоноидов методами ТСХ и спектрофотометрии в растительном сырье коры и листьев *Juglans nigra* L.

5. Результаты исследований по разработке методик количественного оценки доброкачественности коры, листьев *Juglans nigra* L. методами дифференциальной спектрофотометрии и ВЭЖХ, а также обоснованию числовых показателей содержания

флавоноидов в пересчете на мирицитрин, содержания мирицитрина в коре ореха черного, содержания кверцитрина и мирицитрина в листьях ореха черного.

6. Результаты морфолого-анатомического исследования листьев и коры ореха черного с использованием люминесцентной микроскопии.

7. Результаты исследования возможности адаптации методик качественного и количественного анализа растительных препаратов «Ореха черного коры настойка», «Ореха черного листьев настойка».

8. Результаты предварительного изучения фармакологической активности кверцитрина и мирицитрина, выделенных из коры и листьев ореха черного.

9. Результаты подготовки проектов фармакопейной статьи «Ореха черного кора», «Ореха черного листья».

Степень достоверности научных положений подтверждается корректностью сбора информации, представительностью и достоверностью первичных экспериментальных данных, установленных с использованием методов цифровой и люминесцентной микроскопии, колоночной хроматографии, ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии. Обработка результатов исследований проведена с использованием математического анализа данных.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования рассмотрены на научных и научно-практических конференциях областного, всероссийского и международного уровней: Международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата» (г. Москва «ВИЛАР», 2020; 2021 гг.), Международной научной конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва «ВИЛАР», 2020; 2021 гг.), Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «Современные достижения фармацевтической науки и практики» (г. Витебск, 2019 г.), IV Научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (г. Москва РУДН, 2020 год), Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 2021 г.), XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием: «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург СПХФУ, 2021 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2019; 2020; 2021 гг.), V Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (г. Самара, 2020 г.); IV Межвузовской студенческой научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2019 г.), III и IV Научно-практических конференциях студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижевожский» "Физика и медицина: создавая будущее" (г. Самара, 2019; 2020 гг.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки).

Объем и структура работы. Диссертационная работа представлена на 221 странице машинописного текста. В структуре исследования содержится 39 таблиц и 57 рисунков. Указанная работа состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследования, 5 глав собственных исследований с выводами, заключения, списка литературы, включающего себя 184 источника, в том числе 75 на иностранном языке, а также приложений.

Введение содержит данные об актуальности, цели и задачах исследования, степени разработанности темы, научной новизне и практической значимости, основных положениях, выносимых на защиту, а также сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературных данных российских и зарубежных источников в области фармакогностического исследования представителей рода Орех (*Juglans* L.). В главе представлены вопросы, касающиеся таксономической характеристики, ботанического описания, ареала распространения, особенностей химического состава. Также в главе содержится информация о современном состоянии исследований в области стандартизации сырья видов рода Орех (*Juglans* L.), а также о возможности применении указанных видов растений в официальной и народной медицине России и зарубежных стран.

Глава 2 включает в себя описание используемых в настоящем диссертационном исследовании объектов и методов исследования.

В главе 3 описаны результаты сравнительного фитохимического исследования различных видов растительного сырья ореха черного, ореха грецкого и ореха серого. Представлены результаты изучения химического состава растительного сырья: выделение и идентификация индивидуальных соединений из коры и листьев ореха черного.

Глава 4 посвящена обоснованию целесообразности создания и собственно разработке методик определения подлинности основной группы БАС – флавоноидов – а также количественного анализа коры и листьев ореха черного, изучению показателей качества данных видов сырья.

Глава 5 посвящена результатам исследования коры и листьев ореха черного с использованием методов люминесцентной микроскопии.

Глава 6 включает вопросы адаптирования разработанных методик качественного и количественного анализа растительного сырья для препаратов коры и листьев ореха черного.

В главе 7 представлены результаты предварительного скрининга фармакологической активности и определения нейротропной активности мирцитрина и кверцитрина, а также острой токсичности настоек коры и листьев ореха черного.

Диссертация завершается заключением, выводами, практическими рекомендациями, списком литературы и приложениями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования диссертационной работы были использованы образцы растительного сырья: ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.), собранные в период с 2019 по 2021 гг. Сырье было заготовлено на территории Самарской и Ростовской областей, Республики Адыгея, Республики Абхазия в период с марта по сентябрь.

В рамках диссертационной работы исследовались растительные препараты: настойка коры и листьев ореха черного 1:5 (70% этиловый спирт), а также индивидуальные соединения: гиперозид (CAS 482-36-0, ≥ 95 %, MERK), кверцитрин (CAS 522-12-3, ≥ 98 %, MERK), кверцетин (CAS 6151-25-3, ≥ 95 %, MERK), мирцитрин (CAS 17912-87-7, ≥ 98 %, MERK), мирицетин (CAS 529-44-2, ≥ 98 %, MERK), югланин (CAS 5041-67-8, 95 %, MERK), юглон (CAS 481-39-0, ≥ 95 %, MERK).

