

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

На правах рукописи

ЗИМЕНКИНА НАТАЛЬЯ ИГОРЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ОРЕХ (*JUGLANS 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 – 2022

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА ОРЕХ (<i>JUGLANS L.</i>) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	17
1.1. Представители рода Орех перспективные источники биологически активных соединений (БАС).....	17
1.2. Ботаническая характеристика видов рода <i>Juglans</i>	19
1.3. Химический состав перспективных видов рода Орех	21
1.4. Фармакологические свойства и применение в медицине представителей рода Орех	28
1.5. Вопросы стандартизации растительного сырья и препаратов представителей рода Орех	34
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ I	37
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Объекты исследования	38
2.2. Оборудование и материалы, используемые для исследования.....	39
2.3. Методы исследования.....	41
2.3.1. Морфолого-анатомические методы анализа	41
2.3.2. Химические методы анализа	42
2.3.3. Физико-химические методы анализа	42
2.3.4. Технологические методы исследования	48
2.3.5. Фармакологические методы анализа	49
2.3.6. Статистическая обработка результатов эксперимента	50
ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ОРЕХ (<i>JUGLANS L.</i>)	52
3.1. Сравнительное фитохимическое исследование лекарственного	

растительного сырья ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.), ореха грецкого (<i>Juglans regia</i> L.) и ореха серого (<i>Juglans cinerea</i> L.).....	53
3.1.1. Хроматографический анализ коры, листьев и плодов видов рода Орех в тонком слое сорбента.....	53
3.1.2. Исследование коры, листьев и плодов видов рода Орех (<i>Juglans</i> L.) с использованием спектрофотометрии в УФ и видимом свете	56
3.2. Выделение индивидуальных биологически активных соединений из коры и листьев ореха черного	61
3.3. Исследование фракций, содержащих биологически активные соединения экстрактов коры и листьев ореха черного	62
3.4. Идентификация индивидуальных соединений и их физико-химические характеристики.....	64
3.5. Исследование компонентного состава коры и листьев ореха черного методом ВЭЖХ	73
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	77
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО (<i>JUGLANS NIGRA</i> L.)	79
4.1. Разработка методик качественного анализа коры и листьев ореха черного методом ТСХ и спекрофотометрии.....	79
4.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного	84
4.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин листьях ореха черного	90
4.4. Разработка методики количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ.....	95
4.5. Разработка методики количественного определения мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного методом ВЭЖХ	99
4.6. Изучение динамики накопления биологически активных соединений в листьях ореха черного	103
4.7. Определение показателей качества новых видов лекарственного	

растительного сырья «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья»	106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	110
ГЛАВА 5. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>JUGLANS</i> L.	111
5.1. Морфолого-анатомическое исследование коры ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии	112
5.2. Морфолого-анатомическое исследование листьев ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии	118
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	126
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО	127
6.1. Определение подлинности растительных препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка».....	127
6.2. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в растительном препарате «Ореха черного коры настойка».....	130
6.3. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в растительном препарате «Ореха черного листьев настойка» ..	132
6.4. Количественное определение мирицитрина в растительном препарате «Ореха черного коры настойка».....	134
6.5. Количественное определение мирицитрина и кверцитрина в растительном препарате «Ореха черного листьев настойка»	137
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	141
ГЛАВА 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО	142
7.1. Прогноз фармакологической активности растительного сырья и препаратов видов рода Орех (<i>Juglans</i> L.)	142
7.2. Изучение нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.)	145

7.3. Изучение острой токсичности препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка»	146
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7	147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	151
ПРИЛОЖЕНИЯ	172
Приложение 1. ЯМР- и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из коры и листьев ореха черного	173
Приложение 2. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования	182
Приложение 3. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного»	191
Приложение 4. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого»	192
Приложение 5. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Ореха черного кора»	193
Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Ореха черного листья»	206

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В условиях современного функционирования фармацевтической отрасли на различных этапах производственного процесса 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 минимальных 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 – 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 анатомо-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 растения 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 regia (*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- техкратная 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 коры и листьев 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 рабочих 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) (приложение № 2).

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, сакуранетин, сакуранин, 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 листа».

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 (приложения № 3, 4).

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 количественной 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 листа».

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, спекрофотометрии 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 «Нижневолжский» "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 приложения.

ГЛАВА 1. ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА ОРЕХ (*JUGLANS L.*) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Поиск информации проводился в базах данных eLIBRARY [57], Google Scholar [133], ScienceDirect [165], SpringerLink [168], PubMed [177], PubChem [177], The Cochrane Library [174], КиберЛенинка [42].

Данные о лекарственном растительном сырье получены из Государственной Фармакопеи XIII издания [11], XIV издания [12], Международной Фармакопеи [172], Европейской Фармакопеи [173], Фармакопеи Китайской Народной Республики [157].

Поиск данных о лекарственных растительных препаратах и о биологически активных добавках (БАД) осуществлялся в Государственном реестре лекарственных средств [13], пособие для врачей Машковского [54], Реестре продукции, прошедшей государственную регистрацию в Роспотребнадзоре [77], Едином Электронном Справочнике Биологически Активных Добавок, а также на официальном сайте Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) [131].

Поисковые запросы включали систематические названия объектов исследования и видов лекарственного сырья на различных языках (русском, английском и латинском). В анализируемую выборку включались сведения о распространенности объектов, их систематическом положении, химическом составе и методах качественного и количественного анализа, фармакологических свойствах, токсичности, а также опыта применения в народной и официальной медицине.

1.1. Представители рода Орех перспективные источники биологически активных соединений (БАС)

В настоящее время значительную роль в повышении эффективности терапии заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, играет большой ассортимент и применение антибиотиков [179]. Однако антибиотикотерапия также имеет свои недостатки. Доказано, что частое

применение указанной группы препаратов увеличивает частоту появления резистентных штаммов микроорганизмов [179]. В XXI веке проблема антибиотикорезистентности приобрела особую значимость во всем мире. Резистентность к антибиотикам имеет огромное социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности.

Согласно оценкам международных экспертов [116, 179], антимикробная резистентность является причиной более 700 тысяч смертельных случаев ежегодно, в том числе в Европе - 22 тысячи случаев. По оценке Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), только в США ежегодно резистентными штаммами инфицируются около 2 млн. человек, из которых 23 тыс. умирают [116].

Кроме того, прием антибиотиков может привести к появлению различных побочных эффектов, в том числе аллергических реакций, снижению иммунитета, а также увеличению грибковых поражений в организме [48, 59, 126, 130]. В связи с этим, важной и актуальной проблемой современной фармации является поиск новых типов антибактериальных препаратов.

Решение проблемы антибиотикорезистентности может быть осуществлено при использовании БАС растительного происхождения, в частности, содержащих производные хинона [6, 29, 37, 40, 80, 81, 169, 175].

В растительном мире распространен особый класс производных хинона – нафтохиноны. Около 200 различных производных 1,4-нафтохинона обнаружено в различных органах высших растений [175, 176]. Среди производных нафтохинонов особый интерес представляют производные юглона, содержащиеся в растениях семейства *Juglandaceae*: 1,4-нафтохинон, юглон, 2-метил-1,4-нафтохинон, 2,3-диметилюглон [24, 37, 40].

Кроме того, учитывая, что вышеуказанные виды растительного сырья содержат не только производные нафтохинонов, но и другие БАС, в том числе, полифенольные соединения и ненасыщенные жирные кислоты, которые могут оказывать антиоксидантное и противовоспалительное действие [108, 111, 137,

151, 155, 181].

Перспективным источником нафтохинонов могут быть представители рода Орех (*Juglans* L.) – растения семейства *Juglandaceae*, по литературным данным [28, 49, 53, 82, 86], содержащие юглон, гидроюглон и другие потенциально эффективные БАС. В Самарской области ведутся исследования в области интродукции следующих растительных объектов: *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans mandshurica* Maxim., *Juglans cordiformis* Maxim., *Juglans rupestris* Englm. Это позволяет использовать данное сырье также и в фармакогностических целях [70, 71, 72, 73].

1.2. Ботаническая характеристика видов рода *Juglans*

Согласно литературным данным род *Juglans* L. включает в себя более 20 видов, которые выделены в четыре секции: секция Югланы – *Juglans*, представителями являются орех грецкий *Juglans regia* L., *Juglans sigillata* Dode; секция Риссокарони – *Rhysocaryon*, представителями являются орех южный *Juglans australis* Griseb., орех калифорнийский *Juglans californica* S.Wats., орех Гиндса *Juglans hindsii* Jeps. ex R.E.Sm., орех мелкоплодный *Juglans microcarpa* Berland., орех черный *Juglans nigra* L. и др.; секция Кардиокарони – *Cardiocaryon*, представителями являются орех айлантолистный *Juglans ailantifolia* Carrière, орех маньчжурский *Juglans mandshurica* Maxim. и секция Трахикарioni – *Trachycaryon*, представителем которой является орех серый *Juglans cinerea* L. [38, 104, 158].

Обычным местообитанием многих видов рода Орех являются ущелья и речные долины, широколиственные леса смешанного состава (высота над уровнем моря 1500-1800 м). Представители произрастают одиночно или небольшими группами. Ареал естественного произрастания в теплоумеренных районах Евразии, Северной Америки и в горах Южной Америки (рис. 1) [1, 2, 14, 56, 76, 93, 96, 107, 125, 162].

Основные представители рода *Juglans* L. имеют различия в морфологическом отношении [70, 96].

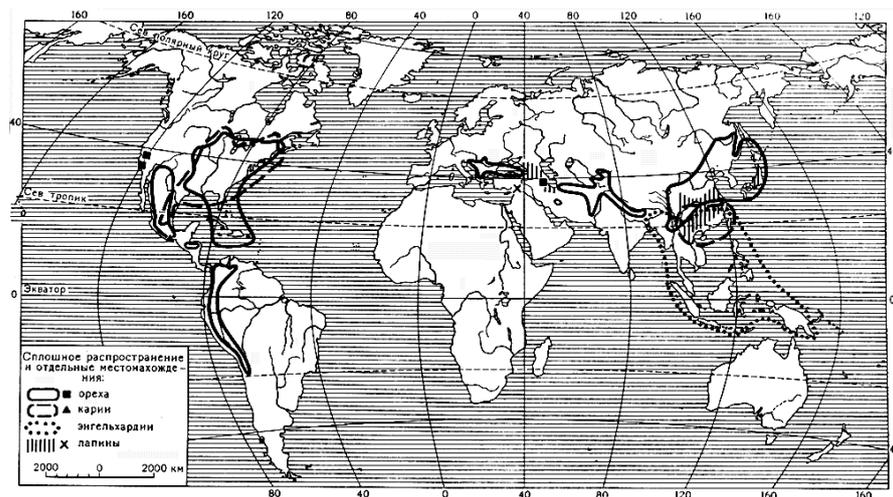


Рисунок 1 – Карта ареалов основных родов семейства Ореховые [95].

Орех грецкий (*Juglans regia* L.) – дерево высотой до 30—35 м и в диаметре до 2 м. Имеет стройный ствол с незначительной кроной, одиночные по длине низкие, достаточно ветвистые с мощной шатровидной кроной. Побеги серо-зеленого, позже пепельного цвета гладкие, но имеют чечевички. Кора серого цвета в местах с глубокими трещинами [76, 78].

Длина листьев – 20-40 см. Сложный лист состоит из 5-11 листочков (длина 5-10 см) яйцевидной или эллиптической формы с цельным краем, расположенных на коротких черешках. Основание листочков в некоторой степени неравнобокое, верхушка их заострённая. Листочки в основном голые, немного опушены в углах жилок с нижней стороны [10, 41, 70, 78, 93]. Плод - ложная костянка. Форма плодов шарообразная, яйцевидная или эллиптическая. Цвет плодов тёмно-зелёный. Диаметр плода от 6 до 8 см. Эндокарпий по структуре круглый или яйцевидный, с 2 гладкими рёбрами и толстой скорлупой [70, 78, 93].

Орех черный (*Juglans nigra* L.) – является древесным представителем, произрастающим в Северной Америке. В высоту и диаметр достигает до 50 м и до 2 м соответственно. Имеет ствол с темно-коричневой корой и глубокими трещинами. Почки голые [93, 103, 107].

Длина листьев 30—60 см. Сложный лист состоит из 13—23 листочков (длина 6—10 см) продолговато-яйцевидной формы. Листочки опушены снизу и расположены на коротких черешках. Плоды по форме шаровидные или грушевидные, не опушены. Диаметр плода до 6,5 см. Ядро ореха съедобное [95,

106, 107].

Орех серый (*Juglans cinerea* L.) – драстение древесной формы жизни родом из Северной Америки высотой до 30 м и диаметром до 1 м. Кора серого цвета с крупными бороздками. Побеги и почки опушены [93, 107].

Длина листьев 50—70 см. Сложный лист состоит из 11—19 листочков со значительной опушенностью. Форма листочков удлинено-яйцевидная. Плод – костянка. По форме плод удлинено-яйцевидный, имеющий острую верхнюю часть. Плод достаточно опушен и клеек. Ядро ореха жирное и съедобное [102, 106, 107].

1.3. Химический состав перспективных видов рода Орех

В России представитель рода *Juglans* L. орех грецкий был включен в I-IV издания отечественной фармакопеи. На данный момент как орех грецкий, так и другие виды вышеуказанного рода, не зарегистрированы в качестве официального РС. Однако их химический состав изучен достаточно хорошо и представлен различными группами БАС [17, 49, 52, 71, 82, 87, 88, 117, 118, 156, 183].

Ведущей группой БАС видов рода Орех являются производные нафтохинонов (юглон и другие), локализующиеся во всех органах растений рода *Juglans* L. [23, 27, 28, 49, 113, 117, 121, 167, 169].

В коре вида *Juglans regia* L. обнаружены нафтохиноны (юглон, региолон), дубильные вещества, алкалоиды (берберин), стероиды (β -ситостерин), тритерпены (бетулин, бетулиновая кислота); в коре ореха серого обнаружены нафтохиноны (юглон), а в коре ореха черного алкалоиды (югландин), нафтохиноны (юглон), тритерпены [6, 28, 76, 128].

Более подробно представлен химический состав листьев представителей рода Орех (табл. 2). В листьях ореха грецкого ведущей группой являются нафтохиноны: юглон, α -гидроюглона глюкозид, α -гидроюглон, β -гидроюглон [3, 6, 16, 28, 71, 75, 87, 121, 167].

Довольно широко представлена группа флавоноидов, в частности, кверцетин, авикулярин (кверцетин 3-арабинозид), гиперозид (кверцетин 3-

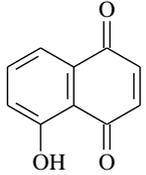
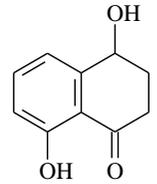
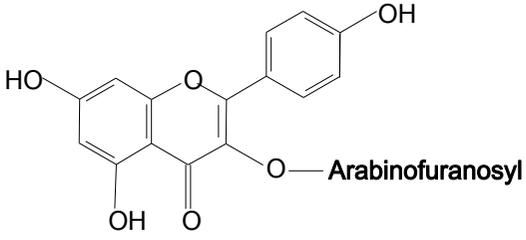
галактозид), кверцитрин (кверцетин 3-рамнозид), кемпферол, юглантин (кемпферол 3-арабинозид), антоцианы (производные цианидина), а также группа фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот: галловая, эллаговая, салициловая, *n*-гидроксibenзойная, ванилиновая, гентизиновая, протокатеховая, хлорогеновая, кофейная, *n*-кумаровая, *n*-гидроксифенилмолочная, феруловая, синаповая [28, 134, 143, 153].

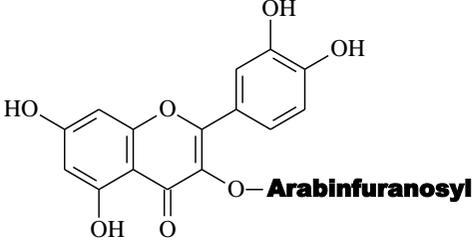
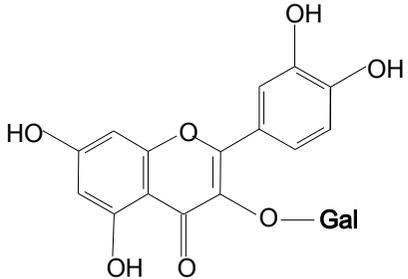
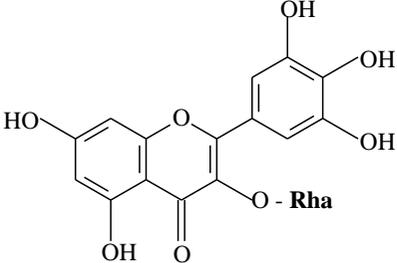
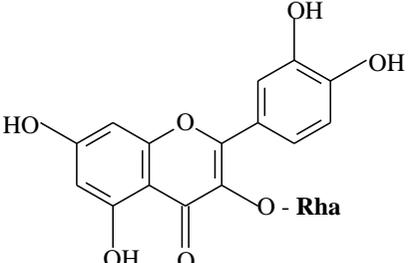
Кроме того, в составе листьев *Juglans regia* L. обнаружены компоненты эфирного масла монотерпеновой и сесквитерпеновой природы: борнилацетат, гумулен, лонгифолен, камфен, γ -кадинен, δ -кадинен, капроновый альдегид, Δ_3 -карен, кариофиллен, α -пинен, β -пинен, α -терпинеол, α -фелландрен, хамазулен [17, 28, 44, 112, 163].

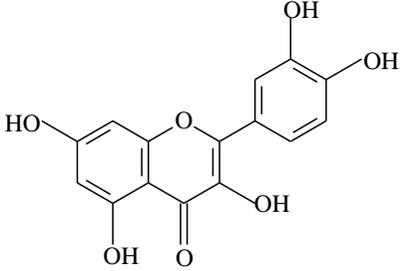
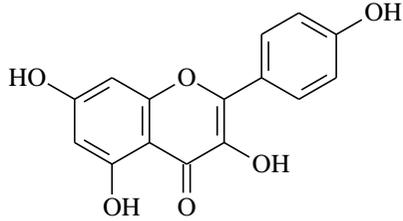
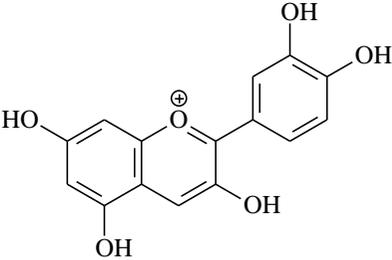
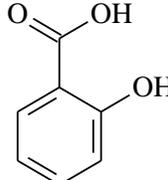
В качестве сопутствующих веществ в листьях ореха грецкого обнаружены сапонины, дубильные вещества, кумарины, алкалоиды (юглантин), аминокислоты (аспарагиновая кислота, аланин, аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серина, тирозин, треонин, триптофан, цистин, фенилаланин), витамины (аскорбиновая кислота, биотин, инозит, β -каротин, ксантины (виолаксантин, криптоксантин, неоксантин, флавоксантин), лютеин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота), макро- и микроэлементы, органические кислоты, полисахариды [28, 75, 120].

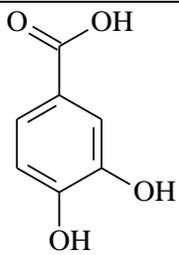
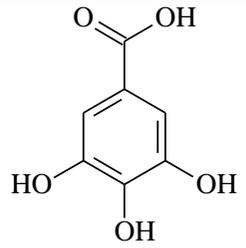
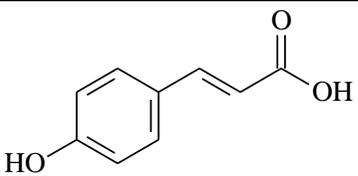
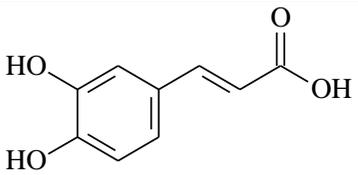
Листья ореха черного содержат нафтохиноны (юглон), флавоноиды (кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид), кверцетин 3-О-альфа-D-рамнофуранозид, астрагалин (кемпферол-3-глюкозид), мирицитрин (мирицетин-3-рамнозид), эфирное масло монотерпеновой природы (гермакрен D, β -кариофиллен, α -пинен), алкалоиды (юглантин), витамины (аскорбиновая кислота, каротиноиды, никотиновая кислота, тиамин, пиридоксин, токоферолы), дубильные вещества, органические кислоты, макро- и микроэлементы. Состав листьев ореха серого, по данным литературы, изучен недостаточно [28, 75, 119].

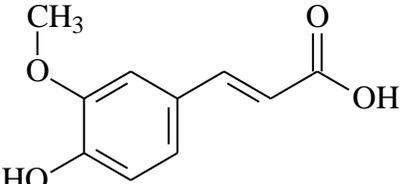
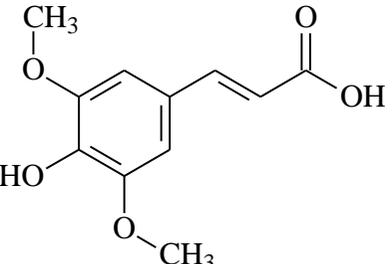
Таблица 1 - Важнейшие фенольные соединения, описанные для листьев видов рода *Juglans* L.

№ п/п	Биологически активные соединения	Основные физико-химические свойства	Растительный источник	Литературный источник
1. Нафтохиноны				
1.	 <p>Юглон</p>	Кристаллическое вещество оранжевого цвета. М.г. 174,15 г/моль. Т. пл. 150-155 ⁰ С. Растворим в гексане, не растворим в бензоле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 250, 320, 420.	<i>J. regia</i> L. <i>J. nigra</i> L. <i>J. cinerea</i> L.	22, 28, 49, 71, 156, 170
2.	 <p>α-Гидроюглон</p>	Кристаллическое вещество оранжевого цвета. М.г. 158,15 г/моль. Т. пл. 143-150 ⁰ С. Растворим в гексане, не растворим в бензоле.	<i>J. regia</i> L.	28, 49, 161
2. Флавоноиды				
2.1. Флавонолы				
3.	 <p>Югланин</p>	Желтое кристаллическое вещество. М.г. 418,35 г/моль. Т. пл. 143-150 ⁰ С. Мало растворим в воде, растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 268, 352.	<i>J. regia</i> L.	75, 121, 150, 155

4.	 <p style="text-align: center;">Авикулярин</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 434,35 г/моль. Т. пл. 240-243⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле.</p>	<p><i>J. regia</i> L.</p>	<p>88, 121, 150</p>
5.	 <p style="text-align: center;">Гиперозид</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 464.38 г/моль. Т. пл. 231-233⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 258, 363.</p>	<p><i>J. regia</i> L. <i>J. cinerea</i> L.</p>	<p>88, 121, 150, 183</p>
6.	 <p style="text-align: center;">Мирицитрин</p>	<p>Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество. М.г. 464.37 г/моль. Т. пл. 203-205⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 212, 260, 358.</p>	<p><i>J. nigra</i> L.</p>	<p>88, 121</p>
7.	 <p style="text-align: center;">Кверцитрин</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 448.38 г/моль. Т. пл. 187-189⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 257, 361.</p>	<p><i>J. regia</i> L. <i>J. nigra</i> L.</p>	<p>88, 121, 155, 183</p>

8.	 <p>Кверцетин</p>	Желтое кристаллическое вещество. М.г. 302.236 г/моль. Т. пл. 316-318 ⁰ С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 258, 374.	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 150, 183
9.	 <p>Кемпферол</p>	Желтое кристаллическое вещество. М.г. 286,23 г/моль. Т. пл. 276–278 ⁰ С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 265, 365.	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 183
2.2. Антоцианидины				
10.	 <p>Цианидин</p>	Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 287,24 г/моль. Т. пл. 300 -305 ⁰ С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле.	<i>J. regia</i> L.	88, 121
3. Фенолкарбоновые кислоты				
11.	 <p>Салициловая кислота</p>	Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 138,12 г/моль. Т. пл. 158 ⁰ С. Легко растворим в этаноле, диэтиловом эфире, плохо растворим в воде. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 210, 234, 303	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 150

12.	 <p>Протокатеховая кислота</p>	Белое кристаллическое вещество. М.г. 154,12 г/моль. Т. пл. 221 ⁰ С. Практически не растворим в воде, растворим в спирте и эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 240, 294 .	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 150
13.	 <p>Галловая кислота</p>	Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 170.12 г/моль. Т. пл. 260 ⁰ С. Растворим в кипящей воде, спирте, трудно растворим в холодной воде. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 275, 305.	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 150
4. Фенилпропаноидные метаболиты Производные коричной кислоты				
14.	 <p><i>p</i>-Кумаровая кислота</p>	Белое кристаллическое вещество. М.г. 164,16 г/моль. Т. пл. 207-209 ⁰ С. Трудно растворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 227, 295, 309.	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 134, 150
15.	 <p>Кофейная кислота</p>	Желтое кристаллическое вещество. М.г. 180.16 г/моль. Т. пл. 218-222 ⁰ С. Трудно растворим в воде. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 247, 299, 327.	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 134, 150

16.	 <p>Феруловая кислота</p>	<p>Белые или светло-бежевые кристаллы. М.г. 194.19 г/моль. Т. пл. 168-170⁰С. Растворим в горячей воде, этаноле, трудно растворима в эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 242, 292, 324.</p>	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 134, 150
17.	 <p>Синаповая кислота</p>	<p>Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 224.21 г/моль. Т. пл. 203-205⁰С. Растворим в горячей воде, этаноле, трудно растворима в эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 235, 260, 300.</p>	<i>J. regia</i> L.	88, 121, 134, 150

Химический состав плодов ореха грецкого представлен нафтохинонами (α -гидроюглон, β -гидроюглон, 1,4-нафтохинон, юглон, 5-глюкозид гидроюглона, менадион, плюмбагин, 2,3-дигидро-5-гидрокси-1,4-нафтохинон, 2,3-дигидро-5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохинон, 5-гидрокси-3-метил-1,4-нафтохинон, 2,3-диметлил-5-гидрокси-1,4-нафтохинон), фенолкарбоновыми кислотами (ванилиновая, галловая, гентизиновая, *n*-гидроксibenзойная, *n*-гидроксифенилмолочная, протокатеховая, салициловая, хлорогеновая, эллаговая), фенилпропаноидными метаболитами (*n*-кумаровая, синаповая, сиреневая, феруловая), флавоноидами (катехины, проантоцианидины), дубильными веществами, компонентами жирного масла, стероидами (β -ситостерин или β -ситостерол и его глюкозид – даукостерин), белками, органическими кислотами, полисахаридами, витаминами (аскорбиновая кислота, β -каротин, никотиновая кислота, тиамин, рибофлавин), макро- и микроэлементы. Химический состав плодов ореха черного и ореха серого также изучен недостаточно [3, 5, 8, 28, 32, 52, 58, 87, 88, 153, 164].

Таким образом, на сегодняшний день достаточно глубоко исследован химический состав листьев и плодов ореха грецкого. Степень фитохимической разработанности других представителей рода *Juglans* (кора и листья *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L.) является недостаточной для использования в качестве новых видов лекарственного растительного сырья. Требуется дальнейшее фитохимическое исследование различных видов растительного сырья представителей рода Орех.

1.4. Фармакологические свойства и применение в медицине представителей рода Орех

Разнообразие химического состава, в том числе наличие большого числа фенольных соединений обуславливают широкий спектр фармакологической активности представителей рода Орех (ореха грецкого, ореха черного и ореха серого). В работах по изучению фармакологической активности указанных выше видов можно выделить следующие направления: исследование противомикробного, противовирусного, противогрибкового, антиоксидантного,

противовоспалительного, противоопухолевого, кардио-, нейро-, гепатопротективного, гиполипидемического, влияющего на когнитивную функцию эффектов [23, 130]. Рассмотрим некоторые из них далее.

Водные экстракты незрелого жома плодов *J. regia* подавляют рост грамположительных бактерий, при этом золотистый стафилококк был наиболее восприимчивой бактерией с минимальной ингибирующей концентрацией (MIC) 0,1 мг / мл [151].

Юглон, выделенный из ореха грецкого, ингибирует 3 ключевых фермента бактерии *Helicobacter pylori*: цистатион- γ -синтазу (HpCGS), малонилCoA: трансацилазу белка-переносчика ацила (HpFabD) и β -гидроксиацилACP-дегидратазу (HpFabZ) [141].

Гексановый экстракт коры *J. regia* проявляет *in vitro* противомикобактериальную туберкулезную активность с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) 100 мкг/мл [122].

Также была обнаружена антимикробная активность экстракта листьев *J. regia* в отношении пропионовой бактерии акне (*Propionibacterium acnes*), золотистого стафилококка (*S. aureus*) и эпидермального стафилококка (*S. epidermidis*) [161].

Эфирное масло, полученное из листьев *J. regia*, и его основные компоненты (β -пинен, α -пинен, лимонен, кариофиллен) проявляли сильную антибактериальную активность в отношении *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. [155, 159].

Водные и этанольные экстракты листьев *J. regia* оценивали также и на противовоспалительную активность. При каррагинан-индуцированном отеке задней лапы у мышей только этанольный экстракт *J. regia* проявлял противовоспалительную активность, не вызывая при этом желудочных-кишечных расстройств [129].

Клетки микроглии типа BV-2, обработанные экстрактом *J. regia* перед стимуляцией LPS, показали снижение продукции оксида азота (NO) и экспрессии

индуцибельной NO-синтетазы. Также экстракт *J. regia* снижал выработку фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α). Таким образом, сырье грецкого ореха оказывает противовоспалительное действие в микроглии, что может быть актуальным в плане профилактики и лечения нейродегенераций [183].

Водный (2,87 и 1,64 г/кг) и этанольный (2,044 и 1,17 г/кг) экстракты *J. regia* показали антиноцицептивную активность в тестах горячей пластинки; антиноцицептивный эффект, как полагают, действует через рецепторы неопиоидного типа. Также проводили испытания этих экстрактов на противовоспалительную активность, что было показано в тесте на ксилол [137].

Эфирное масло из листьев *J. regia* анализировали на его антиоксидантную активность с использованием 2 различных анализов «*in vitro*»: поглощение 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) и гидроксильного радикала. Результаты показали высокую антиоксидантную активность при значениях 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) 34,5 и 56,4 мкг / мл соответственно [155].

На модели окислительного стресса у крыс «*in vivo*», введение экстракта листьев грецкого ореха в дозах от 0,2 до 0,4 г / кг массы тела в течение 4 недель способствовало защите животных от повреждений печени, вызванных четыреххлористым углеродом (CCl₄). Кроме того, в экстракте грецкого ореха выявлено повышенное содержание антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы [127].

Основные флавоноиды, такие как кверцетин-3-рамнозид, кверцетин-3-О-арабинозид, кверцетин-3-ксилозид, производное кемпферол-О-пентозида, кверцетин-3-О-галактозид и кемпферол-О-пентозид, выделенные из листьев *J. regia*, показали значительную радикал-поглощающую активность при снижении уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках RAW264.7. Флавоноиды проявляют потенциальную антиоксидантную активность и могут быть использованы для регулирования иммунной системы и усиления противоопухолевой активности [183].

Юглон, полученный из хлороформного экстракта корней *J. regia*, и его синтетические триазолильные аналоги показали цитотоксическую активность

против различных видов раковых клеток человека, находящихся в легких (NCI-H322 и A549), молочных железах (T47D), коже (A-431), толстой кишке (Colo-205 и HCT-116) и простате (PC-3 и DU-145). Синтетические производные триазолила обладают высоким уровнем цитотоксичности, но этот эффект достаточно специфичен именно для раковых клеток легких. Некоторые аналоги даже продемонстрировали более высокую активность против видов раковых клеток NCI-H322 и A549, чем выпускаемый противораковый препарат BEZ235 (двойной ингибитор фосфоинозитид-3-киназы и mTOR) [182].

Аналогичным образом, применение жома незрелых плодов грецкого ореха и экстракта из корня *J. regia* способствовало индукции апоптоза в раковых клетках молочных желез человека MDA-ME231 и в раковых клетках предстательной железы PC-3 путем повышения экспрессии каспазы 3, каспазы 8 и гена Вах и подавления экспрессии гена Bcl-2 [110, 135].

Кроме вышеуказанных видов фармакологической активности, для *Juglans regia* выявлены также гепатопротекторные свойства [166]. Проводилось исследование, в котором мышам давали с пищей экзокарпий плодов грецкого ореха (WP, 200 мг/кг), представляющий собой тонкую кожицу вокруг ядра ореха. При этом оказалось, что при его употреблении значительно уменьшаются уровни сывороточной аспаратаминотрансферазы (AST) и аланинаминотрансферазы (ALT) в печени, поврежденной четыреххлористым углеродом, однако не оказывает такого же эффекта при повреждении печени D-галактозамином (GalN). Такие компоненты, как теллимаграндины I, II и ругозин С, снижали повреждающую активность тетрахлорметана на гепатоциты, тогда как теллимаграндин I и 2,3-О-гексагидроксидифеноилглюкоза уменьшали повреждение, вызванное D-GalN [166].

Экстракт листьев грецкого ореха (в диапазоне от 0,2 до 0,4 г / кг массы тела) проявил защитную активность в отношении крыс с поврежденной тетрахлорметаном печенью за счет снижения сывороточных уровней ALT, AST и щелочной фосфатазы [127]. Юглон, выделяемый из грецких орехов, защищает печень от HFD-индуцированного повреждения (повреждение, вызываемое диетой

с высоким содержанием жиров) у крыс. Данный эффект осуществляется путем торможения активности воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL6, посредством подавления toll-подобного рецептора и активации действия NF- κ B [153].

Кроме того, согласно литературным данным сообщалось о раздражении и гиперпигментации кожи, связанных с местным применением грецкого ореха. Хотя и сообщается, что у морских свинок грецкий орех является сильным сенсибилизатором, у людей контактная аллергия встречается достаточно редко [136].

У мышей полумаксимальная летальная доза (LD50) при внутрибрюшинном введении водного и этанольного экстракта листа *J. regia* составляла 5,5 и 3,3 г/кг соответственно [137].

Согласно исследованиям Calabro и соавторов [115], юглон индуцировал эриптоз (суицидальную гибель эритроцита), увеличивая содержание церамида и снижая уровень энергии и блокируя активацию протеинкиназы C (PKC). В этом исследовании происходило значительное снижение прямого рассеяния эритроцитов в течение 24 ч при обработке эритроцитов человека юглоном в дозе 5 мкмоль/л. Кроме того, юглон в дозах от 1 до 5 мкмоль/л значительно повышал процент связывания аннексина V. Аналогично, в дозе 5 мкмоль/л юглон значительно уменьшал концентрацию АТФ в эритроцитах, а также увеличивал содержание церамида на поверхности эритроцитов [115].

Несмотря на широкий спектр фармакологической активности, виды рода Орех используются в официальной медицине небольшого количества стран. В основном указанные растения используются в народной медицине. В традиционной медицине Китайской Народной Республики листья ореха грецкого применяются в качестве средства, обладающего противовоспалительной, противомикробной, вяжущей, противовирусной, гипосенсибилизирующей и тонизирующей активностями [45, 105]. Сырье ореха серого в народной медицине Канады применяется как антимикробное средство [130].

На данный момент на территории РФ зарегистрированы 2 лекарственных

растительных препаратов, растительное сырье ореха грецкого – «Тонзилгон Н» и «Югланэкс» [13, 54]. Немецкий препарат «Тонзилгон Н» представляет собой водно-спиртовой экстракт корней алтея, цветков ромашки, травы хвоща, листьев грецкого ореха, травы тысячелистника, коры дуба, а также травы одуванчика лекарственного, и применяется в качестве антисептического, противовоспалительного средства для терапии острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей (тонзиллит, фарингит, ларингит), а также профилактики осложнений при респираторных вирусных инфекциях [13, 54]. «Югланэкс» выпускается в форме жидкого экстракта плодов грецкого ореха для приема внутрь [13, 54]. Обладает капилляроукрепляющим, вентонизирующим, антиоксидантным, противовоспалительным эффектом и применяется в составе комплексной терапии хронических заболеваний вен [13, 54].

Из растительного сырья *Juglans regia* L. экспериментально разработаны экстракты «Чеблин», «Чеблин СК-1», а также «Тодикамп», обладающие антипаразитарной, гепатопротекторной и иммуномодулирующей активностью и применяющиеся при терапии сифачиоза, энтеробиоза, аскаридоза и гетеракидоза [60, 92].

На базе Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета совместно с лабораторией ЗАО «ВИФИТЕХ» были разработаны жидкий и сухой экстракты, а также таблетки с порошком листьев *Juglans regia* L. [28].

Растительное сырье рода *Juglans* L. активно применяется в гомеопатии, в связи с известным иммуномодулирующим, противогрибковым, антимикробным, антипаразитарным, антиоксидантным и общеукрепляющим действием данных растений [33]. Используют гомеопатические суппозитории на основе масляного экстракта околоплодника ореха черного [69]. В Республике Молдова производят фитопрепарат «Nucina», в состав которого включены листья *Juglans regia* L.. Указанный препарат оказывает антибактериальное и противогрибковое действие при поражениях полости рта, глотки, дыхательных путей [132].

БАД Е.П. Корненой, содержащий порошок из листьев ореха грецкого,

обладает превентивными свойствами при йодной недостаточности, а также гепатопротекторной, гиполипидемической, гипохолестеринемической, гипогликемической, антиоксидантной, антитоксической активностью [62, 63, 64, 65, 66, 67, 68].

1.5. Вопросы стандартизации растительного сырья и препаратов представителей рода Орех

Представители рода Орех (*Juglans* L.) не имеют фармакопейного статуса не только на территории нашей страны, но и в других странах. Единственное исключение составляет Китайская Народная Республика, в Государственную Фармакопею которой включена фармакопейная статья на плоды ореха грецкого [157].

По литературным данным, проблема стандартизации растительного сырья, содержащего фенольные соединения, в том числе нафтохиноны, связана, прежде всего, с отсутствием унифицированных подходов к их анализу, отсутствием в ряде случаев стандартных образцов, отработанных методик качественного и количественного анализа, а также статистических данных [28, 79].

Сотрудниками Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета был предложен подход к стандартизации РС рода Орех, который заключался в использовании в качестве анализируемой группы БАС нафтохинонов (в частности, юглона) [28].

Для определения подлинности сырья рода Орех проводился анализ извлечений из растительного сырья с помощью качественных реакций и тонкослойной хроматографии (ТСХ) с детекцией парами аммиака. При этом анализ проводился в элюентных системах петролейный эфир – диэтиловый эфир 10:3,5, петролейный эфир – диэтиловый эфир – муравьиная кислота 7: 3:0,2 и бензол – петролейный эфир 1:1 с использованием в качестве внутреннего видетеля стандартного образца юглона. Предполагаемую хроматографическую зону адсорбции юглона идентифицировали в виде зоны адсорбции жёлтого цвета, меняющей окраску на фиолетовую при обработке парами аммиака,

соответствующей зоне адсорбции СО юглона [22, 25, 27, 28].

Для количественной оценки доброкачественности растительного сырья видов рода Орех применяли разработанную методику анализа суммы нафтохинонов в пересчёте на юглон с использованием фотоколориметра. Извлечение получали методом двухкратной экстракции спиртом этиловым 20 % с последующим упариванием, и трехкратной экстракцией диэтиловым эфиром. При этом определено, что содержание нафтохинонов в коре ореха черного, листьях ореха черного, ореха грецкого и ореха серого достигает $0,11 \pm 0,005$, $0,24\% \pm 0,009$, $0,083 \pm 0,002$, $0,032 \pm 0,001$ в пересчете на юглон соответственно [22, 25, 27, 28].

Также для определения подлинности основных групп БАС видов рода Орех используют:

- химические методы определения подлинности – пробирочные реакции соединений, содержащих фенольную гидроксильную группу, со щелочами. Аналитический эффект реакции – образование окрашенных фенолятов (в водном и спиртовом растворах оранжевого и фиолетового цвета соответственно – юглон) [176]. Юглон в водных растворах щелочей и солей разрушается, устойчив в кислых условиях [176]. Кроме того, химические методы определения подлинности используются и для идентификации полифенолов [3].

- физико-химические методы определения подлинности нафтохинонов [32, 100, 126, 147] и полифенольных соединений [117, 148, 150, 180] – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра, спектроскопия в инфракрасной области спектра, газовая хроматография с масс-селективным детектированием (ГХ-МС), ВЭЖХ, высокоэффективная жидкостная хроматография с квадрупольным масс-спектрометрическим детектированием посредством фрагментации (ВЭЖХ-МС-МС), сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с квадрупольной время-пролетной масс-спектрометрией (СВЭЖХ–МС/МС/ВП).

Для количественного анализа нафтохинонов (юглона, гидроюглона и гликозида юглона) в растительном сырье и препаратах применяют:

- спектрофотометрию в листьях [37, 123], плодах [123] и коре ореха

грецкого [140];

- фотоэлектроколориметрию различных видов растительного сырья рода Орех [19, 25, 27, 28];

- метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа листьев [32, 134], и плодов ореха грецкого [117];

- метод ГХ-МС для анализа листьев ореха грецкого [147].

Кроме того, в качестве анализируемой группы БАС для методик количественного определения выступали полифенолы: фенолпропаноиды, флавоноиды и дубильные вещества, а также терпеноиды. Анализ их осуществлялся методами спектрофотометрии [36], ВЭЖХ [134, 150, 160], жидкостной хроматографией - масс спектрометрией с ионной ловушкой [161], ГХ-МС [183], сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс спектрометрией через орбитальную ионную ловушку (СВЭЖХ-МС/ОИЛ) [143], СВЭЖХ с гибридной квадрупольной масс-спектрометрией высокого разрешения через орбитальную ионную ловушку [171].

Принимая во внимание достаточную трудоемкость в ходе проведения пробоподготовки, сложность проведения анализа для нафтохинонов в качестве целевой группы БАС, использование дорогостоящих методов анализа, а также недостаточность литературных данных относительно стандартизации растительного сырья видов рода Орех, актуальным является продолжение исследований в этом направлении, в том числе на основе углубленного изучения состава БАС растительного сырья представителей рода *Juglans* L.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ I

1. Растительное сырье представителей рода Орех (*Juglans* L.) является перспективным для использования в медицинской и фармацевтической практике.

2. Ведущей группой БАС сырья видов рода Орех являются нафтохиноны, представленные производными юглона. Юглон в качестве целевого агента содержится во всех видах растительного сырья представителей вышеуказанного рода. Химический состав также отмечается второй группой соединений – флавоноиды (югланин, авикулярин, гиперозид, кверцетин, кемпферол. В сырье содержатся сопутствующие компоненты: фенолкарбоновые кислоты, фенилпропаноиды, дубильные вещества, витамины и эфирное масло.

3. Широкий состав биологически активных соединений видов растительного сырья рода *Juglans* L. обуславливает разнообразие его фармакологических свойств. Анализ работ отечественных и зарубежных ученых позволил выявить антимикробное, противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое, гепатопротекторное действие ореха грецкого, ореха черного и ореха серого, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения видов вышеуказанного рода.

4. В результате анализа литературных источников относительно вопросов стандартизации, выявлена противоречивость в подходах к контролю качества растительного сырья представителей рода Орех. Указанное обстоятельство свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования химического состава сырья и разработки унифицированных методов стандартизации сырья видов рода Орех.

5. Отсутствие данных относительно нормативной документации в области контроля качества указанных видов сырья ограничивает его применение в фармацевтической и медицинской практике. В этой связи актуально проведение комплексных фармакогностических исследований, направленных на создание проектов фармакопейной статьи для новых видов растительного сырья.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы образцы растительного сырья: ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.). Время сбора с 2019 по 2021 гг. Заготовка сырья осуществлялась в период с марта по сентябрь на соответствующих участках Самарской и Ростовской областей, Республики Адыгея, Республики Абхазия. Данные по образца РС представлены в таблице 2:

Таблица 2 – Исследуемые виды растительного сырья

Вид	РС	Время сбора	Место сбора
Орех грецкий (<i>Juglans regia</i> L.)	кора	март 2019 г.	Ботанический сад Самарского университета (г. Самара)
	листья	май - сентябрь 2019- 2021 гг.	Ботанический сад Самарского университета (г. Самара)
		июль 2020 г.	Ростовская область
		август 2020 г.	Республика Адыгея
	Околоплодники	август- сентябрь 2019 г.	Ботанический сад Самарского университета (г. Самара)
Орех серый (<i>Juglans regia</i> L.)	кора	март 2019 г.	Ботанический сад Самарского университета (г. Самара)
	листья	май - сентябрь 2019- 2021 гг.	Ботанический сад Самарского университета (г. Самара)
		август 2021 г.	Республика Абхазия
	Околоплодники	август- сентябрь 2019 г.	Ботанический сад Самарского государственного университета (г. Самара)
Орех черный (<i>Juglans nigra</i> L.)	кора	март 2019 - 2020 гг.	Ботанический сад Самарского государственного университета (г. Самара)
	листья	май - сентябрь 2019- 2021 гг.	Ботанический сад Самарского государственного университета

			(г. Самара)
		июль 2020 г.	Ростовская область
		август 2020 г.	Республика Адыгея
		август 2021 г.	Республика Абхазия
	Околоплодники	август- сентябрь 2019 г.	Ботанический сад Самарского государственного университета (г. Самара)

Сушка образцов растительного сырья проводилась естественным воздушно-теневым способом. Высушенное РС хранилось в бумажных пакетах в соответствии с требованиями ГФ XIII, ГФ XIV изданий [11, 12].

