

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ КОРЫ ОРЕХА ЧЕРНОГО

Н.И. Зименкина, В.А. Куркин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара

Для цитирования: Зименкина Н.И., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации коры ореха черного // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – № 1–2. – С. 131–136. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136>

Поступила: 24.01.2020

Одобрена: 28.02.2020

Принята: 16.03.2020

▪ **Актуальность.** Орех черный (*Juglans nigra* L.) — вид деревьев семейства Ореховых (*Juglandaceae*). Данный представитель рода Орех (*Juglans* L.) недостаточно изучен по сравнению с другими видами, в том числе орехом грецким, однако является перспективным видом лекарственного растительного сырья, препараты которого оказывают противомикробное, общеукрепляющее действие. В качестве сырьевого источника представляют интерес листья, незрелые плоды и кора видов рода Орех, которые пока не нашли широкого применения в научной медицине. С целью введения представителей рода Орех в Государственную фармакопею Российской Федерации необходимо проведение фармакогностических исследований с последующей разработкой нормативной документации, подтверждающей подлинность и качество как лекарственного растительного сырья, так и лекарственных фитопрепаратов на их основе. **Цель исследования** — разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного (*Juglans nigra* L.). **Материалы и методы.** Материалом исследования служила кора ореха черного, заготовленная в период сокодвижения (апрель) в 2018 г. Кора была разрезана на полоски длиной до 15 см и шириной 2–3 см. Сушка коры проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей. Окончание сушки проверяли по ломкости коры. **Результаты.** В результате проведенного исследования разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца рутина при аналитической длине волны 416 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 1,20$ %. **Заключение.** С использованием разработанной методики проанализирован ряд образцов коры ореха черного. Содержание суммы флавоноидов в сырье составляет $5,13 \pm 0,02$ % (в пересчете на рутин). Это позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела содержание суммы флавоноидов не менее 4,0 %.

▪ **Ключевые слова:** орех черный (*Juglans nigra* L.); кора; флавоноиды; рутин; спектрофотометрия; стандартизация.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO STANDARDIZATION OF BLACK WALNUT BARK

N.I. Zimenkina, V.A. Kurkin

Samara State Medical University, Samara, Russia

For citation: Zimenkina NI, Kurkin VA. Development of approaches to standardization of black walnut bark. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2020;(1-2):131-136. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.1.131-136>

Received: 24.01.2020

Revised: 28.02.2020

Accepted: 16.03.2020

▪ **Significance.** Black Walnut (*Juglans nigra* L.) is a species of trees of the Walnut family (*Juglandaceae*). This plant of the genus Walnut (*Juglans* L.) has not been sufficiently studied unlike other species e.g. *Juglans regia* L. This medicinal plant raw material is quite perspective, its preparations have antimicrobial, general tonic effect. We can use its leaves, unripe fruit, and the bark. However they are not widely used in medicine. In order to introduce the plants of the Walnut genus to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (RF State Pharmacopoeia), it is necessary to conduct of pharmacognostic studies, to develop product specification file to confirm the identification and quality of medicinal plant raw materials. **The aim of this study** is to develop a method of quantitative determination of flavonoids in the bark of the black walnut (*Juglans nigra* L.). **Materials and methods.** Material of the study was black walnut bark, stocked during the sap flow period (April) in 2018. The bark was skived up to 15 cm long and 2–3 cm wide. The bark was air-dried with the protection from direct sun light. The end of the drying was checked by the brittleness of the bark. **Results.** The methods of the quantitative determination of flavonoids in walnut bark has been

developed. We used the differential spectrophotometry taking into consideration state standard sample of rutin at the analytical wavelength of 416 nm. The error of a single determination with a confidence level of 95% is $\pm 1.20\%$. **Conclusion.** We used the developed technique and analyzed a number of samples of black walnut bark. The content of total flavonoids in the plant raw material is $5.13 \pm 0.02\%$ (as calculated on rutin). The flavonoid content should be at least 4.0%.

