

Є. В. Залигіна, О. А. Подплетня, В. Ю. Слесарчук, К. В. Соколова

Отримання густих екстрактів з незрілих плодів горіха волоського та дослідження кількісного вмісту юглону в їхньому складі

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України», м. Дніпро

Ключові слова: екстракти густі водно-спиртові з незрілих плодів горіха волоського, юглон, біологічно активні речовини

Сьогодні спостерігається підвищення інтересу до вивчення фармакологічних властивостей лікарських рослин, наукового обґрунтування розробки нових фітопрепаратів і доцільності їхнього застосування. У першу чергу, це пов'язано з багатим на біологічно активні речовини (БАР) складом лікарської рослинної сировини (ЛРС) [1–2]. БАР лікарських рослин сприяють відновленню й нормалізації життєво важливих процесів, забезпечують організм необхідними мінералами та вітамінами, на певному рівні підтримують обмін речовин, відрізняються доброю переносимістю та успішно застосовуються за багатьох хронічних захворювань.

Нашу увагу привернув горіх волоський (ГВ) (*Juglans regia* L.). Відомо, що він широко застосовується в народній медицині. За даними джерел літератури відомо, що незрілі плоди ГВ містять гідролізовані таніни, похідні елагової кислоти, катехіни, похідні дикарбоксильованих кислот, нуклеїнові кислоти, амінокислоти та специфічну речовину – юглон [3–4]. Юглон (рис. 1) є представником фізіологічно активних сполук класу нафтохінонів – міститься в зеленій шкірці та плодах, листі, коренях, корі різних видів рослин родини горіхових (*Juglandaceae*).

З урахуванням специфічної присутності цієї сполуки в рослинах видів дерев роду Горіх, юглон є зручною речовиною для якісного та кількісного визначення фітохімічних препаратів,

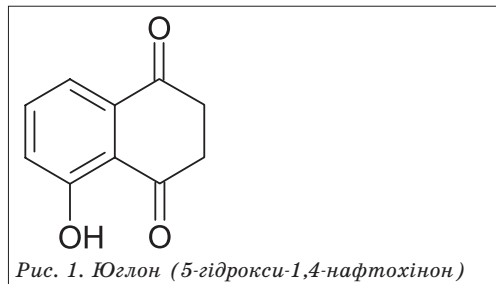
отриманих з означених рослин [5–6]. За даними літератури вміст юглону в різних частинах рослин роду Горіх складає 0,006–0,023 % [6–7], 0,04–0,21 % [8]. Цей показник коливається залежно від пори року, регіону вирощування, сорту та ін.

Доведено, що юглон у складі незрілих плодів ГВ виявляє антиоксидантну, цукрознижуючу, антипроліферативну, протимікробну, гастропротекторну, протизапальну дії [2–3, 9–12].

Мета дослідження – отримати густий водний і водно-спиртові екстракти з незрілих плодів ГВ, розробити методику визначення кількісного вмісту юглону в складі цих екстрактів, враховуючи широкий спектр фармакологічної дії БАР незрілих плодів ГВ і можливі перспективи отримання нових лікарських засобів на їхній основі.

Матеріали та методи. Екстракт густий водний (ЕГВ) та екстракти густі водно-спиртові з концентрацією екстрагенту – спирту етилового 30, 70 і 96 % (ЕГВС 30, ЕГВС 70, ЕГВС 96 відповідно) були одержані на базі НФаУ під керівництвом професора В. А. Георгіянц шляхом комплексної переробки незрілих плодів молочно-воскової стиглості ГВ (*Juglans regia* L.).

Визначення юглону в густих екстрактах з незрілих плодів ГВ проводили



методом ВЕРХ [5–8,13–15]. Розробку методики визначення проводили на аналітичному хроматографі Varian ProStar (США) у наступній комплектації: градієнтна система високого тиску ProStar 210 (s/n 03376, 03366); спектрофотометричний діодно-матричний детектор ProStar 330 (s/n 01286); авто-смплер ProStar 400 з об'ємом дозуючої петлі 20 мкл (s/n 40012); термостат для колонок ProStar 500 (s/n 00399) з використанням колонки Waters XBridge™ C18 3.5µm, 150·4.6, (s/n 0152320201) (колонка з нержавіючої сталі, заповнена октадецилсилільним силікагелем, довжина 150 мм, діаметр 4,6 мм, розмір часток 3,5 мкм), з предколоною. Спектри поглинання отримані на спектрофотометрі Specord-200 (Analytik Jena, Німеччина) у кюветах з товщиною шару 10 мм.