Исследование указанного растительного сырья и растительных препаратов, а также их стандартизацию проводили с использованием химических и физико-химических методов анализа. Для установления химического состава коры и листьев ореха черного был использован

метод жидкостно-адсорбционной колоночной хроматографии; для разделения применялись силикагель марки L 40/100 мкм (Чехия), полиамид For Column Chromatography (Fluca Analytical, Германия). Спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ исследовали с помощью ЯМР ^1H -спектроскопии и ЯМР ^{13}C -спектроскопии с использованием спектрометров «Bruker AM 300» (300 МГц), «JNM-ECX 400» (399.78 МГц) и «Bruker DRX 500» (126.76 МГц), «JNM-ECX 400» (100.52 МГц) соответственно. Масс-спектры EI-MS и ESI-MS низкого и высокого разрешения были получены на масс-спектрометрах «Kratos MS-30» и Bruker micrOTOF II соответственно.

Для исследования извлечений изучаемых видов сырья, выделенных веществ и разработанных лекарственных растительных препаратов и их стандартизации использовали метод тонкослойной хроматографии с пластинками «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Россия). Спектрофотометрическое исследование проводили на спектрофотометрах «Specord 40» (Analytik Jena) и «СФ-2000» (ОКБ Спектр) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ВЭЖХ-анализ проводили с использованием хроматографа «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с ультрафиолетовым детектором в следующих условиях: обращенная фаза, изократический режим, стальная колонка колонка КАХ-6-80-4 (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – различные соотношения ацетонитрила и воды с добавлением 1% уксусной кислоты, скорость элюирования - 100 мкл/мин, объем элюента – 2000-2500 мкл, объем пробы 4-8 мкл. Аналитические длины волн – 260, 360 нм.

Анатомо-гистологический и морфологический анализ проводили с использованием цифровых микроскопов марки «Motic DM-111» и «Motic DM-39C-N9GO-A», люминисцентного микроскопа «Альтами» ЛЮМ-2 (голубой и желтый светофильтры) с увеличениями x40, x100, x400.

С использованием фармакологических методов проводили прогнозирование биологической активности индивидуальных соединений, выделенных из коры и листьев ореха черного, и последующее изучение нейротропной активности, а также исследование острой токсичности настоек коры и листьев ореха черного.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Сравнительное фитохимическое исследование сырья некоторых видов рода Орех (*Juglans L.*)

Предварительное сравнительное исследование растительного видов рода *Juglans L.* с использованием метода тонкослойной хроматографии позволило выявить наличие соединений флавоноидной структуры в коре и листьях ореха черного, листьях ореха грецкого и ореха серого.

Для подтверждения результатов анализа, полученных методом тонкослойной хроматографии, дополнительно проведен анализ извлечений коры ореха черного, листьев ореха черного, ореха грецкого и ореха серого методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой области спектра. По результатам сравнительного изучения электронных спектров поглощения водно-спиртовых извлечений указанных видов, полученных в условиях прямой спектрофотометрии, установлены особенности спектральных характеристик. Полученные спектры поглощения водно-спиртовых извлечений указанных видов сырья имеют два максимума поглощения. Дальнейшее исследование растительного сырья методом дифференциальной спектрофотометрии позволило установить батохромный сдвиг длинноволновой полосы, появляющийся при взаимодействии с комплексообразователем – спиртовым раствором AlCl_3 . В условиях дифференциальной спектрофотометрии для извлечения коры и листьев ореха черного

установлен максимум поглощения в области 412-416 нм, который фактически аналогичен зарегистрированному максимуму поглощения раствора стандартного образца мирицитрина при длине волны 416 нм. Проведенное сравнительное спектрофотометрическое исследование показало, что характер спектра поглощения листьев и коры ореха черного во многом определяют соединения, используемые ранее в ТСХ-анализе сырья – мирицитрин и кверцитрин (рис. 1-3). Полученные по результатам хроматографических и спектрофотометрических исследований данные позволили предположить перспективность дальнейшего изучения химического состава коры и листьев ореха черного.

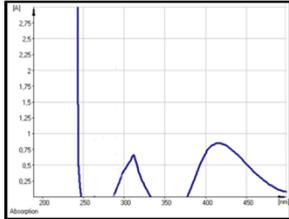


Рисунок 1 - Электронный спектр поглощения раствора водно-спиртового извлечения из коры ореха черного (дифференциальный вариант)

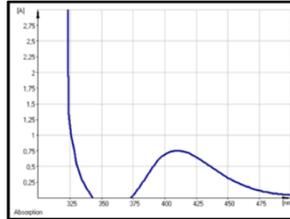


Рисунок 2 - Электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха черного (дифференциальный вариант)

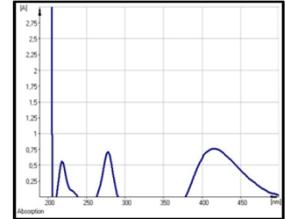


Рисунок 3 - Электронный спектр поглощения раствора мирицитрина (дифференциальный вариант)

Для последующего анализа химического состава коры и листьев ореха черного проводилось выделение индивидуальных биологически активных соединений из указанных видов растительного сырья методом адсорбционной колоночной хроматографии. Для определения химической структуры выделенных веществ использовали методы ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ, а также спектрофотометрии.

В ходе исследования химического состава коры и листьев ореха черного методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии для коры и листьев ореха черного выделены и идентифицированы вещества, представленные в таблице 1.

С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен предварительный анализ компонентного состава извлечений коры и листьев ореха черного в целях идентификации выделенных химических соединений. Установлено, что доминирующим и диагностически значимым соединением коры ореха черного является флавонол – мирицитрин. В листьях ореха черного доминирующим также является мирицитрин. При этом проведенное исследование позволило установить, что диагностически значимыми флавоноидами для листьев ореха черного являются 2 флавонола – мирицитрин и кверцитрин (рис. 4-7).

