

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
факультет по подготовке иностранных граждан
кафедра химии природных соединений и нутрициологии**

КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

по теме: «**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ JUGLANS NIGRA**»

Выполнил: соискатель высшего образования
группы Фм18(5,0д)и-11
специальности 226 Фармация, промышленная фармация
образовательной программы Фармация
Мохаммед Амин ТАУФИК

Руководитель: профессор заведения высшего образования
кафедры химии природных соединений и нутрициологии,
д.фарм.н., профессор, Андрей КОМИССАРЕНКО

Рецензент: профессор заведения высшего образования
кафедры фармакогнозии,
д.фарм.н., профессор Олег КОШЕВОЙ

Харьков – 2023 год

АННОТАЦИЯ

Квалификационная работа посвящена фармакогностическому изучению Ореха черного. Установлены показатели подлинности и доброкачественности ЛРС. Проведено исследование качественного и количественного состава биологически активных веществ в сырье.

Ключевые слова: Juglans nigra, кора, лист, диагностические признаки, биологически активные вещества

ANNOTATION

Qualifying work is devoted to pharmacognostic study of Juglans nigra. Indicators of authenticity and benignity of the herbal products have been established. The research of qualitative and quantitative composition of biologically active substances in raw material has been carried out.

Keywords: Juglans nigra, bark, leaf, diagnostic attributes, biologically active substances

СОДЕРЖАНИЕ			
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ			5
ВВЕДЕНИЕ			6
РАЗДЕЛ 1	ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА ОРЕХ (<i>JUGLANS L.</i>) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)		9
	1.1	Представители рода Орех перспективные источники биологически активных соединений	9
	1.2	Ботаническая характеристика видов рода <i>Juglans</i>	10
	1.3	Химический состав перспективных видов рода Орех	12
	1.4	Фармакологические свойства и применение в медицине представителей рода Орех	21
РАЗДЕЛ 2	РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО (<i>JUGLANS NIGRA L.</i>)		29
	2.1	Разработка методик качественного анализа коры и листьев ореха черного методом ТСХ и спектрофотометрии	29
	2.2	Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного	34
	2.3	Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин листьях ореха черного	38
	2.4	Изучение динамики накопления биологически активных соединений в листьях ореха черного	42

РАЗДЕЛ 3	МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА JUGLANS L.	46
	3.1 Морфолого-анатомическое исследование коры ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии	47
	3.2 Морфолого-анатомическое исследование листьев ореха черного (<i>Juglans nigra</i> L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии	54
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ		63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ		64
ПРИЛОЖЕНИЯ		

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения;

БХ – бумажная хроматография;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ГФУ – Государственная фармакопея Украины;

ЛРС – лекарственное растительное сырьё;

НД – нормативная документация;

НФаУ – Национальный фармацевтический университет;

СО – стандартный образец;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ – ультрафиолетовый;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В условиях современного функционирования фармацевтической отрасли на различных этапах производственного процесса многочисленное количество лекарственных средств. Среди всего ассортимента ЛС особое место занимает группа лекарственных растительных препаратов. Указанная категория фармацевтических агентов сочетает в себе широту терапевтического действия и минимальных риск появления побочных эффектов. Значительное место занимают растительные препараты при терапии хронических нозологий, так как в данном случае требуется длительный приём лекарственных средств.

Современное состояние фармацевтической науки в области фармакогнозии характеризуется определенным исчерпанием потенциала известных официальных лекарственных растений. Одной из причин этого является недостаточное внимание, уделяемое учеными в области фармакогнозии новым и малоизученным видам растительного сырья.

Одним из перспективных видов сырья растительного происхождения являются представители рода Орех (*Juglans* L.) семейства Ореховые (*Juglandaceae*). Представляющими интерес являются орех грецкий (*Juglans regia* L.), орех черный (*Juglans nigra* L.) и орех серый (*Juglans cinerea* L.). Представители рода Орех являются потенциальными источниками важного класса биологически активных соединений – нафтохинонов – представители которого (юглон, гидроюглон) обуславливают высокую антибактериальную, противогрибковую и противовоспалительную активность.

Представители рода Орех являются ценными растениями и широко применяются в деревообрабатывающей и пищевой промышленности. Однако указанные виды пока не нашли широкого применения в научной медицине. Таким образом, проведение комплексного фармакогностического изучения особенностей анатомо-морфологической диагностики, а также идентификации и количественного определения основных групп БАС сырья

представителей рода Орех, отвечающих современным требованиям фармакопейного анализа, является актуальной научной задачей.

Цель работы – фармакогностическое изучение Ореха черного, установление показателей доброкачественности.

Задачи исследования. Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

-Разработка методик качественного анализа коры и листьев *Juglans nigra* L. методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.

-Разработка методик количественного определения флавоноидов в коре и листьях *Juglans nigra* L. с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

-Морфолого-анатомическое исследование листьев и коры ореха черного.

Объект исследования. фармакогностическое изучение коры и листьев *Juglans nigra*.

Предмет исследования. Изучение биологически активных веществ коры и листьев *Juglans nigra*, показатели доброкачественности коры и листьев *Juglans nigra*.

Методы исследования: качественный состав и количественное содержание БАВ определяли по фармакопейным методам: тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостью хроматографией (ВЭЖХ), специфическими качественными реакциями, спектрофотометрическим методом, статистические – обработка результатов экспериментальных исследований.

Практическое значение полученных результатов. В результате проведённых исследований показана возможность расширения ассортимента ЛРС за счёт использования коры и листьев *Juglans nigra*.

Элементы научных исследований. Исследованы морфолого-анатомические признаки коры и листьев *Juglans nigra*, данное исследование подтвердило наличие классических структур В результате изучения

химического состава сырья видов *Juglans nigra* расширены представления о компонентном составе.

Апробация результатов исследования и публикации. Результаты исследования были представлены на V Международная научно-практическая интернет-конференция "Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения" (14 апреля 2023 г.) в Национальном фармацевтическом университете (г. Харьков). По результатам квалификационной работы опубликованы 1 тезисы доклада.

Структура и объём квалификационной работы. Работа состоит из введения, аннотации на русском и английском языках, обзора литературы, 3-х разделов собственных исследований, общих выводов, списка использованной литературы, который включает в себя 87 источников, в том числе 55 на иностранных языках, и приложений. Содержание работы изложено на 63 страницах основного текста и иллюстрировано 8 таблицами и 20 рисунками.

РАЗДЕЛ 1. ПРЕДСТАВИТЕЛИ РОДА ОРЕХ (*JUGLANS L.*) – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Представители рода Орех перспективные источники биологически активных соединений

В настоящее время значительную роль в повышении эффективности терапии заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, играет большой ассортимент и применение антибиотиков [79]. Однако антибиотикотерапия также имеет свои недостатки. Доказано, что частое применение указанной группы препаратов увеличивает частоту появления резистентных штаммов микроорганизмов [79]. В XXI веке проблема антибиотикорезистентности приобрела особую значимость во всем мире. Резистентность к антибиотикам имеет огромное социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности.

Согласно оценкам международных экспертов [16, 79], антимикробная резистентность является причиной более 700 тысяч смертельных случаев ежегодно, в том числе в Европе - 22 тысячи случаев. По оценке Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), только в США ежегодно резистентными штаммами инфицируются около 2 млн. человек, из которых 23 тыс. умирают [16].

Кроме того, прием антибиотиков может привести к появлению различных побочных эффектов, в том числе аллергических реакций, снижению иммунитета, а также увеличению грибковых поражений в организме [48, 59]. В связи с этим, важной и актуальной проблемой современной фармации является поиск новых типов антибактериальных препаратов.

Решение проблемы антибиотикорезистентности может быть осуществлено при использовании БАС растительного происхождения, в частности, содержащих производные хинона [6, 29, 37, 40].

В растительном мире распространен особый класс производных хинона – нафтохиноны. Около 200 различных производных 1,4-нафтохинона обнаружено в различных органах высших растений [75, 76]. Среди производных нафтохинонов особый интерес представляют производные юглона, содержащиеся в растениях семейства *Juglandaceae*: 1,4-нафтохинон, юглон, 2-метил-1,4-нафтохинон, 2,3-диметилюглон [24, 37, 40].

Кроме того, учитывая, что вышеуказанные виды растительного сырья содержат не только производные нафтохинонов, но и другие БАС, в том числе, полифенольные соединения и ненасыщенные жирные кислоты, которые могут оказывать антиоксидантное и противовоспалительное действие.

Перспективным источником нафтохинонов могут быть представители рода Орех (*Juglans* L.) – растения семейства *Juglandaceae*, по литературным данным [28, 49, 53, 82, 86], содержащие юглон, гидроюглон и другие потенциально эффективные БАС. В Самарской области ведутся исследования в области интродукции следующих растительных объектов: *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans mandshurica* Maxim., *Juglans cordiformis* Maxim., *Juglans rupestris* Englm. Это позволяет использовать данное сырье также и в фармакогностических целях [70, 71, 72, 73].

1.2. Ботаническая характеристика видов рода *Juglans*

Согласно литературным данным род *Juglans* L. включает в себя более 20 видов, которые выделены в четыре секции: секция Югланы – *Juglans*, представителями являются орех грецкий *Juglans regia* L., *Juglans sigillata* Dode; секция Риссокарены – *Rhysocaryon*, представителями являются орех южный *Juglans australis* Griseb., орех калифорнийский *Juglans californica* S.Wats., орех Гиндса *Juglans hindsii* Jeps. ex R.E.Sm., орех мелкоплодный

Juglans microcarpa Berland., орех черный *Juglans nigra* L. и др.; секция Кардиокарионы – *Cardiocaryon*, представителями являются орех айлантолистный *Juglans ailantifolia* Carrière, орех маньчжурский *Juglans mandshurica* Maxim. и секция Трахикарионы – *Trachycaryon*, представителем которой является орех серый *Juglans cinerea* L. [38].

Обычным местообитанием многих видов рода Орех являются ущелья и речные долины, широколиственные леса смешанного состава (высота над уровнем моря 1500-1800 м). Представители произрастают одиночно или небольшими группами. Ареал естественного произрастания в теплоумеренных районах Евразии, Северной Америки и в горах Южной Америки (рис. 1) [1, 2, 14, 56, 76].

Основные представители рода *Juglans* L. имеют различия в морфологическом отношении [70, 86].

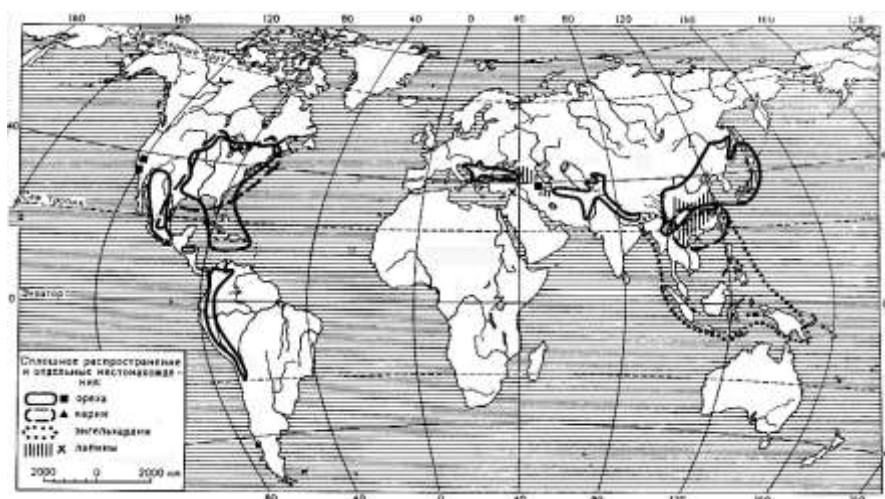


Рисунок 1.1 – Карта ареалов основных родов семейства Ореховые.

Орех грецкий (*Juglans regia* L.) – дерево высотой до 30—35 м и в диаметре до 2 м. Имеет стройный ствол с незначительной кроной, одиночные по длине низкие, достаточно ветвистые с мощной шатровидной кроной. Побеги серозеленого, позже пепельного цвета гладкие, но имеют чечевички. Кора серого цвета в местах с глубокими трещинами [76, 78].

Длина листьев – 20-40 см. Сложный лист состоит из 5-11 листочков (длина 5-10 см) яйцевидной или эллиптической формы с цельным краем, расположенных на коротких черешках. Основание листочков в некоторой

степени неравнобокое, верхушка их заострённая. Листочки в основном голые, немного опушены в углах жилок с нижней стороны [10, 41, 70, 78]. Плод - ложная костянка Форма плодов шарообразная, яйцевидная или эллиптическая. Цвет плодов тёмнозелёный. Диаметр плода от 6 до 8 см. Эндокарпий по структуре круглый или яйцевидный, с 2 гладкими рёбрами и толстой скорлупой [70, 78].

Орех черный (*Juglans nigra* L.) – является древесным представителем, произрастающим в Северной Америке. В высоту и диаметр достигает до 50 м и до 2 м соответственно. Имеет ствол с темно-коричневой корой и глубокими трещинами. Почки голые [23, 33, 47]. Длина листьев 30—60 см. Сложный лист состоит из 13—23 листочков (длина 6—10 см) продолговато-яйцевидной формы. Листочки опушены снизу и расположены на коротких черешках. Плоды по форме шаровидные или грушевидные, не опушены. Диаметр плода до 6,5 см. Ядро ореха съедобное [9, 16, 17].

Орех серый (*Juglans cinerea* L.) – растение древесной формы жизни родом из Северной Америки высотой до 30 м и диаметром до 1 м. Кора серого цвета с крупными бороздками. Побеги и почки опушены.

Длина листьев 50—70 см. Сложный лист состоит из 11—19 листочков со значительной опушенностью. Форма листочков удлинённо-яйцевидная. Плод – костянка. По форме плод удлинённо-яйцевидный, имеющий острую верхнюю часть. Плод достаточно опушен и клеек. Ядро ореха жирное и съедобное .

1.3. Химический состав перспективных видов рода Орех

На данный момент как орех грецкий, так и другие виды вышеуказанного рода, не зарегистрированы в качестве официального РС. Однако их химический состав изучен достаточно хорошо и представлен различными группами БАС [17, 49, 52, 71]. Ведущей группой БАС видов рода Орех являются производные нафтохинонов (юглон и другие), локализующиеся во

всех органах растений рода *Juglans* L. [23, 27, 28, 49]. В коре вида *Juglans regia* L. обнаружены нафтохиноны (юглон, региолон), дубильные вещества, алкалоиды (берберин), стероиды (β -ситостерин), тритерпены (бетулин, бетулиновая кислота); в коре ореха серого обнаружены нафтохиноны (юглон), а в коре ореха черного алкалоиды (югландин), нафтохиноны (юглон), тритерпены [6, 28, 76].

Более подробно представлен химический состав листьев представителей рода Орех (табл. 1,2). В листьях ореха грецкого ведущей группой являются нафтохиноны: юглон, гидроюглона глюкозид, гидроюглон, β -гидроюглон [3, 6, 16, 28, 71, 75].

Довольно широко представлена группа флавоноидов, в частности, кверцетин, авикулярин (кверцетина 3-арабинозид), гиперозид (кверцетина 3-галактозид), кверцитрин (кверцетина 3-рамнозид), кемпферол, югланин (кемпферола 3-арабинозид), антоцианы (производные цианидина), а также группа фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот: галловая, эллаговая, салициловая, *n*-гироксибензойная, ванилиновая, гентизиновая, протокатеховая, хлорогеновая, кофейная, *n*-кумаровая, *n*-гидроксифенилмолочная, феруловая, синаповая [28, 34, 43, 53].

Кроме того, в составе листьев *Juglans regia* L. обнаружены компоненты эфирного масла монотерпеновой и сесквитерпеновой природы: борнилацетат, гумулен, лонгифолен, камфен, γ -кадинен, δ -кадинен, капроновый альдегид, Δ^3 карен, кариофиллен, α -пинен, β -пинен, α -терпинеол, α -фелландрен, хамазулен [17, 28, 44].

