Изучение лекарственного растительного сырья грецкого ореха

Н. В. Чебышев¹, А. В. Стреляева¹, Д. И. Лежава^{1*}, А. Н. Луферов¹, Н. В. Бобкова¹,
Н. В. Карташова¹, Р. М. Кузнецов¹

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Лежава Дианос Иванович. E-mail: dianos1993@mail.ru

Статья получена: 27.03.2019. Статья принята к печати: 05.09.2019

Резюме

Введение. Грецкий орех (*Juglans regia* L.) – лекарственное растение, содержащее большое количество биологически активных веществ. В качестве лекарственного сырья рядом авторов предлагается использовать листья грецкого ореха, в которых идентифицированы юглон, флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота и другие вещества. В настоящий момент разработана и предложена методика стандартизации данного вида сырья. Однако лекарственное растение грецкий орех может быть источником других видов сырья, таких как плоды грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, коры грецкого ореха, перегородок грецкого ореха. Данные виды лекарственного сырья содержат большое количество биологически активных веществ и обладают большим потенциалом фармакологической активности. Поэтому изучение с последующей стандартизацией лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и коры грецкого ореха является актуальным.

Цель. Целью исследования является изучение внешних признаков, микроскопии сырья коры грецкого ореха и плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и химического состава спиртового извлечения из данных видов сырья.

Материалы и методы. В работе использовались методы хромато-масс-спектрометрии, ТСХ.

Результаты и обсуждение. При описании внешних признаков и микроскопии были выявлены диагностические признаки как цельного, так и измельченного сырья, и порошка коры грецкого ореха, плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья коры грецкого ореха, представляет собой прозрачную жидкость бурого цвета. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурюю жидкость с ароматным запахом.

Заключение. Методом ТСХ в коре грецкого ореха идентифицирована галловая кислота. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения кумарины, органические кислоты. В спиртовом извлечении из коры грецкого ореха определены маркерные соединения, совокупность которых делает возможным быструю идентификацию данного вида сырья методом хромато-масс-спектрометрии.

Ключевые слова: грецкий орех, кора грецкого ореха, плоды грецкого ореха.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Благодарности. Поддерживается «Проектом повышения конкурентноспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-исследовательских центров: 5-топ 100» (Сеченовский Университет).

Вклад авторов. А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, А. В. Стреляева придумали и разработали эксперимент. Н. В. Карташова и Р. М. Кузнецов провели валидацию методики анализа. Д. И. Лежава, Н. В. Карташова и Р. М. Кузнецов выполнили эксперимент. Д. И. Лежава и Н. В. Карташова участвовали в написании статьи. Все авторы обсудили результаты и внесли свой вклад в окончательную рукопись.

Для цитирования: Чебышев Н. В., Стреляева А. В., Лежава Д. И., Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Карташова Н. В., Кузнецов Р. М. Изучение лекарственного растительного сырья грецкого ореха. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 38–46.

Investigation of Walnut Herbal Drug Raw Material

Nikolay V. Chebyshev¹, Angelina V. Strelyaeva¹, Dianos I. Lezhava^{1*}, Alexander N. Luferov¹,
Natalya V. Bobkova¹, Natalya V. Kartashova¹, Roman M. Kuznetsov¹

1 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Dianos I. Lezhava. E-mail: dianos1993@mail.ru

Received: 27.03.2019. Accepted: 05.09.2019

Abstract

Introduction. Walnut (*Juglans regia* L.) is a medicinal plant containing a large number of biologically active substances. A number of authors propose to use walnut leaves as medicinal raw materials, in which juglone, flavonoids, tannins, ascorbic acid and other substances are identified. Currently, a standardization technique for this type of raw material has been developed and proposed. However, the medicinal plant walnut can be a source of other types of raw materials, such as milky-waxed walnuts, walnut bark, and walnut partitions. These types of medicinal raw materials contain a large number of biologically active substances and have a great potential for pharmacological activity. Therefore, the study with the subsequent standardization of medicinal plant material of walnut fruits in the stage of milky-wax ripeness and walnut bark is relevant.

Aim. The aim of the study is to study the external signs, microscopy of raw walnut bark and walnut fruit in the stage of milky-wax ripeness and chemical composition of alcohol extract from these types of raw materials.

Materials and methods. Chromato-mass spectrometry and TLC were used in the work.

Results and discussion. When describing external signs and microscopy, diagnostic signs of both whole and crushed raw materials, and powder of walnut bark, and fruits of walnut in the stage of milky-wax ripeness were revealed. Alcohol extract obtained from medicinal plant raw materials walnut bark is a clear brown liquid. Alcohol extract obtained from medicinal plant raw materials of walnut fruit at the stage of milky-wax ripeness is a transparent, green-brown liquid with a fragrant odor.