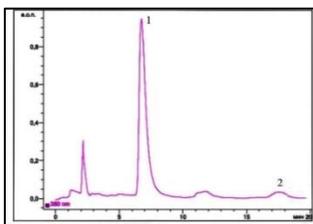


Рисунок 4 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из коры ореха черного
Обозначения: 1 – мирицитрин;
2 – мирицитин;
3 – кверцитрин.

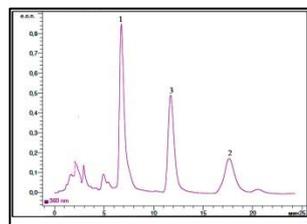


Рисунок 5 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного
Обозначения: 1 – мирицитрин;
2 – мирицитин;
3 – кверцитрин.

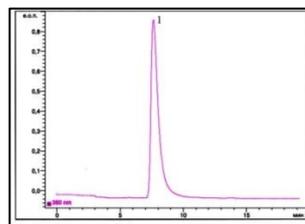


Рисунок 6 - ВЭЖХ-хроматограмма мирицитрина
Обозначения : 1 – мирицитрин.

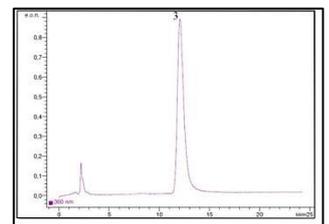
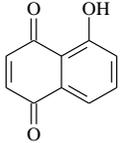
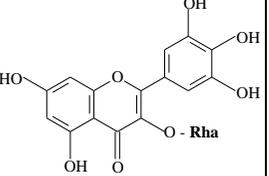
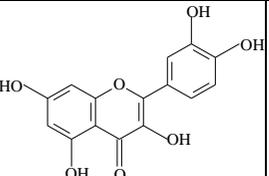
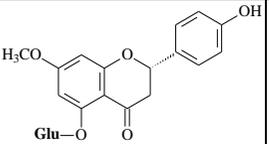
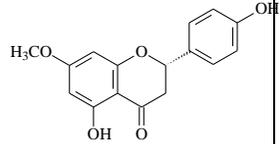
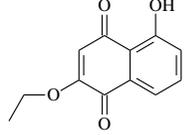
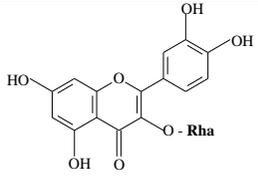
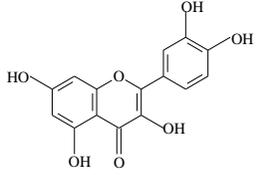
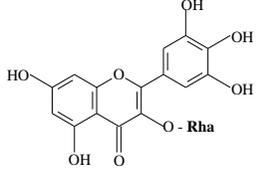
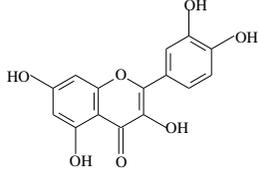


Рисунок 7 - ВЭЖХ-хроматограмма кверцитрина
Обозначения : 3 - кверцитрин.

Таблица 1 - Характеристики веществ, выделенных из коры и листьев ореха черного методом колоночной хроматографии

№	Название соединения	Химическая формула	Характеристики
Кора ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.)			
1.	Юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон)		$C_{10}H_6O_3$ Кристаллическое вещество оранжевого цвета $\lambda_{max}=250, 320, 420$
2.	Мирицитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона)		$C_{21}H_{20}O_{12}$ Желтое кремовым оттенком кристаллическое вещество $\lambda_{max}=212, 260, 358$
3.	Мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон) $C_{15}H_{10}O_8$		$C_{15}H_{10}O_8$ Желто-зеленое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=254, 377$
4.	Сакуранин (Сакуранетин-5-O- β -D-глюкопиранозид; 5-O- β -D-глюкопиранозид 5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванона)		$C_{22}H_{24}O_{10}$ Белое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=228, 283, 324$

5.	Сакуранетин (5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванон)		$C_{16}H_{15}O_5$ Белое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=224, 288, 326$
Листья ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.)			
6.	Этоксиглон (2-этоксигидрокси-5-гидрокси-1,4-нафтохинон)		$C_{12}H_{10}O_4$ Кристаллическое вещество оранжевого цвета $\lambda_{max}=248, 289, 418$
7.	Кверцитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавона)		$C_{21}H_{20}O_{11}$ Белое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=258, 264, 356$
8.	Кверцетин (5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванон)		$C_{15}H_{10}O_7$ Белое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=258, 270, 374$
9.	Мирицитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона)		$C_{21}H_{20}O_{12}$ Желтое кремовым оттенком кристаллическое вещество $\lambda_{max}=212, 260, 358$
10.	Мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон)		$C_{15}H_{10}O_8$ Желто-зеленое кристаллическое вещество $\lambda_{max}=254, 377$

2. Разработка подходов к стандартизации коры и листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.)

В рамках диссертационной работы в рамках фитохимического исследования коры ореха черного было выделено и идентифицировано диагностически значимое соединение группы флавонолов - мирицитрин. Установлено, что мирицитрин и кверцитрин являются диагностически значимыми соединениями листьев ореха черного. Следовательно, указанные соединения целесообразно использовать в качестве стандартных образцов при разработке методик определения основных групп БАС и количественного анализа коры и листьев ореха черного.