Отбор проб для анализа проводили согласно требованиям ГФ XIII и ГФ XIV [11, 12].

Исследованы растительные препараты и индивидуальные соединения, представленные ниже.

1. Настойка коры и листьев ореха черного 1:5 (70 % этиловый спирт);

2. Индивидуальные вещества:

- гиперозид (CAS 482-36-0, ≥ 95 %, MERK);
- кверцитрин (CAS 522-12-3, ≥ 98 %, MERK);
- кверцетин (CAS 6151-25-3, ≥ 95 %, MERK);
- мирицитрин (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).

2.2. Оборудование и материалы, используемые для исследования

Оборудование, использованное в исследовании:

- весы аптечные для сыпучих материалов ВСМ трех модификаций: ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ± 5 , ± 10 и ± 20 соответственно (ЗАО «НТМИЗ», Россия);

- весы аналитические «Mettler Toledo XS 204» с дискретностью 0,0001 г.

(«Mettler Toledo», Швейцария);

- шкафы сушильные: электрический круглый 2В-151 (Одесский экспериментальный завод лабораторной медицинской техники, СССР) и ШС80-01МК СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия);

Материалы, использованные в исследовании:

- пластины для тонкослойной хроматографии марки «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия);

- лабораторная посуда, в том числе бюксы (стаканчики для взвешивания) по ГОСТ 25336-82 (ПАО «Химлабоприбор», Россия; ООО «МиниМед», Россия и др.);

- фильтры обеззоленные «Красная лента» по ТУ 6-09-1678-95 (АО «Экос-1», Россия);

- сита лабораторные с диаметром отверстий 0,2 мм; 0,5 мм; 1 мм; 2 мм; 3 мм; 5 мм (ООО «Новолаб», Россия);

- реактивы отечественных и зарубежных производителей различной квалификации:

- полиамид For Column Chromatography (CAS 63428-83-1, Sigma-Aldrich, MERK),

- силикагель КСК L 40/100 мкм и L 100/250 мкм по ТУ 6-09-39-23-86 (ООО «ИМИД»),

- сефадекс LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden)

- ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии по ТУ СОМР 3-074-06 (ООО «Компонент-Реактив», Россия),

- гексан химически чистый по СТП ТУ КОМП 2-557-13 (ООО «Компонент-Реактив», Россия);

- трихлорметан химически чистый по ТУ СОМР 2-028-06 (ООО «Компонент-Реактив», Россия),

- ацетон химически чистый по ТУ 2633-018-44493179-98 (АО «Экос-1», Россия),

- бутанол-1 химически чистый по ТУ 2632-021-44493179-98 (АО «Экос-1»,

Россия),

- кислота уксусная химически чистая по ГОСТ 61-75 (АО «Экос-1»,

Россия),

- кислота уксусная ледяная химически чистая по ГОСТ 61-75 (АО «Экос-1»,

Россия),

- серная кислота химически чистая по ГОСТ 4204-77 (ООО «База № 1 Химреативов),

- хлористоводородная кислота химически чистая по ГОСТ 3118-77 (ООО «База № 1 Химреативов).

Програмное обеспечение, использованное в исследовании:

- Офисный пакет Microsoft Office 2010,
- Adobe Photoshop CC 2019,
- ChemWindow® 6.0,
- PASS Online (<http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/index.php>).

2.3. Методы исследования

2.3.1. Морфолого-анатомические методы анализа

В данном диссертационном исследовании проводилось изучение высушенных видов растительного сырья коры, листьев ореха черного, ореха грецкого и ореха серого. Согласно требованиям общей фармакопейной статьи (ОФС) *ОФС.1.5.3.0003.15* ГФ РФ XIV издания осуществлялась пробоподготовка микропрепаратов и проведение гистохимических реакций для целей морфолого-анатомического анализа [12].

В соответствии с указаниями ОФС *ОФС.1.5.1.0003.15* «Листья» и *ОФС.1.5.1.0005.15* «Кора» ГФ РФ XIV издания в целях морфолого-анатомического исследования фиксацию свежесобранного сырья осуществляли при использовании систему состава глицерин очищенный-этанол-вода очищенная (1:1:1) [12]. Образцы лекарственного растительного сырья изучали визуально и с использованием лупы с увеличением $\times 10$. Органолептическая оценка указанных видов сырья проводилась по следующим параметрам: размеры, цвет, запах и вкус исследуемых объектов.

Изучение гистологических и морфологических признаков анализируемых видов рода *Juglans* проводили в проходящем свете на белом поле при помощи цифровых микроскопов «Motic» DM-111 и DM-39C-N9GO-A. Исследование методом люминесцентной микроскопии осуществляли на микроскопе марки «Альтами» ЛЮМ-2 с использованием голубого (диапазон возбуждения 420-550 нм) и желтого светофильтров (диапазон возбуждения 330-400 нм). В качестве источника света использовалась высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт).

2.3.2. Химические методы анализа

Для проведения процедуры идентификации ведущих групп БАС в РС видов рода Орех были предложены реакции идентификации для предварительного фитохимического анализа различных органов растений рода *Juglans* L. [47, 49]:

- Цианидиновая реакция (проба Shinoda);
- Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту;
- Реакция с раствором алюминия (III) хлорида;
- Реакция с щелочным раствором diazobenzolsulfonic кислоты (ДСК);
- Реакция с раствором железа (III) хлорида;
- Реакция Вильсона (борно-лимонная реакция).

2.3.3. Физико-химические методы анализа

Спектральный анализ. ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия [11, 12]

В целях установления спектральных характеристик выделенных индивидуальных соединений использовались следующие методы: протонная спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H -спектроскопии), спектроскопия ядерного магнитного резонанса ядер ^{13}C (ЯМР ^{13}C -спектроскопии), а также масс-спектрометрия. ЯМР ^1H -спектры и ^{13}C -спектры зарегистрированы с помощью 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 низкого разрешения EI-MS и ESI-MS были получены на секторном масс-спектрометре с двойной фокусировкой «Kratos MS-30» в режиме

электронного удара и источником ионов с энергией ионизации в 70 эВ [12].

Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) ионах. Диапазон сканирования масс — m/z 50 — 3000. Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в метаноле, скорость потока — 3 мкл/мин. Газ-распылитель — азот (4 л/мин), температура интерфейса — 180 °С [12].

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях электромагнитного спектра [12, 49, 50]

Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях электромагнитного спектра использовался для исследования спектральных характеристик выделенных индивидуальных соединений, а также для определения доброкачественности образцов водно-спиртовых извлечений и препаратов, изготовленных из сырья видов рода *Juglans* L.

Методика получения испытуемого раствора извлечения. Около 1,0 г измельченной аналитической пробы растительного сырья (коры, листьев, плодов) *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L. помещали в термостойкую коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70% концентрации, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Затем колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане (при умеренном кипении) в течение 1 ч. После охлаждения в течение 30 мин полученного извлечения, колбу закрывали той же пробкой, взвешивали и содержимое при необходимости восполняли экстрагентом до первоначального значения. Содержимое колбы фильтровали через бумажный фильтр во флакон из светозащитного стекла (раствор А испытуемого извлечения). Испытуемый раствор: 1,0 мл раствора А испытуемого извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ и доводили до метки спиртом 96 % (раствор Б испытуемого извлечения). Оптическую плотность раствора Б испытуемого извлечения измеряли на спектрофотометре через 40 мин после приготовления. В

качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А извлечения (1:30), доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Методика получения испытуемого раствора настойки. 1,0 мл настойки (коры или листьев *Juglans nigra* L.) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70 % концентрации (раствор А испытуемого образца). 2,0 мл раствора А испытуемого образца настойки помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ и до метки спиртом 96 % (раствор Б испытуемого образца). Оптическую плотность раствора Б испытуемого извлечения измеряли на спектрофотометре через 40 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,0 мл раствора А испытуемого образца настойки, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Анализ проводили на следующей приборной базе: спектрофотометрах марки «Specord 40» (Analytik Jena) и марки «СФ-2000» (ОКБ Спектр) в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм и диапазоне длин волн от 190 до 600 нм.

Анализ осуществляли в двух вариантах: прямой и дифференциальной спектрофотометрии. Метод дифференциальной спектрофотометрии заключается в измерении оптической плотности анализируемого раствора после его взаимодействия с 3 % спиртовым раствором $AlCl_3$ по отношению к раствору сравнения, являющимся анализируемым раствором без добавления комплексообразователя. Измерение оптической плотности анализируемого раствора в условиях прямой спектрофотометрии проводили по отношению к раствору сравнения – спирт этиловый 96 % концентрации.

Обработку результатов спектрофотометрического определения проводили с помощью программных пакетов производителей «WinASPECT» версии 2.1.1.0 и «Сканирование для СФ-2000» версии 4.06.

Хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ) [12, 49, 50]

В целях сравнительного фитохимического исследования испытуемых растворов спирто-водных извлечений из коры, листьев и околоплодников видов рода Орех, а также идентификации выделенных индивидуальных соединений использовали метод тонкослойной хроматографии. Для анализа применялись хроматографические пластины «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ. Активацию хроматографических пластин осуществляли перед анализом в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 60 минут.

В работе применялись элюентные системы:

- хлороформ – этанол 96% - вода (25:18:2);
- хлороформ – этанол 96% (4:1);
- *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2).

Перед началом исследования стенки хроматографической камеры предварительно выстилали фильтровальной бумагой. Хроматографическую камеру предварительно насыщали парами элюента в течение 24 часов.

Извлечение для ТСХ-анализа получали по *методике получения испытуемого раствора извлечения (см. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях электромагнитного спектра)*.

Образцы спиртоводных извлечений объемом 20 мкл наносили на линию старта с помощью стеклянной микропипетки, закрепляли каждое нанесение спиртом этиловым 96 % и пластинку погружали в хроматографическую камеру. Использовали восходящий способ хроматографирования при комнатной температуре. Окончание хроматографического анализа идентифицировали при достижении фронтом растворителя линии финиша. Далее пластины извлекали из камеры и высушивали в сушильном шкафу.

Детектирование полученных хроматограмм проводили с помощью физических и химических методов:

- в видимом свете и при использовании монохроматических УФ-облучателей ($\lambda=254$ нм и 365 нм);
- в видимом свете после обработки раствором диазобензосульфокислоты

(ДСК) в насыщенном растворе натрия карбоната – обнаружение фенольных соединений;

– в видимом свете и УФ-свете после обработки спиртовым раствором алюминия (III) хлорида 3 % ($AlCl_3$) – обнаружение соединений флавоноидной природы.

Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [49, 79]

В целях исследования химического состава коры, листьев ореха черного применяли метод жидкостно-адсорбционной колоночной хроматографии. Хроматографическое разделение проводили на колонке с параметрами – диаметр и высота сорбента 8 см и 5 см соответственно. Неподвижная фаза - силикагель марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм по ТУ 6-09-39-23-86 (ООО «ИМИД»). Разделение проводили по схеме:

Измельченное воздушно-сухое сырье коры или листьев ореха черного (100,0 г), заготовленное в марте 2019 г. в Ботаническом саду Самарского государственного университета г. Самары, экстрагировали 70 % этиловым спиртом в соотношении 1:5 до полного истощения сырья методом дробной мацерации. Полученное водно-спиртовое извлечение объединяли и упаривали на ротационно-вакуумной установке до густого экстракта. Для смешивания с целевым объектом использовали сорбент массой 70,0 г, что составляет 70 % от указанной массы растельного сырья (100 г). Сухой экстракт смешивали с указанным количеством силикагеля и высушивали. Высушенный порошок – смесь сухого экстракта и силикагеля – вносили на колонку, заполненную силикагелем в виде взвеси в хлороформе. Поток подвижной фазы служила элюентная система состава хлороформ - этанол 96 % ряда соотношений, процесс разделения завершался элюированием водой очищенной.

По итогу колоночного разделения были выделены фракции, содержащие индивидуальные соединения коры и листьев ореха черного. Последующую очистку биологически активных соединений осуществляли на хроматографической колонке (диаметр 2 см, высота сорбента 2 см), в качестве сорбента использовали силикагель и полиамид For Column Chromatography. Второй вариант очистки

проводился перекристаллизацией с помощью различных органических растворителей: ацетона, гексана, хлороформа и этанола.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [12, 49]

В целях идентификации и количественного определения содержания основной группы БАС – флавоноидов осуществляли анализ методом микроколоночной жидкостной хроматографии высокого давления на хроматографе «Милихром-6» с УФ-детектором (НПАО «Научприбор») в следующих условиях:

Колонка КАХ (2 x 64 мм, сталь), стационарная фаза “Separon C18”(обращенная фаза), 5 мкм

ПФ А – ацетонитрил

В – вода (с добавлением уксусной кислоты)

К 20 мл ацетонитрила (СТП ТУ СОМР 3-074-06, для высокоэффективной жидкостной хроматографии) прибавляют 80 мл воды дистиллированной, 0,8 мл ледяной уксусной кислоты и тщательно перемешивают. Смесь фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,4 - 0,5 мкм под вакуумом (при остаточном давлении 7 - 15 мм рт. ст. - водоструйный насос). Элюент дегазируют гелием непосредственно перед анализом. Срок годности элюента сутки.

Способ элюирования Изократический

Время	А, об. %	В, об. %
0	20	80
25	20	80

Скорость потока, 100
мкл/мин

Температура +23±2

Детектор Многоволновый спектрофотометрический УФ или диодная матрица
260, 360 нм

Объем вводимой 4
пробы, мкл

Время 20-25
хроматографирования,
мин

Обработку результатов анализа проводили с помощью программного обеспечения «UniChrom» (версия 5.0.19.1162, ООО «Новые аналитические системы», Беларусь).

Приготовление стандартного раствора мирицитрина. Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного мирицитрина (содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 80 % этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Приготовление стандартного раствора кверцитрина. Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного кверцитрина (содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 80 % этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Извлечение для ВЭЖХ-анализа получали по *методике получения испытуемого раствора извлечения (см. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях электромагнитного спектра)*.

2.3.4. Технологические методы исследования

Образцы настоек из сырья коры и листьев ореха черного получали на 70 % этиловом спирте в соотношении 1:5 методом модифицированной дробной мацерации (Патент РФ на изобретение № 2134584) [60]. Указанный метод получения настоек используется с целью получения настоек из различного вида растительного сырья, содержащего в качестве БАС фенилпропаноиды и флавоноиды.

В последующие 2-3 суток полученные настойки выдерживали при температуре 8°C и фильтровали. Готовый продукт фасовали во флаконы светозащитного стекла. Органолептические свойства указанных препаратов представлены ниже:

- Настойка коры *Juglans nigra* L. на 70 % этиловом спирте: темно-

коричневая опалесцирующая жидкость со слабым характерным запахом и горьковатым вкусом.

- Настойка листьев *Juglans nigra* L. на 70 % этиловом спирте: буро-зеленая опалесцирующая жидкость со слабым характерным запахом и горьковатым вкусом.

2.3.5. Фармакологические методы анализа

Прогноз фармакологической активности индивидуальных соединений, выделенных из коры и листьев ореха черного составлен с использованием программы PASS Online (<http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/index.php>) - prediction of activity spectra for substances [74]. Онлайн-сервис PASS Online позволяет осуществлять прогноз фармакологических эффектов, механизмов действия, токсических и побочных эффектов. Для анализа активностей были использованы структурные формулы мирицитрина и кверцитрина. На основании введенных данных была получена информация о вероятности проявления в эксперименте «активности» (Pa) и «неактивности» (Pi) по убыванию их разности.

На кафедре фармакологии имени з.д.н. РФ проф. А.А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России проводилась экспериментальная часть диссертационной работы: исследование нейротропной активности мирицитрина и острой токсичности настоек коры и листьев ореха черного на 70% этиловом спирте.

Исследования нейротропной активности осуществлялось в следующих условиях: белые беспородные крысы обоего пола массой 200-220 г были разделены на 2 группы: контрольную и опытную. Каждая группа включала десять животных. Объекты содержались в условиях вивария (обычный рацион питания и открытый доступ к водному источнику).

Полученную субстанцию мирицитрина вводили внутрижелудочно через зонд в дозах от 0,5 мг/кг до 5 мг/кг. Контроль – вода очищенная. Опытная группа – предварительная водная нагрузка. Далее осуществляли однократное введение субстанции. Через 1 час после введения объекта исследования проводили оценку нейротропной активности мирицитрина с использованием теста Порсолта [80].

При этом в течение пяти минут фиксировали индивидуальное время активных попыток животных выбраться из воды. Полученные данные обрабатывали статистически по критерию Манна-Уитни.

Фармакологическое изучение острой токсичности настоек коры и листьев *Juglans nigra* L. проводилось на 2 группах (по 10 животных в каждой) белых беспородных половозрелых крыс-самцов массой 200-220 г. Объекты содержались в условиях вивария (обычный рацион питания и открытый доступ к водному источнику).

Эксперимент проводился в 2 этапа: изучение острой токсичности препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка». Опытной группе, предварительно получавшей водную нагрузку, вводили настойки в дозе 0,5 г/кг с помощью того же зонда. Контрольная группа животных получала водно-спиртовой раствор 70 % концентрации в двух экспериментах. В течение первого дня эксперимента животные находились под непрерывным контролем. Общая продолжительность одного эксперимента составила 14 дней.

2.3.6. Статистическая обработка результатов эксперимента

Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики с оценкой однородности выборок, расчетом среднего значения (\bar{x}), дисперсии (S^2), стандартного отклонения (S_x), стандартного отклонения среднего значения ($S_{\bar{x}}$), полуширины доверительного интервала (Δx), полуширины доверительного интервала среднего значения ($\Delta \bar{x}$) и относительной ошибки результата единичного определения (ε). Значения определяемых величин количественного содержания ведущих групп БАС представлены в виде $\bar{x} \pm \Delta x$, где \bar{x} – среднее значение; Δx – полуширина доверительного интервала при доверительной вероятности 95 %. Статистический анализ проведен в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с использованием программ STATISTICA 10.0 (Statsoft Inc., USA) и ChemMetr 1.0 [9, 12].

Для целей валидации проводилась оценка аналитических методик в

соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» 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. Специфичность методик количественного определения содержания мирицитрина и кверцитрина определялась по показателю разрешения между пиками, а также хроматографированием испытуемых растворов СО мирицитрина и СО кверцитрина.

Линейность методики определяли экспериментально измерением аналитических сигналов (оптической плотности; единиц оптической плотности, далее определение площади пика) для серии из 5 проб растворов мирицитрина (кверцитрина) с концентрациями в различных диапазонах. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мкг/мл – аналитический сигнал» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (r^2).

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора мирицитрина (кверцитрина) с известной концентрацией (25 %, 50 % и 75 %) к испытуемому раствору извлечения или настойки. Рассчитывали систематическую составляющую неопределенности (δ).

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ОРЕХ (*JUGLANS L.*)

Растительное сырье видов рода Орех в настоящее время активно используется в традиционной медицине, благодаря наличию обширного спектра фармакологической активности [35, 111, 122, 127, 129, 146]. В основном широкого применения в медицинской практике достигли растительное сырье и препараты листьев и плодов ореха грецкого. Для них во многом установлен и химический состав, и фармакологическая активность [16, 18, 23, 32, 33]. Однако для изучения интерес представляют и другие виды сырья представителей рода *Juglans*: кора всех трех видов, а также листья и околоплодники ореха черного и ореха серого.

Ведущей группой БАС во всех видах растительного сырья представителей рода Орех выступают нафтохиноны. Однако литературный обзор показал недостатки данного решения:

- сложность диагностики целевого вида от примесных. Виды рода Орех: орех грецкий, орех черный и орех серый имеют близкое морфолого-анатомическое строение.

- трудоемкость этапа пробоподготовки современных методик качественного и количественного анализа растительного сырья рода Орех: использование большого числа операций экстракции, упаривания,

- низкое содержание анализируемой группы – нафтохинонов – в растительном сырье.

Ввиду отсутствия данных относительно диагностически значимых веществ, существует необходимость в проведении экспериментальной работы по изучению химического состава с последующей разработкой методик качественной и количественной оценки доброкачественности растительного сырья *Juglans L.* с целью создания нормативной документации, регламентирующей качество указанных видов сырья.

3.1. Сравнительное фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.) и ореха серого (*Juglans cinerea* L.)

В ходе предварительного сравнительного фитохимического исследования химического состава коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L. и *Juglans cinerea* L. использовались химические (пробирочные реакции) и физико-химические методы (хроматографические и спектрофотометрические методы) анализа.

На первом этапе с целью подтверждения наличия или отсутствия в растительном сырье видов рода Орех соединений фенольной природы, в том числе флавоноидов, проводилось исследование с помощью химических (пробирочных) реакций: реакция с щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, реакция Вильсона, проба Шинода, проба Брианта, реакция со спиртовым раствором алюминия хлорида. После получения аналитических эффектов реакций на соединения, содержащих фенольную функциональную группу, осуществлялось сравнительное хроматографическое исследование видов рода Орех.

3.1.1. Хроматографический анализ коры, листьев и плодов видов рода Орех в тонком слое сорбента

Хроматографическое исследование проводилось для 70 % водно-спиртовых извлечений образцов коры, листьев и плодов ореха черного, ореха грецкого и ореха серого в тонком слое сорбента. Предварительные исследования различных хроматографических систем (*n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2), хлороформ – этанол 96% - вода (25:18:2), хлороформ – этанол 96% (4:1) показали, что система растворителей хлороформ – этанол 96% – вода в соотношении 25:18:2 имеет наибольшее разрешение между хроматографическими зонами (R_s от 1,39 до 1,43). Указанная система использовалась в сравнительных хроматографических исследованиях.

В результате ТСХ-анализа отмечается, что наиболее информативными являются хроматограммы, детектируемые в условиях монохроматического УФ-

освещения при длине волны 365 нм до и после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ и последующей обработкой щелочным раствором ДСК. В качестве внутренних свидетелей использовали спиртовые растворы стандартных образцов мирицитрина, югланина, кверцитрина, гиперозида (рис. 2).

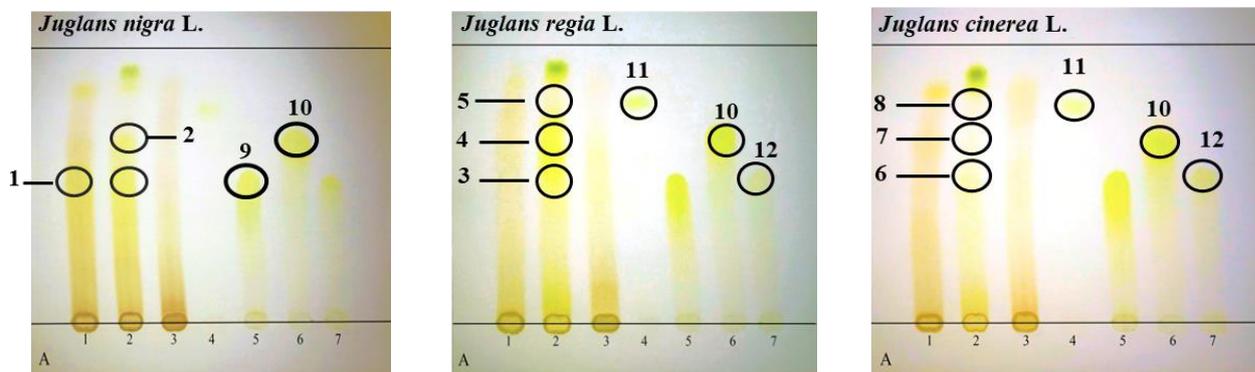


Рисунок 2 – Хроматограммы водно-спиртовых извлечений растительного сырья ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.) и ореха серого (*Juglans cinerea* L.) в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (25:18:2): детекция в видимом свете.

Обозначения: 1 – 70 % водно-спиртовое извлечение коры; 2 – 70 % водно-спиртовое извлечение листьев; 3 – 70 % водно-спиртовое извлечение околоплодников; 4 – стандартный образец (СО) югланина; 5 – СО мирицитрина; 6 – СО кверцитрина; 7 – СО гиперозида.

По результатам хроматографических исследований выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. При детектировании хроматографических пластинок со спирто-водными извлечениями коры, листьев и плодов ореха черного, ореха грецкого и ореха серого в видимом и УФ-свете при 365 нм наблюдается наличие широкого спектра фенольных соединений различного состава (табл. 3).

Таблица 3 – Характеристика хроматографических зон адсорбции исследуемых объектов

Хроматографическая зона	R_f	Разрешение	Детектирование
1	0,40	1,43	УФ (365 нм): темно-коричневая $AlCl_3$: ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
2	0,65		УФ (365 нм): темно-коричневая со

			светлой каймой AlCl ₃ : ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
3	0,45	1,42 1,39	УФ (365 нм): коричневая AlCl ₃ : желто-зеленоватая ДСК: желтая
4	0,65		УФ (365 нм): темно-коричневая со светлой каймой AlCl ₃ : ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
5	0,80		УФ (365 нм): темно-коричневая с желтой каймой AlCl ₃ : светло-желтая ДСК: желто-оранжевая
6	0,45	1,42 1,39	УФ (365 нм): коричневая AlCl ₃ : желто-зеленоватая ДСК: желтая
7	0,65		УФ (365 нм): темно-коричневая со светлой каймой AlCl ₃ : ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
8	0,80		УФ (365 нм): темно-коричневая с желтой каймой AlCl ₃ : светло-желтая ДСК: желто-оранжевая
9 СО мирицитрина	0,40	-	УФ (365 нм): темно-коричневая AlCl ₃ : ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
10 СО кверцитрина	0,65		УФ (365 нм): темно-коричневая со светлой каймой AlCl ₃ : ярко-желтая ДСК: желто-оранжевая
11 СО югланина	0,80		УФ (365 нм): темно-коричневая с желтой каймой AlCl ₃ : светло-желтая ДСК: желто-оранжевая
12 СО гиперозида	0,45		УФ (365 нм): коричневая AlCl ₃ : желто-зеленоватая ДСК: желтая

Хроматографическая зона 1 предположительно является мирицитрином, что подтверждается одинаковой величиной R_f относительно СО мирицитрина ($R_f \approx 0,4$) и результатами детектирования. Вторая зона адсорбции желтого цвета локализована в листьях ореха черного. Величина R_f , данной зоны совпадает с величиной R_f СО кверцитрина $\approx 0,65$.

В листьях ореха грецкого и ореха серого обнаружены зоны адсорбции 5-8, принадлежащих веществам, предположительно, флавоноидной структуры. R_f хроматографических зон 4 и 7 приблизительно равно R_f СО кверцитрина (10). Вторым выявленным компонентом является соединение с хроматографическими зонами 5 и 8, величина R_f которых совпадает с величиной R_f СО югланина $\approx 0,8$ (хроматографическая зона 11). По литературным данным, в извлечениях листьев ореха грецкого должны обнаруживаться зоны адсорбции, соответствующие СО гиперозида (зона адсорбции 12). На хроматографических пластинках их локализация также выявлена (хроматографическая 3 и 6).

В извлечениях обнаружены другие флавоноидные соединения, предположительно, негликозидной структуры. В сравнительном аспекте видно, что на хроматограммах плодов и околоплодников не выявлены различия в химическом составе (рис. 2).

Полученные результаты хроматографических исследований коры, листьев и околоплодников *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L. методом хроматографии в тонком слое сорбента позволило выявить наличие соединений флавоноидной структуры в коре и листьях *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L..

3.1.2. Исследование коры, листьев и плодов видов рода Орех (*Juglans* L.) с использованием спектрофотометрии в УФ и видимом свете

С целью дальнейшего исследования сырья, содержащего соединения флавоноидной структуры, 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. Полученный электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения коры ореха черного имеет два максимума поглощения (рис. 3). Электронные спектры поглощения листьев ореха черного, грецкого и серого также имеют два максимума поглощения (рис. 7, 9, 11).

Дальнейшее исследование растительного сырья методом дифференциальной спектрофотометрии позволило установить батохромный сдвиг длинноволновой полосы, появляющийся при взаимодействии с комплексообразователем – спиртовым раствором $AlCl_3$. Указанный эффект свидетельствует о вкладе флавоноидов в спектр поглощения извлечений коры ореха черного, листьев ореха черного, ореха грецкого и ореха серого.

Для раствора СО мирицитрина после комплексообразования с раствором $AlCl_3$ установлен максимум поглощения при длине волны 414 ± 2 нм (рис. 5). для извлечения коры ореха черного установлен максимум поглощения в области 416 ± 2 нм (рис. 3). В условиях дифференциальной спектрофотометрии для исследуемых образцов извлечений коры ореха черного и водно-спиртового раствора СО мирицитрина зарегистрированы максимумы поглощения в области 414-416 нм (рис. 4 и 6).

Для раствора СО кверцитрина после комплексообразования с раствором $AlCl_3$ установлен максимум поглощения при $\lambda = 410 \pm 2$ нм (рис. 13 и 14). В условиях дифференциальной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой части спектра для исследуемых образцов водно-спиртовых извлечений из листьев *Juglans nigra* L. регистрируется максимум поглощения при длине волны 412 ± 2 нм (рис. 7 и 8), который практически аналогичен зарегистрированным максимумам поглощения растворов стандартных образцов мирицитрина и кверцитрина.

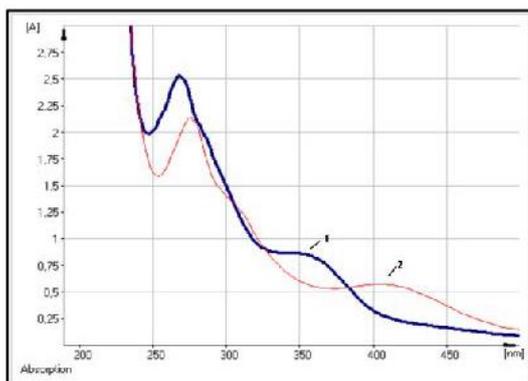


Рисунок 3 - Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из коры ореха черного. Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 270 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 360 \pm 2 \text{ нм}$$

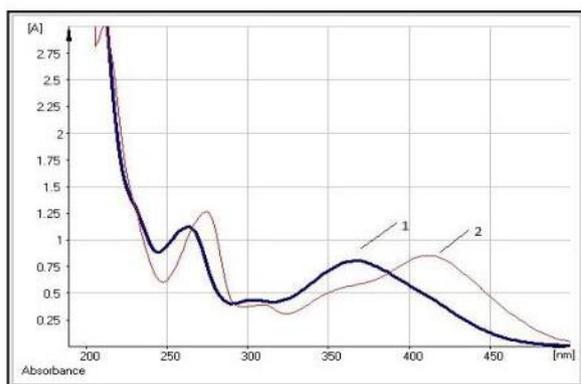


Рисунок 5 - Электронные спектры поглощения спиртового раствора мирцитрина. Обозначения: 1 – мирцитрина исходный; 2 – с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 270 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 360 \pm 2 \text{ нм}$$

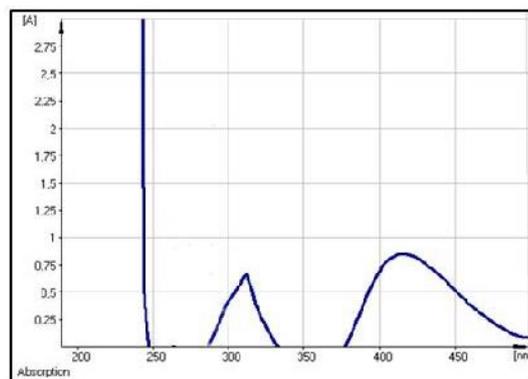


Рисунок 4 - Электронный спектр поглощения раствора водно-спиртового извлечения из коры ореха черного (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 416 \pm 2 \text{ нм}$$

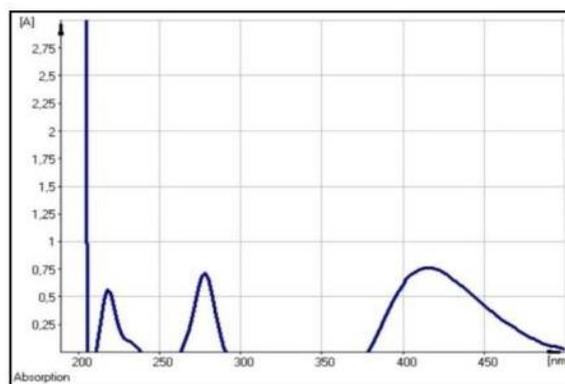


Рисунок 6 - Электронный спектр поглощения раствора мирцитрина (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 416 \pm 2 \text{ нм}$$

В условиях дифференциальной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой части спектра для исследуемых образцов водно-спиртовых извлечений из листьев *Juglans regia* L. и *Juglans cinerea* L. установлены максимумы поглощения при длине волны 412 ± 2 нм (рис. 9-12), которые фактически совпадают с максимумом поглощения спиртового раствора кверцитрина.

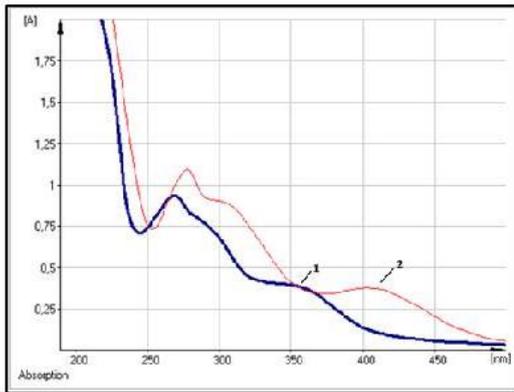


Рисунок 7 - Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха черного. Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 270 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 356 \pm 2 \text{ нм}$$

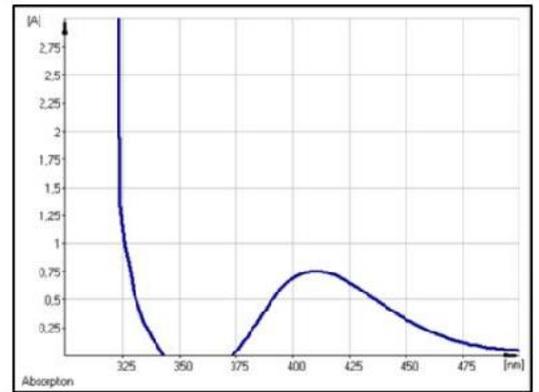


Рисунок 8 - Электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха черного (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 412 \pm 2 \text{ нм}$$

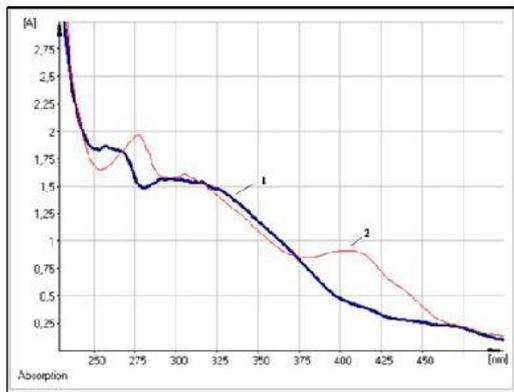


Рисунок 9 - Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого.

Обозначения: 1 – раствор извлечения;

2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 258 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 356 \pm 2 \text{ нм}$$

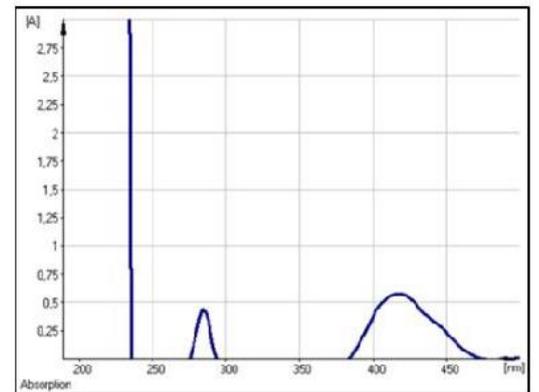


Рисунок 10 - Электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 412 \pm 2 \text{ нм}$$

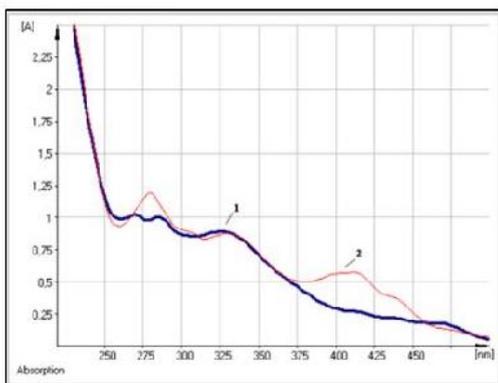


Рисунок 11 - Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха серого. Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 258 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 330 \pm 2 \text{ нм}$$

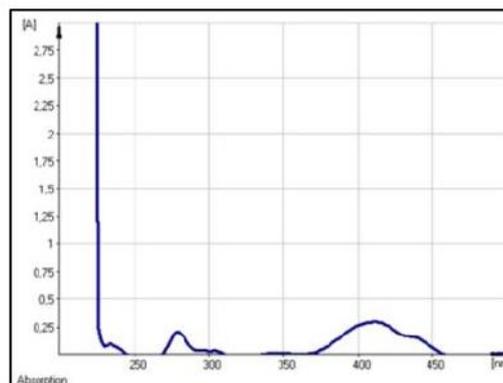


Рисунок 12 - Электронный спектр поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха серого (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 412 \pm 2 \text{ нм}$$

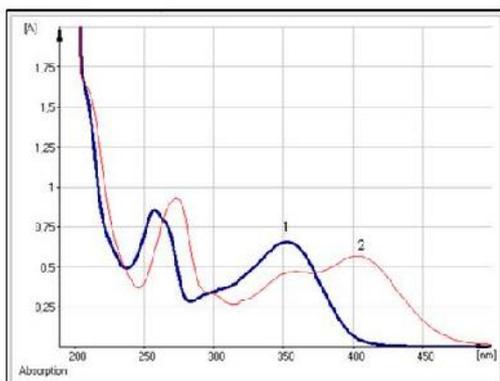


Рисунок 13 - Электронные спектры поглощения спиртового раствора кверцитрина. Обозначения: 1 – исходный; 2 – с добавлением алюминия хлорида

$$\lambda_{max1} = 258 \pm 2 \text{ нм};$$

$$\lambda_{max2} = 354 \pm 2 \text{ нм}$$

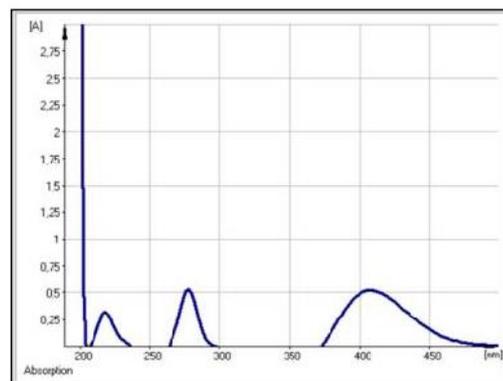


Рисунок 14 - Электронный спектр поглощения спиртового раствора кверцитрина (дифференциальный вариант)

$$\lambda_{max} = 408 \pm 2 \text{ нм}$$

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. Полученные по результатам хроматографических и спектрофотометрических исследований данные позволили предположить

перспективность дальнейшего изучения химического состава коры и листьев ореха черного.

3.2. Выделение индивидуальных биологически активных соединений из коры и листьев ореха черного

Для целей исследования химического состава коры и листьев ореха черного осуществляли выделение индивидуальных биологически активных соединений из указанных видов растительного сырья методом адсорбционной колоночной хроматографии. В таблице 4 приведена схема выделения фракций из экстрактов коры и листьев ореха черного.

Таблица 4 – Схема элюирования фракций из экстрактов коры и листьев ореха черного методом адсорбционной колоночной хроматографии

№ фракции экстракта коры <i>J. nigra</i>	№ фракции экстракта листьев <i>J. nigra</i>	Состав элюента; об. %		Объем
		хлороформ	спирт	
1	1-3	100%	0%	200 мл
2-3	4-7	99%	1%	500 мл
4-9	8-13	97%	3%	1000 мл
10-13	14-19	95%	5%	500 мл
14-18	20-25	93%	7%	500 мл
29-26	26-31	90%	10%	1000 мл
27-31	32-38	85%	15%	1000 мл
32-35	39-45	80%	20%	500 мл
36-38	46-54	75%	25%	500 мл
39-42	55-63	70%	30%	500 мл
43-50	64-68	60%	40%	1000 мл
51-54	1-3	50%	50%	500 мл
55-57	-	40%	60%	500 мл
58-62	69-74	0%	96%	1000 мл
63-64	75-77	Вода	0%	500 мл

Полученные после операции элюирования фракции переносили в

промаркированные колбы и упаривали на ротационно-вакуумной установке до объема 10 мл. Сконцентрированные элюаты вносили в соответствующие емкости объемом 10 мл и проводили операции очистки и перекристаллизации.

При проведении адсорбционной хроматографии процесс разделения веществ контролировали визуальными (по изменению интенсивности окраски раствора) и физико-химическими (ТСХ) методами. В качестве внутреннего стандарта использовали настойку коры ореха черного.

3.3. Исследование фракций, содержащих биологически активные соединения экстрактов коры и листьев ореха черного

Наличие фракций, содержащих доминирующие и диагностически значимые индивидуальные вещества коры и листьев *Juglans nigra* L., устанавливалось с использованием метода тонкослойной хроматографии.

Полученное в минорных количествах соединение 1 (табл. 5), было найдено в фракциях № 2-3, где в качестве элюата выступал хлороформ и смесь хлороформа и этанола в соотношении 99:1. Очистку фракций проводили с использованием перекристаллизации из смеси хлороформ-гексан.

Соединение 2 выделено из фракций 43-46. Элюент – смесь хлороформа и этилового спирта в соотношении 60:40. Кристаллизация вещества 2 проходила во фракции 45. Элюат фракции № 45, а также фракций, в которых обнаружено соединение 2 (№ 43, 44 и 46), объединяли в одну фракцию и проводили рехроматографическую очистку с помощью полиамида (смесь экстракт и полиамид). Элюирование веществ с полученной хроматографической колонки (диаметр 4 см; высота 5 см) проводили системой состава вода и водный раствор этанола различных соотношений (20 %; 40 %; 70 %; 96 %). В итоге после операции рехроматографирования выделено вещество 2 (элюент – спирт этиловый 40 % и 70 % концентрации). Выход вещества 1,3 %.

Соединение 3 получено элюированием системой растворителей хлороформ и этиловый спирт в соотношении 90:10 (фракции № 24-25). Выход вещества 0,1 %.

Соединение 4 получено элюированием системой растворителей хлороформ

и этиловый спирт в соотношении 80:20 (фракции № 32-35). Для получения соединения фракции объединяли и суммарный элюат фракций 32-35 очищали рехроматографированием на сорбенте (полиамид для колоночной хроматографии) путем элюирования системой состава вода и водный раствор этанола различных соотношений (20 %; 40 %; 70 %; 96 %). В итоге после операции рехроматографирования и дополнительной перекристаллизации выделено вещество 4 (элюент - спирт этиловый 40 % концентрации).

Соединение 5 получено элюированием системой растворителей хлороформ и этиловый спирт в соотношении 93:7 (фракция № 7). Для очистки элюата фракцию 7 наносили на сефадекс LH-20. Элюирование веществ с полученной хроматографической колонки проводили системой гексана, хлороформа и спирта этилового различных концентраций (гексан чистый; 20 %, 40 %, 60% хлороформ в гексане, хлороформ чистый; 1%, 3% спирт в хлороформе). С хроматографической колонки получили вещество 5 (элюент - 40 % раствор хлороформа в гексане). Вещество получено в минорных количествах.

