

АДСОРБЦИОННАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ЭТАНОЛЬНОГО ЭЛЮАТА ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ЗЕЛЁНЫХ ГРЕЦКИХ ОРЕХОВ+ЛИСТЬЯ (*LUGLANS REGIA L.*, СЕМЕЙСТВО ОРЕХОВЫЕ — *LUGLANDACEAE*) (Сообщение VI)

В. В. ПЛАТОНОВ¹, А. А. ХАДАРЦЕВ², Г. Т. СУХИХ³,
М. В. ВОЛОЧАЕВА³, И. В. ДУНАЕВА²

¹ ООО «Террапроминвест», Тула

² Тульский государственный университет, медицинский институт, Тула

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, Москва

Цель исследования — выполнить колоночную адсорбционную жидкостную хроматографию с целью получения этанольного элюата, после предварительного последовательного элюирования этанольного экстракта растворителями в порядке возрастания их полярности: *n*-гексан, толуол, хлороформ, ацетон; детально изучить химический состав данного элюата методами хромато-масс-спектрометрии и рентгено-флуоресцентной спектроскопии, с интенсификацией соединений, определяющих состав элюата, получением их масс-спектров, структурных формул, установлением природы микроэлементов. **Материалы и методы исследования.** Методами колоночной адсорбционной жидкостной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и рентгено-флуоресцентного анализа выполнено подробное исследование особенностей химического состава ацетонового элюата этанольного экстракта грецких орехов+листья. **Результаты и их обсуждение.** Изучены особенности химического состава этанольного элюата продукта колоночной адсорбционной жидкостной хроматографии этанольного экстракта, качественный состав и количественное содержание соединений, идентифицированных в первом, установлены хромато-масс-спектрометрией. Для 31 индивидуального соединения элюата получены масс-спектры и структурные формулы. Этанольный элюат характеризуется следующими показателями структурно-группового состава (масс.% от элюата): сложные эфиры фталевой кислоты — 52,14, кремний и серосодержащие соединения соответственно — 20,19 и 6,43, углеводороды — 15,38, гликозиды — 2,21, спирты — 1,92, карбоновые кислоты — 1,07, стерины — 0,89. Сделано предположение, что фармакологическое действие этанольного элюата, в основном, определяется набором свободных карбоновых кислот, а также фталевой, образующейся в результате биохимической и гидрологической переэтерификации её эфиров, содержащими соединениям, спиртами, гликозидами и стеринами. Кремнийорганические соединения в ходе гидролиза дают кремнезём в размере наночастиц, играющие роль переносчиков вышеперечисленных соединений к различным органам живого организма, а также дренажирование кровеносных сосудов от продуктов метаболизма клеток, например, холестерина, различных жиров и т.п. Проведена сравнительная характеристика химического состава всех элюатов этанольного экстракта, показана эффективность колоночной адсорбционной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: зеленый грецкий орех+листья, этанольный экстракт, жидкостная колоночная адсорбционная хроматография, этанольный элюат, хромато-масс-спектрометрия.

Цель исследования — выполнить колоночную адсорбционную жидкостную хроматографию с целью

получения этанольного элюата, после предварительного последовательного элюирования этанольного

экстракта растворителями в порядке возрастания их полярности: н-гексан, толуол, хлороформ, ацетон; детально изучить химический состав данного элюата методами хромато-масс-спектрометрии и рентгено-флуоресцентной спектроскопии, с интенсификацией соединений, определяющих состав элюата, получением их масс-спектров, структурных формул, установлением природы микроэлементов. С учетом всего комплекса полученных сведений определить возможные направления фармакологического действия рассматриваемого растительного препарата. Показать высокую эффективность применения колоночной адсорбционной жидкостной хроматографии для разделения сложных по составу экстрактов, например, этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья.

Материалы и методы исследования

Исходным сырьем являются зелёные грецкие орехи и их листья, собранные до 24 июня. Согласно литературным данным данное сырье имеет следующие показатели химического состава и фармакологического действия [2–6, 8, 9–13].

