

Разработка подходов к стандартизации листьев ореха грецкого

Н.И. Зименкина, В.А. Куркин

Самарский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Куркин Владимир Александрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-7513-9352

Зименкина Наталья Игоревна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. Тел.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: nata.zimenkina@mail.ru. ORCID: 0000-0003-1334-6046

РЕЗЮМЕ

Введение. Лекарственное растительное сырье представителей рода орех (*Juglans* L.) обладает противомикробным, общеукрепляющим действием благодаря наличию в составе производных нафтохинона (юглона, гидроюглона), а также других фенольных соединений. Несмотря на широкий спектр фармакологической активности орех грецкий (*Juglans regia* L.), не является фармакопейным в Российской Федерации. Для введения листьев ореха грецкого в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, включая разработку нормативной документации, подтверждающей качество лекарственного растительного сырья.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого (*Juglans regia* L.).

Материал и методы. В работе использовали листья ореха грецкого, заготовленные в 2018–2019 гг. в Ботаническом саду СамГМУ. Использовался метод дифференциальной спектрофотометрии.

Результаты. Изучение спектральных характеристик показало, что определение содержания суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого можно проводить в пересчете на рутин при аналитической длине волны 412 нм. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов для изучаемого растительного сырья. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,49\%$.

Заключение. С использованием разработанной методики проанализированы образцы листьев ореха грецкого, произрастающего в Ботаническом саду СамГМУ. Содержание в сырье суммы флавоноидов в пересчете на рутин колебалось от 3,58 до 3,72%. Разработанная методика может быть использована в дальнейших исследованиях данного вида лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: орех грецкий, *Juglans regia* L., листья, стандартизация, флавоноиды, рутин, спектрофотометрия.

Для цитирования: Зименкина Н.И., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха грецкого. Фармация, 2020; 69 (7): 23–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-07-04>

ELABORATION OF APPROACHES TO STANDARDIZING WALNUT (*JUGLANS REGIA*) LEAVES

N.I. Zimenkina, V.A. Kurkin

Samara State Medical University, 89, Chapaevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kurkin Vladimir Aleksandrovich – Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Fundamentals of Phytotherapy SamSMU, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-7513-9352

Zimenkina Natal'ya Igorevna – Post graduate student of the Department of Pharmacognosy with Botany and Fundamentals of Phytotherapy SamSMU. Tel.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: nata.zimenkina@mail.ru. ORCID: 0000-0003-1334-6046

SUMMARY

Introduction. Medicinal plant raw materials of representatives of the genus *Juglans* of walnuts have antimicrobial and general tonic effects due to the fact that it contains naphthoquinone derivatives (juglone, hydrojuglone) and other phenolic compounds. Despite a wide spectrum of pharmacological activities, walnut (*Juglans regia* L.) is not pharmacopoeial in the Russian Federation. For inclusion of walnut leaves into the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, it is necessary to conduct a set of pharmacognostic studies, including the development of regulatory documents that confirm the quality of medicinal plant materials.

Objective: to develop a procedure for the quantitative determination of total flavonoid contents in walnut leaves.

Material and methods. The investigation used the walnut leaves stored in the Samara State Medical University Botanical Garden in 2018-2019, as well as differential spectrophotometry.

Results. A study of spectral characteristics showed that the total content of flavonoids in the walnut leaves could be determined with reference to rutin at an analytical wavelength of 412 nm. A procedure for quantification of the amount of flavonoids in the investigated plant raw materials was developed and validated. The error of a single determination with a confidence level of 95% is $\pm 3.49\%$.

Conclusion. The developed procedure was used to analyze a number of samples of walnut leaves growing in the Samara State Medical University Botanical Garden. The total flavonoid contents calculated with reference to rutin ranged from 3.58 to 3.72%. The developed procedure can be used in further investigations of this type of medicinal plant material.

Key words: walnut, *Juglans regia* L., leaves, standardization, flavonoids, rutin, spectrophotometry.

