

# РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ

## В.А. Куркин

д. фарм.н., зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,  
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Самара, Россия)  
E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

## Н.И. Зименкина

аспирант, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,  
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Самара, Россия)

## А.В. Помогайбин

к.б.н., зам. директора Ботанического сада,  
ФГАУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» (г. Самара, Россия)

**Актуальность.** Орех черный (*Juglans nigra* L., сем. ореховые – *Juglans*) – листопадное дерево, являющееся одним из перспективных видов лекарственного растительного сырья. Кроме ведущей группы биологически активных соединений (нафтохинонов) в данном сырье содержатся и другие химические соединения, в том числе флавоноиды (кверцитрин, мирицитрин), которые могут вносить существенный вклад в антимикробную и общеукрепляющую активность указанных лекарственных растительных препаратов. Несмотря на содержание большого числа биологически активных соединений и высокую фармакологическую активность, листья ореха черного не включены в Государственную фармакопею РФ. Возникает необходимость в стандартизации листьев ореха черного, в том числе и разработке методик количественного определения с использованием современных методов анализа.

**Цель исследования.** Разработка методик количественного анализа биологически активных соединений листьев ореха черного – мирицитрина и кверцитрина.

**Материал и методы.** Объект исследования – образцы листьев ореха черного, заготовленные в марте–апреле 2018–2020 гг. на территории Ботанического сада Самарского университета (г. Самара), выделенные авторами стандартные образцы мирицитрина и кверцитрина с чистотой не менее 98%. В качестве методов анализа извлечений выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которую осуществляли с использованием хроматографа «Миличром-6» (НПАО «Научприбор»). Расчет содержания мирицитрина и кверцитрина проводили методом внешнего стандарта. Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография».

**Результаты.** Из водно-спиртового извлечения листьев ореха черного выделены доминирующие флавоноиды – мирицитрин (мирицетин-3-О-α-L-рамнопиранозид) и кверцитрин (кверцетин-3-О-α-L-рамнопиранозид), идентифицированные на основании данных УФ-, ЯМР-спектров, масс-спектров, а также результатов кислотного гидролиза. Разработаны методики количественного определения мирицитрина и кверцитрина в листьях ореха черного методом микроколоночной ВЭЖХ в условиях изократического режима (подвижная фаза – ацетонитрил : 1%-ный раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 2:8). Ошибка единичного определения содержания мирицитрина в листьях ореха черного с доверительной вероятностью 95% составила ±4,91%. Содержание мирицитрина варьировало от 2,58±0,15 до 2,67±0,13%, кверцитрина – от 1,36±0,12 до 1,45±0,15%. Ошибка единичного определения содержания кверцитрина в листьях ореха черного с доверительной вероятностью 95% составила ±5,18%.

**Выводы.** Результаты проведенных исследований показали удовлетворительные метрологические характеристики предлагаемых для стандартизации сырья листьев ореха черного ВЭЖХ-методик определения количественного содержания мирицитрина и кверцитрина.

**Ключевые слова:** орех черный, *Juglans nigra* L., листья, флавоноиды, мирицитрин, кверцитрин, высокоэффективная жидкостная хроматография, стандартизация.

**Для цитирования:** Куркин В.А., Зименкина Н.И., Помогайбин А.В. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха черного методом ВЭЖХ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(12):24–35. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-12-04>

Одними из перспективных видов лекарственного растительного сырья являются растения видов рода орех (*Juglans* L.). На территории Российской Федерации на данный момент основными культивируемыми видами рода *Juglans* являются орех грецкий (*Juglans regia* L.), орех черный (*Juglans nigra* L.) и орех серый (*Juglans cinerea* L.) [1, 2].

Орех черный (*Juglans nigra* L., сем. ореховые – *Juglans*) – листопадное дерево, которое используется как источник ценной древесины, но известно и своими лечебными свойствами [3–5]. Листья ореха черного представляют интерес как новый вид лекарственного растительного сырья, поскольку содержат в качестве ведущей группы биологически активных соединений различные производные нафтохинона [6, 7], а также и другие химические соединения: алкалоиды (югландин), витамины, органические кислоты, эфирное масло ( $\beta$ -кардиофиллен, гермакрен D,  $\alpha$ -пинен) и фенольные соединения, в том числе флавоноиды (кверцитрин, астрагалин, мирицитрин), которые могут вносить существенный вклад в антимикробную и общеукрепляющую активность указанного лекарственного сырья [8–11]. Данные сведения свидетельствуют об актуальности изучения флавоноидов листьев ореха черного.