Определение подлинности основных групп БАС методами ТСХ и спектрофотометрии

Предварительный фитохимический анализ показал, что при определении подлинности коры ореха черного методом ТСХ в системе хлороформ – спирт этиловый – вода (25:18:2) на хроматограмме обнаруживается зона адсорбции доминирующего соединения на уровне СО мирицитрина. Таким образом, в качестве внутреннего вещества-свидетеля предлагается использовать СО мирицитрина.

При определении подлинности листьев ореха черного методом ТСХ в системе хлороформ – спирт этиловый – вода (25:18:2) на хроматограмме обнаруживаются зоны адсорбции диагностически значимых соединений на уровне СО мирицитрина и кверцитрина. Следовательно, в качестве стандартных образцов (веществ-свидетелей) предлагается использовать СО мирицитрина и СО кверцитрина. На хроматограмме испытуемого раствора листьев ореха черного должны обнаруживаться зоны адсорбции ярко-желтого цвета, расположенные на уровне зон адсорбции СО мирицитрина и СО кверцитрина. Детектирование хроматографических пластин представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Детектирование основных зон адсорбции при анализе растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L.

Вид анализируемого образца	R _f	Детекция в видимом свете	Детекция в УФ-свете (λ=365 нм)	Детекция AlCl ₃ и в УФ-свете	Детекция раствором ДСК
Кора ореха черного Хроматографическая зона № 1	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
Листья ореха черного Хроматографическая зона № 1	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
Хроматографическая зона № 2	0,65	Желтая	Темно-коричневая со светлой каймой	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
СО мирицитрина	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
СО кверцитрина	0,65	Желтая	Темно-коричневая со светлой каймой	Ярко-желтая	Желто-оранжевая

Дополнительно для определения подлинности сырья рекомендовано проведение спектрофотометрического анализа. Испытуемые растворы извлечений коры и листьев ореха черного фотометрировали и устанавливали максимумы поглощения (табл. 3).

Таблица 3 – Установленные значения максимумов поглощения испытуемых растворов извлечений коры и листьев ореха черного

Условия фотометрии	Кора ореха черного	Листья ореха черного
Прямой метод	$\lambda_{max1} = 270 \pm 2$ нм; $\lambda_{max2} = 360 \pm 2$ нм	$\lambda_{max1} = 270 \pm 2$ нм ; $\lambda_{max2} = 356 \pm 2$ нм
Дифференциальный метод	$\lambda_{max} = 416 \pm 2$ нм	$\lambda_{max} = 412 \pm 2$ нм

Разработка методик количественного определения суммы флавоноидов в коре и листьях ореха черного

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного были определены основные параметры пробоподготовки. Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья показали, что оптимальными условиями экстракции являются: однократное извлечение 80 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30 и степени измельчения сырья – 2 мм.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного. Аналитическую пробу коры *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл спирта этилового 80 % концентрации. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 1 часа. После охлаждения в течение 30 мин полученного извлечения, колбу закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое при необходимости восполняют экстрагентом до первоначального значения. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная полоса (раствор А испытуемого извлечения). Испытуемый раствор: 1,0 мл раствора А испытуемого извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % концентрации (раствор Б испытуемого извлечения). Оптическую плотность раствора Б испытуемого извлечения измеряют на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого извлечения (1:30), доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Примечание: Приготовление раствора мирицитрина-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска) мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы в течение 30 минут, доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А мирицитрина). 1,0 мл раствора А раствора СО мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б мирицитрина). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А мирицитрина доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор сравнения Б мирицитрина).

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

$$X = \frac{A \times m_0 \times 30 \times 50 \times 1 \times 100 \times 100}{A_0 \times m \times 50 \times 25 \times (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО мирицитрина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО мирицитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Для целей количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин при отсутствии стандартного образца мирицитрина было экспериментально определено значение показателя экстинкции (удельный показатель поглощения). Его величина при длине волны 416 нм составляет 432.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов из одной серии сырья свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре *Juglans nigra* L. с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 8,58$ % (табл. 4).

Таблица 4 – Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения суммы флавоноидов в коре *Juglans nigra* L.

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	3,17	0,0149	0,1221	0,0368	95	2,23	$\pm 0,27$	0,08	$\pm 8,58$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методик количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин определялась по соответствию максимумов поглощения суммы флавоноидов листьев ореха черного и стандартного образца мирицитрина в условиях дифференциальной спектрофотометрии после реакции с комплексообразователем. Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 400 до 3000 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации составил 0,9954. Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности (δ) анализа – 4,56 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками мирицитрина, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности.

Содержание суммы флавоноидов варьировало от $2,82 \pm 0,20$ % до $3,17 \pm 0,25$ %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы флавоноидов не менее 2,5 %. Разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного в пересчете на мирицитрин методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 416 нм включена в проект фармакопейной статьи «Ореха черного кора».

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях ореха черного установлены оптимальные условия пробоподготовки: однократное извлечение 80 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 30 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30 и степени измельчения сырья – 2 мм.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха черного. Аналитическую пробу коры *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл спирта этилового 80 % концентрации. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 минут. Дальнейший анализ проводят в соответствии с методикой, изложенной выше.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов из одной серии сырья свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях *Juglans nigra* L. с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 8,21$ % (табл. 5).

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях *Juglans nigra* L.

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	3,28	0,0146	0,1209	0,0365	95	2,23	$\pm 0,27$	0,08	$\pm 8,21$

Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 400 до 3000 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации составил 0,9954. Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности (δ) анализа – 4,16 %.