Полученное соединение 6 выделено из фракции под номером 8, где в качестве элюата выступал хлороформ и смесь хлороформа и этанола в соотношении 97:3. Очистку фракции проводили с использованием перекристаллизации из смеси хлороформ-гексан.

Соединение 7 получено элюированием системой растворителей хлороформ и этиловый спирт в соотношении 70:30 (фракции № 50-53). Чистое вещество 7 получено из фракций 51-52 перекристаллизацией из водного спирта с использованием хлороформа. Для очистки элюатов фракций № 51 и 52, а также исходных фракций 50 и 53 их объединяли и наносили на сорбент (полиамид для колоночной хроматографии). Высушенную смесь экстракта и полиамида переносили на хроматографическую колонку (4 см×5 см). Операцию элюирования с хроматографической колонки осуществляли водой и водным раствором этанола в различных концентрациях (20 %; 40 %; 70 %, 96 %). В результате хроматографического разделения выделено вещество 7 (элюент – спирт этиловый 70 % концентрации). Выход вещества 0,6 %.

Соединение 8 получено элюированием системой растворителей хлороформ и этиловый спирт в соотношении 93:7 (фракции № 20-25). Выход вещества 0,02 %.

Соединение 9 получено из фракций 55-60. Элюент – смесь хлороформа и этанола в соотношении 60:40. Фракции 55-60 объединяли в одну фракцию и проводили рехроматографическую очистку с помощью полиамида, как и для соединения 2. Выход вещества 1,0 %.

Соединение 10 получено вымыванием элюентной системой хлороформ и этиловый спирт в соотношении 90:10 (фракции № 27-30). Выход вещества 0,1 %.

3.4. Идентификация индивидуальных соединений и их физико-химические характеристики

Индивидуальные биологически активные соединения коры ореха черного были выделены из 2-3, 7, 24-25, 32-35 и 43-46 фракций; индивидуальные БАС листьев ореха черного из 8, 27-30, 20-25, 50-53, 55-60 фракций. Выделенные вещества анализировали с использованием различных методов для установления их химической структуры, включая: тонкослойную хроматографию, спектрофотометрию, ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрию (Приложение 1), а также химические методы анализа.

В протонной спектре ядерного магнитного резонанса соединения **2** наблюдаются два однопротонных дублетных сигнала при 6.19 миллионной доли частоты (м.д.) и 6.36 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) 2,5 Гц, принадлежащих Н-6 и Н-8 соответственно, что подтверждает замещение кольца А в положении С-5 и С-7. Кроме того, в ¹Н-ЯМР-спектре соединения **2** обнаружен двухпротонный синглетный сигнал при 6.88 м.д. протонов кольца В флавоноида **2** - Н-2' и Н-6'. О наличии в молекуле флавоноида **2** свободной 5-ОН-группы свидетельствует присутствующий в ¹Н-ЯМР спектре однопротонный синглетный сигнал при 12.68 м.д. В ¹Н-ЯМР-спектре обнаруживаются также однопротонный дублетный сигнал с КССВ 1.5 Гц аномерного протона Н-1'' α-L-рамнопиранозы при 5.20 м.д., а также трехпротонный дублетный сигнал с КССВ 6 Гц СН₃-группы рамнозы при 0.84 м.д. (Приложение 1).

В результате кислотного гидролиза соединение **2** расщепляется на рамнозу и агликон (**3**), идентифицированный как мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоон), который выделен также в свободном виде из коры ореха черного. О присоединении рамнозы к 3-ОН-группе в молекуле флавоноида **2** свидетельствуют результаты спектрофотометрии с ионизирующими и комплексообразующими добавками [145] (Приложение №1).

Флавановая природа соединений **4** и **5** подтверждается данными ^1H -ЯМР- и спектрофотометрии. В результате кислотного и ферментативного гидролиза гликозид **4** расщепляется на глюкозу и сакурнетин (5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванон) (**5**), который выделен также в свободном виде. Присоединение глюкозы подтверждается отсутствием синглетного сигнала 5-ОН-группы в ^1H -ЯМР-спектре. Наличие метоксигруппы в положении С-7 агликона (**5**) подтверждается данными масс-спектрометрии: пики ионов с m/z 167 (кольцо А) и m/z 121 (кольцо В).

Следовательно, соединение **2** имеет строение 3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона (мирицитрин) (рис. 42-44), а соединение **4** 5-О- β -D-глюкопиранозид 5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванона (сакурнетин) (Приложение 1).

В протонной спектре ядерного магнитного резонанса соединения **7** обнаружены два однопротонных дублетных сигнала ароматических протонов, подтверждающих замещения кольца А в положении С-5 и С-7. Кроме того, в ^1H -ЯМР-спектре соединения **7** обнаружены однопротонные синглетные сигналы при 6.82, 7.21, 7.26 м.д. протонов кольца В флавоноида **7** - Н-2', Н-5' и Н-6'. О наличии в молекуле флавоноида **7** свободной 5-ОН-группы свидетельствует присутствующий в ^1H -ЯМР спектре однопротонный синглетный сигнал при 12.61 м.д. Присутствие в молекуле свободной 7-ОН-группы, а также орто-дигидроксигруппировки при С-3' и С-4' подтверждается данными ^1H -ЯМР-спектров (наличие однопротонных синглетных сигналов при 10.83 м.д.), а также данными спектрофотометрии после проведения соответствующих химических реакций [145] (Приложение №1).

В результате кислотного гидролиза соединения **7** расщепляется на рамнозу и агликон, идентифицированный как кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавоноид) (**8**). О присоединении рамнозы к 3-ОН-группе в молекуле флавоноида **7** свидетельствовали результаты спектрофотометрии с ионизирующими и комплексообразующими добавками.

Идентификация соединения **9** по данным ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии совпадает с таковой для соединения **2**. В результате кислотного гидролиза соединение **9** расщепляется на рамнозу и агликон (**10**), идентифицированный как мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоноид), который выделен также в свободном виде из коры ореха черного. О присоединении рамнозы к 3-ОН-группе в молекуле флавоноида **9** свидетельствуют результаты спектрофотометрии с ионизирующими и комплексообразующими добавками [145].

Данные ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также результатов кислотного гидролиза свидетельствуют о том, что флавоноиды **8** и **10** являются α -L-рамнопиранозидами мирицетина (**7**) и кверцетина (**9**) соответственно, которые были выделены из листьев ореха черного. Присоединение рамнозы к 3-ОН-группе обоих флавоноидов подтверждено данными спектрофотометрии с ионизирующими и комплексообразующими добавками [145].

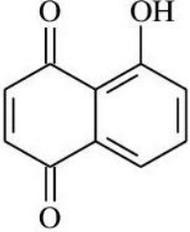
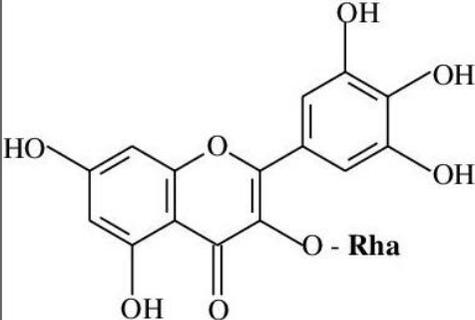
Соединение **6**, идентифицированное нами на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии как 5-гидрокси-2-этокси-1,4-нафтохинон (2-этоксиюглон), было выделено ранее из незрелых плодов ореха маньчжурского - *Juglans mandshurica* Maxim. [184].

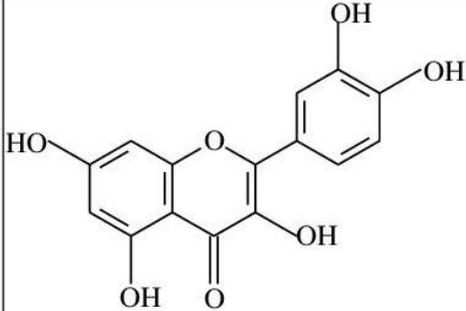
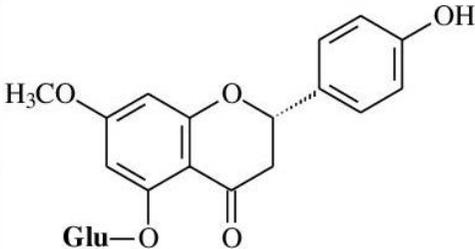
Таким образом, мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоноид), мирицитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид мирицетина), сакуранетин (5,4'-дигидрокси-7-метоксифлаванон) и сакуранетин-5-O- β -D-глюкопиранозид, идентифицированные на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, спектрофотометрии, а также результатов химических превращений, впервые выделены из коры ореха черного наряду с известным для сырья данного растения и других видов рода Орех юглоном (нафтохинон). Из листьев ореха черного, культивируемого в Самарской области, впервые выделены

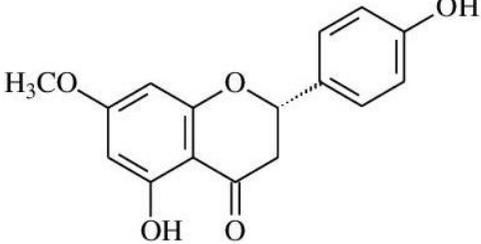
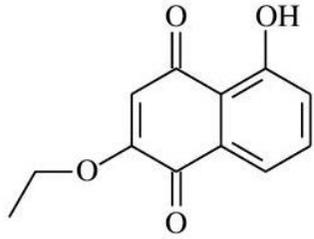
и идентифицированы мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоон), мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид мирицетина), кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавоон), кверцитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид кверцетина), 2-этоксиюглон (5-гидрокси-2-этокси-1,4-нафтохинон), а мирицетин, кверцетин и 2-этоксиюглон впервые описаны для листьев данного растения [6, 28, 32].

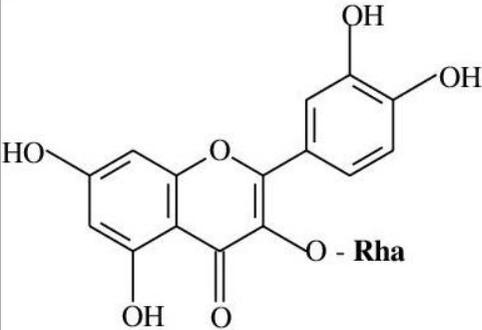
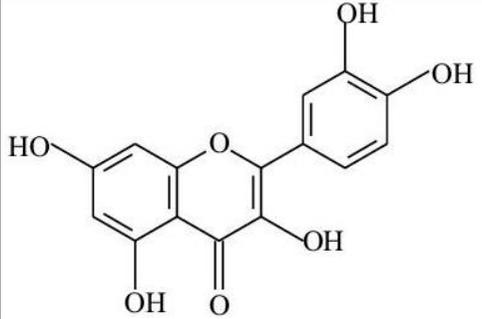
Характеристики веществ, выделенных из экстрактов коры и листьев *Juglans nigra* L. методом жидкостно-адсорбционной хроматографии, указаны в таблице 5.

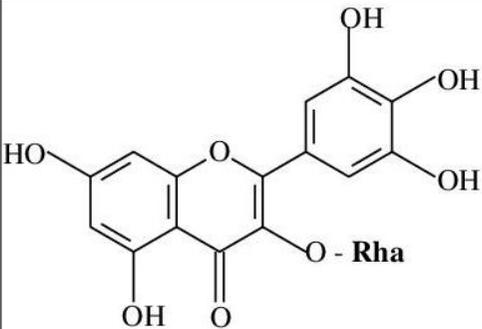
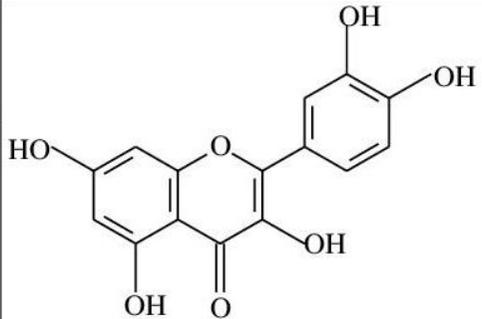
Таблица 5 – Физико-химические и спектральные характеристики биологически активных соединений, содержащихся в коре и листьях *Juglans nigra* L.

№	Название соединения	Химическая формула	Физико-химические характеристики
Кора ореха черного			
1.	Юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон) $C_{10}H_6O_3$		<p>Кристаллическое вещество оранжевого цвета. Т. пл. 150-153° (хлороформ-гексан). λ_{max} EtOH 250, 320, 420.</p> <p>1H-ЯМР спектр (300 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 11.78 (1H, с, 5-OH группы), 7.65 (1H, т, 9 Гц, H-7), 7.62 (1H, дд, 2.5 и 9 Гц, H-8), 7.59 (1H, дд, 2.5 и 9 Гц, H-6), 7.04 (1H, д, 9 Гц, H-2), 6.92 (1H, д, 9 Гц, H-3).</p> <p>Масс-спектр (EI-MS, 70 eV, 200 оС, m/z, %): M+ 174 (87.67), 146 (15.36), 118 (74.07), 102 (18.75), 92 (53.64), 74 (27.99), 43 (100).</p>
2.	Мирицитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона) $C_{21}H_{20}O_{12}$		<p>Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество. Т.пл. 203-205 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 212, 260, 358; + NaOAc 268, 366; + NaOAc + H₃BO₃ 260, 382; +AlCl₃ 278, 416; +AlCl₃ + HCl 270, 406.</p> <p>1H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.68 (1H, с, 5-OH-группа), 9.23 (2H, уш. с, 7-OH-группа и 4'-OH-группа), 6.88 (2H, с, H-2' и H-6'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.19 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.20 (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' рамнозы), 3.1-5.0 (м, 4H рамнозы), 0.84 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO-d_6, δ_C, м.д.): C-4 (177.85), C-7 (164.24), C-5 (161.37), C-4' (157.57), C-9</p>

			(156.49), C-2 и C-3 (145.83), C-3' и C-5' (145.83), C-1' (119.70), C-2' и C-6' (108.00), C-10 (104.12), C-1'' равнозы (102.00), C-6 (98.41), C-8 (94.30), C-2' (116.21), C-3'' (71.03), C-5'' (70.62), C-4'' (70.47), C-2'' (70.08), C-6'' (CH ₃) (17.57). Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>): <i>m/z</i> 465.1016 [M+H] ⁺ , <i>m/z</i> 487.0830 [M+Na] ⁺ , <i>m/z</i> 503.0560 [M+K] ⁺ .
3.	Мирицетин (3,5,7,3',4',5'- гексагидроксифлавоно)C ₁ 5H ₁₀ O ₈		Желто-зеленое кристаллическое вещество. Т.пл. 357 °C (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ _{max} , нм): 254, 377; + NaOAc 275, 382; + NaOAc + H ₃ BO ₃ 258, 392; +AlCl ₃ 266, 440; +AlCl ₃ + HCl 266, 440. ¹ H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d ₆ , δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1H, с, 5-ОН-группа), 10.73 (1H с, 7-ОН-группа), 9.28 (1H, с, 4'-ОН-группа), 9.17 (2H, с, 3'-ОН-группа и 5'-ОН-группа), 8.75 (1H, с, 3-ОН-группа), 7.20 (2H, с, H-2' и H-6'), 6.32 (1H, д, 2.2 Гц, H-8), 6.14 (1H, д, 2.2 Гц, H-6). ¹³ C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d ₆ , δ _C , м.д.): C-4 (176.29), C-7 (164.39), C-5 (161.25), C-9 (156.59), C-4' (147.36), C-3' и C-5' (146.23), C-2 и C-3 (136.38), C-1' (121.30), C-2' и C-6' (107.68), C-10 (103.49), C-8 (93.71), C-6 (98.67).
4.	Сакуранин (Сакуранетин-5-О-β-D- глюкопиранозид; 5-О-β- D-глюкопиранозид 5,4'- дигидроски-7- метоксифлаванона) C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀		Белое кристаллическое вещество. Т.пл. 212-214° (водный спирт). λ _{max} EtOH 228, 283, 324(пл.) нм. ¹ H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d ₆ , δ, м.д., J/Гц): 9.63 (1H, с, 4'-ОН группы), 7.26 (2H, д, 9 Гц, H-2' и H-6'), 6.74 (2H, д, 8.5 Гц, H-3' и H-5'), 6.42 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.12 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.40 (1H, дд, 4 и 12 Гц, H-2a), 5.05 (1H, д, 7 Гц, H-1'' глюкопиранозы), 3.2-5.0 (м, 6H глюкопиранозы), 3.75 (3H, с, OCH ₃ при C-7), 3.11 (дд, 12

			и 17 Гц, Н-3ах), 2.62 (дд, 4 и 17 Гц, Н-3еа). ¹³ С-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d ₆ , δ _С , м.д.): 192.99 (С-4), 166.15 (С-7), 165.74 С-5), 164.38 С-4'), 160.52 (С-9), 131.50 (С-1'), 128.76 (С-2' и С-6'), 115.66 (С-3' и С-5'), 106.68 (С-10), 102.21 (С-1'' глюкозы), 98.03 (С-6), 94.30 (С-8), 78.97 (С-2), 77.95 (С-5''), 76.77 (С-3''), 73.86 (С-2''), 70.33 (С-4''), 61.22 (С-6''), CH ₃ O (56.25), 45.10 (С-3).
5.	Сакуранетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон) C ₁₆ H ₁₅ O ₅		Белое кристаллическое вещество. Т.пл. 240-243° (хлф-гексан). λ _{max} EtOH 224, 288, 326 (пл.) нм. ¹ Н-ЯМР спектр (300 МГц, DMSO-d ₆ , δ, м.д., J/Гц): 12.02 (1Н, с, 5-ОН группы). 7.33 (2Н, д, 9 Гц, Н-2' и Н-6'), 6.87 (2Н, д, 8.5 Гц, Н-3' и Н-5'), 6.08 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-8), 6.02 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-6), 5.35 (1Н, дд, 4 и 12 Гц, Н-2а), 3.82 (3Н, с, OCH ₃ при С-7), 3.10 (дд, 12 и 17 Гц, Н-3ах), 2.79 (дд, 4 и 17 Гц, Н-3еа). Масс-спектр (EI-MS, 70 eV, 200 °С, m/z, %): M ⁺ 286 (10.33), 248 (100), 167 (21.99), 121 (13.56), 120 (32.05), 95 (47.85), 43 (100).
Листья ореха черного			
6.	Этоксиглон (2-этокси-5-гидрокси-1,4-нафтохинон) C ₁₂ H ₁₀ O ₄		Кристаллическое вещество оранжевого цвета, λ _{max} EtOH 248, 289, 418 нм. ¹ Н-ЯМР спектр (399.78 МГц, DMSO-d ₆ , δ, м.д., J/Гц): 12.23 (1Н, с, 5-ОН группы), 7.65 (1Н, т, 8 Гц, Н-7), 7.49 (1Н, дд, 1.5 и 8 Гц, Н-8), 7.30 (1Н, дд, 1.5 и 8 Гц, Н-6), 6.29 (1Н, с, Н-3), 4.09 (2Н, кв, 6 и 10 Гц, OCH ₂), 1.32 (3Н, т, 6 Гц, CH ₃). ¹³ С-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d ₆ , δ _С , м.д.): 191.57

			(C-1), 179.48 (C-4), 160.89 (C-5), 160.53 (C-2), 136.35 (C-7), 131.57 (C-9), 125.05 (C-8), 119.32 (C-6), 110.37 (C-3), 110.20 (C-10), 66.14 (CH ₂), 14.34 (CH ₃).
7.	<p>Кверцитрин (3-<i>O</i>-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавона) C₂₁H₂₀O₁₁</p>		<p>Белое кристаллическое вещество. Т. пл. 250-252°C (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 258, 264 (плечо), 356; + NaOAc 261, 356; + NaOAc + H₃BO₃ 265, 380; + AlCl₃ 274, 404; + AlCl₃ + HCl 270, 400.</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.61 (1H, с, 5-ОН-группа), 10.83 (1H, с, 7-ОН-группа), 9.63 (1H, с, 4'-ОН-группа), 9.30 (1H, с, 3'-ОН-группа), 7.26 (1H, д, 2.5 Гц, H-2'), 7.21 (1H, дд, 2.5 и 9 Гц, H-6'), 6.82 (1H, д, 9 Гц, H-5'), 6.35 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.16 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.21 (1H, с, H-1'' рамнозы), 3.1-4.9 (м, 4H рамнозы), 0.78 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): C-4 (178.27), C-7 (164.72), C-5 (161.82), C-9 (157/82), C-2 (156.97), C-4' (148.97), C-3' (147.73), C-3 (134.74), C-6' (121.63), C-1' (121.25), C-2' (116.17), C-5' (115.98), C-10 (104.61), C-1'' рамнозы (102.36), C-6 (99.21), C-8 (94.15), C-3'' (71.69), C-5'' (71.11), C-4'' (70.87), C-2'' (70.58), C-6'' (CH₃) (18.02).</p>
8.	<p>Кверцетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон) C₁₅H₁₀O₇</p>		<p>Белое кристаллическое вещество. Т. пл. 316-318 °C (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 258, 270 (плечо), 374; + NaOAc 274, 382; + NaOAc + H₃BO₃ 258, 392; + AlCl₃ 268, 434; + AlCl₃ + HCl 266, 410.</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1H, с, 5-ОН), 10.72 (1H, с, 7-ОН-группа), 9.53 (1H, с, 4'-ОН-группа), 9.31 (1H, с, 3'-ОН-группа), 9.21 (1H, с, 3-ОН-группа), 7.63 (д, 2.5 Гц, H-2'), 7.49 (1H, дд, 2.5 и 9</p>

			Гц, Н-6 ¹), 6,84 (1Н, д, 9 Гц, Н-5 ¹), 6.36 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-8), 6,14 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-6). ¹³ С-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d ₆ , δ _с , м.д.): С-4 (176.35), С-7 (164.26), С-5 (161.24), С-9 ((161.24), С-2 (156.65), С-4' (148.22), С-3' (145.58), С-3 (136.26), С-6' (122.46), С-1' (120.48), С-2' (116.11), С-5' (115.58), С-10 (103.53), С-6 (98.53), С-8 (93.86).
9.	Мирицитрин (3- <i>O</i> - α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона) C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂		Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество (см. п.2).
10.	Мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон)C ₁₅ H ₁₀ O ₈		Желто-зеленое кристаллическое вещество (см. п.3).

3.5. Исследование компонентного состава коры и листьев ореха черного методом ВЭЖХ

Проведен предварительный ВЭЖХ-анализ компонентного состава образцов коры и листьев ореха черного. Из коры и листьев ореха черного получали водно-спиртовые извлечения, которые были использованы для качественного анализа – идентификации БАС.

Анализировали водно-спиртовые извлечения с использованием стандартных образцов мирицитрина (1), мирицетина (2), кверцитрина (3). Исходя из спектральных данных, поскольку все указанные соединения имеют в длинноволновой области электронного спектра максимум поглощения при 360 ± 2 нм, нами была выбрана 360 нм длина волны для детекции анализируемых веществ при проведении ВЭЖХ-анализа.

Объемы инжестируемых проб для извлечений из коры и листьев ореха черного, а также растворов СО мирицитрина, мирицетина, кверцитрина, югланина – 4 мкл.

Определено, что в заданных условиях хроматографирования при использовании системы ацетонитрил – вода в соотношении 2:8 в извлечении коры ореха черного возможно идентифицировать анализируемый компонент – мирицитрин (рис. 17). При сравнении времени удерживания пика стандартного образца мирицитрина (рис. 15) и индивидуального соединения на хроматограмме извлечения коры ореха черного (рис. 17) выявлено, что мирицитрин является диагностически значимым соединением извлечения коры ореха черного, и соответственно растительного сырья.

Установлено, что в системе ацетонитрил-вода в соотношении 2:8 также возможно определить агликон мирицитрина – мирицетин (рис. 16 и 17). Показатель времени удерживания мирицитрина и мирицетина на хроматограмме стандартного образца мирицитрина и мирицетина 7,326 мин и 14,211 мин соответственно. В извлечении из коры ореха черного время удерживания пика мирицитрина 7,949 мин, время удерживания пика мирицетина 15,123 мин.

При добавлении растворов стандартных образцов мирицитрина и

мирицетина в извлечение на ВЭЖХ-хроматограмме регистрируется увеличение единиц оптической плотности пиков мирицитрина и мирицетина соответственно по отношению к первоначальным единицам оптической плотности пиков мирицитрина и мирицетина в исходном растворе извлечения (рис. 18).

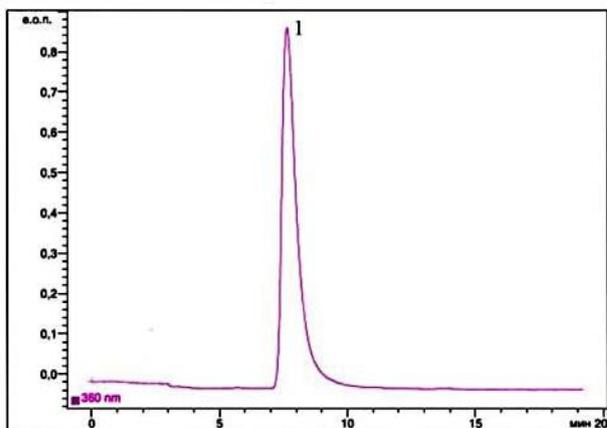


Рисунок 15 - ВЭЖХ-хроматограмма мирицитрина.

Обозначения: 1 – мирицитрин.

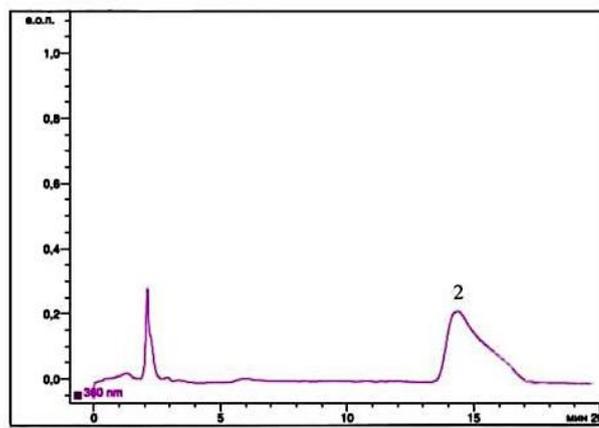


Рисунок 16 - ВЭЖХ-хроматограмма мирицетина.

Обозначения: 2 – мирицетин.

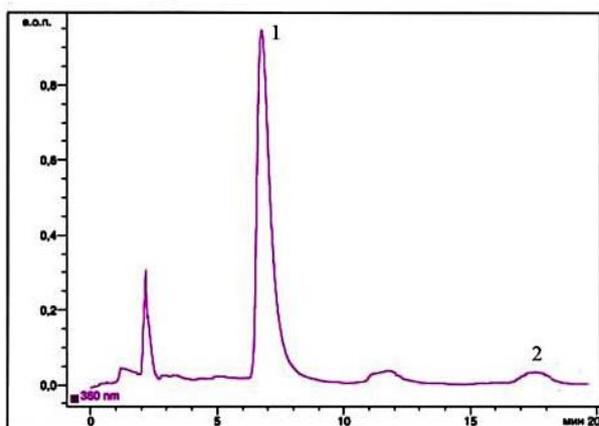


Рисунок 17 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из коры ореха черного.

Обозначения: 1 – мирицитрин; 2 – мирицетин.

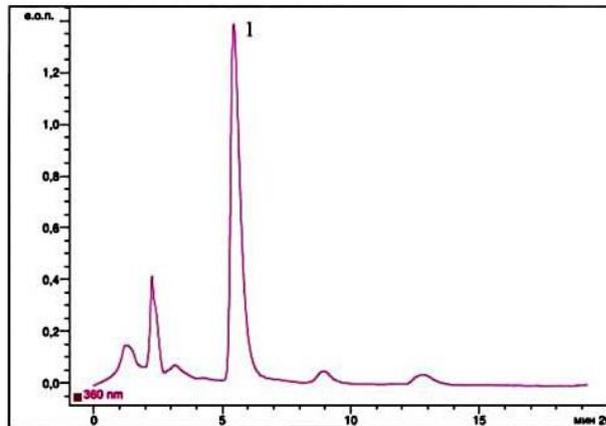


Рисунок 18 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из коры ореха черного с добавлением мирицетина.

Обозначения: 1 – мирицитрин.

При изучении испытуемого раствора извлечения листьев ореха черного в тех же условиях хроматографирования возможно идентифицировать

анализируемые компоненты системы – мирицитрин (рис. 15 и 20) и кверцитрин (рис. 19 и 20).

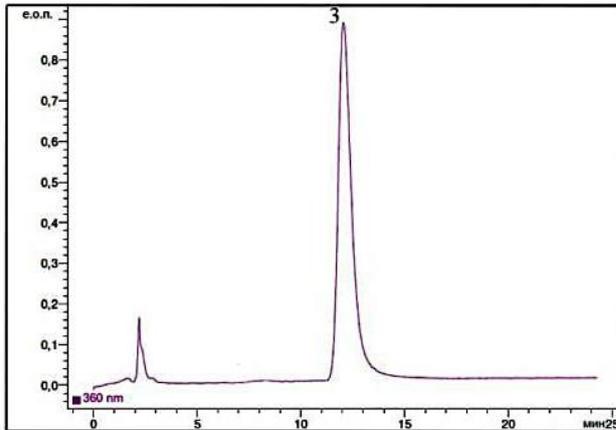


Рисунок 19 – ВЭЖХ-хроматограмма кверцитрина.
Обозначения: 3 – кверцитрин.

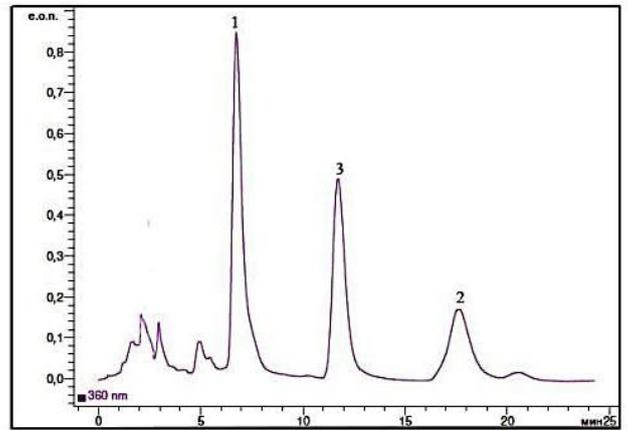


Рисунок 20 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного.
Обозначения: 1 – мирицитрин; 2 – мирицетин; 3 – кверцитрин.

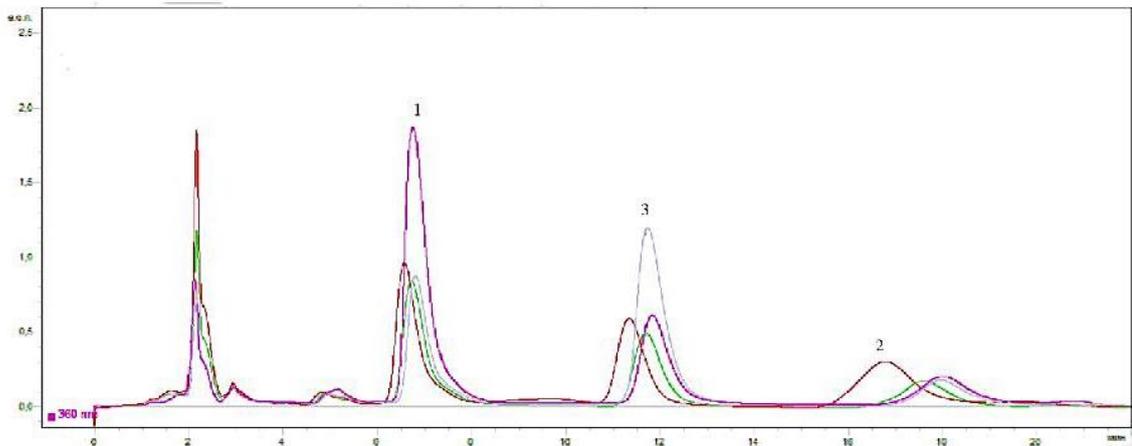


Рисунок 21 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного с добавлением стандартных образцов.
Обозначения: 1 – мирицитрин; 2 – мирицетин; 3 – кверцитрин.

Кроме того, выявлено, что при использовании системы ацетонитрил-вода в соотношении 2:8 для анализа того же вида лекарственного растительного сырья возможно идентифицировать агликон мирицитрина – мирицетин (рис. 16 и 20).

Время удерживания пиков мирицитрина, кверцитрина и мирицетина на соответствующих хроматограммах рабочих стандартных образцов, а также в

извлечении из листьев ореха черного представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Времена удерживания пиков флавоноидов листьев ореха черного

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Мирицитрин (1)	6,526	6,856
Кверцитрин (3)	11,342	11,724
Мирицетин (2)	14,211	17,631

При добавлении растворов стандартных образцов мирицитрина, кверцитрина и мирицетина в извлечение листьев ореха черного на хроматограмме регистрируется увеличение интенсивности пиков мирицитрина, кверцитрина и мирицетина соответственно по отношению к пикам указанных соединений в исходном испытуемом растворе (рис. 21).

По результатам проведенных фармакогностических исследований были установлены особенности флавоноидного состава изучаемых объектов – коры и листьев ореха черного. Определено, что диагностически значимыми соединениями коры и листьев ореха черного являются мирицитрин и кверцитрин.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Выполненное сравнительное хроматографическое исследование растительного сырья видов рода *Juglans* позволило выявить наличие флавоноидов в коре и листьях ореха черного, листьях ореха грецкого и ореха серого.

2. Для спектров поглощения исследуемых образцов коры и листьев ореха черного установлено появление батохромного сдвига длинноволновой полосы поглощения при внесении комплексообразователя – спиртового раствора $AlCl_3$, что свидетельствует о вкладе флавоноидов в спектр поглощения. В условиях дифференциальной спектрофотометрии для коры ореха черного зарегистрирован максимум поглощения в области 414-418 нм, для листьев ореха черного установлен максимум поглощения в области 410-414 нм. Характер спектров поглощения листьев и коры ореха черного во многом определяют соединения, используемые ранее в ТСХ-анализе сырья – мирицитрин и кверцитрин. Данные виды растительного сырья выбраны для дальнейшего исследования химического состава, как наиболее перспективные источники биологически активных соединений флавоноидной природы.

3. 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 (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). Кроме того, был 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-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавона) и его агликон кверцетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон), мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона) и его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон). Все указанные индивидуальные соединения, кроме этоксиюглона, были ранее выделены из листьев ореха черного.

4. Проведенное исследование компонентного состава коры и листьев ореха черного методом ВЭЖХ позволило установить, что диагностически значимым флавоноидом коры ореха черного является мирицитрин. Диагностически значимыми флавоноидами для листьев ореха черного являются мирицитрин и кверцитрин.

5. С использованием метода ВЭЖХ определено, что химический состав листьев и коры ореха черного коррелирует между собой, при этом диагностически значимым соединением является мирицитрин (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона). Указанный факт свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения коры и листьев *Juglans nigra* L. в части разработки подходов к качественной и количественной оценке доброкачественности новых видов лекарственного растительного сырья.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО (*JUGLANS NIGRA* L.)

Для включения соответствующего лекарственного растительного сырья в Государственную фармакопею РФ, необходимо проведение комплекса исследований, в том числе разработки методик качественного (морфолого-анатомический анализ, идентификация основных групп БАС хроматографическими и спектрофотометрическими методами) и количественного определения содержания основной группы биологически активных соединений, итогом которой является подготовка соответствующей нормативной документации, регламентирующей его доброкачественность. На данный момент в текущем издании Государственной Фармакопеи РФ отсутствуют ФС на РС видов рода Орех (*Juglans* L.), в том числе и на кору и листья ореха черного.

Учитывая достаточную трудоемкость в ходе проведения пробоподготовки, сложность проведения анализа для нафтохинонов в качестве целевой группы БАС, а также недостаточность литературной базы относительно стандартизации коры и листьев *Juglans nigra* L., актуальным является продолжение исследований в данном направлении.

Данная глава посвящена разработке и реализации методик идентификации основных групп БАС, а также их количественного определения в коре и листьях ореха черного (*Juglans nigra* L.) с использованием современных инструментальных методов анализа – хроматографических и фотометрических.

4.1. Разработка методик качественного анализа коры и листьев ореха черного методом ТСХ и спекрофотометрии

Проведенное предварительного фармакогностического исследования позволило выделить и идентифицировать диагностически значимое соединение коры ореха черного – мирицитрин. Его зоны адсорбции и обнаруживаются во всех хроматограммах образцов извлечений коры ореха черного (рис. 22). Поэтому в качестве внутреннего свидетеля нами предлагается использовать стандартный образец мирицитрина.

При исследовании извлечений из коры ореха черного методом

тонкослойной хроматографии установлена хроматографическая зона адсорбции на уровне стандартного образца мирицитрина ($R_f = 0,4$). После процедуры детектирования физическими (характер свечения в ультрафиолетовом свете) и химическими (ДСК и спиртовой раствор $AlCl_3$) методами идентифицируется соединение флавоноидной природы, которое по подвижности и окраске соответствует СО мирицитрина (рис. 22).

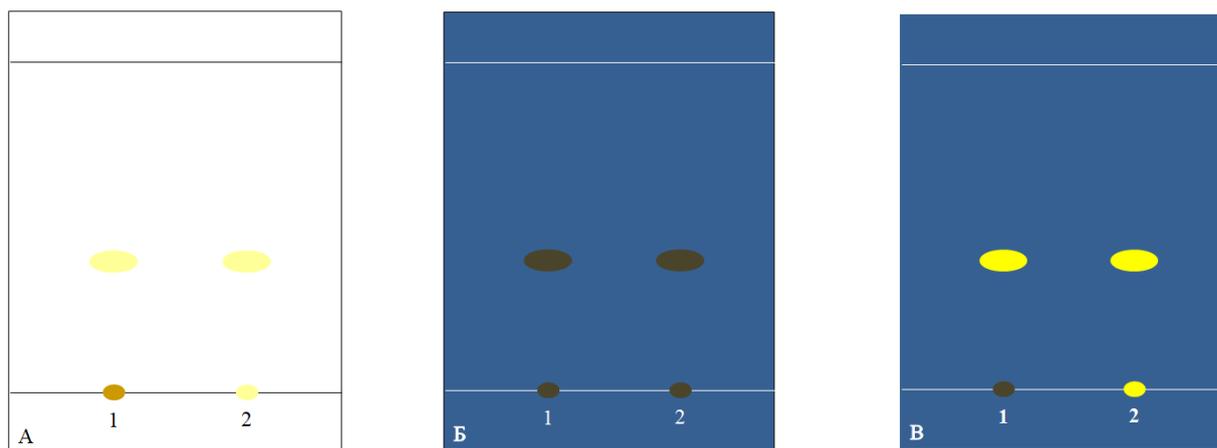


Рисунок 22 – Схема хроматограммы анализа водно-спиртовых извлечений коры ореха черного в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм; В - детекция детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия ($AlCl_3$)

Обозначения: 1– 80% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО мирицитрина.

Методика определения основных групп биологически активных соединений (флавоноидов). Испытуемый раствор коры *Juglans nigra* L., спиртовой раствор СО мирицитрина объемом 20 мкл с помощью стеклянной микропипетки наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом (силикагель) и закрепляют спиртом этиловым 96 %. Пластинку с нанесенными пробами просушивают, погружают в хроматографическую камеру с элюентной системой хлороформ: этанол: вода (28:15:2) и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюентной системы 80-90% длины пластинки, ее извлекают из хроматографической камеры, высушивают до удаления следов элюентов и просматривают в видимом и УФ-свете при длине

волны 365 нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Детектирование хроматографических пластин представлено в таблице 7.

Предварительное фармакогностическое исследование листьев ореха черного позволило выделить и идентифицировать два диагностически значимых соединений листьев ореха черного – мирицитрин и кверцитрин. Зоны адсорбции указанных индивидуальных веществ должны обнаруживаться в хроматограммах образцов извлечений листьев ореха черного (рис. 23). Поэтому в качестве веществ-свидетелей мы предлагаем использовать СО мирицитрина и СО кверцитрина.

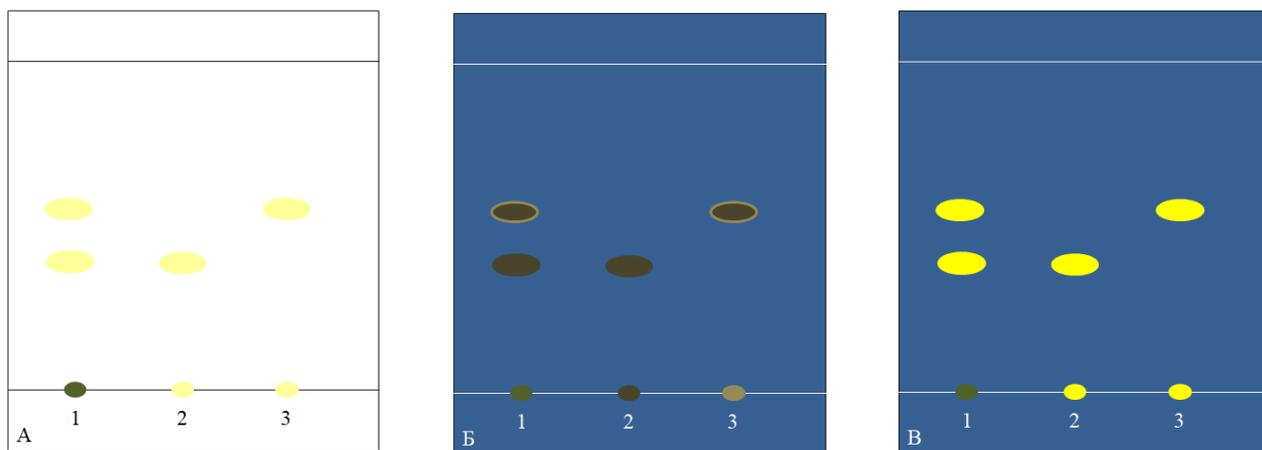


Рисунок 23 – Схема хроматограммы анализа водно-спиртового извлечения листьев ореха черного в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм; В - детекция детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия ($AlCl_3$)

Обозначения: 1– 80% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО мирицитрина, 3 – СО кверцитрина.

При исследовании извлечений из листьев ореха черного методом тонкослойной хроматографии установлены хроматографические зоны адсорбции на уровне стандартных образцов мирицитрина ($R_f = 0,4$) и кверцитрина ($R_f = 0,65$). После процедуры детектирования физическими (характер свечения в ультрафиолетовом свете) и химическими (ДСК и спиртовой раствор $AlCl_3$)

методами идентифицируются биологически активные соединения флавоноидной природы, которые по подвижности и окраске совпадают со стандартными образцами мирицитрина и кверцитрина.

Методика определения основных групп биологически активных соединений (флавоноидов). Испытуемый раствор листьев *Juglans nigra* L., спиртовые растворы СО мирицитрина и кверцитрина объемом 20 мкл с помощью стеклянной микропипетки наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом (силикагель) и закрепляют спиртом этиловым 96 %. Пластинку с нанесенными пробами просушивают, погружают в хроматографическую камеру с элюентной системой хлороформ: этанол: вода (28:15:2) и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюентной системы 80-90% длины пластинки, ее извлекают из хроматографической камеры, высушивают до удаления следов элюентов и просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. Затем пластинку обрабатывают 3% спиртовым раствором $AlCl_3$ и просматривают в УФ-свете при $\lambda=365$ нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Детектирование хроматографических пластин представлено в таблице 7.

ТСХ-методики качественной оценки доброкачественности коры и листьев *Juglans nigra* L. представлены в проектах ФС на новые виды растительного сырья «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья».

Таблица 7 – 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 (λ=365 нм)	Детекция раствором диазобензолсульфоки слоты
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. 8).

Таблица 8 – 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

Таким образом, характер спектров поглощения извлечений коры и листьев ореха черного позволяет подтвердить полученные данные тонкослойной хроматографии и использование в качестве стандартных образцов кверцитрина и мирицитрина при разработке методик количественного анализа.

4.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного за прототип была принята методика Чалештори и соавторов. Анализ содержания флавоноидов в листьях *Juglans regia* L. осуществлялся в пересчете на рутин при $\lambda = 415$ нм, пробоподготовку сырья проводили путем экстрагирования 70 % этиловым спиртом [117].