Для включения листьев ореха черного в Государственную фармакопею Российской Федерации необходимо проведение всего комплекса фармакогностических исследований, в том числе и разработки методик количественного определения для указанного вида сырья.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я** – разработка методик количественного анализа биологически активных соединений листьев ореха черного – мирицитрина и кверцитрина.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали образцы листьев ореха черного, заготовленные в марте-апреле 2018–2020 гг. на территории Ботанического сада Самарского университета (г. Самара). Из листьев ореха черного получали водно-спиртовые извлечения, которые были использованы для качественного (спектрофотометрическое определение) и количественного (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)) анализа, а также для препаративного выделения

индивидуальных соединений. Анализировали водно-спиртовые извлечения из листьев ореха черного с использованием стандартного образца (СО) мирицитрина (рис. 1) и кверцитрина (рис. 2) методом УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

В работе использовали ацетонитрил (ООО «Компонент-реактив», «Для высокоэффективной жидкостной хроматографии»), воду, полученную с использованием системы для получения воды очищенной с многоступенчатой системой очистки (адсорбция, обратный осмос, мембранное фильтрование) и проверенную на чистоту в условиях хроматографического анализа. Остальные реактивы имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

Выделение индивидуальных веществ из листьев ореха черного проводили с использованием колоночной хроматографии на силикагеле в условиях градиентного элюирования смесями растворителей хлороформ–этанол в различных соотношениях с последующей рехроматографией на полиамиде смесями растворителей вода–этанол в градиентном режиме с постепенным увеличением концентрации этанола. Из фракций, полученных элюированием смесью воды и этилового спирта в соотношении 70:30, выделили одно доминирующее соединение с величиной  $R_f$  0,60, а также другое соединение в соотношении 60:40, с величиной  $R_f$  0,40, идентификацию которых проводили с помощью УФ-,  $^1\text{H}$ -ЯМР-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений (кислотный гидролиз).

Для мирицитрина спектры ЯМР  $^1\text{H}$  получали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц), спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  – на приборе «Bruker DRX 500» (126,76 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30». Для кверцитрина, кверцетина и мирицетина спектры ЯМР  $^1\text{H}$  получали на приборе «JNM-ECX 400» (399,78 МГц), спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  – на приборе «JNM-ECX 400» (100,52 МГц). Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате хроматографических исследований были выделены вещества, идентифицированные как мирицитрин (1) и его агликон – мирицетин (2) (рис. 1).

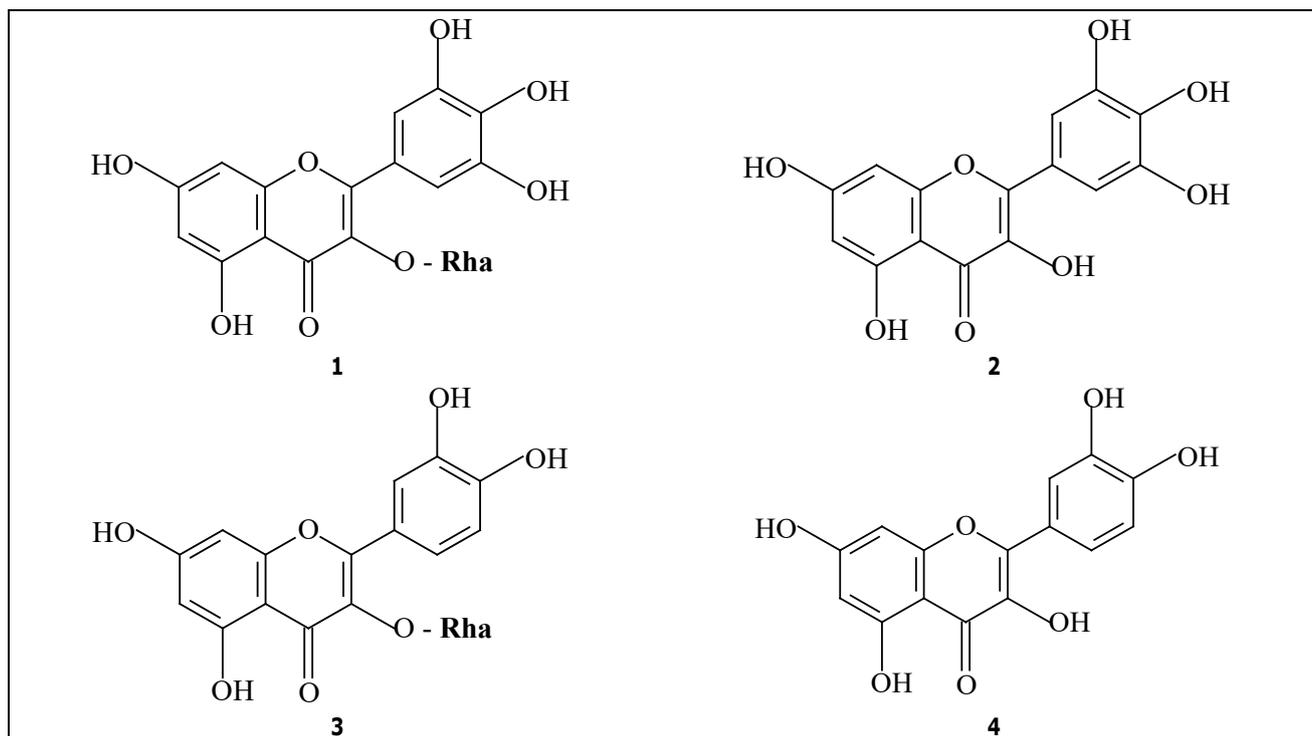


Рис. 1. Структурные формулы мирицитрина (1), мирицетина (2), кверцитрина (3) и кверцетина (4)