© Чебышев Н. В., Стреляева А. В., Лежава Д. И., Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Карташова Н. В., Кузнецов Р. М., 2019

© Chebyshev N. V., Strelyaeva A. V., Lezhava D. I., Luferov A. N., Bobkova N. V., Kartashova N. V., Kuznetsov R. M., 2019

Conclusion. Gallic acid was identified by TLC in walnut bark. Chromato-mass spectrometry in alcohol extraction from the fruit of walnut in the stage of milky-wax maturity was able to identify 17 compounds belonging to different classes of biologically active substances. Sugars, flavonoids, coumarin phenolic compounds, organic acids were identified. In alcoholic extraction from the bark of a walnut, marker compounds have been determined, the combination of which makes it possible to quickly identify this type of raw material using chromatography-mass spectrometry.

Keywords: walnut, walnut bark, walnut fruit.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Acknowledgements. Supported by the Russian Academic Excellence Project 5-100 (Sechenov University).

Contribution of the authors. Alexander N. Luferov, Natalya V. Bobkova, and Angelina V. Strelyaeva conceived of the presented idea. Angelina V. Strelyaeva developed the theory and performed the computations. Natalya V. Kartashova and Roman M. Kuznetsov verified the analytical methods. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript. Dianos I. Lezhava, Natalya V. Kartashova, and Roman M. Kuznetsov carried out the experiment. Dianos I. Lezhava wrote the manuscript with the support from Natalya V. Kartashova.

For citation: Chebyshev N. V., Strelyaeva A. V., Lezhava D. I., Luferov A. N., Bobkova N. V., Kartashova N. V., Kuznetsov R. M. Investigation of walnut herbal drug raw material. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 38–46.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внушительное количество ученых во всем мире занимаются поиском новых природных биологически активных веществ; доскональным изучением фармакологического действия известных биологически активных веществ то есть действия на отдельные системы и на организм в целом; занимаются поиском новых источников получения биологически активных веществ, более выгодных с экономической точки зрения. Этими источниками являются растения. Ученым дан природой широчайший выбор объектов для исследования. Одним из них и является грецкий орех (*Juglans regia* L.), семейство Ореховые (*Juglandaceae*), одно из народных названий которого – царский орех [1, 2].

Многие исследователи упоминали это лекарственное растение в своих научных работах, предварительно проводя множество экспериментов по изучению химического состава – это качественные реакции на основные группы БАВ, метод бумажной хроматографии, метод тонкослойной хроматографии. Проводился количественное определение УФ-спектрофотометрией и высокоэффективной жидкостной хроматографией [6, 15, 16, 18].

Качественными реакциями определен богатый химический состав. В лекарственном растении, присутствуют: хиноны (нафтохинон юглон, α - и β -гидроюглоны), флавоноиды (гиперозид, кемпферол), витамин В, аскорбиновая кислота, дубильные вещества, каротиноиды, фенольные кислоты, сиреневый альдегид, юглон (Mateja Colaric, 2005) – и это только в листьях [8–10, 23].

Зеленый околоплодник содержит гидроюглоны и дубильные вещества. В ядрах плодов грецкого ореха идентифицированы жирные масла, белковые вещества, витамины К и Р, аминокислоты [25]. Сырье грецкого ореха широко используется в народной медицине [7]. Ряд исследователей указывает на широкую фармакологическую активность различных видов сырья грецкого ореха. Так по данным ряда авторов (Márcia Carvalho, 2010) грецкий орех обладает выраженным противоопухолевым действием и антипролифера-

тивной активностью [12]. Экстракт из плодов грецкого ореха проявляет высокую противогрибковую, противомикробную и антиоксидантную активность [17, 19–21, 24]. Выявлено противогрибковое действие этанольного экстракта из корней грецкого ореха. Петролеумное извлечение из плодов грецкого ореха показало высокую антигельминтную активность и противопаразитарное действие [4, 13].

Целью исследования является изучение внешних признаков, микроскопии сырья коры грецкого ореха и плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, перегородок грецкого ореха и химического состава спиртового извлечения из данных видов сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили лекарственное растительное сырье плоды грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости и кора грецкого ореха, а также спиртовое извлечение из данного вида сырья. Материалом исследования служили образцы коры и плодов ореха грецкого (*Juglans regia* L.), собранные в Московской области, высушенные воздушно-теньевым способом и используемые в качестве лекарственного растительного сырья.

Плоды заготавливались в июне в стадии молочно-восковой зрелости.

Для выполнения срезов высушенная кора вымачивалась в смеси 95%-й этанол : глицерин : вода (1:1:1). Микроскопия готовилась по методике ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ XIII издания. [22]. Поперечные срезы исследовали с помощью светового микроскопа. (ЛОМО «МИКМЕД-5», Россия) на малом (10х/0,25) и большом (40х/0.65) увеличении.

Фотоснимки выполнялись с использованием цифровой фотокамеры Canon Digital IXUS 80 IS (Китай). Спиртовое извлечение готовили с использованием 96 % спирта по методике получения настойки матричной гомеопатической.