For reference: Zimenkina N.I., Kurkin V.A. Elaboration of approaches to standardizing walnut (*Juglans regia*) leaves. Farmatsiya, 2020; 69 (7): 23–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-07-04>

Введение

Род орех включает более 20 видов древесных растений, произрастающих в теплоумеренных районах Евразии и Северной Америки [1, 2].

Орех грецкий (*Juglans regia* L.) является перспективным видом официального лекарственного растительного сырья (ЛРС) в связи с наличием в листьях растения различных нафтохинонов (юглон, гидроюглон, глюкозид гидроюглона), оказывающих антибактериальное действие. Также орех грецкий содержит такие ценные биологически активные соединения, как липидные вещества, азотистые вещества, углеводы, органические кислоты, флавоноиды и другие фенольные соединения, которые также вносят свой вклад в фармакологическое действие [3–6].

На наш взгляд, вклад в антимикробный эффект листьев ореха грецкого, наряду с нафтохинонами, вносят и флавоноиды. Также необходимо учитывать, что в сырье, переназначенном для получения водных, спиртовых, водно-спиртовых экстрактов, существует необходимость определения действующих веществ гидрофильной природы, к которым относят флавоноиды данного растения [7, 8].

Ранее нами было проведено сравнительное фитохимическое исследование видов ЛРС рода орех. Во всех электронных спектрах исследуемых образцов обнаруживался максимум поглощения при $\lambda=270$ нм, что свидетельствует о вкладе флавоноидов в кривую поглощения УФ-спектров. В результате сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений из различных видов сырья представителей рода орех сделан вывод о целесообразности использования в качестве целевого ЛРС листа ореха грецкого [9].

В литературе показана возможность стандартизации листьев ореха грецкого по содержа-

нию суммы нафтохинонов в пересчете на юглон с применением метода фотоколориметрии [10, 11]. Извлечение получали методом двукратной экстракции спиртом этиловым 20% с последующим упариванием, и трехкратной экстракцией диэтиловым эфиром. При этом установлено, что содержание нафтохинонов в пересчете на юглон в листьях ореха грецкого достигает 0,083%. Принимая во внимание достаточную трудоемкость при проведении пробоподготовки, сложность проведения анализа для нафтохинонов в качестве целевой группы БАС, а также отсутствие других литературных данных относительно стандартизации листьев ореха грецкого, актуальным является продолжение исследований в этом направлении.

Цель настоящего исследования – разработка спектрофотометрической методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого.

Материал и методы

Материалом исследования служили листья ореха грецкого, заготовленные в период массового цветения в Ботаническом саду Самарского университета в июле 2018 и 2019 гг. Сушка сырья проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей до воздушно-сухого состояния. Спектрофотометрически исследовали спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений из сырья и комплекса флавоноидов ореха грецкого с алюминия хлоридом. Для разработки методики изучались оптимальные условия экстракции флавоноидов из листьев ореха грецкого.

Результаты и обсуждение

При изучении УФ-спектров водно-спиртовых извлечений из листьев ореха грецкого (рис.

1, 2) определено, что в УФ-спектре наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов. УФ-спектр комплекса ГСО ру-

тина с алюминия хлоридом имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 3). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 4), который практически соответствует максимуму спиртового раствора рутина.

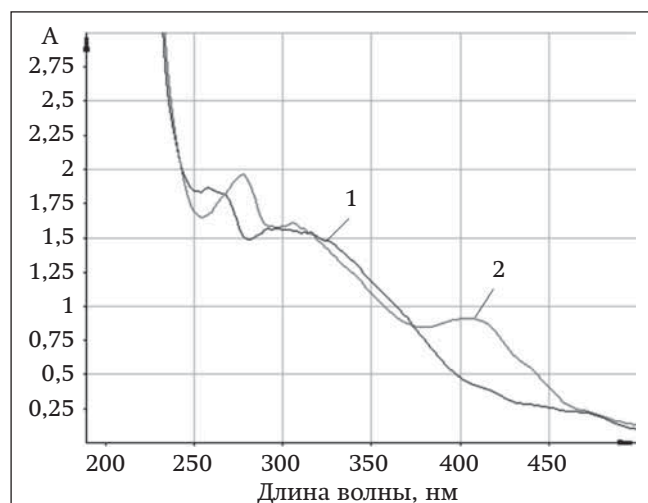


Рис. 1. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого. *Примечание.* 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида.