**Мирицитрин** (мирицетин-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид) (1). Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество с т.пл. 203–205 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH,  $\lambda_{\max}$ , нм): 212, 260, 358; + NaOAc 268, 366; + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 260, 382; +AlCl<sub>3</sub> 278, 416; +AlCl<sub>3</sub> + HCl 270, 406.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , м.д., J/Гц): 12.68 (1H, с, 5-ОН-группа), 9.23 (2H, уш. с, 7-ОН-группа и 4'-ОН-группа), 6.88 (2H, с, Н-2' и Н-6'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, Н-8), 6.19 (1H, д, 2.5 Гц, Н-6), 5.20 (1H, д, 1.5 Гц, Н-1'' равнозв), 3.1–5.0 (м, 4H равнозв), 0.84 (3H, д, 6 Гц, СН<sub>3</sub> равнозв).

<sup>13</sup>C-ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ С, м.д.): С-4 (177.85), С-7 (164.24), С-5 (161.37), С-4' (157.57), С-9 (156.49), С-2 и С-3 (145.83), С-3' и С-5' (145.83), С-1' (119.70), С-2' и С-6' (108.00), С-10 (104.12), С-1'' равнозв (102.00), С-6 (98.41), С-8 (94.30), С-2' (116.21), С-3'' (71.03), С-5'' (70.62), С-4'' (70.47), С-2'' (70.08), С-6'' (СН<sub>3</sub>) (17.57).

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °С, m/z): m/z 465.1016 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 487.0830 [M+Na]<sup>+</sup>, m/z 503.0560 [M+K]<sup>+</sup>.

**Мирицетин** (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавонон) (2). Желтовато-зеленое кристаллическое вещество с т.пл. 357 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH,  $\lambda_{\max}$ , нм): 254, 377; + NaOAc 275, 382; + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 258, 392; +AlCl<sub>3</sub> 266, 440; +AlCl<sub>3</sub> + HCl 266, 440.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , 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, Н-2' и Н-6'), 6.32 (1H, д, 2.2 Гц, Н-8), 6.14 (1H, д, 2.2 Гц, Н-6).

<sup>13</sup>C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ С, м.д.): С-4 (176.29), С-7 (164.39), С-5 (161.25), С-9 (156.59), С-4' (147.36), С-3' и С-5' (146.23), С-2 и С-3 (136.38), С-1' (121.30), С-2' и С-6' (107.68), С-10 (103.49), С-8 (93.71), С-6 (98.67).

Кроме того, были выделены соединения, идентифицированные как кверцитрин (3) и его агликон – кверцетин (4) (рис. 1).

**Кверцитрин** (кверцетин-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид) (3). Желтое кристаллическое вещество с т. пл. 250–252 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH,  $\lambda_{\max}$ , нм): 258, 264 (плечо), 356; + NaOAc 261, 356; + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 265, 380; +AlCl<sub>3</sub> 274, 404; +AlCl<sub>3</sub> + HCl 270, 400.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , 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, Н-2'), 7.21 (1H, дд, 2.5

и 9 Гц, Н-6'), 6.82 (1Н, д, 9 Гц, Н-5'), 6.35 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-8), 6.16 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-6), 5.21 (1Н, с, Н-1'' рамнозы), 3.1–4.9 (м, 4Н рамнозы), 0.78 (3Н, д, 6 Гц, СН<sub>3</sub> рамнозы).

<sup>13</sup>С-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, δ<sub>с</sub>, м.д.): С-4 (178.27), С-7 (164.72), С-5 (161.82), С-9 (157.82), С-2 (156.97), С-4' (148.97), С-3' (147.73), С-3 (134.74), С-6' (121.63), С-1' (121.25), С-2' (116.17), С-5' (115.98), С-10 (104.61), С-1'' рамнозы (102.36), С-6 (99.21), С-8 (94.15), С-3'' (71.69), С-5'' (71.11), С-4'' (70.87), С-2'' (70.58), С-6'' (СН<sub>3</sub>) (18.02).

**Кверцетин** (3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавоон) (4). Желтое кристаллическое вещество с т. пл. 316–318 °С (водный спирт), УФ-спектр (EtOH, λ<sub>max</sub>, нм): 258, 270 (плечо), 374; + NaOAc 274, 382; + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 258, 392; + AlCl<sub>3</sub> 268, 434; + AlCl<sub>3</sub> + HCl 266, 410.