Содержание суммы флавоноидов варьировало от $3,02 \pm 0,22$ % до $3,28 \pm 0,24$ %, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы флавоноидов не менее 3,0 %. Разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха черного в пересчете на мирицитрин методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 416 нм включена в проект фармакопейной статьи «Ореха черного листья».

Разработка методик количественного определения мирицитрина и кверцитрина в коре и листьях ореха черного методом ВЭЖХ

Для разработки методик количественного определения содержания мирицитрина (мирицитрина и кверцитрина) методом ВЭЖХ в коре и листьях ореха черного в качестве прототипа была использована методика ВЭЖХ анализа листьев ореха грецкого с градиентным элюированием и детектированием на диодной матрице. Разделение осуществляли на колонке Hypersil Gold C18 с обращенной фазой (размер частиц 5 мкм, $250 \times 4,6$ мм). Подвижная фаза состояла из 1% водного раствора уксусной кислоты (А) и метанола (Б) (Nour V. et al., 2013). Отличием полученной методики является состав элюентной системы, длины волн для детектирования, время анализа, а также использование изократического элюирования.

Испытуемые растворы извлечений коры и листьев ореха черного получены в соответствии с параметрами пробоподготовки методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в условиях дифференциальной спектрофотометрии. Расчет содержания мирицитрина проводили методом внешнего стандарта.

Методика количественного определения мирицитрина в коре ореха черного. Полученный ранее испытуемый раствор А (см. методику количественного определения суммы флавоноидов в

коре ореха черного) использовали для методики количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса) и затем дополнительно через мембранный фильтр Milipore с диаметром пор 0,45 мкм (испытуемый раствор).

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 4 мкл полученного раствора. Хроматографируют 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:вода в соотношении 2:8 с добавлением 1% уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2000 мкл, объем пробы испытуемого раствора – 4 мкл. Рабочая длина волны 360 нм.

Для дальнейших расчетов осуществляют не менее 3 параллельных определений для испытуемого раствора извлечения и стандартного раствора мирицитрина. Определяют хроматографические пики мирицитрина на хроматограммах испытуемого раствора извлечения и раствора стандартного образца. По результатам 3 параллельных определений рассчитывают среднюю площадь пика мирицитрина на хроматограмме раствора СО мирицитрина и испытуемого раствора А извлечения.

Содержание мирицитрина в коре ореха черного в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S * m_0 * 0,98 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

где S – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме стандартного раствора; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора СО мирицитрина, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора СО мирицитрина, мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО мирицитрина, г; 0,98 – содержание основного вещества в СО мирицитрина; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов из одной серии сырья свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения содержания мирицитрина в коре ореха черного с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 7,88$ % (табл. 6).

Таблица 6 - Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения мирицитрина в коре *Juglans nigra* L.

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	3,10	0,0120	0,1096	0,0331	95	2,23	$\pm 0,24$	0,07	$\pm 7,88$

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения коры *Juglans nigra* L. Показатель эффективности хроматографической колонки составил 5115 теоретических тарелок, разрешение между пиками – 1,74, фактор асимметрии – 1,35.

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методик количественного определения содержания мирицитрина определялась по показателю разрешение между пиками, а также хроматографированием испытуемых растворов СО мирицитрина. Линейную зависимость площади пика от концентрации в диапазоне от 250 до 2000 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации составил 0,9957. Правильность методики

определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности (δ) анализа – 3,96 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками стандартных образцов, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности.

Установлено, что количественное содержание доминирующего вещества - мирицитрина для коры ореха черного, определенное с помощью метода ВЭЖХ, варьирует от (3,08±0,18) % до (3,14±0,22) %. Разработанная методика количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ включена в проект фармакопейной статьи «Ореха черного кора».

Методика количественного определения мирицитрина (кверцитрина) в листьях ореха черного. Полученный ранее испытуемый раствор А (см. методику количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного) использовали для методики количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса) и затем дополнительно через мембранный фильтр Milipore с диаметром пор 0,45 мкм (испытуемый раствор).

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 4 мкл полученного раствора. Хроматографируют 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:вода в соотношении 2:8 с добавлением 1% уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл, объем пробы испытуемого раствора – 4 мкл. Рабочая длина волны 360 нм.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов из одной серии сырья свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения содержания мирицитрина в листьях ореха черного с доверительной вероятностью 95 % составляет ±8,05 % (табл. 7).

Таблица 7 - Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения мирицитрина (кверцитрина) в листьях *Juglans nigra* L.

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	2,62	0,009	0,094	0,029	95	2,23	±0,21	0,06	±8,05
11	10	1,41	0,006	0,077	0,023	95	2,23	±0,17	0,05	±11,11

Линейность методики определяли для серии растворов мирицитрина и кверцитрина (с концентрациями в диапазоне от 250 до 2000 мкг/мл). Скорректированный коэффициент детерминации определении СО мирицитрина составил 0,9957. Коэффициент детерминации при определении СО кверцитрина – 0,9967. Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности анализа – 4,75 %.

3. Морфолого-анатомическое исследование коры и листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.)