■ **Keywords:** black walnut (*Juglans nigra* L.); barks; flavonoids; rutin; spectrophotometry; standardization.

Введение

Орех черный (*Juglans nigra* L.) — растительный объект, являющийся представителем рода Орех (*Juglans* L.) семейства *Juglandaceae*. Известно, что род Орех включает более 20 видов древесных растений, произрастающих в теплоумеренных районах Евразии и Северной Америки [2, 6].

Интерес к ореху связан с наличием в наземной части ореха черного различных нафтохинонов, оказывающих антибактериальную активность, в частности: юглон, гидроюглон, глюкозид гидроюглона. Наряду с вышеуказанными, растение содержит и следующие ценные биологически активные соединения (БАС): липидные вещества, азотистые вещества, углеводы, органические кислоты, флавоноиды и другие фенольные соединения, которые также вносят свой вклад в фармакологическое действие [1, 3, 8].

На наш взгляд, вклад в основной антимикробный эффект, наряду с нафтохинонами, вносят и флавоноиды. Необходимо учитывать тот факт, что в сырье, переназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, а также экстрактов, существует необходимость определения действующих веществ гидрофильной природы, к которым относят флавоноиды данного растения [7].

Ранее нами было проведено сравнительное фитохимическое исследование видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) рода Орех. Во всех электронных спектрах исследуемых образцов обнаруживается максимум поглощения при длине волны 270 нм, что свидетельствует о вкладе флавоноидов в кривую поглощения ультрафиолетовых (УФ) спектров. В результате сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений из различных видов сырья представителей рода Орех был сделан вывод о целесообразности использования в качестве целевого ЛРС кору ореха черного (*Juglans nigra* L.).

Обзор литературы показал возможность стандартизации листьев ореха черного при проведении количественного определения суммы нафтохинонов методом фотоколориметрии в пересчете на юглон [4, 5]. Извлечение получали методом двухкратной экстракции

20 % этиловым спиртом с последующим упариванием и трехкратной экстракцией диэтиловым эфиром [4, 5]. При этом определено, что содержание нафтохинонов в листьях ореха черного достигает $0,24 \pm 0,01\%$ в пересчете на юглон [4, 5]. Принимая во внимание достаточную трудоемкость в ходе проведения пробоподготовки, сложность проведения анализа для нафтохинонов в качестве целевой группы БАС, а также отсутствие литературных данных относительно стандартизации коры ореха черного (*Juglans nigra* L.), актуальным является продолжение исследований в этом направлении.

Материалы и методы

Материалом исследования служила кора ореха черного, заготовленная в период сокодвижения (апрель) в 2018 и 2019 гг. в ботаническом саду Самарского государственного университета. Кора была разрезана на полоски длиной до 15 см и шириной 2–3 см. Сушка коры проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей. Окончание сушки проверяли по ломкости коры.

Результаты исследования и обсуждение

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного были изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья (рис. 1 и 2). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения ореха черного наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 1), как и в случае рутина (рис. 3). Изучение УФ-спектров государственного стандартного образца (ГСО) рутина показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 3). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из коры ореха черного в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны 416 нм (рис. 4), который практически соответствует максимуму спиртового раствора рутина.

Оптическая плотность, абс. / Absorbance, Abs

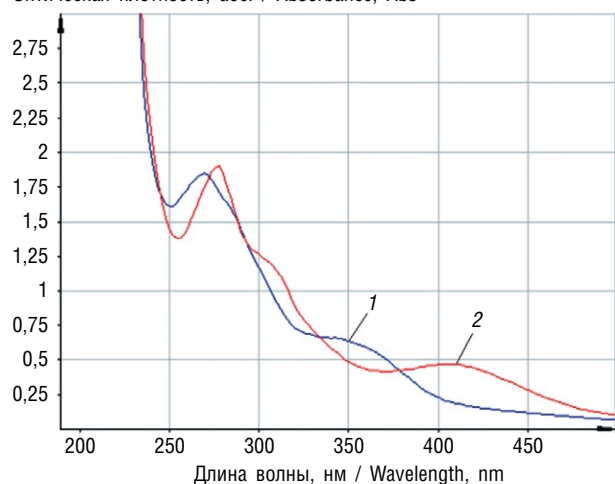


Рис. 1. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из коры ореха черного: 1 — раствор извлечения; 2 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