Fig. 1. Electronic spectra of solutions of aqueous-alcoholic extract from walnut leaves.

Note. 1 – extract solution; 2 – extract solution with addition of aluminum chloride.

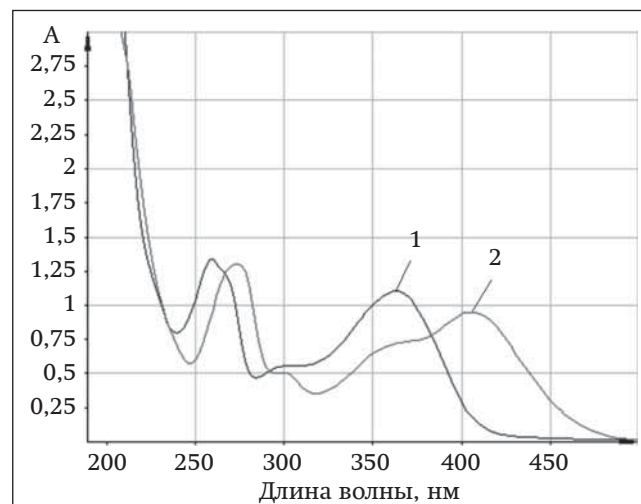


Рис. 3. Электронные спектры спиртовых растворов рутина. *Примечание.* 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида.

Fig. 3. Electronic spectra of alcoholic rutin solutions. *Note.* 1 – stock solution; 2 – solution with addition of aluminum chloride.

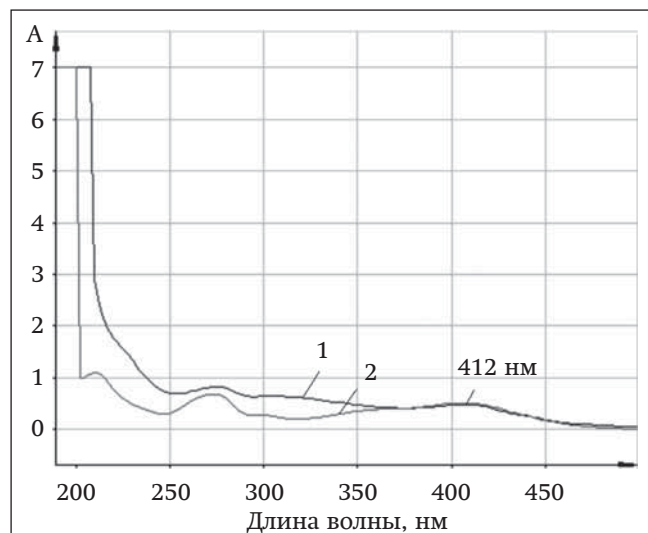


Рис. 2. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого. *Примечание.* 1 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида; 2 – раствор рутина с добавлением алюминия хлорида.

Fig. 2. Electronic spectra of solutions of aqueous-alcoholic extract from walnut leaves. *Note.* 1 – extract solution with addition of aluminum chloride; 2 – rutin solution with addition of aluminum chloride.

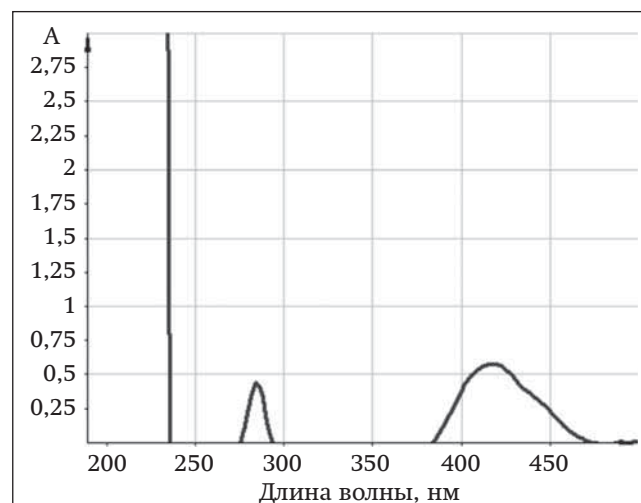


Рис. 4. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого (дифференциальный вариант)

