

УДК 615.322

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ И ФЛАВОНОГЛИКОЗИДОВ В ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ГИНГГО БИЛОБА И НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФЛАВОНОГЛИКОЗИДОВ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ¹H

© В.Г. Васильев*, А.С. Прокопьев, Г.А. Калабин

Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва,
117198 (Россия), e-mail: vasyavasilyev@mail.ru

Исследован состав терпеновых лактонов и флавоногликозидов серии коммерческих препаратов на основе экстракта гингго билоба методом спектроскопии ЯМР ¹H. Содержание отдельных терпеновых лактонов определено с использованием растворителей ДМСО-d₆ и ацетона-d₆. Рассмотрено влияние строения флавоногликозидов на положение сигнала протона гидроксильной группы у С-5 кольца А. Предложен принципиально новый подход к полуколичественному определению суммарного содержания флавоногликозидов по интегральной интенсивности этого сигнала, который в растворителе ДМСО-d₆ является суперпозицией синглетов отдельных флавоноидов в области 12,5–12,65 м.д. Поскольку соответствующие сигналы агликонов (кверцетина, кемпферола, изорамнетина), являющихся минорными для экстрактов гингго билоба, проявляются обособленно в несколько иной области (12,45–12,48 м.д.), предлагаемая методика может быть использована также как для выявления фальсификации экстрактов гингго билоба путем добавления в них относительно дешевых агликонов или рутина, так и оценки содержания флавоноидов подобного строения в некоторых видах растительного сырья.

Ключевые слова: спектроскопия ЯМР ¹H, лекарственные препараты, биологически активные добавки, флавоногликозиды, терпеновые лактоны.

Введение

Одним из наиболее популярных растительных ноотропов являются листья гингго двулопастный (*Ginkgobiloba* L., сем. Гинкговых – *Ginkgoaceae*) и препараты на его основе, содержащие терпеновые лактоны и флавоноиды. Первые являются антагонистами тромбоцит-активирующих рецепторов и нейропротекторами, а вторые – антиоксидантами [1]. Лекарственные свойства листьев дерева гингго были известны более 2000 лет назад и по сей день они применяются при заболеваниях ЦНС, связанных с нарушениями обменных процессов и мозгового кровообращения, для симптоматического лечения слабоумия и болезни Альцгеймера [2–4]. Более 30 препаратов из листьев гингго билоба в виде лекарственных средств (ЛС) и биологически активных добавок (БАД) широко представлены на российском фармацевтическом рынке в форме таблеток и капсул [5].

Основными биологически активными веществами экстракта гингго билоба являются терпеновые

лактоны (ТЛ) – билобалид (ББ), гинкголид А (ГА), гинкголид В (ГБ), гинкголид С (ГС), гинкголид J (ГJ) и флавоногликозиды (ФГ) – производные кверцетина, кемпферола и изорамнетина (рис. 1). Стандартизированный экстракт гингго билоба (EGB 761) содержит 6% терпеновых лактонов и 24% флавоногликозидов [6].

Васильев Василий Геннадьевич – аспирант,
e-mail: vasyavasilyev@mail.ru
Прокопьев Александр Сергеевич – соискатель,
e-mail: intel99@yandex.ru
Калабин Геннадий Александрович – доктор химических наук, профессор кафедры системной экологии,
e-mail: kalabinga@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

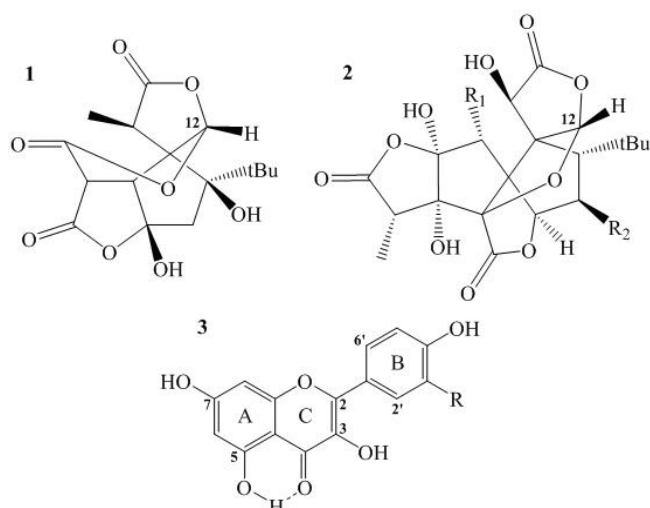


Рис. 1. Основные биологически активные вещества экстракта гинкго билоба: **1** – ББ; **2** – ГА ($R_1 = H, R_2 = H$), ГВ ($R_1 = OH, R_2 = H$), ГС ($R_1 = OH, R_2 = OH$), ГЛ ($R_1 = H, R_2 = OH$); **3** – агликоны доминирующих ФГ: кемпферол ($R = H$), кверцетин ($R = OH$), изорамнетин ($R = OCH_3$)

В ведущих фармакопеех мира экстракт гинкго билоба идентифицируют с помощью ТСХ и ВЭЖХ, а количественное содержание терпеновых лактонов и флавоногликозидов определяют с помощью ВЭЖХ и спектрофотометрии [5, 7]. Эти методы трудоемки и требуют наличия соответствующих стандартных образцов. Нами предлагается использовать для идентификации и количественного определения обеих групп биологически активных компонент спектроскопию ЯМР 1H , свободную от применения стандартных образцов, отличающуюся простотой пробоподготовки, прецизионностью и экспрессностью.