Fig. 1. Electronic spectra of solutions of water-ethanolic extraction from *Juglans nigra* bark: 1 — solution of extraction; 2 — solution of extraction with the addition of aluminum chloride

Оптическая плотность, абс. / Absorbance, Abs

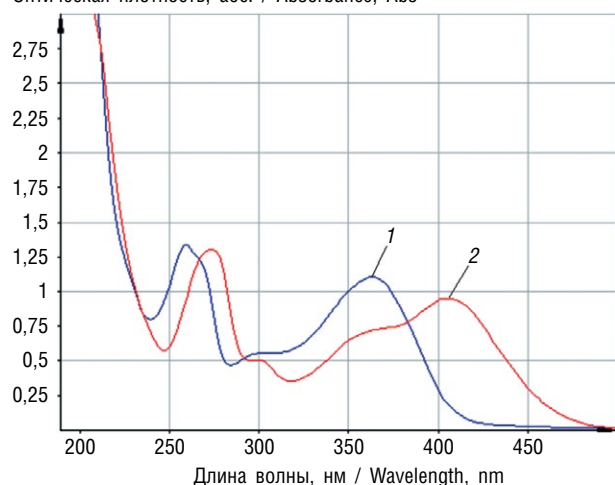


Рис. 3. Электронные спектры спиртовых растворов рутина: 1 — исходный раствор; 2 — раствор с добавлением алюминия хлорида

Fig. 3. Electronic spectra of ethanolic solutions of rutin: 1 — initial solution; 2 — solution with the addition of aluminum chloride

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов нами определены оптимальные условия экстракции флавоноидов в коре ореха черного: экстрагент 80 % этиловый спирт; соотношение «сырье – экстрагент» — 1 : 30; время экстракции — извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин; степень измельчения сырья — 2 мм (табл. 1).

Оптическая плотность, абс. / Absorbance, Abs

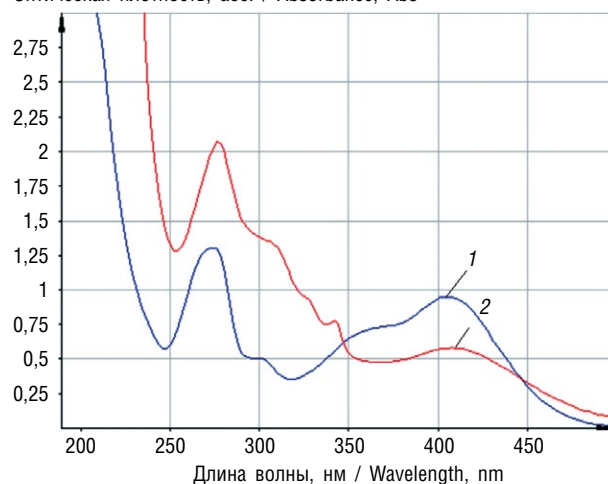


Рис. 2. Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из коры ореха черного: 1 — раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида; 2 — раствор рутина с добавлением алюминия хлорида

Fig. 2. Electronic spectra of solutions of water-ethanolic extraction from *Juglans nigra* bark: 1 — solution of extraction with the addition of aluminum chloride; 2 — solution of rutin with the addition of aluminum chloride

