

УДК 543.42.062:543.544.5:615.073:615.322

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО

М.А. Марченко¹, И.Н. Зилфикаров^{1,2}, Т.А. Ибрагимов^{3,4}, А.Г. Малеев¹

¹ЗАО «ВИФИТЕХ», 142279, Россия, Московская обл., п. Оболенск, ГНЦ ПМБ, к. 84

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

³ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», 367000, Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. Батырая, 4

⁴ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», 367012, Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. Ленина, 1

E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru ; dagfarm@mail.ru

В статье представлены новые подходы к стандартизации сухого экстракта и лекарственных препаратов (ЛП) гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.). Предложены методики спектрофотометрического определения флавоноидов, терпенолактонов и гинкголевых кислот в активной фармацевтической субстанции (АФС) «Гинкго двулопастного экстракт сухой» (далее «экстракт гинкго»), а также методики анализа ЛП «ГИНКГО, таблетки, покрытые оболочкой, 40 мг» (далее «ГИНКГО, таблетки») и «ГИНКГО, раствор для приема внутрь, 40 мг/мл» (далее «ГИНКГО, раствор»). **Цель работы** – разработка и валидационная оценка методик стандартизации АФС растительного происхождения – экстракта гинкго, а также ЛП на его основе. **Материалы и методы.** Объектами исследования послужили образцы АФС «Гинкго двулопастного экстракт сухой», ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор», произведенные компанией ЗАО «ВИФИТЕХ» (Россия). Методы исследования: спектрофотометрия (далее «СФ-метрия») и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Используемое оборудование: спектрофотометр СФ-56, производство ООО «ЛОМО-СПЕКТР» (Россия) и хроматограф жидкостный марки Shimadzu Prominence LC-20AD (Япония) с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа. **Результаты и обсуждение.** Использование метода СФ-метрии оптимизирует процесс анализа не только в ходе стандартизации готового продукта, но и на всех стадиях промышленного производства ЛП в рамках межоперационного контроля. Содержание суммы флавоноидов в образцах двух серий экстракта гинкго в пересчете на рутин составило методом прямой СФ-метрии – (29,64 ± 0,36) % и (28,88 ± 0,54) %; методом дифференциальной СФ-метрии – (21,78 ± 0,41) и (20,98 ± 0,24) %. Содержание суммы флавоноидов в препаратах «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор» составило: методом прямой СФ-метрии – (9,84 ± 0,15) мг/таб. и (10,07 ± 0,10) мг/мл; методом дифференциальной СФ-метрии – (7,33 ± 1,13) мг/таб. и (8,30 ± 0,13) мг/мл, соответственно. Проанализированы препараты-аналоги «МЕМОПЛАНТ» («Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG») и «ТАНАКАН®» («Beaufour Ipsen Industrie») – полученные результаты сопоставимы. Разработаны методики количественного определения в АФС суммы терпенолактонов методом дифференциальной СФ-метрии и остаточного содержания суммы гинкголевых кислот методом прямой СФ-метрии. В ходе их апробации было установлено, что количество гинкголактонов в исследованных образцах составляет (7,87 ± 0,17) % и (8,03 ± 0,22)% в пересчете на билобалид, а остаточное содержание суммы гинкголевых кислот не превышает 10 ppm. Подтверждена целесообразность и эффективность применения метода ВЭЖХ для одновременного определения подлинности и оценки доброкачественности субстанции и ЛП гинкго. **Заключение.** Разработаны методики СФ-метрического количественного определения суммы флавоноидов в АФС и ЛП, полученных из листьев гинкго двулопастного. Применительно к АФС предложены методики СФ-метрического определения суммы терпенолактонов и остаточного содержания суммы гинкголевых кислот. Разработанные методики отвечают валидационным критериям, характеризуются точностью и воспроизводимостью в сочетании с простотой исполнения и апробированы в условиях фармацевтического производства.

Ключевые слова: гинкго экстракт, гинкгофлавоногликозиды, терпенолактоны, гинкголевые кислоты, спектрофотометрия

Для цитирования:

Марченко М.А., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Малеев А.Г.
РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО. Фармация и фармакология. 2017;5(3):222-241. DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-222-241

For citation:

Marchenko M.A., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A., Maleev A.G. DEVELOPMENT OF THE METHODS OF STANDARTIZATION OF THE METHODS OF STANDARTIZATION DRY EXTRACT AND MEDICAL DRUGS GINKGO BILOBA. Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):222-241. (In Russ.) DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-222-241

DEVELOPMENT OF THE METHODS OF STANDARDIZATION DRY EXTRACT AND MEDICAL DRUGS GINKGO BILOBA

M.A. Marchenko¹, I.N. Zilfikarov^{1,2}, T.A. Ibragimov^{3,4}, A.G. Maleev¹

¹ CJSC «VIFITEH», 84, SSC PMB, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia

² All-Russian Science Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 1, building, 7, Grina str, Moscow, 117216, Russia

³ Dagestan State University, 4, Batyraya str, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000, Russia

⁴ Dagestan State Medical University, 1, Lenina str, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367012, Russia