У роботі використовували наступні розчинники та реактиви: ацетонітрил «gradient grade» (Sigma-Aldrich), метанол «gradient grade» (Sigma-Aldrich), кислоту трифтороцтової (Fluka), воду для хроматографії (Millipore Direct-Q5).

Стандартні зразки, що було використано: 5-гідрокси-1,4-нафтохінон (Sigma-Aldrich, H47003-1G, Lot#STBC8900V).

Результати та їх обговорення. Для екстрагування використовували завчасно промиті водою нестигли плоди ГВ з перикарпом, які подрібнювали до однорідної маси. Густих водний і водно-спиртові екстракти з незрілих плодів ГВ готували наступним чином: подрібнені плоди поміщали в мірний посуд, додавали воду очищену або спирт етиловий 30, 70 чи 95 % у співвідношенні 1:1 та настоювали за температури 20 °С впродовж 7 діб у захищеному від світла місці, після чого піддавали ультразвуковій екстракції протягом 30 хв за температури 20 °С. Отримані екстракти відфільтровували. Фільтрати концентрували у вакуум-випарному апараті за температури 55–60 °С і тиску 80–87 кПа до густої консистенції. Отримані кінцеві продукти – густі маси темно-коричневого кольору та однорідного складу, зі специфічним запахом нафтохінонів, на смак солодкуваті, є розчинними в гідрофільних розчинниках і спиртах.

Наступним етапом стало визначення вмісту юглону в екстрактах за допомогою ВЕРХ, оскільки відповідно до джерел літератури більшість авторів досліджують уміст цієї речовини у ЛРС саме методом рідинної хроматографії з спектрофотометричним детектуванням [5–8, 13–15].

Розпочали дослідження з приготування випробовуваних розчинів, розчинів стандартного зразка та розробки методики визначення вмісту юглону.

Приготування розчинів стандартного зразка проводили наступним чином.

Юглон, ~1 мг/мл (RS_1407_01). 24,9 мг 5-гідрокси-1,4-нафтохінону поміщали в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додавали 10 мл суміші метанол – ацетонітрил (1:1) (субстанція не розчинилася в 5 мл метанолу), витримували до повного розчинення в ультразвуковій бані та доводили об'єм тим самим розчинником до позначки.

Юглон, ~0,1 мг/мл в ацетонітрилі (RS_1407_02). 1,0 мл розчину RS_1407_01 поміщали в мірну колбу місткістю 10 мл та доводили об'єм до позначки ацетонітрилом.

Юглон, ~0,1 мг/мл в підкисленому трифтороцтовою кислотою ацетонітрилі (RS_1407_03). 1,0 мл розчину RS_1407_01 поміщали в мірну колбу місткістю 10 мл та доводили об'єм до позначки сумішню ацетонітрил – трифтороцтова кислота (1000:1).

Юглон, ~0,01 мг/мл в ацетонітрилі (RS_1407_08). 1,0 мл розчину RS_1407_02 поміщали в мірну колбу місткістю 10 мл і доводили об'єм до позначки ацетонітрилом.

Юглон, ~0,01 мг/мл в підкисленому трифтороцтовою кислотою ацетонітрилі (RS_1407_09). 1,0 мл розчину RS_1407_03 поміщали в мірну колбу місткістю 10 мл та доводили об'єм до позначки сумішню ацетонітрил – трифтороцтова кислота (1000:1).

Концентрація юглону в стандартному розчині (0,01 мг/мл, або 0,001%) еквівалентна концентрації, яку вивчаємо в досліджуваних екстрактах (з урахуванням пробопідготовки це 0,05 % юглону). З урахуванням співвідношення сировина – екстрагент і даних літератури щодо вмісту юглону в сировині

в разі повного екстрагування концентрація його в екстрактах може скласти 0,006–0,20 %.