Зелёные грецкие орехи и листья пропускают через мясорубку, помещают в стеклянную посуду, смешивают с этанолом с массовой долей 95%, последнюю помещают в темное прохладное место на 12 месяцев, при этом периодически встряхивают, получая этанольный экстракт, который в конце экстракции отфильтровывают и изучают химический состав хромато-масс-спектрометрией, ИК-Фурье спектроскопией, рентгено-флуоресцентной спектроскопией.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения особенностей химического состава этанольного элюата. Условия хромато-масс-спектрометрии следующие: хромато-масс-спектрометрия осуществлялась с использованием газового хроматографа GC-2010, соединенного с тройным квадрупольным масс-спектрометром GCMS-TQ-8030 под управлением программного обеспечения (ПО) GCMS Solution 4.11 [7,15].

Результаты и их обсуждение

Характеристика исходного сырья, его химический состав, фармакологическое действие различных препаратов, методика колоночной адсорбционной жидкостной хроматографии этанольного экстракта, с получением этанольного элюата, условия хромато-масс-спектрометрии приведены в [1,3].

Хроматограмма и масс-спектр этанольного элюата этанольного экстракта даны на рис. 1, 2.

Перечень соединений идентифицированных в этанольном элюате, их количественное содержание в нем приведены в табл. 1, результаты которой были использованы для расчета структурно-группового состава элюата.

Состав этанольного элюата этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья характеризуется высоким содержанием эфиров фталевой кислоты 52,14 (масс.% от элюата) при доминировании *Phthalic acid, di (2-pronylpentyl) ester* — 45,58% (масс.% от элюата). Это является отличительной особенностью этанольного элюата, так как во всех других элюатах (н-гексан, толуол, хлороформ, аце-