Морфолого-анатомическому анализу подвергали кора и листья ореха черного. Данное исследование позволило выявить диагностические признаки, характерные для коры ореха черного: особенности внешнего вида, расположения тканей и локализации включений. Кроме того, выявлены основные диагностические признаки листьев ореха черного: особенности внешнего вида, формы эпидермиса и локализации его производных и различных включений

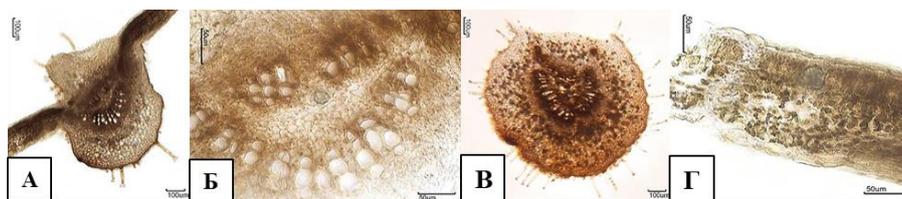


Рисунок 8 - Результаты морфолого-анатомического исследования листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.)

Обозначения: А – центральная жилка листовая пластинки – поперечное сечение ($\times 100$); Б – проводящая система центральной жилки ($\times 400$); В – фрагмент поперечного сечения черешка ($\times 100$); Г – фрагмент боковой жилки.

К диагностическим особенностям черешков и листовой пластинки листьев ореха черного можно отнести: очертания центральной жилки округлой формы, уплощенной с адаксиальной стороны с 3 пучками проводящих тканей: одного основного – в форме полумесяца, а также 2 других с адаксиальной стороны. Центральная жилка достаточно армирована: склеренхима окружает проводящие пучки центральной жилки, отмечается значительное содержание крупных округлых друз в базальной части листовой пластинки (рис 8 А-Г).

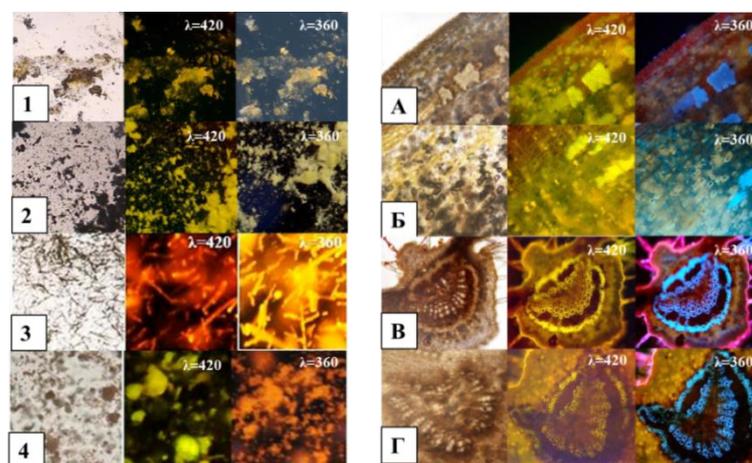


Рисунок 9 - Люминесцентная микроскопия: 1-5 – индивидуальных соединений СО; А-Г - тканей коры и листьев ореха черного

Обозначения: 1 - юглон; 2 - мирицитрин; 3 - кверцетин; 4 - кверцитрин; А – кора ореха черного – поперечное сечение; Б - фрагмент основной паренхимы коры ореха черного – поперечное сечение; В - центральная жилка листовая пластинки листа ореха черного; Г – проводящая система центральной жилки листовая пластинка листа ореха черного.

Анализ с использованием люминесцентной микроскопии выявил активное свечение тканей феллемы, проводящей и механической систем коры ореха черного (рис. 9-А). Кроме того, в основной паренхиме поперечного сечения с достоверной повторяемостью обнаруживаются скопления мелких кристаллов. При облучении поперечных сечений УФ-светом при 360 нм обнаруживается характерное желтое и оранжевое свечение кристаллических включений (рис. 9-Б), что соответствует свечению при тех же длинах волн образцов юглона и мирицитрина (рис. 9-1). Такой же анализ проведен и для тканей листьев ореха черного. Полученные данные люминесценции свидетельствуют о том, что кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализуются кристаллические включения мирицитрина (рис. 9-В, 9-Г).

4. Разработка методик стандартизации экстракционных препаратов коры и листьев ореха черного

В результате проведенных фармакогностических и аналитических исследований обоснована целесообразность создания экстракционных препаратов на основе коры и листьев ореха черного.

В лабораторных условиях нами получены образцы настоек коры и листьев ореха черного на 70 % этиловом спирте методом модифицированной дробной мацерации. Определение основных групп БАС образцов настоек коры и листьев ореха черного проводили методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии в УФ и видимой части спектра по методикам анализа соответствующих видов растительного сырья, адаптированных для препаратов. В качестве внутреннего свидетеля использовались стандартные образцы мирицитрина и кверцитрина, ранее применяемые для стандартизации коры и листьев ореха черного.

Разработанные методики количественной оценки содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях *Juglans nigra* L. были адаптированы для контроля качества настоек из указанных видов сырья. Рекомендуемое содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в препаратах «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка» должно составлять не менее 0,5 %.

Разработанные методики количественной оценки содержания мирицитрина в коре *Juglans nigra* L., мирицитрина и кверцитрина в листьях коры *Juglans nigra* L. были также адаптированы для контроля качества настоек из указанных видов сырья. Рекомендуемое содержание мирицитрина и кверцитрина в препаратах «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка» – не менее 0,1 % соответственно.