Приготування випробовуваних розчинів досліджуваних екстрактів. З досліджуваних екстрактів (отримували з використанням співвідношення ЛРС ГВ – екстрагент (1:1) і різних екстрагентів) приготовано випробовувані розчини. По 1,0 мл кожного з екстрактів поміщали в мірні колби місткістю 50 мл і доводили об'єм до позначки ацетонітрилом. Отримані розчини фільтрували через мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Випробовувані розчини для визначення юглону наведено в таблиці 1.

Для визначення придатної для детектування довжини хвилі за допомогою спектрофотометричного детектора були отримані спектри поглинання юглону в ультрафіолетовій і видимій ділянках спектра. Використовували розчини RS_1407_08 та RS_1407_09. Отримані спектри наведено на рисунках 2 і 3. Спектр в ацетонітрилі, що підкислений трифтороцтовою кислотою, отримали тому, що хроматографічні дослідження планували проводити в кислому середовищі. Максимуми поглинання для юглону в ацетонітрилі: 208,9 нм, 249,3 нм,

420,0 нм. У підкисленому ацетонітрилі внаслідок несуттєвого гіпсохромного зсуву максимуми становлять 208,9 нм, 247,6 нм, 420,0 нм.

Першим етапом розробки методики визначення юглону в досліджуваних екстрактах був підбір умов хроматографування, які наведено в таблиці 2. Як рухомі фази використовували суміші вода – ацетонітрил – трифтороцтова кислота (200 : 800 : 1, о/о/о, рухома фаза А) та ацетонітрил – трифтороцтова кислота (1000 : 1, о/о, рухома фаза Б). Визначення юглону проводили за співвідношення рухомих фаз А і Б (80 : 20). Програму градієнта наведено в таблиці 3. Градієнт у кінці хроматографування використовували з урахуванням можливої присутності в матриці компонентів, що не елюювалися би рухомою фазою з малим вмістом органічного компонента. Фрагмент хроматограми стандартного розчину наведено на рисунку 4.

Уміст юглону в екстрактах, у відсотках, визначали за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 50 \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 1000}$$

де S_0 – площа піка юглону з розчину стандарту;

Таблиця 1

Випробовувані розчини для визначення юглону методом ВЕРХ

Екстрагент вихідного витягу	Отриманий розчин	Зовнішній вигляд отриманого розчину	Колір розчину після фільтрування
Вода	RS_1407_04	Мутний	Безбарвний
30 % етанол	RS_1407_05	Опалесцюючий	Безбарвний
70 % етанол	RS_1407_06	Мутний (мутніший за ts_1407_04)	Безбарвний
96 % етанол	RS_1407_07	Прозорий	Жовтуватий

Таблиця 2

Умови хроматографування, що використовувалися для визначення юглону в досліджуваних екстрактах

Колонка	Waters XBridge™ C18 3.5µm, 150 • 4,6
Температура колонки	25 °C
Рухома фаза А	H ₂ O – MeCN – CF ₃ COOH (200:800:1, v/v/v)
Рухома фаза В	MeCN – CF ₃ COOH (1000:1, v/v)
Швидкість рухомої фази	1,0 мл/хв
Детектор	Спектрофотометричний
Довжина хвилі детектування	248 нм
Об'єм проби	20 мкл

**Програма градієнта хроматографування, яку використовували
для визначення юглону в досліджуваних екстрактах**

Час, хв	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0–20	80	20
20–21	80→10	20→90
21–26	10	90
26–27	10→80	90→20
27–30	80	20

S_1 – площа піка юглону з випробовуваного розчину;

m_0 – наважка стандартної речовини, мг;

P – уміст речовини в стандарті, %.

Теоретична межа визначення, яка розрахована з хроматограми стандартного розчину (з використанням співвідношення сигнал-шум (3:1) та в разі збереження лінійності інтенсивності сигналу детектора від концентрації в діапазоні 0,1–10,0 мкг/мл), складатиме менше 0,1 мкг/мл, що відповідає вмісту юглону в досліджуваних екстрактах (з урахуванням етапів прободготовки) в 0,0005% (5 ppm). Межа кількісного визначення складатиме менше ніж 0,3 мкг/мл.