Экспериментальная часть

В работе исследован ряд ЛС и БАД на основе экстракта гинкго билоба в форме таблеток и капсул, присутствующих на российском рынке лекарственных средств и парафармацевтиков: I. БАД «Гинкго билоба»; II. ЛС «Гинкгоум»; III. БАД «Острум» (все – продукция ЗАО «Эвалар», Россия); IV. ЛС «Танакан» (IPSEN, Франция); V. БАД «Доппельгерц актив Гинкго Билоба+B1+B2+B6» (QueisserPharma, Германия); VI. БАД «Билобил» (КРКА, Словения); VII. БАД «Гинкго билоба» (ООО «Натурофарм», Россия); VIII. БАД «Гинос» (ПАО «Верофарм», Россия). По информации производителей единичная доза (таблетка или капсула) препаратов I, II, IV, VI, VII, VIII содержат 40 мг экстракта, препарата V – 30 мг и препарата III – 20 мг.

Пробоподготовка препаратов проводилась следующим образом. Таблетки растирают в ступке до образования порошка, навески которого помещают в эппендорфы и заливают 1 мл дейтерированного растворителя. Капсулы вскрывают, содержимое взвешивают, помещают в эппендорф и также заливают 1 мл дейтерированного растворителя. Эппендорфы в течение 10 мин встряхивают на Vortex, 10 мин обрабатывают ультразвуком и на 5 мин помещают в центрифугу (14000 об/мин). Надосадочную жидкость переносят в стандартную ампулу для ЯМР диаметром 5 мм и регистрируют спектр ЯМР 1H . Для каждого препарата готовится три параллельных образца, т.е. три таблетки или капсулы.

Для регистрации спектров ЯМР 1H использованы дейтерированные растворители: ацетон- d_6 (99,9%, Sigma-Aldrich) и ДМСО- d_6 (99,9%, Sigma-Aldrich). Содержание в них остаточных протонов изотопмеров ацетона- d_5 и ДМСО- d_5 определялось путем измерения количественных спектров раствора стандартных образцов бензоата натрия и бензойной кислоты в этих растворителях в качестве внутренних эталонов (1 мг в 1 мл ацетона- d_6 и ДМСО- d_6). Найдено, что используемый ацетон- d_6 имеет обогащение 99,92%, а ДМСО- d_6 – 99,91, что несколько выше гарантированного производителем. Знание точного содержания остаточных протонов в выбранных растворителях позволяет использовать их сигналы 1H в качестве сигналов внутреннего стандарта при количественных измерениях содержания компонент в препаратах.

Спектры ЯМР 1H зарегистрированы на спектрометре ЯМР высокого разрешения со сверхпроводящим магнитом JNM ECA (JEOL, Япония) с рабочей частотой для протонов 600 МГц в следующих условиях: импульс – 90° , развертка спектра – 18 м.д., центр спектра – 7 м.д., точек на спектр – 32 К, время считывания сигнала – 3,64 сек, время задержки между импульсами – 15 сек, количество накоплений – 16, затраты

времени на каждый спектр – около 5 мин. Коррекция фазы и базовой линии проводится автоматически, интегрирование – вручную.

Результаты расчета суммарного содержания терпеновых лактонов и флавоногликозидов для удобства сравнения со стандартизированным экстрактом гинкго билоба EGB 761 представлены в таблице в процентах от заявленной массы экстракта.

Обсуждение результатов

Растительное сырье содержит большое количество классов веществ, обладающих разными химическими и физическими свойствами, поэтому выбор растворителя должен обеспечивать полное извлечение целевых компонент.

Гинкголиды листьев гинкго билоба, среди которых наибольшей биологической активностью обладает гинкголид В, содержится в них в очень низкой концентрации (около 0,03% в сухих листьях). Это создает значительные трудности в их количественном определении в сложных смесях общепринятыми методами хроматографии.

Спектры ЯМР ^1H гинкголидов впервые были зарегистрированы в ацетоне- d_6 [8] и позднее – в ДМСО- d_6 [9], а билобалида – в ДМСО- d_6 [10] и ацетоне- d_6 [11]. Во всех случаях для целей количественного определения предложено использовать сигнал протона у С-12 билобалида и гинкголидов. Этому протону в гинкголидах А, J, В, С и в билобалиде соответствуют синглетные сигналы с химическими сдвигами 6,02, 6,03, 6,07, 6,10 и 6,21 м.д. в случае ДМСО- d_6 , а в ацетоне- d_6 6,06, 6,08, 6,12, 6,14 и 6,36 м.д. соответственно [12]. Поскольку в растворителе ацетон- d_6 диапазон химических сдвигов шире, а сам растворитель менее вязкий, чем ДМСО- d_6 , более предпочтительным представляется ацетон- d_6 . Однако при регистрации спектра ^1H на частоте 600 МГц это преимущество несущественно, более того, для одновременного определения суммы флавоноидов в экстрактах гинкго билоба ацетон неприемлем, как будет показано далее.

