

ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ГИНГГО ДВУЛОПАСТНОГО С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ

Куркина А.В.¹, Калабухова Е.А.², Власова Г.И.², Демидова Г.А.², Авдеева Е.В.¹

¹Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия (443099, Самара, ул. Чапаевская, 89), e-mail: kurkina-av@yandex.ru

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», Самара, Россия (443070, Самара, ул. Партизанская, 33), e-mail: sert@obp.ru

В настоящей работе обсуждаются результаты исследований листьев гингго двулопастного (*Ginkgo biloba* L., сем. Гинкговых – *Ginkgoaceae*), по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья данного растения. Разработаны новые подходы к стандартизации листьев гингго двулопастного, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определено, что диагностическим флавоноидом листьев гингго двулопастного является гинкгетин. С учетом специфичности тилианина для листьев гингго двулопастного, является целесообразным использование методов ТСХ и ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение. Метод ВЭЖХ целесообразно использовать как для качественного анализа листьев гингго двулопастного, так и для целей стандартизации препаратов на основе сырья данного растения.

Ключевые слова: гингго двулопастный, *Ginkgo biloba* L., листья, флавоноиды, гинкгетин, никотифлорин, нарциссин, рутин, стандартизация, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, высокоэффективная хроматография.

THE SUBSTANTIATION OF THE NEW PATHWAYS TO THE STANDARDIZATION OF GINKGO BILOBA L. LEAVES BY MEANS OF METHOD OF HPLC

¹Kurkina A.V., ²Kalabukhova E.A., ²Vlasova G.I., ²Demidova G.A., ¹Avdeeva E.V.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: kurkina-av@yandex.ru

²Samara Centre of Certification of Pharmaceuticals, Samara, e-mail: sert@obp.ru

In the present paper are discussed the results of the investigations of *Ginkgo biloba* L. leaves (family *Ginkgoaceae*) on the substantiation of pathways to the standardization of this plant. There were substantiated the pathways to the standardization of *Ginkgo biloba* L. leaves, which are caused in the combined using of spectrophotometry, thin layer chromatography (TLC) and high liquid performance chromatography (HPLC). It was shown, that the predominant flavonoid for of *Ginkgo biloba* L. leaves is ginkgetin. Taking into account the specificity of ginkgetin for the of *Ginkgo biloba* L. leaves, is it appropriate to use the methods of TLC and HPLC for determining the authenticity of raw materials and phytopharmaceuticals by means of detection of the this flavonoid, which has diagnostic value. It is appropriate HPLC to use both for qualitative analysis of *Ginkgo biloba* L. leaves, and for the aims of standardization of phytopharmaceuticals of this plant.

Keywords: *Ginkgo biloba* L., leaves, flavonoids, ginkgetin, nicotiflorin, narcissin, rutin, standardization, spectrophotometry, thin layer chromatography, high liquid performance chromatography.

Введение

Гингго двулопастный *Ginkgo biloba* L. — единственный реликтовый вид класса Гинкговых (сем. *Ginkgoaceae*), который сохранился до нашего времени с пермского периода палеозойской эры [1, 6, 11]. Гингго двулопастный произрастает в странах с субтропическим климатом, однако возможности к адаптации этого растения очень высоки, о чем свидетельствует его успешное культивирование в Российской Федерации, в частности, в Краснодарском, Ставропольском краях, в Московской обл. [3, 4]. Листья гингго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) входят в Европейскую и Американскую фармакопеи, а

также включены в Государственный реестр лекарственных средств РФ [1, 3, 6]. На основе субстанций из листьев гинкго двулопастного в Российской Федерации применяются такие препараты, как танакан, билобил, мемоплант, гинкор форт, гинкор гель, однако они производятся за рубежом и являются дорогостоящими. Это обуславливает актуальность исследований в плане обоснования целесообразности создания импортозамещающих ноотропных препаратов на основе листьев гинкго двулопастного. Для успешного решения данной проблемы необходимой является разработка методов стандартизации, позволяющих объективно оценивать качество сырья и лекарственных препаратов данного растения.

На данный момент в Российской Федерации отсутствуют какие-либо виды нормативной документации на сырье «Гинкго двулопастного листа», причем до сих пор не решены в полной мере вопросы стандартизации сырья и препаратов гинкго, хотя определенный опыт в этом отношении имеется [3]. На основе результатов изучения компонентного состава флавоноидов листьев гинкго двулопастного ранее была разработана методика количественного определения суммы флавоноидов с использованием дифференциальной спектрофотометрии и Государственного стандартного образца рутина [2]. В плане дальнейшего совершенствования методов стандартизации листьев гинкго двулопастного особый интерес представляют такие методы, как тонкослойная хроматография (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [3, 12].

