

УДК 615.322: 582.628.2

DOI: 10.25684/NBG.scbook.146.2018.23

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОРЕХА ГРЕЦКОГО

Жанна Владимировна Дайронас¹, Ифрат Назимович Зилфикаров²,
Владислав Владиславович Верниковский¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11

E-mail: daironas@mail.ru

² ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений

117216, г. Москва, ул. Грина, 7

E-mail: dagfarm@mail.ru

Разработана технология получения из листьев ореха грецкого (*Juglans regia* L.) таблеток с порошком листьев, экстракта жидкого и сухого. Предложены методики стандартизации лекарственных растительных препаратов по содержанию суммы нафтохинонов. Методики валидированы по показателям линейность, специфичность, правильность, повторяемость, межоперационная точность.

Ключевые слова: орех грецкий; *Juglans regia*; лекарственные растительные препараты; экстракция.

Введение

Листья ореха грецкого (*Juglans regia* L., семейство *Juglandaceae*) содержат дубильные вещества, нафтохиноны, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, кумарины, сапонины, полисахариды, эфирное масло, алкалоиды, витамины [5, 6, 14, 15]. Такой разнообразный химический состав обеспечивает антиоксидантное, антитоксическое, гепатопротекторное, гипохолестеринемическое и гипогликемическое действие, а также профилактическое при йододефиците [7-13].

Несмотря на широкий спектр фармакологических свойств, в Государственный реестр лекарственных средств России включены только два лекарственных растительных препарата – «Югланэкс» и «Тонзилгон», содержащие экстракт плодов и листьев ореха грецкого [2].

Цель работы – разработать технологию и методики стандартизации лекарственных растительных препаратов, полученных из листьев ореха грецкого.

Объекты и методы исследования

Листья ореха грецкого заготавливали Предгорном районе Ставропольского края в фазу начала плодоношения. Таблетки получали путём прессования порошка листьев, смешанного со вспомогательными веществами (эфиры целлюлозы, кальция стеарат, тальк). Также из листьев ореха грецкого получали экстракт жидкий и экстракт сухой, при выборе метода и экстрагента учитывая максимальный выход нафтохинонов из лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Результаты и обсуждение

Для изучения таблеток с порошком листьев ореха получали экспериментальные образцы методом прессования. Готовый продукт представлял собой таблетки плоскоцилиндрической формы светло-зелёного цвета.

Для разработки технологии экстракта из листьев ореха грецкого подбирали экстрагент, позволяющий оптимально извлекать как весь комплекс биологически активных веществ, так и нафтохиноны, обеспечивающие основные фармакологические свойства (таблица 1).

Таблица 1

Зависимость содержания биологически активных веществ от концентрации спирта этилового

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %	Содержание, % от суммы экстрактивных веществ	
		дубильных веществ	нафтохинонов
Спирт этиловый 95 %	19,08	5,71	0,72
Спирт этиловый 70 %	26,77	7,46	0,44
Спирт этиловый 50 %	27,18	8,32	0,23
Спирт этиловый 40 %	28,54	9,95	1,30

Таким образом, оптимальный экстрагент – спирт этиловый 40 %, который извлекает сумму нафтохинонов не только в виде липофильных агликонов, но и в гликозидированной форме.

В качестве возможных способов получения спиртового извлечения из ореха грецкого листьев были рассмотрены мацерация, дробная мацерация и реперколяция. Все указанные способы широко применяются в промышленности для получения спиртовых извлечений из ЛРС. Соотношение масса ЛРС – ожидаемый объём получаемого извлечения во всех случаях принималось 1 : 1. После завершения каждого из этапов или экстрагирования в целом, полученные извлечения сливались самотёком. Оставшийся после экстрагирования шрот отжимали, полученные сливы объединяли с соответствующими извлечениями. Объединённые извлечения отстаивали при температуре 8-10 °С в течение 2 суток, после чего фильтровали через бумажный фильтр.

Оценку качества полученных экстрактов проводили по содержанию сухого остатка, суммы нафтохинонов и суммы дубильных веществ (таблица 2).