<sup>1</sup>Н-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1Н, с, 5-OH), 10.72 (1Н, с, 7-OH-группа), 9.53 (1Н, с, 4'-OH-группа), 9.31 (1Н, с, 3'-OH-группа), 9.21 (1Н, с, 3-OH-группа), 7.63 (д, 2.5 Гц, Н-2<sup>1</sup>), 7.49 (1Н, дд, 2.5 и 9 Гц, Н-6<sup>1</sup>), 6.84 (1Н, д, 9 Гц, Н-5<sup>1</sup>), 6.36 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-8), 6.14 (1Н, д, 2.5 Гц, Н-6).

<sup>13</sup>С-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>, δ<sub>с</sub>, 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).

Исходя из спектральных данных, для детекции анализируемых веществ при проведении ВЭЖХ-анализа была выбрана длина волны 360 нм, поскольку мирицитрин имеет в длинноволновой области электронного спектра максимум поглощения при 360±2 нм, а кверцитрин – максимум поглощения при 356±2 нм.

**Приготовление рабочих растворов.** Для аналитических целей извлечения из листьев ореха черного получали в условиях, описанных в методике количественного определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии [12].

**Пробоподготовка для извлечения из листьев ореха черного.** Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл 70%-ного этанола. Колбу закрывали пробкой, взвешивали на тарированных весах с точностью до ±0,01, далее присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение пропускали через бумажный фильтр (красная полоса) и затем дополнительно – через мембранный фильтр Milipore (0,45 мкм) (испытуемый раствор).

**Приготовление стандартного раствора мирицитрина.** Около 0,02 г (точная навеска предварительно высушенного мирицитрина, содержание основного вещества ≥98 %) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 70%-ном 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 ≥98 %) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 70%-ном этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

**Условия хроматографического разделения.** Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№ 2; 2×80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : 1%-ный раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 2:8, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ проводили при длине волны 360 нм. Объемы инжестируемых проб для извлечения из коры ореха черного, а также растворов кверцитрина и мирицитрина – 4 мкл. Расчет содержания мирицитрина и кверцитрина выполняли методом внешнего стандарта. Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» [13].

**Оценка пригодности системы.** С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения листьев ореха черного.

В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии.

Результаты расчетов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Формула расчета	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	$N = \frac{5,54 \cdot RT^2}{W_{0,5}^2}$ где $RT$ – время удерживания пика; $W_{0,5}$ – ширина пика на 0,5 высоты	5111	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между пиками	$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_2 + W_1}$ где $t_{R1}$ и $t_{R2}$ – времена удерживания; $W_1$ и $W_2$ – ширина пиков образцов при основании	1,63	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	$T = \frac{W_{0,05}}{2a}$ где $W_{0,05}$ – ширина пика на высоте 5%; $a$ – расстояние от фронта пика до высоты, измеренное на высоте 5% от основания	1,38	Не более 1,5

Полученные при хроматографировании данные позволяют оценить пригодность хроматографической системы, а также сделать заключение о том, что данная система может быть использована для количественного определения мирицитрина в листьях ореха черного.

**Валидационный анализ.** Для построения градуировочного графика серию разведения мирицитрина (250–1500 мкг/мл) и кверцитрина (250–1500 мкг/мл) хроматографировали в описанных условиях. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ( $Y = aX + b$ ), значение коэффициента детерминации ( $r^2$ ), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013.

Стабильность методики определяли на образце извлечения листьев ореха черного, анализируя его через 2, 4, 8, 12, 24, 48 и 72 ч после первого анализа. Точность методики выявляли на образце извлечения листьев ореха черного с введением в аликвоту образца растворов стандартных образцов мирицитрина и кверцитрина в количестве от 80 до 120% от исходного содержания.

В указанных условиях хроматографирования при использовании системы ацетонитрил : вода в соотношении 2:8 возможно идентифицировать анализируемые компоненты системы – мирицитрин (рис. 2 и 4) и кверцитрин (рис. 3 и 4). Кроме того,

выявлено, что в системе ацетонитрил : вода в соотношении 2:8 возможно идентифицировать агликон мирицитрина – мирицетин (рис. 4 и 5).

Времена удерживания пиков мирицитрина, кверцитрина и мирицетина на соответствующих хроматограммах рабочих стандартных образцов, а также в извлечении из листьев ореха черного представлены в табл. 2.

Добавление раствора мирицитрина (1), кверцитрина (3) и мирицетина (2) в извлечение проявляется на хроматограмме увеличением интенсивности пика мирицитрина, пика кверцитрина и пика мирицетина соответственно, по сравнению с таковой флавоноидов 1, 3 и 2 в исходном испытуемом растворе (рис. 6–8).

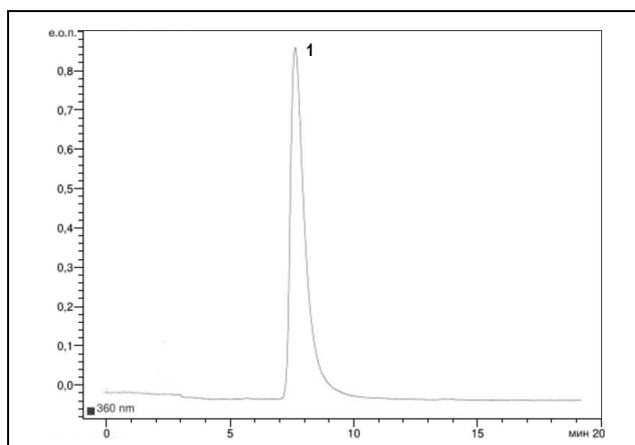


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма мирицитрина. Обозначения: 1 – мирицитрин

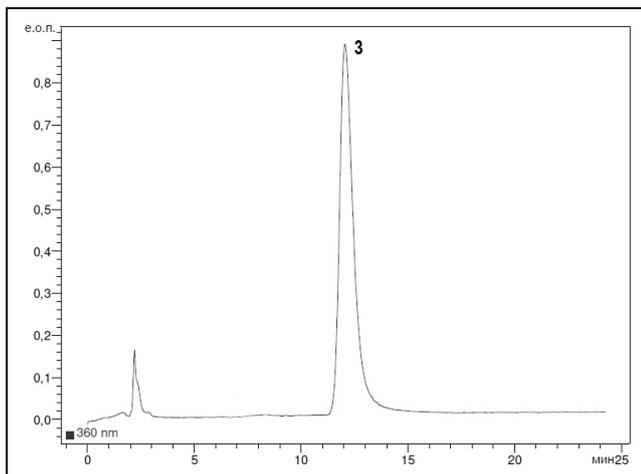


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма кверцитрина. Обозначения: **3** – кверцитрин

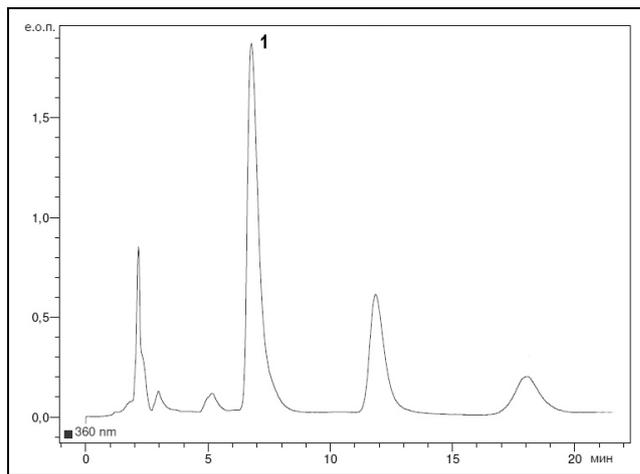


Рис. 6. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного с добавлением мирицитрина. Обозначения: **1** – мирицитрин

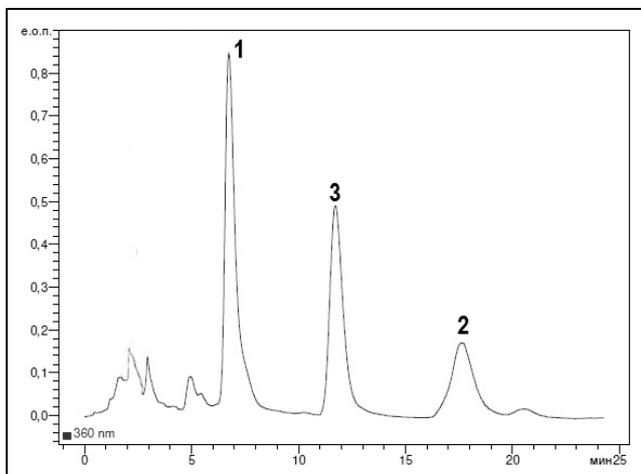


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного. Обозначения: **1** – мирицитрин; **2** – мирицетин; **3** – кверцитрин

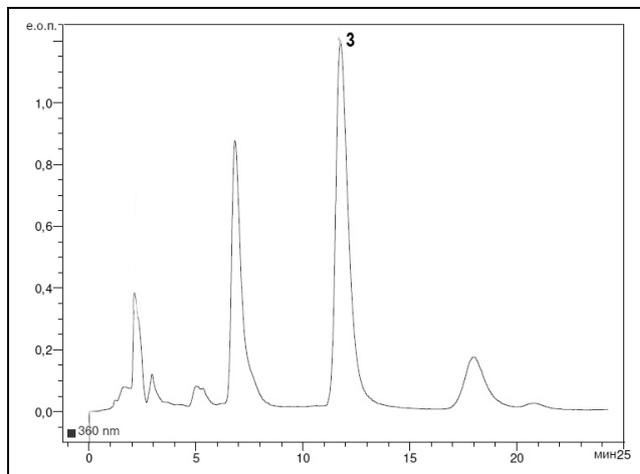


Рис. 7. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного с добавлением кверцитрина. Обозначения: **3** – кверцитрин

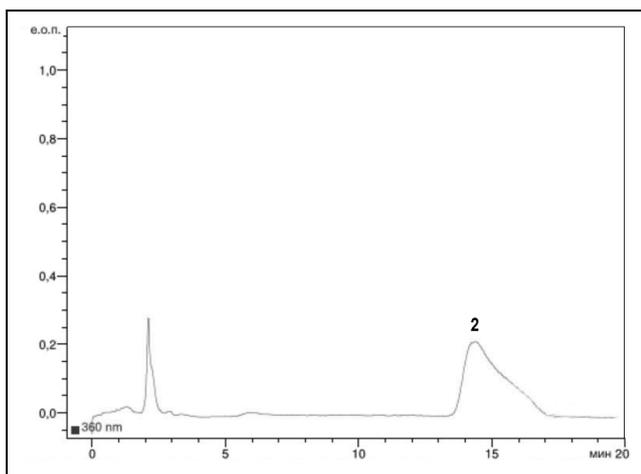


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма мирицетина. Обозначения: **2** – мирицетин

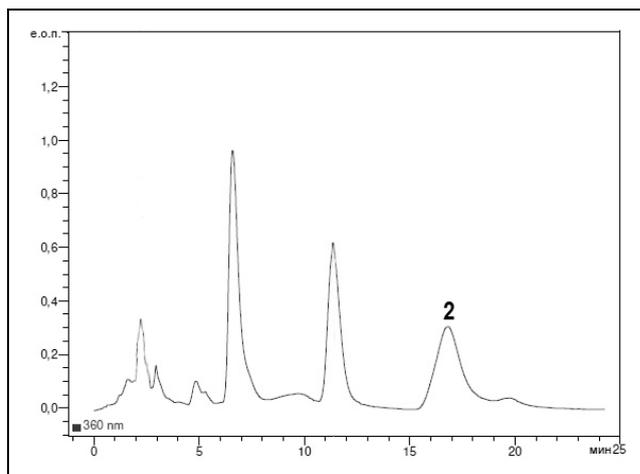


Рис. 8. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев ореха черного с добавлением мирицетина. Обозначения: **2** – мирицетин

Принимая во внимание невысокое содержание мирицетина в извлечении по сравнению с мирицитрином и кверцитрином, считаем целесообразным количественный анализ осуществлять отдельно по мирицитрину и по кверцитрину. Зависимость высоты хроматографического пика от

концентрации мирицитрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 250 до 1500 мкг/мл (рис. 9), предел количественного определения – 140 мкг/мл.

Точность методики составила 96,48–102,11 % (табл. 3).

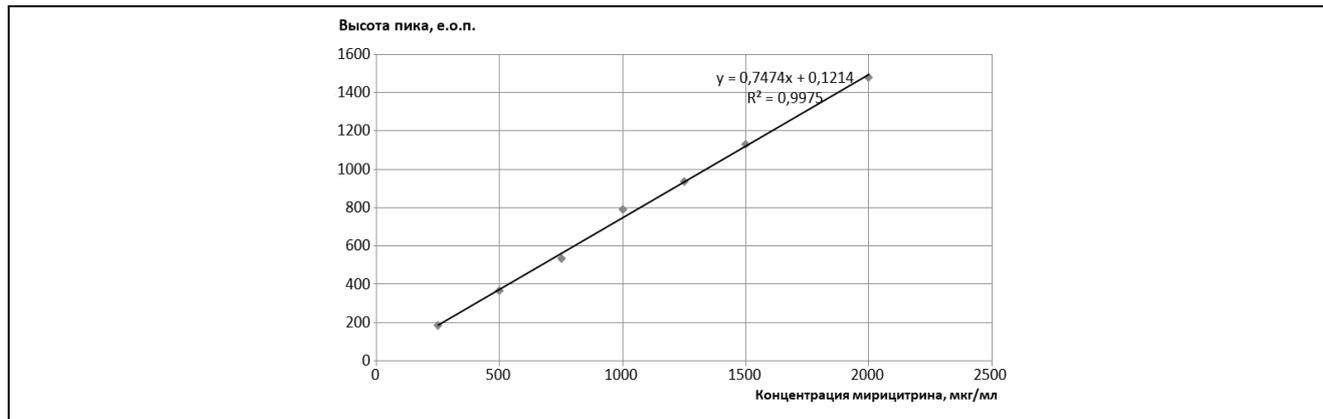


Рис. 9. График зависимости высоты пика от концентрации мирицитрина в пробе и уравнение линейной регрессии

Таблица 2. 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

Таблица 3. Результаты определения точности методики количественного определения мирицитрина

Исходное содержание мирицитрина, мг/г	Добавлено мирицитрина, мг/г	Содержание мирицитрина, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг	относительная, %
2,60	1,95	4,55	4,39	-0,16	-3,52
2,60	2,60	5,20	5,31	+0,11	+2,11
2,60	3,25	5,85	5,67	-0,18	-3,08

**Методика количественного определения мирицитрина в листьях 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 70%-ного 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 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы.

Извлечение пропускают через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

В жидкостный хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 4 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№ 2; 2×80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система – ацетонитрил : вода в соотношении 2:8 с добавлением 1%-ной уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл, объем пробы испытуемого раствора – 4 мкл.

Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Вы-

полняют не менее трех параллельных определений. Одновременно 4 мкл раствора мирицитрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют площадь пика РСО мирицитрина и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам трех определений.

Устанавливают время удерживания и идентифицируют пик мирицитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика мирицитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по трем параллельным определениям (см. рис. 4).

Содержание мирицитрина в листьях ореха черного в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах ( $x$ ) вычисляют по формуле:

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

где  $S$  – среднее значение площади пика мирицитрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца;  $S_0$  – среднее значение площади пика раствора РСО мирицитрина, вычисленное из хроматограмм раство-

ра РСО мирицитрина;  $V$  – объем извлечения, мл;  $V_1$  – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;  $V_0$  – объем раствора РСО мирицитрина, мл;  $V_2$  – объем вводимой пробы раствора РСО мирицитрина, мкл;  $m$  – масса сырья, г;  $m_0$  – масса РСО мирицитрина, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания мирицитрина в листьях ореха черного с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 4,91\%$  (табл. 4).

При разработке методики количественного определения кверцитрина зависимость высоты хроматографического пика от концентрации кверцитрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 250 до 1500 мкг/мл (рис. 10), предел количественного определения равен 180 мкг/мл.

Точность методики составила 95,56–103,67% (табл. 5).

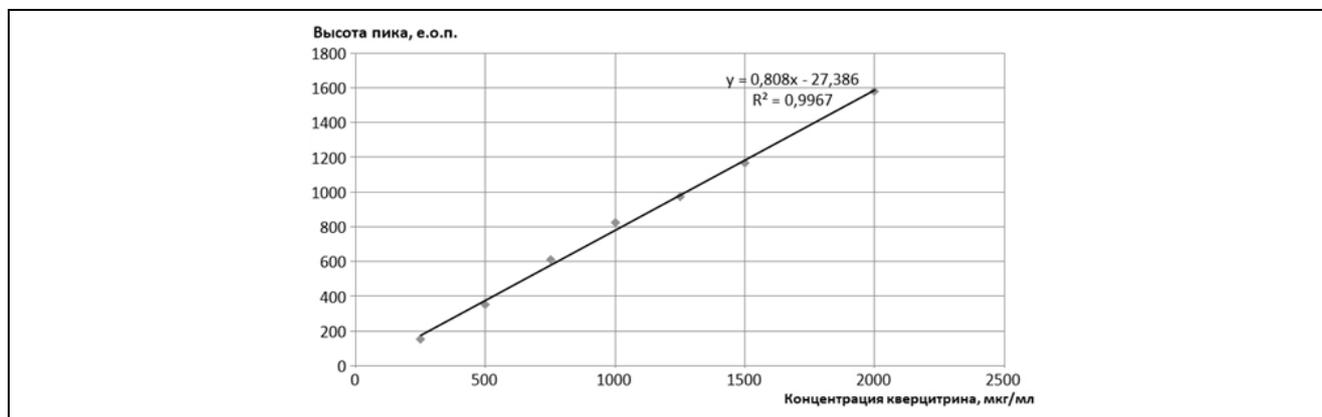


Рис. 10. График зависимости высоты пика от концентрации кверцитрина в пробе и уравнение линейной регрессии

Таблица 4. Метрологические характеристики методики количественного определения мирицитрина в листьях ореха черного

Образец	$f$	$X_{cp}$	$S$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
Извлечение из коры ореха черного	10	2,62	0,05769	95	2,23	$\pm 0,18$	$\pm 4,91$

Таблица 5. Результаты определения точности методики количественного определения кверцитрина

Исходное содержание кверцитрина, мг/г	Добавлено кверцитрина, мг/г	Содержание кверцитрина, мг/г		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг	относительная, %
1,50	1,20	2,70	2,58	-0,12	-4,44
1,50	1,50	3,00	3,11	+0,11	+3,67
1,50	1,90	3,40	3,27	-0,13	-3,82

**Методика количественного определения кверцитрина в листьях 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 70%-ного 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 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение пропускают через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

В жидкостный хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 4 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№ 2; 2×80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система – ацетонитрил : вода в соотношении 2:8 с добавлением 1%-ной уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл, объем пробы испытуемого раствора – 4 мкл.

Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Выполняют не менее трех параллельных определений.

Параллельно 4 мкл раствора кверцитрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади

пика РСО кверцитрина и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам трех определений.

Определяют время удерживания и идентифицируют пик кверцитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика кверцитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по трем параллельным определениям.

Содержание кверцитрина в листьях ореха черного в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах ( $x$ ) вычисляют по формуле:

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

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 РСО кверцитрина, вычисленное из хроматограмм раствора РСО кверцитрина;  $V$  – объем извлечения, мл;  $V_1$  – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;  $V_0$  – объем раствора РСО кверцитрина, мл;  $V_2$  – объем вводимой пробы раствора РСО кверцитрина, мкл;  $m$  – масса сырья, г;  $m_0$  – масса РСО кверцитрина, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания кверцитрина в листьях ореха черного с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 5,18\%$  (см. табл. 6).

**Таблица 6. Метрологические характеристики методики количественного определения кверцитрина в листьях ореха черного**

Образец	$f$	$X_{cp}$	$S$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
Извлечение из коры ореха черного	10	1,41	0,03276	95	2,23	$\pm 0,18$	$\pm 5,18$

**Таблица 7. Содержание мирицитрина и кверцитрина в объектах исследования**

№ п/п	Образец	Содержание мирицитрина, %	Содержание кверцитрина, %
1	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, апрель 2018 г.)	2,58 $\pm$ 0,15	1,45 $\pm$ 0,15
2	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, март 2019 г.)	2,67 $\pm$ 0,13	1,36 $\pm$ 0,12
3	Листья ореха черного (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, март 2020 г.)	2,62 $\pm$ 0,18	1,41 $\pm$ 0,11

С использованием указанных методик был проанализирован ряд образцов листьев ореха черного (табл. 7). Содержание доминирующего флавоноида – мирицитрина (мирицетин-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид) в листьях ореха черного варьировало от 2,58 $\pm$ 0,15 до 2,67 $\pm$ 0,13%. Содержание кверцитрина (кверцетин-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид) составляло от 1,36 $\pm$ 0,12 до 1,45 $\pm$ 0,15%.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали удовлетворительные метрологические характеристики предлагаемых для стандартизации листьев ореха черного ВЭЖХ-методики количественного определения содержания доминирующих и диагностически значимых флавоноидов данного сырья – мирицитрина и кверцитрина.

## ВЫВОДЫ

1. Обоснована методика количественного определения мирицитрина в листьях ореха черного методом микроколоночной ВЭЖХ с детекцией в УФ-свете при длине волны 360 нм. Содержание мирицитрина в лекарственном сырье варьировало от 2,58 $\pm$ 0,15 до 2,67 $\pm$ 0,13%. При этом ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm$ 4,91 %.
2. Обоснована методика количественного определения кверцитрина листьев ореха черного методом микроколоночной ВЭЖХ с детекцией в УФ-свете при длине волны 360 нм. Содержание кверцитрина в лекарственном сырье варьировало от 1,36 $\pm$ 0,12 до 1,45 $\pm$ 0,15%. При этом ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm$ 5,18 %.

*Исследование выполнено в рамках комплексных тем НИОКР СамГМУ «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (№ АААА-А19-119051490148-7 от 14.05.2019).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Губанов И.А., Крылова И.Л., Тихонова В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР. М.: Мысль, 1976: 81—85.
2. Дайронас Ж.В. Зилфикаров И.Н. Орех грецкий - перспективное лекарственное растение (обзор литературы). Традиционная медицина: сб. науч. трудов Российского фитотерапевтического съезда (22-23 октября 2010 г.). 2010; 3(22): 118–23.
3. Ильинская И.А. К систематике и филогении семейства Juglandaceae. Ботанический журнал. 1990; 75(6): 792–803.
4. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармац. Вузов. Изд. 4-е, перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2019; 1278 с.
5. Paudel P., Satyal P., Dosoky N.S., Maharjan S., Setzer W.N. *Juglans 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.
6. Дайронас Ж.В. Определение нафтохинонов в сырье и фитопрепарате ореха черного – *Juglans nigra* L. Фармация. 2013; 4: 12–14.
7. Тушканова О.В., Бойко И.Е. Исследование антибиотической активности юглона, выделенного из околоплодника *Juglans nigra* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017; 1(18): 126–129.
8. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. Самара: ГБОУ ВПО «СамГМУРосздрава»: ООО ОФОРТ, 2012; 290 с.
9. Железникова А.С. Изучение флавоноидов в листьях некоторых видов рода *Juglans*, интродуцированных в условиях Самарской области. Материалы докладов Всеросс. конф. с междунар. участием (Аспирантские чтения – 2013): «Молодые учёные в медицине», 2013; 274–77.
10. Зайцева Е.Н., Дубищев А.В., Куркин В.А. Анализ влияния рутина и гравитационного воздействия на выделительную функцию почек. Наука и инновации в медицине. 2016; 1(4): 47–50.
11. Cruz-Vega D.E., Verde-Star M.J., Salinas-González N., Rosales-Hernández B., Estrada-García I., Mendez-Aragón P., Carranza-Rosales P., González-Garza M.T., Castro-Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. Phytother. Res., 2008; 22(4): 557–559. DOI: 10.1002/ptr.2343.
12. 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>.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

Поступила 24 мая 2021 г.