Fig. 4. Electronic spectrum of solution of aqueous-alcoholic extract from walnut leaves (a differential version)

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов определены оптимальные условия экстракции флавоноидов из листьев ореха грецкого: экстрагент 80% этиловый спирт; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:30; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 30 мин; степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 1).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого. 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 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). Затем 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 % (испытываемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения используют 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.

Таблица 1

Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из листьев ореха грецкого

Table 1

Relationship of the completeness of extraction to the total content of flavonoids from walnut leaves

№	Концентрация экстрагента – этилового спирта, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
1	40	1:30	60	3,42 \pm 0,02
2	50			3,44 \pm 0,02
3	60			3,45 \pm 0,01
4	70			3,54 \pm 0,03
5	80			3,65 \pm 0,01
6	90			3,37 \pm 0,02
7	96			2,99 \pm 0,03
8	80	1:30	15	3,63 \pm 0,02
9			30	3,69 \pm 0,02
10			45	3,64 \pm 0,03
11			60	3,62 \pm 0,03
12			90	3,57 \pm 0,02
13			120	3,51 \pm 0,02
14	80	1:20	30	3,62 \pm 0,02
15		1:30		3,72 \pm 0,01
16		1:50		3,68 \pm 0,03

Приготовление раствора стандартного образца рутина. Около 0,02 г (точная навеска) ГСО рутин помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А рутина). Затем 2 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытываемый раствор Б рутина).

Измеряют оптическую плотность раствора Б рутина на спектрофотометре при длине волны 412 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 2 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б рутина).

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

$$x = \frac{D \cdot m_0 \cdot 30 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m – масса сырья, г; m₀ – масса ГСО рутин, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца рутин целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения при 412 нм, равное 240, и расчет вести по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 30 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; m₀ – масса ГСО рутин, г; 240 – удельный показатель поглощения (E_{1cm}^{1%}) ГСО рутин при 412 нм; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого с доверительной вероятностью 95% составляет ±3,49%.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев ореха грецкого и рутин с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутин (с концентрациями в диапазоне от 0,00520 до 0,02080 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99996. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления

раствора рутин с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору. Средний процент восстановления составил 98%. Полученные результаты показали валидность разработанной методики.

Данная методика была применена для анализа ряда образцов листьев ореха грецкого (табл. 3). Установлено, что содержание суммы флавоноидов в сырье колеблется от 3,58 до 3,72%, поэтому нижний предел содержания суммы флавоноидов для листьев ореха грецкого может составлять не менее 3,0%.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации листьев ореха грецкого путем определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 412 нм.

Заключение

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием ГСО рутин при аналитической длине волны 412 нм и проведена ее валидация. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 3,49%. С использованием разработанной методики показано, что содержание суммы флавоноидов

Таблица 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого

Table 2

Metrological characteristics of the procedure for quantification of total flavonoid contents in walnut leaves

n	f	\bar{X}	S	S _x	P (%)	T (P, t)	ΔX	Δ \bar{X}	E, %
11	10	3,72	0,05941	0,01791	95%	2,23	0,13	0,05	3,49

Таблица 3

Содержание суммы флавоноидов в образцах листьев ореха грецкого

Table 3

Total flavonoid contents in walnut leaf samples

№	Характеристика образца сырья (место и дата заготовки)	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
1	Ботанический сад СамГМУ, июль 2018 г.	3,72±0,03
2	Ботанический сад СамГМУ, июль 2019 г.	3,58±0,02