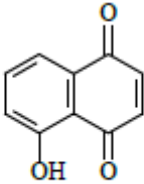
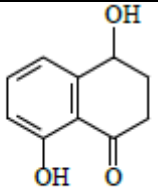
В качестве сопутствующих веществ в листьях орех грецкого обнаружены сапонины, дубильные вещества, кумарины, алкалоиды (югландин), аминокислоты (аспарагиновая кислота, аланин, аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серина, тирозин, треонин, триптофан, цистин, фенилаланин), витамины (аскорбиновая кислота, биотин, инозит, β -каротин, ксантины (виолаксантин, криптоксантин, неоксантин, флавоксантин), лютеин, никотиновая кислота, пантотеновая

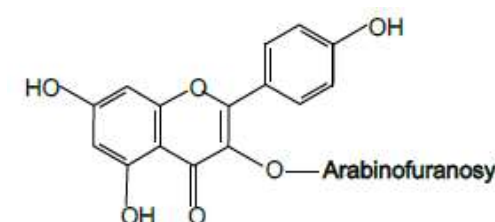

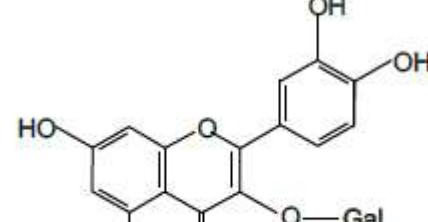
кислота,), макро- и микроэлементы, органические кислоты, полисахариды [28, 75].

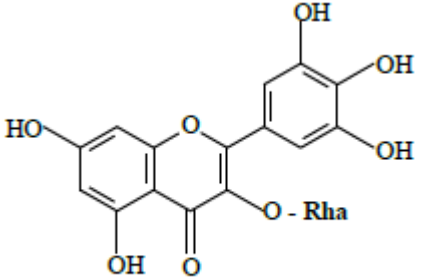
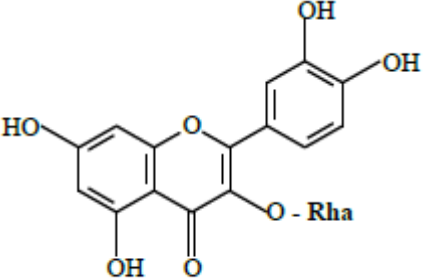
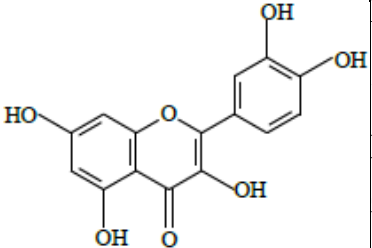
Листья ореха черного содержат нафтохиноны (юглон), флавоноиды (кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид), кверцетин 3-О-альфа-D-рамнофуранозид, астрагалин (кемпферол-3-глюкозид), мирицитрин (мирицетин-3-рамнозид), эфирное масло монотерпеновой природы (гермакрен D, β -кариофиллен, α -пинен), алкалоиды (югландин), витамины (аскорбиновая кислота, каротиноиды, никотиновая кислота, тиамин, пиридоксин, токоферолы), дубильные вещества, органические кислоты, макро- и микроэлементы. Состав листьев ореха серого, по данным литературы, изучен недостаточно [28, 75].

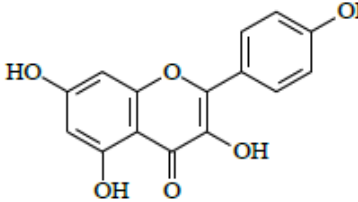
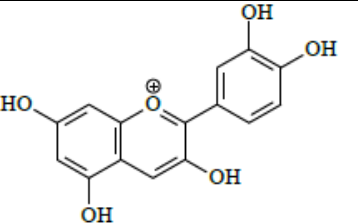
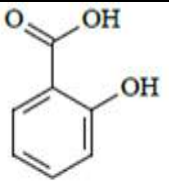
Таблица 1.1

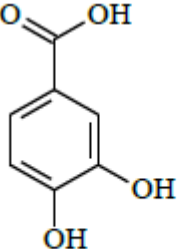
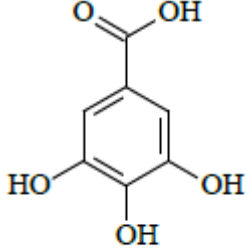
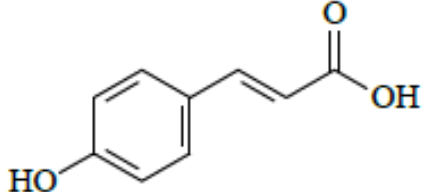
Важнейшие фенольные соединения, описанные для листьев видов рода *Juglans* L.

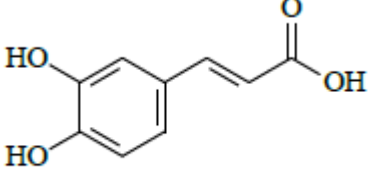
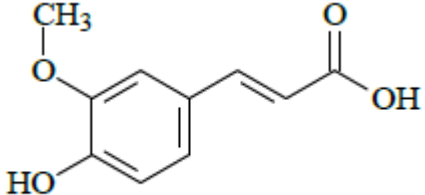
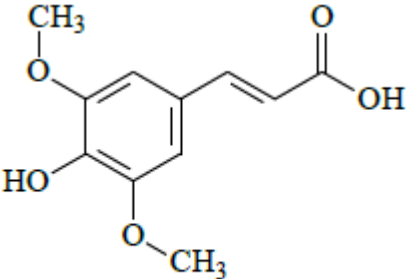
№ п/п	Биологически активные соединения	Основные физико-химические свойства	Растительный источник	Литературный источник
1. Нафтохиноны				
1.	 <p>Юглон</p>	<p>Кристаллическое вещество оранжевого цвета. М.г. 174,15 г/моль. Т. пл. 150155⁰С.</p> <p>Растворим в гексане, не растворим в бензоле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 250, 320, 420.</p>	<p><i>J. regia</i> L. <i>J. nigra</i> L. <i>J. cinerea</i> L.</p>	22, 28, 49, 71
2.	 <p>α-Гидроюглон</p>	<p>Кристаллическое вещество оранжевого цвета. М.г. 158,15 г/моль. Т. пл. 143150⁰С.</p> <p>Растворим в гексане, не растворим в бензоле.</p>	<i>J. regia</i> L.	28, 49
2. Флавоноиды				
2.1. Флавонолы				

3.	 <p>Югланин</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 418,35 г/моль. Т. пл. 143-150⁰С. Мало растворим в воде, растворим в этаноле.</p> <p>УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 268, 352.</p>	<i>J. regia</i> L.	75, 81
4.	 <p>Авикулярин</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 434,35 г/моль. Т. пл. 240-243⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле.</p>	<i>J. regia</i> L.	78, 81, 85
5.	 <p>Гиперозид</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 464.38 г/моль. Т. пл. 231233⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 258, 363.</p>	<i>J. regia</i> L. <i>J. cinerea</i> L.	78, 81, 85

6.	 <p style="text-align: center;">Мирицитрин</p>	<p>Желтое с кремовым оттенком кристаллическое вещество.</p> <p>М.г. 464.37 г/моль. Т. пл. 203-205⁰С.</p> <p>Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 212, 260, 358.</p>	<i>J. nigra</i> L.	68, 71
7.	 <p style="text-align: center;">Кверцитрин</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 448.38 г/моль. Т. пл. 187-189⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 257, 361.</p>	<i>J. regia</i> L. <i>J. nigra</i> L.	68, 71, 83
8.	 <p style="text-align: center;">Кверцетин</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 302.236 г/моль. Т. пл. 316-318⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 258, 374.</p>	<i>J. regia</i> L.	68, 71, 83

9.	 <p>Кемпферол</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 286,23 г/моль. Т. пл. 276–278⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 265, 365.</p>	<i>J. regia</i> L.	68, 71, 83
2.2. Антоцианидины				
10.	 <p>Цианидин</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество. М.г. 287,24 г/моль. Т. пл. 300 -305⁰С. Мало растворим в воде, легко растворим в этаноле.</p>	<i>J. regia</i> L.	71, 83
3. Фенолкарбоновые кислоты				
11.	 <p>Салициловая кислота</p>	<p>Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 138,12 г/моль. Т. пл. 158⁰С. Легко растворим в этаноле, диэтиловом эфире, плохо растворим в воде. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 210, 234, 303</p>	<i>J. regia</i> L.	55, 68, 71, 83

12.	 <p>Протокатеховая кислота</p>	Белое кристаллическое вещество. М.г. 154,12 г/моль. Т. пл. 221 ⁰ С. Практически не растворим в воде, растворим в спирте и эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 240, 294 .	<i>J. regia</i> L.	55, 68, 71
13.	 <p>Галловая кислота</p>	Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 170.12 г/моль. Т. пл. 260 ⁰ С. Растворим в кипящей воде, спирте, трудно растворим в холодной воде. УФСпектр (EtOH, λ max, нм): 275, 305.	<i>J. regia</i> L.	55, 68, 71
4. Фенилпропаноидные метаболиты Производные коричной кислоты				
14.	 <p><i>p</i>-Кумаровая кислота</p>	Белое кристаллическое вещество. М.г. 164,16 г/моль. Т. пл. 207-209 ⁰ С. Трудно растворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире. УФ-спектр (EtOH, λ max, нм): 227, 295, 309.	<i>J. regia</i> L.	58, 61, 64, 75

15.	 <p>Кофейная кислота</p>	<p>Желтое кристаллическое вещество. М.г. 180.16 г/моль. Т. пл. 218-222⁰С. Трудно растворим в воде. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 247, 299, 327.</p>	<i>J. regia</i> L.	58, 61, 64, 75
16.	 <p>Феруловая кислота</p>	<p>Белые или светло-бежевые кристаллы. М.г. 194.19 г/моль. Т. пл. 168-170⁰С. Растворим в горячей воде, этаноле, трудно растворима в эфире. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 242, 292, 324.</p>	<i>J. regia</i> L.	58, 61, 64, 75
17.	 <p>Синаповая кислота</p>	<p>Бесцветные кристаллы без запаха. М.г. 224.21 г/моль. Т. пл. 203-205⁰С. Растворим в горячей воде, этаноле, трудно растворима в эфире. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 235, 260, 300.</p>	<i>J. regia</i> L.	58, 61, 64, 75

Химический состав плодов ореха грецкого представлен нафтохинонами (α -гидроюглон, β -гидроюглон, 1,4-нафтохинон, юглон, 5-глюкозид гидроюглона, менадион, плюмбагин, 2,3-дигидро-5-гидрокси-1,4-нафтохинон, 2,3-дигидро-5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтохинон, 5-гидрокси-3-метил-1,4-нафтохинон, 2,3-диметил-5-гидрокси-1,4-нафтохинон), фенолкарбоновыми кислотами (ванилиновая, галловая, гентизиновая, *n*-гидроксibenзойная, *n*-гидроксифенилмолочная, протокатеховая, салициловая, хлорогеновая, эллаговая), фенилпропаноидными метаболитами (*n*-кумаровая, синаповая, сиреневая, феруловая), флавоноидами (катехины, проантоцианидины), дубильными веществами, компонентами жирного масла, стероидами (β -ситостерин или β ситостерол и его глюкозид – даукостерин), белками, органическими кислотами, полисахаридами, витаминами (аскорбиновая кислота, β -каротин, никотиновая кислота, тиамин, рибофлавин), макро- и микроэлементы. Химический состав плодов ореха черного и ореха серого также изучен недостаточно [3, 5, 8, 28, 32, 52, 58, 87].

Таким образом, на сегодняшний день достаточно глубоко исследован химический состав листьев и плодов ореха грецкого. Степень фитохимической разработанности других представителей рода *Juglans* (кора и листья *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L.) является недостаточной для использования в качестве новых видов лекарственного растительного сырья. Требуется дальнейшее фитохимическое исследование различных видов растительного сырья представителей рода Орех.

1.4. Фармакологические свойства и применение в медицине представителей рода Орех

Разнообразие химического состава, в том числе наличие большого числа фенольных соединений обуславливают широкий спектр фармакологической активности представителей рода Орех (ореха грецкого, ореха черного и ореха серого). В работах по изучению фармакологической активности указанных

выше видов можно выделить следующие направления: исследование противомикробного, противовирусного, противогрибкового, антиоксидантного, противовоспалительного, противоопухолевого, кардио-, нейро-, гепатопротективного, гипополидемического, влияющего на когнитивную функцию эффектов [23, 30]. Рассмотрим некоторые из них далее.

Водные экстракты незрелого жома плодов *J. regia* подавляют рост грамположительных бактерий, при этом золотистый стафилококк был наиболее восприимчивой бактерией с минимальной ингибирующей концентрацией (МИС) 0,1 мг / мл [51].

Юглон, выделенный из ореха грецкого, ингибирует 3 ключевых фермента бактерии *Helicobacter pylori*: цистатион- γ -синтазу (HpCGS), малонилCoA: трансацилазу белка-переносчика ацила (HpFabD) и β -гидроксиацилАССРдегидратазу (HpFabZ) [41].

Гексановый экстракт коры *J. regia* проявляет *in vitro* противомикобактериальную туберкулезную активность с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) 100 мкг/мл [22].

Также была обнаружена антимикробная активность экстракта листьев *J. regia* в отношении пропионовой бактерии акне (*Propionibacterium acnes*), золотистого стафилококка (*S. aureus*) и эпидермального стафилококка (*S. epidermidis*) [161]. Эфирное масло, полученное из листьев *J. regia*, и его основные компоненты (β -пинен, α -пинен, лимонен, кариофиллен) проявляли сильную антибактериальную активность в отношении *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*. [155, 159]. Водные и этанольные экстракты листьев *J. regia* оценивали также и на противовоспалительную активность. При каррагинан-индуцированном отеке задней лапы у мышей только этанольный экстракт *J. regia* проявлял противовоспалительную активность, не вызывая при этом желудочно-кишечных расстройств [29].

Клетки микроглии типа BV-2, обработанные экстрактом *J. regia* перед стимуляцией LPS, показали снижение продукции оксида азота (NO) и экспрессии индуцибельной NO-синтетазы. Также экстракт *J. regia* снижал выработку фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α). Таким образом, сырье грецкого ореха оказывает противовоспалительное действие в микроглии, что может быть актуальным в плане профилактики и лечения нейродегенераций [183]. Водный (2,87 и 1,64 г/кг) и этанольный (2,044 и 1,17 г/кг) экстракты *J. regia* показали антиноцицептивную активность в тестах горячей пластинки; антиноцицептивный эффект, как полагают, действует через рецепторы неопиоидного типа. Также проводили испытания этих экстрактов на противовоспалительную активность, что было показано в тесте на ксилол [37].

Эфирное масло из листьев *J. regia* анализировали на его антиоксидантную активность с использованием 2 различных анализов «*in vitro*»: поглощение 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (DPPH) и гидроксильного радикала. Результаты показали высокую антиоксидантную активность при значениях 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) 34,5 и 56,4 мкг / мл соответственно [55].

На модели окислительного стресса у крыс «*in vivo*», введение экстракта листьев грецкого ореха в дозах от 0,2 до 0,4 г / кг массы тела в течение 4 недель способствовало защите животных от повреждений печени, вызванных четыреххлористым углеродом (CCl₄). Кроме того, в экстракте грецкого ореха выявлено повышенное содержание антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы [27].

Основные флавоноиды, такие как кверцетин-3-рамнозид, кверцетин-3-Оарабинозид, кверцетин-3-ксилозид, производное кемпферол-О-пентозида, кверцетин-3-О-галактозид и кемпферол-О-пентозид, выделенные из листьев *J. regia*, показали значительную радикал-поглощающую активность при снижении уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках RAW264.7. Флавоноиды проявляют потенциальную антиоксидантную активность и могут

быть использованы для регулирования иммунной системы и усиления противоопухолевой активности [73].

Юглон, полученный из хлороформного экстракта корней *J. regia*, и его синтетические триаколильные аналоги показали цитотоксическую активность против различных видов раковых клеток человека, находящихся в легких (NCI-N322 и A549), молочных железах (T47D), коже (A-431), толстой кишке (Colo-205 и HCT-116) и простате (PC-3 и DU-145). Синтетические производные триаколила обладают высоким уровнем цитотоксичности, но этот эффект достаточно специфичен именно для раковых клеток легких. Некоторые аналоги даже продемонстрировали более высокую активность против видов раковых клеток NCI-N322 и A549, чем выпускаемый противораковый препарат BEZ235 (двойной ингибитор фосфоинозитид-3-киназы и mTOR) [72].