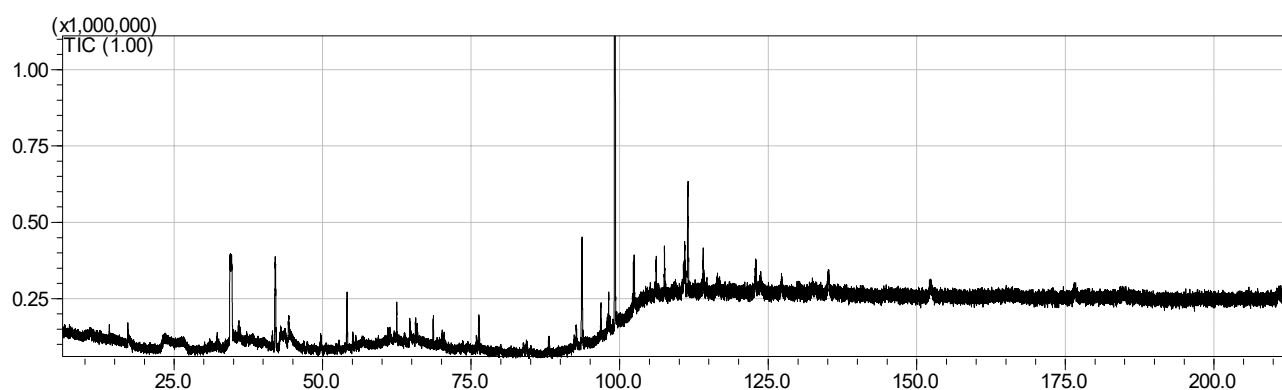


Рис. 1. Хроматограмма

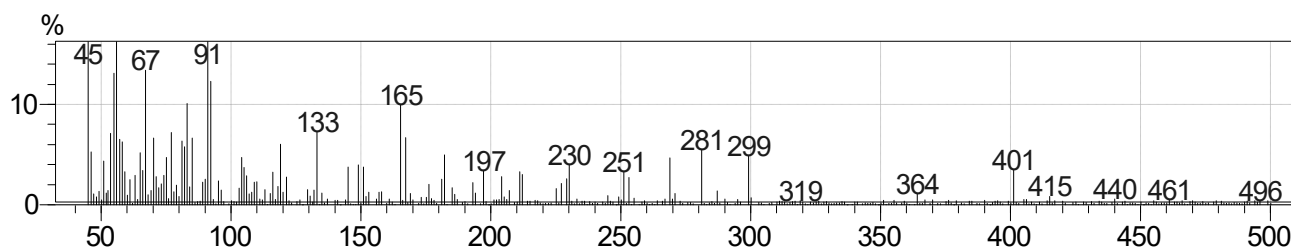


Рис. 2. Масс-спектр

Список соединений

1	34.493	11,99	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-
2	42.014	5,32	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-
3	42.937	2,21	Ethyl.alpha.-d-glucopyranoside
4	43.655	1,79	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis-
5	44.276	1,63	Silane, [(1,1-dimethyl-2-propenyl)oxy] dimethyl-
6	46.789	0,56	3-Trifluoroacetoxy pentadecane
7	49.684	1,02	1-Dodecanol, 3,7,11-trimethyl-
8	52.260	0,23	Hexestrol
9	55.096	0,4	1-Hexadecanol
10	55.576	0,41	2-Bromo dodecane
11	60.979	0,5	1-Heneicosanol
12	61.311	0,48	Nonane, 1-iodo-
13	63.764	0,17	Phthalic acid, isobutyl octadecyl ester
14	64.693	1,07	n-Hexadecanoic acid
15	65.650	0,84	9-Eicosene, (E)-
16	70.114	0,67	1-Dodecanesulfonyl chloride
17	70.429	0,36	Octadecane, 1-chloro-
18	75.881	0,95	10-Heneicosene (c, t)
19	84.304	1,19	Dodecane, 1-iodo-
20	92.340	0,4	1-Nonadecene
21	92.717	0,79	Decane, 2,3,5,8-tetramethyl-
22	93.630	5,76	(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide, trans-
23	98.127	1,44	Hexadecane
24	99.197	45,58	Phthalic acid, di(2-propylpentyl) ester
25	102.320	1,26	Tetratetracontane
26	102.460	1,25	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
27	106.143	1,39	Heptadecane, 4-methyl-
28	110.719	0,66	Ethyl iso-allocholate
29	110.927	2,7	Squalene
30	111.473	5,83	Phthalic acid, 3,3-dimethylbut-2-yl pentadecyl ester
31	116.458	1,15	Pentadecane, 8-hexyl-

тон-растворимая часть в ацетоне) до 80 (масс.% от элюата) приходилось на *Di-h*-октил *Phthalat*. Также, характерной особенностью рассматриваемого элюата является значительное содержание кремнийорганических соединений, с преобладанием среди них *Cycloheptasiloxan*, *tetradecamethyl* (11,99) и *Cyclooctasiloxan*, *hexadecamethyl* (5,32) (масс.% от элюата), соответственно. Кроме того, отмечено низкое содержание стероидов (*Hexesterol* и *Ethyl iso-allocholat*) — 0,89 и гликозидов, представленных только одним соединением — *Ethyl- α -glucopyranosid* (2,21), (масс.% от элюата); а также полное отсутствие азоторганических, но значительное содержание серосодержащих органических соединений: *1-Dodecanesulfonyl chlrorid* и *(2,3-Diphenyl cyclopropyl) methyl phenyl sulfoxid*, *trans-*; составляющих — 6,43 (масс.% от элюата) до 90% (от суммы) второго соединения.

Спирты представлены соединениями: *3,7,11-trimethyl Dodecanol-1* (C_{13}), *1-Hexadecanol* (C_{16}) и *1-Heneicosanol* (C_{21}) в количестве 1,92 (масс.% от элюата).