Фрагменти отриманих хроматограм випробовуваних розчинів наведено на рисунках 5–8. Як видно з хроматограм, у випробовуваних розчинах, отриманих з екстрактів, де як екстрагент використано воду, 30 та 70 % етанол, пік юглону не зареєстровано. Таким чином, уміст юглону у відповід-

них екстрактах менший ніж 5 ppm. У випробовуваному розчині, отриманому з екстракту, де як екстрагент використано 96 % етанол, присутній пік малої інтенсивності (майже на межі визначення), що може належати юглону. У перерахунку на 1 мкг/г щодо ЛРС вміст юглону складає 1,09 мкг/г. Такий результат можна пояснити збільшенням здатності екстрагування поліфенольних сполук спиртом етиловим максимальної концентрації (96 %) порівняно з водою та водно-спиртовими розчинами (30 і 70 %).

Висновки

Було отримано густі водний і водно-спиртові (концентрація екстрагенту – спирту етилового 30, 70 і 96 %) екстракти шляхом комплексної переробки незрілих плодів молочно-воскової стиглості ГВ.

Визначення юглону в густих екстрактах з незрілих плодів ГВ проводили методом ВЕРХ. Розробку методики

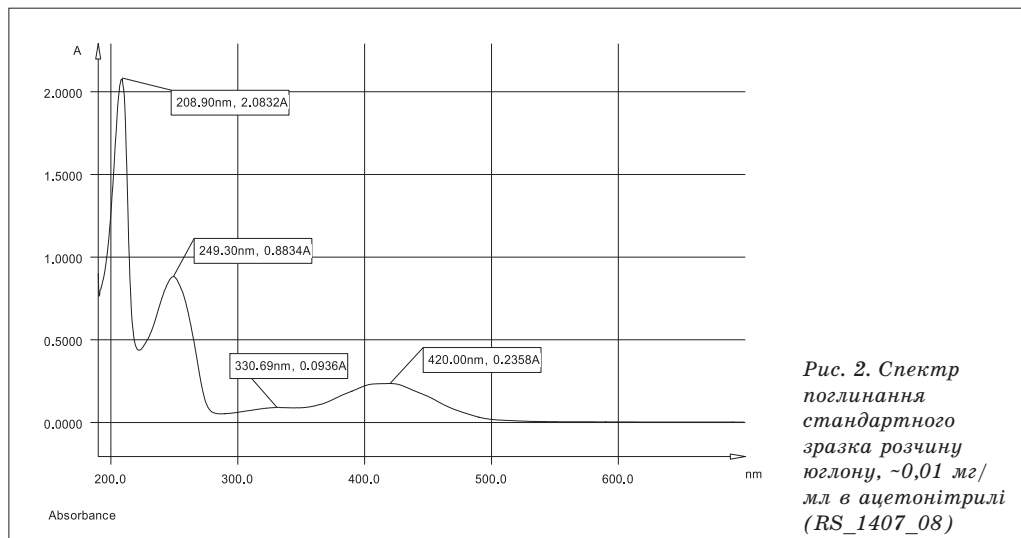


Рис. 2. Спектр поглинання стандартного зразка розчину юглону, ~0,01 мг/мл в ацетонітрилі (RS_1407_08)