Аналогичным образом, применение жома незрелых плодов грецкого ореха и экстракта из корня *J. regia* способствовало индукции апоптоза в раковых клетках молочных желез человека MDA-ME231 и в раковых клетках предстательной железы PC-3 путем повышения экспрессии каспазы 3, каспазы 8 и гена Вах и подавления экспрессии гена Bcl-2 [10, 35].

Кроме вышеуказанных видов фармакологической активности, для *Juglans regia* выявлены также гепатопротекторные свойства [66]. Проводилось исследование, в котором мышам давали с пищей экзокарпий плодов грецкого ореха (WP, 200 мг/кг), представляющий собой тонкую кожицу вокруг ядра ореха. При этом оказалось, что при его употреблении значительно уменьшаются уровни сывороточной аспаратаминотрансферазы (AST) и аланинаминотрансферазы (ALT) в печени, поврежденной четыреххлористым углеродом, однако не оказывает такого же эффекта при повреждении печени D-галактозамином (GalN). Такие компоненты, как теллимаграндины I, II и ругозин С, снижали повреждающую активность тетрахлорметана на гепатоциты, тогда как теллимаграндин I и 2,3-

Огексагидроксидифеноилглюкоза уменьшали повреждение, вызванное D-GalN.

Экстракт листьев грецкого ореха (в диапазоне от 0,2 до 0,4 г / кг массы тела) проявил защитную активность в отношении крыс с поврежденной тетрахлорметаном печенью за счет снижения сывороточных уровней ALT, AST и щелочной фосфатазы. Юглон, выделяемый из грецких орехов, защищает печень от HFD-индуцированного повреждения (повреждение, вызываемое диетой с высоким содержанием жиров) у крыс. Данный эффект осуществляется путем торможения активности воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL6, посредством подавления toll-подобного рецептора и активации действия NF- κ B [53].

Кроме того, согласно литературным данным сообщалось о раздражении и гиперпигментации кожи, связанных с местным применением грецкого ореха. Хотя и сообщается, что у морских свинок грецкий орех является сильным сенсibilизатором, у людей контактная аллергия встречается достаточно редко [36].

У мышей полумаксимальная летальная доза (LD50) при внутрибрюшинном введении водного и этанольного экстракта листа *J. regia* составляла 5,5 и 3,3 г/кг соответственно [37].

Согласно исследованиям Calabro и соавторов [15], юглон индуцировал эриптоз (суицидальную гибель эритроцита), увеличивая содержание церамида и снижая уровень энергии и блокируя активацию протеинкиназы C (PKC). В этом исследовании происходило значительное снижение прямого рассеяния эритроцитов в течение 24 ч при обработке эритроцитов человека юглоном в дозе 5 мкмоль/л. Кроме того, юглон в дозах от 1 до 5 мкмоль/л значительно повышал процент связывания аннексина V. Аналогично, в дозе 5 мкмоль/л юглон значительно уменьшал концентрацию АТФ в эритроцитах, а также увеличивал содержание церамида на поверхности эритроцитов [15].

Несмотря на широкий спектр фармакологической активности, виды рода Орех используются в официальной медицине небольшого количества стран.

В основном указанные растения используются в народной медицине. В традиционной медицине Китайской Народной Республики листья ореха грецкого применяются в качестве средства, обладающего противовоспалительной, противомикробной, вяжущей, противовирусной, гипосенсибилизирующей и тонизирующей активностями [45, 75]. Сырье ореха серого в народной медицине Канады применяется как антимикробное средство [30].

На данный момент на территории РФ зарегистрированы 2 лекарственных растительных препарата, растительное сырье ореха грецкого – «Тонзилгон Н» и «Югланэкс» [13, 54]. Немецкий препарат «Тонзилгон Н» представляет собой водно-спиртовой экстракт корней алтея, цветков ромашки, травы хвоща, листьев грецкого ореха, травы тысячелистника, коры дуба, а также травы одуванчика лекарственного, и применяется в качестве антисептического, противовоспалительного средства для терапии острых и хронических заболеваний верхних дыхательных путей (тонзиллит, фарингит, ларингит), а также профилактики осложнений при респираторных вирусных инфекциях [13, 54]. «Югланэкс» выпускается в форме жидкого экстракта плодов грецкого ореха для приема внутрь [13, 54]. Обладает капилляроукрепляющим, вентонизирующим, антиоксидантным, противовоспалительным эффектом и применяется в составе комплексной терапии хронических заболеваний вен [13, 54].

Из растительного сырья *Juglans regia* L. экспериментально разработаны экстракты «Чеблин», «Чеблин СК-1», а также «Годикамп», обладающие антипаразитарной, гепатопротекторной и иммуномодулирующей активностью и применяющиеся при терапии сифачиоза, энтеробиоза, аскаридоза и гетеракидоза [60, 82].

Растительное сырье рода *Juglans* L. активно применяется в гомеопатии, в связи с известным иммуномодулирующим, противогрибковым, антимикробным, антипаразитарным, антиоксидантным и общеукрепляющим действием данных растений [33]. Используют гомеопатические суппозитории

на основе маслянного экстракта околоплодника ореха черного [69]. В Республике Молдова производят фитопрепарат «Nucina», в состав которого включены листья *Juglans regia* L.. Указанный препарат оказывает антибактериальное и противогрибковое действие при поражениях полости рта, глотки, дыхательных путей [83].

БАД Е.П. Корненой, содержащий порошок из листьев ореха грецкого, обладает превентивными свойствами при йодной недостаточности, а также гепатопротекторной, гиполипидемической, гипохолестеринемической, гипогликемической, антиоксидантной, антитоксической активностью.

Выводы к разделу 1

1. Растительное сырье представителей рода Орех (*Juglans* L.) является перспективным для использования в медицинской и фармацевтической практике.

2. Ведущей группой БАС сырья видов рода Орех являются нафтохиноны, представленные производными юглона. Юглон в качестве целевого агента содержится во всех видах растительного сырья представителей вышеуказанного рода. Химический состав также отмечается второй группой соединений – флавоноиды (югланин, авикулярин, гиперозид, кверцетин, кемпферол. В сырье содержатся сопутствующие компоненты: фенолкарбоновые кислоты, фенилпропаноиды, дубильные вещества, витамины и эфирное масло.

3. Широкий состав биологически активных соединений видов растительного сырья рода *Juglans* L. обуславливает разнообразие его фармакологических свойств. Анализ работ отечественных и зарубежных ученых позволил выявить антимикробное, противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое, гепатопротекторное действие ореха грецкого, ореха черного и ореха серого, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения видов вышеуказанного рода.

4. В результате анализа литературных источников относительно вопросов стандартизации, выявлена противоречивость в подходах к контролю качества растительного сырья представителей рода Орех. Указанное обстоятельство свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования химического состава сырья и разработки унифицированных методов стандартизации сырья видов рода Орех.

5. Отсутствие данных относительно нормативной документации в области контроля качества указанных видов сырья ограничивает его применение в фармацевтической и медицинской практике. В этой связи актуально проведение комплексных фармакогностических исследований, направленных на создание проектов фармакопейной статьи для новых видов растительного сырья.

РАЗДЕЛ 2. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ КОРЫ И ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ЧЕРНОГО (*JUGLANS NIGRA* L.)

2.1. Разработка методик качественного анализа коры и листьев ореха черного методом ТСХ и спекрофотометрии

Проведенное предварительного фармакогностического исследования позволило выделить и идентифицировать диагностически значимое соединение коры ореха черного – мирицитрин. Его зоны адсорбции и обнаруживаются во всех хроматограммах образцов извлечений коры ореха черного (рис. 2.1). Поэтому в качестве внутреннего свидетеля нами предлагается использовать стандартный образец мирицитрина.

При исследовании извлечений из коры ореха черного методом тонкослойной хроматографии установлена хроматографическая зона адсорбции на уровне стандартного образца мирицитрина ($R_f = 0,4$). После процедуры детектирования физическими (характер свечения в ультрафиолетовом свете) и химическими (ДСК и спиртовой раствор $AlCl_3$) методами идентифицируется соединение флавоноидной природы, которое по подвижности и окраске соответствует СО мирицитрина (рис. 2.1).

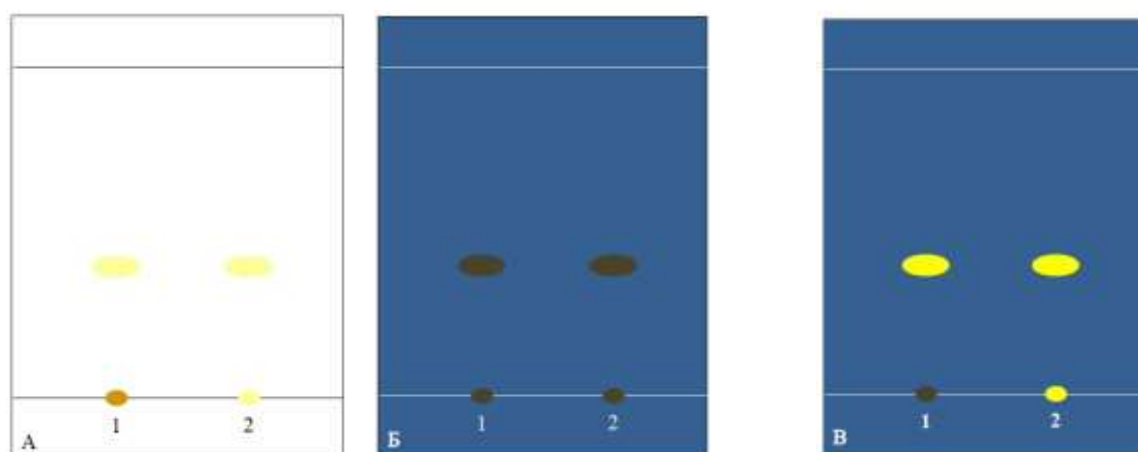


Рисунок 2.1 – Схема хроматограммы анализа водно-спиртовых извлечений коры ореха черного в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете при

длине волны 365 нм; В - детекция детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия ($AlCl_3$)

Обозначения: 1 – 80% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО мирицитрина.

Методика определения основных групп биологически активных соединений (флавоноидов). Испытуемый раствор коры *Juglans nigra* L., спиртовой раствор СО мирицитрина объемом 20 мкл с помощью стеклянной микропипетки наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом (силикагель) и закрепляют спиртом этиловым 96 %. Пластинку с нанесенными пробами просушивают, погружают в хроматографическую камеру с элюентной системой хлороформ: этанол: вода (28:15:2) и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюентной системы 80-90% длины пластинки, ее извлекают из хроматографической камеры, высушивают до удаления следов элюентов и просматривают в видимом и УФ-свете при длине волны 365 нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Детектирование хроматографических пластин представлено в таблице 2.1.

Предварительное фармакогностическое исследование листьев ореха черного позволило выделить и идентифицировать два диагностически значимых соединений листьев ореха черного – мирицитрин и кверцитрин. Зоны адсорбции указанных индивидуальных веществ должны обнаруживаться в хроматограммах образцов извлечений листьев ореха черного (рис. 2.2). Поэтому в качестве веществ-свидетелей мы предлагаем использовать СО мирицитрина и СО кверцитрина.

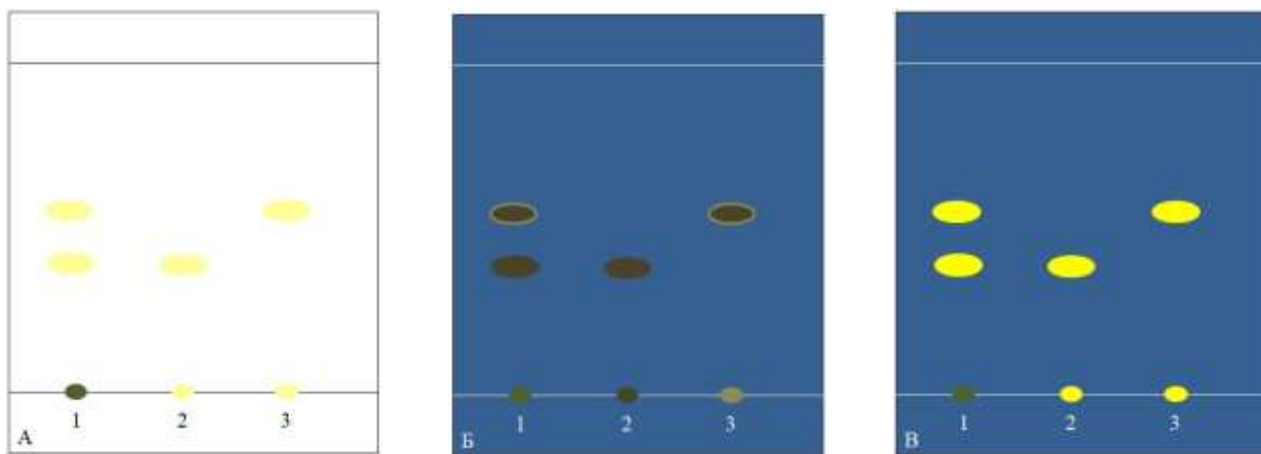


Рисунок 2.2 – Схема хроматограммы анализа водно-спиртового извлечения листьев ореха черного в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм; В - детекция детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия (AlCl_3)

Обозначения: 1 – 80% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО мирицитрина, 3 – СО кверцитрина.

При исследовании извлечений из листьев ореха черного методом тонкослойной хроматографии установлены хроматографические зоны адсорбции на уровне стандартных образцов мирицитрина ($R_f = 0,4$) и кверцитрина ($R_f = 0,65$). После процедуры детектирования физическими (характер свечения в ультрафиолетовом свете) и химическими (ДСК и спиртовой раствор AlCl_3) методами идентифицируются биологически активные соединения флавоноидной природы, которые по подвижности и окраске совпадают со стандартными образцами мирицитрина и кверцитрина.

Методика определения основных групп биологически активных соединений (флавоноидов). Испытуемый раствор листьев *Juglans nigra* L., спиртовые растворы СО мирицитрина и кверцитрина объемом 20 мкл с помощью стеклянной микропипетки наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом (силикагель) и закрепляют спиртом этиловым 96 %. Пластинку с нанесенными пробами просушивают, погружают в хроматографическую камеру с элюентной системой хлороформ: этанол: вода (28:15:2) и хроматографируют восходящим способом. После

достижения фронтом элюентной системы 80-90% длины пластинки, ее извлекают из хроматографической камеры, высушивают до удаления следов элюентов и просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. Затем пластинку обрабатывают 3% спиртовым раствором $AlCl_3$ и просматривают в УФ-свете при $\lambda=365$ нм. Также пластинки обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Детектирование хроматографических пластин представлено в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Детектирование основных зон адсорбции при анализе растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L.

Вид анализируемого образца	R _f	Детекция в видимом свете	Детекция в УФ-свете (λ=365 нм)	Детекция AlCl ₃ и в УФ-свете (λ=365 нм)	Детекция раствором диазобензолсульфоокислоты
Кора ореха черного Хроматографическая зона № 1	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
Листья ореха черного Хроматографическая зона № 1 Хроматографическая зона № 2	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
	0,65	Желтая	Темно-коричневая со светлой каймой	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
СО мирицитрина	0,40	Желтая	Темно-коричневая	Ярко-желтая	Желто-оранжевая
СО кверцитрина	0,65	Желтая	Темно-коричневая со светлой каймой	Ярко-желтая	Желто-оранжевая

Дополнительно для определения подлинности сырья рекомендовано проведение спектрофотометрического анализа. Испытуемые растворы извлечений коры и листьев ореха черного фотометрировали и устанавливали максимумы поглощения (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Установленные значения максимумов поглощения испытуемых растворов извлечений коры и листьев ореха черного

Условия фотометрии	Кора ореха черного	Листья ореха черного
Прямой метод	$\lambda_{max1} = 270 \pm 2$ нм; $\lambda_{max2} = 360 \pm 2$ нм	$\lambda_{max1} = 270 \pm 2$ нм; $\lambda_{max2} = 356 \pm 2$ нм
Дифференциальный метод	$\lambda_{max} = 416 \pm 2$ нм	$\lambda_{max} = 412 \pm 2$ нм

Таким образом, характер спектров поглощения извлечений коры и листьев ореха черного позволяет подтвердить полученные данные тонкослойной хроматографии и использование в качестве стандартных образцов кверцитрина и мирицитрина при разработке методик количественного анализа.

2.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного за прототип была принята методика Чалештори и соавторов. Анализ содержания флавоноидов в листьях *Juglans regia* L. осуществлялся в пересчете на рутин при $\lambda = 415$ нм, пробоподготовку сырья проводили путем экстрагирования 70 % этиловым спиртом [77].

Опираясь на указанную методику, были определены основные параметры пробоподготовки. Оптимальные условия экстракции флавоноидов

из коры ореха черного методики количественного определения суммы флавоноидов включают: экстрагент – 80 % этиловый спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:30; время экстракции на кипящей водяной бане – 60 минут, степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 2.3).

Таблица 2.3

Влияние условий экстракции на степень извлечения суммы флавоноидов из коры *Juglans nigra* L.

№ п.п.	Экстрагент	Соотношение сырья:экстрагент	Время экстракции, мин	Степень измельчения сырья, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин и абсолютно сухое
Выбор экстрагента					
1.	40% этиловый спирт	1:30	60	2	2,49±0,20
2.	50% этиловый спирт	1:30	60	2	2,67±0,23
3.	60% этиловый спирт	1:30	60	2	2,78±0,29
4.	70% этиловый спирт	1:30	60	2	2,95±0,26
5.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,09±0,27
6.	90% этиловый спирт	1:30	60	2	2,87±0,24
7.	96% этиловый спирт	1:30	60	2	2,68±0,25
Определение времени экстракции					
8.	80% этиловый спирт	1:30	30	2	2,75±0,22
9.	80% этиловый спирт	1:30	45	2	2,93±0,24
10.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,14±0,25
11.	80% этиловый спирт	1:30	90	2	2,95±0,28
12.	80% этиловый спирт	1:30	120	2	2,83±0,26

Соотношение «сырье: экстрагент»					
13.	80% этиловый спирт	1:20	60	2	2,98±0,27
14.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,12±0,23
15.	80% этиловый спирт	1:50	60	2	3,06±0,28
Степень измельчения сырья					
16.	80% этиловый спирт	1:30	60	1	2,85±0,22
17.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,17±0,27
18.	80% этиловый спирт	1:30	60	3	2,79±0,29

Методика количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного.

Аналитическую пробу коры *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл спирта этилового 80 % концентрации. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на 1 час. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 1 часа. После охлаждения в течение 30 мин полученного извлечения, колбу закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое при необходимости восполняют экстрагентом до первоначального значения. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная полоса (раствор А испытуемого извлечения). Испытуемый раствор: 1,0 мл раствора А испытуемого 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 % концентрации (раствор Б испытуемого извлечения). Оптическую плотность

раствора Б испытуемого извлечения измеряют на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого извлечения (1:30), доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Примечание: *Приготовление раствора мирицитрина-стандартного образца.* Около 0,02 г (точная навеска) мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл 96 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы в течение 30 минут, доводят объем раствора 96 % этиловым спиртом до метки (раствор А мирицитрина). 1,0 мл раствора А раствора СО мирицитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б мирицитрина). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А мирицитрина доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор сравнения Б мирицитрина).

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

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 50 * 1 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО мирицитрина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО мирицитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Для целей количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин при отсутствии стандартного образца мирицитрина было экспериментально определено значение показателя экстинкции

(удельный показатель поглощения). Его величина при длине волны 416 нм составляет 432.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО мирицитрина, г;

432 – удельный показатель поглощения ($E^{1\text{см}}$) СО мирицитрина при 416 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Таблица 2.4

Содержание суммы флавоноидов в образцах коры *Juglans nigra* L.

№ п/п	Номер образца	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на мирицитрин
1.	Образец 1	3,09±0,21
2.	Образец 2	2,94±0,24
3.	Образец 3	3,17±0,27
4.	Образец 4	3,02±0,26

С использованием методики нами проанализирован ряд образцов коры ореха черного (табл. 2.4). Определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре ореха черного варьирует от 2,94 % до 3,17 %.

2.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин листьях ореха черного

Указанная ранее методика количественного определения суммы флавоноидов также была модифицирована и для листьев ореха черного.

Для растительного сырья листьев *Juglans nigra* L. были определены основные параметры пробоподготовки. Оптимальные условия экстракции флавоноидов из листьев *Juglans nigra* L. методики количественного определения суммы флавоноидов включают: экстрагент – 80 % этиловый

спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:30; время экстракции на кипящей водяной бане – 30 мин, степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 2.5).

Таблица 2.5

**Влияние условий экстракции на степень извлечения суммы
флавоноидов из листьев *Juglans nigra* L.**

№ п.п.	Экстрагент	Соотноше нее сырье :экстаген т	Время экстракции, мин	Степень измельчен ия, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин н абсолютно сухое сырье
Выбор экстрагента					
1.	40% этиловый спирт	1:30	60	2	2,75±0,28
2.	50% этиловый спирт	1:30	60	2	2,82±0,26
3.	60% этиловый спирт	1:30	60	2	2,91±0,25
4.	70% этиловый спирт	1:30	60	2	3,02±0,27
5.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	3,11±0,25
6.	90% этиловый спирт	1:30	60	2	3,04±0,29
7.	96% этиловый спирт	1:30	60	2	2,85±0,23
Определение времени экстракции					
8.	80% этиловый спирт	1:30	15	2	2,86±0,24
9.	80% этиловый спирт	1:30	30	2	3,24±0,26
10.	80% этиловый спирт	1:30	45	2	3.05±0,28
11.	80% этиловый спирт	1:30	60	2	2,86±0,25
12.	80% этиловый спирт	1:30	90	2	2,75±0,21
13.	80% этиловый спирт	1:30	120	2	2,65±0,27
Соотношение «сырьё: экстрагент»					
14.	80% этиловый спирт	1:20	30	2	3,04±0,26

15.	80% этиловый спирт	1:30	30	2	3,22±0,22
16.	80% этиловый спирт	1:50	30	2	3,15±0,28
Степень измельчения сырья					
17.	80% этиловый спирт	1:30	30	1	3,10±0,25
18.	80% этиловый спирт	1:30	30	2	3,28±0,27
19.	80% этиловый спирт	1:30	30	3	3,05±0,23

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха черного. Аналитическую пробу листьев *Juglans nigra* L. измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. В термостойкую коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), прибавляют 30 мл спирта этилового 80 % концентрации. Колбу закрывают мепробкой и взвешивают на тарированных весах с погрешностью ±0,01 г и оставляют на 1 час. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 3про 0 минут. После охлаждения в течение 30 мин полученного извлечения, колбу закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое при необходимости восполняют экстрагентом до первоначального значения. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр красная полоса (раствор А испытуемого извлечения). Испытуемый раствор: 1,0 мл раствора А испытуемого 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 % концентрации (раствор Б испытуемого извлечения). Оптическую плотность раствора Б испытуемого извлечения измеряют на спектрофотометре при длине волны 416 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор,

состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого извлечения (1:30), доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

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

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 50 * 1 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО мирицитрина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО мирицитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Для целей количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин при отсутствии стандартного образца мирицитрина было экспериментально определено значение показателя экстинкции (удельный показатель поглощения). Его величина при длине волны 416 нм составляет 432.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО мирицитрина, г;

432 – удельный показатель поглощения ($E^{1\text{см}}$) СО мирицитрина при 416 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов листьев ореха черного (табл. 16). Определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях ореха черного от 3,02 % до 3,28 %.

Таблица 2.6

Содержание суммы флавоноидов в образцах листьев *Juglans nigra* L.

№ п/п	Номер образца	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на мирицитрин
1.	Образец 1	3,17±0,26
2.	Образец 2	3,02±0,23
3.	Образец 3	3,28±0,27
4.	Образец 4	3,11±0,25

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о рациональности контроля качества коры и листьев ореха черного с помощью методики определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин методом спектрофотометрии при аналитической длине волны 416 нм.

2.4. Изучение динамики накопления биологически активных соединений в листьях ореха черного

Под влиянием условий среды содержание БАС на протяжении вегетационного периода растения может постоянно колебаться. Существует необходимость в исследовании определения уровня содержания и динамики накопления действующих веществ в изучаемом сырье для создания рекомендаций по рациональной заготовке лекарственного растительного сырья.

Исследовали образцы листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.), собранные во время вегетационного периода (май-сентябрь) в Ботаническом саду. Для анализа получали водноспиртовые испытуемые извлечения листьев *Juglans nigra* L., а также СО мирицитрина и оценивали содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях ореха черного в условиях дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda = 416$ нм.

Результаты произведенного анализа динамики накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного представлены в таблице 2.7. Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что количество флавоноидов в листьях *Juglans nigra* L. варьирует в течение вегетационного периода. Наибольшая концентрация указанной группы БАС в листьях *Juglans nigra* L. вегетационного периода каждого из трех лет приходится на конец мая и начало июня. Динамика накопления суммы флавоноидов в листьях ореха черного за весь период исследования представлена на рисунке 2.3.

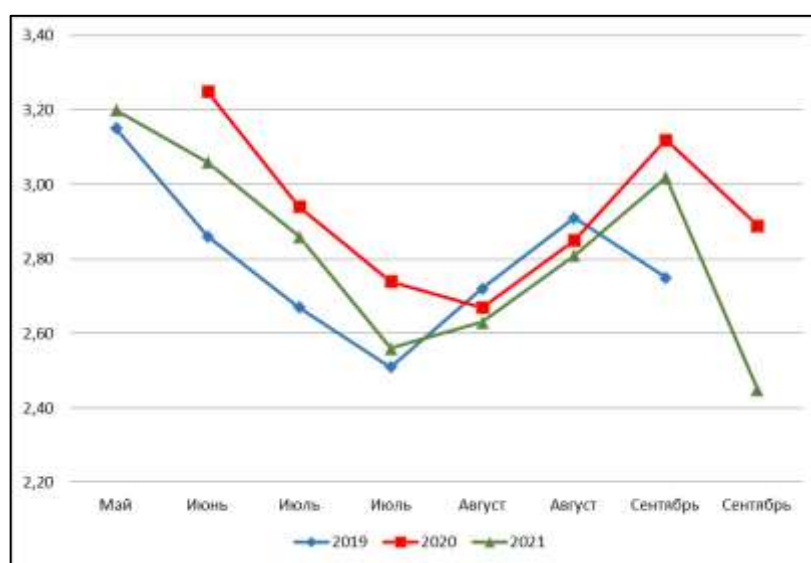


Рисунок 2.3 – Динамика накопления флавоноидов в листьях *Juglans nigra* L. за весь период исследования

Таким образом, сбор листьев ореха черного рекомендуется проводить в период конца мая и начала июня.

Таблица 2.7

**Результаты определения динамики накопления суммы
флавоноидов в листьях ореха черного в течение вегетационного
периода**

Наименование образца (месяц)	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на мирицитрин, %
Май	3,20±0,27
Июнь	3,06±0,29
Начало Июля	2,86±0,23
Конец Июля	2,56±0,24
Середина Августа	2,63±0,26
Конец Августа	2,81±0,24
Середина Сентября	3,02±0,27

Выводы к разделу 2

1. Разработаны методики определения мирицитрина и кверцитрина в водноспиртовых извлечениях коры и листьев *Juglans nigra* L. методом хроматографии в тонком слое сорбента. В качестве веществ-свидетелей рекомендовано использовать стандартные образцы мирицитрина и кверцитрина.

2. Установлены максимумы поглощения извлечений коры и листьев ореха черного. Для коры и листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии максимумы поглощения определены при длине волны 416±2 нм и 412±2 нм соответственно, соответствующие максимуму поглощения раствора СО мирицитрина.

3. Разработаны методики количественной оценки содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda=416\pm 2$ нм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 2,94 % до 3,17 %, и от 3,02 % до 3,28 % соответственно.

4. Содержание мирицитрина в коре *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 3,08 % до 3,14 %. Содержание мирицитрина и кверцитрина в листьях *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 2,58 % до 2,67 % и 1,36 % до 1,45 % соответственно.

5. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. не менее 2,5 % и не менее 3,0 % соответственно. Введен числовой показатель содержания мирицитрина и кверцитрина для указанных видов сырья: мирицитрина не менее 2,0 % и 1,5 % для коры и листьев соответственно; кверцитрина не менее 1,0 % для листьев *Juglans nigra* L.

РАЗДЕЛ 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЫРЬЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *JUGLANS L.*

Одним из начальных этапов контроля качества растительного сырья является определение его доброкачественности методами морфологоанатомического анализа. Целью исследования является возможность отдельно диагностировать целевой вид сырья и примесных видов. Данный метод диагностики растительного сырья является одним из ключевых в фармацевтическом анализе [79].

В литературных источниках содержится информация о применении в официальной и народной медицине перспективных морфологических органов РС видов рода Орех – коры, листьев и околоплодников [18, 25, 33, 35 40]. В Фармакопею Китайской Народной Республики 2020 года включена ФС на плоды ореха грецкого, в которой находится раздел об идентификации плодов по морфолого-микроскопическим признакам. В нашей стране отсутствует нормативная документация, официально регламентирующая качество РС. По литературным данным известно, что зарубежные и отечественные ученые активно проявляли интерес к морфолого-анатомическому исследованию РС представителей рода Орех. В литературе описаны внешние и анатомо-микроскопические признаки листьев [20, 28, 34], коры [19, 28] и околоплодников *Juglans L.* [7, 21, 55]. Данной информации недостаточно для морфолого-анатомической характеристики каждого вида в отдельности.

Вопрос подтверждения подлинности РС представителей рода Орех основывается лишь на морфолого-гистологических особенностях растений, поэтому остается актуальным направлением. Люминесцентный микроскопический анализ как один из современных и перспективных методов подтверждения подлинности РС позволяет детектировать локализацию вторичных метаболитов, имеющих диагностическое значение [12, 79].

Для включения растительного сырья видов рода Орех в Государственную Фармакопею РФ необходимо дополнить уже существующие результаты морфолого-анатомического анализа в целях проектов Фармакопейной статьи «Ореха черного кора», «Ореха черного листья» в части «Микроскопические признаки».

В настоящей главе представлены результаты изучения морфологоанатомических особенностей диагностикиткору и листьев ореха плода черного с использованием люминесцентной микроскопии.

3.1. Морфолого-анатомическое исследование коры ореха черного (*Juglans nigra* L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии

Учеными из Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета были разработаны основные характеристики подлинности коры видов рода *Juglans*, в том числе и ореха черного - *Juglans nigra* L [19, 28]. Установлено, что кора ореха черного по внешним признакам представляет собой трубчатые, желобоватые или плоские кусочки длиной коры до 15 см и шириной 2-3 см.

Наружная поверхность беда коры темносерого цвета, грубо шероховатая с крупными чечевичками и трещинами. С внутренней стороны кора светло-желтая, почти белая. На изломе кора ровная не ворсинистая. По внешним признакам отличается от других видов коры наличием сильно шероховатой наружной поверхности с трещинами, более светлой внутренней стороны [19, 28].



Рисунок 3.1 – Внешний вид коры рода *Juglans* L.: А – кора ореха черного (*Juglans nigra* L.); Б – кора ореха грецкого (*Juglans regia* L.); В – кора ореха серого (*Juglans cinerea* L.).

На поперечном срезе диагностируется достаточно развитая перидерма. Обнаруживается тонкий пробковый слой от темно-коричневого дочерного цвета с клетками неправильной формы и фрагментами отшелушивающейся пробки прошлого года. При рассмотрении пробковой ткани могут диагностироваться особые образования – чечевички. За счет чередования листьев сердцевинных лучей и твердого и мягкого круга луба в коровой части можно легко визуализировать зону флоэмы (от камбия к периферии). В области чередования твердого и мягкого круга луба отчетливо видны группы лубяных рво дволокон, клеточные стенки которых при дневном свете желтого цвета. Стенки лубяных волокон активно толстые, слоистые, одревесневшие. Во вторичной коре расположены одно-трехрядные сердцевинные лучи; встречаются группы склеренхимных клеток с утолщенными одревесневшими слоистыми стенками. Основная паренхима коры мелкоклеточная. Протопласты клеток пигментированы в бурый, светло-желтый цвет. В клетках паренхимы, особенно первичной, выделяются фрагменты механической ткани - брахисклерииды, и скопления друз оксалата кальция звездчатой формы [19, 28].

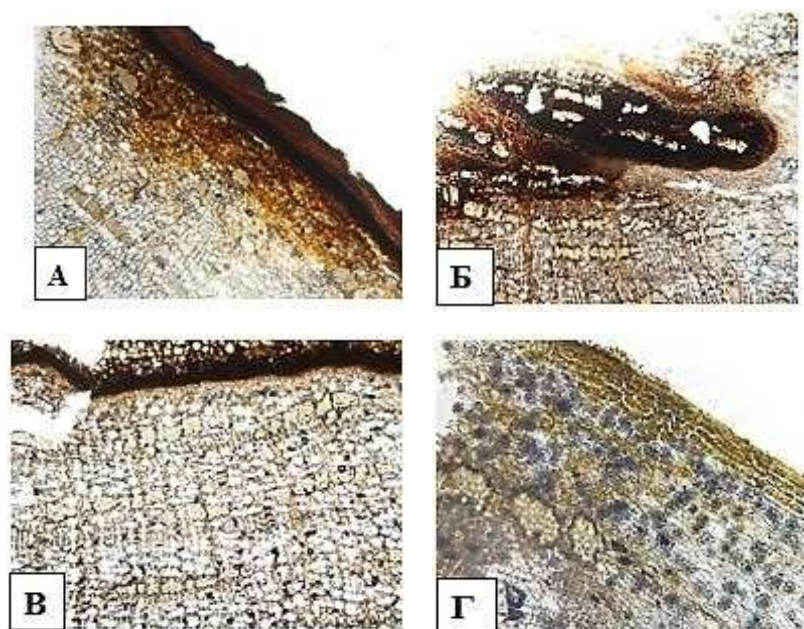


Рисунок 3.2 – Анатомическое строение коры ореха черного: А – поперечный срез – перидерма коры (x 40); Б – фрагмент пробки (феллемы) – поперечное сечение (x 40); В – фрагмент лубяной части коры (x 40); Г – фрагмент основной паренхимы коры ореха черного (x 40).

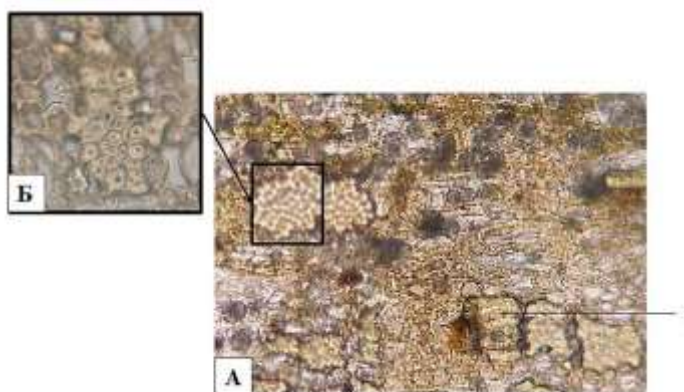


Рисунок 3.3 – Анатомическое строение коры ореха черного: А – (x100); Б – группы склеренхимных клеток на поперечном срезе (x400).

Обозначение: 1 – брахисклереиды

На первом этапе основного исследования с использованием метода люминесцентной микроскопии проводилось изучение внешнего вида кристаллов юглона, содержащихся в коре ореха черного по литературным данным, а также

некоторых соединений вдой флавоноидной структуры при дневном свете, а также с использованием УФ-света.

Анализ СО юглона показал, что в видимом свете его кристаллы обладают желтовато-оранжевой окраской . При облучении образца соединения УФ-светом с длиной волны 360 нм и 420 нм юглона обладают более ярким оранжевым цветом люминесценции.

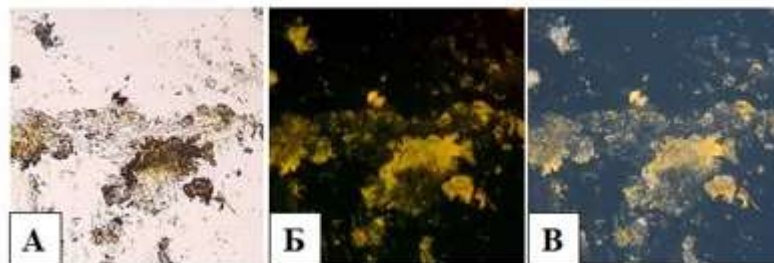


Рисунок 3.4 - Исследование внешнего вида кристаллов юглона: А - дневной свет; Б - облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В — облучение УФ-светом $\lambda=360$ нм.

Предварительному микролюминесцентному анализу также подвергались пробы СО флавоноидов: мирицитрина, кемпферола, кверцетина и кверцитрина. Отмечено, что монозидные формы флавонолов (мирицитрин, кверцитрин) в УФ-свете при длине волны 420 нм люминесцируют ярко-желтым цветом, в отличие от агликонов. При 360 нм мирицитрин обладает желтым свечением, а кверцитрин – оранжевым. Кемпферол в области видимого спектра при $\lambda = 420$ нм имеет зелёно-желтое свечение, а кверцетин имеет оранжевую люминесценцию. При $\lambda = 360$ нм кемпферол люминесцирует зеленым цветом; кверцитрин обладает желтым свечением. В результате микроскопического исследования установлено, что люминесценция исследуемых кристаллов флавоноидов наиболее активная при облучении лампой с длиной волны 360 нм.

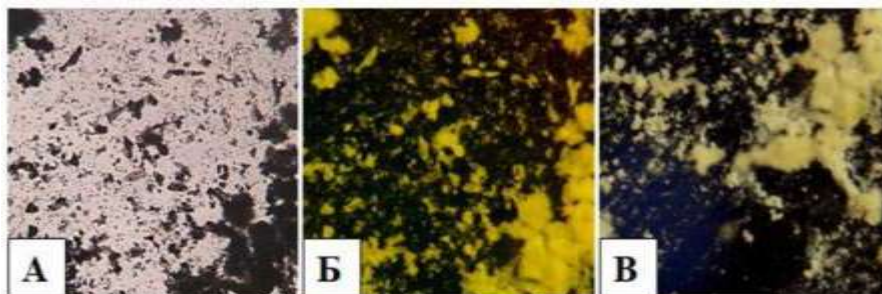


Рисунок 3.4 - Исследование внешнего вида кристаллов мирицитрина: А - дневной свет; Б - облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В - облучение УФ-светом $\lambda=360$ нм.

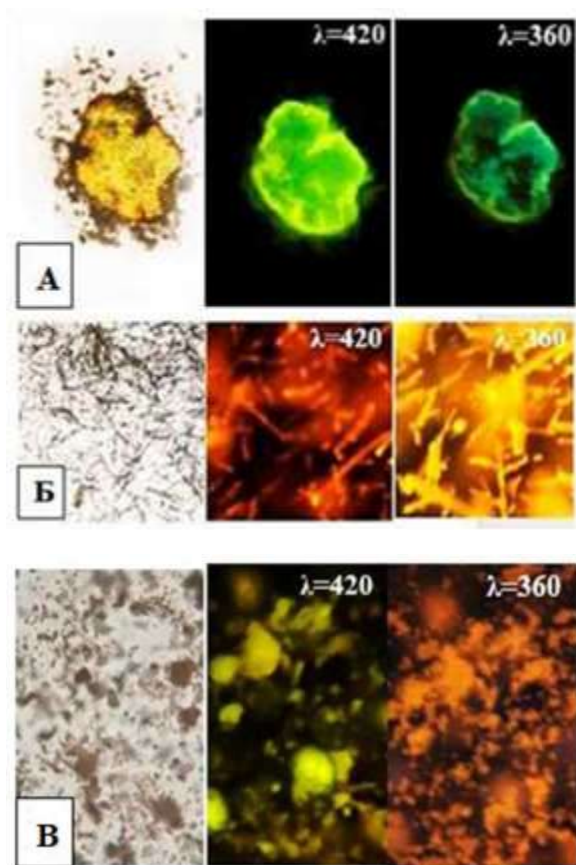


Рисунок 3.5 - Исследование внешнего вида кристаллов флавоноидов под микроскопом: А - кемпферол; Б - кверцетин; В - кверцитрин.

Обозначения: дневной свет, облучение УФ-светом с $\lambda=420$ нм, облучение

На дальнейшем этапе работы оценивалось свечение различных анатомических объектов коры ореха черного. В частности, при облучении среза УФ-светом с $\lambda = 360$ нм видно яркое голубое свечение зоны пробки и твердого луба.

В области чередования твердого и мягкого луба отчетливо видны группы лубяных волокон, клеточные стенки которых при дневном свете желтого цвета. При облучении их УФ-светом с длиной волны 360 нм они люминесцируют светло-голубым цветом за счет наличия в стенках лигниновых структур, а при облучении светом с $\lambda = 420$ нм стенки лубяных волокон люминесцируют желтым, что также характерно для лигнина.

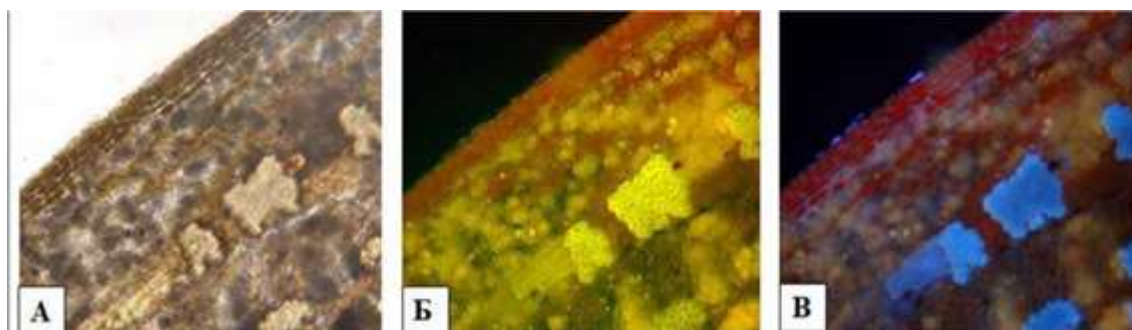


Рисунок 3.6 - Кора ореха черного - поперечное сечение (x40).

Обозначения: А - дневной свет; Б - облучение УФ-светом $\lambda=420$ нм; В - облучение УФ-светом 360 нм.

При ближайшем рассмотрении (на $\times 400$) на поперечном срезе объекта виден бурый пробковый слой из многочисленных рядов клеток. Основная паренхима коры мелкоклеточная. Протопласты клеток пигментированы в светложелтый и светло-оранжевый цвет. При реализации люминесцентной микроскопии были выявлены различные особенности свечения в УФ-свете при $\lambda = 360$ нм. Установлено, что пробковая ткань люминесцирует ярко-голубым свечением за счет наличия в ней фенольного полимера суберина и простых фенольных соединений. При облучении пробковой ткани светом с $\lambda = 420$ нм

клеточная стенка пробки люминесцируют желтым цветом, остатки протопластов темнобурым.

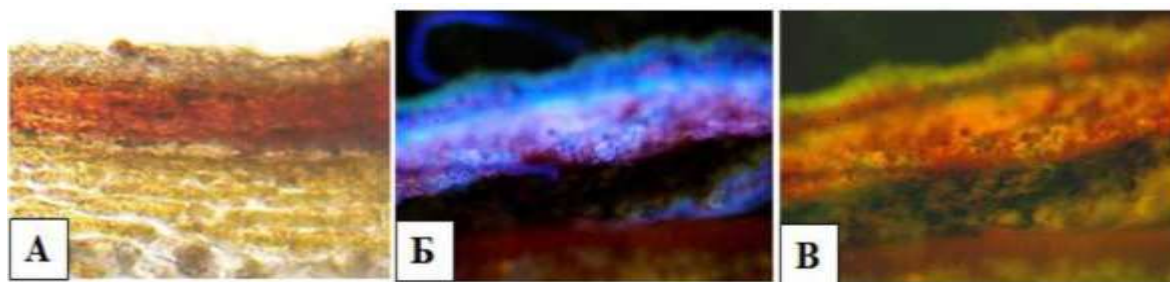


Рисунок 3.7 - Фрагмент пробки (феллемы) - поперечное сечение (x 100).
Обозначения: А - дневной свет; Б - при облучении УФ-светом $\lambda = 420$ нм; В - при облучении УФ-светом $\lambda = 360$ нм.

Основная паренхима мягкого луба, представленная тонкостенными клетками, внутри которых встречаются друзы оксалата кальция, люминесцируют слабо в основном за счет клеточных стенок. В УФ-свете они светло-серые, при $\lambda = 420$ нм – светло-желтые. В УФ-свете при $\lambda = 360$ нм протопласты клеток, диагностированные на срезах, светятся незначительно от бурого до красного в основном за счет пигментов фотосинтеза.

В основной паренхиме коры ореха черного с высокой частотой воспроизводимости в видимом свете детектируются скопления светло-желтых или бесцветных кристаллов. При микроскопировании они выглядят как темные пятна, так как отражают свет. В УФ-свете длиной волны 360 нм детектируется характерное желтое и оранжевое свечение кристаллов вещества .

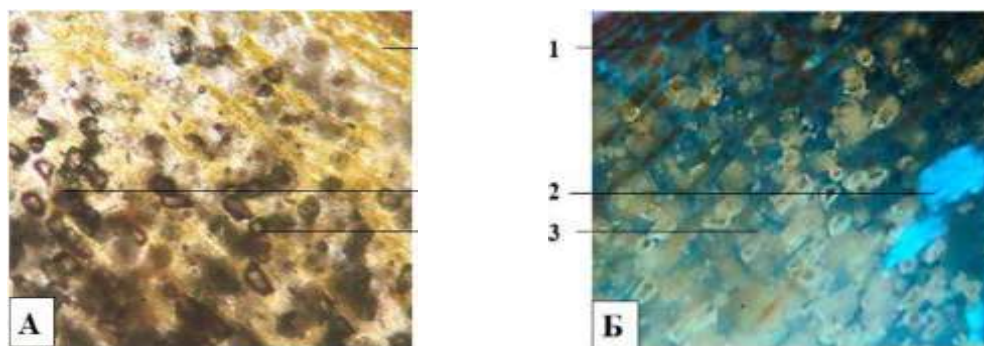


Рисунок 3.7 - Фрагмент основной паренхимы коры ореха черного -

поперечное сечение (x 100). *Обозначения:* А - дневной свет; Б- при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм. 1 - колленхима; 2 - лубяные волокна; 3 - мелкокристаллические включения

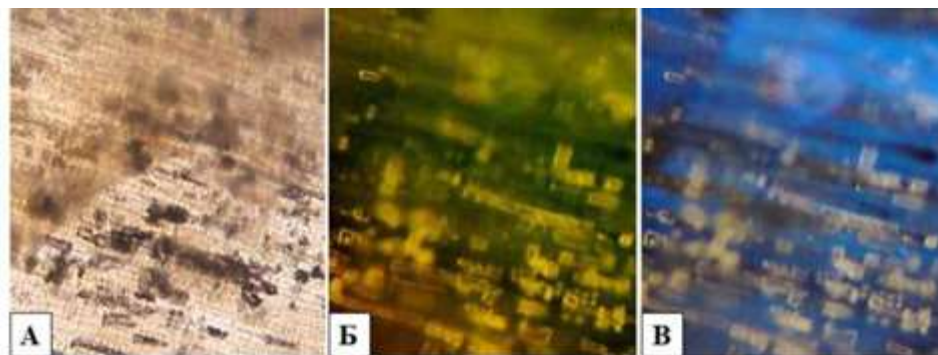


Рисунок 3.8 - Фрагмент основной паренхимы коры ореха черного - продольное сечение (x 100). *Обозначения:* А - дневной свет; Б - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

Подобные включения локализуются и в продольном срезе коры ореха черного. При облучении образцов микропрепаратов УФ-светом $\lambda=360$ нм и 420 нм обнаруживается характерное желтое и оранжевое свечение подобных кристаллических включений. Выявленные особенности люминесценции соответствуют характеру свечения мирицитрина и юглона

3.2. Морфолого-анатомическое исследование листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) с использованием метода люминесцентной микроскопии

Основные характеристики подлинности листьев ореха черного (*Juglans nigra* L.) были ранее подготовлены сотрудниками из Пятигорского

медикофармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета [20, 28].

В соответствии с литературными данными были подтверждены соответствующие диагностические признаки. Листья ореха черного цельные или частично измельченные, сложные, непарноперистого листорасположения, длинночерешковые длиной 20-30 см, шириной 10 см с перистым жилкованием. Отдельные листовые пластинки узкояйцевидной или эллиптической формы с заострённой верхушкой, при основании слегка неравнобокие с зубчатым краем. Опушение диагностируется с абаксиальной стороны. Листья с верхней стороны зеленые, снизу более светлые. [20, 28].

По внешним признакам отличается от других видов листьев формой листовых пластин (орех грецкий), наличием средней степени опушенности с абаксиальной стороны (орех серый).

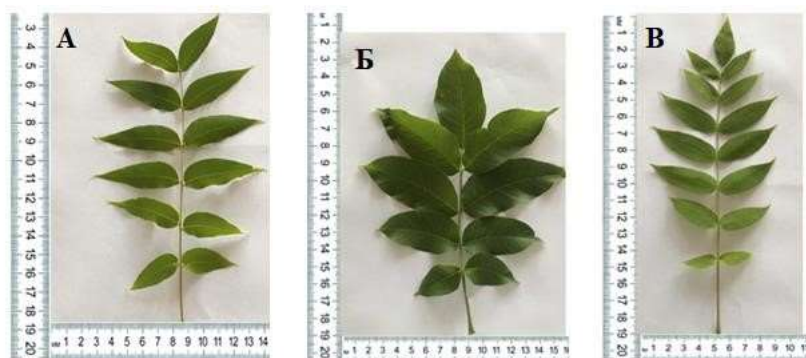


Рисунок 3.9 – Внешний вид листьев рода *Juglans* L.: А – листья ореха черного (*Juglans nigra* L.); Б – листья ореха грецкого (*Juglans regia* L.); В – листья ореха серого (*Juglans cinerea* L.).

При рассмотрении верхней стороны листовой пластинки с поверхности обнаруживаются клетки эпидермиса прямоугольной мета формы с тонкими и извилистыми стенками.

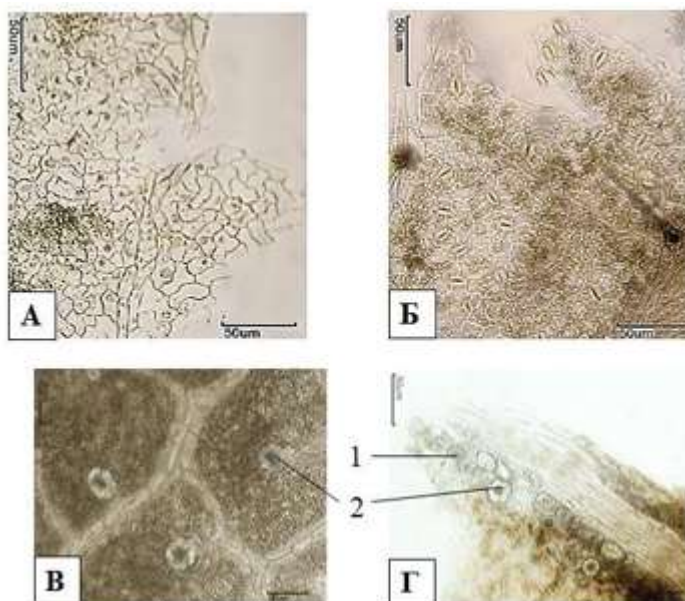


Рисунок 3.10 - Анатомия листовой пластины листа ореха черного: А - эпидермис верхней стороны листовой пластины (x 400); Б - эпидермис нижней стороны листовой пластины (x400); В - эпидермис верхней стороны листовой пластины с включениями (x 400); Г - эпидермис жилки нижней стороны листовой пластины с включениями (x 400).

При рассмотрении нижней стороны листовой пластинки обнаруживаются клетки эпидермиса с извилистыми тонкими стенками. Устьичные аппараты листовых пластинок аномоцитного типа, а также локализованы с нижней стороны листа: гипостоматический вид.

В микропрепаратах листовой пластинки диагностируются включения оксалата кальция. Вдоль жилок детектируются призматические кристаллы; в мезофилле листа локализуются остроконечные друзы [20, 28].

Кроме того, обнаруживаются производные эпидермальных клеток, представленные несколькими типами нежелезистых волосков и железистых трихом. Нежелезистые - одноклеточные волоски, а также пучковые волоски с двумя-восемью ответвлениями, расположенные вдоль жилок листовой пластинки [20, 28].

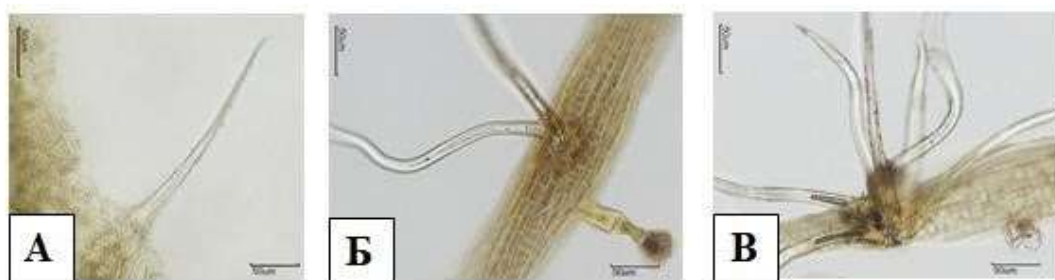


Рисунок 3.11 - Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А - простой волосок (x 400); Б - пучковый волосок с двумя ответвлениями (x 400); В - пучковый волосок с восемью ответвлениями (x 400).

Обнаружены железистые трихомы с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой; также детектируются волоски с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой. При окраске Суданом III железистые трихомы окрашиваются в оранжевый цвет [20, 28].

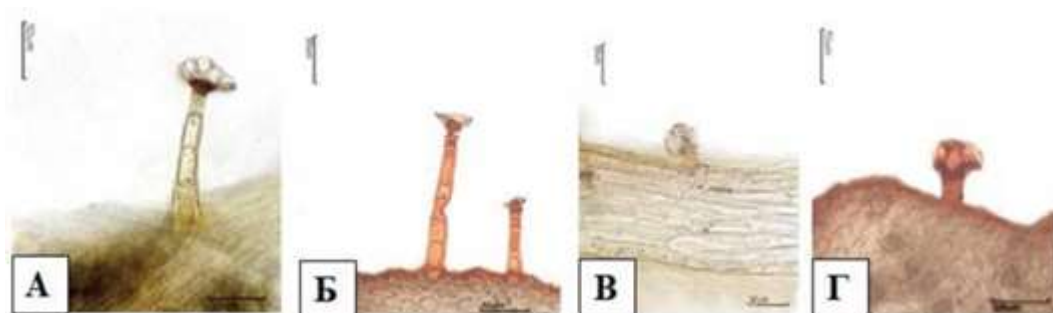


Рисунок 3.12 - Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А - железистые трихомы с четырехклеточной головкой и шестиклеточной ножкой (x 400); Б - Б - окраска раствором Судана III (x 400); В - железистые трихомы с четырехклеточной головкой и двухклеточной ножкой (x 400); Г - окраска раствором Судана III (x 400).

Кроме того, выявлены дополнительные диагностические признаки при микроскопическом анализе поперечных срезов листовой пластины листа ореха черного. Главная жилка на поперечном срезе листовой пластинки листа в целом округлая по форме, но уплощенная с адаксиальной стороны. В жилке локализуются 3 пучка проводящих тканей: один основной – в форме полумесяца,

располагается с абаксиальной стороны, а также 2 других с адаксиальной стороны. Центральная жилка листовой пластинки армирована механическими тканями. На поперечном сечении в медиальной и апикальной частях листовой пластинки под эпидермисом хорошо выражена колленхима углового типа. При этом в структуре пучков склеренхимная часть выражена очень слабо или не выражена совсем. В то же время в базальной части листовой пластинки склерификация выражена значительно. Склеренхима окружает проводящие пучки центральной жилки. Кроме того, отмечается значительное содержание крупных округлых друз в области колленхимы в базальной части поперечного среза листовой пластинки.

Анатомически листовые пластинки листа дорзовентрального типа строения, при этом отмечена значительная выраженность складчатой паренхимы.

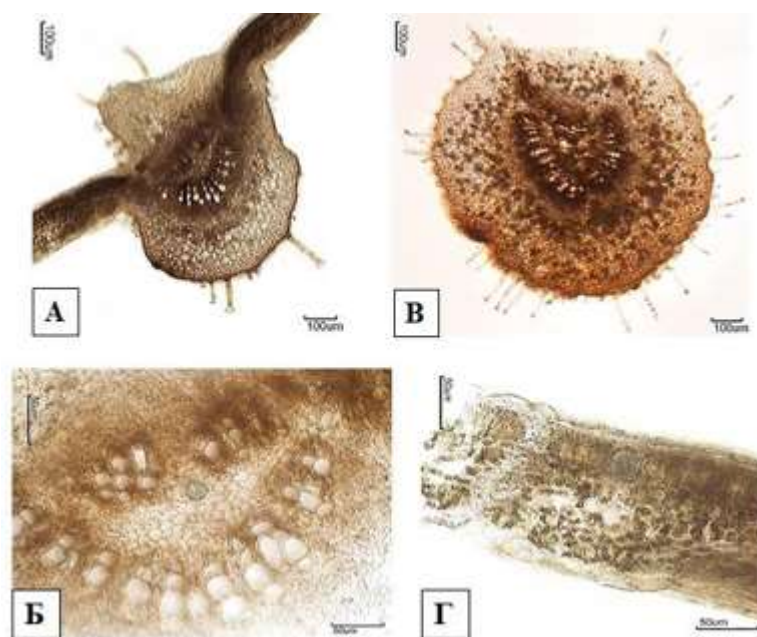


Рисунок 3.13 - Анатомическое строение листовой пластины листа ореха черного - поперечный срез: А - центральная жилка листовой пластины (x 100); Б - проводящая система центральной жилки (x 400); В - фрагмент поперечного сечения черешка (x 100); Г - фрагмент боковой жилки.

С использованием люминесцентной микроскопии проводился анализ локализации биологически активных соединений, содержащихся в РС листьев ореха черного [12]. Для исследования использовались стандартные образцы юглона, мирицитрина, кверцитрина. Особенности их люминесценции выявлены в предыдущем разделе.

В процессе изучения препарата верхнего эпидермиса листовой пластинки листа ореха черного диагностируется люминесценция кутикулы розовым светом при облучении УФ-светом в 360 нм. Данный цвет люминесценции обусловлен наличием каротиноидных структур кутина. Кроме того, люминесценцией красно-розового оттенка при $\lambda=360$ нм обладают хлорофилл и каротиноиды.

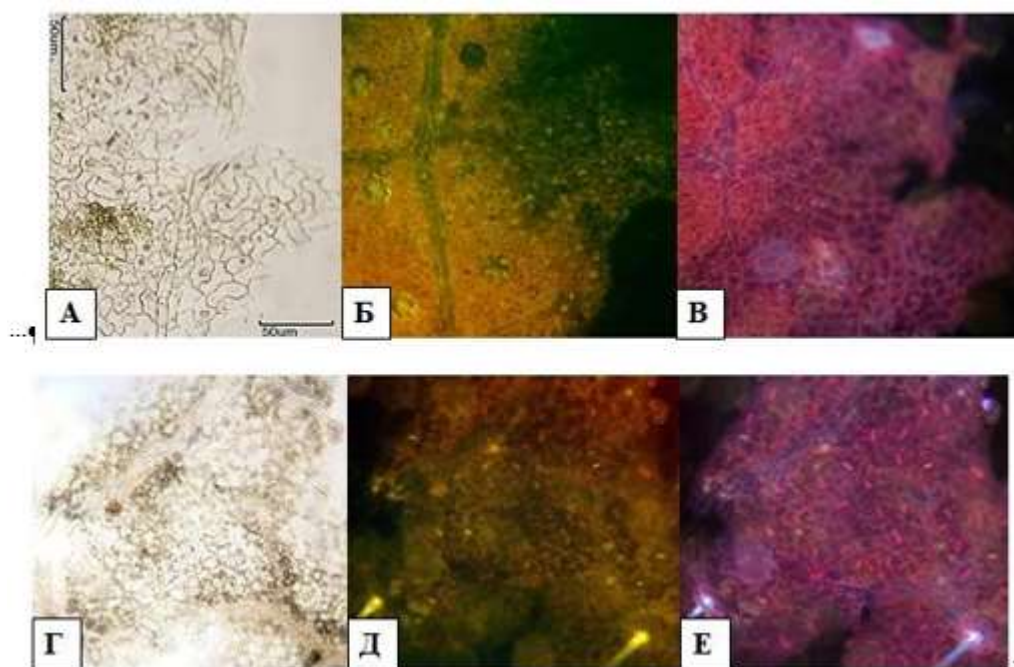


Рисунок 3.14 - Эпидермис листовой пластины листа ореха черного: А - эпидермис верхней стороны листа (x 400); Б - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм; Г - . эпидермис нижней стороны листа (x400); Б - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При облучении УФ-светом при $\lambda=360$ нм препарата нижней эпидермальной ткани листовой пластины *Juglans nigra* L. обнаруживается голубая

люминесценция структур протопласта. Кроме того, в УФ-свете при $\lambda=360$ нм розовая люминесценция диагностируется у клеточных стенок замыкающих клеток устьичного аппарата. Также в мезофилле нижней стороны листовой пластины листа локализуются железистые трихомы. При облучении УФ-светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм отмечается светло-голубое и ярко-желтое свечение соответственно.

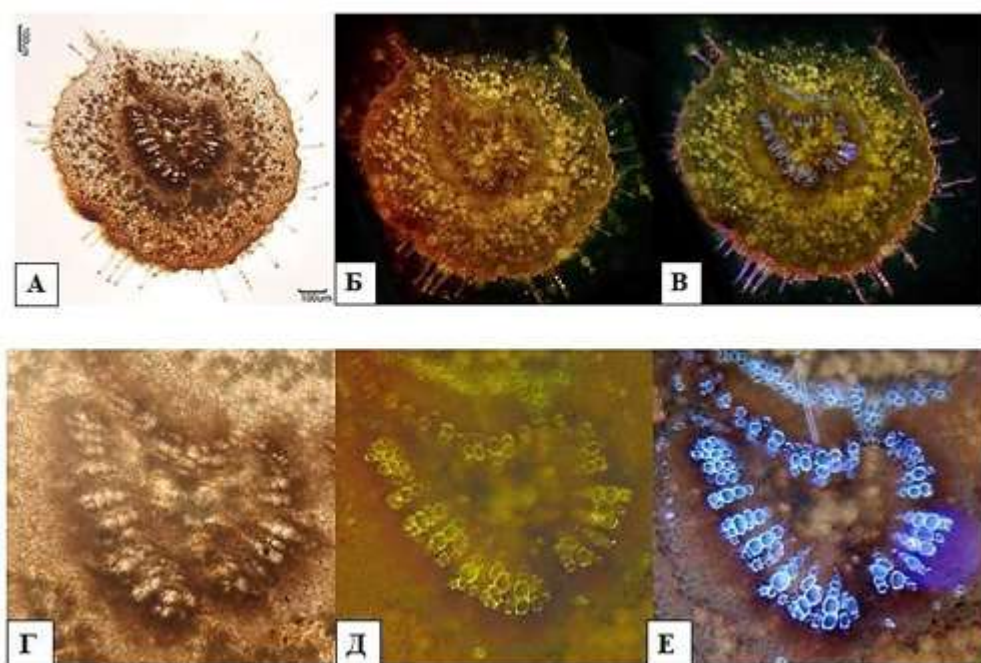


Рисунок 3.15 - Поперечного сечение черешка листовой пластины листа ореха черного: А - дневной свет (x 100); Б - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм; Г - центральная жилка черешка (x 400); Д - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; Е - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При рассмотрении поперечных срезов листовой пластины и черешков (x 100) в УФ-свете при $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм диагностируются оболочки клеток ксилемы и склеренхимы, подвергшиеся лигнификации, и люминесцирующие

светло-голубым и светло-желтым цветом соответственно благодаря наличию лигниновых структур.