Этанольный элюат от других элеатов и этанольного экстракта [4–8] отличается набором углеводов, среди которых до 33,3 (масс.% от суммы углеводов) непредельных, 33,42 н-алканов, 21,65 — изоалканов (масс.% от суммы углеводов). Из аренов идентифицирован только *Benzen*, *1,1'-(1,3-propanediyl)bis* — 11,64 (масс.% от суммы углеводов). Следует отметить существенную замещенность углеводов микроэлементами (*Cl*, *Br*, *J*). На долю йодзамещенных соединений приходится — 10,86, бром- и хлорзамещенных — 2,67 и 2,34 (масс.% от суммы углеводов); причём, преобладание среди углеводов йодзамещенных является отличительной особенностью этанольного элюата перед другими элементами [4–8].

Карбоновые кислоты в данном элюате представлены только: *Hexadecanoic acid* — 1,07 (масс.% от элюата).

Альдегиды, кетоны и фенолы в составе этанольного элюата этанольного экстракта не обнаружены, что также является характерной особенностью первого, отсутствуют терпены, фуран- и пиранпроизводные кетонов, альдегидов, спиртов, которые селективно десорбировались с кремнезёма ацетоном [4–8].

Сравнительный анализ химического состава: н-гексанового, толуольного, хлороформного, растворимой и нерастворимой частей ацетонового и этанольного элеатов, структурных особенностей соединений, их группового распределения, масс-спектров, природы микроэлементов, прежде всего, позволяет сделать однозначный вывод о целесообразности использования, например, колоночной адсорбционной жидкостной хро-

матографии, для разделения на более простые по составу фракции. Одним из важных показателей данного вывода является детализация сложного по исходному составу этанольного экстракта количеством соединений идентифицированных во всех элюатах по сравнению с последним: 568 и 67, причём разделение приходило также с учетом структуры соединений. Так, например, основная доля стероидов сконцентрировалась в толуольном, а также н-гексановом и в растворимой в ацетоне части ацетонового элюата, они практически отсутствуют в хлороформном и крайне малое со-

держание в нерастворимой части ацетонового элюата и в этанольном элюате [4–9]; максимум содержания эфиров фталевой кислоты характерен для хлороформного элюата [6], а минимальная — для нерастворимой в ацетоне части ацетоновые элюата. Гликозиды отсутствуют в первых трёх элюатах [4–6] и сконцентрированы — 49,77 (масс.% от элюата) в нерастворимый в ацетоне части ацетонового элюата [8], аналогичная закономерность характерна и для определения, как по количественному содержанию, так и по набору соединений, для фенолов [8]. Максимальное содержание углеводов, причём обогащенных аренами, терпенами и циклоалкан, алкенами и алкинами отмечено для н-гексанового и толуольного экстрактов, в которых также значительно содержание фуранов и пиранов, замещённых, преимущественно кетонными группами.

Производные фурана и пирана, азотосодержащие структуры не характерны для этанольного элюата [9], но присутствуют серосодержащие соединения. Карбоновые кислоты селективно десорбированы ацетоном и концентрированы в нерастворимой в ацетоне части ацетонового элюата [8]. Всего на данную часть приходится 70,5 (масс.% от этанольного экстракта). Эффективность колонной адсорбционной жидкостной хроматографии при разделении этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья наглядна и при сравнении хроматограмм (рис. 1–6).

Комплекс полученных соединений об особенностях химического состава элюатов этанольного экстракта указывает на различную направленность фармакологического действия элюатов, которая обязательно должна учитывать их структурно-групповой состав, а самое главное, структуру соединений, особенно, терпенов, стероидов, сложных эфиров, свободных карбоновых кислот, фуран- и пиран, азот- и серосодержащих соединений, гликозидов, а среди углеводов — алкены и алкины, хлор, бром, фтор и йодзамещенные углеводороды.

Выводы:

1. Впервые выполнена колонная адсорбционная жидкостная хроматография на кремнезёме этанольная экстракта зелёных грецких орехов+листья, с получением 6 элюатов, которые были охарактеризованы хромато-масс-спектрометрией рентгено-флуоресцентной спектроскопией, позволившие интенсифицировать 568 индивидуальных соединений, относящихся к различным классам, для которых определено количественное содержание в каждом элюате, получены масс-спектры и структурные формулы, выполнен расчет структурно-группового состава элюатов.