5. Определение фармакологической активности растительного сырья и препаратов коры и листьев ореха черного

Проведенный прогноз фармакологической активности субстанций мирицитрина и кверцитрина с использованием программы PASS позволил принять решение о проведении дальнейших исследований нейротропной активности мирицитрина. В результате исследования нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного, установлено, что при однократном внутрижелудочном введении мирицитрина в дозе 0,5 мг/кг отмечалось достоверное повышение двигательной активности опытных крыс относительно водного контроля (на 25% по отношению к водному контролю). В тоже время при однократном внутрижелудочном введении мирицитрина в дозе 5 мг/кг наблюдалось достоверное снижение двигательной активности животных в опытной группе на 46 % по отношению к водному контролю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов рода Орех (*Juglans* L.) позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. Сравнительное фитохимическое исследование растительного сырья видов рода Орех (*Juglans* L.) позволило выявить присутствие в коре и листьях ореха черного, листьях ореха грецкого и ореха серого химических соединений флавоноидной природы, что представляет интерес в плане дальнейшего изучения сырьевой базы видов рода *Juglans* L., среди которых наиболее перспективными источниками биологически активных соединений флавоноидной природы являются кора и листья ореха черного.

2. С использованием хроматографических (колоночной хроматографии, ТСХ, ВЭЖХ), спектральных (ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии) методов из коры ореха черного впервые выделены и идентифицированы мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-

гексагидроксифлавона), его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон), сакуранин (сакуранин-5-O-β-D-глюкопиранозид; 5-O-β-D-глюкопиранозид 5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон) и его агликон сакуранин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон). Кроме того, выделен юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон), уже описанный для коры ореха черного. Из листьев ореха черного были выделены и идентифицированы этоксиюглон (2-этокси-5-гидрокси-1,4-нафтохинон), кверцитрин (3-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавонон) и его агликон кверцетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон), мирицитрин (3-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон) и его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон).

3. Обоснована целесообразность определения мирицитрина и кверцитрина методом тонкослойной хроматографии для коры и листьев *Juglans nigra* L. с использованием в качестве веществ-свидетелей стандартных образцов мирицитрина (кора и листья), кверцитрина (листья). Кроме того, в оценке подлинности коры ореха черного целесообразно использование метода спектрофотометрии, с помощью которой установлены характерные максимумы поглощения: для коры и листьев ореха черного $\lambda_{\max 1} = 270 \pm 2$ нм ; $\lambda_{\max 2} = 360 \pm 2$ нм и $\lambda_{\max 1} = 270 \pm 2$ нм ; $\lambda_{\max 2} = 356 \pm 2$ нм в прямом варианте, $\lambda_{\max} = 416 \pm 2$ нм и $\lambda_{\max} = 412 \pm 2$ нм в дифференциальном варианте.

4. Разработаны методики количественной оценки содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda = 416 \pm 2$ нм. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 2,94 % до 3,17 %, и от 3,02 % до 3,28 % соответственно. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре *Juglans nigra* L. – не менее 2,5 %. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях *Juglans nigra* L. – не менее 3,0%.

5. Разработаны методики количественного определения мирицитрина в коре *Juglans nigra* L., а также мирицитрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. с использованием метода ВЭЖХ. Содержание мирицитрина в коре *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 3,08 % до 3,14 %. Содержание мирицитрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 2,58 % до 2,62 % и 1,36 % до 1,45 % соответственно. Величина числового показателя содержания мирицитрина в коре *Juglans nigra* L. – не менее 2,0 %. Величина числового показателя содержания мирицитрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. – не менее 1,5 % и 1,0 % соответственно.

6. Выявлены основные признаки локализации доминирующих и диагностически значимых соединений в коре и листьях ореха черного. С использованием метода люминесцентной микроскопии выявлено, что наибольшая концентрация фенольных соединений (юглон, мирицитрин) находится в тканях основной паренхимы мягкого луба. С использованием метода люминесцентной микроскопии выявлено, что кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализуются кристаллические включения мирицитрина.

7. Методики качественного и количественного определения БАС коры и листьев ореха черного адаптированы для растительных препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка» с использованием фотометрических и хроматографических методов анализа. Числовой показатель минимального содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в препарате «Ореха черного коры настойка» - не менее 0,5 %. Нижний предел содержания мирицитрина в препарате «Ореха черного коры настойка» – не менее 0,1 %.

Числовой показатель минимального содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в препарате «Ореха черного листьев настойка» - не менее 0,5 %. Нижний предел содержания мирицитрина и кверцитрина в препарате «Ореха черного листьев настойка» – не менее 0,1 % соответственно.

8. Программой PASS осуществлен прогноз фармакологической активности выделенных из растительного сырья субстанций. С использованием теста Порсолта установлено, что мирицитрин, выделенный из коры ореха черного, обладает нейротропной активностью.

9. Предложены проекты фармакопейных статей на новые виды лекарственного растительного сырья «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья».

Практические рекомендации. Разработанные научно-обоснованные подходы к стандартизации сырья видов рода *Juglans* L. позволяют объективно оценить качество указанного растительного сырья. Подготовленные проекты фармакопейных статей рекомендуются для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации следующих изданий. Результаты исследования допускается использовать в учебном процессе, а также в центрах контроля качества ЛС, а также в производственном процессе фармацевтических предприятий.