Для определения содержания терпеновых лактонов в препаратах I–VIII использованы известные методики для обоих растворителей с некоторыми изменениями (выбор внутреннего стандарта, условия регистрации и обработка спада свободной индукции). Количественное содержание отдельных терпеновых лактонов определялось сравнением интегральных интенсивностей их сигнала Н-12 и сигнала остаточных протонов (ОП) ацетона- d_5 (2,05 м.д.) или ДМСО- d_5 (2,5 м.д.) и рассчитывалось по формуле

$$m(\text{ТЛ}) = n(\text{ОП}) \frac{I(\text{ТЛ})}{I(\text{ОП})} M(\text{ТЛ}) \cdot 1000,$$

где m – масса терпенового лактона, мг; $n(\text{ОП})$ – количество вещества остаточных протонов ацетона- d_5 или ДМСО- d_5 , моль; $I(\text{ТЛ})$ – интегральная интенсивность сигнала Н-12 терпенового лактона; $I(\text{ОП})$ – интегральная интенсивность сигнала остаточных протонов; $M(\text{ТЛ})$ – молярная масса терпенового лактона, г/моль. Например, для препарата VIII в ацетоне- d_6 масса ББ в таблетке, содержащей 40 мг экстракта, рассчитывали по следующим величинам: $n(\text{ОП}) = 0,0001565$ моль, $I(\text{ББ})/I(\text{ОП}) = 0,01062$, $M(\text{ТЛ}) = 326$ г/моль. Полученный результат умножается на 1000 для перевода массы билобалида из г в мг.

Результаты определения содержания терпеновых лактонов в изученных препаратах I–VIII представлены в таблице. Суммарное содержание доли терпеновых лактонов в исследованных препаратах (усредненное значение для двух растворителей), за исключением IV и VIII, несущественно отличается от показателя стандартизированного образца EGb 761 (6%). Хотя значения для двух использованных растворителей отличаются в отдельных случаях в полтора раза. Возможно, это обусловлено как повышенными ошибками интегрирования перекрывающихся сигналов в ДМСО- d_6 , так и отличиями сравниваемых значений $I(\text{ТЛ})$ и $I(\text{ОП})$ на 2–3 порядка, что требует дополнительного изучения.

Если терпеновые лактоны в экстракте гинкго билоба представлены всего пятью основными соединениями, то флавоногликозидов в нем выявлено более 70, половина из которых выделена [7]. Характерно, что все они без исключения содержат гидроксильную группу в положении 5 (5-OH), а гликозидные и иные заместители располагаются в положениях 3 и/или 7 колец С и А, а также 3' и 4' кольца В.

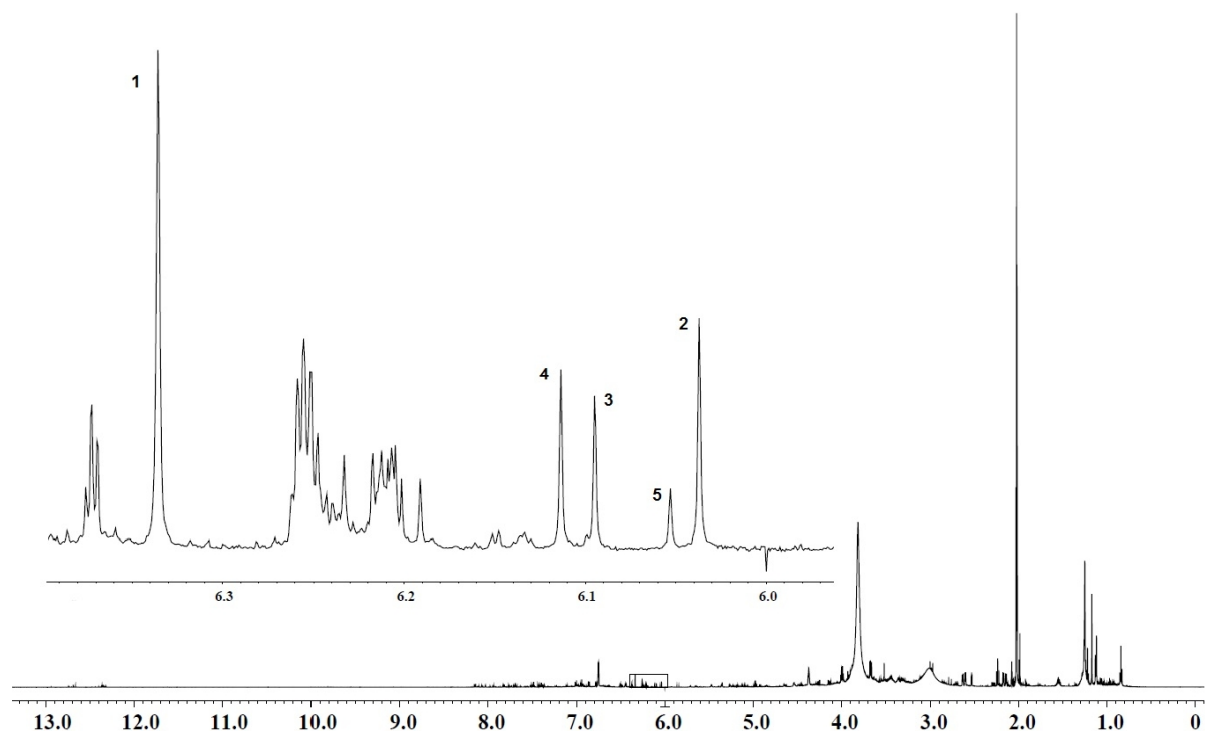


Рис. 2. Спектр ЯМР ^1H препарата VIII в ацетоне- d_6 и его выделенный фрагмент: 1 – ББ, 2 – ГА, 3 – ГВ, 4 – ГС, 5 – ГJ