2. Сделано заключение о достаточно высокой эффективности применения колонной адсорбционной жидкостной хроматографии при разделение сложного по составу этанольного экстракта последовательным элюированием растворителями в порядке возрастания их полярности.

3. Фармакологическое действие находится в зависимости от структурно-группового состава элюата, структуры соединений входящих в него, что предоставляет возможность применения каждого элюата со строгой специфичностью его фармакологического действия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Аслонова И.Ж., Кароматов И.Д., Тураева Н.И. Химический состав грецкого ореха // Биология и интегративная медицина. 2019. № 10 (38). С. 77–83.
2. Дайронас Ж.В. Сравнительный анализ эфирного масла листьев ореха грецкого, ореха серого и ореха чёрного // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 7. С. 16–20.
3. Лежава Д.И., Стреляева А.В., Сологова С.С., Кузнецов Р.М. Фармакогностическое изучение коры грецкого ореха и настойки, полученной из коры грецкого ореха. В сборнике: Актуальные вопросы фармации, фармакологии и клинической фармакологии. Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию фармацевтического фак-та ДГМУ. Махачкала, 2020. С. 101–108.
4. Литвиненко А.А., Дайронас Ж.В., Жилина О.М. Фармакогностическое исследование ореха грецкого цветков. В сборнике: Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сборник научных трудов. Пятигорск, 2020. С. 67–73.
5. Литвиненко А.А., Мыкоц Л.П., Жилина О.М., Степанова Н.Н. Изучение адсорбционных свойств природных сорбентов, полученных из ореха грецкого (*Juglans Regia* L.). В сборнике: Беликовские чтения. Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции. Пятигорск: Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 2020. С. 223–230.
6. Малышева З.Г. Мелиоративная способность насаждений ореха грецкого и ореха черного аккумулировать тяжелые металлы в надземной фитомассе // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2015. № 106. С. 151–161.
7. Платонов В.В., Хадарцев А.А., Волочаева М.В., Датищева Ф.С., Дунаева И.В. Адсорбционная жидкостная хроматография н-гексанового элюата этанольного экстракта зелёного грецкого ореха и его листьев (*Juglans Regia* L., семейство ореховые — *Juglandaceae*) (сообщение I) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. № 2. Публикация 3–3. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-2/3-3.pdf> (дата обращения: 13.04.2021). DOI: 10.24412/2075-4094-2021-2-3-3

8. Платонов В.В., Хадарцев А.А., Дунаева И.В., Сухих Г.Т., Волочаева М.В. Хромато-масс-спектрометрия этанольного экстракта зелёных грецких орехов и листьев (*Juglans regia* L., семейство ореховые — Juglandaceae) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2020. № 4. Публикация 3–1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-4/3-1.pdf> (дата обращения: 22.07.2020). DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16596
9. Стреляева А.В., Лежава Д.И., Луферов А.Н., Карташова Н.В., Кузнецов Р.М., Поддубиков А.В., Сидоров Н.Г. Стандартизация настойки матричной гомеопатической из плодов грецкого ореха в стадии молочно-восковой зрелости. В сборнике: Гомеопатический ежегодник — 2019. Сборник материалов XXIX научно-практической конференции. Москва, 2019. С. 209–211.
10. Сухих Г.Т., Датиева Ф.С., Платонов В.В., Волочаева М.В., Дунаев В.А. Адсорбционная жидкостная хроматография толуольного элюата этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья (*Juglans regia* L., семейство ореховые Juglandaceae) (сообщение II) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. № 3. Публикация 3–5. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-3/3-5.pdf> (дата обращения: 07.06.2021). DOI: 10.24412/2075-4094-2021-3-3-5
11. Хадарцев А.А., Сухих Г.Т., Платонов В.В., Волочаева М.В., Дунаев В.А., Датиева Ф.С. Адсорбционная жидкостная хроматография хлороформного элюата этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья (*Juglans Regia* L., семейство ореховые — Juglandacere) (сообщение III) // Вестник новых медицинских технологий. 2021. № 2. С. 93–96. DOI: 10.24412/1609-2163-2021-2-93-96.
12. Платонов В.В., Сухих Г.Т., Датиева Ф.С., Дунаев В.А., Волочаева М.В. Адсорбционная жидкостная хроматография ацетонового элюата растворимого в ацетоне этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья (*Juglans regia* L., семейство ореховые — Juglandaceae) (сообщение IV) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. № 4. Публикация 3–1. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/3-1.pdf> (дата обращения: 02.07.2021). DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-3-1
13. Хадарцев А.А., Платонов В.В., Сухих Г.Т., Волочаева М.В., Дунаев В.А., Яркова Т.А. Адсорбционная жидкостная хроматография ацетонового элюата нерастворимого в ацетоне этанольного экстракта зелёных грецких орехов+листья (*Juglans regia* L., семейство ореховые — Juglandaceae) (сообщение V) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. № 4. Публикация 3–5. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/3-5.pdf> (дата обращения: 26.07.2021). DOI: 10.24412/2075-4094-2021-4-3-5
14. Чу Э., Де Вита-младший В. Химиотерапия злокачественных новообразований / Пер. с англ. М., «Практика», 2009. 445 с.
15. Naumova N.L., Kameneva K.S., Shevieva K.V. About the possibility of modifying the recipe of "fitness" buckwheat bread by using walnut flour // Современная наука и инновации. 2020. № 2 (30). С. 66–72.