Перспективы дальнейшей разработки темы имеют научно-практическое значение для задач фармакогностического и фармацевтического анализа и заключаются в экспериментально-аналитической работе по углубленному изучению химического состава других видов сырья рода *Juglans* L., и последующей разработке объективных и унифицированных подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зименкина Н.И. Разработка подходов к стандартизации коры ореха черного / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2020. – № 1– 2. – С. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136.
2. Зименкина, Н.И. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха грецкого / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // **Фармация**. – 2020. Т. 69. - №. 7. – С. 23-28. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-07-04>.
3. Куркин, В.А. Определение содержания мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2021. – Том 55, № 9. – С. 13-17.
4. Куркин, В.А. Флавоноиды и нафтохиноны коры *Juglans nigra* / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина // **Химия природных соединений**. – 2021. – № 6. – С. 265-266.
5. Куркин, В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха черного методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина, А.В. Помогайбин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – Т. 24, № 12. – С. 37-47.
6. Зименкина Н.И. Особенности стандартизации настойки коры ореха черного / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2021. – № 5– 6. – С. 131–136. DOI: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136.
7. Куркин, В.А. Флавоноиды и нафтохиноны листьев *Juglans nigra* / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина // **Химия природных соединений**. – 2022. – № 1. – С. 265-266.
8. Куркин, В.А. Особенности количественной оценки содержания флавоноидов в препаратах коры ореха черного / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина // **Фармация и фармакология**. – 2022. – № 1. – С. 31-43.

9. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Люминесцентный анализ коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин В.А. // материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет «Современные достижения фармацевтической науки и практики» / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск : ВГМУ. – 2019. – С. 73-75.

10. Зименкина, Н.И. Сравнительный фитохимический анализ видов рода Орех (*Juglans* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин В.А. // Материалы III научно-практической конференции студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижевожский» «Физика и медицина: Создавая будущее»: Сборник материалов. – Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2019. – С. 213-215.

11. Зименкина, Н.И. Люминесцентный анализ коры ореха серого (*Juglans cinerea* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Новейшие зарубежные и отечественные препараты: фармакотерапия, фармакодинамика, фармакокинетика. Научно-практический журнал. – 2020. - №1(1). – С. 53-58.

12. Зименкина, Н.И. Сравнительный фитохимический анализ листьев представителей рода орех (*Juglans* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 72-й научно-практической конференции студентов и молодых учёных (12-13 мая 2020, г. Витебск) / под ред. А. Т. Щастного. – Витебск: ВГМУ, 2020. – С. 735-738.

13. Зименкина, Н.И. Люминесцентный анализ коры ореха грецкого (*Juglans regia* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // От растения до лекарственного препарата : сборник научных трудов международной научной конференции / М.: ФГБНУ ВИЛАР – 2020. – С. 232-236.

14. Зименкина, Н.И. Сравнительное фитохимическое исследование побегов и коры Ореха черного / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Вестник Пермской государственной Фармацевтической академии / Научно-практический журнал. – 2020. - №25. – С. 174-176.

15. Зименкина, Н.И. Морфолого-анатомическое исследование листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Аспирантские чтения – 2020: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые: научные исследования и инновации» с международным участием, посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева. – Самара: ООО «СамЛюксПринт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. – С. 253-255.

16. Зименкина, Н.И. Сравнительное фармакогностическое исследование коры представителей рода орех (*Juglans* L.) методом спектрофотометрии / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // IV научно-практическая конференция студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижевожский» «Физика и медицина: Создавая будущее»: Сборник материалов. – Самара: Изд. НИЦ LJournal, 2020. – С. 189-193.

17. Зименкина, Н.И. Сравнительное фармакогностическое исследование листьев представителей рода Орех (*Juglans* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения : сборник научных трудов международной научной конференции / М.: ФГБНУ ВИЛАР – 2020. – С. 217-224. DOI: 10.52101/9785870190921_2021_8_217.

18. Трухина, А.С. Особенности стандартизации лекарственного растительного сырья – коры и листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) / А.С. Трухина, Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием:

«Молодая фармация – потенциал будущего». Сборник материалов конференции, 15 марта – 23 апреля 2021г.: в. 2 т. Т.2. / Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ – 2021. – 49-53 С.

19. Зименкина, Н.И. Особенности идентификации лекарственного растительного сырья видов рода орех (*Juglans* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Юбилейная Международная научная конференция «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» : сборник научных трудов международной научной конференции / М.: ФГБНУ ВИЛАР. – 2021. – С. 413-421.

20. Зименкина, Н.И. Особенности количественной оценки содержания флавоноидов коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 13-16 сентября 2021 г.): сборник материалов – Томск: Изд-во СибГМУ. – 2021. – С. 130-132.

21. Зименкина, Н.И. Особенности количественной оценки содержания флавоноидов в настойке листьев ореха черного / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Аспирантские чтения — 2021: молодые ученые – медицине» / ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. – 2021. – С. 267-271.

22. Зименкина, Н.И. Особенности получения мирицитрина из коры ореха черного (*Juglans nigra* L.), обладающего нейротропной активностью / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин Е.Н. Зайцева, О.Е. Правдивцева // Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» / ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. – 2021. – С. 278-284.

23. Зименкина, Н.И. Определение динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного / Н.И. Зименкина, В.А. Куркин // «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» : сборник трудов IX международной научной конференции молодых ученых / М. : ФГБНУ ВИЛАР – 2021. — С. 235-241. DOI: 10.52101/9785870190921_2021_8_217.

Патенты

1. Патент РФ на изобретение 2747417. - (заявка № 2020129429 от 04.09.2020 г.) «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного» / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина. – Решение о выдаче патента 04.05.2021 г.
2. Патент РФ на изобретение 247482. - (заявка № 2020129431 от 04.09.2020 г.) «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого» / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина. – Решение о выдаче патента 05.05.2021 г.