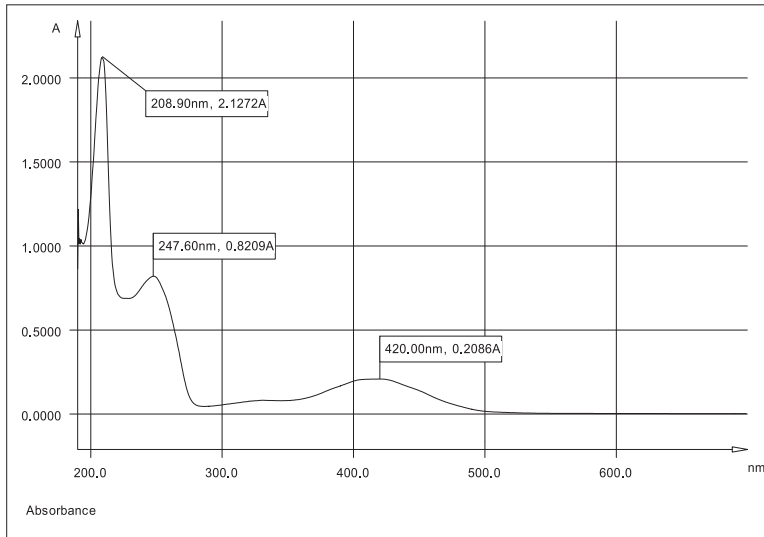


Рис. 3. Спектр поглинання стандартного зразка розчину юглону, ~0,01 мг/мл в підкисленому трифтороцетовою кислотою ацетонітрилі (RS_1407_09)

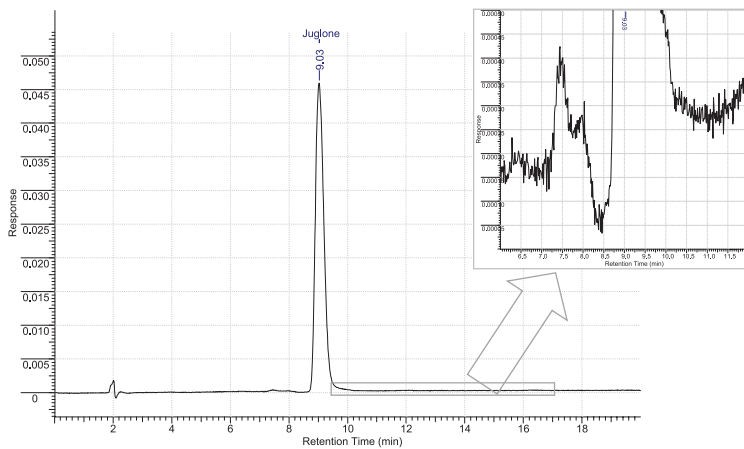


Рис. 4. Хроматограма стандартного зразка розчину юглону, ~0,01 мг/мл в ацетонітрилі (RS_1407_08)

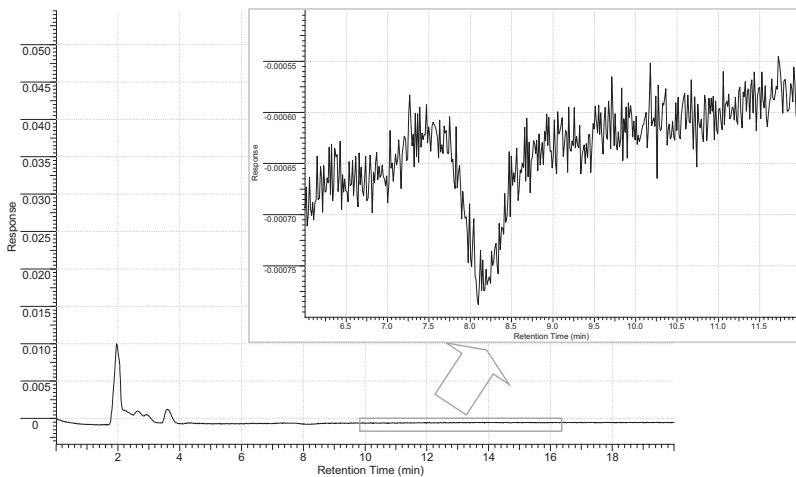


Рис. 5. Хроматограма випробовуваного розчину густого водного екстракту з незрілих плодів горіха волоського (RS_1407_04)