Оптическая плотность, абс. / Absorbance, Abs

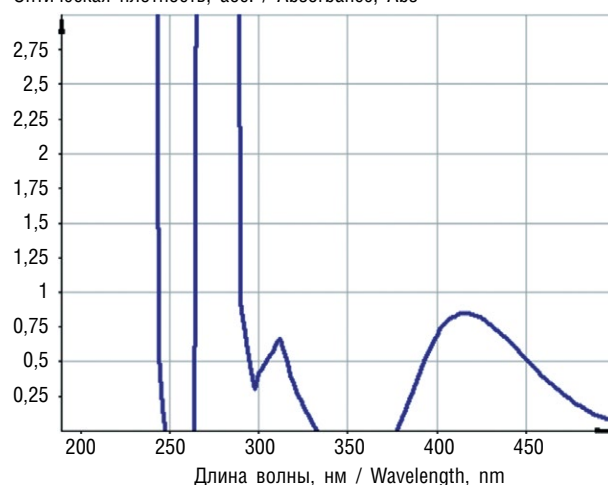


Рис. 4. Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из коры ореха черного (дифференциальный вариант)

Fig. 4. Electronic spectra of solutions of water-ethanolic extraction from *Juglans nigra* bark (differential type)

Методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного. 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

Таблица 1 / Table 1

Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из коры ореха черного
Dependence of the recovery rate of total flavonoids from the *Juglans nigra* bark

№	Экстрагент	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения ЛРС, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
I эксперимент					
1	40 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,48 ± 0,02
2	50 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,59 ± 0,01
3	60 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,69 ± 0,02
4	70 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,78 ± 0,02
5	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,94 ± 0,03
6	90 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	4,71 ± 0,01
7	96 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	3,92 ± 0,01
II эксперимент					
8	80 % этиловый спирт	1 : 30	30	2	4,79 ± 0,03
9	80 % этиловый спирт	1 : 30	45	2	4,88 ± 0,03
10	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	5,10 ± 0,02
11	80 % этиловый спирт	1 : 30	90	2	5,03 ± 0,02
12	80 % этиловый спирт	1 : 30	120	2	4,76 ± 0,03
III эксперимент					
13	80 % этиловый спирт	1 : 20	60	2	4,7 ± 0,01
14	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	5,10 ± 0,03
15	80 % этиловый спирт	1 : 50	60	2	5,08 ± 0,02
IV эксперимент					
16	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	1	4,80 ± 0,02
17	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	2	5,13 ± 0,02
18	80 % этиловый спирт	1 : 30	60	3	4,55 ± 0,01

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 96 % этиловым спиртом (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 мин после

приготовления. В качестве раствора сравнения берут раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1 : 30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки.

П р и м е ч а н и е: *Приготовление раствора рутина-стандартного образца.* Около 0,02 г (точная навеска) рутина 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). 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 96 % этиловым спиртом (испытуемый

Таблица 2 / Table 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного
 Metrological characteristics of the method of quantitative determination of total flavonoids in the *Juglans nigra* bark

<i>n</i>	<i>f</i>	\bar{X} , %	S^2	<i>S</i>	$S_{\bar{x}}$	<i>P</i> , %	<i>T(P, t)</i>	ΔX	$\Delta \bar{X}$	<i>E</i> , %
11	10	5,13	0,00044	0,02102	0,006338	95%	2,23	0,05	0,02	1,20

Таблица 3 / Table 3

Содержание суммы флавоноидов в образцах коры ореха черного
 Content of the flavonoids in the *Juglans nigra* bark

№ образца	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (%) в пересчете на рутин
1	Ботанический сад Самарского университета (март 2018 г.)	5,13 ± 0,02
2	Ботанический сад Самарского университета (март 2019 г.)	4,68 ± 0,04

раствор Б рутина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 416 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 96 % этиловым спиртом (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; *D*₀ — оптическая плотность раствора ГСО рутина; *m* — масса сырья, г; *m*₀ — масса ГСО рутина, г; *W* — потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия стандартного образца рутина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 416 нм — 238.

$$x = \frac{D \cdot 30 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 238 \cdot (100 - W)},$$

где *D* — оптическая плотность испытуемого раствора; *m* — масса сырья, г; *m*₀ — масса ГСО рутина, г; 238 — удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) ГСО рутина при 416 нм; *W* — потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в коре ореха черного представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного с доверительной вероятностью 95 % составляет ±1,20 % (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов коры ореха черного и рутина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутина (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 рутина с известной концентрацией (25, 50 и 75 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98 %.

