

# 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

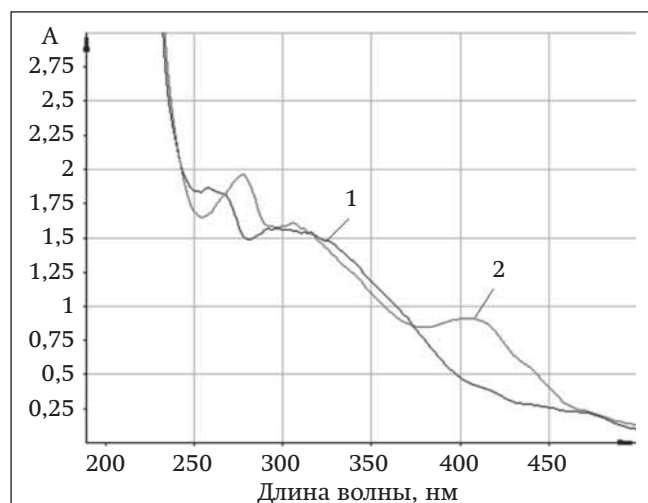
Материалом исследования служили листья ореха грецкого, заготовленные в период массового цветения в Ботаническом саду Самарского университета в июле 2018 и 2019 гг. Сушка сырья проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей до воздушно-сухого состояния. Спектрофотометрически 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 bathochromic shift длинноволновой полосы флавоноидов. УФ-спектр комплекса ГСО ру-

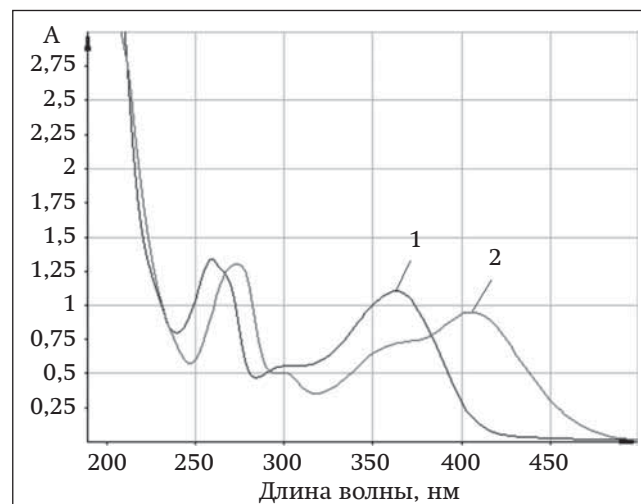
тина с алюминия хлоридом имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 3). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 4), который практически соответствует максимуму спиртового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

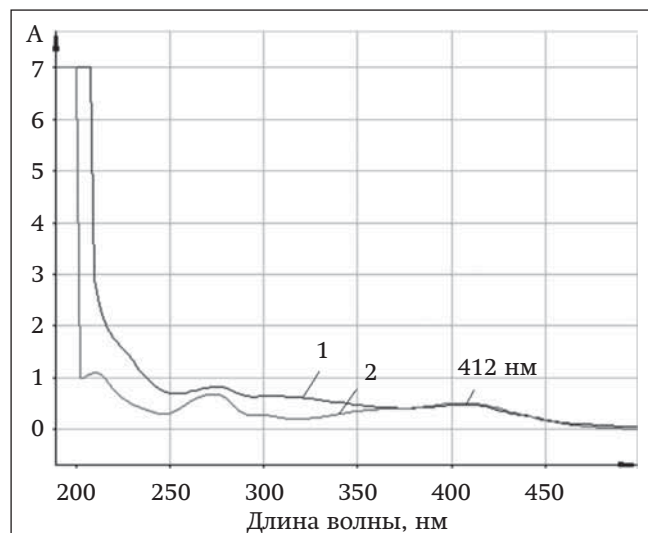
**Fig. 1.** Electronic spectra of solutions of aqueous-alcoholic extract from walnut leaves.

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



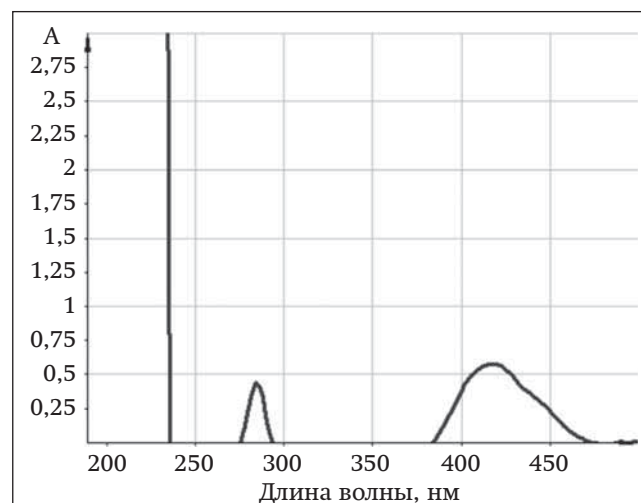
**Рис. 3.** Электронные спектры спиртовых растворов рутина. *Примечание.* 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида.

**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.

*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).

**Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из листьев ореха грецкого**

Таблица 1

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

Table 1

№	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±0,02
2	50			3,44±0,02
3	60			3,45±0,01
4	70			3,54±0,03
5	80			3,65±0,01
6	90			3,37±0,02
7	96			2,99±0,03
8	80	1:30	15	3,63±0,02
9			30	3,69±0,02
10			45	3,64±0,03
11			60	3,62±0,03
12			90	3,57±0,02
13			120	3,51±0,02
14	80	1:20	30	3,62±0,02
15		1:30		3,72±0,01
16		1:50		3,68±0,03

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<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, г; m<sub>0</sub> – масса ГСО рутина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца рутина 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; m<sub>0</sub> – масса ГСО рутина, г; 240 – удельный показатель поглощения (E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>) ГСО рутина 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 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. 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 рутина 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 <sub>x</sub>	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