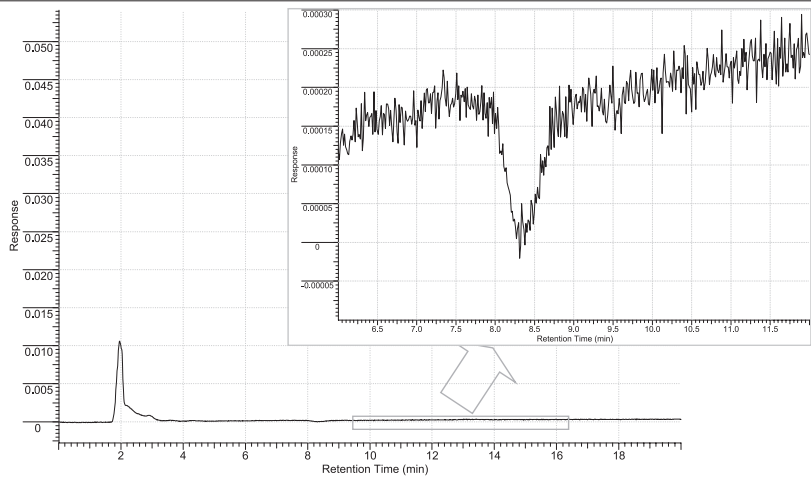


Рис. 6. Хроматограма випробовуваного розчину густого водно-спиртового 30 % екстракту з незрілих плодів горіха волоського (RS_1407_05)

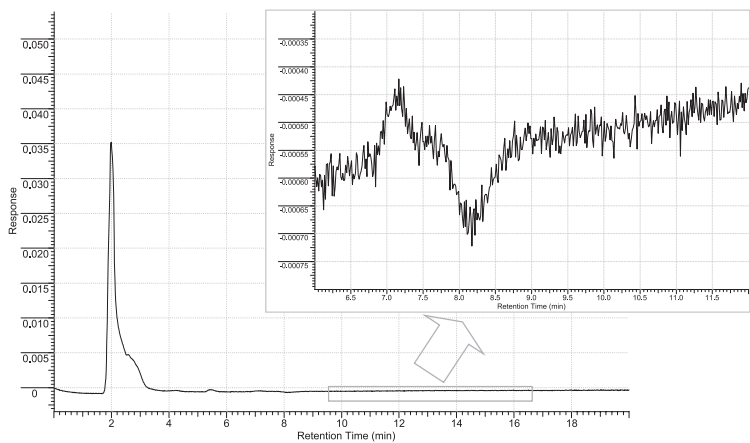


Рис. 7. Хроматограма випробовуваного розчину густого водно-спиртового 70 % екстракту з незрілих плодів горіха волоського (RS_1407_06)

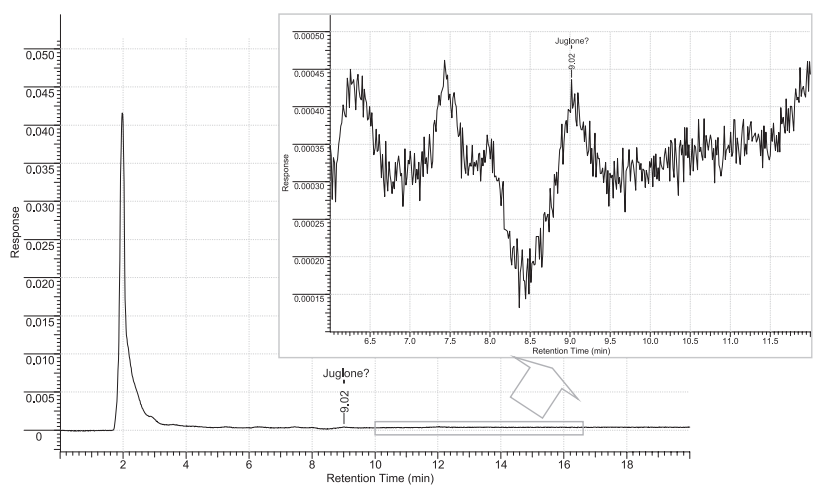


Рис. 8. Хроматограма випробовуваного розчину густого водно-спиртового 96 % екстракту з незрілих плодів горіха волоського (RS_1407_07)

визначення проводили на аналітичному хроматографі Varian ProStar. За результатами дослідження запропоновано ідентифікаційний маркер з нафтохінонів – юглон, що міститься в зеленій шкірці та плодах, листі, коренях, корі різних видів рослин родини горіхових (*Juglandaceae*). За допомогою ВЕРХ в екстрактах, де як екстрагент використано воду, 30 і 70 % спирт

етиловий, юглону виявлено не було. В екстракті, де як екстрагент використано 96 % етанол, уміст юглону становить близько 1 мкг/г. Такий результат можна пояснити збільшенням здатності екстрагування поліфенольних сполук спиртом етиловим максимальної концентрації (96 %) порівняно з водою та водно-спиртовими розчинами (30 та 70 %).