Компонентный состав образцов изучали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Исследование проводили на приборе фирмы Agilent Technologies, состоящем из: 1) газового хроматографа 7890 (колонка HP-5, 50 м × 320 × 1,05 мкм) и 2) масс-селективного детектора 5975 С с квадрупольным масс-анализатором. Температурная программа хроматографирования: при 40 °С – изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев до 250 °С со скоростью 5 °С/мин; при 250 °С – изотерма 15 мин; далее программируемый нагрев до 320 °С со скоростью 25 °С/мин; при 320 °С – изотерма 5 мин. Инжектор с делением потока 1:50. Температура инжектора 250 °С. Температура интерфейса 280 °С. Газ носитель – гелий; скорость потока – 1 мл/мин. Хроматограмма образцов – по полному ионному току. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов 70 эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне (m/z) от 20 до 450 со скоростью 2,5 скан/сек. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических линейных индексов удерживания. Относительное содержание (%) компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношения площадей хроматографических пиков (методом простой нормировки) [14].

Внешние признаки цельного сырья. Кору исследуют невооруженным глазом или с помощью лупы (10х), или стереомикроскопа (8х, 16х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного сырья» [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Свежее сырье представляет собой желобовидные куски коры, длиной 5–6 см, толщиной около 2–3 мм. Наружная поверхность коры гладкая с поперечными морщинками (рисунок 1). Имеются чечевички округлой формы. Внутренняя поверхность коры гладкая. В изломе край волокнистый. Цвет коры снаружи бурый и серовато-бурый, внутри желтовато-телесный. Запах слабый, при смачивании коры водой не усиливается. Вкус горьковатый (рисунок 1).

1.2. Высушенное сырье представляет собой желобовидные куски коры, некоторые свернуты трубочкой, длиной 5–6 см, толщиной около 2–3 мм. Наружная поверхность коры гладкая с поперечными морщинками (рисунок 1). Имеются чечевички округлой формы. Внутренняя поверхность коры гладкая. В изломе край волокнистый. Цвет коры снаружи бурый и серовато-бурый, внутри – желтовато-телесный, светло-коричневый. Запах слабый, при смачивании коры водой не усиливается. Вкус горьковатый.

1.3. Внешние признаки измельченного сырья. Кусочки коры различной формы, преимущественно прямоугольной, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет сырья от светло-коричневого, до темно-красно-коричневого. Возможен темно-се-

Рисунок 1. Свежее (А), высушенное (В) цельное сырье, высушенное измельченное сырье (С), порошок коры грецкого ореха (D)

Figure 1. Fresh (A), dried (B) whole raw materials, dried ground raw materials (C), walnut bark powder (D)

ро-коричневый цвет. Запах слабый, усиливающийся при намачивании. Вкус горький.

Порошок. Серовато – коричневого цвета, проходящий сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Запах слабый, своеобразный. Вкус горький.

1.4. Перидерма коры, собранной с 2–5-летних веток представлена главным образом многослойной феллемой (пробкой), состоящей из 4–6 слоев тонкостенных, в поперечном сечении таблитчатых клеток, окрашенных в коричневый цвет. Наружные слои пробки состоят из бесцветных омертвевших, чешуйчатых сдвигающихся клеток. Клетки феллодермы, расположенные под пигментированным слоем пробки – не окрашены, сдавлены и деформированы (рисунок 2А).

Под перидермой расположены 3–4 слоя колленхимных клеток, в поперечном сечении слегка тангентально удлинённых, с утолщенными стенками и с зеленовато-аморфным содержимым (рисунок 2В).

Паренхима первичной коры состоит из изодиаметрических полигональных или овальных клеток, стенки которых зачастую пронизаны порами. Некоторые паренхимные клетки содержат друзы оксалата кальция, зеленовато-аморфное содержимое и крахмал. Иногда в паренхиме первичной коры наблюдаются межклеточные полости.

Внутренняя зона первичной коры характеризуется наличием прерывистого «механического пояса», состоящего из групп каменистых клеток (склерейд) и механических волокон, образуя стереом первичной

Рисунок 2А. Поперечный срез коры грецкого ореха (масштабная линейка 100 мкм):

в – механические волокна; в.л. – вторичный луч; д – друза оксалата кальция; к – колленхима; н.ф. – наружные слои феллемы; п – перидерма; п.л. – клетки первичного луча; п.п.к. – клетки паренхимы первичной коры; с – стереом первичной коры («механический пояс»); с.кд – склереида; ф – феллема

Figure 2A. Cross-section of walnut bark (scale scale 100 microns):

v – mechanical fibers; v.l. – secondary beam; D – Druse calcium oxalate; k – collenchyme; nf – outer layers of felema; n – periderm; pp – cells of the primary beam; ppt – cells of the parenchyma of the primary cortex; c – stereo of the primary cortex («mechanical belt»); skd – sclereid; f – felema

Рисунок 2В. Фрагмент поперечного среза коры, зона перидермы, колленхимы и первичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

ф – феллема; н.ф. – наружные слои феллемы; к – колленхима

Figure 2B. Fragment of the cross-section of the cortex, periderm zone, collenchyma and primary cortex (scale scale 50 µm):

f – felema; nf – outer layers of felema; k – kollenhima

Рисунок 2С. Фрагмент поперечного среза коры, зона стереома первичной коры, участок «механического пояса» (масштабная линейка 50 мкм):

в – механические волокна; д – друза оксалата кальция; с.кд – склереида

Figure 2C. Fragment of the cross-section of the cortex, stereo-primary zone of the cortex, the section of the «mechanical belt» (scale line 50 microns):

v – mechanical fibers; D – Druse calcium oxalate; skd – sklereida

Рисунок 2Д. Фрагмент продольно-радиального среза коры, зона вторичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

в – механические волокна; д – друза оксалата кальция

Figure 2D. Fragment of the longitudinal-radial cut of the cortex, the zone of the secondary cortex (scale bar 50 µm):

v – mechanical fibers; d – druse calcium oxalate

Рисунок 2Е. Фрагмент поперечного среза коры, зона вторичной коры (масштабная линейка 50 мкм):

п.л. – клетки первичного луча; в – механические волокна

Figure 2E. Fragment of the cross-section of the crust, secondary crust zone (scale bar 50 µm):

p.l. – cells of the primary beam; v – mechanical fibers

коры (рисунок 2А). Волокна узкие, диаметром от 12 до 25 мкм, с очень толстыми стенками, пронизанными немногочисленными простыми порами, с точечной (иногда щелевидной) полостью. Более крупные в диаметре волокна могут встречаться небольшими

группами по 1–3, размер волокон в пучках несколько меньше. Разные по форме склереиды размером от 60 до 90 мкм имеют сильно утолщенные слоистые стенки с многочисленными поровыми канальцами (рисунок 2С).

Пучки волокон «механического пояса» – мощные, округлые в очертании, с ними скомплексованы группы каменных клеток, ориентированных тангентально или радиально, что согласуется с данными других авторов (Dayronas Zh.V., 2015) [3, 5]. Данные элементы стереома чередуются с участками клеток коровой паренхимы. В коре более старых веток стереом сформирован в виде сплошного кольца.

Во вторичной коре наблюдается типичная последовательность чередования слоев мягкого луба и пучков механических волокон, формирующих стереом (твердый луб) в виде нескольких тангентально ориентированных слоев, которые пронизаны первичными и вторичными сердцевинными лучами (рисунок 2А). Вторичные лучи – однорядные, мелкоклеточные. Клетки первичных лучей крупнее, имеют пористые стенки и формируют многорядные радиально ориентированные участки (рисунок 2Е).

Некоторые клетки мягкого луба содержат друзы оксалата кальция, диаметром от 8 до 27 мкм. На продольно-радиальных срезах видны целые тяжи кристаллоносной паренхимы, сопровождающие пучки механических волокон (рисунок 2D).

Таким образом, с целью стандартизации лекарственного растительного сырья – кора грецкого ореха, были установлены диагностически значимые анатомические признаки. К ним относятся: особенности строения перидермы, стереома первичной и вторичной коры, наличие кристаллических включений (друз оксалата кальция).

1.5. При смачивании внутренней поверхности коры каплей 1 % раствора железоммонийных квасцов наблюдается зеленовато-черное окрашивание (рисунок 3).

Рисунок 3. Результаты гистохимической реакции цельной коры грецкого ореха (А) и порошка коры грецкого ореха (В) с 1 % раствором железоммонийных квасцов и результат реакции порошка коры грецкого ореха с 5 % NaOH (С)

Figure 3. The results of the histochemical reaction of whole walnut bark (A) and walnut bark powder (B) with a 1 % solution of iron ammonium alum and the result of the reaction of walnut bark powder with 5 % NaOH (C)

Качественные реакции. Измельченную кору в количестве 0,1 г кипятят в течение 2–3 мин с 10 мл воды, охлаждают и фильтруют. К 1 мл фильтрата прибавляют 2–3 капли 1 % раствора железоммониевых квасцов: наблюдается черное окрашивание.

На кору наносят 2–3 капли 5 % раствора гидроксида натрия: наблюдается фиолетово-коричневое окрашивание.

Порошок помещают на предметное стекло и капают 2–3 капли 1 % раствора железоммониевых квасцов: наблюдается синее окрашивание, переходящее в черное (гидролизуемые дубильные вещества).

Порошок помещают на предметное стекло и капают 2–3 капли 5 % раствора гидроксида натрия: наблюдается желтое окрашивание, переходящее в красное (фенольные соединения и производные антрахинона).

2. ТСХ – анализ спиртового извлечения коры грецкого ореха.

На линию старта готовой хроматографической пластинки со слоем силикагеля «Сорбфил» наносят раздельно полосами длиной 10 мм 20 мкл (0,02 мл) испытуемой настойки и 5 мкл (0,005 мл) 0,1 % раствора РСО галловой кислоты и хроматографируют восходящим способом в системе растворителей хлороформ : кислота уксусная ледяная : этанол : вода (15:8:3:2) на высоту 10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе до удаления следов растворителей и рассматривают в УФ – свете при длине волны 365 нм.

В УФ – свете при длине волны 365 нм на хроматограмме 0,1 % раствора РСО галловой кислоты должна обнаруживаться зона коричневого цвета с Rf около 0,75.

В УФ – свете при длине волны 365 нм на хроматограмме должны обнаруживаться зоны коричневого цвета с Rf около 0,5; 0,9; дополнительно могут быть обнаружены зоны: коричневого цвета с Rf около 0,4 (рисунок 4).

Рисунок 4. Хроматограмма спиртового извлечения из коры грецкого ореха на обнаружение галловой кислоты:

А – извлечение из коры грецкого ореха; Б – государственный стандартный образец галловой кислоты)

Figure 4. Chromatogram of alcohol extraction from walnut bark for detection of gallic acid:

А – extraction of walnut bark; Б – state standard sample of gallic acid

В извлечении из коры грецкого ореха методом ТСХ были обнаружены дубильные вещества – галловая кислота.

Методом хромато-масс-спектрометрии было проанализировано спиртовое извлечение, полученное из коры грецкого ореха. Было идентифицировано 20 соединений, относящихся к разным классам: спиртам, кислотам, сахарам, кетонам, антраценпроизводным, терпенам, эфирам и прочим соединениям (таблица 1).

Таблица 1. Основные соединения, идентифицированные в спиртовом извлечении из коры грецкого ореха

Table 1. The main compounds identified in alcohol extraction from the walnut bark

№	Наименование	Формула	Rt, мин	%	Основные пики
1	2-гидроксипропановая кислота		19,18	1,84	45, 28, 29, 27, 43, 26, 74, 44, 56, 42
2	Цинеол		27,75	0,9	43, 81, 71, 108, 111, 41, 69, 84, 93, 55
3	Этил гидроген оксалат		29,38	0,08	44, 28, 31, 29, 27, 45, 74, 43, 26, 32
4	1,2-гидрокси-ацетогидразин		29,47	0,7	31, 32, 29, 28, 30, 44, 90, 62, 43, 42
5	Туйон		30,35	0,4	81, 41, 68, 110, 67, 69, 109, 95, 39, 55
6	2-оксипропановая кислота		30,96	1,03	43, 15, 44, 45, 42, 28, 29, 14, 18, 39
7	Камфора		31,93	9,63	95, 81, 69, 55, 108, 83, 67, 109, 68, 152
8	Маннопиранозид		34,56	0,34	43, 44, 29, 57, 41, 27, 31, 28, 55, 42
9	Триацетин		36,68	0,81	43, 103, 145, 116, 15, 115, 86, 44, 42, 73
10	О-ацетил – п-крезол		36,90	0,47	135, 150, 77, 107, 43, 136, 51, 39, 53, 151
11	1,3-диэтиловый эфир пирогаллола		37,80	2,01	154, 139, 111, 93, 96, 65, 39, 51, 155, 68

№	Наименование	Формула	Rt, мин	%	Основные пики
12	Этил-α-d-рибозид		38,657	2,03	60, 73, 47, 43, 75, 57, 74, 42, 45, 44
13	Сахароза		39,85	25,27	73, 57, 31, 43, 60, 61, 44, 71, 86, 45
14	1,6-ангидро-α-d-талопиранозид		41,38	4,23	60, 73, 57, 43, 42, 56, 55, 47, 71, 70
15	2-бензамид-оантрахинон		44,58	0,26	207, 105, 133, 151, 134, 132, 104, 77, 106, 18
16	Этил-α-D-глюкопиранозил		45,02	1,54	60, 42, 43, 73, 57, 47, 75, 45, 74, 71
17	Этил-α-D-глюкопиранозил		45,16	29,75	60, 42, 43, 73, 57, 47, 75, 45, 74, 71
18	Лактоза		45,67	4,86	73, 43, 60, 31, 61, 57, 85, 71, 29, 103
19	4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон		47,14	3,71	88, 101, 55, 41, 89, 43, 27, 57, 73, 70
20	Этиловый эфир пальмитиновой кислоты		56,42	4,61	160, 131, 132, 121, 39, 104, 77, 66, 64, 103

Было подсчитано относительное процентное содержание каждого компонента с учетом неидентифицированных пиков (диаграмма 1).

Диаграмма 1

Максимальное содержание приходится на сахара, а именно на сахарозу 25,27 %, на Этил- α -D-глюкопиранозил 29,75 %, и на лактозу 4,86 %.

Идентифицированы терпеновые соединения, общее содержание которых приходится практически на 2 место. Содержание камфоры – 9,63 %, содержание цинеола – 0,9 %, содержание туйона – 0,4 % (Диаграмма 1). Идентифицированы маркерные соединения производные юглона 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон и производное антрацена 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2H)-нафталенон. С данными соединениями связывают фармакологическую активность лекарственного растительного сырья.

В задачу исследований входило изучение сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости. Микроскопию плода готовили по общепринятой методике [4, 22]. Следует отметить наиболее важные диагностические признаки плодов: эпидермальные клетки «окончатого» строения; расположенные группами крупные овальные устьица аномоцитного типа; волоски простые, одноклеточные, толстостенные, соединенные по 2–4 в основании редко; волоски головчатые с 1–3- или многоклеточной однорядной ножкой и многоклеточной железистой головкой (редко) и округлые окрашенные места прикрепления простых и железистых волосков [4, 22].

При исследовании поперечного среза околоплодника видны: экзокарпий, состоящий из однослойного мелкоклеточного эпидермиса, покрытого слоем желтоватой кутикулы, трех-четырёхслойной колленхимы, подстилающей эпидермис, и почти непрерывного, неравномерного по толщине механического пояса, состоящего из толстостенных каменных клеток различной формы, пронизанных порами; мезокарпий, состоящий из крупных тонкостенных паренхимных клеток с зеленоватым зернистым содержанием, друзами оксалата кальция; в толще паренхимы беспорядочно разбросаны проводящие пучки, сосуды и трахеиды которых имеют преимущественно спиральную и лестничную утолщенность клеточных стенок (давленный препарат мезокарпия), а также каменные клетки с пористыми слоистыми, не очень толстыми стенками; эндокарпий (скорлупа), наружная часть которого (примыкающая к мезокарпию) состоит из склерифицированных пористостенных клеток, а внутренняя (примыкающая к семени) – из тонкостенных округлых паренхимных клеток. При исследовании микропрепарата семенной кожуры с поверхности видны: полигональные коричневатые клетки эпидермиса; очень крупные устьица с зияющей устьичной щелью и почковидными замыкающими клетками; под эпидермисом – проводящие пучки клетки паренхимы с каплями жирного масла. При исследовании микропрепарата поперечного среза семян (зародыша семени) видны: мелкие тонкостенные паренхимные клетки с зернистым содержанием; капли жирного масла в незрелом ядре встречаются редко [4, 22, 23, 26].

Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурюю жидкость с ароматным запахом. Методом хромато-масс-спектрометрии спиртового извлечения из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения и кумарины, юглон, органические кислоты.

Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха было идентифицировано 7 соединений, относящихся к производным нафтохинона, антрацена, и ситостерина (таблица 2)

Таблица 2. Основные соединения, идентифицированные в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха

Table 2. The main compounds identified in alcohol extraction from walnut partitions

№	Соединение	Структурная формула	RT, мин	Area	Area, %
1	Цис-6-терпинеол		14,618	21484	1,8
2	Туйон		15,800	27567	2,3
3	Транс-пинан		17,617	59772	4,9
4	6-этил-2,3,5,7-тетрагидрокси-1,4-нафтохинон		20,545	1342	0,1
5	7-изопропил-4а,8а-диметил-4а,5,6,7,8,8а-гексагидро-2(1H)-нафталенон		21,442	10283	0,8
6	9-этил-9,10-диметил-9,10-дигидроантрацен		23,877	4276	0,4
7	Ситостерол		26,170	610477	50,2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При описании внешних признаков и микроскопии были выявлены диагностические признаки как цельного, так и измельченного сырья, и порошка коры грецкого ореха, а также его плодов в стадии молочно-восковой зрелости.
2. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья кора грецкого ореха представляет собой прозрачную жидкость буро-

го цвета. Спиртовое извлечение, полученное из лекарственного растительного сырья плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости, представляет собой прозрачную, зелено-бурую жидкость с ароматным запахом. Методом ТСХ в коре грецкого ореха идентифицирована галловая кислота.

3. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости удалось идентифицировать 17 соединений, относящихся к различным классам БАВ. Были идентифицированы сахара, флавоноиды, фенольные соединения кумарины, органические кислоты. В спиртовом извлечении из коры грецкого ореха определены маркерные соединения, совокупность которых делает возможным быструю идентификацию данного вида сырья методом хромато-масс-спектрометрии. Маркерные соединения производные юглона 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2Н)-нафталенон и производное антрацена 4,5-дигидрокси-3,4-дигидро-1(2Н)-нафталенон. С данными соединениями связывают фармакологическую активность лекарственного растительного сырья.
4. Методом хромато-масс-спектрометрии в спиртовом извлечении из перегородок грецкого ореха было идентифицировано 7 соединений, в том числе, производные нафтохинонов и антрацена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриенко М. В., Затоковский Ф. Т. Грецкий орех в Приднестровье Садоводство и Виноградарство. М.: Медицина. 1989: 328.
2. Атлас лекарственных растений СССР. М.: ГИМЛ, 1962: 404.
3. Дайронас Ж. В., Пшукова И. В. Изучение состава липофильной фракции листьев ореха грецкого, произрастающего на Кавказских Минеральных Водах. *Химия растительного сырья*. 2010; 4: 91–93.
4. Щеглова Т. А., Курилов Д. В., Стреляева А. В. Изучение химического состава и антиоксидантной активности настойки матричной гомеопатической листьев шалфея лекарственного. *Фармация*. 2012; 3: 27–30.
5. Solar A., Colaric M., Usenik V., Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 2006; 106: 453–461. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.09.012.
6. Fernández-Agulló A., Pereira E., Freire M. S., Valentão P., Andrade P. B., González-Álvarez J., Pereira J. A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013; 42: 126–132. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
7. Залыгина Е. В., Кошечкина И. П., Подплетная Е. А. Противомикробная активность густого водно-спиртового экстракта незрелых плодов ореха грецкого. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe*. 2017; 1-1(17): 127–134.
8. Залыгина Е. В., Подплетная Е. А. Исследование противоязвенной активности густого экстракта незрелых плодов грецкого ореха на модели диклофенак-индуцированной язвы желудка крыс. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017; 10(3): 324–328.
9. Верниковский В. В., Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Хаджиева З. Д. Экстракция биологически активных веществ из сырья ореха грецкого: Современные подходы. *Фармация*. 2019; 1: 5–9. Doi: 10.29296/25419218-2019-01-01.
10. Carvalho M., Ferreira P. J., Mendes V. S., Silva R., Pereira J. A., Jerónimo C., Silva B. M. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 441–447. Doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
11. Raja V., Ahmad, S. I., Irshad M., Wani W. A., Siddiqi W. A., Shreaz S. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017; 27(4): 476–486. Doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.002.
12. Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Железникова А. С., Помогайбин А. В. Морфолого-анатомическое исследование рахисов и черешков листа ореха грецкого (*Juglans regia* L.) *Фундаментальные исследования*. 2014; 5-1: 102–108.
13. Dev T. N., Apraj V., Bhagwat A., Mallya R., Sawant L., Pandita N. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. Bark. *Pharmacognosy Journal*. 2011; 3(25): 39–43. Doi: 10.5530/pj.2011.25.7.
14. Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P. B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2287–2295. Doi: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
15. Labuckas D. O., Maestri D. M., Perello M., Martinez M. L., Lamarque A. L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*. 2008; 107: 607–612. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.051.
16. Abdallah I. B., Tlili N., Martinez-Force E., Gracia Pérez Rubio A., Perez-Camino M. C., Albouchi A., Boukhina S. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2015; 173: 972–978. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.095.
17. Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2326–2331. Doi: 10.1016/j.fct.2008.03.017.
18. Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnuts (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2103–2111. Doi: 10.1016/j.fct.2008.02.002.
19. Colaric M., Veberic R., Solar A., Hudina M., Stampar F. Phenolic Acids, Syringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L. J. Agric. *Food Chemistry*. 2005; 53: 6390–6396. Doi: 10.1021/jf050721n.
20. Горлов И. Ф., Юрина И. С. и др. Заявка № 2000128372/13(030034) на патент на изобр.: Способ получения экстракта грецких орехов молочно-восковой спелости в авиационном керосине, 13.11.2000.
21. Самылина И. А., Стреляева А. В., Лазарева Н. Б., Садыков В. М. Гомеопатические препараты из фармакопейного лекарственного растительного сырья: Учебное пособие. М.: ООО Издательство «Медицинское информационное агентство», 2012: 432.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. 2015. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1.html/HTML/
23. Самылина И. А., Ермакова В. А., Бобкова Н. В., Аносова О. Г. Лекарственное растительное сырье, сборы. Растительные порошки. Лекарственные средства на основе измельченного сырья. Фармакогнозия атлас. Том 3. Издательская группа «ГЭОТАР – Медиа». 2009: 448.
24. Орлова О. Ю., Насонова Ю. К. Использование грецкого ореха молочно-восковой спелости для разработки функциональных продуктов питания. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств*. 2014; 2: 20.
25. Ермакова В. А., Бобкова Н. В., Самылина И. А. Микроскопическое исследование незрелых плодов грецкого ореха. «Традиционная медицина – 2007» Сборник научных трудов конгресса. М.: изд-во «Федерального научного клинико-экспериментального центра традиционных методов диагностики и лечения Росздрава – 2007». 2007: 43–47.
26. Дайронас Ж. В. Морфолого-анатомическое изучение коры ореха грецкого (*Juglans Regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) и ореха чёрного (*Juglans nigra* L.) *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 1-2: 234.