Содержание терпеновых лактонов и флавоногликозидов в препаратах гинкго билоба

| Препарат | Растворитель* | ББ, мг | ГА, мг | ГВ, мг | ГС, мг | ГJ, мг | Σ ТЛ, мг | Σ ТЛ, % | Σ ФГ, мг | Σ ФГ, % |
|----------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| I | A | 0,72 | 0,49 | 0,27 | 0,22 | 0,08 | 1,78 | 4,5 | 10,45 | 26,1 |
| | Д | 0,9 | 0,55 | 0,26 | 0,25 | 0,12 | 2,08 | 5,2 | | |
| II | A | 0,98 | 0,77 | 0,48 | 0,35 | 0,10 | 2,67 | 6,6 | 10,45 | 26,1 |
| | Д | 0,98 | 0,65 | 0,28 | 0,29 | 0,17 | 2,36 | 5,9 | | |
| III | A | 0,45 | 0,29 | 0,19 | 0,12 | 0,03 | 1,08 | 5,3 | 5,35 | 26,8 |
| | Д | 0,43 | 0,43 | 0,17 | 0,16 | 0,06 | 1,26 | 6,2 | | |
| IV | A | 0,67 | 0,38 | 0,25 | 0,29 | 0,09 | 1,69 | 4,2 | 9,45 | 23,6 |
| | Д | 0,6 | 0,28 | 0,14 | 0,22 | 0,06 | 1,29 | 3,2 | | |
| V | A | 0,87 | 0,44 | 0,31 | 0,32 | 0,13 | 2,06 | 6,8 | 7,71 | 25,7 |
| | Д | 0,59 | 0,22 | 0,15 | 0,2 | 0,04 | 1,2 | 4,0 | | |
| VI | A | 1,27 | 0,54 | 0,28 | 0,53 | 0,20 | 2,82 | 7,0 | 13,19 | 32,9 |
| | Д | 0,95 | 0,38 | 0,23 | 0,4 | 0,17 | 2,12 | 5,3 | | |
| VII** | A | 1,01 | 0,61 | 0,42 | 0,34 | 0,11 | 2,49 | 6,2 | – | – |
| | Д | – | – | – | – | – | – | – | | |
| VIII | A | 0,73 | 0,33 | 0,23 | 0,28 | 0,09 | 1,66 | 4,2 | 10,45 | 26,1 |
| | Д | 0,45 | 0,22 | 0,14 | 0,18 | 0,03 | 1,02 | 2,6 | | |

*A – ацетон- d_6 , Д – ДМСО- d_6 .

**Образец VII в растворителе ДМСО- d_6 образует суспензию, что не позволило получение спектра ЯМР ^1H .

Как следует из недавнего обзора, посвященного достижениям химического анализа и контролю качества флавоноидов в гинкго билоба [7], для этих целей разработаны и успешно используются методы разделения высокоэффективной жидкостной хроматографией, высокоэффективной тонкослойной хроматографией, капиллярным электрофорезом и в случае агликонов – газовой хроматографией. Два первых из них рекомендованы Фармакопеями США [13], Европы [14] и Китая [15]. Суммы ФГ составляют, как правило, от 22 до 27% от массы экстрагируемых веществ. Общий недостаток хроматографических методов – необходимость гидролиза ФГ или наличия стандартных образцов всех идентифицируемых гликозидов, а также их трудоемкость.

Известна попытка идентификации и количественного определения групп флавоноидов в экстракте гинкго билоба методом спектроскопии ЯМР ^1H , которая включает в пробоподготовку стадию гидролиза, что позволяет избавиться от гликозидов и биофлавоноидов [16]. После гидролиза в исследуемом образце остаются только агликоны: кемпферол, кверцетин и изорамнетин, что существенно упрощает интерпретацию спектра ЯМР ^1H . Идентификацию и количественное определение кверцетина и изорамнетина при этом проводят по интенсивности сигналов ароматических протонов Н-2', а для кемпферола – по интегральной интенсивности сигналов протонов Н-2' и Н-6'.

Использование полного анализа спектров ЯМР ^1H модельных соединений (пять терпеновых лактонов и три агликона, представленные на рисунке 1, а также рутин) для анализа серии из 6 коммерческих препаратов гинкго билоба методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H позволило определить в них без проведения гидролиза содержание этих компонент [17]. Установлено, что суммарное количество агликонов не превосходит 1,1% вес., причем содержание изорамнетина всегда ниже предела детектирования. Содержание рутина составляет от 0,65 до 3,33% в пяти случаях, а в одном образце – 12%. Последний, по видимому, искусственно им обогащен, т.е. фальсифицирован. В целом результат этой работы показывает, что из 25% флавоноидов в стандартном образце содержание каждого из агликонов менее 1%. Следовательно, разработанный алгоритм анализа недостаточно эффективен для определения суммы флавоноидов в натуральных объектах, хотя может быть полезен для выявления фальсификатов, обогащенных агликонами или рутином.

Нами предлагается принципиально новый метод количественного определения суммы флавоноидов в препаратах из гинкго билоба по интегральной интенсивности сигнала протона гидроксильной группы в положении 5 кольца А. Как отмечалось выше, не было выделено ни одного представителя флавоногликозидов, образующих гликозидную связь через кислород 5-ОН. Эта гидроксильная группа образует сильную внутримолекулярную водородную связь с кислородом соседней карбонильной группы (рис. 1). Поэтому в спектрах ЯМР ^1H сигнал протона 5-ОН является наименее экранированным среди протонов всех иных гидроксильных групп в флавоногликозидах и имеет химические сдвиги в области от 11,5 до 13,20 м.д., в зависимости от строения самого агликона, положения и особенностей строения гликозидной части флавоногликозида [18].

Для изучения вариаций химического сдвига протона 5-ОН в флавоноидах различного строения проведена регистрация спектров ЯМР ^1H нескольких индивидуальных флавоноидов: кверцетина, дигидрокверцетина, рутина, гесперидина и диосмина. В качестве растворителя был выбран апротонный биполярный ДМСО- d_6 , поскольку некоторые гликозиды плохо растворяются в ацетоне. Кроме того в ДМСО- d_6 область, в которой проявляются протоны всех гидроксильных групп несколько шире, что облегчает их выявление. Протоны 5-ОН кверцетина, дигидрокверцетина, рутина, гесперидина и диосмина имеют химические сдвиги 12,46, 11,87, 12,56, 11,99, 12,9 м.д., соответственно. Основываясь на этих и ранее опубликованных данных [19], можно предполагать, что вне зависимости от наличия гликозидной части вместо атома водорода одной или нескольких гидроксильных групп флавоногликозида, сигнал протона 5-ОН проявляется в одной из трех нижеуказанных областей. Первая (11,80–12,20 м.д.) относится к флавоногликозидам с насыщенной связью в положении 2–3. Вторая (12,45–12,65) – к флавоногликозидам с гидроксильными или замещенными гликозидными группами в положениях 3 и 7. Третья (12,90–13,00) – к флавоногликозидам без гидроксильной группы в положении 3. Из полученных в растворителе ДМСО- d_6 спектров ЯМР ^1H изученных препаратов следует, что все идентифицированные флавоногликозиды экстракта гинкго билоба действительно относятся ко второй группе, как установлено ранее [7], и содержат в положении 3 ОН группу либо гликозидный фрагмент.

В составе экстракта гинкго билоба входят флавоноиды с различным строением гликозидной части, т.е. и молекулярной массы. По результатам независимых исследований [7, 20], усредненное отношение молекулярной массы флавоногликозидов гинкго билоба к массе их агликонов близко к 2,5. Принимая во внимание этот результат, необходимый для расчета суммарного содержания флавоногликозидов, можно определить их среднюю молекулярную массу, которая оказалась равна 759 г/моль.

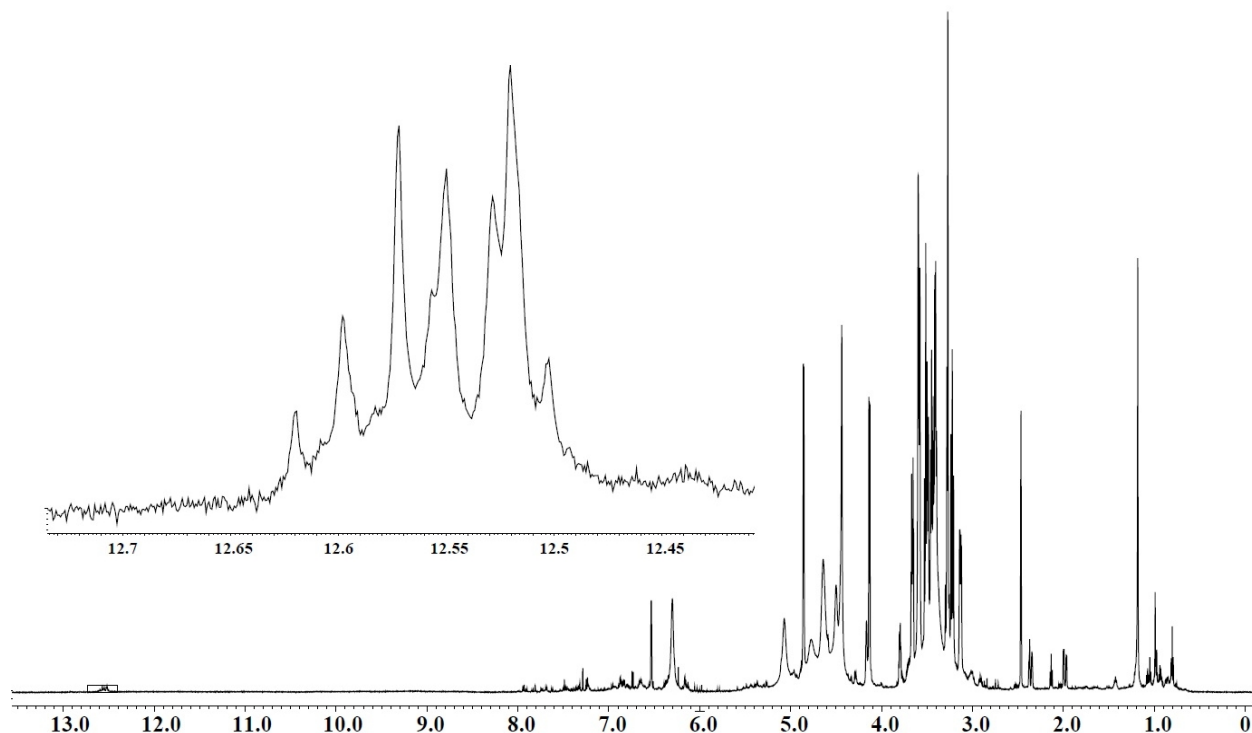


Рис. 3. Спектр ЯМР ^1H препарата VI в ДМСО- d_6

Предлагаемая методика количественного определения суммы флавоногликозидов гинкго билоба, базирующаяся на результатах для серии индивидуальных флавоноидов, использована для анализа препаратов I–VIII. На рисунке 3 представлен спектр ЯМР ^1H препарата VI в ДМСО- d_6 и увеличенное изображение области спектра, в которой проявляются сигналы протонов 5-ОН. Видно, что в этом образце содержится не менее десяти доминирующих флавоногликозидов. Количественное содержание их суммы определяется сравнением интегральной интенсивности суперпозиции этих сигналов и сигнала остаточных протонов (ОП) ДМСО- d_5 (2,5 м.д.):

$$m(\text{ФГ}) = n(\text{ОП}) \frac{I(\text{ФГ})}{I(\text{ОП})} M(\text{ФГ}) \cdot 1000,$$

где m – суммарная масса флавоногликозидов, мг; $n(\text{ОП})$ – количество вещества остаточных протонов в ДМСО- d_6 , моль; $I(\text{ФГ})$ – суммарная интегральная интенсивность сигналов протонов 5-ОН; $I(\text{ОП})$ – интегральная интенсивность сигнала остаточных протонов; $M(\text{ФГ})$ – средняя молярная масса флавоногликозидов, г/моль. Например, для препарата VI расчет массы флавоногликозидов в таблетке, содержащей 40 мг экстракта, проводился следующим образом: $n(\text{ОП}) = 0,000125$ моль, $I(\text{ББ})/I(\text{ОП}) = 0,01738$, $M(\text{ФГ}) = 759$ г/моль. Полученный результат умножается на 1000 для перевода массы флавоногликозидов из г в мг.

В таблице представлены результаты определения содержания суммы флавоногликозидов в препаратах I–VI и VIII из спектров ЯМР ^1H . Суммарное содержание флавоногликозидов во всех препаратах близко к показателю стандартизированного образца экстракта гинкго билоба EGb 761. В препарате VII количественный анализ флавоногликозидов не удалось провести, так как при экстрагировании в ДМСО- d_6 образуется суспензия, которая не разделяется при центрифугировании, имеет отличный от других образцов цвет, объяснения чему не найдено.

Оценена возможность разработанной методики выявлять фальсификацию препаратов гинкго билоба индивидуальными агликонами или рутином. Последние были искусственно добавлены нами в препарат VIII в количестве 1,1 мг кверцетина или 4,7 мг рутина. Фрагменты спектра в области 12,4–12,7 м.д., представленные на рисунке 4, демонстрируют ее эффективность.

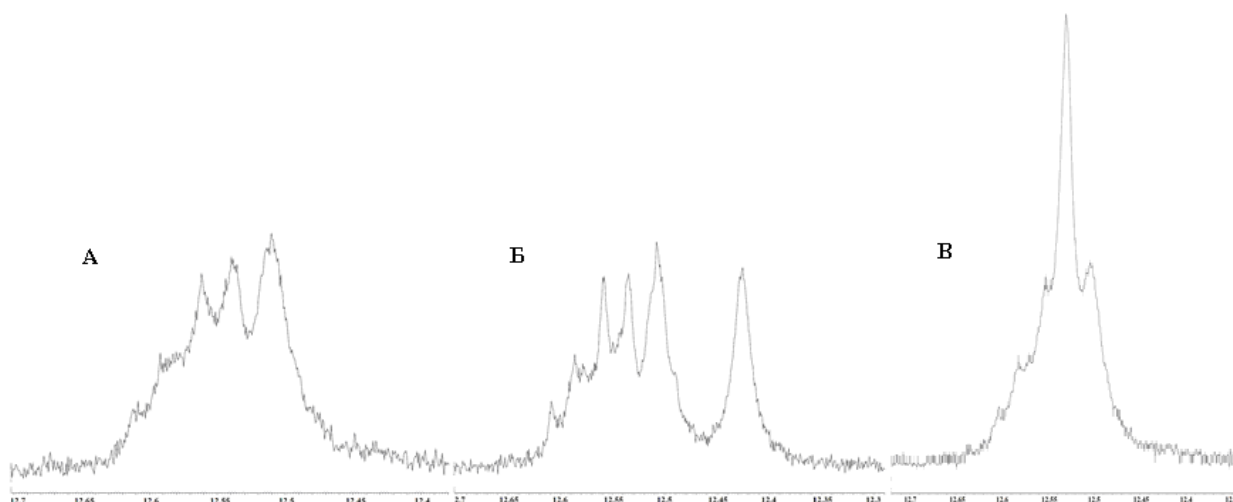


Рис. 4. Фрагмент спектра ЯМР ^1H препарата VIII (А), препарата VIII с добавкой кверцетина 1,1 мг (Б), препарата VIII с добавкой рутина 4,7 мг (В)

Следует отметить, что хотя в препарате VI содержание ФГ несколько выше, чем в других исследованных образцах, и выходит за границы диапазона процентного содержания флавоногликозидов (22–27%), вид сигнала 5-ОН (рис. 3) не выявляет в нем примесей агликонов или рутина.

В целом, проведенный полуколичественный анализ изученных препаратов гинкго билоба при соответствии результатов из спектров ЯМР ^1H с показателями стандартизированного экстракта EGb 761 предполагает их подлинность.

Полученные результаты по определению содержания флавоноидов имеют гораздо более широкое значение, чем экспресс-экспертиза их содержания в препаратах гинкго билоба без химического преобразования при пробоподготовке и без использования стандартных образцов. Разработанный подход к выявлению, структурному и количественному анализу флавоноидов может быть адаптирован для многих других растительных экстрактов, содержащих подобные флавоноиды. В настоящее время нами изучаются экстракты из шлемника байкальского (*Scutellariae baicalensis*) и расторопши пятнистой (*Silybum marianum*).

Выводы

1. Методом спектроскопии ЯМР ^1H проведена оценка содержания терпеновых лактонов и флавоногликозидов в препаратах на основе экстракта гинкго билоба, представленных на российском фармацевтическом рынке.
2. По положению сигналов протонов 5-ОН кольца А флавоногликозидов удобно относить их к отдельным группам, отличающимся строением и положением заместителей.
3. Предложен новый метод количественной оценки суммарного содержания флавоногликозидов в экстрактах на основе гинкго билоба.

Список литературы

1. Nakanishi K. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from the ancient times to the 21st century // Bioorg. Med. Chem. 2005. Vol. 13. Pp. 4987–5000.
2. Stromgaard K., Nakanishi K. Chemistry and biology of terpene trilactones from Ginkgo biloba // Angew. Chem., Int Ed. 2004. Vol. 43. Pp. 1640–1658.
3. Mahadevan S., Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety and uses // J. Food Sci. 2008. Vol. 73. N1. Pp. R14–R19
4. Gardner C.D., Taylor-Piliae R.E., Kiazand A., Nicholus J., Rigby A.J., Farquhar J.W. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on treadmill walking time among adults with peripheral artery disease: a randomized clinical trial // J. Cardiopulm. Rehabil. Prev. 2008. Vol. 28. Pp. 258–265.
5. Крылова Н.Н., Компанцева Е.В., Шевченко А.М. Обоснование состава и методик анализа сублингвальных таблеток на основе экстрактов гинкго, лабазника, глицина и янтарной кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. №1 (10). С. 84–91.

6. Agnolet S., Jaroszewski J.W., Verpoorte R., Staerk D. ¹H-NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MS-SPE-NMR for investigation of standardized Ginkgo biloba preparations // *Metabolomics*. 2010. Vol. 6. N2. Pp. 292–302.
7. Liu X.G., Wu S.Q., Li P., Yang H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoids in Ginkgo biloba // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015. Vol. 113. Pp. 212–225.
8. Okabe K., Yamada K., Yamamura S., Takada S. Ginkgolides // *J. Chem. Soc.* 1967. Pp. 2201–2206.
9. Weinges K., Hepp M., Jaggy H. Isolierung und Structuraufklärung eines neuen Ginkgolids // *Liebigs Ann. Chem.* 1987. N6. Pp. 521–526.
10. Weinges K., Bahr W. Bilobalid A, ein neues Sesquiterpen mitt ret-Butyl-Gruppe aus den Blättern von Ginkgo biloba L. // *Liebigs Ann. Chem.* 1969. Pp. 214–216.
11. Nakanishi K., Habaguchi K., Nakadaira Y., Woods M.C., Maruyama M., Major R.T., Alauddin M., Patel A.R., Weinges K., Bahr W. Structure of bilobalide, a rare tret-butyl containing sesquiterpenoid related to the C₂₀-ginkgolides // *J. Am. Chem. Soc.* 1971. Vol. 93. Pp. 3544–3546.
12. Van Beek T.A., van Veldhuizen A., Lelyveld G.P., Prion I., Lankhorst P.P. Quantitation of Bilobalide and Ginkgolides A, B, C, J by means of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy // *Phytochem. Anal.* 1993. Vol. 4. Pp. 261–268.
13. Фармакопея США: USP 29. В 2 т. М., 2009. Т. 1. С. 1720.
14. European Pharmacopoeia 6th ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. 2007.
15. China Pharmacopoeia commission, Pharmacopoeia of People's Republic of China The First Division of 2010 Edition, Vol. 1. China medical science press. Beijing, 2010. Pp. 296–297.
16. Li Ch.Y., Lin Ch.H., Wu Ch.Ch., Lee K.H., Wu T.Sh. Efficient 1H Nuclear Magnetic Resonance Method for Improved Quality Control Analyses of Ginkgo Constituents // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52. Pp. 3721–3725.
17. Napolitano J.G., Godecke T., Rodrigues-Brasco M.F., Jaki B.U., Chen Sh.N., Lankin D.C., Pauli G.F. The tandem of Full Spin Analysis and qHNMR for the Quality Control of botanicals exemplified with Ginkgo Biloba // *J. Nat. Prod.* 2012. Vol. 75. Pp. 238–248.
18. Charisiadis P., Kontogianni V.G., Tsiafoulis C.G., Tzakos A.G., Siskos M., Gerothanassis I.P. ¹H-NMR as a structural and analytical tool of intra- and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds // *Molecules*. 2014. Vol. 19. Pp. 13643–13682.
19. Шейченко В.И., Шейченко О.П., Ануфриев В.В., Толкачев О.Н., Дюмаев К.М., Сокольская Т.А. Изучение состава фенольного компонента метаболома растений методом ЯМР // *Химико-фармацевтический журнал*. 2016. Т. 50, №2. С. 51–57.
20. Gray D.E., Upton R., Chandra A., Porter A., Harris R.K. Quantitative analysis of flavonol glycosides in Ginkgo Biloba: a comparison of two analytical methods // *Phytochem. Anal.* 2006. Vol. 16 (1). Pp. 56–62.