Опираясь на указанную методику, были определены основные параметры пробоподготовки. Оптимальные условия экстракции флавоноидов из коры ореха черного методики количественного определения суммы флавоноидов включают: экстрагент – 80 % этиловый спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:30; время экстракции на кипящей водяной бане – 60 минут, степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 9).

Таблица 9 – Влияние условий экстракции на степень извлечения суммы флавоноидов из коры *Juglans nigra* L.

№ п.п.	Экстрагент	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин и абсолютно сухое сырье (в %)
Выбор экстрагента					
1.	40% этиловый спирт	1:30	60	2	2,49±0,20
2.	50% этиловый спирт	1:30	60	2	2,67±0,23
3.	60% этиловый спирт	1:30	60	2	2,78±0,29
4.	70% этиловый спирт	1:30	60	2	2,95±0,26
5.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,09±0,27
6.	90% этиловый спирт	1:30	60	2	2,87±0,24
7.	96% этиловый спирт	1:30	60	2	2,68±0,25
Определение времени экстракции					
8.	80% этиловый спирт	1:30	30	2	2,75±0,22
9.	80% этиловый спирт	1:30	45	2	2,93±0,24
10.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,14±0,25
11.	80% этиловый спирт	1:30	90	2	2,95±0,28
12.	80% этиловый спирт	1:30	120	2	2,83±0,26
Соотношение «сырье:экстрагент»					
13.	80% этиловый спирт	1:20	60	2	2,98±0,27
14.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,12±0,23
15.	80% этиловый спирт	1:50	60	2	3,06±0,28

Степень измельчения сырья					
16.	80% этиловый спирт	1:30	60	1	2,85±0,22
17.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,17±0,27
18.	80% этиловый спирт	1:30	60	3	2,79±0,29

Зависимость оптической плотности от концентрации мирицитрина описывалась графиком линейной регрессии в диапазоне концентраций от 400 до 3000 мкг/мл (рис. 24).

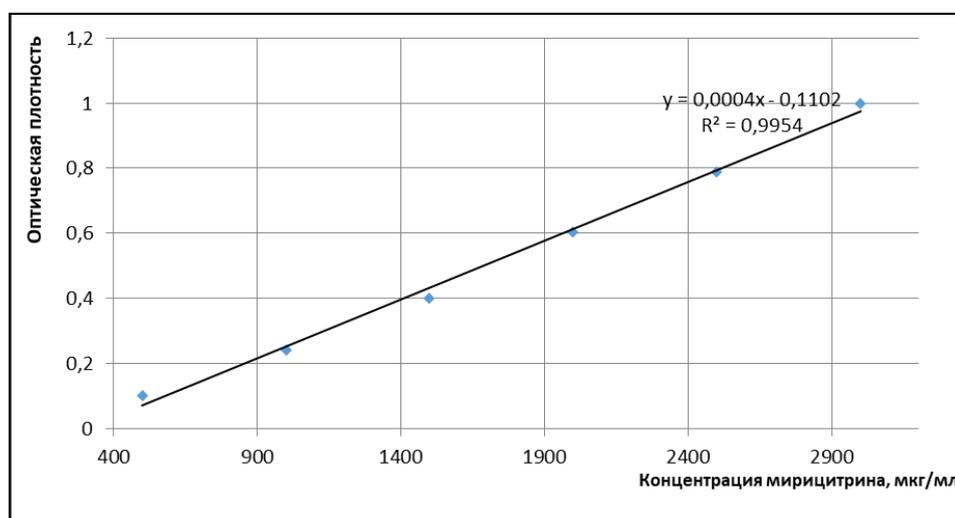


Рисунок 24 – Градуировочный график содержания мирицитрина и уравнение линейной регрессии.

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:

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

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_o – оптическая плотность раствора СО мирицитрина;

m – масса сырья, г;

m_o – масса СО мирицитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

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.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_o – масса СО мирицитрина, г;

432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО мирицитрина при 416 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

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. составляет $\pm 8,58$ % [ДИ 95 %] (табл. 10).

Таблица 10 – 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	0,015	0,12	0,037	95	2,23	$\pm 0,27$	0,08	$\pm 8,58$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. Статистическая обработка результатов эксперимента). 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 (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты определения правильности методики количественного анализа суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре *Juglans nigra* L.

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/мл	Добавлено мирицитрина, мг/мл	Содержание суммы флавоноидов, мг/мл		Систематическая составляющая неопределенности (δ)	
		Введенное количество	Найденное количество	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
31,7	7,70	39,40	37,19	-2,21	-5,61
31,7	15,30	46,00	48,06	+2,06	+4,47
31,7	23,00	54,70	52,73	-1,97	-3,60

Таблица 12 – Содержание суммы флавоноидов в образцах коры *Juglans nigra* L.

№ п/п	Время и место заготовки коры ореха черного	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на мирицитрин
1.	Ботанический сад Самарского университета (март 2018 г.)	3,09±0,21
2.	Ботанический сад Самарского университета (март 2019 г.)	2,94±0,24
3.	Ботанический сад Самарского университета (март 2020 г.)	3,17±0,27
4.	Ботанический сад Самарского университета (март 2021 г.)	3,02±0,26

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд

образцов коры ореха черного (табл. 12). Определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного варьирует от 2,94 % до 3,17 %.

4.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин листьях ореха черного

Указанная ранее методика количественного определения суммы флавоноидов [117] также была модифицирована и для листьев ореха черного.

Для растительного сырья листьев *Juglans nigra* L. были определены основные параметры пробоподготовки. Оптимальные условия экстракции флавоноидов из листьев *Juglans nigra* L. методики количественного определения суммы флавоноидов включают: экстрагент – 80 % этиловый спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:30; время экстракции на кипящей водяной бане – 30 мин, степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 13).

Таблица 13 – Влияние условий экстракции на степень извлечения суммы флавоноидов из листьев *Juglans nigra* L.

№ п.п.	Экстрагент	Соотношение сырья:экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения РС, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин и абсолютно сухое сырье (в %)
Выбор экстрагента					
1.	40% этиловый спирт	1:30	60	2	2,75±0,28
2.	50% этиловый спирт	1:30	60	2	2,82±0,26
3.	60% этиловый спирт	1:30	60	2	2,91±0,25
4.	70% этиловый спирт	1:30	60	2	3,02±0,27
5.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,11±0,25
6.	90% этиловый спирт	1:30	60	2	3,04±0,29
7.	96% этиловый спирт	1:30	60	2	2,85±0,23

Определение времени экстракции					
8.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	15	2	2,86±0,24
9.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	30	2	3,24±0,26
10.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	45	2	3,05±0,28
11.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	60	2	2,86±0,25
12.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	90	2	2,75±0,21
13.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	120	2	2,65±0,27
Соотношение «сырье:экстрагент»					
14.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:20	30	2	3,04±0,26
15.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	30	2	3,22±0,22
16.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:50	30	2	3,15±0,28
Степень измельчения сырья					
17.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	30	1	3,10±0,25
18.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	30	2	3,28±0,27
19.	80% ЭТИЛОВЫЙ спирт	1:30	30	3	3,05±0,23

Зависимость оптической плотности от концентрации мирицитрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 400 до 3000 мкг/мл (рис. 24).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха черного. Аналитическую пробу листьев *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. 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 (см. 4.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного).*

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

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

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, %.

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.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО мирицитрина, г;

432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) СО мирицитрина при 416 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

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. составляет $\pm 8,21$ % [ДИ 95 %] (табл. 14).

Таблица 14 – Метрологические характеристики средних результатов 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	0,015	0,12	0,037	95	2,23	$\pm 0,27$	0,08	$\pm 8,21$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. *Статистическая обработка результатов эксперимента*). 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 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками мирицитрина, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности (табл. 15).

Таблица 15 – Результаты определения правильности методики количественного анализа суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях *Juglans nigra* L.

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
32,8	8,20	41,00	38,87	-2,13	-5,19
32,8	16,40	49,20	47,19	-2,01	-4,08
32,8	24,60	57,40	59,24	+1,84	+3,21

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов листьев ореха черного (табл. 16). Определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях ореха черного от 3,02 % до 3,28 %.

Таблица 16 – Содержание суммы флавоноидов в образцах листьев *Juglans nigra* L.

№ п/п	Время и место заготовки листьев ореха черного	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на мирицитрин
1.	Ботанический сад Самарского университета (июнь 2018 г.)	3,17±0,26
2.	Ботанический сад Самарского университета (июнь 2019 г.)	3,02±0,23
3.	Ботанический сад Самарского университета (июнь 2020 г.)	3,28±0,27
4.	Ботанический сад Самарского университета (июнь 2021 г.)	3,11±0,25

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о рациональности контроля качества коры и листьев ореха черного с помощью методики определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 416 нм. Разработанная методика количественного определения отвечает основным параметрам валидации: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость.

4.4. Разработка методики количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ

Для разработки методики количественного определения содержания мирицитрина методом ВЭЖХ в коре ореха черного в качестве прототипа была использована методика ВЭЖХ анализа листьев ореха грецкого градиентным элюированием и детектированием на диодной матрице. Разделение осуществляли на колонке Hypersil Gold C18 с обращенной фазой (размер частиц 5 мкм, 250 × 4,6 мм). Подвижная фаза состояла из 1% водного раствора уксусной кислоты (А) и метанола (Б) [150]. Хроматографические параметры разработанной методики представлены в главе 2. Отличием является состав элюентной системы, длины волн для детектирования, время анализа, а также использование изократического элюирования.

Испытуемые растворы извлечений коры 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.

Учитывая низкое содержание мирицитрина в испытуемом растворе извлечения, количественное определение проводим только по мирицитрину. Зависимость площади хроматографического пика от концентрации мирицитрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 250 до 2000 мкг/мл (рис. 25).

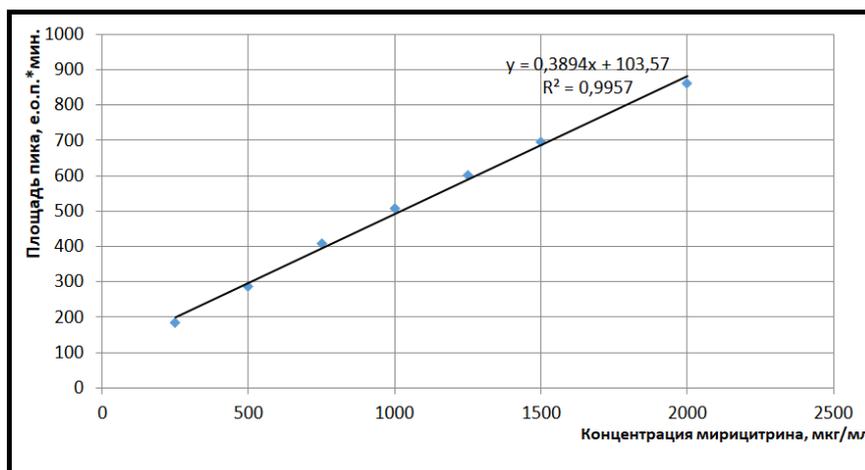


Рисунок 25 – Градуировочный график содержания мирицитрина и уравнение линейной регрессии.

Методика количественного определения мирицитрина в коре ореха черного. Аналитическую пробу коры *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую посуду со шлифом вместимостью 100 мл переносят около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл 80 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Колбу с полученным извлечением охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, взвешивают и при необходимости восполняют недостающую массу содержимого путем добавления экстрагента до первоначального значения. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная полоса и дополнительно через мембранный фильтр Milipore с диаметром пор 0,45 мкм (раствор А испытуемого извлечения).

(Хроматографические параметры см. 2.3.3. Физико-химические методы анализа. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)).

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 *Juglans nigra* L. 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 составляет $\pm 7,88\%$ [ДИ 95 %] (табл. 17).

Таблица 17 – 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	0,012	0,11	0,033	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. (табл. 18).

Таблица 18 – Определение пригодности хроматографической колонки КАХ-6-80-4

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	5115	Не менее 2000

		теоретических тарелок
Разрешение между пиками	1,74	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,35	Не более 1,5

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. *Статистическая обработка результатов эксперимента*). 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 (табл. 19).

Таблица 19 – Результаты определения правильности методики количественного анализа мирицитрина в коре ореха черного

Исходное содержание мирицитрина, мг/мл	Добавление мирицитрина, мг/мл	Содержание мирицитрина, мг/мл		Систематическая составляющая неопределенности (δ)	
		Введенное количество	Найденное количество	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
31,0	7,75	38,75	40,61	+1,86	+4,80
31,0	15,50	46,50	44,70	-1,80	-3,87
31,0	23,25	54,25	55,99	+1,74	+3,21

Таблица 20 – Содержание мирицитрина в образцах коры ореха черного

№ п/п	Время и место заготовки коры ореха черного	Содержание мирицитрина (%)
1.	Кора ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, апрель 2018 г.)	3,08±0,19
2.	Кора ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, март 2019 г.)	3,14±0,22
3.	Кора ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, март 2020 г.)	3,10±0,24

С использованием указанной методики был проанализирован ряд образцов коры ореха черного (табл. 20). Содержание доминирующего флавоноида – мирицитрина (мирицетин-3-О- α -L-рамнопиранозид) в коре ореха черного варьировало от $(3,08 \pm 0,19)\%$ до $(3,14 \pm 0,22)\%$.

4.5. Разработка методики количественного определения мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного методом ВЭЖХ

Указанная ранее методика количественного оценки содержания полифенолов в листьях ореха грецкого [150] была модифицирована и для листьев ореха черного. В результате получена методика количественного определения содержания мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного с использованием ВЭЖХ.

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

Проверка пригодности хроматографической системы (см. 4.4. *Разработка методики количественного определения мирицитрина в коре ореха черного методом ВЭЖХ*) (табл. 21).

Таблица 21 – Определение пригодности хроматографической колонки КАХ-6-80-4

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	5111	Не менее 2000 теоретических тарелок
Разрешение между пиками	1,63	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,38	Не более 1,5

По результатам анализа анализа компонентного состава листьев (глава 3), целесообразно количественное определение осуществлять отдельно по мирицитрину и по кверцитрину. Зависимость площади хроматографического пика

от концентрации мирицитрина и кверцитрина описывались линейной регрессией в диапазоне концентраций от 250 до 2000 мкг/мл (рис. 25 и 26).

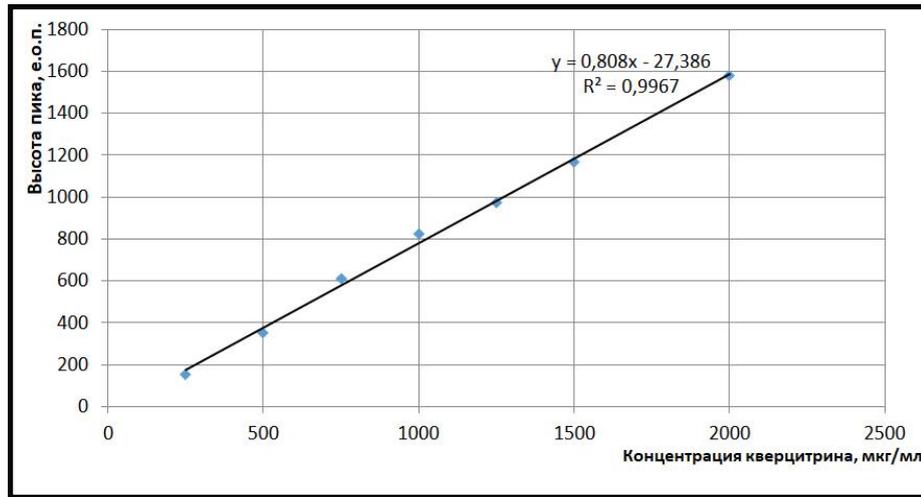


Рисунок 26 – Градуировочный график содержания кверцитрина и уравнение линейной регрессии.

Методика количественного определения мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного. Аналитическую пробу листьев *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую посуду со шлифом вместимостью 100 мл переносят около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл 80 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 минут. Колбу с полученным извлечением охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, взвешивают и при необходимости восполняют недостающую массу содержимого путем добавления экстрагента до первоначального значения. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная полоса и дополнительно через мембранный фильтр Milipore с диаметром пор 0,45 мкм (раствор А испытуемого извлечения).

Хроматографические параметры и процедура определения представлена в *Приложении 6. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Ореха черного листа».*

Содержание миритрина (кверцитрина) в листьях *Juglans nigra* L. 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 миритрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО миритрина, вычисленное из хроматограмм раствора СО миритрина; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора СО миритрина, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора СО миритрина, мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО миритрина, г; 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 миритрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. составляет $\pm 8,05$ % и $\pm 11,11$ % соответственно [ДИ 95 %] (табл. 22).

Таблица 22 – Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения миритрина и кверцитрина в листьях ореха черного

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	$\pm 0,21$	0,06	$\pm 8,05$
11	10	1,41	0,006	0,077	0,023	95	2,23	$\pm 0,17$	0,05	$\pm 11,11$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. *Статистическая обработка результатов эксперимента*). Линейную зависимость площади пика от концентрации в диапазоне от 250 до 2000 мкг/мл СО миритрина (кверцитрина) определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации

определении СО мирицитрина составил 0,9957. Коэффициент детерминации при определении СО кверцитрина – 0,9967.

Правильность методики определяли методом добавок. Для каждой концентрации проводили по три определения (табл. 23 и 24). Систематическая составляющая неопределенности определения содержания мирицитрина – 4,75 %. Систематическая составляющая неопределенности определения содержания кверцитрина – 8,88 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками стандартных образцов, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности.

Таблица 23 – Результаты определения правильности методики количественного анализа мирицитрина в листьях ореха черного

Исходное содержание мирицитрина, мг/мл	Добавление мирицитрина, мг/мл	Содержание мирицитрина, мг/мл		Систематическая составляющая неопределенности (δ)	
		Введеное количество	Найденное количество	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
26,2	6,55	32,75	30,86	-1,89	-5,77
26,2	13,10	39,30	41,12	+1,82	+4,63
26,2	19,65	45,85	44,08	-1,77	-3,86

Таблица 24 – Результаты определения правильности методики количественного определения кверцитрина в листьях ореха черного

Исходное содержание кверцитрина, мг/г	Добавление кверцитрина, мг/г	Содержание кверцитрина, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
14,1	3,53	17,63	15,71	-1,92	-10,89
14,1	7,05	21,15	19,32	-1,83	-8,65
14,1	10,58	24,68	26,43	+1,75	+7,09

С использованием указанных методик был проанализирован ряд образцов листьев ореха черного (табл. 25). Содержание доминирующего флавоноида –

мирицитрина (мирицетин-3-О- α -L-рамнопиранозид) в листьях ореха черного варьировало от (2,58 \pm 0,19)% до (2,67 \pm 0,23)%. Содержание кверцитрина (кверцетин-3-О- α -L-рамнопиранозид) составляло от (1,36 \pm 0,17)% до (1,45 \pm 0,16)%.

Таблица 25 – Содержание мирицитрина и кверцитрина в объектах исследования

№ п/п	Время и место заготовки листьев ореха черного	Содержание мирицитрина (%)	Содержание кверцитрина (%)
1.	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, июнь 2018 г.)	2,58 \pm 0,19	1,45 \pm 0,16
2.	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, июнь 2019 г.)	2,67 \pm 0,23	1,36 \pm 0,14
3.	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, июнь 2020 г.)	2,62 \pm 0,21	1,41 \pm 0,17

Таким образом, результаты проведенных исследований показали удовлетворительные метрологические характеристики предлагаемых для стандартизации коры и листьев ореха черного ВЭЖХ-методики количественного оценки содержания доминирующих и диагностически значимых флавоноидов данного сырья - мирицитрина и кверцитрина с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при длине волны 360 нм.

4.6. Изучение динамики накопления биологически активных соединений в листьях ореха черного

Под влиянием условий среды содержание БАС на протяжении вегетационного периода растения может постоянно колебаться. Существует необходимость в исследовании определения уровня содержания и динамики накопления действующих веществ в изучаемом сырье для создания рекомендаций по рациональной заготовке лекарственного растительного сырья.

Исследовали образцы листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.), собранные во время вегетационного периода (май-сентябрь) 2019-2021 годов в Ботаническом

саду Самарского университета (г. Самара). Для анализа получали водно-спиртовые испытуемые извлечения листьев *Juglans nigra* L., а также СО мирицитрина и оценивали содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях ореха черного в условиях дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda = 416$ нм по разработанной ранее методике.

Результаты произведенного анализа динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного представлены в таблице 26. Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что количество флавоноидов в листьях *Juglans nigra* L. варьирует в течение вегетационного периода. Наибольшая концентрация указанной группы БАС в листьях *Juglans nigra* L. вегетационного периода каждого из трех лет приходится на конец мая и начало июня. Динамика накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного за весь период исследования представлена на рисунке 27.

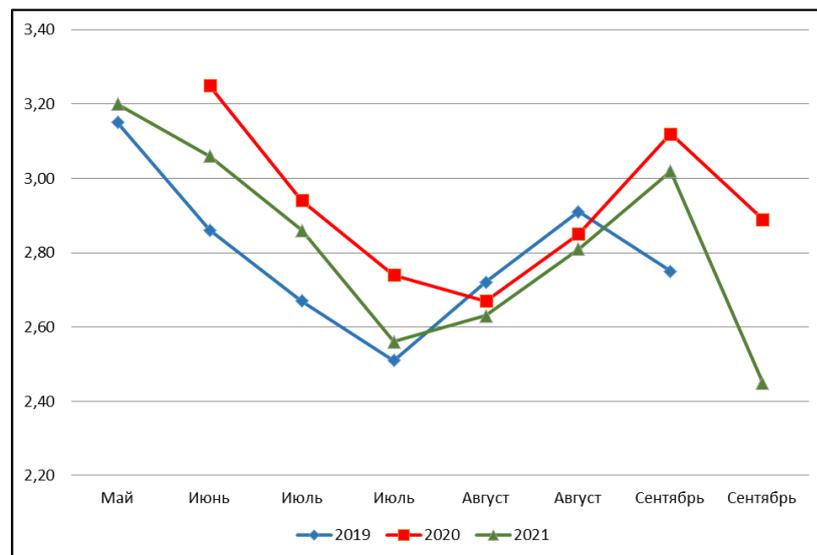


Рисунок 27 – Динамика накопления флавоноидов в листьях *Juglans nigra* L. за весь период исследования

Таким образом, сбор листьев ореха черного рекомендуется проводить в период конца мая и начала июня.

Таблица 26 – Результаты определения динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного в течение вегетационного периода 2019 – 2021 годов

2019		2020		2021	
Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на мирицитрин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на мирицитрин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на мирицитрин, %
29.05.2019	3,15±0,28	11.06.2020	3,25±0,26	25.05.2021	3,20±0,27
12.06.2019	2,86±0,25	27.06.2020	2,94±0,22	13.06.2021	3,06±0,29
08.07.2019	2,67±0,24	16.07.2020	2,74±0,25	29.06.2021	2,86±0,23
21.07.2019	2,51±0,23	04.08.2020	2,67±0,21	15.07.2021	2,56±0,24
15.08.2019	2,72±0,26	20.08.2020	2,85±0,24	27.07.2021	2,63±0,26
30.08.2019	2,91±0,22	03.09.2020	3,12±0,27	16.08.2021	2,81±0,24
13.09.2019	2,75±0,25	23.09.2020	2,89±0,22	01.09.2021	3,02±0,27
		-		30.09.2021	2,45±0,25

4.7. Определение показателей качества новых видов лекарственного растительного сырья «Ореха черного кора» и «Ореха черного листа»

В целях подготовки проектов фармакопейной статьи на новые виды растительного сырья - «Ореха черного кора» и «Ореха черного листа» (цельное и измельченное сырье) в соответствии с методиками ГФ РФ XIV издания были определены числовые показатели качества сырья [11, 12, 43]. Показатели установлены при изучении 21 образца сырья, находящихся на хранении в течение 4 лет. На основании полученных данных рекомендован срок хранения сырья коры и листьев ореха черного в течение 2 лет. Результаты определения числовых показателей качества цельного и измельченного сырья представлены в таблице 27.

Результаты определения показателей качества сырья коры и листьев ореха черного включены в проекты ФС на новые виды лекарственного растительного сырья - «Ореха кора» и «Ореха черного листа».

Таким образом, для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. рекомендуются оптимальные значения нижнего предела флавоноидов не менее 2,5 % и не менее 3,0 % соответственно. Числовой показатель нижнего предела содержания мирицитрина в коре *Juglans nigra* L. не менее 2,0 %; показатель нижнего предела содержания мирицитрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. не менее 1,5 % и 1,0 % соответственно.

Таблица 27 - Результаты определения числовых показателей качества цельного и измельченного сырья коры и листьев ореха черного

Испытания	Содержание для цельного сырья	Нормируемый показатель для цельного сырья	Содержание для измельченного сырья	Нормируемый показатель для измельченного сырья
Ореха черного кора				
Влажность	От 8,66 до 9,52 %	не более 12 %	От 8,78 до 9,36 %	не более 12 %
Зола общая	От 6,11 до 8,94 %	не более 10 %	От 6,17 до 8,78 %	не более 10 %
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	От 0,12 до 0,75%	не более 1 %	От 0,17 до 0,79 %	не более 1 %
Измельченность сырья				
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм	От 2,31 до 4,76 %	не более 5 %	-	-
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм	-	-	От 3,03 до 4,75 %	не более 5 %
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм	-	-	От 3,21 до 4,83%	не более 5 %
Посторонние примеси				
Другие части растения (остатки древесины и веточек)	От 0,47 до 1,56 %	не более 2 %	От 0,38 до 1,49 %	не более 2 %

Сырье, изменившее окраску (потемневшее или почерневшее)	От 2,06 до 4,71 %	не более 5 %	От 2,12 до 4,92 %	не более 5 %
Органические примеси	От 0,27 до 1,06 %	не более 1,5 %	От 0,34 до 1,11 %	не более 1,5 %
Минеральные примеси	От 0,08 до 0,27 %	не более 0,5 %	От 0,05 до 0,31 %	не более 0,5 %
Количественное определение				
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин	От 2,82 до 3,17 %	не менее 2,5 %	От 2,82 до 3,17 %	не менее 2,5 %
Содержание мирицитрина	От 3,08 до 3,14 %	не менее 2,0 %	От 3,08 до 3,14 %	не менее 2,0 %
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 80 % этиловым спиртом	От 13,48 до 15,94%	не менее 13,0 %	От 13,41 до 15,87 %	не менее 13,0 %
Ореха черного листья				
Влажность	От 5,74 до 7,21 %	не более 8 %	От 5,76 до 7,23 %	не более 8 %
Зола общая	От 5,19 до 7,32 %	не более 8 %	От 5,17 до 7,28 %	не более 8 %
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	От 0,42 до 0,56 %	не более 1 %	От 0,39 до 0,52 %	не более 1 %
Измельченность сырья				
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм	От 2,31 до 4,23 %	не более 5 %	-	
Частиц, проходящих сквозь	-	-	От 2,64 до 6,27 %	не более 7 %

сито с отверстиями диаметром 5 мм				
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм	-	-	От 2,41 до 7,83 %	не более 8 %
Посторонние примеси				
Другие части растения (ветки, части соцветий)	От 0,39 до 1,12 %	не более 2 %	От 0,36 до 1,09 %	не более 2 %
Сырье, изменившее окраску (потемневшее или почерневшее)	От 1,42 до 2,14 %	не более 3 %	От 1,47 до 2,38 %	не более 3 %
Органические примеси	От 0,12 до 0,82 %	не более 1 %	От 0,18 до 0,96 %	не более 1 %
Минеральные примеси	От 0,07 до 0,34 %	не более 1 %	От 0,08 до 0,29 %	не более 1 %
Количественное определение				
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин	От 3,02 до 3,28 %	не менее 3,0 %	От 3,02 до 3,28 %	не менее 3,0 %
Содержание мирицитрина	От 2,58 до 2,67 %	не менее 1,5 %	От 2,58 до 2,67 %	не менее 1,5 %
Содержание кверцитрина	От 1,36 до 1,45 %	не менее 1,0 %	От 1,36 до 1,45 %	не менее 1,0 %
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 80 % этиловым спиртом	От 11,34 до 13,52%	не менее 11,0 %	От 11,43 до 13,68 %	не менее 11,0 %

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Разработаны методики определения мирицитрина и кверцитрина в водно-спиртовых извлечениях коры и листьев *Juglans nigra* L. методом хроматографии в тонком слое сорбента. В качестве веществ-свидетелей рекомендовано использовать стандартные образцы мирицитрина и кверцитрина.

2. Установлены максимумы поглощения извлечений коры и листьев ореха черного. Для коры и листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии максимумы поглощения определены при длине волны 416 ± 2 нм и 412 ± 2 нм соответственно, соответствующие максимуму поглощения раствора СО мирицитрина.

3. 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.

4. Разработаны методики количественной оценки содержания 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 2,67 % и 1,36 % до 1,45 % соответственно.

5. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. не менее 2,5 % и не менее 3,0 % соответственно. Введен числовой показатель содержания мирицитрина и кверцитрина для указанных видов сырья: мирицитрина не менее 2,0 % и 1,5 % для коры и листьев соответственно; кверцитрина не менее 1,0 % для листьев *Juglans nigra* L. Методики стандартизации и числовые показатели включены в проекты фармакопейной статьи на новые виды растительного сырья - «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья».

ГЛАВА 5. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *JUGLANS L.*

Одним из начальных этапов котроля качества растительного сырья является определение его доброкачественности методами морфолого-анатомического анализа. Целью исследования является возможность отдельно диагностировать целевой вид сырья и примесных видов. Данный метод диагностики растительного сырья является одним из ключевых в фармацевтическом анализе [99].

В литературных источниках содержится информация о применении в официальной и народной медицине перспективных морфологических органов РС видов рода Орех – коры, листьев и околоплодников [18, 25, 33, 35 40, 94]. В Фармакопею Китайской Народной Республики 2020 года включена ФС на плоды ореха грецкого, в которой находится раздел об идентификации плодов по морфолого-микроскопическим признакам. В нашей стране отсутствует нормативная документация, официально регламентирующая качество РС. По литературным данным известно, что зарубежные и отечественные ученые активно проявляли интерес к морфолого-анатомическому исследованию РС представителей рода Орех. В литературе описаны внешние и анатомо-микроскопические признаки листьев [20, 28, 34, 83, 85, 89, 124, 125], коры [19, 28] и околоплодников *Juglans L.* [7, 21, 55, 101, 102]. Данной информации недостаточно для морфолого-анатомической характеристики каждого вида в отдельности.

Вопрос подтверждения подлинности РС представителей рода Орех основывается лишь на морфолого-гистологических особенностях растений, поэтому остается актуальным направлением. Люминесцентный микроскопический анализ как один из современных и перспективных методов подтверждения подлинности РС позволяет детектировать локализацию вторичных метаболитов, имеющих диагностическое значение [12, 99].

Для включения растительного сырья видов рода Орех в Государственную Фармакопею РФ необходимо дополнить уже существующие результаты

морфолого-анатомического анализа в целях проектов Фармакопейной статьи «Ореха черного кора», «Ореха черного листа» в части «Микроскопические признаки».

В настоящей главе представлены результаты изучения морфолого-анатомических особенностей диагностики коры и листьев ореха черного с использованием люминесцентной микроскопии.

5.1. Морфолого-анатомическое исследование коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии

Учеными из Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета были разработаны основные характеристики подлинности коры видов рода *Juglans*, в том числе и ореха черного - *Juglans nigra* L [19, 28]. Установлено, что кора ореха черного по внешним признакам представляет собой трубчатые, желобоватые или плоские кусочки длиной до 15 см и шириной 2-3 см. Наружная поверхность коры тёмно-серого цвета, грубо шероховатая с крупными чечевичками и трещинами. С внутренней стороны кора светло-желтая, почти белая. На изломе кора ровная не ворсинистая. (рис. 28 А). По внешним признакам отличается от других видов коры наличием сильно шероховатой наружной поверхности с трещинами, более светлой внутренней стороны (рис. 28 А-В) [19, 28].



Рисунок 28 – Внешний вид коры рода *Juglans* L.: А – кора ореха черного (*Juglans nigra* L.); Б – кора ореха грецкого (*Juglans regia* L.); В – кора ореха серого (*Juglans cinerea* L.).

На поперечном срезе диагностируется достаточно развитая перидерма

(рис. 29 А). Обнаруживается тонкий пробковый слой от темно-коричневого до черного цвета с клетками неправильной формы и фрагментами отшелушивающейся пробки прошлого года. При рассмотрении пробковой ткани могут диагностироваться особые образования – чечевички (рис. 29 Б).

За счет чередования сердцевинных лучей и твердого и мягкого луба в коровой части можно легко визуализировать зону флоэмы (от камбия к периферии). В области чередования твердого и мягкого луба отчетливо видны группы лубяных волокон, клеточные стенки которых при дневном свете желтого цвета. Стенки лубяных волокон толстые, слоистые, одревесневшие. Во вторичной коре расположены одно-трехрядные сердцевинные лучи; встречаются группы склеренхимных клеток с утолщенными одревесневшими слоистыми стенками (рис. 29 В).

Основная паренхима коры мелкоклеточная. Протопласты клеток пигментированы в бурый, светло-желтый цвет (рис. 29 Г). В клетках паренхимы, особенно первичной, выделяются фрагменты механической ткани – брахисклерииды, и скопления друз оксалата кальция звездчатой формы (рис. 30 А, Б) [19, 28].

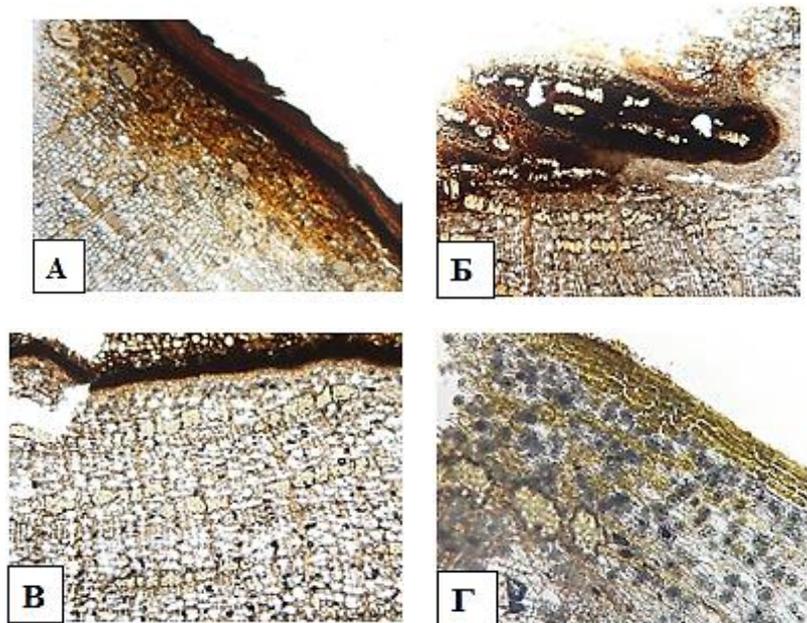


Рисунок 29 – Анатомическое строение коры ореха черного: А – поперечный срез – перидерма коры (x 40); Б – фрагмент пробки (феллемы) –

поперечное сечение (x 40); В – фрагмент лубяной части коры (x 40); Г – фрагмент основной паренхимы коры ореха черного (x 40).

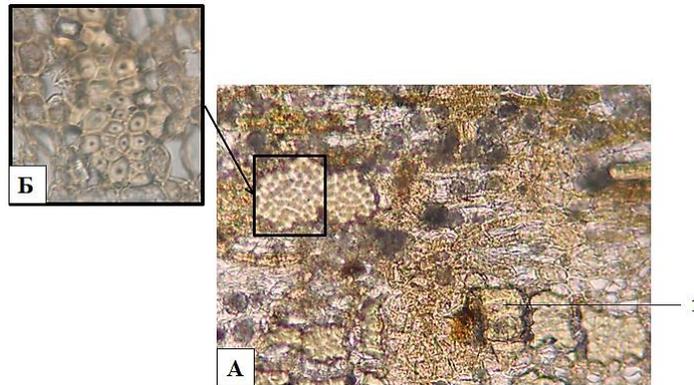


Рисунок 30 – Анатомическое строение коры ореха черного: А – (x100); Б – группы склеренхимных клеток на поперечном срезе (x400).

Обозначение: 1 – брахисклереиды

На первом этапе основного исследования с использованием метода люминесцентной микроскопии проводилось изучение внешнего вида кристаллов юглона, содержащихся в коре ореха черного по литературным данным, а также некоторых соединений флавоноидной структуры при дневном свете, а также с использованием УФ-света.

Анализ СО юглона показал, что в видимом свете его кристаллы обладают желтовато-оранжевой окраской (рис. 31 А). При облучении образца соединения УФ-светом с длиной волны 360 нм и 420 нм юглона обладают более ярким оранжевым цветом люминесценции (рис. 31 Б, В).

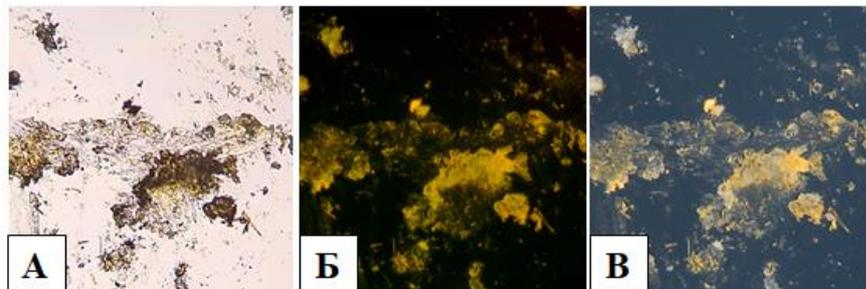


Рисунок 31 – Исследование внешнего вида кристаллов юглона: А – дневной свет; Б – облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В – облучение УФ-светом $\lambda=360$ нм.

Предварительному микролюминесцентному анализу также подвергались пробы СО флавоноидов: мирицитрина, кемпферола, кверцетина и кверцитрина (рис. 32 и 33). Отмечено, что монозидные формы флавонолов (мирицитрин, кверцитрин) в УФ-свете при длине волны 420 нм люминесцируют ярко-желтым цветом, в отличие от агликонов (рис. 32Б и рис. 33В). При 360 нм мирицитрин обладает желтым свечением, а кверцитрин – оранжевым (рис.32 В и рис. 33 В). Кемпферол в области видимого спектра при $\lambda = 420$ нм имеет зелёно-желтое свечение, а кверцетин имеет оранжевую люминесценцию (рис 33 А, Б). При $\lambda = 360$ нм кемпферол люминесцирует зеленым цветом; кверцитрин обладает желтым свечением (рис 33 А, Б). В результате микроскопического исследования установлено, что люминесценция исследуемых кристаллов флавоноидов наиболее активная при облучении лампой с длиной волны 360 нм.

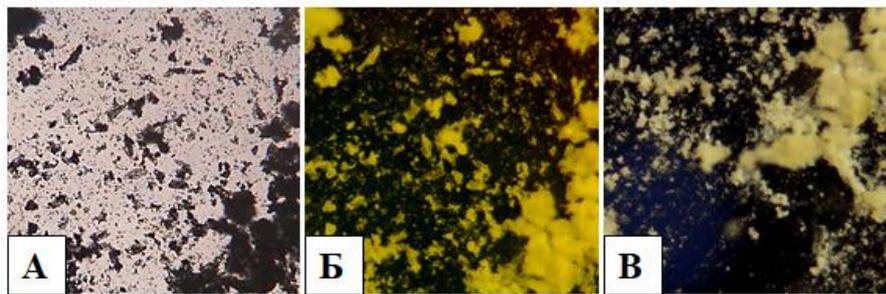
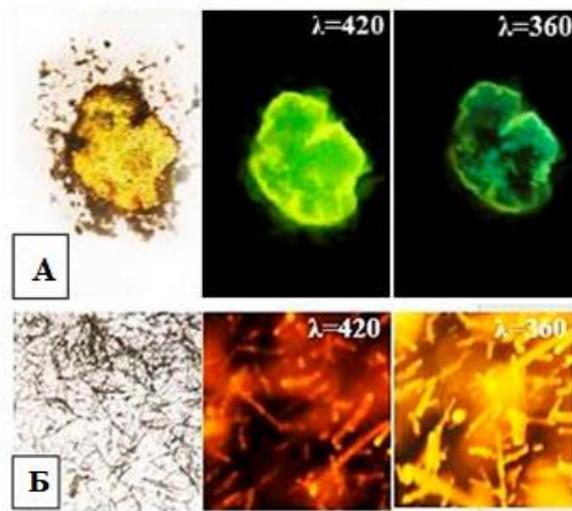


Рисунок 32 – Исследование внешнего вида кристаллов мирицитрина: А – дневной свет; Б – облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В – облучение УФ-светом $\lambda=360$ нм.



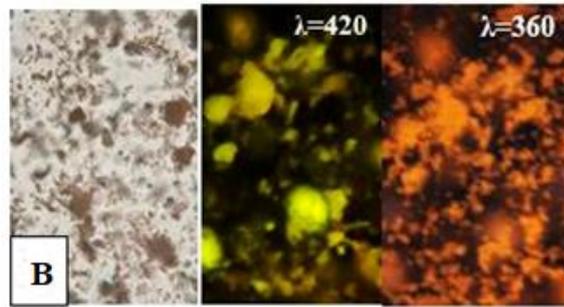


Рисунок 33 – Исследование внешнего вида кристаллов флавоноидов под микроскопом: А – кемпферол; Б – кверцетин; В – кверцитрин.

Обозначения: дневной свет, облучение УФ-светом с $\lambda=420$ нм, облучение

На дальнейшем этапе работы оценивалось свечение различных анатомических объектов коры ореха черного. В частности, при облучении среза УФ-светом с $\lambda = 360$ нм видно яркое голубое свечение зоны пробки и твердого луба (рис. 34).

В области чередования твердого и мягкого луба отчетливо видны группы лубяных волокон, клеточные стенки которых при дневном свете желтого цвета. При облучении их УФ-светом с длиной волны 360 нм они люминесцируют светло-голубым цветом за счет наличия в стенках лигниновых структур, а при облучении светом с $\lambda = 420$ нм стенки лубяных волокон люминесцируют желтым, что также характерно для лигнина (рис. 34 А-В).

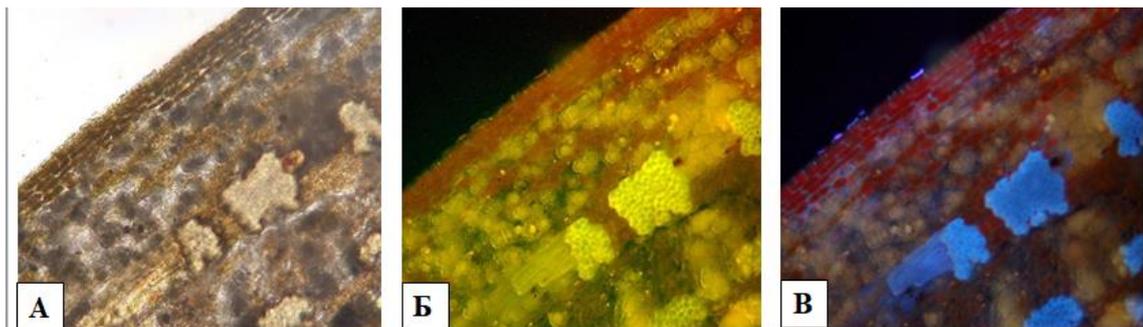


Рисунок 34 – Кора ореха черного – поперечное сечение (x40). *Обозначения:* А – дневной свет; Б – облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В – облучение УФ-светом $\lambda=360$ нм.

При ближайшем рассмотрении (на x 400) на поперечном срезе объекта виден бурый пробковый слой из многочисленных рядов клеток. Основная паренхима коры мелкоклеточная. Протопласты клеток пигментированы в светло-

желтый и светло-оранжевый цвет. При реализации люминесцентной микроскопии были выявлены различные особенности свечения в УФ-свете при $\lambda = 360$ нм. Установлено, что пробковая ткань люминесцирует ярко-голубым свечением за счет наличия в ней фенольного полимера суберина и простых фенольных соединений. При облучении пробковой ткани светом с $\lambda = 420$ нм клеточная стенка пробки люминесцирует желтым цветом, остатки протопластов темно-бурым (рис. 35 А-В).