REFERENCES

- Andrienko M. V., Zatokovsky F. T. Walnut in Transdnistria Sadovodstvo and Vinogradarstvo. M.: *Meditsina*. 1989: 328 (in Russ.).
- Atlas of Medicinal Plants of the USSR. M.: *GUGK*. 1962: 404 (in Russ.).
- Dayronas Zh. V., Pshukova I. V. Study of the composition of the lipophilic fraction of walnut leaves growing in the Caucasian Mineral Waters Chemistry of plant raw materials. *Chemistry of plant raw materials*. 2010. 4: 91–93 (in Russ.).
- Shcheglova T. A., Kurilov D. V., Strelyaeva A. V. The chemical composition and antioxidant activity of mother tincture from the leaves of *Salvia officinalis*. *Pharmacy*. 2012; 3: 27–30 (in Russ.).
- Solar A., Colaric M., Usenik V., Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 2006; 106: 453–461. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.09.012.
- Fernández-Agulló A., Pereira E., Freire M. S., Valentão P., Andrade P. B., González-Álvarez J., Pereira J. A. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013; 42: 126–132. Doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
- Zalygina E. V., Koshevaya I. P., Podpletynaya E. A. Antimicrobial activity of a thick aqueous-alcoholic extract of unripe walnut fruit. *Czasopismo Naukowe*. 2017; 1-1(17): 127–134 (in Russ.).
- Zalygina E. V., Podpletynaya E. A. Investigation of the antiulcer activity of a thick extract of unripe walnut fruit on a model of diclofenac-induced gastric ulcer of rats. *Topical issues in pharmaceutical and medical science and practice*. 2017; 10(3): 324–328. (in Ukraine).
- Vernikovskiy V. V., Dayronas Zh. V., Zilfikarov I. N., Khadzhieva Z. D. Extraction of biologically active substances from raw walnut raw materials: Modern approaches. *Pharmacy*. 2019; 1: 5–9 (in Russ.).
- Carvalho M., Ferreira P. J., Mendes V. S., Silva R., Pereira J. A., Jerónimo C., Silva B. M. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 441–447. Doi: 10.1016/j.fct.2009.10.043.
- Raja V., Ahmad, S. I., Irshad M., Wani W. A., Siddiqi W. A., Shreaz S. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017; 27(4): 476–486. Doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.002.
- Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Zheleznikova A. S., Pomogaybin A. V. Morphological-anatomical study of rachises and stalks of walnut leaf (*Juglans regia* L.) *Basic research*. 2014; 5-1: 102–108 (in Russ.).
- Dev T. N., Apraj V., Bhagwat A., Mallya R., Sawant L., Pandita N. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. Bark. *Pharmacognosy Journal*. 2011; 3(25): 39–43. Doi: 10.5530/pj.2011.25.7.
- Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P. B., Ferreira I.C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 2287–2295. Doi: 10.1016/j.fct.2007.06.004.
- Labuckas D. O., Maestri D. M., Perello M., Martinez M. L., Lamarque A. L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*. 2008; 107: 607–612. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.051.
- Abdallah I. B., Tlili N., Martinez-Force E., Gracia Pérez Rubio A., Perez-Camino M. C., Albouchi A., Boukhcina S. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2015; 173: 972–978. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.095.
- Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2326–2331. Doi: 10.1016/j.fct.2008.03.017.
- Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnuts (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 2103–2111. Doi: 10.1016/j.fct.2008.02.002.
- Colaric M., Veberic R., Solar A., Hudina M., Stampar F. Phenolic Acids, Syringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L. *J. Agric. Food Chemistry*. 2005; 53: 6390–6396. Doi: 10.1021/jf050721n.
- Gorlov I. F., Yurina I. S. et al. Application № 2000128372/13(030034) for a patent for an image: A method for obtaining an extract of walnuts of milky wax ripeness in aviation kerosene, 13.11.2000 (in Russ.).
- Samylina I. A., Strelyaeva A. V., Lazareva N. B., Sadykov V. M. Homeopathic preparations from pharmacopeial medicinal plant raw materials: Textbook. M.: *Publishing House «Medical Information Agency»*. 2012: 432 (in Russ.).
- Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. 2015. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML/ (in Russ.).
- Samylina I. A., Ermakova V. A., Bobkova N. V., Anosova O. G. Pharmacognosy atlas. Volume 3. *Publishing group «GEOTAR – Media»*. 2009: 488 (in Russ.).
- Orlova, O. Yu., Nasonova, Yu. K. The use of milky-wax ripeness for the development of functional foods. *Scientific journal NRU ITMO. Series: Processes and Food Production Equipment*. 2014; 2: 20 (in Russ.).
- Ermakova V. A., Bobkova N. V., Samylina I. A. Microscopic examination of immature walnut fruit. «Traditional Medicine – 2007» Collection of scientific papers of the congress M.: *Publishing house of the «Federal Scientific Clinical and Experimental Center for Traditional Diagnostic and Treatment Methods of Roszdrav – 2007»*. 2007: 43–47 (in Russ.).
- Dayronas Zh. V. Morphological and anatomical study of walnut (*Juglans regia* L.), gray walnut (*Juglans cinerea* L.) and walnut black (*Juglans nigra* L.) *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 1-2: 234 (in Russ.).