1. Ковальов В. М. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / В. М. Ковальов, О. І. Павлій, Т. І. Ісакова. – Харків : Прапор, 2000. – 703 с.
2. Солодовниченко Н. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати / Н. М. Солодовниченко, М. С. Журавльов, В. М. Ковальов. – Харків : Золоті сторінки, 2001. – 408 с.
3. Tree Nuts. (Walnut polyphenols: structures and functions); Ed. by Toshiyuki Fukuda. / Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health effects / Ed. by Cesarettin Alasalvar and Fereidoon Shahidi // Nutraceutical Science and Technology / Ed. by Fereidoon Shahidi. – Boca Raton/ London/ New York : CRC Press Taylor & Francis Grup, 2009. – 307 p.
4. Подходы к оценке эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств в современной фармацевтической практике / К. С. Давыдова, И. Е. Шохин, Г. В. Раменская, В. Г. Кукес // Вісник фармації. – 2010. – № 3 (63). – С. 66–68.
5. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves / J. S. Amaral, R. M. Seabra, P. B. Andrade [et al.] // Food Chemistry. – 2004. – V. 88. – P. 373–379.
6. Juglone content in leaf and green husk of five walnut (*Juglans regia* L.) cultivars / S. Cosmulescu, I. Trandafir, G. Achim [et al.] // Not Bot Hort Agrobot Cluj. – 2011. – V. 39, Is. 1. – P. 237–240.
7. *Cosmulescu S.* Variation of phenols content in walnut (*Juglans regia* L.) / S. Cosmulescu, I. Trandafir // South west J Horticult Biol Environ. – 2011. – V. 2, Is. 1. – P. 25–33.
8. *Nour V.* HPLC Determination of Phenolic Acids, Flavonoids and Juglone in Walnut Leaves / V. Nour, I. Trandafir, S. Cosmulescu // Journal of Chromatographic Science. – 2012. – P. 1–8.
9. *Залигіна Є. В.* Скринінгове дослідження противиразкової активності густих екстрактів незрілих плодів горіха волоського / Є. В. Залигіна, О. А. Подплетня // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. – № 6.
10. *Залигіна Є. В.* Експериментальне дослідження впливу густого екстракту з незрілих плодів горіха волоського на функціональні показники роботи шлунково-кишкового тракту / Є. В. Залигіна, О. А. Подплетня // Збірник матеріалів VIII Національного з'їзду фармацевтів України 13–16 вересня 2016 р. – Харків, 2016. – С. 45.
11. *Zalygina E. V.* Antimicrobial activity of thick aqueous-alcoholic extract of unripe walnut fruits / E. V. Zalygina, I. P. Koshova, E. A. Podpletnyaya // East European Scientific. – 2017. – № 1.
12. *Залигіна Є. В.* Дослідження гострої токсичності та протизапальної дії екстракту густого водно-спиртового з незрілих плодів горіха волоського / Є. В. Залигіна, О. А. Подплетня, В. Ю. Слесарчук // Український біофармацевтичний журнал. – 2017. – № 2 (49).
13. Simultaneous determination of 1,4-naphthoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection / P. Babula, R. Mikelova, D. Potěšil [et al.] // Biomed. Papers. – 2005. – V. 149 (Sup. 1). – P. 26–30.
14. *Mohammad Reza H.* Determination of Juglone (5-hydroxy 1,4-naphthoquinone) in *Pterocarya fraxinifolia* by RP-HPLC / H. Mohammad Reza, K. Kamyar // Iran. J. Chem. Chem. Eng. – 2006. – V. 25, Is. 4. – P. 73–76.
15. *Gevrenova R.* Determination of natural colorants in plant extracts by high-performance liquid chromatography / R. Gevrenova // J. Serb. Chem. Soc. – 2010. – V. 75, Is. 7. – P. 903–915.

Є. В. Залигіна, О. А. Подплетня, В. Ю. Слесарчук, К. В. Соколова **Отримання густих екстрактів з незрілих плодів горіха волоського та дослідження кількісного вмісту юглону в їхньому складі**

Мета дослідження – отримати густий водний і водно-спиртові екстракти з незрілих плодів горіха волоського, розробити методику визначення юглону, дослідити його кількісний уміст у складі цих екстрактів.

Екстракти були одержані шляхом комплексної переробки незрілих плодів молочно-воскової стиглості горіха волоського. Розробку методики визначення, дослідження вмісту юглону в складі екстрактів проводили з використанням ВЕРХ.

За допомогою методу ВЕРХ у густих екстрактах з незрілих плодів горіха волоського, де як екстрагент використано воду, 30 і 70 % спирт етиловий, юглону виявлено не було. У густому екстракті

з незрілих плодів горіха волоського, де як екстрагент використано 96 % етанол, уміст юглону становить близько 1 мг/г.

Таким чином, було виготовлено густі екстракти з незрілих плодів горіха волоського з використанням різних екстрагентів, розроблено методику визначення юглону з використанням ВЕРХ і визначено кількісний уміст цієї речовини в складі досліджуваних екстрактів.

Ключові слова: екстракти густі водно-спиртові з незрілих плодів горіха волоського, юглон, біологічно-активні речовини.

Е. В. Залыгина, Е. А. Подплетня, В. Ю. Слесарчук, Е. В. Соколова
Получение густых экстрактов из незрелых плодов ореха грецкого и исследование количественного содержания юглона в их составе

Цель исследования – получить густые водный и водно-спиртовые экстракты из незрелых плодов ореха грецкого, разработать методику определения юглона, исследовать его количественное содержание в составе этих экстрактов.

Экстракты были получены путем комплексной переработки незрелых плодов молочно-восковой спелости ореха грецкого. Разработку методики определения и исследование содержания юглона в составе экстрактов проводили с использованием ВЭЖХ.

С помощью метода ВЭЖХ в густых экстрактах из незрелых плодов ореха грецкого, где в качестве экстрагента использовали воду, 30 и 70% спирт этиловый, юглон обнаружен не был. В густом экстракте из незрелых плодов ореха грецкого, где как экстрагент использован 96 % этанол, содержание юглона составляет около 1 мг/г.

Таким образом, были изготовлены густые экстракты из незрелых плодов ореха грецкого с использованием различных экстрагентов, с помощью разработанной методики ВЭЖХ определено количественное содержание юглона в исследуемых экстрактах.

Ключевые слова: экстракты густые водно-спиртовые из незрелых плодов ореха грецкого, юглон, биологически активные вещества

I. V. Zalygina, H. A. Podpletnya, V. U. Slesarchuk, K. V. Sokolova
Obtaining of thick extracts from immature walnut fruit and researching the quantitative content of Juglon in their compositions

The aim of study – to obtain thick aqueous and hydroalcoholic extracts from immature walnut fruit, to develop a technique for determining juglon, to study its quantitative content in these extracts.

Extracts were obtained by means of complex processing of immature fruits of milk-wax ripeness of walnut. The development of the procedure for determining, and studying the content of juglon in the extracts were carried out by HPLC.

Using the HPLC method, it was found that in thick extracts of immature walnut fruit, where water 30 and 70 % ethyl alcohol were used as the extractants, no Juglon was detected. In thick extract of immature walnut fruit, where 96 % ethanol is used as an extractant, the content of juglon is about 1 µg/g.

Thus, the thick extracts from unripe walnut fruit were obtained using different extractants, a technique for juglon determining using HPLC was developed and quantitative content of this substance was determined in the extracts under study.

Key words: thick water-alcohol extracts from unripe walnut fruit, juglon, biologically active substances

Надійшла: 15 квітня 2018 р.

Контактна особа: Залыгіна Євгенія Володимирівна, викладач, здобувач, кафедра загальної та клінічної фармації, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», буд. 9, вул. Володимира Вернадського, м. Дніпро. 49044. Тел.: + 38 0 56 713 52 57, 713-52-37. Електронна пошта: avis.rara@hotmail.com