ADSORPTION LIQUID CHROMATOGRAPHY OF ETHANOL ELUATE OF ETHANOL EXTRACT OF GREEN WALNUTS+LEAVES (*JUGLANS REGIA* L., NUT FAMILY — JUGLANDACEAE) (MESSAGE VI)

V. V. PLATONOV, A. A. KHADARTSEV, G. T. SUKHOI, M. V. VOLOCHAEVA, I. V. DUNAIEVA

The aim of the study was to perform column adsorption liquid chromatography in order to obtain ethanol eluate, after preliminary sequential elution of ethanol extract with solvents in the order of their polarity: n-hexane, toluene, chloroform, acetone; to study in detail the chemical composition of this eluate by chromatography-mass spectrometry and X-ray fluorescence spectroscopy, with the intensification of compounds determining the composition of eluate, obtaining their masses -spectra, structural formulas, determination of the nature of trace elements. Materials and methods of research. A detailed study of the chemical composition of acetone eluate of ethanol extract of walnuts+ leaves was carried out using column adsorption liquid chromatography, chromato-mass spectrometry and X-ray fluorescence analysis. The results and their discussion. The features of the chemical composition of ethanol eluate of the product of column adsorption liquid chromatography of ethanol extract were studied, the qualitative composition and quantitative content of compounds identified in the first one were established by chromatography-mass spectrometry. Mass spectra and structural formulas were obtained for 31 individual eluate compounds. Ethanol eluate is characterized by the following indicators of structural and group composition (mass.% of eluate): esters of phthalic acid — 52.14, silicon and sulfur-containing compounds, respectively — 20.19 and 6.43, hydrocarbons — 15.38, glycosides — 2.21, alcohols — 1.92, carboxylic acids — 1.07, sterols — 0.89. It is assumed that the pharmacological effect of ethanol eluate is mainly determined by a set of free carboxylic acids, as well as phthalic acid, formed as a result of biochemical and hy-

drological transesterification of its esters containing compounds, alcohols, glycosides and sterols. Organosilicon compounds during hydrolysis give silica in the size of nanoparticles, which play the role of carriers of the above compounds to various organs of a living organism, as well as drainage of blood vessels from the products of cell metabolism, for example, cholesterol, various fats, etc. A comparative characteristic of the chemical composition of all ethanol extract eluates was carried out, the effectiveness of column adsorption liquid chromatography was shown.

Keywords: *green walnut+leaves, ethanol extract, liquid column adsorption chromatography, ethanol eluate, chromato-mass spectrometry.*