Цель исследования – научное обоснование новых подходов к стандартизации листьев гинкго двулопастного с использованием метода ВЭЖХ.

Материал и методы исследования

В качестве объектов исследования образцы листьев гинкго двулопастного, культивируемого в различных регионах Российской Федерации: Московская обл. (Ботанический сад Института физиологии растений РАН, г. Москва), Краснодарский край (Ботанический сад г. Краснодара), Ставропольский край (окр. г. Пятигорска).

В работе использованы тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и спектрофотометрия. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Воздушно-сухое растительное сырье подвергали исчерпывающему экстрагированию 70 % этиловым спиртом в соотношении «сырье – экстрагент» - 1:30. Анализ полученных водно-спиртовых извлечений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системе хлороформ-этанол-вода (26:16:3). В качестве стандартных веществ использовали гинкгетин (7,4¹-диметиламентофлавоноид) (1), никотифлорин (3-О-рутинозид кемпферола) (2), рутин (3-О-рутинозид кверцетина) (3) и нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина) (4) (рис. 1).

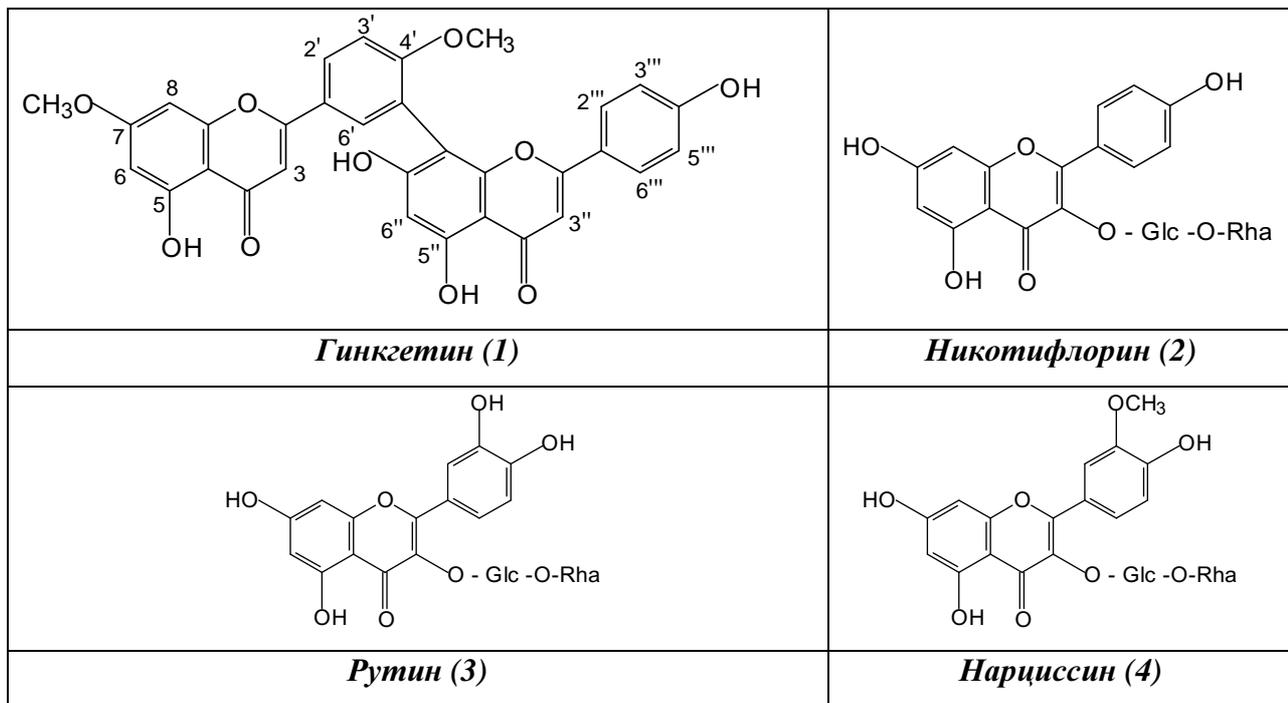


Рис. 1. Химические структуры важнейших флавоноидов листьев гинкго двулопастного.