Рисунок 3.16 - Центральная жилка листовой пластины. Обозначение: А - дневной свет; Б - при облучении УФ-светом с длиной волны 420 нм; В - при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм.

При исследовании люминесценции проводящих пучков центральной жилки черешка и листовой пластинки УФ-светом при 360 нм в области флоэмных тканей детектируется оранжево-красная люминесценция. Природа люминесценции схожа с ранее выявленным свечением кверцитрина. Кроме того, в основной паренхиме центральной жилки черешка и листовой пластинки локализуются кристаллические включения тёмного цвета. При облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм и 420 нм обнаруживается характерное желтое и оранжевое свечение кристаллических включений. Особенности люминесценции указывают на локализацию в данной ткани мирицитрина.

Выводы к разделу 3

1. Морфолого–анатомическое исследование коры и листьев ореха черного позволило подтвердить имеющиеся литературные данные об основных диагностических признаках, характерных для указанных видов растительного сырья: особенности внешнего вида, расположения тканей и локализации включений.

2. Проведено анатомо-гистологическое изучение черешков и листовой пластинки листьев ореха черного на поперечных сечениях. К диагностическим особенностям листьев ореха черного можно отнести: очертания центральной жилки округлой формы, уплощенной с адаксиальной стороны с 3 пучками проводящих тканей: одного основного – в форме полумесяца, а также 2 других с адаксиальной стороны. Центральная жилка достаточно армирована: склеренхима окружает проводящие пучки центральной жилки, отмечается значительное содержание крупных округлых друз в базальной части листовой пластинки.

3. Исследование методом люминесцентной микроскопии тканей коры ореха черного выявило, что наибольшая концентрация фенольных соединений (юглон, мирицитрин) сосредоточена в тканях основной паренхимы мягкого луба. Проведённый анализ тканей листьев ореха черного с использованием люминесцентной микроскопии позволил установить локализацию диагностически значимых соединений: кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализуются кристаллические включения мирицитрина.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Сравнительное фитохимическое исследование растительного сырья видов рода Орех (*Juglans* L.) позволило выявить присутствие в коре и листьях ореха черного, листьях ореха грецкого и ореха серого химических соединений флавоноидной природы, что представляет интерес в плане дальнейшего изучения сырьевой базы рода. Для дальнейшего исследования химического состава были выбраны кора и листья *Juglans nigra* L., как наиболее перспективные источники биологически активных соединений флавоноидной природы.
2. Обоснована целесообразность определения мирицитрина и кверцитрина методом тонкослойной хроматографии для коры и листьев *Juglans nigra* L. с использованием в качестве веществ-свидетелей стандартных образцов мирицитрина (кора и листья), кверцитрина (листья).
3. Проведена оценка количественного содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин для растительного сырья коры и листьев *Juglans nigra* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии при 416 ± 2 нм. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях *Juglans nigra* L. варьирует в пределах от 2,94 % до 3,17 %, и от 3,02 % до 3,28 % соответственно. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре *Juglans nigra* L. - не менее 2,5 %. Величина числового показателя содержания флавоноидов в пересчете на мирицитрин в листьях *Juglans nigra* L. - не менее 3,0%.
4. Выявлены основные признаки локализации доминирующих и диагностически значимых соединений в коре и листьях ореха черного. С использованием метода люминесцентной микроскопии выявлено, что наибольшая концентрация фенольных соединений (юглон, мирицитрин) находится в тканях основной паренхимы мягкого луба. С использованием метода люминесцентной микроскопии выявлено, что кверцитрин обнаруживается в основном в области флоэмных тканей, а в клетках основной паренхимы локализуются кристаллические включения мирицитрина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бежуашвили, М.Г. Химическая характеристика перегородок плодов *Juglans regia* / М.Г. Бежуашвили, Н.З. Курашвили // Химия природных соединений. – 1998. - № 2. – С. 161-164.
2. Громадин, А. В. Дендрология: учебник для студ. образоват. учреждений сред. проф. образования./ А.В. Громадин, Д.Л. Матюхин. – М.: Академия, 2006. С. 160164.
3. Грязнов В. П. Практикум по физиологии растений / В.П. Грязнов, Л.В. Сиротина – Белгород: Белгородский государственный университет, 2000. – С. 68.
4. Гуков, Г.В. Комплексное использование ореха маньчжурского на юге Дальнего Востока / Г.В. Гуков, А.Ю Личман // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения): материалы II международной конференции. Хабаровск: ФГУ «ДальНИИЛХ». – 2004. – С. 233–236.
5. Дайронас, Ж.В. Инновационные технологии в производстве фитопрепаратов ореха черного / Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров, А.В. Корочинский // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2014. — № 3. — С. 60-64.
6. Дайронас, Ж.В. Морфолого-анатомическое изучение коры ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) [Электронный ресурс] / Ж.В. Дайронас // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 1. — Режим доступа: <http://www.scienceeducation.ru/125-19849>.

7. Дудников, М. Э. Биотехнологические исследования по безотходному использованию околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Дудников Михаил Эдуардович. — Ставрополь, 2006. — 120 с.
8. Еникеева, Р.А. Исследование по фармакогностическому изучению и стандартизации сырья и препаратов Ореха грецкого (*Juglans regia* L.): автореф. дис... канд. фармац. наук: защищена 23.06.2008 / Р.А. Еникеева. - Москва: (ВИЛАР) РАСХН, 2008. - 22 с.
9. Есауленко, Е.Е. Перспективы использования масла ореха черного (*Juglans nigra* L.) для коррекции окислительного стресса и патологии липидного обмена при токсическом гепатите / Е.Е. Есауленко, А.А. Ладутько, И.М. Быков, Е.В. Щербакова // Аллергология и иммунология. – 2010. – Т. 10, № 3. – С. 260-262.
10. Жўрабоева, М. Д. и. Стандартизация дубильных веществ, содержащихся в листьях грецкого ореха и получение сухого экстракта / М. Д. и. Жўрабоева, О. Р. Рахимова, Н. Юсупова, Г. Р. и. Рахимова // Интернаука. – 2019. – № 9-1(91). – С. 28-31.
11. Ильинская, И.А. К систематике и филогении семейства *Juglandaceae* // Ботанический журнал. – 1990. – Т. 75, № 6. – С. 792-803.
12. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. - М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
13. Кузнецов, П.В. Именные (цветные) реакции в фармацевтическом и химикотоксикологическом функциональном анализе: учебное пособие / П.В. Кузнецов. – Кемерово: АИ «Кузбассвузиздат», 2016. – 167 с.

14. Лойко, Р.Э. Химический состав плодов *Juglans regia* L. в Белоруссии / Р.Э. Лойко, Т.С. Ширко // Растительные ресурсы. – 1990. -Т.26, вып. 2. – С. 160-169.
15. Назарова, Н.В. Исследование стрессовых реакций эпидермиса листа видов рода *Juglans*, произрастающих в условиях Белгородской области, на действие высоких температур / Н.В. Назарова, Т.А. Кузнецова, В.Н. Сорокопудов, Н.Н. Шестопалова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 715.
16. Пастушенкова, А.Л. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье с противомикробным действием как путь преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов к действию антибактериальных препаратов / А.Л. Пастушенкова // Клиническая патофизиология. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 20-24.
17. Программа PASS [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmaexpert.ru/PASSOnline>. – Текст: электронный.
18. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Caprifoliaceae-Plantaginaceae*. – Л: Наука, 1990. – 328 с.
19. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. С.Н. Быковского [и др.]. М.: Изд-во Перо, 2014. - 656 с.
20. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО Издательство «Медицина», 2005. - 832 с.

21. Рыбников, В.Н. Нафтохиноны как иммуномодуляторы при интенсивных физических нагрузках / В.Н. Рыбников, И.Л. Ласкова, Л.Г. Прокопенко // Антибиотики и химиотерапия. - 1997. - Т. 42, №3. - С. 6-10.
22. Садыкова, З.З. Некоторые фитохимические показатели экстракта, полученного из листьев грецкого ореха (*Juglans regia* L.) / З. З. Садыкова // Актуальные проблемы химии и образования : Материалы II научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Астрахань, 19–20 марта 2018 года. – Астрахань: Без издательства, 2018. – С. 21-22.
23. Салионова, А.В. Микроскопические признаки сырья листьев *Juglans mandshurica* / А.В. Салионова, С.П. Раилко, А.Ю. Маняхин, О.Г. Зорикова // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы : Материалы II Международной научной конференции, Новосибирск, 20–22 октября 2015 года / Новосибирский государственный аграрный университет. – Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2015. – С. 191-193.
24. Сдобнина, Л.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии / Л.И. Сдобнина // Биоразнообразии: проблемы и перспективы сохранения: тезисы докл. междунар. науч. конф. (Пенза, 13 – 16 мая 2008 г.). – Пенза, 2008. – С. 75–77.
25. Семенов, А.А. Основы химии природных соединений: в 2 т. / А.А. Семенов, В.Г. Карцев - М.: МБФНП, 2009. - Т. 1. – 624 с.
26. Сорокопудов, В.Н. Жирнокислотный состав семян отборных форм ореха грецкого (*Juglans regia* L.), индуцированного в Белгородской области / Сорокопудов В.Н., Зинченко А.А., Назарова Н.В. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина и фармация. - 2011. Том 13 - № 4-2(99). - С. 174-177.

27. Сорокопудов, В.Н. Изучение химического состава листьев и незрелых плодов некоторых видов рода *Juglans* / В.Н. Сорокопудов, С.Н. Шлапакова, Т.Т. Нгуен, Т.Б.Т. То // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2014. - № 9. - С. 52-55.
28. Стратегия ВОЗ в области народной медицины: 2014-2023 гг. – Гонконг: ВОЗ, 2013. – 72 с.
29. Стреляева, А.В. Изучение токсичности и фармакологической активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья и новых экстрагентов: дис. ... докт. фармац. наук: 15.00.02 / Ангелина Вадимовна Стреляева. – М., 2002. – 360 с.
30. Тахтаджян, А.Л. Жизнь растений. Том 5. Часть 1. Цветковые растения' \\Под редакцией академика АН СССР А.Л. Тахтаджяна - Москва: Просвещение, 1980 – 430 с.
31. Тушканова, О.В. Исследование антибиотической активности юглона, выделенного из околоплодника *Juglans nigra* L. / О.В. Тушканова, И.Е. Бойко // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2017. - № 1(18). - С. 126-129.
32. Чуб, С.К. Морфолого-анатомическое изучение перегородок плодов ореха грецкого (*Juglans regia* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) // Материалы IX Международной научно-практической конференции: Молодые ученые в решении актуальных проблем науки. - 2019. - С. 167-171.
33. Abdallaha, I.B. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties / I.B. Abdallaha, N. Tlilia, E. Martinez-Forceb // Food Chemistry. - 2015. - Vol. 173. - P. 973-978.

34. Alshatwi, A.A. Validation of the antiproliferative effects of organic extracts from the green husk of *Juglans regia* L. on PC-3 human prostate cancer cells by assessment of apoptosis-related genes / A.A. Alshatwi, T.N. Hasan, G. Shafi, N.A. Syed, A.H. AlAssaf, M.S. Alamri, A.S. Al-Khalifa // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. – 2012. – Vol. 2012: 103026.
35. Arrnz, S. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter / S. Arrnz, J. Perez-Jimenz, F. Sayra-Calixta // European Food Research and Technology. - 2008. - Vol. 227, No. 2. - P. 425-431.
36. Bada, J.C. Characterization of walnut oils (*Juglans regia* L.) from Asturias, Spain / J.C. Bada, M. Leon-Camacho, M. Prieto // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 2010. - Vol. 87, No. 12. - P. 1469-1474.
37. Bandele O.J., Clawson S.J., Osheroff N. Dietary polyphenols as topoisomerase II poisons: B ring and C ring substituents determine the mechanism of enzyme-mediated DNA cleavage enhancement. Chem Res Toxicol. 2008. Vol. 21(6). P. 1253-1260. DOI:10.1021/tx8000785.
38. Caballero, E. Thermal stability data of juglone from extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk, and technologies used to concentrate juglone / E. Caballero, C. Soto, J. Jara // Data in Brief. – 2019. – Vol. 25. - 104081.
39. Calabro, S. Enhanced eryptosis following juglone exposure / S. Calabro, K. Alzoubi, R. Bissinger, K. Jilani, C. Faggio, F. Lang // Basic Clin Pharmacol Toxicol. – 2015. – Vol. 116, No. 6. - P. 460–467.
40. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.

42. Chaleshtori R.S., Chaleshtori F.S., Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves // Turkish Journal of Biology. 2011. – T.35. – No.5. – P. 635-639.
43. Colaric, M. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. / M. Colaric, R. Veberic, A. Solar, M. Hudina, F. Stampar // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53, No. 16. – P. 6390–6396.
44. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. Journal of Natural Products. 1995. Vol. 58(2). P. 217-225. DOI: 10.1021/np50116a009.
45. Cosmulescu, S.N. Mineral composition of fruits in different walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars / S.N. Cosmulescu, A. Baciuc, G. Achim // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- Napoca. - 2009. - Vol. 37, No. 2. - P. 157-160.
46. Cosmulescu, S. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia* L.) leaves / S. Cosmulescu, I. Trandafir, V. Nour // Pharmaceutical Biology. – 2014. – Vol. 52, No. 5. – P. 575-580.
47. Cruz-Vega, D.E. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens* / D.E. Cruz-Vega, M.J. Verde-Star, N. SalinasGonzalez, B. Rosales-Hernandez, I. Estrada-Garcia, P. Mendez-Aragon, P. CarranzaRosales, M.T. González-Garza, J. Castro-Garza // Phytotherapy Research. – 2008. – Vol. 22, No. 4. – P. 557–559.
48. Daglish, C. The determination and occurrence of a hydrojuglone glucoside in the walnut / C. Daglish // Biochemical Journal. – 1950. – Vol. 47, No. 4. – P. 458-462.

49. Dai, X. TrichOME: A comparative omics database for plant trichomes / X. Dai, G. Wang, D.S. Yang, Y. Tang, P. Broun, M.D. Marks, L.W. Sumner, R.A. Dixon and P.X. Zhao // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 152. – P. 44-54.
50. Dilcher, D.L. Investigations of angiosperms from the Eocene of North America: leaves of the engelhardieae (*Juglandaceae*) / D.L. Dilcher and S.R. Manchester // *Botanical Gazette*. – 1986. – Vol. 147, No. 2. – P. 189-199.
51. Ebrahimia, I. Extraction of juglone from *Pterocarya fraxinifolia* leaves for dyeing, anti-fungal finishing, and solar UV protection of wool / I. Ebrahimia, M.P. Gashti // *Coloration Technology*. – 2015. – Vol. 131, No. 6. – P. 451-457.
52. Eidi, A. Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats / A. Eidi, J.Z. Moghadam, P. Mortazavi, S. Rezazadeh, S. Olamafar // *Pharmaceutical Biology*. – 2013. – Vol. 51. – No.5. – P. 558–565.
53. El-Sakka, M.A. Phytochemistry alkaloids / M.A. El-Sakka. – 3rd ed. – Al Azhar, 2010. – 222 p.
54. Erdemoglu, N. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine / N. Erdemoglu, E. Kupeli, E. Yesilada // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2003. – Vol. 89, No. 1. – P. 123–129.
55. Ficker, C.E. Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts / C.E. Ficker, J.T. Arnason, P.S. Vindas, L.P. Alvarez, K. Akpagana, M. Gbéassor, C.D. Souza, M.L. Smith // *Mycoses*. – 2003. – Vol. 46, No. 1-2. – P. 29-37.
56. Food and Drug Administration // URL: <https://www.fda.gov>. – Текст: электронный.
57. Hasan, T.N. Anti-proliferative effects of organic extracts from root bark of *Juglans regia* L. (RBJR) on MDA-MB-231 human breast cancer cells: role of

- Bcl-2/Bax, caspases and Tp53 / T.N. Hasan, L.G. B, G. Shafi, A.A. Al-Hazzani, A.A. Alshatwi // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2011. Vol. 12, No. 2. P. 525–530.
58. Hosseinzadeh, H. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Juglans regia* L. leaves in mice / H. Hosseinzadeh, H. Zarei, E. Taghiabadi // Iranian Red Crescent Medical Journal. – 2011. – Vol. 13, No. 1. – P. 27–33.
59. Jakopič, J. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents / J. Jakopič, R. Veberič, F. Štampar // Acta agriculturae Slovenica. – 2009. – Vol. 93, No. 1. – P. 11-15.
60. Kale Hu, A.A. Spectrophotometric validation and standardization of a bioactive component from *J. regia* stem bark / A.A. Kale Hu, S.A. Gaikwad, S. Devare, N.R. Deshpande, J.P. Salvekar // International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences. – 2012. – Vol. 3, No. 1. – P. 133-136.
61. Kong, Y.H. Natural product juglone targets three key enzymes from *Helicobacter pylori*: inhibition assay with crystal structure characterization / Y.H. Kong, L. Zhang, Z.Y. Yang, C. Han, L.H. Hu, H.L. Jiang, X. Shen // Acta Pharmacologica Sinica. – 2008. – Vol. 29, No. 7. P. 870–876.
62. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. Cancer Lett. 2009. Vol. 275(1). P. 17-26. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.027.
63. Matławska, I. Determination of the juglone content of *Juglans regia* leaves by GC/MS / I. Matławska, W. Bylka, E. Widy-Tyszkiewicz, B. Stanisiz // Natural Product Communications. – 2015. – Vol. 10, No. 7. – P. 1239- 1242.
64. Medic, A. Identification and quantification of the major phenolic constituents in *Juglans regia* L. peeled kernels and pellicles, using HPLC-MS/MS / A. Medic, J.

- Jakopic, M. Hudina, A. Solar, R. Veberic // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 352. – P. 129404. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129404.
- 65.Min, B.–S. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Ribonuclease H Activities by Constituents of *Juglans mandshurica* / B.–S. Min, N. Nakamura, H. Miyashiro, Y.–H. Kim, M. Hattori // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2000. – Vol. 48, No 2. – P. 194–200.
- 66.Nour, V. HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves / V. Nour, I. Trandafir, S. Cosmulescu // Journal of Chromatographic Science. – 2013. – Vol. 51, No. 9. – P. 883-890.
- 67.Oliveira, I. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks / I. Oliveira, A. Sousa, I.C. Ferreira, A. Bento, L. Estevinho, J.A. Pereira // Food and Chemical Toxicology. – 2008. – Vol. 46. – No. 7. – P. 2326–2331.
- 68.Omar, S. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine / S. Omar, B. Lemonnier, N. Jones, C. Ficker, M.L. Smith, C. Neema, G.H. Towers, K. Goel, J.T. Arnason // Journal of Ethnopharmacology. – 2000. – Vol. 73, No. 1–2. – P. 161–170.
- 69.Pereira, J.A. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars / J.A. Pereira, I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P.B. Andrade, I.C. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho // Food and Chemical Toxicology. – 2008. - Vol. 46, No. 6. - P. 2103-2111.
- 70.Pharmacopoeia of the People's Republic of China // URL: <http://db.ouryao.com/yd2015/view.php?v=txt&id=5667>
- 71.Qadan, F. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms / F. Qadan // Am J Chin Med. – 2005. – Vol. 33, No. 2. – P. 197–204.

72. Regueiro, J. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry / J. Regueiro, C. Sanchez-Gonzalez, A. Vallverdi-Queralt et al // Food Chemistry. - 2014. - Vol. 152. - P. 340-348.
73. Strelyaeva, A.V. Study of quality medicinal plants bark walnuts and extract from it / A. V. Strelyaeva, D. I. Lezhava, A. N. Luferov // Pharmacognosy Journal. – 2020. – Vol. 12. – No 2. – P. 282-286. – DOI 10.5530/pj.2020.12.44.
74. Strugstad, M.P. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review / M.P. Strugstad, S. Despotovski // Journal of Ecosystems and Management. – 2012. – Vol. 13, No. 3. – P. 1–16.
75. Su, C. Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-QOrbitrap HRMS combined with QAMS / C. Su, C. Li, K. Sun, W. Li, R. Liu // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 331. – P. 127180. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127180.
76. The International pharmacopoeia [electronic resource] - 10th ed. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.1> Текст электронный.
77. The European pharmacopoeia (Ph. Eur.) [electronic resource] - 10th Edition (1 July 2019). – URL - <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>. Текст: электронный.
78. The Cochrane Library // URL: <http://www.cochranelibrary.com>. – Текст: электронный.
79. Thomson, R.H. Naturally occurring quinones IV: recent advances. R.H. Thomson. – London: Springer, 1997. – 746 p.

80. Tomasziewicz-Potępa, A.A. method of isolation of juglone from walnut leaves / A. Tomasziewicz-Potępa, O. Vogt, D. Siewiec // Химия и химическая технология. – 2005. – Т. 48, вып. 11. – С. 85-90.
81. US National Library of Medicine National Institutes of Health. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
82. Willis, L.M. Walnut extract inhibits LPS-induced activation of BV-2 microglia via internalization of TLR4: possible involvement of phospholipase D2 / L.M. Willis, D.F. Bielinski, D.R. Fisher, N.R. Matthan, J.A. Joseph // Inflammation. – 2010. – Vol. 33, No. 5. – P. 325–333.
83. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/antimicrobialresistance/global-action-plan/ru/>.
84. Yan, M. Separation and analysis of flavonoid chemical constituents in flowers of *Juglans regia* L. by ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry / M. Yan, M. Chen, F. Zhou, D. Cai, H. Bai, P. Wang, H. Lei, Q. Ma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019. Vol. 164. – P. 734-741. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.11.029.
85. Zhang, X.B. Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines / X.B. Zhang, C.L. Zou, Y.X. Duan, F. Wu, G. Li // BMC Complementary and Alternative Medicine. – 2015. – Vol. 15. – P. 396.
86. Zhao, M.H. Flavonoids in *Juglans regia* L. leaves and evaluation of in vitro antioxidant activity via intracellular and chemical methods / M.H. Zhao, Z.T. Jiang, T. Liu, R. Li. // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 2014. - Art. ID 303878.

87. Zhou, Y. Studies on Cytotoxic Activity against HepG-2 Cells of Naphthoquinones from Green Walnut Husks of *Juglans mandshurica* Maxim / Y. Zhou, B. Yang, Y. Jiang, Z. Liu, Y. Liu, X. Wang, H. Kuang // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, No. 9. – P. 15572-15588. <https://doi.org/10.3390/molecules200915572>.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК ВИЩОЇ ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ХІМІЇ ПРИРОДНИХ СПОЛУК І НУТРИЦІОЛОГІЇ

СЕРТИФІКАТ

№ 199

Цим засвідчується, що

Тауфік Мохаммед Амін

брав(ла) участь у роботі V Міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції

"СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ НАУКИ В СТВОРЕННІ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ І ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК, ЩО МІСТЯТЬ КОМПОНЕНТИ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ"

(тривалість - 6 годин)
14 квітня 2023 р., м. Харків, Україна

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.

Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ, д. фарм. н., проф.

Завідувач кафедри хімії природних сполук
і нутриціології НФаУ, д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Вікторія КИСЛИЧЕНКО

Национальный фармацевтический университет

Факультет по подготовке иностранных граждан
Кафедра химии природных соединений и нутрициологии

Степень высшего образования магистр

Специальность 226 Фармация, промышленная фармация
Образовательная программа Фармация

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
химии природных
соединений и
нутрициологии

Виктория КИСЛИЧЕНКО
“28” сентября 2022 года

ЗАДАНИЕ
НА КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ
СОИСКАТЕЛЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

Мохаммед Амин ТАУФИК

1. Тема квалификационной работы: «Фармакогностическое изучение *Juglans nigra*.», руководитель квалификационной работы: Андрей КОМИССАРЕНКО, д.фарм.н., профессор, утвержденный приказом НФаУ от “06” лютого 2023 года № 35
2. Срок подачи соискателем высшего образования квалификационной работы: апрель 2023 г.
3. Исходящие данные к квалификационной работе: Фармакогностическое изучение *Juglans nigra*
4. Содержание расчетно-пояснительной записки (перечень вопросов, которые необходимо разработать): разработка методик качественного анализа коры и листьев *Juglans nigra* L. методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Разработка методик количественного определения флавоноидов в коре и листьях *Juglans nigra* L. с использованием дифференциальной спектрофотометрии. Морфолого-анатомическое исследование листьев и коры ореха черного.
5. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей): таблиц – 8, рисунков – 20.

6. Консультанты разделов квалификационной работы

Раздел	Имя, ФАМИЛИЯ, должность консультанта	Подпись, дата	
		задание выдал	задание принял
1	Андрей КОМИССАРЕНКО, профессор заведения высшего образования кафедры химии природных соединений и нутрициологии	28.09.2022	28.09.2022
2	Андрей КОМИССАРЕНКО, профессор заведения высшего образования кафедры химии природных соединений и нутрициологии	02.12.2022	02.12.2022
3	Андрей КОМИССАРЕНКО, профессор заведения высшего образования кафедры химии природных соединений и нутрициологии	08.02.2023	08.02.2023

7. Дата выдачи задания: «28» сентября 2022 года.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

№ з/п	Название этапов квалификационной работы	Срок выполнения этапов квалификационной работы	Примечание
1	Выбор темы. Анализ научных первоисточников	Сентябрь-декабрь 2022 г.	выполнено
2	Проведение экспериментальных исследований	Декабрь 2022 г.- Март 2023 г.	выполнено
3	Оформление работы и подготовка к защите	Март - апрель 2023 г.	выполнено

Соискатель высшего образования _____ Мохаммед Амин ТАУФИК

Руководитель квалификационной работы _____ Андрей КОМИССАРЕНКО

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 35
По Національному фармацевтичному університету
від 06 лютого 2023 року

нижченаведеним студентам 5-го курсу 2022-2023 навчального року, навчання за освітнім ступенем «магістр», галузь знань 22 охорона здоров'я, спеціальності 226 – фармація, промислова фармація, освітня програма – фармація, денна форма здобуття освіти (термін навчання 4 роки 10 місяців та 3 роки 10 місяців), які навчаються за контрактом, затвердити теми кваліфікаційних робіт:

Прізвище студента	Тема кваліфікаційної роботи		Посада, прізвище та ініціали керівника	Рецензент кваліфікаційної роботи
• по кафедрі хімії природних сполук				
Тауфік Мохаммед Амін	Фармакогностичне дослідження <i>Juglans nigra</i>	Pharmacognostic study of <i>Juglans nigra</i>	проф. Комісаренко А.М.	Проф. Кошовий О.М.

Підстава: подання декана, згода ректора

Ректор

Вірно, Секретар



ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 112695 від « 28 » квітня 2023 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Тауфік Мохаммед Амін, 5 курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Фармакогностичне дослідження *Juglans nigra* / Pharmacognostic study of *Juglans nigra*», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (компіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

3%

27%

ОТЗЫВ

научного руководителя на квалификационную работу степени высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Мохаммед Амин ТАУФИК

на тему: «Фармакогностическое изучение *Juglans nigra*».

Актуальность темы. Одним из перспективных видов сырья растительного происхождения являются представители рода Орех (*Juglans* L.) семейства Ореховые (*Juglandaceae*). Представляющими интерес являются орех грецкий (*Juglans regia* L.), орех черный (*Juglans nigra* L.) и орех серый (*Juglans cinerea* L.). Представители рода Орех являются потенциальными источниками важного класса биологически активных соединений – нафтохинонов – представители которого (юглон, гидроюглон) обуславливают высокую антибактериальную, противогрибковую и противовоспалительную активность.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность.

Материал магистерской работы изложен последовательно и логично, вся использованная литература и экспериментальные данные умело обобщены. Квалификационная работа посвящена проведению фармакогностическому изучению *Juglans nigra*, проведению анализа основных показателей качества сырья.

Оценка работы. Материал квалификационной работы изложен методически правильно, последовательно, логично, что свидетельствует об умении автора анализировать научные первоисточники, применять методики

анализа лекарственного растительного сырья, обобщать литературные и экспериментальные данные.

Общий вывод и рекомендации о допуске к защите. Полученные результаты исследований по актуальности, научному и практическому значению отвечают требованиям, предъявляемым к квалификационным работам, поэтому представленная работа может быть рекомендована к публичной защите в Экзаменационную комиссию Национального фармацевтического университета.

Научный руководитель _____ Андрей КОМИССАРЕНКО

«05» апреля 2023 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на квалификационную степени высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Мохаммед Амин ТАУФИК

на тему: «Фармакогностическое изучение *Juglans nigra*».

Актуальность темы. Представители рода Орех являются ценными растениями и широко применяются в деревообрабатывающей и пищевой промышленности. Однако указанные виды пока не нашли широкого применения в научной медицине. Таким образом, проведение комплексного фармакогностического изучения особенностей анатомо-морфологической диагностики, а также идентификации и количественного определения основных групп БАС сырья представителей рода Орех, отвечающих современным требованиям фармакопейного анализа, является актуальной научной задачей

Теоретический уровень работы. Соискателем высшего образования обработано большое количество научной литературы на достаточно высоком теоретическом уровне. Содержание работы полностью соответствует поставленной задаче. По теме работы опубликованы 1 тезисы доклада.

Предложения автора по теме исследования. В результате проведённых исследований показана возможность расширения ассортимента ЛРС за счёт использования травы цикория обыкновенного.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность. Полученные результаты имеют практическое и теоретическое значение, все

результаты обработаны статистически, информация структурирована и логически представлена.

Недостатки работы. Среди недостатков можно отметить неточные выражения, не влияющие на научную и практическую ценность работы.

Общий вывод и оценка работы. Материал квалификационной работы изложен последовательно и систематически, что указывает на умение автора применять выборочный анализ научных первоисточников и критически их обобщать. Квалификационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к магистерским работам, и может быть представлена к защите в Экзаменационной комиссии Национального фармацевтического университета.

Рецензент _____

проф. Олег КОШЕВОЙ

«11» апреля 2023 г.

Витяг

з протоколу засідання кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету № 4 від 18 квітня 2023 року

ПРИСУТНІ: Бурда Н.Є., Журавель І.О., Кисличенко В.С., Комісаренко А.М.,
Король В.В., Новосел О.М., Попик А.І., Попова Н.В., Процька В.В.,
Скребцова К.С., Тартинська Г.С., Хворост О.П.

Порядок денний:

1. Щодо допуску здобувачів вищої освіти до захисту кваліфікаційних робіт у
Екзаменаційній комісії.

СЛУХАЛИ: про представлення до захисту в Екзаменаційній комісії
кваліфікаційної роботи на тему «Фармакогностичне дослідження
Juglans nigra» здобувача вищої освіти випускного курсу
Фм18(5,0д)і-11 групи Мохамед Амін ТАУФІК.

Науковий керівник: професор Андрій КОМІСАРЕНКО

Рецензент: професор Олег КОШЕВОЙ

УХВАЛИЛИ: рекомендувати до захисту в Екзаменаційній комісії
кваліфікаційну роботу здобувача вищої освіти Мохамед Амін
ТАУФІК на тему «Фармакогностичне дослідження Juglans nigra».

Завідувачка кафедри хімії природних
сполук і нутриціології

Вікторія КИСЛИЧЕНКО

Секретар кафедри ХПСіН

Надія БУРДА

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Мохамед Амін ТАУФІК до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «Фармакогностичне дослідження Juglans nigra».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Світлана КАЛАЙЧЕВА /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Мохамед Амін ТАУФІК засвоїв основні методи фітохімічного аналізу, дана кваліфікаційна робота має практичне значення та відповідає вимогам, що висувуються до роботи певного рівня

Керівник кваліфікаційної роботи

_____ Андрій КОМІСАРЕНКО

«05» квітня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Мохамед Амін ТАУФІК допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри
хімії природних сполук
і нутриціології

_____ Вікторія КИСЛИЧЕНКО

«18» квітня 2023 року

Квалификационную работу защищено

в Экзаменационной комиссии

« ____ » июня 2023 г.

С оценкой _____

Председатель Экзаменационной комиссии,

доктор фармацевтических наук, профессор

_____ / Владимир ЯКОВЕНКО /