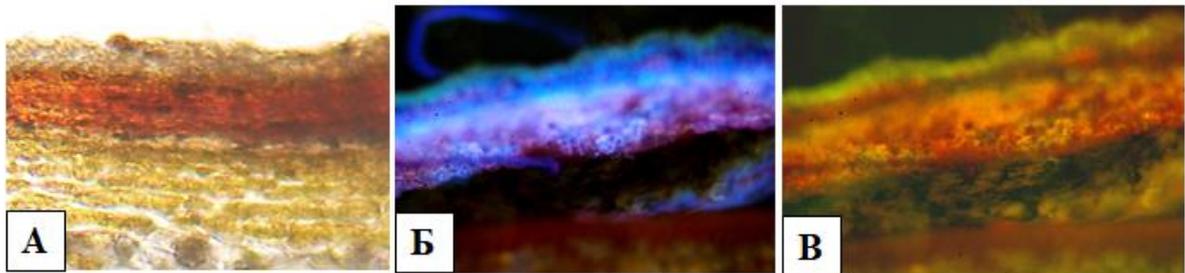


Рисунок 35 – Фрагмент пробки (феллемы) – поперечное сечение (x 100).
 Обозначения: А – дневной свет; Б – при облучении УФ-светом $\lambda = 420$ нм; В – при облучении УФ-светом $\lambda = 360$ нм.

Основная паренхима мягкого луба, представленная тонкостенными клетками, внутри которых встречаются друзы оксалата кальция, люминесцируют слабо в основном за счет клеточных стенок. В УФ-свете они светло-серые, при $\lambda = 420$ нм – светло-желтые. В УФ-свете при $\lambda = 360$ нм протопласты клеток, диагностированные на срезах, светятся незначительно от бурого до красного в основном за счет пигментов фотосинтеза (рис. 36).

В основной паренхиме коры ореха черного с высокой частотой воспроизводимости в видимом свете детектируются скопления светло-желтых или бесцветных кристаллов. При микроскопировании они выглядят как темные пятна, так как отражают свет (рис. 36 А). В УФ-свете длиной волны 360 нм детектируется характерное желтое и оранжевое свечение кристаллов вещества (рис. 36 Б).

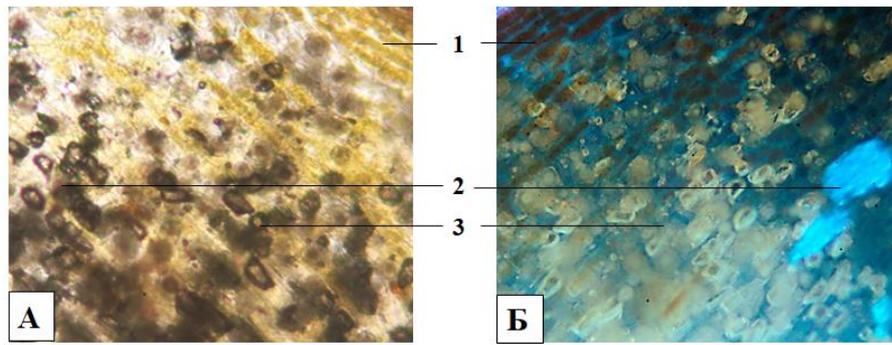


Рисунок 36 – Фрагмент основной паренхимы коры ореха черного – поперечное сечение (x 100). *Обозначения:* А – дневной свет; Б– при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

1 – колленхима; 2 – лубяные волокна; 3 – мелкокристаллические включения

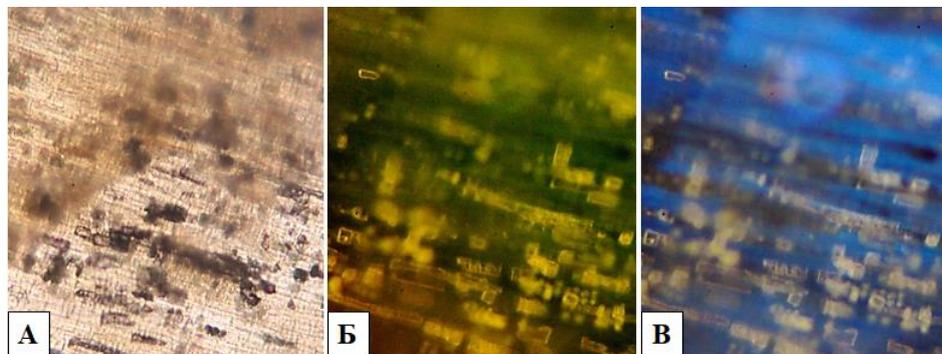


Рисунок 37 – Фрагмент основной паренхимы коры ореха черного – продольное сечение (x 100). *Обозначения:* А – дневной свет; Б – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

Подобные включения локализуются и в продольном срезе коры ореха черного. При облучении образцов микропрепаратов УФ-светом $\lambda=360$ нм и 420 нм обнаруживается характерное желтое и оранжевое свечение подобных кристаллических включений (рис. 37 А-В). Выявленные особенности люминесценции соответствуют характеру свечения мирицитрина и юглона (рис. 31 и 32).

5.2. Морфолого-анатомическое исследование листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии

Основные характеристики подлинности листьев ореха черного (*Juglans*

nigra L.) были ранее подготовлены сотрудниками из Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета [20, 28].

В соответствии с литературными данными были подтверждены соответствующие диагностические признаки. Листья ореха черного цельные или частично измельченные, сложные, непарноперистого листорасположения, длинночерешковые длиной 20-30 см, шириной 10 см с перистым жилкованием. Отдельные листовые пластинки узкояйцевидной или эллиптической формы с заостренной верхушкой, при основании слегка неравнобокие с зубчатым краем. Опушение диагностируется с абаксиальной стороны. Листья с верхней стороны зеленые, снизу более светлые (рис. 38 А). [20, 28].

По внешним признакам отличается от других видов листьев формой листовых пластин (орех грецкий), наличием средней степени опушенности с абаксиальной стороны (орех серый) (рис. 38 А-В).

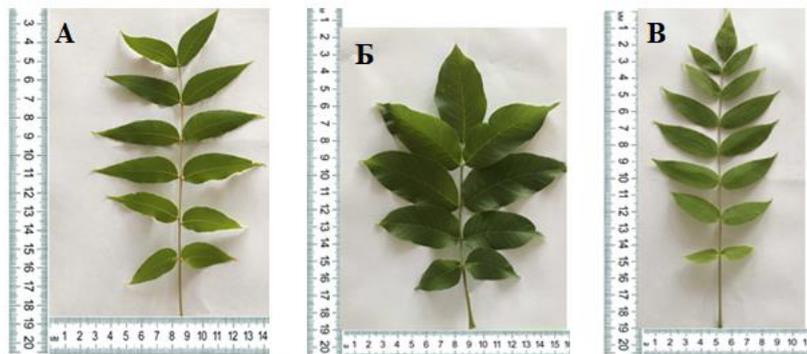


Рисунок 38 – Внешний вид листьев рода *Juglans* L.: А – листья ореха черного (*Juglans nigra* L.); Б – листья ореха грецкого (*Juglans regia* L.); В – листья ореха серого (*Juglans cinerea* L.).

При рассмотрении верхней стороны листовой пластинки с поверхности обнаруживаются клетки эпидермиса прямоугольной формы с тонкими и извилистыми стенками (рис. 39 А).

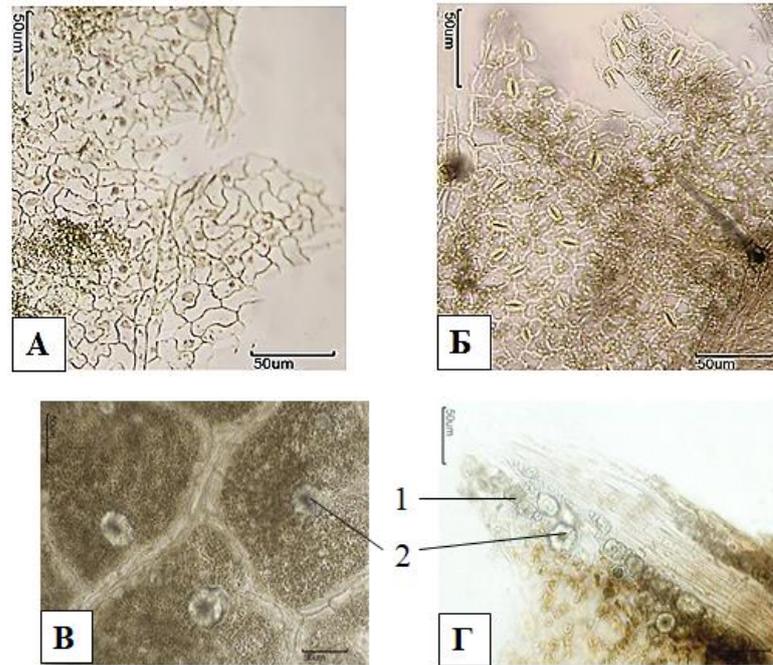


Рисунок 39 – Анатомия листовой пластины листа ореха черного: А – эпидермис верхней стороны листовой пластины (x 400); Б – эпидермис нижней стороны листовой пластины (x 400); В – эпидермис верхней стороны листовой пластины с включениями (x 400); Г – эпидермис жилки нижней стороны листовой пластины с включениями (x 400).

Обозначения: 1 – призматические кристаллы; 2 – остроконечные друзы

При рассмотрении нижней стороны листовой пластинки обнаруживаются клетки эпидермиса с извилистыми тонкими стенками. Устьичные аппараты листовых пластинок аномоцитного типа, а также локализованы с нижней стороны листа: гипостоматический вид (рис. 39 Б).

В микропрепаратах листовой пластинки диагностируются включения оксалата кальция. Вдоль жилок детектируются призматические кристаллы; в мезофилле листа локализуются остроконечные друзы (рис. 39 В, Г) [20, 28].

Кроме того, обнаруживаются производные эпидермальных клеток, представленные несколькими типами нежелезистых волосков и железистых трихом (рис. 2). Нежелезистые - одноклеточные волоски, а также пучковые волоски с двумя-восемью ответвлениями, расположенные вдоль жилок листовой пластинки (рис. 40 А-В) [20, 28].

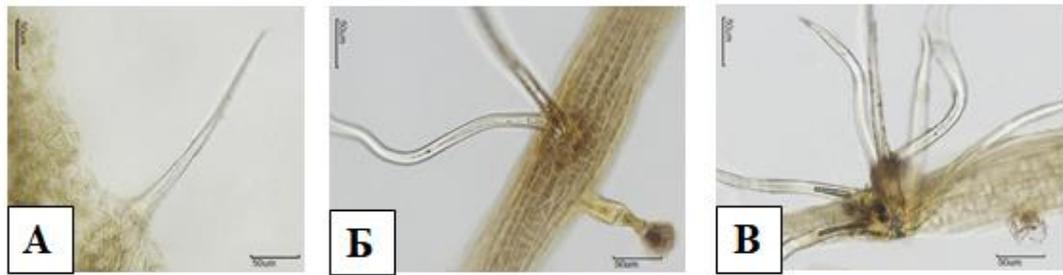


Рисунок 40 – Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А – простой волосок (x 400); Б – пучковый волосок с двумя ответвлениями (x 400); В – пучковый волосок с восемью ответвлениями (x 400).

Обнаружены железистые трихомы с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой; также детектируются волоски с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой (рис. 41 А, В). При окраске Суданом III железистые трихомы окрашиваются в оранжевый цвет (рис. 41 Б, Г) [20, 28].

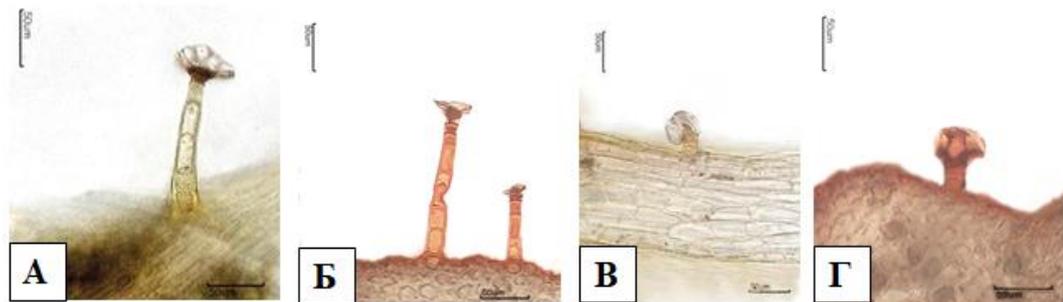


Рисунок 41 – Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А – железистые трихомы с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой (x 400); Б – Б - окраска раствором Судана III (x 400); В – железистые трихомы с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой (x 400); Г – окраска раствором Судана III (x 400).

Кроме того, выявлены дополнительные диагностические признаки при микроскопическом анализе поперечных срезов листовой пластины листа ореха черного. Главная жилка на поперечном срезе листовой пластинки листа в целом округлая по форме, но уплощенная с адаксиальной стороны (рис. 1). В жилке локализуются 3 пучка проводящих тканей: один основной – в форме полумесяца, располагается с абаксиальной стороны, а также 2 других с адаксиальной стороны (рис. 42 А).

Центральная жилка листовой пластинки армирована механическими тканями. На поперечном сечении в медиальной и апикальной частях листовой пластинки под эпидермисом хорошо выражена колленхима углового типа. При этом в структуре пучков склеренхимная часть выражена очень слабо или не выражена совсем. В то же время в базальной части листовой пластинки склерификация выражена значительно. Склеренхима окружает проводящие пучки центральной жилки. Кроме того, отмечается значительное содержание крупных округлых друз в области колленхимы в базальной части поперечного среза листовой пластинки (рис. 42 Б-В).

Анатомически листовые пластинки листа дорзовентрального типа строения, при этом отмечена значительная выраженность складчатой паренхимы (рис. 42 Г).

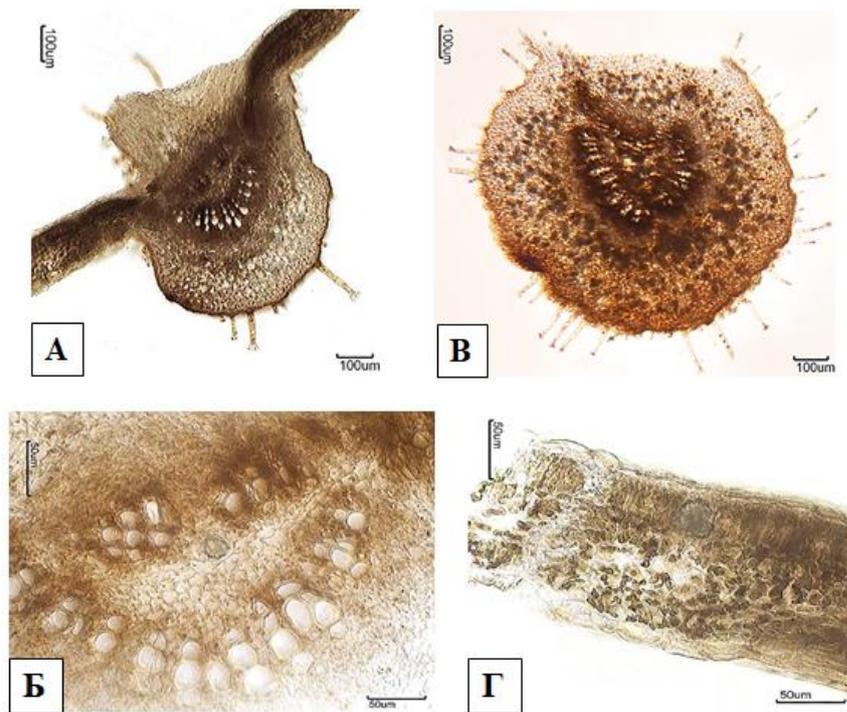


Рисунок 42 – Анатомическое строение листовой пластины листа ореха черного – поперечный срез: А – центральная жилка листовой пластины (x 100); Б – проводящая система центральной жилки (x 400); В – фрагмент поперечного сечения черешка (x 100); Г – фрагмент боковой жилки.

С использованием люминесцентной микроскопии проводился анализ локализации биологически активных соединений, содержащихся в РС листьев

ореха черного [12]. Для исследования использовались стандартные образцы юглона, мирицитрина, кверцитрина. Особенности их люминесценции выявлены в предыдущем разделе (рис. 31 и 32).

В процессе изучения препарата верхнего эпидермиса листовой пластинки листа ореха черного диагностируется люминесценция кутикулы розовым света при облучении УФ-светом в 360 нм. Данный цвет люминесценции обусловлен наличием каротиноидных структур кутина (рис. 43 В). Кроме того, люминесценцией красно-розового оттенка при $\lambda=360$ нм обладают хлорофилл и каротиноиды (рис. 43).

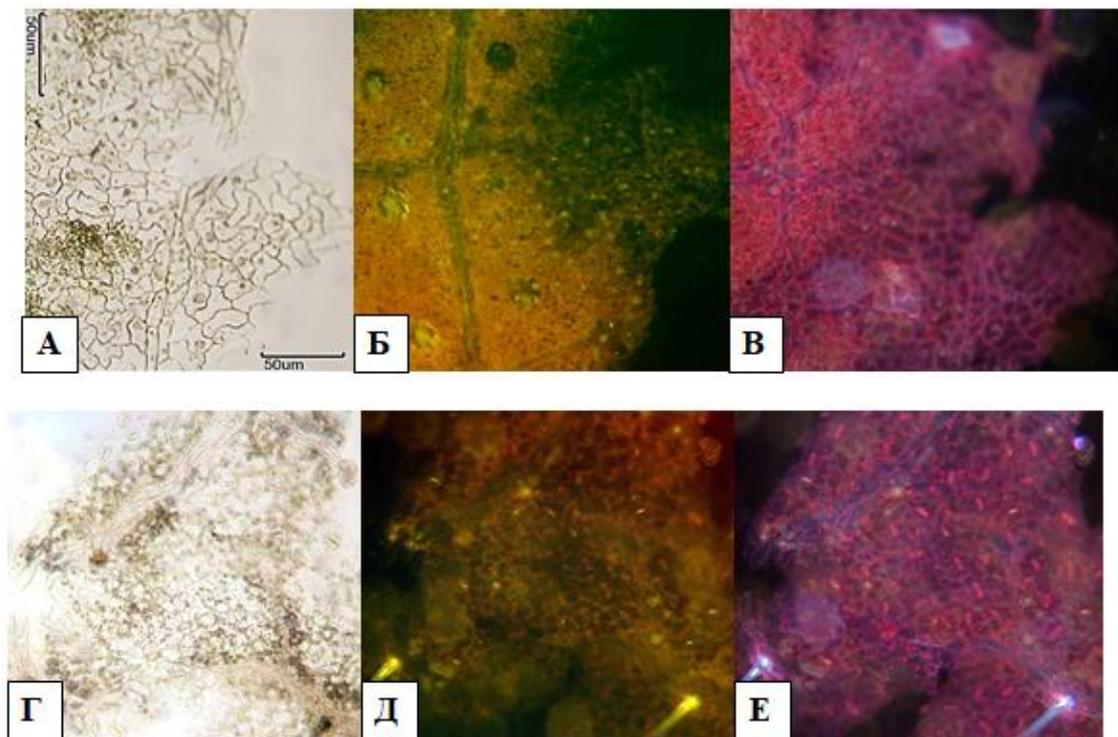


Рисунок 43 – Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А – эпидермис верхней стороны листа (x 400); Б – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм; Г – . эпидермис нижней стороны листа (x 400); Б – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При облучении УФ-светом при $\lambda=360$ нм препарата нижней эпидермальной ткани листовой пластины *Juglans nigra* L. обнаруживается голубая люминесценция структур протопласта. Кроме того, в УФ-свете при $\lambda=360$ нм

розовая люминесценция диагностируется у клеточных стенок замыкающих клеток устьичного аппарата. Также в мезофилле нижней стороны листовой пластины листа локализуются железистые трихомы. При облучении УФ-светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм отмечается светло-голубое и ярко-желтое свечение соответственно (рис. 43 Д, Е).

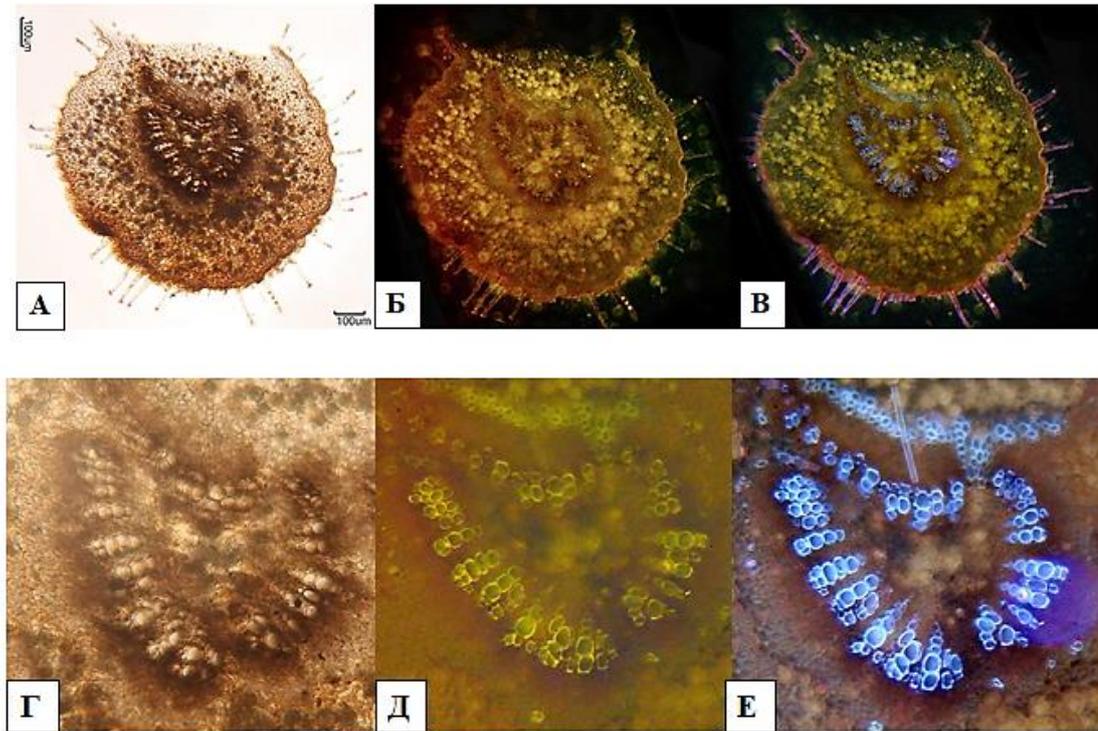


Рисунок 44 – Поперечного сечение черешка листовой пластины листа ореха черного: А – дневной свет (x 100); Б – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм; Г – центральная жилка черешка (x 400); Д – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; Е – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При рассмотрении поперечных срезов листовой пластины и черешков (x 100) в УФ-свете при $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм диагностируются оболочки клеток ксилемы и склеренхимы, подвергшиеся лигнификации, и люминесцирующие светло-голубым и светло-желтым цветом соответственно благодаря наличию лигниновых структур (рис. 44 и 45).



Рисунок 45 – Центральная жилка листовой пластины. Обозначение: А – дневной свет; Б – при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В – при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При исследовании люминесценции проводящих пучков центральной жилки черешка и листовой пластинки УФ-светом при 360 нм в области флоэмных тканей детектируется оранжево-красная люминесценция. Природа люминесценции схожа с ранее выявленным свечением кверцитрина. Кроме того, в основной паренхиме центральной жилки черешка и листовой пластинки локализуются кристаллические включения тёмного цвета (рис. 45 А). При облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм и 420 нм обнаруживается характерное желтое и оранжевое свечение кристаллических включений (рис. 45 Б, В). Особенности люминесценции указывают на локализацию в данной ткани мирицитрина.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Морфолого–анатомическое исследование коры и листьев ореха черного позволило подтвердить имеющиеся литературные данные об основных диагностических признаках, характерных для указанных видов растительного сырья: особенности внешнего вида, расположения тканей и локализации включений.

2. Проведено анатомо-гистологическое изучение черешков и листовой пластинки листьев ореха черного на поперечных сечениях. К диагностическим особенностям 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.

3. Исследование методом люминесцентной микроскопии тканей коры ореха черного выявило, что наибольшая концентрация фенольных соединений (юглон, мирицитрин) сосредоточена в тканях основной паренхимы мягкого луба. Проведённый анализ тканей листьев ореха черного с использованием люминесцентной микроскопии позволил установить локализацию диагностически значимых соединений: кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализируются кристаллические включения мирицитрина.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСТРАКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО

Проведенные ранее исследования (глава 4) показали, что кора ореха черного содержит, кроме различных производных нафтохинона, флавоноиды, которые могут вносить существенный вклад в фармакологическое действие [40, 49, 59, 94, 110, 155]. Установлено, что доминирующим и диагностически значимым соединением является флавоноид мирицитрин (мирицетин-3-О- α -L-рамнопиранозид), для которого были выявлены противовоспалительное, антиноцицептивное и нейротропное действие [113, 119, 142]. Следовательно, препараты коры и листьев ореха черного являются перспективными для дальнейшего изучения не только в области фармакологии, но и в сфере контроля их качества.

В данной главе рассматривается возможность получения настоек коры и листьев ореха черного и применения методов спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра и микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для контроля их качества.

Дальнейшее исследование растительных препаратов проведено с учетом требований фармакопейной статьи «Настойки» (ОФС.1.4.1.0019.15) Государственной Фармакопеи РФ XIV издания, которая регламентирует показатель содержания действующих биологически активных веществ [12].

6.1. Определение подлинности растительных препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка»

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 (рис. 46).

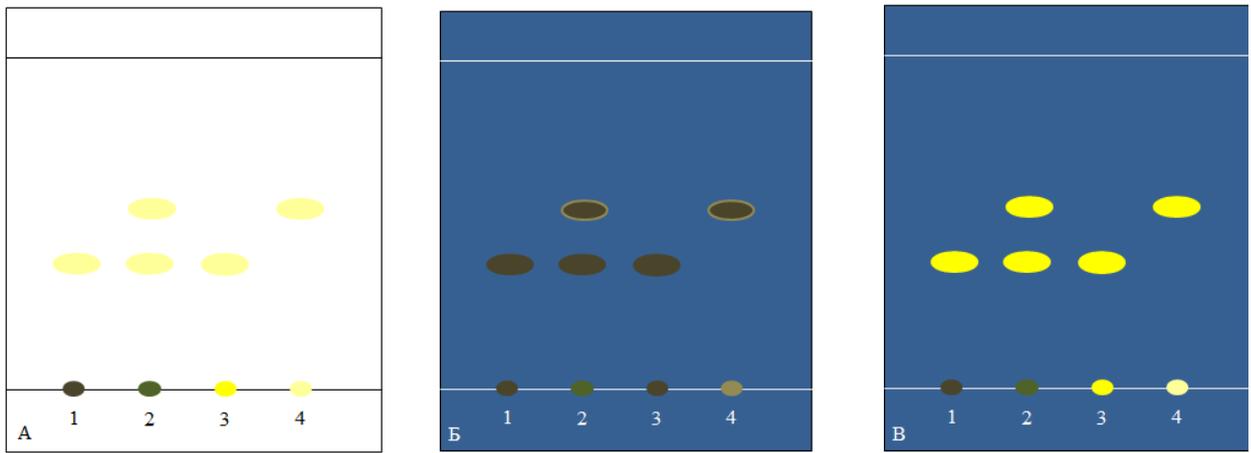


Рисунок 46 – Схема хроматограммы анализа образцов настоек коры и листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм; В – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия.

Обозначения: 1 – настойка коры ореха черного; 2 – настойка листьев ореха черного; 3 – СО мирицитрина; 4 – СО кверцитрина.

На полученной хроматограмме с образцом настойки коры ореха черного обнаруживается зона адсорбции одного доминирующего соединения флавоноидной природы ярко-желтого цвета в видимом, темно-коричневого цвета в УФ-свете с $R_f \approx 0,4$. Выявленные зоны адсорбции совпадают с зонами адсорбции, используемого в качестве стандарта мирицитрина.

При анализе настойки листьев ореха черного обнаруживаются зоны адсорбции двух диагностически значимых соединений флавоноидной природы желтого цвета в видимом, темно-коричневого цвета в УФ-свете с $R_f \approx 0,4$ и $R_f \approx 0,65$. Выявленные зоны адсорбции совпадают с зонами адсорбции, используемых в качестве внутренних стандартов мирицитрина и кверцитрина соответственно.

Для качественного анализа настоек также рекомендуется проведение спектрофотометрического исследования испытуемых растворов настоек коры и листьев ореха черного. Спектральные характеристики испытуемых растворов настоек аналогичны растворам извлечений из коры и листьев ореха черного (рис. 47-50).

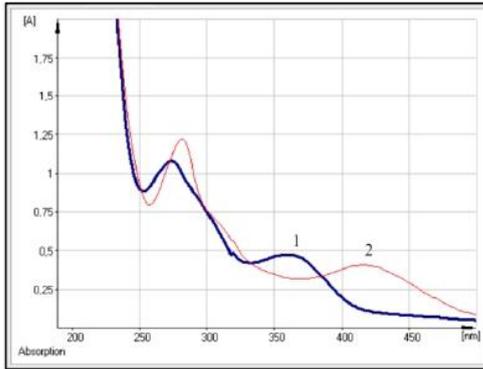


Рисунок 47 – Электронные спектры настойки коры ореха черного на спирте этиловом 70% концентрации.

Обозначения: 1 - исходный раствор; 2 - раствор с добавлением алюминия хлорида.

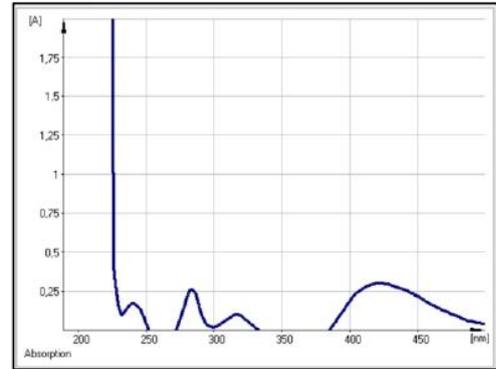


Рисунок 48 – Электронный спектр настойки коры ореха черного на спирте этиловом 70% концентрации (дифференциальный вариант).

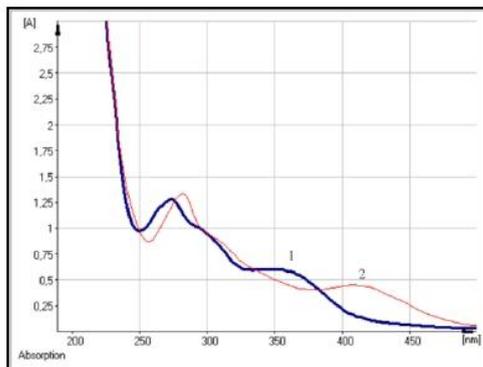


Рисунок 49 – Электронные спектры настойки листьев ореха черного на спирте этиловом 70% концентрации.

Обозначения: 1 - исходный раствор; 2 - раствор с добавлением алюминия хлорида.

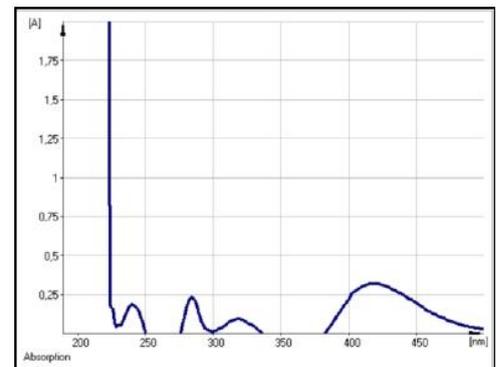


Рисунок 50 – Электронный спектр настойки листьев ореха черного на спирте этиловом 70% концентрации (дифференциальный вариант).

Электронные спектры поглощения испытуемых растворов настойки коры ореха черного в прямом варианте имеют 2 максимума поглощения около 270 нм и 360 нм; в дифференциальном варианте максимум поглощения обнаруживается при длине волны 416 нм, что согласуется с результатами спектрофотометрического исследования извлечений коры ореха черного (рис. 47 и 48).

Электронные спектры поглощения испытуемых растворов настойки листьев

ореха черного в условиях прямой спектрофотометрии имеют 2 максимума поглощения около 260 нм и 360 нм. В условиях дифференциальной спектрофотометрии максимум поглощения обнаруживается при длине волны 412 нм, что согласуется с результатами спектрофотометрического исследования извлечений листьев ореха черного (рис. 49 и 50).

6.2. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в растительном препарате «Ореха черного коры настойка»

При исследовании спектров поглощения извлечения и настойки коры *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии установлены максимумы поглощения при $\lambda_{\max}=416\pm 2$ нм. Следовательно, разработанную методику количественной оценки содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре *Juglans nigra* L. возможно адаптировать для контроля качества настойки коры *Juglans nigra* L.

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

$$x = \frac{A * m_0 * 25 * 50 * 5 * 100}{A_0 * V * 25 * 1 * 25}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО мирицитрина;

V – объем настойки, взятой для анализа, мл;

m_0 – масса СО мирицитрина, г.

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.

$$x = \frac{A * 25 * 50}{V * 432}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

V – объем настойки, взятой для анализа, мл;

432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) мирицитрина при 416 нм.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб испытуемых образцов настойки коры *Juglans nigra* L. свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа (табл. 28).

Таблица 28 - Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения суммы флавоноидов в настойке коры ореха черного

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm\Delta X$	$\pm\Delta\bar{X}$	E, %
11	10	0,84	0,0012	0,034	0,010	95	2,23	$\pm 0,08$	0,02	$\pm 9,07$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. Статистическая обработка результатов эксперимента). Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 400 до 1500 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации при определении СО мирицитрина составил 0,99973.

Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности анализа – 6,63 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками мирицитрина, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности (табл. 29).

Таблица 29 - Результаты определения правильности методики количественного анализа суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в настойке коры ореха черного

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
8,4	2,10	10,50	9,63	-0,87	-8,28
8,4	4,20	12,60	13,41	+0,81	+6,43
8,4	6,30	14,70	13,90	-0,76	-5,17

Содержание суммы флавоноидов для исследуемого образца настойки коры ореха черного составило $0,84 \pm 0,08$ % (в пересчете на мирицитрин).

6.3. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в растительном препарате «Ореха черного листьев настойка»

При исследовании спектров поглощения извлечения и настойки листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии установлены максимумы поглощения при $\lambda_{\max} = 412 \pm 2$ нм. Следовательно, разработанную методику количественной оценки содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях *Juglans nigra* L. возможно адаптировать для контроля качества настойки коры *Juglans nigra* L.

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

$$x = \frac{A * m_0 * 25 * 50 * 5 * 100}{A_0 * V * 25 * 1 * 25}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО мирицитрина;

V – объем настойки, взятой для анализа, мл;

m_0 – масса СО мирицитрина, г.

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.

$$x = \frac{A * 25 * 50}{V * 432}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

V – объем настойки, взятой для анализа, мл;

432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) мирицитрина при 416 нм.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб испытуемых образцов настойки листьев *Juglans nigra* L. свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа (табл. 30).

Таблица 30 - Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения суммы флавоноидов в настойке листьев ореха черного

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	0,91	0,0013	0,036	0,011	95	2,23	$\pm 0,08$	0,02	$\pm 8,77$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность (см. 2.3.6. (см. 2.3.6. Статистическая обработка результатов эксперимента). Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 400 до 1500 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации при определении СО мирицитрина составил 0,9953.

Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности анализа – 5,50 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками мирицитрина, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности (табл. 31).

Таблица 31 - Содержание суммы флавоноидов в настойке листьев ореха черного в зависимости от добавления мирицитрина

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
9,0	2,25	11,25	12,03	+0,78	+6,93
9,0	4,5	13,5	12,78	-0,72	-5,33
9,0	6,75	15,75	15,08	-0,67	-4,25

Содержание суммы флавоноидов для исследуемого образца настойки коры ореха черного составило $0,91 \pm 0,08$ % (в пересчете на мирицитрин).

6.4. Количественное определение мирицитрина в растительном препарате «Ореха черного коры настойка»

Для коры *Juglans nigra* L. была разработана и описана методика количественной оценки содержания мирицитрина методом ВЭЖХ. Указанную методику количественной оценки содержания мирицитрина в коре *Juglans nigra* L. возможно адаптировать для контроля качества настойки коры *Juglans nigra* L.

Объемы инжестируемых проб настойки коры ореха черного и мирицитрина 4 мкл. Расчет содержания мирицитрина проводили методом внешнего стандарта.

При анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, определено, что в указанных условиях хроматографирования (глава 2) в испытуемых растворах настойки возможно идентифицировать анализируемый компонент – мирицитрин (рис.51 и рис. 52). При добавлении раствора стандартного образца мирицитрина в испытуемые растворы настойки коры *Juglans nigra* L. регистрируется увеличение единиц оптической плотности пика мирицитрина соответственно по отношению к первоначальным единицам оптической плотности пика мирицитрина в исходном испытуемом растворе (рис. 53).

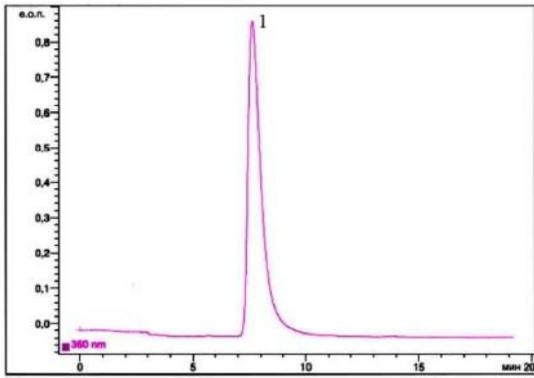


Рисунок 51 – ВЭЖХ-хроматограмма мирицитрина

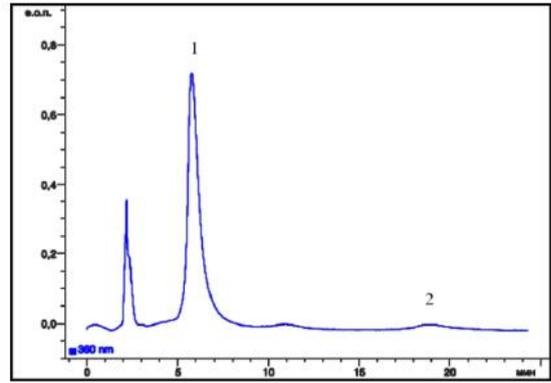


Рисунок 52 – ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора настойки

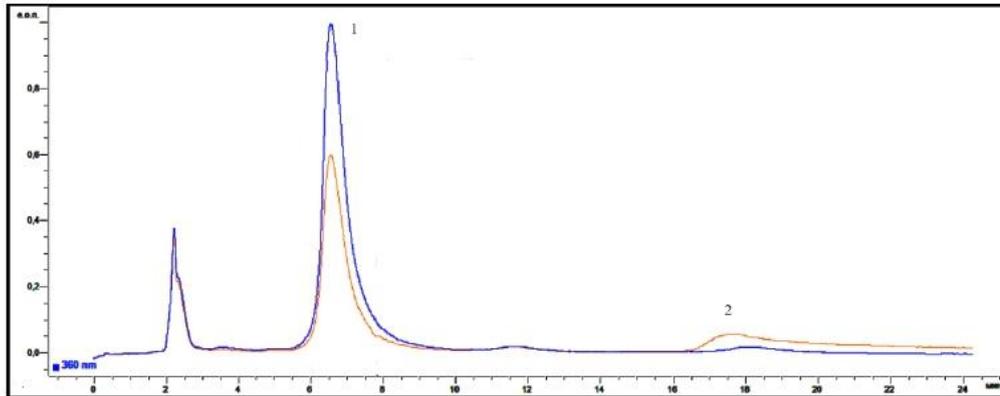


Рисунок 53 – ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора настойки коры ореха черного с добавлением мирицитрина и мирицетина

Обозначения: 1 – мирицитрин; 2 – мирицетин.

Время удерживания пиков мирицитрина и мирицетина на хроматограмме стандартного образца мирицитрина, в также в испытуемых растворах настойки коры ореха черного представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Содержание суммы флавоноидов в настойке коры ореха черного в зависимости от добавления мирицитрина

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Настойка
Мирицитрин (1)	7,326	6,951
Мирицетин (2)	14,211	18,909

Количественный анализ настойки коры ореха черного методом ВЭЖХ, как и для извлечений коры ореха черного, осуществляем по мирицитрину.

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

$$x = \frac{S * m_0 * 0,98 * V * V_2 * 100}{S_0 * V_n * V_0 * V_1},$$

где S – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме стандартного раствора; V – объем испытуемого образца, 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; V_n – объем настойки, взятой для анализа, мл; m_0 – масса СО мирицитрина, г; 0,98 – содержание основного вещества в 1,0 г СО мирицитрина.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов настойки свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа (табл. 33).

Таблица 33 – Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения мирицитрина в настойке коры ореха черного

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	0,42	0,0004	0,021	0,010	95	2,23	$\pm 0,05$	0,01	$\pm 11,14$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по показателю разрешения между пиками ($R_s \approx 1,71$), а также хроматографированием испытуемого раствора СО мирицитрина. Линейную зависимость площади пика от концентрации в диапазоне от 250 до 1000 мкг/мл СО мирицитрина определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент

детерминации при определении СО мирицитрина составил 0,9951.

Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности анализа – 6,73 %. (табл. 34). Погрешность, определяемая для проб с добавками стандартных образцов, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности.

Таблица 34 - Результаты определения правильности методики количественного определения мирицитрина в настойке коры ореха черного

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
4,20	1,05	5,25	5,72	+0,47	+8,95
4,20	2,10	6,30	5,90	-0,40	-6,35
4,20	3,15	7,35	6,71	+0,36	+4,90

Содержание мирицитрина для исследуемого образца настойки коры ореха черного составило $0,42 \pm 0,04$ % (в пересчете на мирицитрин).

6.5. Количественное определение мирицитрина и кверцитрина в растительном препарате «Ореха черного листьев настойка»

Для листьев *Juglans nigra* L. были разработаны и описаны методики количественного определения мирицитрина и кверцитрина методом ВЭЖХ. Разработанные методики количественного определения мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного могут быть адаптированы и для настойки вышеуказанного вида сырья. Объемы инжестируемых проб настойки коры ореха черного и мирицитрина 4 мкл. Расчет содержания мирицитрина проводили методом внешнего стандарта.

При анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, определено, что в указанных условиях хроматографирования (глава 2) возможно идентифицировать анализируемые компоненты системы – мирицитрин и кверцитрин (рис. 51, 55 и 56).

При добавлении растворов стандартных образцов мирицитрина, кверцитрина к испытуемому раствору настойки на хроматограмме регистрируется увеличение интенсивности пиков мирицитрина, кверцитрина соответственно по отношению к пикам указанных соединений в исходном испытуемом растворе (рис. 57).

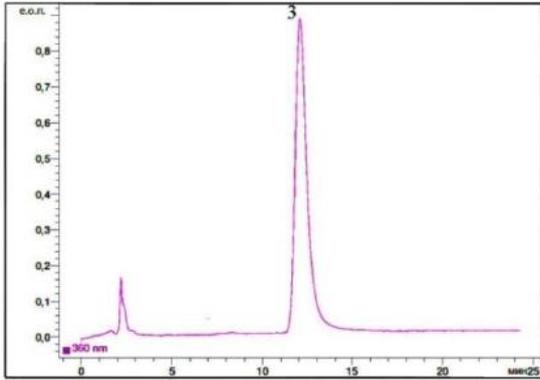


Рисунок 55 — ВЭЖХ-хроматограмма кверцитрина
Обозначения: 3 — кверцитрин

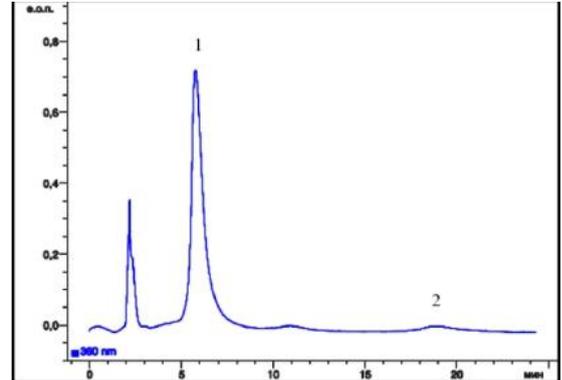


Рисунок 56 — ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора настойки листьев ореха черного
Обозначения: 1 — мирицитрин; 2 — мирицетин; 3- кверцитрин

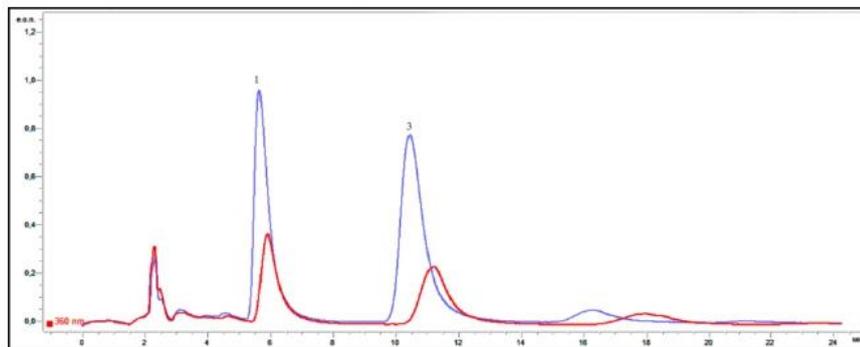


Рисунок 57 — ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора настойки из листьев ореха черного с добавлением стандартных образцов
Обозначения: 1 — мирицитрин; 3- кверцитрин

Время удерживания пиков мирицитрина и кверцитрина на хроматограмме стандартного образца мирицитрина и кверцитрина соответственно, а также в испытуемом растворе настойки листьев ореха черного представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Содержание суммы флавоноидов в настойке коры ореха черного в зависимости от добавления мирицитрина

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Настойка
Мирицитрин (1)	6,526	6,246
Кверцитрин (3)	11,342	11,567

В данном случае считаем целесообразным количественный анализ для настойки листьев ореха черного, как и для извлечений листьев ореха черного, осуществлять отдельно по мирицитрину и по кверцитрину.

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

$$x = \frac{S * m_0 * 0,98 * V * V_2 * 100}{S_0 * V_H * V_0 * V_1},$$

где S – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – среднее значение площади пика мирицитрина на хроматограмме стандартного раствора; V – объем испытуемого образца, 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; V_H – объем настойки, взятой для анализа, мл; m_0 – масса СО мирицитрина, г; 0,98 – содержание основного вещества в 1,0 г СО мирицитрина.

Метрологические характеристики средних результатов проведенных опытов 11 проб образцов из одной серии сырья свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа (табл. 36).

Таблица 36 – Метрологические характеристики средних результатов методики количественного определения мирицитрина в настойке листьев ореха черного

n	f	\bar{X}	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %
11	10	0,32	0,0003	0,017	0,0050	95	2,23	$\pm 0,04$	0,01	$\pm 11,65$
11	10	0,21	0,0001	0,012	0,0036	95	2,23	$\pm 0,03$	0,01	$\pm 12,48$

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по показателю разрешения между пиками ($R_s \approx 1,53$), а также хроматографированием испытуемого раствора СО мирицитрина. Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 250 до 1000 мкг/мл СО мирицитрина (кверцитрина) определяли с использованием серии из 5 проб растворов указанного образца. Скорректированный коэффициент детерминации при определении СО мирицитрина и СО кверцитрина составил 0,9954 и 0,9945.

Правильность методики определяли методом добавок. Систематическая составляющая неопределенности анализа – 8,59 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками стандартных образцов, находилась в пределах погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности (табл. 37).

Таблица 37 - Результаты определения правильности методики количественного определения мирицитрина в настойке листьев ореха черного

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавление мирицитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолют., мг	относит., %
3,20	0,80	4,00	4,44	+0,44	+11,00
3,20	1,60	4,80	4,40	-0,40	-8,33
3,20	2,40	5,60	5,96	+0,36	+6,43

Содержание мирицитрина для исследуемого образца настойки листьев ореха черного составило $0,32 \pm 0,04$ % (в пересчете на мирицитрин). Содержание кверцитрина для исследуемого образца настойки листьев ореха черного составило $0,21 \pm 0,03$ % (в пересчете на кверцитрин).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Методики качественного анализа БАС коры и листьев ореха черного адаптированы для растительных препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка».

2. Разработанные методики количественного определения БАС коры ореха черного с использованием фотометрических и хроматографических методов анализа адаптированы для растительного препарата «Ореха черного коры настойка». Нижний предел содержания флавоноидов в пересчете на СО мирицитрина в настойке коры ореха черного – не менее 0,5 %. Нижний предел содержания мирицитрина в настойке коры ореха черного – не менее 0,1 %.

3. Разработанные методики количественного определения БАС листьев ореха черного с использованием фотометрических и хроматографических методов анализа адаптированы для растительного препарата «Ореха черного листьев настойка». Нижний предел содержания флавоноидов в пересчете на СО мирицитрина в настойке листьев ореха черного – не менее 0,5 %. Нижний предел содержания мирицитрина и кверцитрина в настойке листьев ореха черного – не менее 0,1 % соответственно

ГЛАВА 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО

7.1. Прогноз фармакологической активности растительного сырья и препаратов видов рода *Орех (Juglans L.)*

Для полученных лекарственных растительных препаратов, кроме проведения мероприятий по их стандартизации, необходимо также установить основные виды фармакологической активности. Считается, что одним из основных определяющих фармакологическое действие объектов является ведущая группа БАС или один из доминирующих компонентов многокомпонентной системы. Следовательно, для проведения предварительных исследований фармакологического действия необходимо спрогнозировать наличие фармакологической активности выделенных доминирующих и диагностически значимых индивидуальных соединений – мирицитрина и кверцитрина.

По литературным данным мирицитрин является ингибитором оксида азота и протеинкиназы С и проявляет антипсихотические и анксиолитические эффекты на животных моделях психоза и тревоги соответственно [113, 142]. Мирицитрин также оказывает антиноцицептивное действие в моделях острой и хронической боли [119].

Кроме того, в последние годы при прогнозировании биологических и фармакологических свойств активных веществ используются технологии компьютерного моделирования в решении задачи установления связи между структурой вещества и прогнозированием свойств новых соединений. Актуальным является возможность оценивать физико-химические свойства непосредственно по структурной формуле соединения с помощью, так называемых дескрипторов. Мощным набором методов компьютерного прогнозирования биологической активности химических соединений являются методы, основанные на Байесовской вероятности

Для предсказания биологической и фармакологической активности

мирицитрина и кверцитрина был использован программный пакет PASS online (prediction of activity spectra for substances) [74]. В таблице 38 приведены значения вероятностей проявления некоторых видов активностей указанных субстанций.

Как видно из таблицы, у соединений большой набор видов биологического действия с высокой вероятностью проявления. В основном большинство указанных видов активности связаны с ингибирующими действиями по отношению к биологическим процессам окисления (поглотитель свободных радикалов, ингибитор липидной пероксидазы, ингибитор липидной пероксидазы). Данные результаты свидетельствуют о возможности проявления мирицитрином и кверцитрином антиоксидантной активности.

Кроме того, для указанных соединений прогнозируется антибактериальный, противогрибковый и противовоспалительный характер действия при минимальных нежелательных эффектах реакции.

Также по данным PASS анализа для мирицитрина подтверждается связь механизма действия с оксидом азота, что можно использовать для дальнейшего исследования анксиолитической активности указанной субстанции.

Таблица 38 – Результаты расчета биологической и фармакологической активностей в программе PASS online

Мирицитрин (мирицетин-3-О-α-L-рамнопиранозид)		Кверцитрин (кверцетин-3-О-α-L-рамнопиранозид)	
Вид активности	Проявление активности / нежелательные эффекты	Вид активности	Проявление активности / нежелательные эффекты
Ингибитор мембранной проницаемости	0,985 / 0,001	Агонист целостности мембраны	0,987 / 0,001
Агонист целостности мембраны	0,985 / 0,001	Ингибитор мембранной проницаемости	0,986 / 0,001
Кардиопротектор	0,983 / 0,001	Кардиопротектор	0,979 / 0,001
Поглотитель свободных радикалов	0,978 / 0,001	Поглотитель свободных радикалов	0,974 / 0,001
Ингибитор липидной пероксидазы	0,972 / 0,002	Вазопротектор	0,966 / 0,001
Ингибитор йодид пероксидазы	0,967 / 0,001	Ингибитор йодид пероксидазы	0,965 / 0,000
Вазопротектор	0,962 / 0,001	Ингибитор липидной пероксидазы	0,962 / 0,002
Антиканцерогенный	0,955 / 0,001	Ингибитор НАДФН-оксидазы	0,947 / 0,001
Антиоксидант	0,938 / 0,002	Антиканцерогенный	0,943 / 0,002
Гепатопротектор	0,929 / 0,002	Ингибитор глутатион-дисульфидредуктазы	0,934 / 0,000
Лечение пролиферативных заболеваний	0,913 / 0,002	Усилитель экспрессии TP53	0,928 / 0,004
Антигеморрагический	0,888 / 0,002	Стимулятор высвобождения гистамина	0,922 / 0,001
Противовоспалительное средство	0,762 / 0,009	Ингибитор CDP- глицеролглицерофосфотрансферазы	0,922 / 0,006
Противогрибковый	0,750 / 0,007	Гепатопротектор	0,917 / 0,002
Антигиперхолестеринемический	0,735 / 0,007	Антиоксидант	0,915 / 0,003
Антимикробный	0,733 / 0,006	Ингибитор ксантиндегидрогеназы	0,911 / 0,001
Антагонист оксида азота	0,732 / 0,003	Ингибитор хлордеконредуктазы	0,903 / 0,005

7.2. Изучение нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного (*Juglans nigra* L.)

Исследование нейротропной активности проводили с использованием теста Порсолта. При этом в течение пяти минут фиксировали индивидуальное время активных попыток животных выбраться из воды. Полученные данные обрабатывали статистически по критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования влияния на двигательную активность крыс в методике теста Порсолта представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Результаты исследования нейротропной активности мирицитрина по методике теста Порсолта

Вводимое вещество	Контроль Вода	Опыт 1 Мирицитрин, 0,5 мг/кг
Двигательная активность животных за 5 мин, с	92,57±5,85	115,43±7,83 *
Изменение двигательной активности относительно контроля, %	100%	125%
Статистическая значимость результатов эксперимента	О/К	p=0,038
Вводимое вещество	Контроль Вода	Опыт 2 Мирицитрин, 1 мг/кг
Двигательная активность животных за 5 мин, с	97,00±7,15	104,00±10,17
Изменение двигательной активности относительно контроля, %	100%	107%
Статистическая значимость результатов эксперимента	О/К	p=0,584
Вводимое вещество	Контроль Вода	Опыт 3 Мирицитрин, 5 мг/кг
Двигательная активность животных за 5 мин, с	97,29±12,29	52,29±10,97 *
Изменение двигательной активности относительно контроля, %	100%	54%
Статистическая значимость	О/К	p =0,018

результатов эксперимента		
--------------------------	--	--

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

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, 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 мирицетина в дозе 5 мг/кг наблюдалось достоверное снижение двигательной активности животных в опытной группе на 46% по отношению к водному контролю.

7.3. Изучение острой токсичности препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка»

В результате фармакологического исследования острой токсичности препаратов «Ореха черного коры настойка» и «Ореха черного листьев настойка» установлено, что после однократного внутрижелудочного введения указанных препаратов в дозе 0,5 г/кг летальных случаев не зафиксировано. В течение всего периода проведения эксперимента отсутствовали отклонения в поведении контрольной и экспериментальной группы крыс. На протяжении всего исследования вес животных экспериментальной группы и вес крыс контрольной группы практически не отличался. Следовательно, исследуемые настойки в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относятся к III классу токсичности (умеренно опасные вещества).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

1. Проведен предварительный прогноз фармакологической активности субстанций мирцитрина и кверцитрина с использованием программы PASS. Принято решение о проведении дальнейших исследований нейротропной активности.

2. Впервые проведено исследование нейротропной активности мирицитрина, выделенного из коры ореха черного. Выявлено, что мирицитрин в дозе 0,5 мг/кг при однократном внутрижелудочном введении способствовал повышению двигательной активности животных в опытной группе на 25 % по отношению к водному контролю. В то же время мирицитрин в дозе 5 мг/кг способствовал понижению двигательной активности животных в опытной группе на 46 % по отношению к водному контролю.

3. Таким образом, препараты коры и листьев ореха черного, а также выделенные индивидуальные соединения являются перспективными в плане дальнейшего изучения и проведения доклинических исследований, подтверждающих их фармакологическую активность. Полученные результаты позволяют в перспективе эффективно решить проблемы расширения базы лекарственного растительного сырья, а также комплексного использования ореха, так как листья и кора ореха черного составляют значительную часть фитомассы растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей 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 рода. Для дальнейшего исследования химического состава были выбраны кора и листья *Juglans nigra* L., как наиболее перспективные источники биологически активных соединений флавоноидной природы.

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 (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). 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-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавона) и его агликон кверцетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон), мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавона) 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 количественного 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 в препарате «Ореха черного коры 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 листа».

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 Фармакпею 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко, Е.В. Биологическая активность замещённых нафтохиноидных соединений / Е.В. Авраменко [и др.] // Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии: материалы II регион. науч. конф. (19-21 декабря 2006, Владивосток). - Владивосток: ДВО РАН, 2006. - С. 8.
2. Алентьев, П.Н. Перспективы промышленного ореховодства на Кубани / П.Н.Алентьев, Б.П. Орлов // Лесное хозяйство. -1992.- № 2. - С.29-31.
3. Аслонова, И. Ж. Химический состав грецкого ореха / И. Ж. Аслонова, И. Д. Кароматов, Н. И. Тураева // Биология и интегративная медицина. – 2019. – № 10(38). – С. 77-83.
4. Бандюкова, В.А. О вероятности обнаружения некоторых агликонов в семействах высших растений / В.А. Бандюкова, Э.Т. Аванесов // Растительные ресурсы. – 1975. – Т. 11, вып. 3. – С. 334-342.
5. Бежуашвили, М.Г. Химическая характеристика перегородок плодов *Juglans regia* / М.Г. Бежуашвили, Н.З. Курашвили // Химия природных соединений. – 1998. - № 2. – С. 161-164.
6. Беленовская, Л.М. Нафтохиноны видов флоры России и их биологическая активность / Л.М. Беленовская, А.Л. Буданцев // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42, Вып. 4. – С. 108-141.
7. Бобкова, Н. В. Микроскопическое исследование незрелых плодов грецкого ореха / Н.В. Бобкова, В.А. Ермакова, И.А. Самылина // Традиционная медицина - 2007: сб. науч. тр. конгресса (1-3 марта 2007, г. Москва). - М., 2007. - С. 43-47.
8. Вехов, Н.К. К биологии орехов рода *Juglans* / Н.К. Вехов // Ореховые насаждения: сб. науч. тр. / Опыты исследования ВНИАЛМИ. – М., 1934. – Вып. 3. – С. 36–39.
9. Воронин, А.В. Использование компьютерной программы «Chemmetr 1.0» для метрологической оценки методик фармацевтического анализа / А. В. Воронин, И. В. Сынбулатов. — Текст : непосредственный // Национальная ассоциация ученых. — 2020. — Вып. 52, Т. 3. — С. 45-49.
10. Гладкова, Л.И. Современные методы выращивания орехоплодных культур (на

- примере грецкого ореха) / Л.И. Гладкова. М.: ВНИИТЭИСХ, 1984. – 320 с.
11. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание / МЗ РФ. - Москва, 2015. - Т. 3.– С. 657 - 663.
 12. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.4 / Москва, 2018. – 1832 с. [Электронный ресурс] / URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html - 25.07.2019.
 13. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
 14. Громадин, А. В. Дендрология: учебник для студ. образоват. учреждений сред. проф. образования./ А.В. Громадин, Д.Л. Матюхин. – М.: Академия, 2006. С. 160-164.
 15. Грязнов В. П. Практикум по физиологии растений / В.П. Грязнов, Л.В. Сиротина – Белгород: Белгородский государственный университет, 2000. – С. 68.
 16. Гуков, Г.В. Комплексное использование ореха маньчжурского на юге Дальнего Востока / Г.В. Гуков, А.Ю Личман // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения): материалы II международной конференции. Хабаровск: ФГУ «ДальНИИЛХ». – 2004. – С. 233–236.
 17. Дайронас, Ж.В. Изучение состава липофильной фракции листьев ореха грецкого, произрастающего на Кавказских Минеральных Водах / Ж.В. Дайронас, И.В. Пшукова // Химия растительного сырья. — 2010. — № 4. — С. 91-93.
 18. Дайронас, Ж.В. Инновационные технологии в производстве фитопрепаратов ореха черного / Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров, А.В. Корочинский // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2014. — № 3. — С. 60-64.
 19. Дайронас, Ж.В. Морфолого-анатомическое изучение коры ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) [Электронный ресурс] / Ж.В. Дайронас // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 1. — Режим доступа: <http://www.science-education.ru/125-19849>.
 20. Дайронас, Ж.В. Морфолого-анатомическое изучение листьев ореха серого

- (*Juglans cinerea* L.) / Ж.В. Дайронас // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-23. – С. 5161-5165.
21. Дайронас, Ж.В. Морфолого-анатомическое изучение плодов ореха грецкого (*Juglans regia* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) / Ж.В. Дайронас // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-2. – С. 233.
22. Дайронас, Ж.В. Определение нафтохинонов в сырье и фитопрепарате ореха черного - *Juglans nigra* L. / Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров, А.В. Корочинский, В.В. Корочинская // Фармация. - 2013.— № 4. — С. 12-14.
23. Дайронас, Ж. В. Основные фармакологические свойства извлечений из сырья рода *Juglans* / Ж. В. Дайронас, В. В. Верниковский // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14. – № 4. – С. 707-710. – DOI 10.14300/mnnc.2019.14177.
24. Дайронас, Ж.В. Природные нафтохиноны: перспективы медицинского применения / Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров. — МО, Щёлково: Издатель Мархотин П. Ю. — 2011. — 252 с.
25. Дайронас, Ж. В. Разработка и стандартизация лекарственных растительных препаратов из листьев ореха грецкого / Ж. В. Дайронас, И. Н. Зилфикаров, В. В. Верниковский // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2018. – Т. 146. – С. 153-158. – DOI 10.25684/NBG.scbook.146.2018.23.
26. Дайронас, Ж.В. Содержание производных шиконина в корнях синяка русского в зависимости от фазы вегетации / Ж.В. Дайронас // Научное обозрение. – 2008. – № 4. – С. 29-32.
27. Дайронас, Ж.В. Фитохимическое изучение листьев грецкого ореха как источника антиоксидантного средства / Ж. В. Дайронас, С. А. Кулешова, И. В. Пшукова // Химия растительного сырья. — 2010. — № 4. — С. 95-98.
28. Дайронас, Ж.В. Экспериментально-теоретическое исследование лекарственного растительного сырья, содержащего нафтохиноны, и его стандартизация. [Текст]: дис. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Дайронас Жанна Владимировна. - М., 2017. – 389 с.

29. Дмитриев, И.С. Взгляд на формирование химических школ Петербурга / И.С. Дмитриев // Природа. – 2003 - № 9. – С. 73-82
30. Дудников, М. Э. Биотехнологические исследования по безотходному использованию околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Дудников Михаил Эдуардович. — Ставрополь, 2006. — 120 с.
31. Дудников, М.Э. Сравнительные исследования суммарных фитопрепаратов, полученных из околоплодника некоторых разновидностей орехов / М.Э. Дудников, И.Н. Андреева, Т.Ю. Арчинова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2003. — Вып. 58. — С. 203-204.
32. Еникеева, Р.А. Исследование по фармакогностическому изучению и стандартизации сырья и препаратов Ореха грецкого (*Juglans regia* L.): автореф. дис... канд. фармацевт. наук: защищена 23.06.2008 / Р.А. Еникеева. - Москва: (ВИЛАР) РАСХН, 2008. - 22 с.
33. Еникеева, Р.А. Орех грецкий и его препараты в современной гомеопатической практике / Р.А. Еникеева, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Вестник Бурятского государственного университета. - 2007. - № 8. - С. 32-35.
34. Еникеева, Р.А. Характеристика микродиагностических признаков ореха грецкого листьев / Р.А. Еникеева, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. - Пятигорск: Пятигорская ГФА. – 2007. - Вып. 62. - С. 44-46.
35. Есауленко, Е.Е. Перспективы использования масла ореха черного (*Juglans nigra* L.) для коррекции окислительного стресса и патологии липидного обмена при токсическом гепатите / Е.Е. Есауленко, А.А. Ладутько, И.М. Быков, Е.В. Щербакова // Аллергология и иммунология. – 2010. – Т. 10, № 3. – С. 260-262.
36. Железникова, А.С. Изучение флавоноидов в листьях некоторых видов рода *Juglans*, интродуцированных в условиях Самарской области / А.С. Железникова // Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием Аспирантские чтения – 2013: "Молодые учёные в медицине". - 2013. - С. 274-277.

37. Жунгиету, Г.И. Юглон и родственные 1,4- нафтохиноны / Г.И. Жунгиету, Л.А. Влад. - Кишинев: Штиинца, 1978. - 93 с.
38. Жўрабоева, М. Д. и. Стандартизация дубильных веществ, содержащихся в листьях грецкого ореха и получение сухого экстракта / М. Д. и. Жўрабоева, О. Р. и. Рахимова, Н. Юсупова, Г. Р. и. Рахимова // Интернаука. – 2019. – № 9-1(91). – С. 28-31.
39. Ильинская, И.А. К систематике и филогении семейства *Juglandaceae* // Ботанический журнал. – 1990. – Т. 75, № 6. – С. 792-803.
40. Ильичева, Е.С. Основные способы получения 5-окси-1,4-нафтохинона (юглона) - антибактериального препарата широкого спектра действия / Е.С. Ильичева, Э.Р. Миннахметова, Р.И. Сафина, А.С. Крайнов // Вестник Казанского технологического университета. - 2015. - Т. 18, № 3. - С. 147-150.
41. Картелев, В.Г. Диагностика разновидностей ореха грецкого / В.Г. Картелев, В.Г. Мишнев // Лесное хозяйство.-1976. -№ 12.- С.39-40.
42. КиберЛенинка // URL: <https://cyberleninka.ru> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
43. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. - М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
44. Колесникова, Р.Д. Газожидкостная хроматография эфирных масел листьев некоторых видов семейства *Juglandaceae* / Р. Д. Колесникова, М.К. Улюкина, Р.И. Дерюжкин // Растительные ресурсы. – 1980. – Т. 16, вып. 3. – С. 441-446.
45. Корочинский, А.В. Актуальные аспекты медицинского применения ореха черного - *Juglans nigra* L. (обзор) / А. В. Корочинский, Ж.В. Дайронас, В.В. Верниковский // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 21-28. – DOI 10.33380/2305-2066-2019-8-3-21-28.
46. Корочинский, А.В. Технология биологически активной добавки к пище «Веноспас» и его применение в профилактике хронических сосудистых заболеваний / А.В. Корочинский, В.В. Корочинская, Ж.В. Дайронас, И.Н.

- Зилфикаров // Сб. работ молодых ученых 3-й Междунар. науч.-практ. конф. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Владикавказ, 2012), ч. 1. – Владикавказ, 2012. – С. 208–210.
47. Кузнецов, П.В. Именные (цветные) реакции в фармацевтическом и химико-токсикологическом функциональном анализе: учебное пособие / П.В. Кузнецов. – Кемерово: АИ «Кузбассвуиздат», 2016. – 167 с.
48. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие / В.А. Куркин. - Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава»; ООО ОФОРТ, 2009. - С. 462-463.
49. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. - 4-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2019. - 1278 с.
50. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. Самара: ГБОУ ВПО «СамГМУ Росздрава»; ООО ОФОРТ, 2012. - 290 с.
51. Левчук, И.П. Лечение ран на этапах медицинской эвакуации / И.П. Левчук, М.В. Костюченко, А.П. Назаров, А.А. Горобец // Эффективная фармакотерапия. – 2012. – № 28. – С. 36-41.
52. Лойко, Р.Э. Химический состав плодов *Juglans regia* L. в Белоруссии / Р.Э. Лойко, Т.С. Ширко // Растительные ресурсы. – 1990. -Т.26, вып. 2. – С. 160-169.
53. Меденцев А.Г. Биосинтез нафтохинонов и цианидрезистентное дыхание в ответе микроскопических грибов (*Fusarium*, *Verticillium* и *Yarrowia*) на стрессовые воздействия: дис... д-ра. биол. наук: 03.00.07 / Меденцев Александр Григорьевич. – Пушино, 2004. – 193 с.
54. Машковский, М. Д. Лекарственные средства: пособие для врачей / М.Д. Машковский. — М.: Новая Волна, 2005. — 15-е изд. — 1164 с.
55. Муравник, Л.Е. Трихомы перикарпия у видов *Juglans* (*Juglandaceae*): сканирующая микроскопия, флуоресцентная микроскопия и гистохимия / Л.Е. Муравник // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 7. – С. 636-642.
56. Назарова, Н.В. Исследование стрессовых реакций эпидермиса листа видов рода

- Juglans*, произрастающих в условиях Белгородской области, на действие высоких температур / Н.В. Назарова, Т.А. Кузнецова, В.Н. Сорокопудов, Н.Н. Шестопалова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 715.
57. Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.e-library.ru>.
58. Орловская, Т.В. Фитохимическое изучение околоплодника ореха грецкого / Т.В. Орловская, Э.Ф. Степанова, А.У. Гагуева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пятигорск : Пятигорская ГФА, 2003. – Вып. 58. – С. 73-74.
59. Пастушенкова, А.Л. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье с противомикробным действием как путь преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов к действию антибактериальных препаратов / А.Л. Пастушенкова // Клиническая патофизиология. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 20-24.
60. Патент РФ № 2134584 МКИ7 А61К35/78 на изобретение «Способ получения иммуномодулирующего препарата «Настойка эхинацеи пурпурной» » / Куркин В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – Бюл. №23 от 20.08.99.
61. Пат. 2033803 Российская Федерация МПК А61К35/78 Способ получения биологически активного препарата «Тодикамп» / А.Г. Маленков, П.С. Дейнеко, И.М. Колотыгина, Л.Г. Нехамкина, М.П. Тодика, Г.В. Щеткин. – № 93043794/14; заявл. 30.08.1993
62. Пат. 2180589 Российская Федерация МПК 7 А61К35/78, Б0Ш11/02, А61Р29/00, А61Р17/00, А61Р17/02, А61Р35/00 Способ получения экстракта растительного сырья на основе грецких орехов / И.Ф. Горлов, И.М. Осад-ченко (РФ). - № 2001104565/14; заявл. 19.02.2001, опубл. 20.03.2002. [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
63. Пат. 2399321 Российская Федерация МПК А23L 1/30 Биологически активная добавка к пище, обладающая гипохолестеринемическими свойствами / Е.П. Корнена, И.Б. Красина, В.И. Харламов, А.Н. Пахомов, И.А. Косинкова, Р.А. Ханферян, А.Н. Харченко (РФ). – № 2009106641/13; заявл. 25.02.09; опубл.

- 20.09.10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
64. Пат. 2399297 Российская Федерация МПК А23L 1/00 Биологически активная добавка к пище, обладающая профилактическими свойствами при йодной недостаточности / Е.П. Корнена, И.Б. Красина, В.И. Харламов, А.Н. Пахомов, И.А. Косинкова, Р.А. Ханферян, А.Н. Харченко (РФ). – № 2009106643/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
65. Пат. 2399313 Российская Федерация МПК А23L 1/30 Биологически активная добавка к пище, обладающая гепатопротекторными свойствами / Е.П. Корнена, И.Б. Красина, В.И. Харламов, А.Н. Пахомов, И.А. Косинкова, Р.А. Ханферян, А.Н. Харченко (РФ). – № 2009106636/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
66. Пат. 2399315 Российская Федерация МПК А23L1/30. Биологически активная добавка к пище / Е.П. Корнена, И.Б. Красина, В.И. Харламов, А.Н. Пахомов, И.А. Косинкова, Р.А. Ханферян, А.Н. Харченко (РФ). – № 2009106638/13, заявл. 25.02.2009; опубл. 20.09.2010. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
67. Пат. 2399316 Российская Федерация МПК А23L 1/30 Биологически активная добавка к пище, обладающая антиоксидантными свойствами / Е.П. Корнена, И.Б. Красина, В.И. Харламов, А.Н. Пахомов, И.А. Косинкова, Р.А. Ханферян, А.Н. Харченко (РФ). – № 2009106646/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
68. Пат. 2322074 Российская Федерация МПК А23G3/46 Состав для приготовления молочных помадных конфет и способ их приготовления / И. Б. Красина, Т.Н. Прудникова, М.А. Сквиря, А.В. Темников (РФ). – № 2007119492/13, заявл. 25.05.2007, опубл. 20.04.2008. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.
69. Пат. 2402346 Российская Федерация МПК А61К 36/72 Гомеопатические суппозитории для лечения заболеваний половых органов / И.В. Жилина (РФ). – № 2009115130/15; заявл. 20.04.09; опубл. 27.10.10. [Электронный ресурс]. – Режим

доступа: <http://www.fips.ru>.

70. Помогайбин, А.В. Биоэкологические особенности представителей родового комплекса Орех (*Juglans*) при интродукции в условиях среднего Поволжья (г. Самаре) / А.В. Помогайбин // Вестник Самарского государственного университета - Естественная серия. - 2006. - №7(47). - С. 172-176.
71. Помогайбин, А.В. Некоторые особенности химического состава и биологической активности листового опада видов рода Орех (*Juglans* L.) при интродукции в среднем Поволжье / А.В. Помогайбин // Химия растительного сырья. – 2002. – № 4. – С. 43–47.
72. Помогайбин, А.В. Особенности плодоношения различных видов Ореха, интродуцированных в Самарском Ботаническом саду / А.В. Помогайбин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2007. – Т. 9. – № 4. – С. 1091–1096.
73. Помогайбин, А.В. Эколого-биологический анализ результатов интродукционных испытаний видов рода Орех (*Juglans* L.) в лесостепи среднего Поволжья: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Помогайбин Александр Владимирович. – Тольятти, 2008. – С. 23
74. Программа PASS [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmaexpert.ru/PASSOnline> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
75. Пушкарский, С.Н. Содержание биологически активных веществ в листьях ваточника (ластовень) сибирского (*Asclepias syriaca* L.) и ореха грецкого (*Juglans regia* L.), выращиваемых в ботаническом саду ПятГФА / С.Н. Пушкарский, Д.А. Муравьева, Е.С. Чернова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск: Пятигорская ГФА. – 2003. – Вып. 58. – С. 77-78.
76. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Caprifoliaceae-Plantaginaceae*. – Л: Наука, 1990. – 328 с.
77. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и

- благополучия человека, включая Управления). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://fp.crc.ru/gosregfr>.
78. Рихтер, А.А. Грецкий орех / А.А. Рихтер, А.А. Ядров - М.: Агропромиздат, 1985. - 215 с.
79. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. С.Н. Быковского [и др.]. - М.: Изд-во Перо, 2014. - 656 с.
80. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО Издательство «Медицина», 2005. - 832 с.
81. Рыбников, В.Н. Нафтохиноны как иммуномодуляторы при интенсивных физических нагрузках / В.Н. Рыбников, И.Л. Ласкова, Л.Г. Прокопенко // Антибиотики и химиотерапия. - 1997. - Т. 42, №3. - С. 6-10.
82. Садыкова, З.З. Некоторые фитохимические показатели экстракта, полученного из листьев грецкого ореха (*Juglans regia* L.) / З. З. Садыкова // Актуальные проблемы химии и образования : Материалы II научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Астрахань, 19–20 марта 2018 года. – Астрахань: Без издательства, 2018. – С. 21-22.
83. Салионова, А.В. Микроскопические признаки сырья листьев *Juglans mandshurica* / А.В. Салионова, С.П. Раилко, А.Ю. Маняхин, О.Г. Зорикова // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы : Материалы II Международной научной конференции, Новосибирск, 20–22 октября 2015 года / Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2015. – С. 191-193.
84. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х т. / И.А. Самылина, О.Г. Аносова – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – Т.1. – 192 с.
85. Сдобнина, Л.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии / Л.И. Сдобнина // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: тезисы докл. междунар. науч. конф. (Пенза, 13 – 16 мая 2008 г.). – Пенза, 2008. – С. 75–77.

86. Семенов, А.А. Основы химии природных соединений: в 2 т. / А.А. Семенов, В.Г. Карцев - М.: МБФНП, 2009. - Т. 1. – 624 с.
87. Сорокопудов, В.Н. Жирнокислотный состав семян отборных форм ореха грецкого (*Juglans regia* L.), индуцированного в Белгородской области / Сорокопудов В.Н., Зинченко А.А., Назарова Н.В. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. - 2011. Том 13 - № 4-2(99). - С. 174-177.
88. Сорокопудов, В.Н. Изучение химического состава листьев и незрелых плодов некоторых видов рода *Juglans* / В.Н. Сорокопудов, С.Н. Шлапакова, Т.Т. Нгуен, Т.Б.Т. То // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2014. - № 9. - С. 52-55.
89. Сорокопудов, В.Н. Морфологическая характеристика трихом видов рода *Juglans*, произрастающих в условиях юга Среднерусской возвышенности / В.Н. Сорокопудов, Н.В. Назарова, Т.А. Кузнецова, Д.А. Колесников // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 490.
90. Стратегия ВОЗ в области народной медицины: 2014-2023 гг. – Гонконг: ВОЗ, 2013. – 72 с.
91. Стрела, Т.Е. Орех грецкий / Т.Е. Стрела – Киев: Наукова думка, 1990. – 257 с.
92. Стреляева, А.В. Изучение токсичности и фармакологической активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья и новых экстрагентов: дис. ... докт. фармац. наук: 15.00.02 / Ангелина Вадимовна Стреляева. – М., 2002. – 360 с.
93. Тахтаджян, А.Л. Жизнь растений. Том 5. Часть 1. Цветковые растения' \Под редакцией академика АН СССР А.Л. Тахтаджяна - Москва: Просвещение, 1980 – 430 с.
94. Тушканова, О.В. Исследование антибиотической активности юглона, выделенного из околоплодника *Juglans nigra* L. / О.В. Тушканова, И.Е. Бойко // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2017. - № 1(18). - С. 126-129.
95. Тхагушев, Н.А. Орехоплодные культуры / Н.А. Тхагушев. Майкоп: Адыг. Респ. кн. изд-во, 2003. - 320 с.

96. Федоров, А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений / А.А. Федоров, З.Т. Артюшенко - Л.: Наука, 1979. – С. 24, 51, 65, 71.
97. Фёдоров, А.А. Флора европейской части СССР: в 7 т. / Под ред. А.А. Фёдорова. – Л.: Наука, 1981. – Т. 5. – С. 380.
98. Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Российский химический журнал. - 2006. - Т. 50, № 2. - С. 66-75.
99. Фурст, Т.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования тканей. М.: Наука, 1979. – 155 с.
100. Ходжибаева, С.М. Новые аспекты получения и контроля юглона / С.М. Ходжибаева, О.Ф. Филатова, А.А. Тыщенко // Химия природных соединений. - 2000. - №3. - С. 227-229.
101. Чуб, С.К. Морфолого-анатомическое изучение перегородок плодов ореха грецкого (*Juglans regia* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) // Материалы IX Международной научно-практической конференции: Молодые ученые в решении актуальных проблем науки. - 2019. - С. 167-171.
102. Шехмирзова, М.Д. Биологические особенности ореха черного в условиях Республики Адыгея / М.Д. Шехмирзова, О.В. Тушканова // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2004. – № 2. – С. 80-84.
103. Шехмирзова, М.Д. Перспективы разведения ореха черного на Северо-Западном Кавказе / М.Д. Шехмирзова, А.С. Василенко // Новые технологии. – 2012. – № 2. – С. 113–118.
104. Шнелле, Ф. Фенология растений / Ф. Шнелле. Л.: Гидрометеиздат, 1961.-259 с.
105. Шретер, А.И. Природное сырье китайской медицины: справочник (в 3-х томах) / А. И. Шретер, Б.Г. Валентинов, Э.М. Наумова. – М.: Теревинф, 2004. – Т.1. – 506 с.
106. Щепотьев, Ф.Л. Орехоплодовые лесные и садовые культуры / Ф.Л. Щепотьев, А.А. Рихтер, Ф.А. Павленко. — М.: Агропромиздат, 1985. — 224 с.
107. Щепотьев, Ф.Л. Орехоплодные древесные породы / Ф.Л. Щепотьев, А.А.

- Рихтер, Ф.А. Павленко. - Москва: Лесная промышленность, 1968. - 368 с.
108. Якубовская, А.Я. Синтез, антимикробная и противогрибковая активность соединений нафтазаринового ряда / А.Я. Якубовская, Н.Д. Похило, В.Ф. Ануфриев, М.М. Анисимов // Химико-фармацевтический журнал. - 2009. - Т. 43, № 7. - С. 22-24.
109. Abdallaha, I.B. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties / I.B. Abdallaha, N. Tlilia, E. Martinez-Forceb // Food Chemistry. - 2015. - Vol. 173. - P. 973-978.
110. Alshatwi, A.A. Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of *Juglans regia* L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes / A.A. Alshatwi, T.N. Hasan, G. Shafi, N.A. Syed, A.H. Al-Assaf, M.S. Alamri, A.S. Al-Khalifa // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. – 2012. – Vol. 2012: 103026.
111. Arrnz, S. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter / S. Arrnz, J. Perez-Jimenz, F. Sayra-Calixta // European Food Research and Technology. - 2008. - Vol. 227, No. 2. - P. 425-431.
112. Bada, J.C. Characterization of walnut oils (*Juglans regia* L.) from Asturias, Spain / J.C. Bada, M. Leon-Camacho, M. Prieto // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 2010. - Vol. 87, No. 12. - P. 1469-1474.
113. Bandele O.J., Clawson S.J., Osheroff N. Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement. Chem Res Toxicol. 2008. Vol. 21(6). P. 1253-1260. DOI:10.1021/tx8000785.
114. Caballero, E. Thermal stability data of juglone from extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk, and technologies used to concentrate juglone / E. Caballero, C. Soto, J. Jara // Data in Brief. – 2019. – Vol. 25. - 104081.
115. Calabro, S. Enhanced eryptosis following juglone exposure / S. Calabro, K. Alzoubi, R. Bissinger, K. Jilani, C. Faggio, F. Lang // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2015. – Vol. 116, No. 6. - P. 460–467.

116. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. (дата обращения 10.05.2020).
117. Chaleshtori R.S., Chaleshtori F.S., Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves // *Turkish Journal of Biology*. 2011. – Т.35. – No.5. – P. 635-639.
118. Colaric, M. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. / M. Colaric, R. Veberic, A. Solar, M. Hudina, F. Stampar // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, No. 16. – P. 6390–6396.
119. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*. 1995. Vol. 58(2). P. 217-225. DOI: 10.1021/np50116a009.
120. Cosmulescu, S.N. Mineral composition of fruits in different walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars / S.N. Cosmulescu, A. Baciu, G. Achim // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- Napoca*. - 2009. - Vol. 37, No. 2. - P. 157-160.
121. Cosmulescu, S. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia* L.) leaves / S. Cosmulescu, I. Trandafir, V. Nour // *Pharmaceutical Biology*. – 2014. – Vol. 52, No. 5. – P. 575-580.
122. Cruz-Vega, D.E. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens* / D.E. Cruz-Vega, M.J. Verde-Star, N. Salinas-Gonzalez, B. Rosales-Hernandez, I. Estrada-Garcia, P. Mendez-Aragon, P. Carranza-Rosales, M.T. González-Garza, J. Castro-Garza // *Phytotherapy Research*. – 2008. – Vol. 22, No. 4. – P. 557–559.
123. Daglish, C. The determination and occurrence of a hydrojuglone glucoside in the walnut / C. Daglish // *Biochemical Journal*. – 1950. – Vol. 47, No. 4. – P. 458-462.
124. Dai, X. TrichOME: A comparative omics database for plant trichomes / X. Dai, G. Wang, D.S. Yang, Y. Tang, P. Broun, M.D. Marks, L.W. Sumner, R.A. Dixon and P.X. Zhao // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 152. – P. 44-54.
125. Dilcher, D.L. Investigations of angiosperms from the Eocene of North America:

- leaves of the engelhardieae (*Juglandaceae*) / D.L. Dilcher and S.R. Manchester // Botanical Gazette. – 1986. – Vol. 147, No. 2. – P. 189-199.
126. Ebrahimia, I. Extraction of juglone from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for dyeing, anti-fungal finishing, and solar UV protection of wool / I. Ebrahimia, M.P. Gashti // Coloration Technology. – 2015. – Vol. 131, No. 6. – P. 451-457.
127. Eidi, A. Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats / A. Eidi, J.Z. Moghadam, P. Mortazavi, S. Rezazadeh, S. Olamafar // Pharmaceutical Biology. – 2013. – Vol. 51. – No.5. – P. 558–565.
128. El-Sakka, M.A. Phytochemistry alkaloids / M.A. El-Sakka. – 3rd ed. – Al Azhar, 2010. – 222 p.
129. Erdemoglu, N. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine / N. Erdemoglu, E. Kupeli, E. Yesilada // Journal of Ethnopharmacology. – 2003. – Vol. 89, No. 1. – P. 123–129.
130. Ficker, C.E. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts / C.E. Ficker, J.T. Arnason, P.S. Vindas, L.P. Alvarez, K. Akpagana, M. Gbéassor, C.D. Souza, M.L. Smith // Mycoses. – 2003. – Vol. 46, No. 1-2. – P. 29-37.
131. Food and Drug Administration // URL: <https://www.fda.gov> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
132. Ghinda, S. Acțiunea preparatului „Nucina” asupra concentrației T-limfocitelor în patologia recidivantă a căilor respiratorii superioare la copii / S. Ghinda, D. Romanciuc, E. Privalova // Buletinul academiei de științe a Moldovei științe medicale revistă științifico-practică Fondată în anul 2005 Apare de 4 ori pe an 2/2006 Numărul este consacrat celui deal III-lea Congres Național de Ftiziopneumologie din Republica Moldova (27-28 octombrie 2005). – Chișinău, 2006. – P. 126-129.
133. Google Scholar // URL: <https://scholar.google.com> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
134. Gutiérrez Ortiz, A.L. Aqueous extracts of walnut (*Juglans regia* L.) leaves: quantitative analyses of hydroxycinnamic and chlorogenic acids / A.L. Gutiérrez Ortiz, F. Berti, L. Navarini, P. Crisafulli, S. Colombari, C. Forzato // Journal of

- Chromatographic Science. – 2018. – Vol. 56, No. 8 – P. 753-760. DOI: 10.1093/chromsci/bmy041.
135. Hasan, T.N. Anti-proliferative effects of organic extracts from root bark of *Juglans regia* L. (RBJR) on MDA-MB-231 human breast cancer cells: role of Bcl-2/Bax, caspases and Tp53 / T.N. Hasan, L.G. B, G. Shafi, A.A. Al-Hazzani, A.A. Alshatwi // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2011. Vol. 12, No. 2. P. 525–530.
136. Hausen, B.M. Woods injurious to human health: a manual. – Berlin: Walter de Gruyter, 1981. – P. 119–121.
137. Hosseinzadeh, H. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Juglans regia* L. leaves in mice / H. Hosseinzadeh, H. Zarei, E. Taghiabadi // Iranian Red Crescent Medical Journal. – 2011. – Vol. 13, No. 1. – P. 27–33.
138. Jähnichen, H. Blätter und Früchte von Engelhardia Lesch. ex Bl. (*Juglandaceae*) aus dem europäischen Tertiär / Dr. Hellmut Jähnichen, Dr. Dieter H. Mai, Dr. Harald Walther // Journal Botanical Taxonomy and Geobotany. – 1977. – Vol. 88, No. 5-6. – P. 323–363.
139. Jakopič, J. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents / J. Jakopič, R. Veberič, F. Štampar // Acta agriculturae Slovenica. – 2009. – Vol. 93, No. 1. – P. 11-15.
140. Kale Hu, A.A. Spectrophotometric validation and standardization of a bioactive component from *J. regia* stem bark / A.A. Kale Hu, S.A. Gaikwad, S. Devare, N.R. Deshpande, J.P. Salvekar // International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences. – 2012. –Vol. 3, No. 1. – P. 133-136.
141. Kong, Y.H. Natural product juglone targets three key enzymes from *Helicobacter pylori*: inhibition assay with crystal structure characterization / Y.H. Kong, L. Zhang, Z.Y. Yang, C. Han, L.H. Hu, H.L. Jiang, X. Shen //Acta Pharmacologica Sinica. – 2008. – Vol. 29, No. 7. P. 870–876.
142. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. Cancer Lett. 2009. Vol. 275(1). P. 17-26. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.027.
143. Li, L. Characterisation of phenolics in fruit septum of *Juglans regia* Linn. by ultra

- performance liquid chromatography coupled with Orbitrap mass spectrometer / L. Li, L. Song, X. Sun, S. Yan, W. Huang, P. Liu // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 286. – P. 669-677. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.054.
144. Lin, Y. Phenolic constituents from the fresh pericarps of *Juglans sigillata* / Y. Lin, J. Liang, X. Peng, H. Ruan // *Natural Product Research*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1080.
145. Mabry, T.J. The Systematic Identification of Flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas // Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1970. – 354 p.
146. Mao, X. Amino Acid Composition, Molecular Weight Distribution and Gel Electrophoresis of Walnut (*Juglans regia* L.) Proteins and Protein Fractionations / X. Mao, Y. Hua, G. Chen // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2014. - Vol. 15, No. 2. - P. 2003-2014.
147. Matławska, I. Determination of the juglone content of *Juglans regia* leaves by GC/MS / I. Matławska, W. Bylka, E. Widy-Tyszkiewicz, B. Stanisiz // *Natural Product Communications*. – 2015. – Vol. 10, No. 7. – P. 1239- 1242.
148. Medic, A. Identification and quantification of the major phenolic constituents in *Juglans regia* L. peeled kernels and pellicles, using HPLC-MS/MS / A. Medic, J. Jakopic, M. Hudina, A. Solar, R. Veberic // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 352. – P. 129404. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129404.
149. Min, B.–S. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Ribonuclease H Activities by Constituents of *Juglans mandshurica* / B.–S. Min, N. Nakamura, H. Miyashiro, Y.–H. Kim, M. Hattori // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2000. – Vol. 48, No 2. – P. 194–200.
150. Nour, V. HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves / V. Nour, I. Trandafir, S. Cosmulescu // *Journal of Chromatographic Science*. – 2013. – Vol. 51, No. 9. – P. 883-890.
151. Oliveira, I. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks / I. Oliveira, A. Sousa, I.C. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho, J.A. Pereira // *Food and Chemical Toxicology*. – 2008. – Vol. 46. – No. 7. – P. 2326–2331.

152. Omar, S. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine / S. Omar, B. Lemonnier, N. Jones, C. Ficker, M.L. Smith, C. Neema, G.H. Towers, K. Goel, J.T. Arnason // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2000. – Vol. 73, No. 1–2. – P. 161–170.
153. Panth, N. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia* / N. Panth, K.R. Paudel, R. Karki // *Journal of Integrative Medicine*. – 2016. – Vol. 14, No.5. – P. 359-373. DOI: 10.1016/S2095-4964(16)60274-1.
154. Peng, X. Juglone prevents metabolic endotoxemia-induced hepatitis and neuroinflammation via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway in high-fat diet rats / X. Peng, Y. Nie, J. Wu, Q. Huang, Y. Cheng // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Vol. 462, No. 3. – P. 245–250.
155. Pereira, J.A. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars / J.A. Pereira, I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P.B. Andrade, I.C. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho // *Food and Chemical Toxicology*. – 2007. – Vol. 45, No. 11. – P. 2287-2295.
156. Pereira, J.A. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars / J.A. Pereira, I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P.B. Andrade, I.C. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho // *Food and Chemical Toxicology*. – 2008. - Vol. 46, No. 6. - P. 2103-2111.
157. Pharmacopoeia of the People's Republic of China // URL: <http://db.ouryao.com/yd2015/view.php?v=txt&id=5667> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
158. Plant List (2013). Version 1.1. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.theplantlist.org>
159. Qadan, F. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms / F. Qadan // *Am J Chin Med*. – 2005. – Vol. 33, No. 2. – P. 197–204.
160. Qureshi, M.N. Determination of total polyphenolic compounds and flavonoids in *Juglans regia* leaves / M.N. Qureshi, G. Stecher, G.K. Bonn // *Pakistan Journal of*

- Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 27, No. 4. – 865-869.
161. Regueiro, J. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry / J. Regueiroa, C. Sanchez-Gonzalezb, A. Vallverdi- Queraltb et al // Food Chemistry. - 2014. - Vol. 152. - P. 340-348.
162. Savage, G.P. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand / G.P. Savage // Plant Foods for Human Nutrition. - 2001. - Vol. 56, No. 1. - P. 75-82.
163. Savage, G.P. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils / G.P. Savage, P.C. Dutta, D.L. McNeil // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 1999. - Vol. 76, No. 9. - P. 1059-1063.
164. Schwindl, S. Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves / S. Schwindl, B. Kraus, J. Heilmann // Phytochemistry. – 2017. – Vol. 144. – P. 58-70. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.08.012.
165. ScienceDirect – full-text scientific database [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.sciencedirect.com (дата обращения 10.11.2021).
166. Shimoda, H. Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine: hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut / H. Shimoda, J. Tanaka, M. Kikuchi, T. Fukuda, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56, No. 12. P. 4444–4449.
167. Slatnar, A. Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.) / A. Slatnar, M. Mikulic-Petkovsek, F. Stampar // Food Research International. - 2015. - Vol. 67. - P. 255-263.
168. SpringerLink [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.springer.com>.
169. Strelyaeva, A.V. Study of quality medicinal plants bark walnuts and extract from it / A. V. Strelyaeva, D. I. Lezhava, A. N. Luferov // Pharmacognosy Journal. – 2020. – Vol. 12. – No 2. – P. 282-286. – DOI 10.5530/pj.2020.12.44.
170. Strugstad, M.P. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of

- juglone: A literature review / M.P. Strugstad, S. Despotovski // *Journal of Ecosystems and Management*. – 2012. – Vol. 13, No. 3. – P. 1–16.
171. Su, C. Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS / C. Su, C. Li, K. Sun, W. Li, R. Liu // *Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 331. – P. 127180. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127180.
172. The International pharmacopoeia [electronic resource] - 10th ed. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.1> Текст электронный.
173. The European pharmacopoeia (Ph. Eur.) [electronic resource] - 10th Edition (1 July 2019). – URL - <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Текст: электронный.
174. The Cochrane Library // URL: <http://www.cochranelibrary.com> (дата обращения: 12.07.2021). – Текст: электронный.
175. Thomson, R.H. Naturally occurring quinones IV: recent advances. R.H. Thomson. – London: Springer, 1997. – 746 p.
176. Tomasziewicz-Potępa, A.A. method of isolation of juglone from walnut leaves / A. Tomasziewicz-Potępa, O. Vogt, D. Siewiec // *Химия и химическая технология*. – 2005. – Т. 48, вып. 11. – С. 85-90.
177. US National Library of Medicine National Institutes of Health. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (дата обращения 10.11.2021).
178. Willis, L.M. Walnut extract inhibits LPS-induced activation of BV-2 microglia via internalization of TLR4: possible involvement of phospholipase D2 / L.M. Willis, D.F. Bielinski, D.R. Fisher, N.R. Matthan, J.A. Joseph // *Inflammation*. – 2010. – Vol. 33, No. 5. – P. 325–333.
179. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/ru/>. (дата обращения 10.02.2021).
180. Yan, M. Separation and analysis of flavonoid chemical constituents in flowers of *Juglans regia* L. by ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole

- time-of-flight mass spectrometry / M. Yan, M. Chen, F. Zhou, D. Cai, H. Bai, P. Wang, H. Lei, Q. Ma // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. Vol. 164. – P. 734-741. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.11.029.
181. Zakavi, F. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria / F. Zakavi, L.G. Hagh, A. Daraeighadikolaei, A.F. Sheikh, A. Daraeighadikolaei, Z.L. Shooshtari // *International Journal of Dentistry*. – 2013. – Vol. 2013 (2013), Art. ID 854765, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/854765>.
182. Zhang, X.B. Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines / X.B. Zhang, C.L. Zou, Y.X. Duan, F. Wu, G. Li // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2015. – Vol. 15. – P. 396.
183. Zhao, M.H. Flavonoids in *Juglans regia* L. leaves and evaluation of in vitro antioxidant activity via intracellular and chemical methods / M.H. Zhao, Z.T. Jiang, T. Liu, R. Li. // *The Scientific World Journal*. – 2014. – Vol. 2014. - Art. ID 303878.
184. Zhou, Y. Studies on Cytotoxic Activity against HepG-2 Cells of Naphthoquinones from Green Walnut Husks of *Juglans mandshurica* Maxim / Y. Zhou, B. Yang, Y. Jiang, Z. Liu, Y. Liu, X. Wang, H. Kuang // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, No. 9. – P. 15572-15588. <https://doi.org/10.3390/molecules200915572>.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. ЯМР- и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из коры и листьев ореха черного

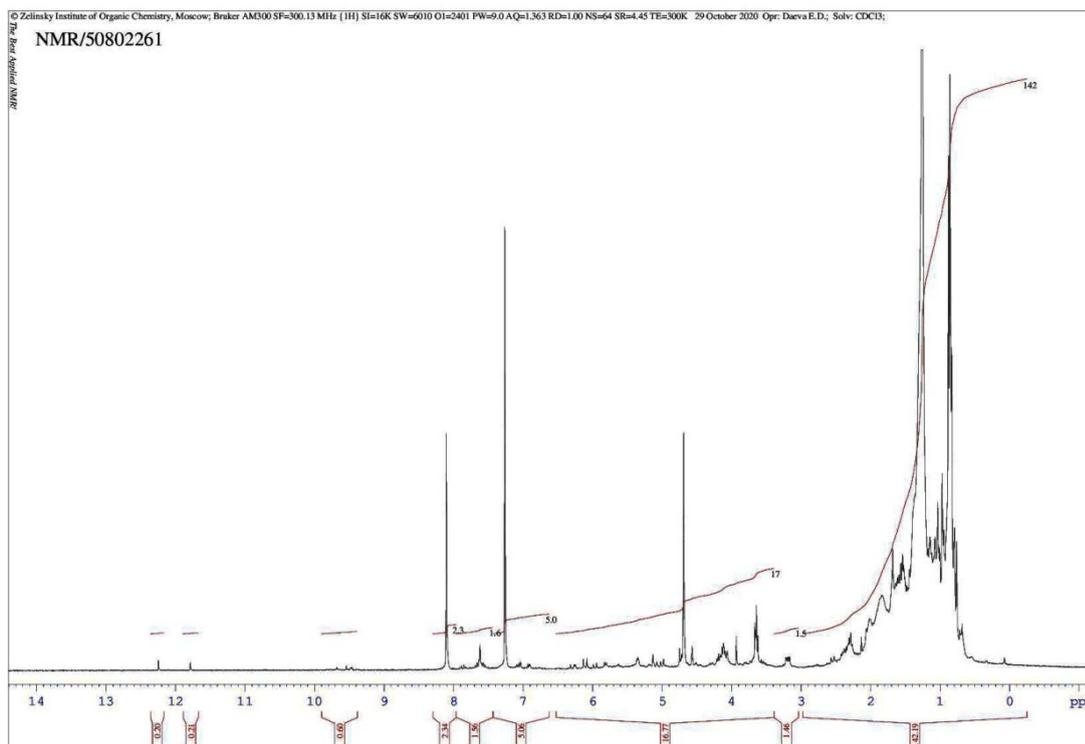


Рисунок 1 - ^1H -ЯМР-спектр юглона (**1**) в CDCl_3 .

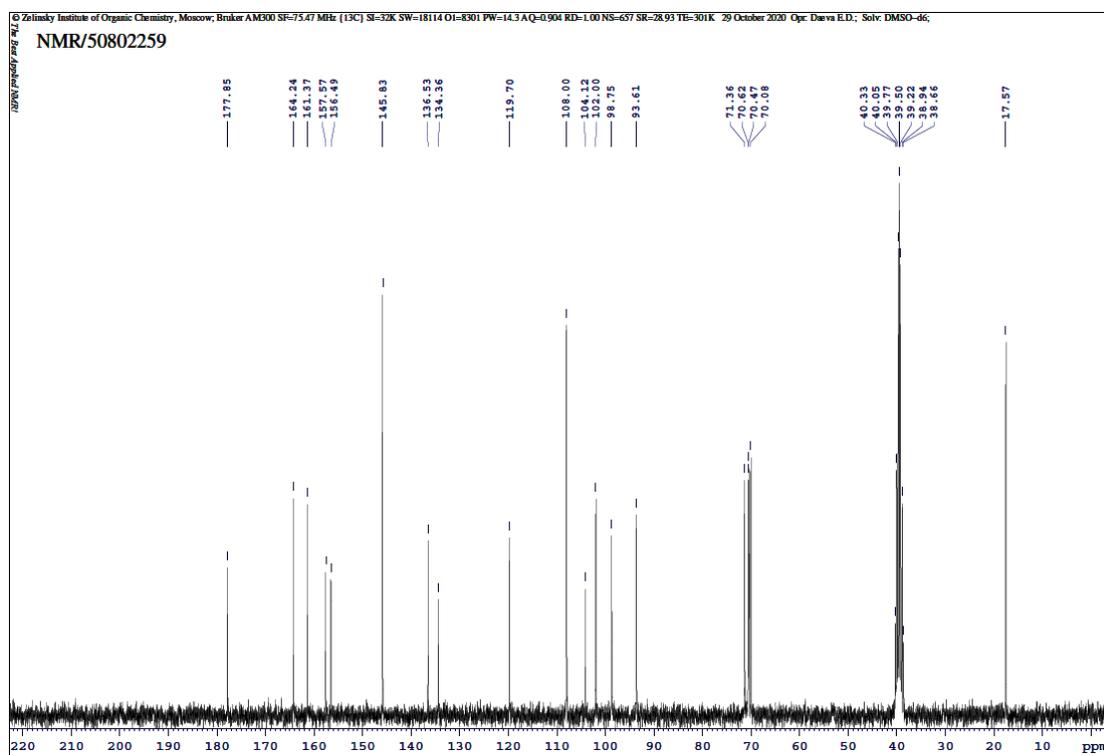


Рисунок 2 - ^{13}C -ЯМР-спектр юглона (**1**) в CDCl_3 .

Count	82	Data Type	MASS SPECTRUM	Date	20 Oct 2020 13:27:38
Date Stamp	20 Oct 1920 13:27:37	File Name	C:\ACDLabs\ms2_1	MASS SPECTRUM	
Inlet Model	DIRECT	Instrumental Parameters	LOW RESOLUTION	Origin	JN-2
Owner	Copyright(C) by Victor (2020)	Spectrum Title	MASS SPECTRUM	TIC	1243.20
Total Signal	1243				

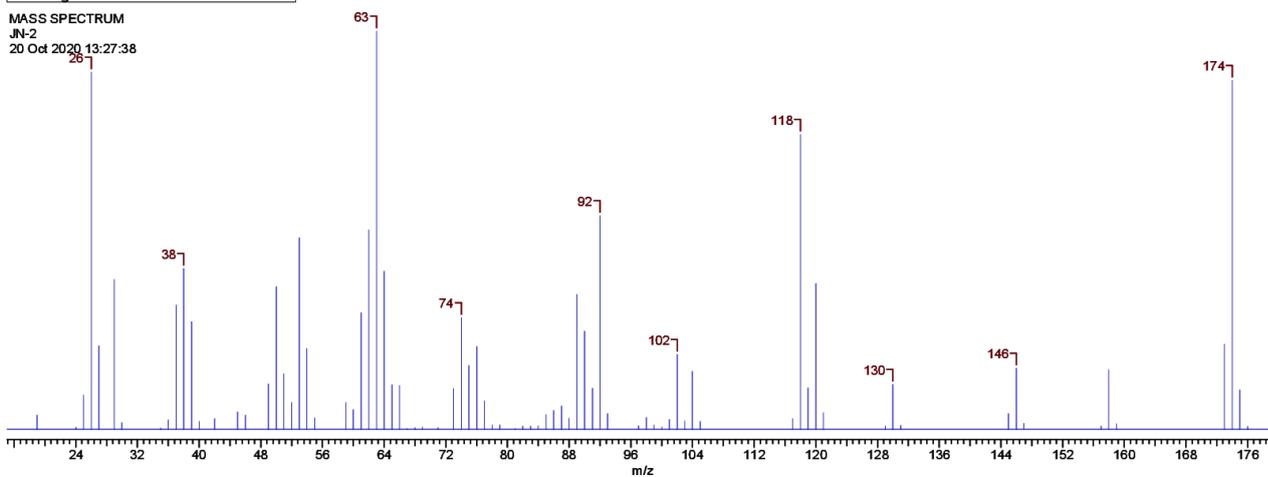
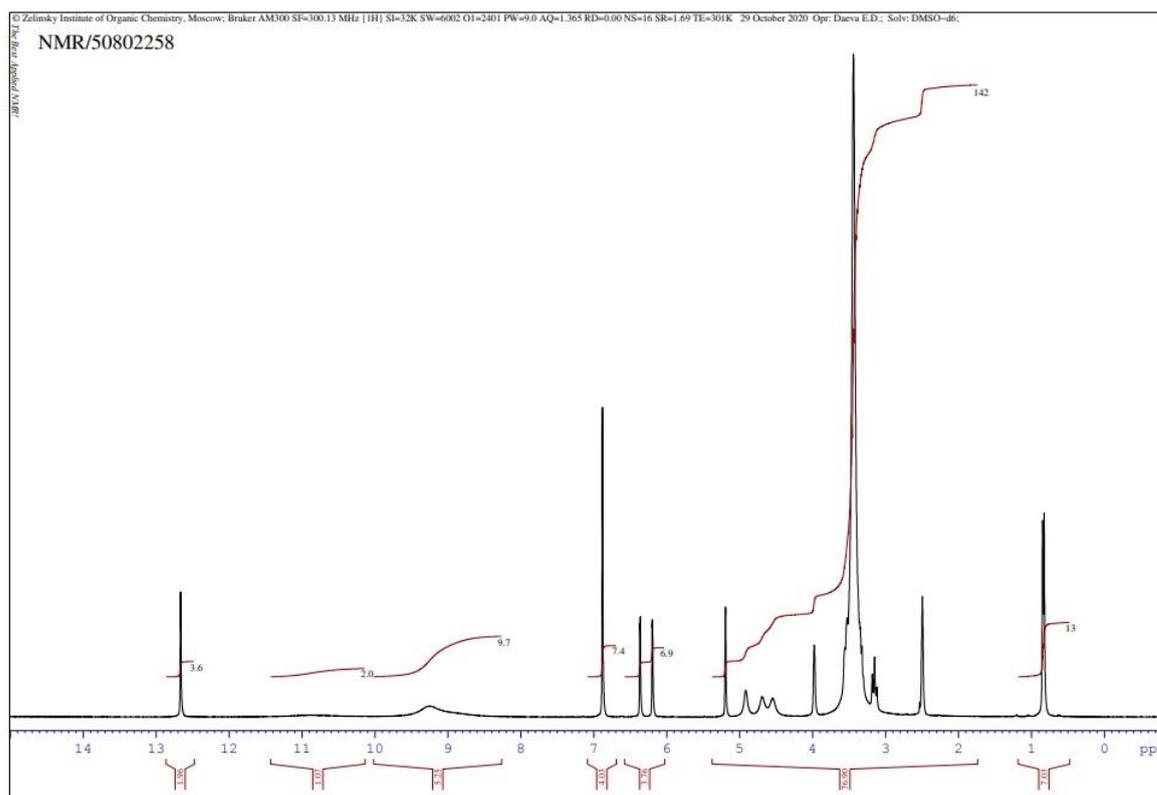


Рисунок 3 - Масс-спектр юглона (1).

Рисунок 4 - ^1H -ЯМР-спектр мирицитрина (2) в DMSO-d_6 .

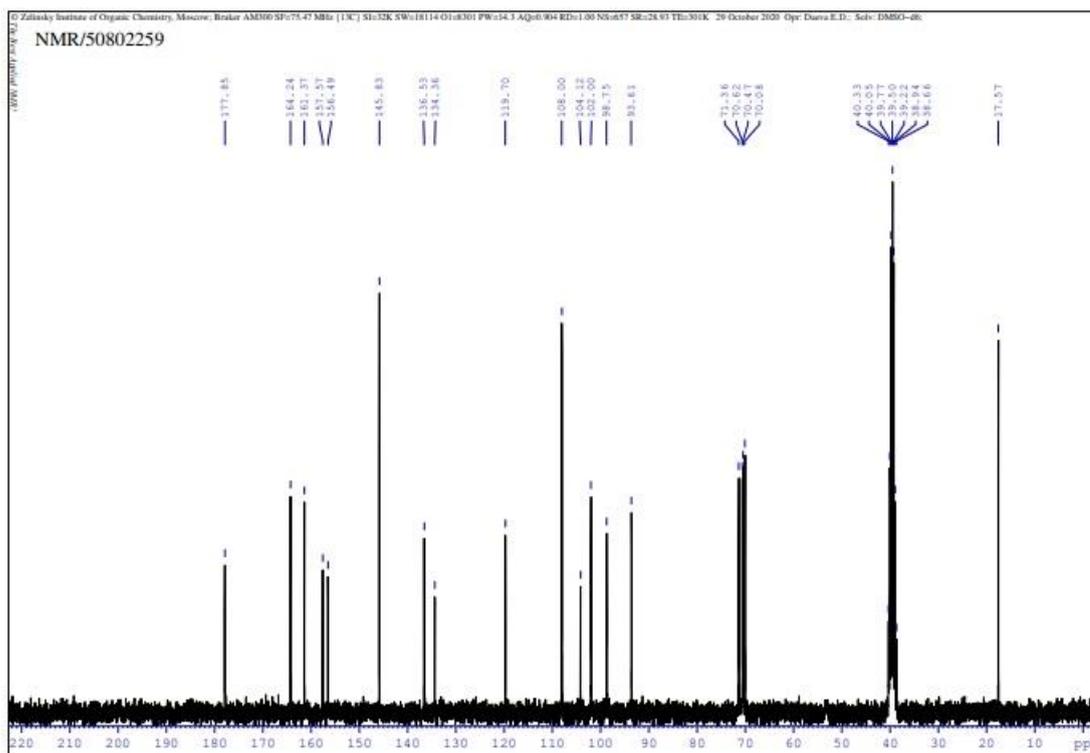


Рисунок 5 - ^{13}C -ЯМР-спектр мирицитрина (2) в DMSO-d_6 .

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Kolotyorkina\2020\Kurkin\1021013.d
 Method tune_50-1600.m
 Sample Name /NGKO JN-1
 Comment C21H20O14 mH 497.0925 calibrant added H2O/CH3CN

Acquisition Date 21.10.2020 12:46:47

Operator BDAL@DE
 Instrument / Ser# micrOTOF 10248

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.0 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1600 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste

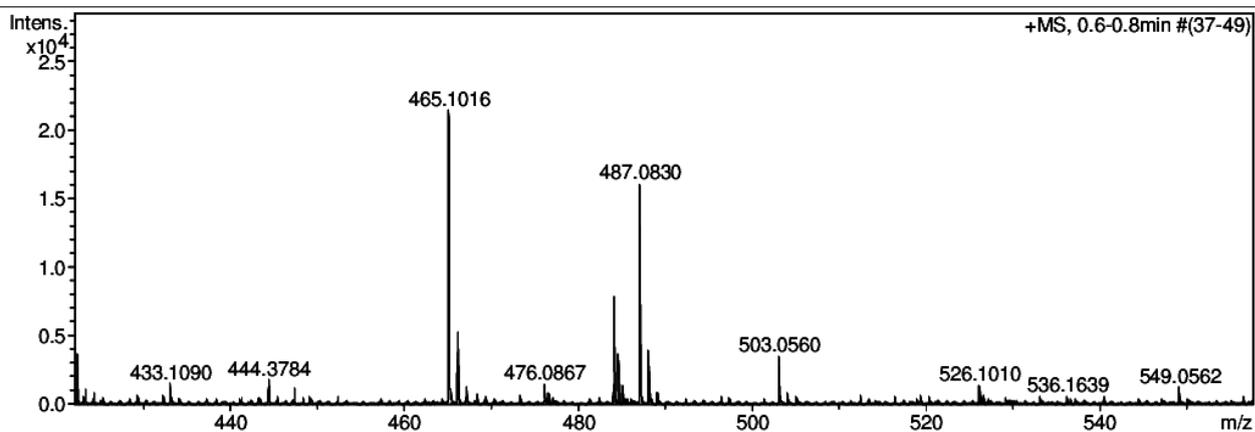
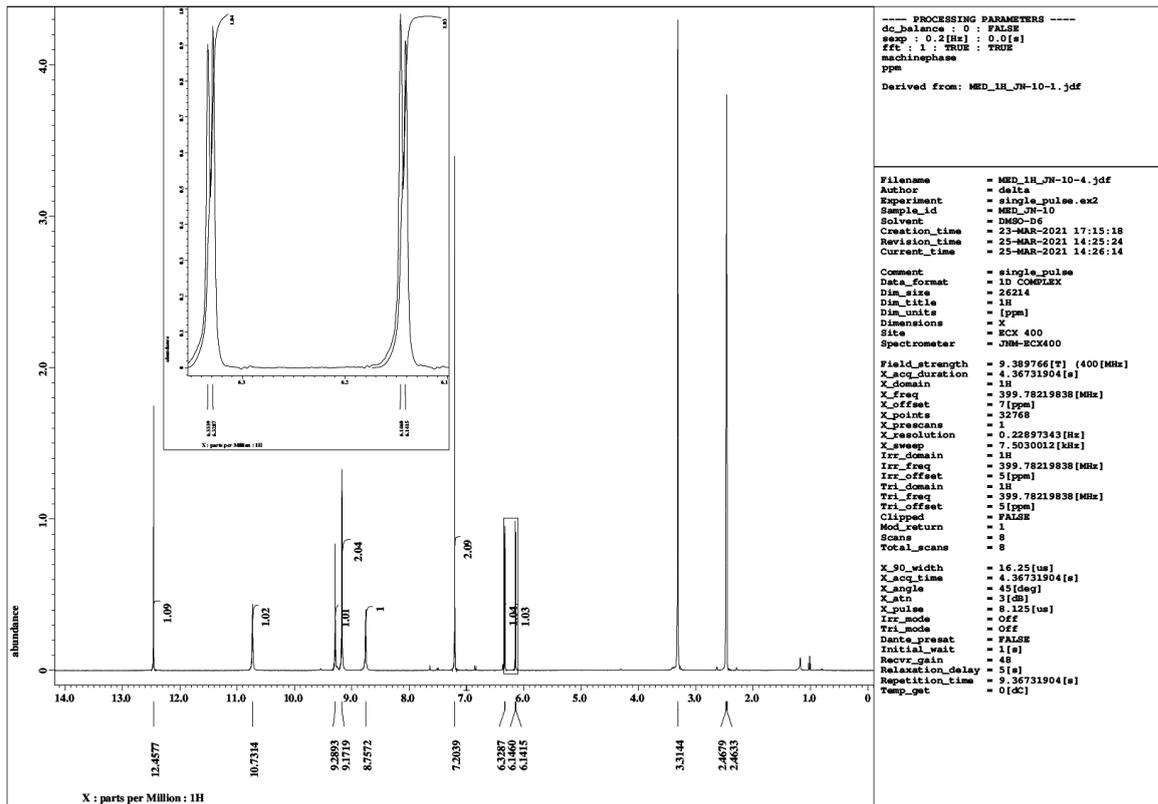
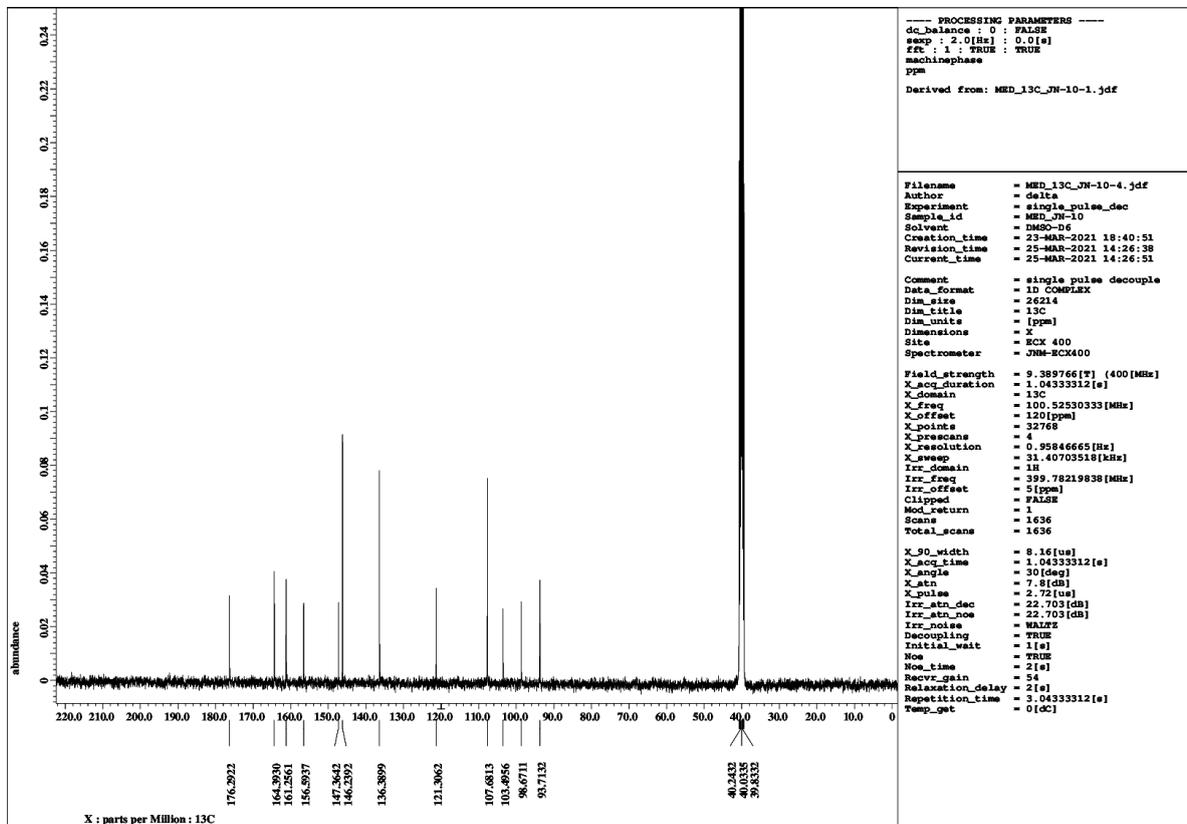
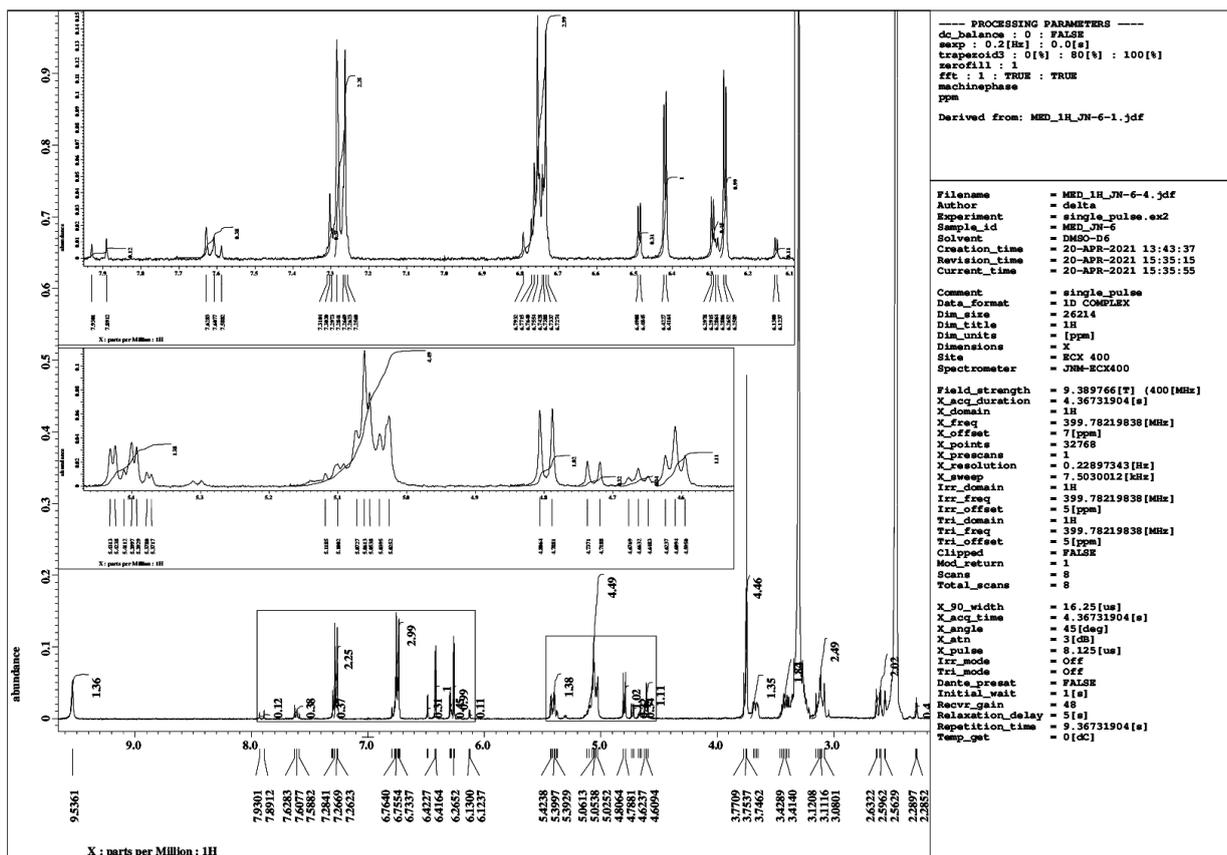
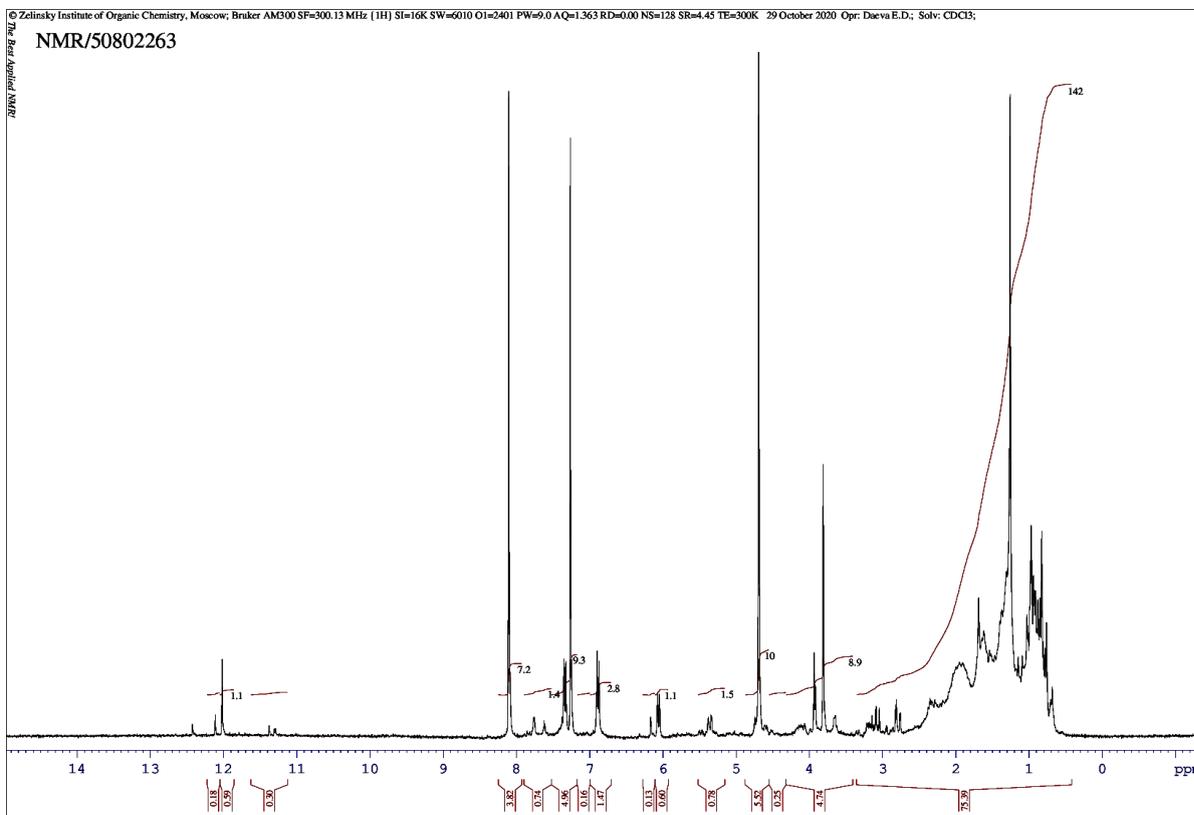


Рисунок 6 - Масс-спектр мирицитрина (2).

Рисунок 7 - ^1H -ЯМР-спектр мирицетина (3) в DMSO-d_6 .Рисунок 8 - ^{13}C -ЯМР-спектр мирицетина (3) в DMSO-d_6 .

Рисунок 9 - ^1H -ЯМР-спектр сакуранина (4) в DMSO-d_6 .Рисунок 10 – ^1H -ЯМР-спектр сакуранетина (5) в CDCl_3 .

20 Oct 2020

Count	185	Data Type	MASS SPECTRUM	Date	20 Oct 2020 13:27:38
Date Stamp	20 Oct 1920 13:27:37	File Name	C:\ACDLabs\ms2_2	MASS SPECTRUM	
Inlet Model	DIRECT	Instrumental Parameters	LOW RESOLUTION	Origin	JN-3
Owner	Copyright(C) by Victor (2020)	Spectrum Title	MASS SPECTRUM	TIC	1344.16
Total Signal	1344				

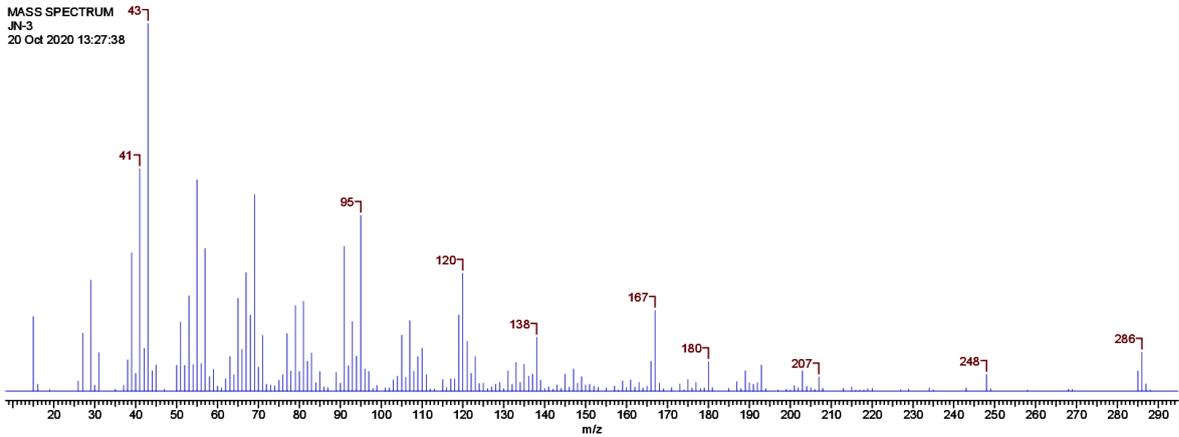
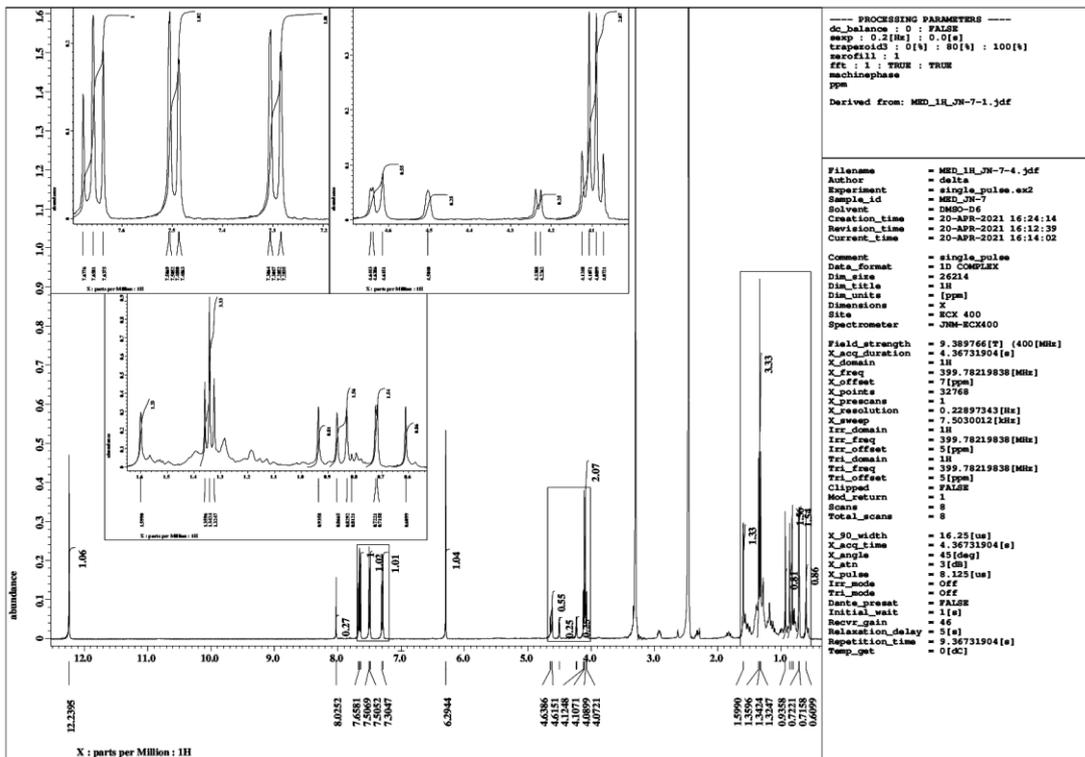
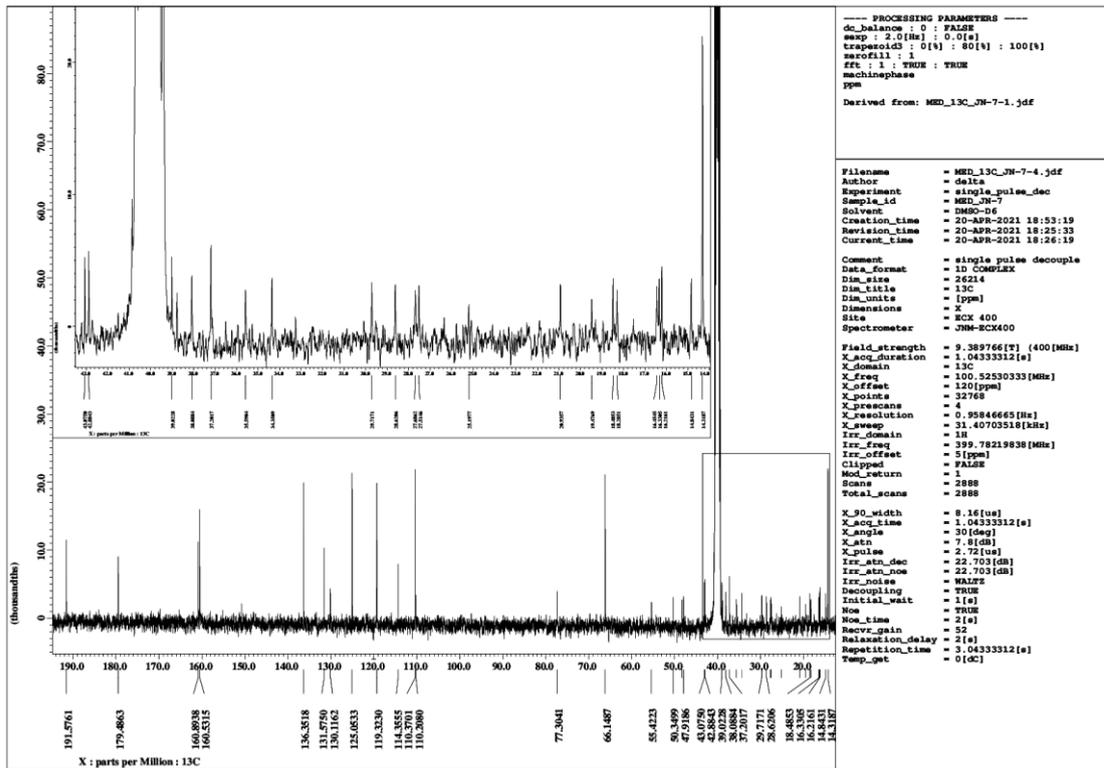
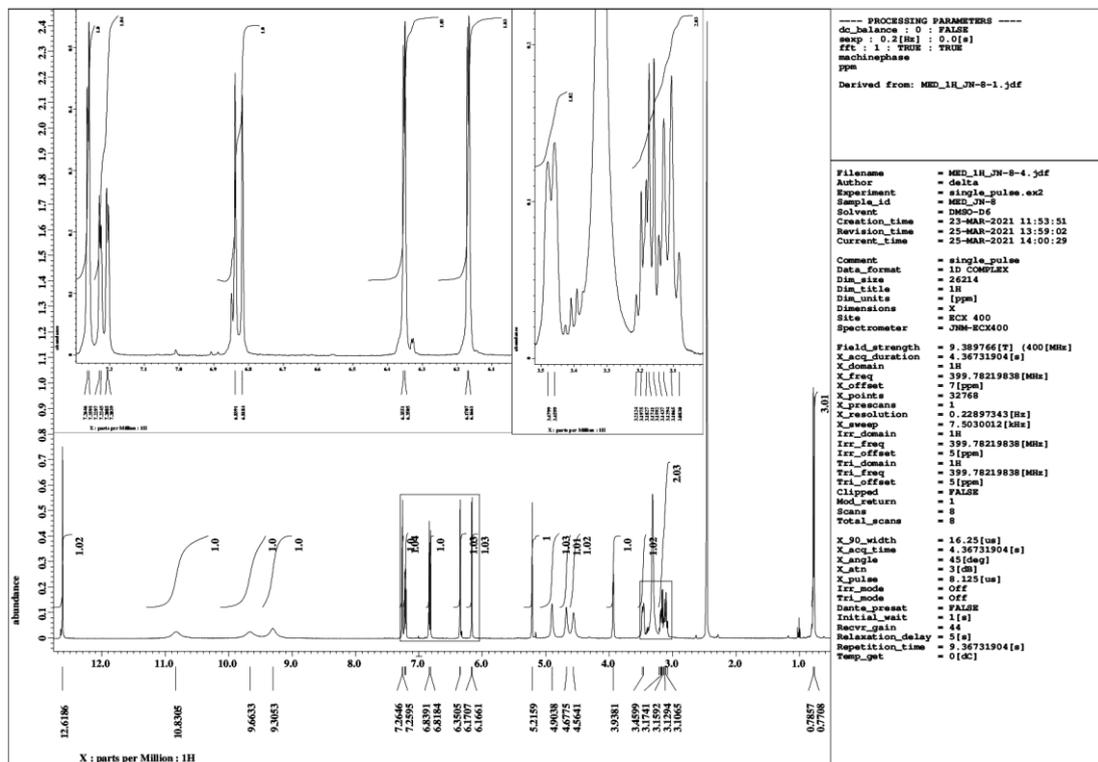
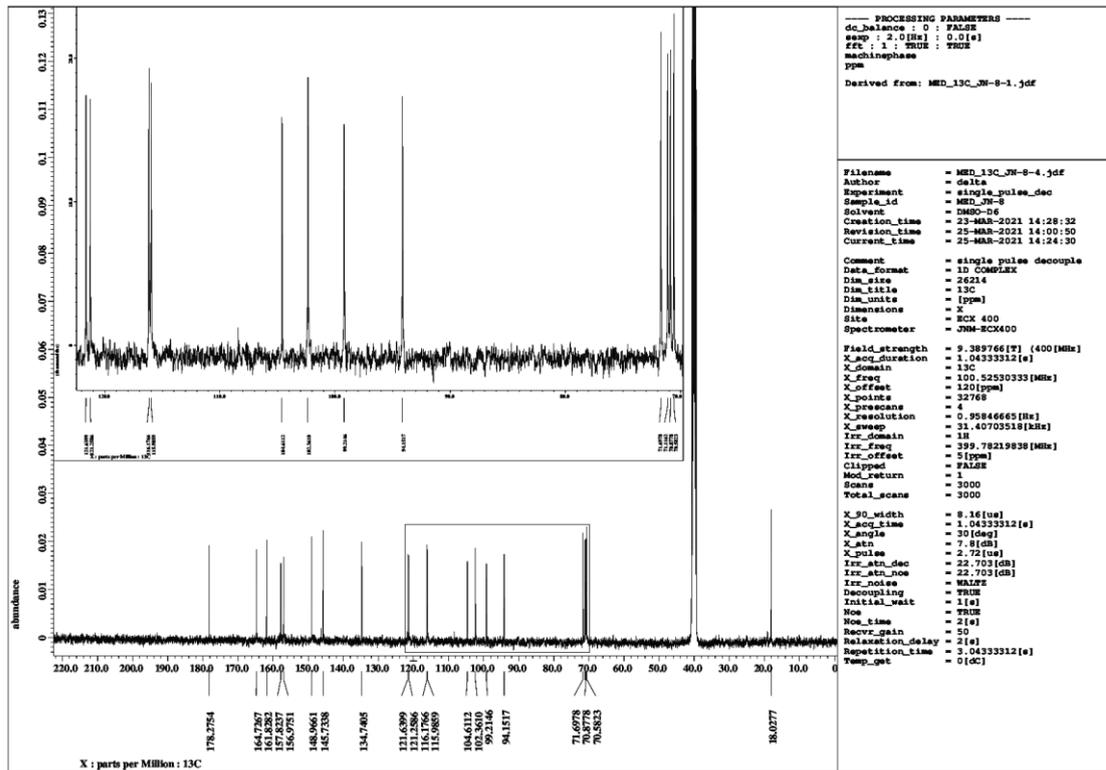
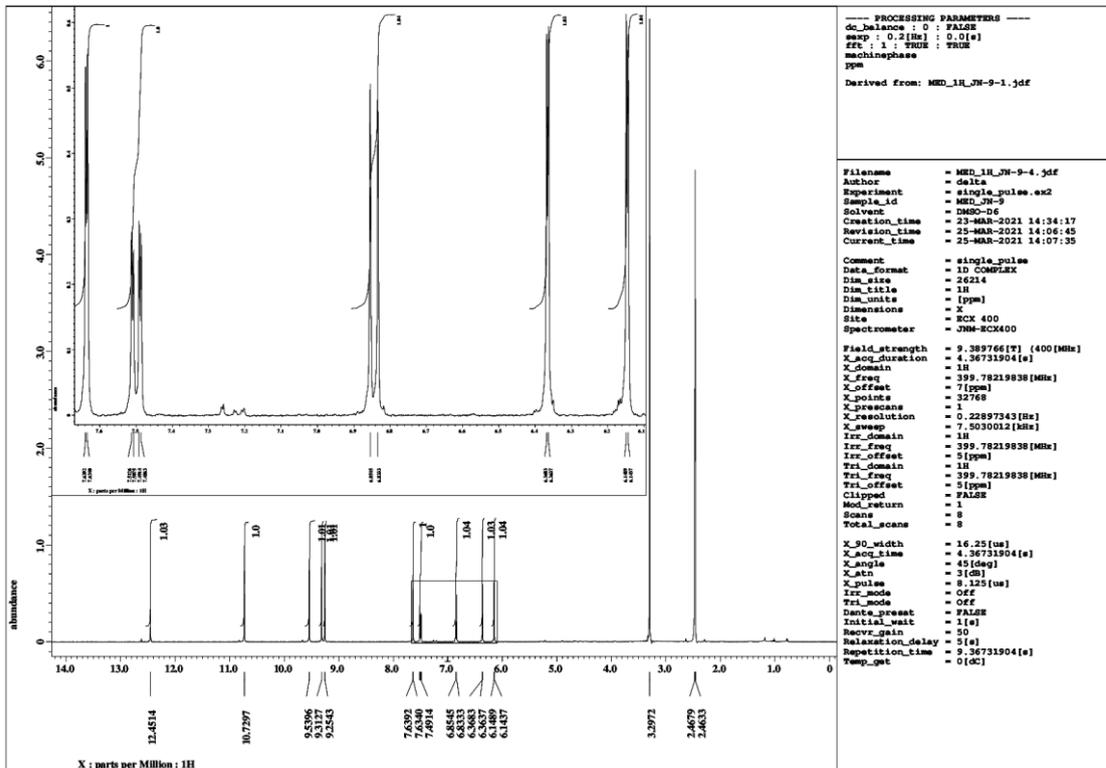


Рисунок 11 - Масс-спектр сакуранетина (5).

Рисунок 12 - ^1H -ЯМР-спектр этоксиюглона (1) в CDCl_3 .

Рисунок 13 – ^{13}C -ЯМР-спектр этоксиюглона (1) в CDCl_3 .Рисунок 14 – ^1H -ЯМР-спектр кверцитрина (2) в DMSO-d_6 .

Рисунок 15 - ^{13}C -ЯМР-спектр кверцитрина (2) в DMSO-d_6 .Рисунок 16 – ^1H -ЯМР-спектр кверцетина (3) в DMSO-d_6 .

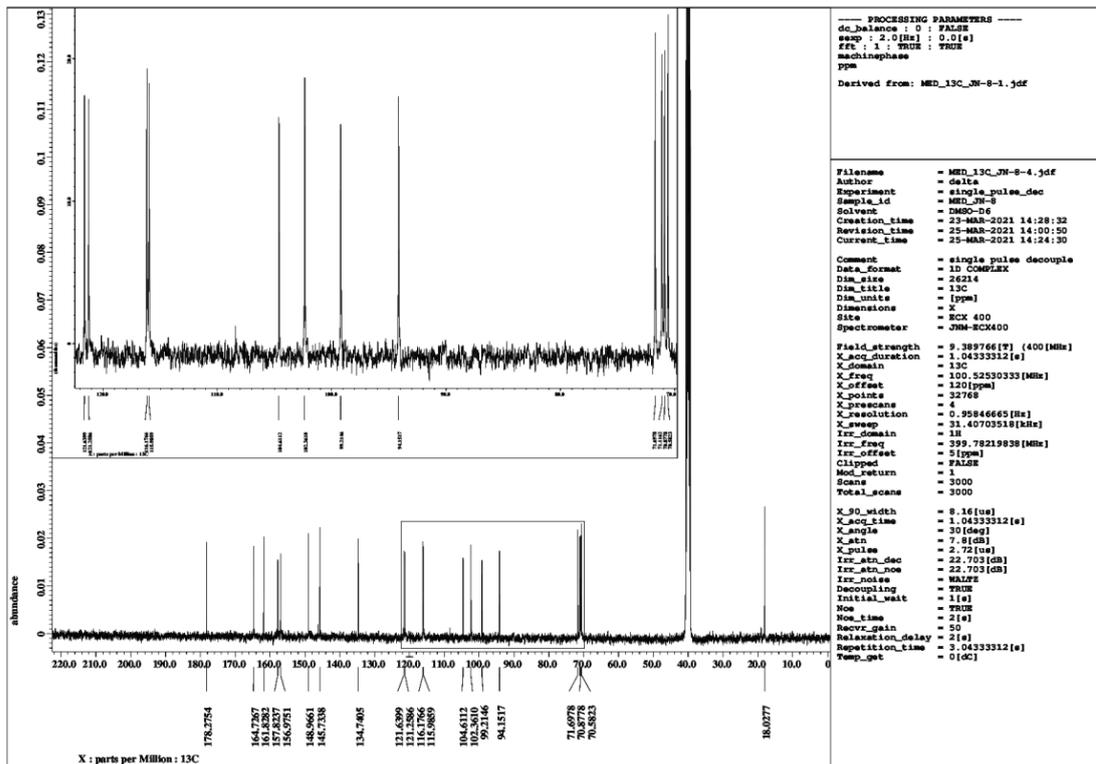


Рисунок 17 – ^{13}C -ЯМР-спектр кверцетина (3) в DMSO-d_6 .

Приложение 2. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»



О.В. ОСИПОВА

января 2020 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «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» заместителя начальника центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Зименкиной Н.И., посвященного фармакогностическому исследованию коры, листьев и плодов ореха черного 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 и УФ-спектроскопии в присутствии СО юглона, СО рутина. Методики определения подлинности сырья и препаратов коры, листьев и плодов ореха черного, а также методики определения суммы флавоноидов в сырье ореха воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Зименкиной Н.И. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья ореха черного, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», кандидат фармацевтических наук

 Л.Е. ЖНЯКИНА

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

 Г.И. ВЛАСОВА

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

 Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

«15» января 2020 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «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» заместителя начальника центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Зименкиной Н.И., посвященного фармакогностическому исследованию коры, листьев и плодов ореха грецкого 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 и УФ-спектроскопии в присутствии СО юглона, СО рутина. Методики определения подлинности сырья и препаратов коры, листьев и плодов ореха грецкого, а также методики определения суммы флавоноидов в сырье ореха воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Зименкиной Н.И. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья ореха грецкого, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»,
кандидат фармацевтических наук

Л.Е. ЖНЯКИНА

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

Г.И. ВЛАСОВА

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

Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ



«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

января 2020 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «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» заместителя начальника центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Зименкиной Н.И., посвященного фармакогностическому исследованию коры, листьев и плодов ореха серого 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 и УФ-спектроскопии в присутствии СО юглона, СО рутина. Методики определения подлинности сырья и препаратов коры, листьев и плодов ореха серого, а также методики определения суммы флавоноидов в сырье ореха воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Зименкиной Н.И. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья ореха серого, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»,
кандидат фармацевтических наук

 Л.Е. ЖНЯКИНА

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

 Г.И. ВЛАСОВА

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

 Е.Е. МИРОНОВА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»


 _____ М.С. Глебов
 « 18 » _____ 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

Результаты диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны, посвященные изучению химического состава, вопросов фитохимической и морфолого-анатомической диагностики, определению диагностических признаков, обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и создания лекарственных препаратов на основе представителей рода Орех (*Juglans L.*): ореха черного, ореха грецкого и ореха серого.

Внедренные результаты используются в рабочем процессе ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», способствуют повышению объективности и научному обоснованию целесообразности использования современных подходов контроля качества лекарственного растительного сырья видов рода Орех, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог
 ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»



Д.С. Зуев

« 18 » _____ 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «Лекарь»
Бобров Д.Ю.

« 25 » _____ 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ООО «Лекарь»

Результаты диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны, посвященные изучению химического состава, определению диагностических признаков, обоснованию подходов к стандартизации состава и использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов видов рода Орех (*Juglans L.*): ореха черного, ореха грецкого и ореха серого.

Внедренные результаты, используемые в рабочем процессе ООО «Лекарь», являются методической и методологической основой для научного обоснования целесообразности использования современных подходов контроля качества лекарственного растительного сырья видов рода Орех, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог ООО «Лекарь»

Д.С. Зуев

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Самарского государственного
медицинского университета,
Лауреат премии Правительства РФ,
д.м.н., профессор
И.П. Давыдкин
" 15 " 11 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия на кафедре химии Института фармации СамГМУ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии Института фармации: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Воропина А.В., доцента кафедры, к.х.н., доцента Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.б.н., доцента Расцветовой Н.В. подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Зименкиной Н.И., посвященной изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов видов рода Орех (*Juglans L.*) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья видов рода Орех.

Члены комиссии:

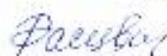
Зав. кафедрой химии Института фармации
д. фарм. н., доцент

 А.В. Воропин

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

 С.Х. Шарипова

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

 Н.В. Расцветова

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Самарского государственного
медицинского университета,
Лауреат премии Правительства РФ,
д.м.н., профессор

И.Л. Давылкин
" 22 " 11 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

**результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны
«Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода
Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами
фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России**

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: профессора кафедры, д.фарм.н., доцента Правдивцевой О.Е., доцента кафедры, д.фарм.н., доцента Браславского В.Б., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Браславского В.Б., подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Зименкиной Н.И., посвященной изучению вопросов фитохимической и морфолого-анатомической диагностики, методов стандартизации лекарственного сырья и создания лекарственных препаратов на основе представителей рода Орех (*Juglans L.*): ореха черного, ореха грецкого и ореха серого в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и ординаторами и в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья.

Члены комиссии:

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

О.Е. Правдивцева

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

В.Б. Браславский

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

В.М. Рыжов

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Самарского государственного
медицинского университета,
Лауреат премии Правительства РФ,
д.м.т., профессор

И.Л. Давылкин

2022 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогнозическое исследование представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий: зав. кафедрой, доцента, д.фарм.н. А.В. Куркиной, профессора кафедры, профессора, д.фарм.н. С.В. Первухина, доцента кафедры, к.фарм.н. Л.Д. Климовой подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Зименкиной Н.И., посвященной изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов представителей рода Орех (*Juglans L.*), в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по производству лекарственных препаратов на основе данного растения.

Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и технологической основой для научного обоснования ресурсосберегающих технологий.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д.фарм.н., доцент

А.В. Куркина

Профессор кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д.фарм.н., профессор

С.В. Первухин

Доцент кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
к.фарм.н., доцент

Л.Д. Климова

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Самарского государственного
медицинского университета,
Лауреат премии Правительства РФ,
д.м.н., профессор
И.Л. Давыдкин
" 13 " 01 2022 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

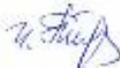
результатов диссертационного исследования Зименкиной Натальи Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Орех (*Juglans L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, д.фарм.н. И.К. Петрухиной, профессора кафедры, доцента, д.фарм.н. Е.П. Гладуновой, доцента кафедры, доцента, к.фарм.н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов исследования Зименкиной Н.И., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов видов рода Орех (*Juglans L.*), в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами Института фармации, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований антимикробных средств.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности создания конкурентоспособных лекарственных препаратов, обладающих антимикробным действием, в том числе импортозамещающих.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации
д. фарм. н., доцент

 И.К. Петрухина

Профессор кафедры управления и экономики фармации
д. фарм. н., доцент

 Е.П. Гладунова

Доцент кафедры управления и экономики фармации
к. фарм. н., доцент

 Е.Л. Абдулманова

Приложение 3. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2747417

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В КОРЕ ОРЕХА ЧЕРНОГО

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Куркин Владимир Александрович (RU), Зименкина Наталья Игоревна (RU)*

Заявка № 2020129429
 Приоритет изобретения **04 сентября 2020 г.**
 Дата государственной регистрации
 в Государственном реестре изобретений
 Российской Федерации **04 мая 2021 г.**
 Срок действия исключительного права
 на изобретение истекает **04 сентября 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы
 по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



Приложение 4. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2747482

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ ОРЕХА
ГРЕЦКОГО**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Куркин Владимир Александрович (RU), Зименкина Наталья Игоревна (RU)*

Заявка № 2020129431

Приоритет изобретения 04 сентября 2020 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 05 мая 2021 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 04 сентября 2040 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ильин



Приложение 5. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Ореха черного кора»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», доктор фармацевтических наук, профессор

Е.И. САКАНЯН

«__» _____ 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

Ореха черного кора

ФС.2.5. .

Вводится впервые

Juglandis nigrae cortex

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г

Заготовленная в период сокодвижения (апрель) кора дикорастущих и культивируемых деревьев ореха черного – *Juglans nigra* L., сем. Ореховых – *Juglandaceae*

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) или под микроскопом (8x, 16x, 20x, 40x) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

Трубчатые, желобоватые или плоские кусочки коры длиной до 15 см и шириной 2-3 см. Наружная поверхность коры тёмно-серого цвета, грубо шероховатая с крупными чечевичками и трещинами. С внутренней стороны кора светло-желтая, почти белая. На изломе кора ровная не ворсинистая.

Запах коры слабый специфический. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Измельченное сырье.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки коры различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Кусочки коры, снаружи грубо шероховатые тёмно-серого цвета, с крупными чечевичками и трещинами; с внутренней стороны кусочки гладкие, светло-желтые, почти белые. Излом — ровный, не ворсинистый.

Запаха слабый неспецифический. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

На поперечном срезе диагностируется достаточно развитая перидерма (рис. 1). Обнаруживается тонкий пробковый слой от темно-коричневого до черного цвета с клетками неправильной формы и фрагментами отшелушивающейся

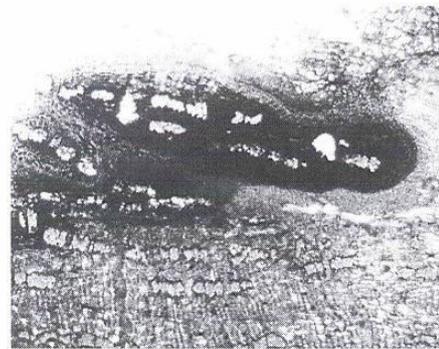
пробки прошлого года. При рассмотрении пробковой ткани могут диагностироваться особые образования – чечевички. За счет чередования сердцевинных лучей и твердого и мягкого луба в коровой части можно легко визуализировать зону флоэмы (от камбия к периферии). В области чередования твердого и мягкого луба отчетливо видны группы лубяных волокон, клеточные стенки которых при дневном свете желтого цвета. Стенки лубяных волокон толстые, слоистые, одревесневшие. Во вторичной коре расположены одно-трехрядные сердцевинные лучи; встречаются группы склеренхимных клеток с утолщенными одревесневшими слоистыми стенками. Основная паренхима коры мелкоклеточная. Протопласты клеток пигментированы в бурый, светло-желтый цвет. В клетках паренхимы, особенно первичной, выделяются фрагменты механической ткани - брахисклерииды, и скопления друз оксалата кальция звездчатой формы.

Измельченное сырье.

При рассмотрении давленого препарата должны быть видны мелкие и крупные частицы (обычно в продольном сечении): фрагменты темно-коричневой пробковой ткани с чечевичками; группы лубяных волокон с толстыми, слоистыми, одревесневшими, стенками среди паренхимных клеток; фрагменты паренхимы с клетками, содержащими друзы оксалата кальция звездчатой формы; фрагменты склеренхимных клеток; фрагменты паренхимы с брахисклереидами, одиночные друзы оксалата кальция.



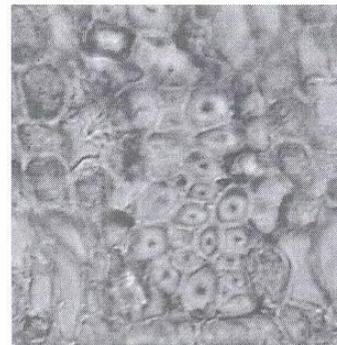
1.



2.



3.



4.

Рисунок 1 – Ореха черного кора:

1 – поперечный срез – перидерма коры (x100); 2 – фрагмент пробки (феллемы) поперечное сечение (x 100); 3 – фрагмент лубяной части коры (x 100); 4 – группы склеренхимных клеток на поперечном срезе (x400).

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора алюминия (III) хлорида спиртового, наблюдают появление зеленовато - желтое окрашивания через 20-30 мин.

2. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимумы поглощения: коротковолновый при длине волны 270 ± 2 нм, длиноволновый при длине волны 360 ± 2 нм (рис. 2).

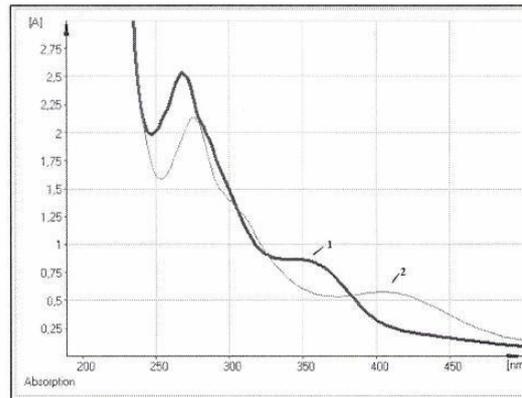


Рисунок 2 - Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из коры ореха черного.

Обозначения: 1 – исходный спектр; 2 – с добавлением алюминия хлорида.

3. Тонкослойная хроматография

Приготовление раствора мирицитрина - стандартного образца.
Около 0,02 г (точная навеска) мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане, остужают, затем доводят этиловым спиртом 96 % концентрации до метки и перемешивают.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» заранее активируют в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 60 минут.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля стеклянной микропипеткой наносят 20 мкл испытуемого раствора коры ореха черного и 20 мкл спиртового раствора СО

мирицитрина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 ч парами системы растворителей хлороформ: этанол: вода (28:15:2), и хроматографируют восходящим способом. Хроматография проводилась восходящим способом. Когда фронт элюентной системы пройдет 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из хроматографической камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО мирицитрина зона адсорбции желтого цвета и темно-коричневого цвета соответственно.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции желтого и темно-коричневого цвета соответственно, расположенные на уровне зон адсорбции СО мирицитрина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку обрабатывают 3 % спиртовым раствором $AlCl_3$ и просматривают в УФ-свете при $\lambda=365$ нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфо кислоты.

На хроматограмме раствора СО мирицитрина зоны адсорбции ярко-желтого цвета и желто-оранжевого цвета соответственно.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции ярко-желтого цвета и желто-оранжевого цвета соответственно, расположенные на уровне зон адсорбции СО мирицитрина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье,*

измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 5 %. *Измельченное сырье:* проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5 %.

Посторонние примеси.

Остатки древесины и веточек. *Цельное, измельченное сырье:* не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску. *Цельное, измельченное сырье:* не более 5%

Органическая примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1,5 %.

Минеральная примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 0,5 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин не менее 2,5 %; содержание мирицитрина не менее 2,0 %.

Метод 1. Приготовление растворов.

Раствор алюминия хлорида спиртовой 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.

Раствор 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 до комнатной температуры доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А мирицитрина). 1 мл раствора А мирицитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б мирицитрина).

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 30 мл 80 % 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 (красная полоса).

Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного 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 % (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения раствор, полученный следующим образом: 1 мл

извлечения (1:30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 416 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А мирицитрина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б мирицитрина).

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

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

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.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин вычислять с использованием удельного показателя поглощения мирицитрина при длине волны 416 нм, который равен 432.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО мирицитрина, г;

432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО мирицитрина при 416 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метод 2. Приготовление растворов.

Раствор мирицитрина-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного мирицитрина - содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 80 % этиловом спирте и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограмме раствора А испытуемого раствора (360 нм) слева от пиков мирицитрина выходит пик, соответствующий по времени удерживания СО мирицетина.

На хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пиков мирицитрина.

На хроматограммах растворов СО разрешение между пиками мирицитрина должно быть не менее 1,5.

На хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пиков мирицитрина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

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 30 мл 80% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на весах с точностью до 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 (красная полоса) и затем дополнительно через мембранный фильтр Milipore с диаметром пор 0,45 мкм (испытуемый раствор).

Хроматографические условия

Колонка КАХ (2 x 64 мм, сталь), стационарная фаза “Separon C18”, 5 мкм

ПФ А – ацетонитрил

В – вода (с добавлением уксусной кислоты)

К 20 мл ацетонитрила (СТП ТУ СОМР 3-074-06, для высокоэффективной жидкостной хроматографии) прибавляют 80 мл воды дистиллированной, 0,8 мл ледяной уксусной кислоты и тщательно перемешивают. Смесь фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,4 - 0,5 мкм под вакуумом (при остаточном давлении 7 - 15 мм рт. ст. - водоструйный насос). Элюент дегазируют гелием непосредственно перед анализом. Срок годности элюента сутки.

Способ элюирования Изократический

Время	А, об. %	В, об. %
0	20	80
25	20	80

Скорость потока, мкл/мин 100

Температура +23±2

Детектор Многоволновый спектрофотометрический УФ или диодная матрица
360 нм (определение мирицитрина и кверцитрина)

Объем вводимой пробы, мкл 4

Время хроматографирования, мин 20

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Параллельно вводят в хроматограф и хроматографируют последовательно не менее 3 раз 4 мкл растворов СО мирицитрина (раствор А СО мирицитрина) и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Определяют времена удерживания и идентифицируют пики мирицитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площади пиков мирицитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

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

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

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

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование 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,
профессор



И.Л. Давыдкин

« 23 » _____ 2021 г.

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

« 23 » _____ 12 _____ 2021 г.

Очный аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

« 23 » _____ 12 _____ 2021 г.

Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Ореха черного листья»

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», доктор
фармацевтических наук, профессор

Е.И. САКАНЯН

«__» _____ 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

Ореха черного листья

ФС.2.5. .

Вводится впервые

Juglandis nigrae folia

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

Собранные в конце мая и начале июня и высушенные листья дикорастущих и культивируемых деревьев ореха черного – *Juglans nigra* L., сем. Ореховых – *Juglandaceae*

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) или под микроскопом (8x, 16x, 20x, 40x) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

Цельные или частично измельченные листья, сложные, непарноперистого листорасположения, длинночерешковые длиной 20-30 см, шириной 10 см. Отдельные листовые пластинки узкояйцевидной или эллиптической формы с заостренной верхушкой, при основании слегка неравнобокие. Край листа зубчатый. Лист достаточно опушен с абаксиальной стороны.

Листья с верхней стороны зеленые, снизу более светлые, молодые листья с редкими волосками и длинными уплощенными черешками. Жилкование листьев перистое.

Запах ароматный, усиливающийся при растирании. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Измельченное сырье.

Кусочки листовых пластин, рахисов, черешков и прилистников различной формы и размера, проходящие сквозь сито диаметром 1 мм, цвет кусочков листьев с верхней стороны зеленый и с нижней - светло-зеленый.

Запах ароматный. Вкус водного извлечения пряно-горький.

Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье.

Анатомически листовые пластинки листа дорзовентрального типа строения, при этом отмечена значительная выраженность складчатой паренхимы.

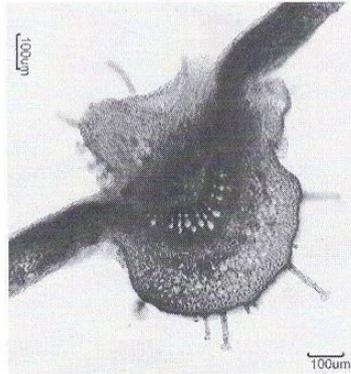
Главная жилка на поперечном срезе листовой пластинки листа в целом округлая по форме, но уплощенная с адаксиальной стороны (рис. 1). В жилке локализуются 3 пучка проводящих тканей: один основной – в форме полумесяца, располагается с абаксиальной стороны, а также 2 других с адаксиальной стороны.

Центральная жилка листовой пластинки армирована механическими тканями. На поперечном сечении в медиальной и апикальной частях листовой пластинки под эпидермисом хорошо выражена колленхима уголкового типа. При этом в структуре пучков склеренхимная часть выражена очень слабо или не выражена совсем. В то же время в базальной части листовой пластинки склерификация выражена значительно. Склеренхима окружает проводящие пучки центральной жилки. Кроме того, отмечается значительное содержание крупных округлых друз в области колленхимы в базальной части поперечного среза листовой пластинки.

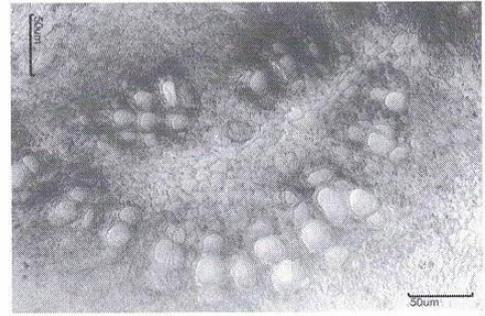
При рассмотрении верхней листовой пластинки с поверхности должны быть заметны тонкостенные клетки эпидермиса, прямоугольной формы с извилистыми стенками. В мезофилле верхней стороны листа необходимо отметить значительное содержание крупных округлых друз.

С нижней стороны листовой пластины должны быть заметны клетки с извилистыми тонкими стенками эпидермиса.

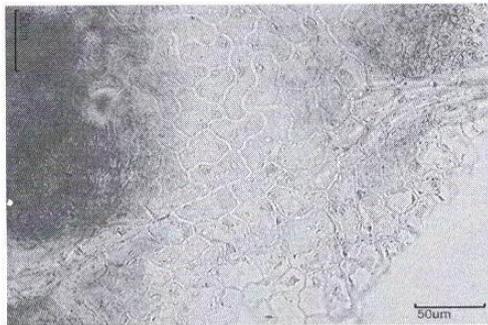
Устьичные аппараты листьев аномоцитного типа. Устьица расположены только с нижней стороны листа: гипостоматический вид листовой пластинки.



1.



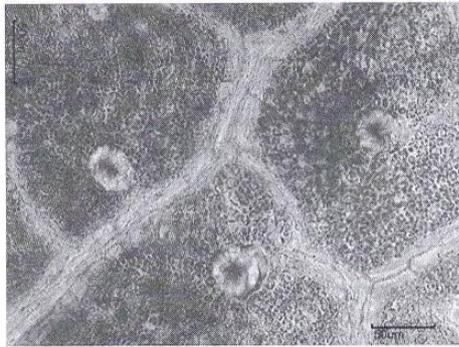
2.



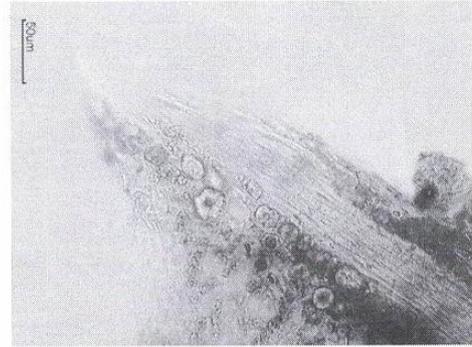
3.



4.



5.



6.

Рисунок 1 – Ореха черного лист:

1 – поперечный срез жилки – общий вид (x100); 2 – строение пучка жилки листовой пластинки (x400); 3 – эпидермис верхней стороны листа (x400); 4 – эпидермис нижней стороны листа (x400); 5- друзы в мезофилле верхней стороны листовой пластинки (x400); 6 – кристаллоносная обкладка жилки нижней стороны листовой пластинки (x400).

Кроме того, обнаруживаются производные эпидермальных клеток, представленные несколькими типами нежелезистых волосков и железистых трихом (рис. 2). Нежелезистые - одноклеточные волоски, а также пучковые волоски с двумя-восемью ответвлениями, расположенные вдоль жилок листовой пластинки. Железистые трихомы представлены волосками с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой; есть волоски с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой. При окраске суданом III железистые трихомы окрашиваются в оранжевый цвет.

При рассмотрении микропрепаратов диагностируются включения оксалата кальция. Вдоль жилок расположены призматические кристаллы; в мезофилле листа локализуются остроконечные друзы.

Измельченное сырье.

При рассмотрении препаратов измельченного сырья должны диагностироваться включения оксалата кальция: призматические кристаллы

вдоль жилок, а также друзы в мезофилле нижней и верхней стороны листа. Также обнаруживаются производные эпидермальных клеток: нежелезистые волоски и железистые трихомы. Устьичные аппараты аномоцитного типа с нижней стороны листа.

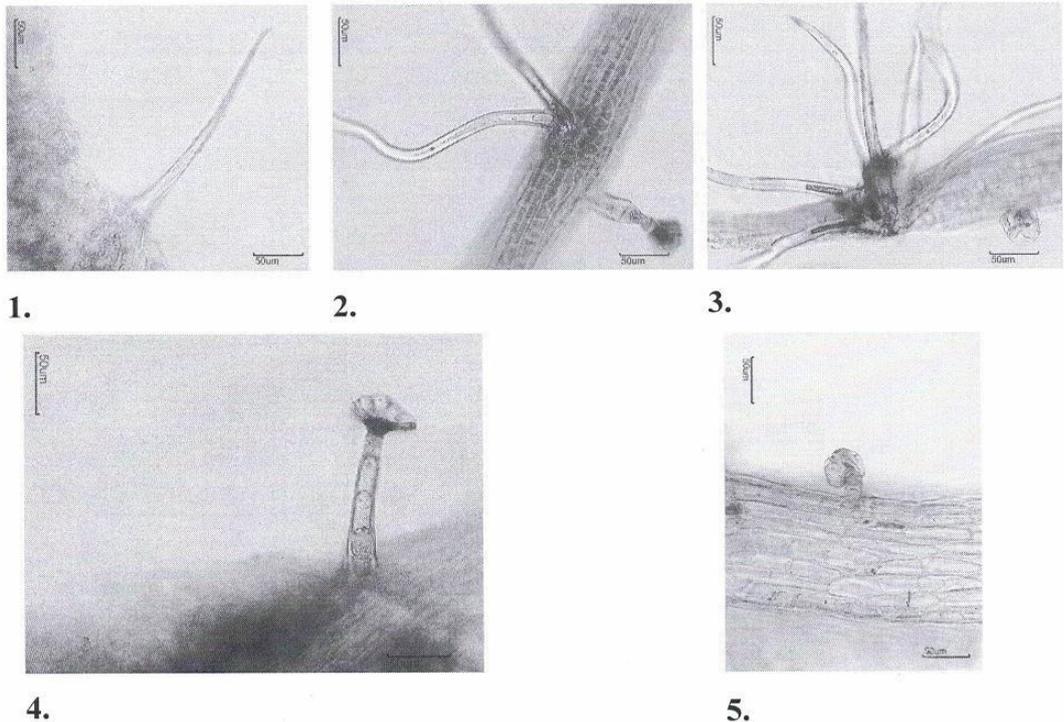


Рисунок 2 – Эпидермис листовая пластинки листа ореха черного:

1 – простой волосок (x400); 2 – пучковый волосок с двумя ответвлениями (x400); 3 – пучковый волосок с восемью ответвлениями (x400); 4 – железистые трихомы с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой (x400); 5 – железистые трихомы с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой (x400).

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора

алюминия (III) хлорида спиртового, наблюдают появление зеленовато-желтое окрашивания через 20-30 мин (флавоноиды).

2. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимумы поглощения: коротковолновый при длине волны 270 ± 2 нм, длиноволновый при длине волны 356 ± 2 нм (рис. 3).

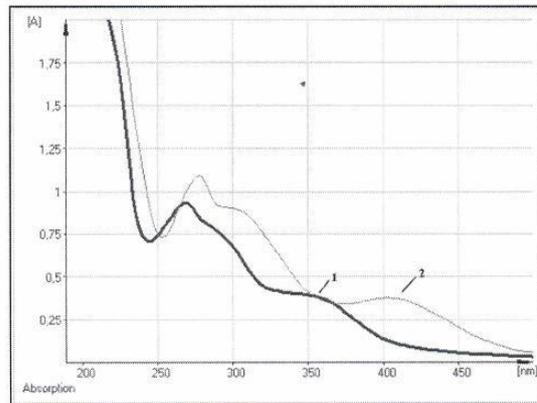


Рисунок 3 - Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из листьев ореха черного.

Обозначения: 1 – исходный спектр; 2 – с добавлением алюминия хлорида.

3. Тонкослойная хроматография

Приготовление раствора мирицитрина - стандартного образца.
Около 0,02 г (точная навеска) мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане, остужают, затем доводят этиловым спиртом 96 % концентрации до метки и перемешивают.

Приготовление раствора кверцитрина - стандартного образца. Около

0,02 г (точная навеска) кверцитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане, остужают, затем доводят этиловым спиртом 96 % концентрации до метки и перемешивают.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» заранее активируют в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 1 ч. На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля стеклянной микропипеткой наносят 20 мкл испытуемого раствора листьев ореха черного, полученного в разделе «Количественное определение», 20 мкл спиртового раствора СО мирицитрина и кверцитрина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 ч парами системы растворителей *хлороформ: этанол: вода* (28:15:2), и хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт элюентной системы пройдет 80-90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из хроматографической камеры, сушат до удаления следов растворителей и и просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО мирицитрина зона адсорбции желтого цвета и темно-коричневого цвета соответственно.

На хроматограмме раствора СО кверцитрина зона адсорбции желтого цвета и темно-коричневого со светлой каймой цвета соответственно.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции желтого и темно-коричневого цвета соответственно, расположенные на уровне зон адсорбции СО мирицитрина и СО кверцитрина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Затем пластинку обрабатывают 3 % спиртовым раствором $AlCl_3$ и

просматривают в УФ-свете при $\lambda=365$ нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты.

На хроматограмме раствора СО мирицитрина зоны адсорбции ярко-желтого цвета и желто-оранжевого цвета соответственно.

На хроматограмме раствора СО кверцитрина зона адсорбции ярко-желтого цвета и желто-оранжевого цвета соответственно.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции ярко-желтого цвета и желто-оранжевого цвета соответственно, расположенные на уровне зон адсорбции СО мирицитрина и СО кверцитрина; допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 5%. *Измельченное сырье:* проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм не более 7 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 8 %.

Посторонние примеси.

Ветки, части соцветий, почки. *Цельное, измельченное сырье:* не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску. *Цельное, измельченное сырье:* не более 3%

Органическая примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном

в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин не менее 2,0 %; содержание мирицитрина не менее 2,0 %, содержание кверцитрина не менее 1,0 %.

Метод 1. Приготовление растворов.

Раствор алюминия хлорида спиртовой 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.

Раствор 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 до комнатной температуры доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А мирицитрина). 1 мл раствора А мирицитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б мирицитрина).

Аналитическую пробу листьев ореха черного 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 30 мл 80 % 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 30 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 (красная полоса).

Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного 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 % (испытуемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО мирицитрина на спектрофотометре при длине волны 416 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А мирицитрина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б мирицитрина).

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

$$x = \frac{D * m_0 * 30 * 50 * 1 * 100 * 100}{D_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_o – оптическая плотность раствора СО мирицитрина;
 m – масса сырья, г;
 m_o – масса СО мирицитрина, г;
 W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин вычислять с использованием удельного показателя поглощения рутина при длине волны 416 нм, который равен 432.

$$x = \frac{D * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;
 m – масса сырья, г;
 m_o – масса СО мирицитрина, г;
 432 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО мирицитрина при 416 нм;
 W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метод 2. Приготовление растворов.

Раствор мирицитрина-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного мирицитрина - содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 80 % этиловом спирте и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Раствор кверцитрина-стандартного образца. Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного кверцитрина - содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 80 % этиловом спирте и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограмме раствора А испытуемого раствора (360 нм) слева от пиков мирицитрина и кверцитрина выходит пик, соответствующий по

времени удерживания СО мирицетина.

На хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пиков мирицитрина и кверцитрина.

На хроматограммах растворов СО разрешение между пиками мирицитрина и кверцитрина должно быть не менее 1,5.

На хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пиков мирицитрина и кверцитрина должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

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 30 мл 80% 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 30 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 (испытуемый раствор).

Хроматографические условия

Колонка	КАХ (2 x 64 мм, сталь), стационарная фаза "Separon C18", 5 мкм
ПФ	А – ацетонитрил В – вода (с добавлением уксусной кислоты) К 20 мл ацетонитрила (СТП ТУ СОМР 3-074-06, для высокоэффективной жидкостной хроматографии) прибавляют 80 мл воды дистиллированной, 0,8 мл ледяной уксусной кислоты и тщательно перемешивают. Смесь фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,4 - 0,5 мкм под вакуумом (при остаточном давлении 7 - 15 мм рт. ст. - водоструйный насос). Элюент дегазируют гелием непосредственно перед анализом. Срок годности элюента сутки.

Способ элюирования		Изократический	
Время	А, об.%	В, об.%	
0	20	80	
25	20	80	

Скорость потока, мкл/мин 100

Температура +23 ± 1

Детектор Многоволновый спектрофотометрический УФ или диодная матрица
360 нм (определение мирицитрина и кверцитрина)

Объем вводимой пробы, мкл 4

Время хроматографирования, мин 25

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Параллельно вводят в хроматограф и хроматографируют последовательно не менее 3 раз 4 мкл растворов СО мирицитрина (раствор А СО мирицитрина) и СО кверцитрина (раствор А СО кверцитрина) и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Определяют времена удерживания и идентифицируют пики мирицитрина и кверцитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площади пиков мирицитрина и кверцитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям. Содержание мирицитрина в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

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

Содержание кверцитрина в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

Где S – среднее значение площади пика кверцитрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО кверцитрина, вычисленное из хроматограмм раствора СО кверцитрина; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора СО кверцитрина, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора СО кверцитрина, мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО кверцитрина, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

ФС.2.5._____с.17

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование 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,
профессор



И.Л. Давыдкин
2021 г.

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

«23» 12 В.А. Куркин
2021 г.

Очный аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

«23» 12 Н.И. Зименкина
2021 г.