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов травы монарды дудчатой (табл. 3) и при этом определено, что содержание суммы флавоноидов варьирует от 3,92 до 4,28 %. На основе полученных данных нами рекомендован нижний предел содержания суммы флавоноидов для сырья данного растения не менее 4,0 %.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации коры ореха черного путем определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 416 нм в пересчете на рутин.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием ГСО рутина при аналитической длине волны 416 нм.
2. Содержание суммы флавоноидов для коры ореха черного варьирует от 4,68

до 5,13 %. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет 1,20 %.

3. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать для коры ореха черного нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 4,0 %.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Беленовская Л.М., Буданцев А.Л. Нафтохиноны видов флоры России и их биологическая активность // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42. – № 4. – С. 108–141. [Belenovskaya LM, Budantsev AL. Naphthoquinones of the species of Russian flora and their biological activity. *Rastitel'nye resursy*. 2006;42(4):108-141. (In Russ.)]
2. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР. – М.: Мысль, 1976. – С. 81–85. [Gubanov IA, Krylova IL, Tikhonova VL. Wild useful plants of the USSR. Moscow: Mysl'; 1976. P. 81-85. (In Russ.)]
3. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий – перспективное лекарственное растение (обзор литературы) // Традиционная медицина. – 2010. – № 3. – С. 118–123. [Dayronas ZhV, Zilfikarov IN. Walnut – a promising medicinal plant (literature review). *Traditsionnaya meditsina*. 2010;(3):118-123. (In Russ.)]
4. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Спектрофотометрическое определение производных юглона в листьях ореха грецкого // Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. 24–26 мая 2011 г. – Самара, 2011. – С. 113–114. [Dayronas ZhV, Zilfikarov IN. Spektrofotometricheskoye opredeleniye proizvodnykh yuglona v list'yakh orekha gretskogo. (Conference proceedings) *Sovremennaya farmatsevticheskaya nauka i praktika: traditsii, innovatsii, priorityty: Materialy Vseros. nauch: prakt. konf.*, 24-26 May 2011. Samara; 2011. P. 113-114. (In Russ.)]
5. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н., Корочинский А.В., Корочинская В.В. Определение нафтохинонов в сырье и фитопрепарате ореха черного // Фармация. – 2013. – № 4. – С. 12–14. [Daironas ZhV, Zilfikarov IN, Korochinsky AV, Korochinskaya VV. Determination of naphthoquinones in the raw material and phytopreparation of black walnut (*Juglans nigra* L). *Farmatsiya*. 2013;(4):12-14. (In Russ.)]
6. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевт. вузов. Изд. 4-е, перераб. и доп. – Самара: Офорт, 2019. – 1278 с. [Kurkin VA. Pharmacognosy: A textbook for students pharmaceutical universities. 4th revised and updated. Samara: Ofort; 2019. 1278 p. (In Russ.)]
7. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. – Самара: СамГМУ Росздрава: ООО «Офорт», 2012. – 290 с. [Kurkina AV. Flavonoids of pharmacopeia plants: monograph. Samara: SamGMU Roszdrava: ООО «Ofort»; 2012. 290 p. (In Russ.)]
8. Paudel P, Satyal P, Dosoky NS, et al. *J. regia* and *J. nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities. *Nat Prod Commun*. 2013;8(10):1481-1486.

▪ Информация об авторах

Наталья Игоревна Зименкина — аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: nata.zimenkina@mail.ru.

Владимир Александрович Куркин — доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, почетный профессор, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru.

▪ Information about the authors

Natalya I. Zimenkina — Postgraduate student, Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy, Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: nata.zimenkina@mail.ru.

Vladimir A. Kurkin — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Bases of Phytotherapy, Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru.