

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ ОРЕХА ГРЕЦКОГО

Зименкина Н.И., Куркин В.А.

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

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

Резюме: Орех грецкий (*Juglans regia* L.) – ценное лекарственное растение семейства *Juglandaceae*. Для введения листьев ореха грецкого в Государственную фармакопею Российской Федерации необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, включая разработку методик стандартизации. В данной статье обсуждаются результаты разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцитрин в листьях ореха грецкого (*Juglans regia* L.).

Resume: *Juglans regia* L. is a very valuable medicinal plant of the *Juglandaceae* family. We have aim to include leaves of *Juglans regia* L. to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. So it is necessary to conduct of pharmacognostic studies with the development of regulatory documentation confirming the identification and quality of medicinal plant raw materials. In this article are discussed the results of the development of a method of quantitative determination of the total flavonoids calculated on quercitrin in *Juglans regia* L.

Актуальность. Лекарственные растения видов рода орех (*Juglans* L.) семейства *Juglandaceae* являются перспективными видами официального лекарственного растительного сырья (ЛРС) благодаря высокому содержанию биологически активных соединений (БАС). На наш взгляд, перспективным объектом ЛРС для практического применения могут служить и листья ореха грецкого (*Juglans regia* L.) [2].

Представители рода орех являются потенциальными источниками важного класса биологически активных соединений – нафтохинонов, проявляющих высокую антимикробную активность [3,7]. Также установлено, что вклад в основной антимикробный эффект, наряду с нафтохинонами, могут вносить и флавоноиды [8].

Необходимо учитывать тот факт, что в сырье, предназначенном для получения водных, спиртовых, спирто-водных извлечений, экстрактов, существует необходимость определения действующих веществ гидрофильной природы, к которым относят флавоноиды данного растения [6]. Следовательно, существует необходимость разработки методик как качественного, так и количественного определения указанной группы БАС.

Ранее нами была установлена возможность стандартизации листьев ореха грецкого при проведении количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом УФ-спектрофотометрии [4]. При этом определено, что содержание флавоноидов в листьях ореха грецкого достигает $3,72 \pm 0,03$ в пересчете на рутин [4]. Принимая во внимание тот факт, что рутин не содержится в указанном ЛРС, существует необходимость выбора другого соединения, на которое будет осуществляться пересчет. На наш взгляд, в качестве стандартного вещества может

быть использован кверцитрин, входящий в состав листьев ореха грецкого [5].

Цель: Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцитрин в листьях ореха грецкого (*Juglans regia* L.).

Задачи: 1. Определение рабочего значения удельного показателя поглощения стандартного образца кверцитрина при 412 нм; 2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцитрин в листьях ореха грецкого (*Juglans regia* L.); 3. Расчет содержания суммы флавоноидов в ряде образцов листьев ореха грецкого (*Juglans regia* L.) с учетом разработанной методики.

Материал и методы. Исследовали листья ореха грецкого (*Juglans regia* L.). Образцы листьев были собраны в период массового цветения (июль) 2018-2020 годов в Ботаническом саду Самарского университета. Сушка сырья проводилась естественным способом под навесом без доступа прямых солнечных лучей до воздушно-сухого состояния. Для проведения анализа получали водно-спиртовые извлечения исследуемого лекарственного растительного сырья для количественной оценки (спектрофотометрия), а также раствор стандартного образца (СО) кверцитрина для получения значения рабочего значения удельного показателя поглощения стандартного образца кверцитрина при 412 нм.

Для определения флавоноидов в листьях ореха грецкого (*Juglans regia* L.) использовали метод прямой и дифференциальной спектрофотометрии. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena, Германия). Исследование ЛРС осуществлялось в соответствии с требованиями ОФС. 1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» ГФ РФ XIV издания [1].

Результаты и их обсуждение. С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого были изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья (рис. 1). Определено, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения ореха грецкого наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 1), как и в случае СО кверцитрина (рис. 2). Изучение УФ-спектров СО кверцитрина показало, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 410 ± 2 нм (рис. 2). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны 412 нм (рис. 3), который практически соответствует максимуму спиртового раствора кверцитрина (рис. 4).

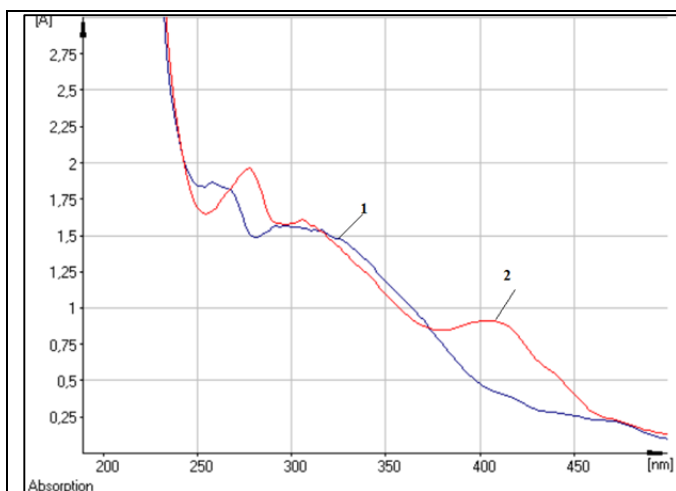


Рис. 1 - Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого
Обозначения: 1 – раствор извлечения;
2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

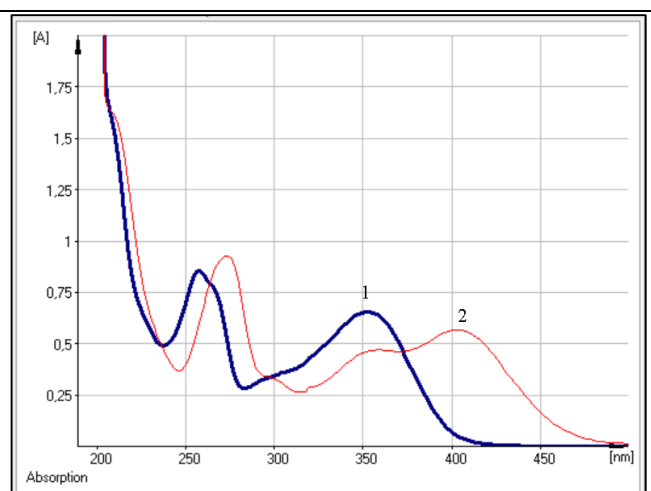


Рис. 2 - Электронные спектры спиртовых растворов кверцетина.
Обозначения: 1 – исходный раствор;
2 – раствор с добавлением алюминия хлорида

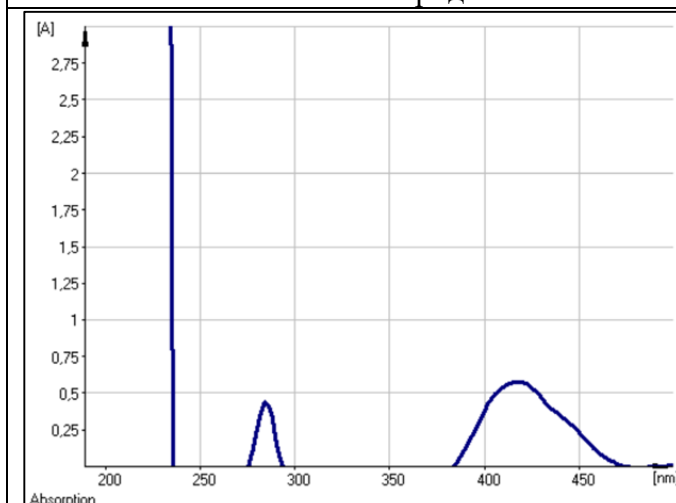


Рис. 3 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из листьев ореха грецкого (дифференциальный вариант)

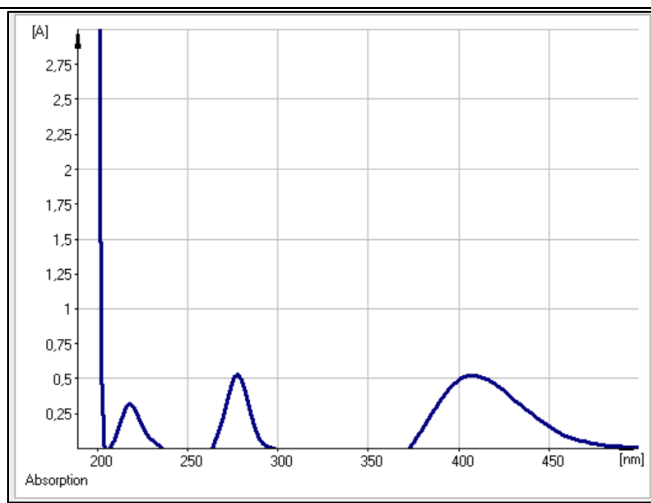


Рис. 4 - Электронный спектр спиртового раствора кверцетина (дифференциальный вариант)

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов ранее были определены оптимальные условия экстракции флавоноидов в листьях ореха грецкого [4].

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). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:30) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Примечание: *Приготовление раствора кверцитрина-стандартного образца.* Около 0,02 г (точная навеска) кверцитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А кверцитрина). 5 мл раствора А кверцитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б кверцитрина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 412 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 5 мл раствора А кверцитрина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б кверцитрина).

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

$$x = \frac{D * 30 * 50 * 100}{m * 269 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

269 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО кверцитрина при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого представлены в таблице 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцитрин в листьях ореха грецкого с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,33$ % (табл. 1).

Табл. 1. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого

n	F	\bar{X}	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	X	$\Delta\bar{X}$	E,%
---	---	-----------	---	---------------	------	---------	---	-----------------	-----

11	10	3,19	0,07514	0,02265	95%	2,23	0,17	0,05	5,33
----	----	------	---------	---------	-----	------	------	------	------

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов листьев ореха грецкого (табл. 2) и при этом определено, что содержание суммы флавоноидов варьирует от 3,19 % до 3,01 %.

Табл.2. Содержание суммы флавоноидов в образцах листьев ореха грецкого

№п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на рутин
1.	Ботанический сад Самарского университета (июль 2018 г.)	3,19±0,17
2.	Ботанический сад Самарского университета (июль 2019 г.)	3,15±0,15
3.	Ботанический сад Самарского университета (июль 2020 г.)	3,01±0,14

Выводы: 1. Рассчитано значение рабочего значения удельного показателя поглощения стандартного образца кверцитрина при 412 нм. 2. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием СО кверцитрина при аналитической длине волны 412 нм. 3. Содержание суммы флавоноидов для листьев ореха грецкого варьирует от ±3,19 % до ±3,01 %. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет ±5,33%.

Литература

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание [Электронный ресурс]. МЗ РФ. Москва, 2018; Т.2: 2327–2348. URL: http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/513/index.html (дата обращения 29.09.2021 г.).
2. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий - перспективное лекарственное растение (обзор литературы) // Традиционная медицина. - 2010. - №3(22). - С. 118-123.
3. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Спектрофотометрическое определение производных юглона в листьях ореха грецкого // Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты. - Самара: ООО "Офорт", 2011. - С. 113-114.
4. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха грецкого // Фармация. – 2020. – № 69(7). – С. 23-28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-07-04>.
5. Зименкина Н.И., Куркин В.А. Сравнительное фармакогностическое исследование листьев представителей рода Орех (*Juglans* L.) // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. - М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2020. – С. 217-224.
6. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. - Самара: ГБОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2012. - 290 с.
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). – С. 126-129.
8. Kumamoto T., Fujii M., Hou D.X. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation // *Cancer Lett.* – 2009. – Vol. 275, No. 1. – P. 17-26. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.027.