дов в пересчете на рутин в листьях ореха грецкого, заготовленных в Ботаническом саду СамГМУ, колеблется от 3,58 до 3,72%. Данная методика может быть использована в дальнейших исследованиях данного вида лекарственного растительного сырья.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР. М.: Мысль, 1976: 81–5.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: СамГМУ, 2019: 1278.
3. Беленовская Л.М., Буданцев А.Л. Нафтохиноны видов флоры России и их биологическая активность. Растительные Ресурсы. 2006; 42 (4): 108–41.
4. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий – перспективное лекарственное растение. Традиционная медицина. 2010; 3 (22): 118–23.
5. Степанов Г.В., Аюпова И.О., Ульянова Л.Г. Изучение результатов лабораторных исследований ротовой жидкости и сыворотки крови пациентов в ретенционном периоде ортодонтического лечения. Наука и инновации в медицине. 2016; 2 (2): 29–32.
6. Paudel P. et al. *Juglans regia* and *Juglans nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. Natural product communications. 2013; 8 (10): 1481–6.
7. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара: СамГМУ, 2012; 290.
8. Лапина А.С., Варина Н.Р., Куркин В.А. и др. ВЭЖХ-анализ терпеноидного комплекса эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.). Аспирантский вестник Поволжья. 2018; 1–2: 17–21.
9. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Сравнительный фитохимический анализ видов рода орех (*Juglans* L.). Физика и медицина: Создавая будущее. Сборник научных трудов. 2019; 3: 213–5.
10. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Спектрофотометрическое определение производных юглона в листьях ореха грецкого. Современная фармацевтическая

наука и практика: традиции, инновации, приоритеты. 2011; 113–4.

11. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. и др. Определение нафтохинонов в сырье и препарате ореха черного *Juglans nigra* L. Фармация. 2013; 4: 12–4.

References

1. Gubanov I.A., Krylova I.L., Tikhonova V.L. Wild useful plants of the USSR. Moscow: Mysl', 1976; 81–5 (in Russian)
2. Kurkin V.A. Pharmacognosy. Samara: SamGMU, 2019; 1278 (in Russian)
3. Belenovskaya L.M., Budantsev A.L. Naphthoquinones of the species of Russian flora and their biological activity. Rastitel'nyye Resursy. 2006; 42 (4): 108–41 (in Russian)
4. Dayronas J.V., Zilfikarov I.N. Walnut – a promising medicinal plant. Traditsionnaya meditsina. 2010; 3 (22): 118–23 (in Russian)
5. Stepanov G.V., Ayupova I.O., Ulyanova L.G. Studying the results of laboratory studies of the oral fluid and blood serum of patients in the retention period of orthodontic treatment. Nauka i innovatsii v meditsine. 2016; 2 (2): 29–32 (in Russian)
6. Paudel P. et al. *Juglans regia* and *Juglans nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. Natural product communications. 2013; 8 (10): 1481–6.
7. Kurkina A.V. Flavonoids of pharmacopeia plants. Samara: SamGMU, 2012; 290 (in Russian)
8. Lapina A.S., Varina N.R., Kurkin V.A. et al. HPLC analysis of the terpenoid complex of rod eucalyptus (*Eucalyptus viminalis* Labill.). Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya. 2018; 1–2: 17–21 (in Russian)
9. Zimenkina N.I., Kurkin V.A. Comparative phytochemical analysis of species of the genus Walnut (*Juglans* L.). Fizika i meditsina: Sozdavaya budushcheye. Sbornik materialov. 2019; 3: 213–5 (in Russian)
10. Dayronas J.V., Zilfikarov I.N. Spectrophotometric determination of juglone derivatives in walnut leaves. Sovremennaya farmatsevticheskaya nauka i praktika: traditsii, innovatsii, priority. 2011; 113–4 (in Russian)
11. Dayronas J.V., Zilfikarov I.N. et al. Determination of naphthoquinones in the raw material and herbal preparation of black walnut – *Juglans nigra* L. Farmatsiya. 2013; 4: 12–4 (in Russian)

Поступила 7 августа 2020г.

Received 7 August 2020

Принята к публикации 14 октября 2020 г.

Accepted 14 October 2020