Таблица 2

Содержание БАВ в экстракте в зависимости от метода его получения

Метод экстракции	Сухой остаток, %	Сумма нафтохинонов, мг %	Сумма дубильных веществ, %
Мацерация	3,47	28,2	1,41
Дробная мацерация	3,49	7,6	1,18
Реперколяция	7,47	20,4	2,46

Таким образом, оптимальным методом экстракции является реперколяция. Предложенный способ получения экстракта листьев ореха грецкого запатентован [4].

Полученный экстракт представляет собой жидкость тёмно-коричневого цвета с зеленоватым или красноватым оттенком со слабым специфическим запахом.

Способ получения сухого экстракта заключался в упаривании жидкого экстракта под вакуумом на роторном испарителе и последующем высушивании под вакуумом до достижения остаточной влажности не более 5 %. Полученная субстанция представляет собой гигроскопичный порошок от светло-коричневого до коричневого с зеленоватым оттенком цвета со слабым специфическим запахом.

Качественный анализ нафтохинонов в полученных лекарственных растительных препаратах проводили методом тонкослойной хроматографии (подвижная фаза петролейный эфир – диэтиловый эфир 10 : 3,5) по фармакопейной методике [1].

Хроматографировали испытуемый раствор и раствор стандартного образца (СО) юглона. Детекцию зон адсорбции проводили выдерживанием хроматографической пластинки над парами аммиака. Результат представлен в таблице 3.

Таблица 3

Результаты качественного анализа юглона в лекарственных растительных препаратах

Образцы ЛФ	R _f	Окраска	
		без обработки	после обработки парами аммиака
Таблетки с листьями ореха грецкого	0,8	жёлтая	светло-фиолетовая
Экстракт ореха грецкого листьев жидкий	0,8	жёлтая	светло-фиолетовая
Экстракт ореха грецкого листьев сухой	0,8	жёлтая	светло-фиолетовая
СО юглона	0,8	жёлтая	светло-фиолетовая

Как следует из данных, представленных в таблице 3, во всех разработанных лекарственных растительных препаратах идентифицирован юглол.

Для подтверждения подлинности порошка листьев ореха в составе таблеток изучали микропрепараты по стандартным методикам. При просматривании препаратов под микроскопом обнаружены фрагменты листа, на которых наблюдали диагностические признаки: сосуды с кристаллоносной обкладкой, эфирномасличные желёзки, друзы оксалата кальция, простые одноклеточные волоски, железистые многоклеточные волоски [3].

Также определяли среднюю массу одной таблетки ($0,3 \pm 0,001$ г), распадаемость (не превысила 15 мин), что соответствует требованиям ГФ XIII [1].

Для количественного определения суммы нафтохинонов в пересчёте на юглол измеряли оптическую плотность испытуемого раствора на фотоэлектроколориметре КФК-3-01 при длине волны 440 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали этиловый спирт 95 %. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора.

Пробоподготовку при анализе таблеток листьев ореха грецкого производили следующим образом: 20 таблеток растирали в ступке до получения однородного порошка, 1,0 г (точная навеска) которого помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта этилового 20 % и перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч. Затем смесь отстаивали в течение 15 мин и фильтровали через бумажный фильтр «красная лента», декантируя извлечение с порошка. Операцию повторяли еще 2 раза в тех же условиях. Фильтрат упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 85-90 °С до достижения объема около 20 мл. Остаток количественно с помощью 20 мл воды переносили в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 10 мл раствора железа (III) хлорида 1 %, 40 мл раствора кислоты хлористоводородной 8,3 %, присоединяли обратный холодильник и нагревали на водяной бане при температуре 60 °С в течение 1 часа.

Пробоподготовка при анализе экстрактов листьев ореха грецкого: 10 мл жидкого экстракта или около 0,5 г (точная навеска) сухого экстракта, растворённого в 20 мл воды дистиллированной, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 40 мл кислоты хлористоводородной разведённой и 10 мл раствора железа (III) хлорида 1 %, присоединяли обратный холодильник и нагревали на водяной бане при температуре 60 °С в течение 1 часа.

Далее анализ проводили по следующей схеме: с помощью 20 мл воды охлаждённую смесь переносили в делительную воронку вместимостью 250 мл и экстрагировали 40 мл эфира диэтилового в течение 2 мин. Эфирные извлечения последовательно фильтровали через бумажный фильтр с 2 г натрия сульфата

безводного в сухую колбу. Эфирное извлечение упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 40 °С досуха, остаток растворяли в 15 мл спирта 95 % и количественно с помощью 5 мл того же спирта переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем раствора доводили тем же спиртом до метки и перемешивали (испытуемый раствор).

Если оптическая плотность превышала 0,8, испытуемый раствор разводили спиртом этиловым 95 % и вычисляли коэффициент разведения (К).

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора юглона.

Приготовление раствора СО юглона: около 0,01 г (точная навеска) СО юглона помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл спирта 96 %, затем объем доводили тем же спиртом до метки и перемешивали (раствор А). 1,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки спиртом 95 % и перемешивали (раствор Б).

Содержание суммы нафтохинонов в таблетках в пересчете на юглон (X) и одну таблетку рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 0,3}{A_0 \cdot 20 \cdot 25},$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора;

a_0 – навеска юглона, г.

Содержание суммы нафтохинонов в экстракте жидком и сухом в пересчете на юглон (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 100}{A_0 \cdot V(a) \cdot 25},$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора;

$V(a)$ – объём жидкого экстракта, мл или навеска сухого экстракта, г;

a_0 – навеска юглона, г.

Эксперименты по каждому объекту проведены в шести повторностях. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4

Содержание нафтохинонов в пересчёте на юглон в лекарственных формах ореха грецкого листьев

Образец	X_i , мкг/таб. (таблетки), % (экстракты)	f	\bar{X}	$S^2 \cdot 10^{-7}$	S	P	T(P,f)	Δx	ε
Таблетки	172,1; 174,0; 176,2; 172,2; 170,1; 170,4	5	172,5	5,27	2,296	95	2,57	2,41	1,40
Экстракт жидкий	0,031; 0,029; 0,031; 0,030; 0,032; 0,032	5	0,031	2,5	0,0005	95	2,57	0,0012	3,98
Экстракт сухой	0,098; 0,10; 0,10; 0,092; 0,095; 0,10	5	0,10	20	0,0014	95	2,57	0,0035	3,59

Как следует из данных таблицы, погрешность определения во всех случаях не превышает 5 %, что является допустимым уровнем отклонения для использованного метода анализа и позволяет считать разработанные методики пригодными для стандартизации ЛФ.

Для подтверждения обоснованности выбора методики доказательства подлинности установлена специфичность процедуры ТСХ анализа. Для проведения испытания на подлинность изучали образцы лекарственных растительных препаратов трех серий по выше описанным методикам. Из каждой серии подготовлены две параллельные пробы.

На хроматограммах наблюдали зоны адсорбции с R_f 0,8 жёлтого цвета (при просматривании в дневном свете), меняющие окраску на фиолетовую при обработке парами аммиака, соответствующие зоне адсорбции СО юглона. Таким образом, аналитическая методика удовлетворяет критериям приемлемости.

Для подтверждения обоснованности выбора фотоколориметрического метода для количественного определения содержания суммы нафтохинонов в пересчете на юглон в разработанных лекарственных растительных препаратах проверяли линейность, специфичность, правильность, повторяемость и межоперационную точность. Результаты валидации представлены в таблице 5.

Таблица 5
Результаты валидации методики количественного определения суммы нафтохинонов в пересчёте юглон в экстрактах ореха грецкого листьев

Показатели	Критерий приемлемости	Установленные для экстракта	
		жидкого	сухого
Линейность	$y = a + bx$, $ r \geq 0,99$	$y = 0,003 + 0,001x$ $r = 0,999$	$y = 0,003 + 0,001x$ $r = 0,996$
Специфичность			
– открываемость, %	95 – 105	100,17	100,18
– относительная систематическая ошибка, δ %	≤ 5	0,73	0,77
Правильность, RSD (%)			
– открываемость, %	97 – 103	99,88	99,76
– относительная систематическая ошибка, δ %	≤ 3	0,27	0,32
Повторяемость, RSD (%)	≤ 2	0,38	1,70
Межоперационная точность, RSD (%)	≤ 3	0,40	1,80

Методика количественного определения содержания суммы нафтохинонов в пересчете на юглон и сухое вещество фотометрическим методом соответствует основным валидационным критериям приемлемости.

Выводы

В результате проведенного исследования разработаны таблетки, экстракт жидкий и экстракт сухой из листьев ореха грецкого. Предложены методики качественного и количественного анализа нафтохинонов (юглона) в лекарственных растительных препаратах. Методики валидированы и соответствуют критериям приемлемости.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 3 т. – XIII изд. – М., 2015. – <http://www.femb.ru/feml>.
2. Государственный реестр лекарственных средств. <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
3. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Микроскопический анализ таблеток ореха грецкого листьев // Молодые учёные в решении актуальных проблем науки: сб. тр. II Международная научно-практическая конференция: (Владикавказ, 13-15 мая 2011 г.). – Владикавказ, 2011. – Часть 1. – С. 199-202.

4. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н., Верниковский В.В. Способ получения экстракта листьев грецкого ореха. Пат. РФ 2632488, МПК А23L33/105, № 2015130718, заявл. 23.07.2015, опубл. 05.10.2017.

5. Дайронас Ж.В., Кулешова С.А., Пищукова И.В. Фитохимическое изучение листьев грецкого ореха как источника антиоксидантного средства // Химия растительного сырья. – 2010. – № 4. – С. 95-98.

6. Дайронас Ж.В., Пищукова И.В. Изучение состава липофильной фракции листьев ореха грецкого, произрастающего на Кавказских Минеральных Водах // Химия растительного сырья. – 2010. – № 4. – С. 91-93.

7. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая профилактическими свойствами при йодной недостаточности. Пат. РФ 2399297 МПК А23L 1/00. № 2009106643/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

8. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Пат. 2399313 РФ МПК А23L 1/30 Биологически активная добавка к пище, обладающая гепатопротекторными свойствами. № 2009106636/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

9. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая антиоксидантными свойствами. Пат. РФ 2399316 МПК А23L 1/30, № 2009106646/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

10. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая гипохолестеринемическими свойствами Пат. РФ 2399321 МПК А23L 1/30, № 2009106641/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

11. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая гипогликемическими свойствами Пат. РФ 2399322 МПК А23L 1/30, № 2009106645/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

12. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая гиполипидемическими свойствами Пат. РФ 2399323 МПК А23L 1/30, № 2009106647/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

13. Корнена Е.П., Красина И.Б., Харламов В.И., Пахомов А.Н., Косинкова И.А., Ханферян Р.А., Харченко А.Н. Биологически активная добавка к пище, обладающая антиоксидантными свойствами. Пат. РФ 2399324 МПК А23L 1/30, № 2009106649/13; заявл. 25.02.09; опубл. 20.09.10.

14. Cosmulescu S., Trandafir I, Nour V., Cosmulescu S. Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (*Juglans regia*) leaves // Pharm. Biol. – 2014. – Vol. 52, № 5. – P. 575-580.

15. Paudel P., Satyal P., Dosoky N.S., Maharjan S., Setzer W.N. *Juglans regia* and *J. nigra*, two trees important in traditional medicine: A comparison of leaf essential oil compositions and biological activities // Nat Prod Commun. – 2013. – Vol. 8(10). – P. 1481-1486.

Daironas J.V., Zilfikarov I.N., Vernikovskiy V.V. Development and standardization of herbal drugs from leaves of *Juglans regia* // Woks of the State Nikit. Botan. Gard. – 2018. – Vol. 146. – P. 153 – 158.

The technology of obtaining tablets with leaf powder, liquid and dry extract from leaves *Juglans regia* L. has been developed. Methods of standardization of herbal drugs on the content of the amount of naphthoquinones are proposed. The methods are validated by linearity, specificity, accuracy, repeatability, and interoperational accuracy.

Key words: *Juglans regia*; extraction; tablets.