Исследование водно-спиртовых извлечений из листьев гинкго двулопастного с помощью ВЭЖХ осуществляли с использованием хроматографа «Стайер» (ООО «НПО Аквилон», г. Подольск) и колонки размером 4,6 x 250 мм (стационарная фаза - октадецил силан С-18), объем вводимой пробы – 25 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смеси «ацетонитрил-вода» в соотношении (70:30). Скорость подачи элюента составила 2 мл/мин. Детектирование веществ осуществляли УФ-детектором при длине волны 270 нм. Скорость подачи элюента составила 2 мл/мин. Детектирование веществ осуществляли УФ-детектором при длине волны 270 нм. Качественный анализ проводили посредством регистрации времен удерживания веществ и сравнения спектральных отношений, причем как в условиях метода внутреннего стандарта, так и путем введения растворов индивидуальных веществ в хроматографическую колонку.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты сравнительного исследования методом ТСХ свидетельствуют о том, что на хроматограммах водно-спиртовых извлечений различных образцов являются гинкгетин (1) и никотифлорин (2) (рис. 2). После проявления хроматограммы щелочным раствором диазобензолсульфокислоты гинкгетин и изогинкгетин обнаруживаются в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета с величиной R_f около 0,8, а никотифлорин - в виде желтого пятна с величиной R_f около 0,6. Следует отметить, что на уровне гинкгетина

обнаруживается изогингетин, что соответствует данным зарубежных ученых, в работах которых близкие по химической структуре флавоноиды обнаруживаются в виде одного пятна [10]. Сопоставимую хроматографическую подвижность имеют также никотифлорин и нарциссин, которые в водно-спиртовых извлечениях и в лекарственном препарате «Танакан» обнаруживаются в виде одного пятна желтой окраски с величиной R_f около 0,6.

На наш взгляд, заслуживает внимания тот факт, что во всех исследуемых образцах листьев одним из доминирующих компонентов является соединение фенольной природы с величиной R_f около 0,7, тогда как в лекарственном препарате «Танакан» оно содержится в незначительных количествах. Что касается одного из доминирующих флавоноидов листьев - гинггетина, то это вещество в танакане не обнаруживается.

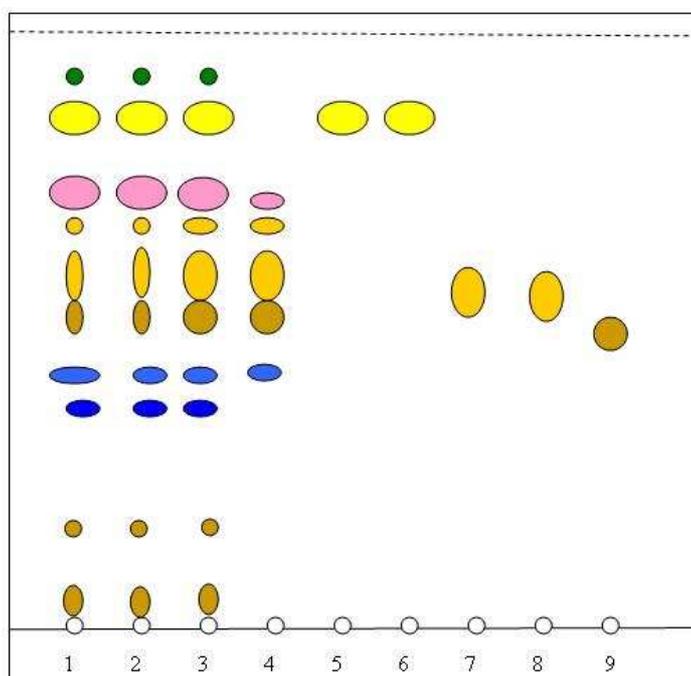


Рис. 2. Схема тонкослойной хроматограммы веществ и водно-спиртового извлечения из листьев гинкго двулопастного.

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из сырья (Ботанический сад г. Краснодара); 2 – водно-спиртовое извлечение из сырья (Ботанический сад Института физиологии растений РАН, г. Москва); 3 – водно-спиртовое извлечение из сырья (окр. г. Пятигорска); 4 – раствор препарата «Танакан»; 5 – гинггетин; 6 – изогинггетин; 7 – никотифлорин; 8 – нарциссин; 9 – рутин.

Изогинггетин обнаружен нами в качестве примеси в образце гинггетина, что соответствует данным зарубежных ученых, которые получили эти соединения в виде смеси [9]. Примечательно, что и в другой зарубежной работе гинггетин (7,4¹-диметиламентофлавон) и изогинггетин (4¹,4¹¹¹-диметиламентофлавон), будучи близкими по химической структуре, обнаруживаются в виде одного пятна [6]. На наш взгляд, определение гинггетина как одного из доминирующих и характерных флавоноидов листьев гинкго двулопастного имеет принципиальное значение. Во-первых, для гинггетина выявлена

ноотропная активность, свойственная препаратам гинкго [4, 7, 10], а во-вторых, имеются примеры, когда стандартизацию сырья данного растения осуществляют без учета наличия гинггетина: методом ВЭЖХ обнаруживаются лишь продукты кислотного гидролизата – кемпферол, кверцетин и изорамнетин [5], что, на наш взгляд, является ошибочным подходом. Что касается рутина, описанного в литературе для данного растения, то он относится к минорным компонентам и едва обнаруживается на хроматограммах (ТСХ). Интересно, по данным зарубежных ученых, в исследуемых образцах листьев гинкго двулопастного рутин относительно четко обнаруживается методом ТСХ лишь в сырье из Италии [8].

Учитывая то обстоятельство, что гинггетин (1), как один из доминирующих флавоноидов, имеет диагностическое значение, на наш взгляд, ТСХ-анализ может быть использован для целей идентификации сырья и препаратов данного растения.

Результаты сравнительного исследования электронных спектров водно-спиртовых извлечений образцов листьев гинкго двулопастного, культивируемого в различных регионах России, свидетельствуют о том, что для всех образцов сырья характерен основной максимум поглощения в области $270 \text{ нм} \pm 1 \text{ нм}$ (рис. 3).

Гинггетин (1), имея максимумы поглощения при 270 и 330 нм, в значительной мере определяет спектральные характеристики водно-спиртового извлечения из листьев гинкго двулопастного (рис. 3), может быть также использовано для целей идентификации сырья данного растения.

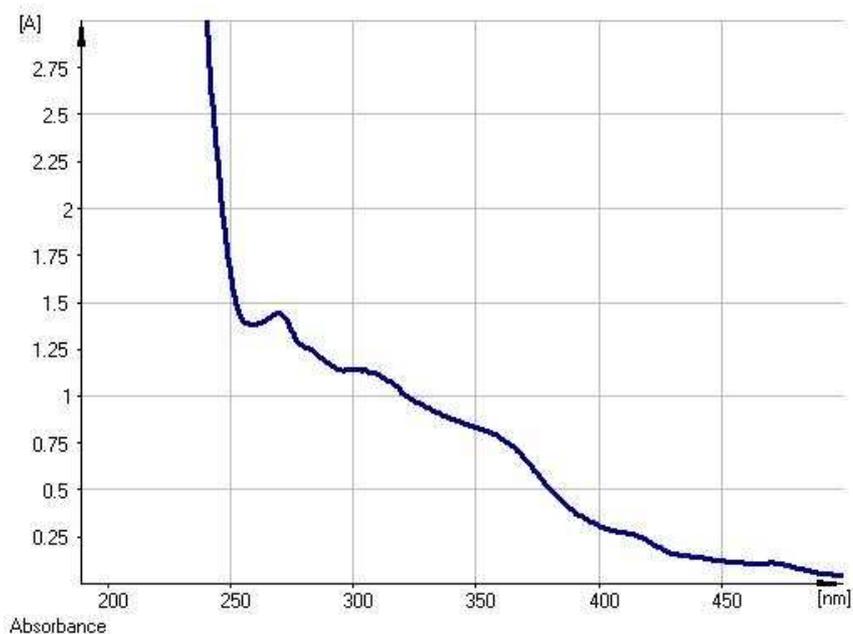


Рис. 3. Электронный спектр водно-спиртового извлечения из листьев гинкго двулопастного.

В последнее время для целей стандартизации активно внедряется метод ВЭЖХ, позволяющий одновременно осуществлять качественный и количественный анализ ЛРС. На наш взгляд, в условиях ВЭЖХ в качестве маркера может выступать доминирующий флавоноид гинкгетин (1). Результаты ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что в исследуемых условиях хроматографирования гинкгетин (1) с величиной времени удерживания около 12,5 мин хорошо отделяется от других компонентов листьев гинкго двулопастного (рис. 4), что позволяет данный метод рекомендовать как для целей идентификации листьев гинкго двулопастного, так и для целей стандартизации препаратов на основе сырья данного растения.

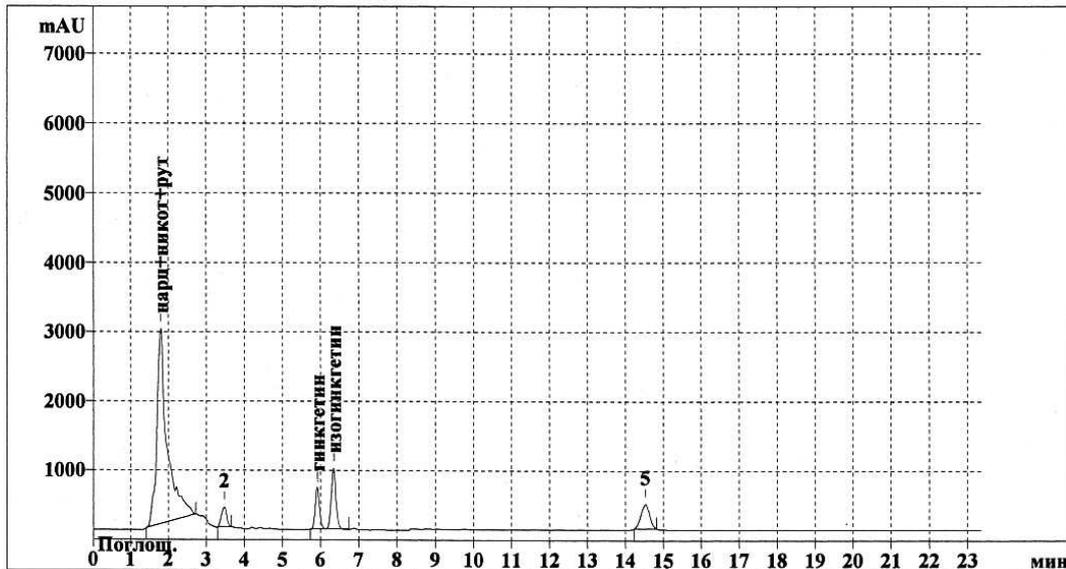


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма водно-спиртового извлечения из листьев гинкго двулопастного.

Учитывая специфичность гинкгетина для листьев гинкго двулопастного, считаем целесообразным использование метода ВЭЖХ для определения подлинности сырья и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение. Метод ВЭЖХ имеет принципиальное значение с точки зрения создания импортозамещающих ноотропных препаратов, которые в отличие зарубежных аналогов содержат гинкгетин, обладающий ноотропной активностью и характеризующий их происхождение в силу специфичности.

Выводы

1. Разработаны новые подходы к стандартизации подхода к стандартизации листьев гинкго двулопастного, заключающиеся в комплексном использовании спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.
2. С учетом специфичности гинкгетина для листьев гинкго двулопастного, является целесообразным использование методов ВЭЖХ и ТСХ для определения подлинности сырья

и препаратов данного растения по обнаружению данного флавоноида, имеющего диагностическое значение.

Список литературы

1. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. - 1239 с.
2. Куркин В.А., Буланкин Д.Г. Определение флавоноидов в сырье и препаратах гинкго двулопастного // Фармация. – 2011. - Т. 59, № 2. – С. 13-17.
3. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: Монография. - Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. - 290 с.
4. Куркина А.В., Корчагина Д.В., Дубищев А.В., Буланкин Д.Г., Загоскина Н.В. Гинкго двулопастный – перспективный источник импортозамещающих ноотропных лекарственных препаратов // Традиционная медицина. - 2012. - № 5. – С. 261-265.
5. Юрьев Д.В., Эллер К.И., Арзамасцев А.П. Анализ флавонолгликозидов в препаратах и БАД на основе гинкго билоба. – Фармация. - 2003. – Т. 51, № 2. - С. 7-10.
6. Crane P. Ginkgo: the tree that time forgot. – New Haven and London: Yale University Press, 2013. – 350 p.
7. Cheng S.-Y., Xu F., Wang Ya. Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves // Journal of Medicinal Plants Research. - 2009. - Vol. 3. - No. 13. - P. 1248-1252.
8. Cheng S., Xu F., Li L., Cheng H., Zhang W. Seasonal Pattern of Flavonoid Content and Related Enzyme Activities in Leaves of *Ginkgo biloba* L. // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici. - 2012. - Vol. 40. - No. 1. - P. 98-106.
9. Ellnain–Wojtaszek M., Kruczyński I.Z., Kasprzak J. Analysis of the content of flavonoids, phenolic acids as well as free radicals from *Ginkgo biloba* L. leaves during the vegetation cycle // Acta Pharmaceutica – Drug-Research. 2001. Vol. 58. No. 3. P. 205-208.
10. Hanrahan J.R., Chebib M., Davucheron N.L.M., Belinda H.J., Johnston G.A.R. Semisynthetic Preparation of Amentoflavone: A Negative Modulator at GABAA Receptors. Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2003. - Vol.13. - P. 2281-2284.
11. Sasaki K. Chemistry and biological activities of *Ginkgo biloba*. - Hokkaido, 2007. - 177 p.
12. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1996. – 348 p.

Рецензенты:

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Самара.

Правдивцева Ольга Евгеньевна, доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Самара.