Поступило в редакцию 6 апреля 2016 г.

После переработки 26 мая 2016 г.

Vasil'ev V.G.*, Prokop'ev A.S., Kalabin G.A. IDENTIFICATION OF TERPENE LACTONES AND FLAVONOL GLYCOSIDES IN PREPARATIONS BASED ON GINKGO BILOBA EXTRACT AND A NEW WAY OF SEMI QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOL GLYCOSIDES BY ¹H NMR SPECTROSCOPY

Peoples Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya, 6, Moscow, 117198 (Russia),
e-mail: vasyavasilyev@mail.ru

The composition of terpen lactones and flavonol glycosides of commercial preparation series based on ginkgo biloba extracts was explored by quantitative ¹H NMR spectroscopy. The content of individual terpen lactones was determined using DMSO-d₆ and acetone-d₆ solvents. The structure effect of flavonol glycosides on the signal of the hydroxyl proton at position 5 of ring A was examined. A new approach of semi quantitative determination of flavonol glycosides amount by this signal, which is superposition of the singlets of individual flavonoids on the area from 12,5 to 12,65 ppm in DMSO-d₆ solvent, was offered. The offered method can be used for detection of counterfeit ginkgo biloba extracts by cheap individual aglicones or rutin, because the signals of individual aglicones have different from flavonol glycosides chemical shifts.

Keywords: ¹H NMR spectroscopy, pharmaceuticals, dietary supplements, flavonol glycosides, terpen lactones.

References

1. Nakanishi K. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, vol. 13, pp. 4987–5000.
2. Stromgaard K., Nakanishi K. *Angew. Chem., Int Ed.*, 2004, vol. 43, pp. 1640–1658.
3. Mahadevan S., Park Y. *J. Food Sci.*, 2008, vol. 73, no. 1, pp. R14–R19.
4. Gardner C.D., Taylor-Piliae R.E., Kiazand A., Nicholus J., Rigby A.J., Farquhar J.W. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.*, 2008, vol. 28, pp. 258–265.
5. Krylova N.N., Kompantseva E.V., Shevchenko A.M. *Razrabotka i registratsiia lekarstvennykh sredstv*, 2015, no. 1 (10), pp. 84–91. (in Russ.).
6. Agnolet S., Jaroszewski J.W., Verpoorte R., Staerk D. *Metabolomics*, 2010, vol. 6, no. 2, pp. 292–302.
7. Liu X.G., Wu S.Q., Li P., Yang H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, vol. 113, pp. 212–225.
8. Okabe K., Yamada K., Yamamura S., Takada S. *J. Chem. Soc.*, 1967, pp. 2201–2206.
9. Weinges K., Hepp M., Jaggy H. *Liebigs Ann. Chem.*, 1987, no. 6, pp. 521–526.
10. Weinges K., Bahr W. *Liebigs Ann. Chem.*, 1969, pp. 214–216.
11. Nakanishi K., Habaguchi K., Nakadaira Y., Woods M.C., Maruyama M., Major R.T., Alauddin M., Patel A.R., Weinges K., Bahr W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, vol. 93, pp. 3544–3546.
12. Van Beek T.A., van Veldhuizen A., Lelyveld G.P., Prion I., Lankhorst P.P. *Phytochem. Anal.*, 1993, vol. 4, pp. 261–268.
13. *Farmakopeia SShA: USP 29*. [USP: USP 29]. Moscow, 2009, vol. 1, p. 1720. (in Russ.).
14. *European Pharmacopoeia 6th ed.* Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007.
15. *China Pharmacopoeia commission, Pharmacopoeia of People's Republic of China The First Division of 2010 Edition. Vol. 1.* China medical science press. Beijing, 2010, pp. 296–297.
16. Li Ch.Y., Lin Ch.H., Wu Ch.Ch., Lee K.H., Wu T.Sh. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, pp. 3721–3725.
17. Napolitano J.G., Godecke T., Rodrigues-Brasco M.F., Jaki B.U., Chen Sh.N., Lankin D.C., Pauli G.F. *J. Nat. Prod.*, 2012, vol. 75, pp. 238–248.
18. Charisiadis P., Kontogianni V.G., Tsiafoulis C.G., Tzakos A.G., Siskos M., Gerothanassis I.P. *Molecules*, 2014, vol. 19, pp. 13643–13682.
19. Sheichenko V.I., Sheichenko O.P., Anufriev V.V., Tolkachev O.N., Diumaev K.M., Sokol'skaia T.A. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2016, vol. 50, no. 2, pp. 51–57. (in Russ.).
20. Gray D.E., Upton R., Chandra A., Porter A., Harris R.K. *Phytochem. Anal.*, 2006, vol. 16(1), pp. 56–62.

Received April 6, 2016

Revised May 26, 2016

* Corresponding author.