E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru; dagfarm@mail.ru

The article presents new approaches to standardization of dry extract and medicinal preparations (MD) of ginkgo biloba. Methods for the spectrophotometric determination of flavonoids, terpenolactones and ginkgoic acids in the active pharmaceutical substance "Ginkgo biloba dry extract" (further in the text "ginkgo extract"), as well as methods for analysis of MD "GINKGO, tablets coated with 40 mg" ("GINKGO", Tablets) and "GINKGO, solution for enteral use, 40 mg/ml" ("GINKGO, solution"). **The aim** – development and validation of methods for standardization of plant-derived APS – ginkgo extract, as well as MD based on it. **Materials and methods.** The samples of the APS "Ginkgo biloba dry extract", MD "GINKGO, tablets" and "GINKGO, solution", produced by CJSC "VIFITEH" (Russia) served as the objects of the study. Research methods: spectrophotometry (further in the text "SF-metry") and high-performance liquid chromatography (HPLC). Used equipment: SF-56 spectrophotometer manufactured by LLC "LOMO-SPECTR" (Russia) and liquid chromatograph of the brand Shimadzu Prominence LC-20AD (Japan) with software control and computer processing of analysis results. **Results and discussion.** The use of the method of SF-metry optimizes the analysis process not only during the standardization of the finished product, but also at all stages of industrial production of MD within the framework of interoperational control. The content of the sum of flavonoids in the samples of two series of ginkgo extract in terms of rutine was determined by direct SF-metry – (29.64 ± 0.36)% and (28.88 ± 0.54)%; method of differential SF-metry – (21.78 ± 0.41) and (20.98 ± 0.24)%. The content of the amount of flavonoids in the preparations "GINKGO, tablets" and "GINKGO, solution" was: by direct SF-metry – (9.84 ± 0.15) mg/tab. and (10.07 ± 0.10) mg/ml; Method of differential SF-metry – (7.33 ± 1.13) mg/tab. and (8.30 ± 0.13) mg/ml, respectively. The analogues "MEMOPLANT" ("Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG") and "TANAKAN®" ("Beaufour Ipsen Industrie") were analyzed – the results obtained are comparable. Methods for quantitative determination of the amount of terpenolactones in the APS by the method of differential SF-metry and the residual content of the sum of ginkgoic acids by the direct SF-metry method are developed. During their approbation it was found that the amount of ginkgolactones in the samples studied is 7.87 ± 0.17% and 8.03 ± 0.22%, calculated as bilobalide, and the residual content of ginkgoic acid does not exceed 10 ppm. The expediency and effectiveness of using the HPLC method for simultaneous determination of the authenticity and evaluation of the benign nature of the substance and MD ginkgo was confirmed. **Conclusion.** The methods of the SF metric quantification of the amount of funds have been developed. The developed methods meet the validation tests, are characterized by accuracy and reproducibility in combination with simplicity of execution and are tested in the conditions of pharmaceutical production.

Keywords: Ginkgo extract, ginkgofavonglycosides, terpenolactones, ginkgolic acids, spectrophotometry

Введение. Ноотропы – фармакологическая группа лекарственных препаратов (ЛП), которые оказывают специфическое позитивное влияние на высшие интегративные функции мозга человека, умственную деятельность, повышают устойчивость к различным повреждающим факторам, снижают неврологический дефицит и улучшают кортико-субкортикальные связи [1, 2]. В современном ассортименте ноотропных средств особое место принадлежит препаратам растительного происхождения, которые при правильном применении действуют не менее эффективно, чем синтетические или полусинтетические аналоги, при этом они, как правило, не вызывают побочных эффекты. Среди них выделяют ЛП на основе гинкго двулопастного листьев экстракта (*Extractum foliorum Ginkgo bilobae*), характеризующиеся цереброваскулярной активностью.

Реализация фармакологического эффекта препаратов гинкго происходит через опосредованное воздействие на нервную клетку, обусловленное улучшением как системного мозгового кровотока, так и микроциркуляции, а также антиагрегантным и антигипоксическим действием [3, 4, 5].

Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba L.*) – голосеменное листопадное реликтовое дерево, которое является единственным современным представителем сем. Гинкговые (Ginkgoaceae). Листья гинкго включены в Российскую, Европейскую и Британскую фармакопеи и служат сырьем для производства ряда ЛП (Танакан, Мемоплант, Билобил, Гинкго-Форт и др.) и биологически активных добавок (БАД) к пище, которых насчитывается несколько десятков наименований. Однако, в силу различных причин, в том числе относительно

высокой стоимости конечного продукта, спрос на данные препараты остается нереализованным [1, 6, 7, 8]. В связи с вышеизложенным, задача создания российских ЛП на основе экстракта гинкго, не уступающих по качеству, эффективности и безопасности зарубежным аналогам, весьма актуальна. Созданию импортозамещающих ЛП из листьев гинкго препятствуют такие факторы, как необеспеченность лекарственным растительным сырьем и стандартными образцами (СО), в ряде случаев сложность проведения методик анализа и др.

Аналізу экстракта гинкго и его препаратов посвящен ряд исследований [9, 10, 11, 12, 13]. В большинстве методик, предложенных ранее, основное внимание уделяется двум классам биологически активных веществ (БАВ): флавоноидным гликозидам, объединенным под общим названием «гинкгофлавоногликозиды», «гинкгозиды», «гинкгофлавоны», и терпенолактонам, которые также объединяют под групповым названием «гинкголиды», «гинкголактоны», «билобалиды» [14, 15, 16]. В публикациях последних лет отмечается потенциальная опасность неконтролируемого применения неочищенного экстракта гинкго, связанная с проявлением ряда побочных эффектов, в частности, аллергических реакций и токсического воздействия на желудочно-кишечный тракт, что обусловлено присутствием т.н. гинголевых кислот. В связи с тем, что минимальный курс терапии препаратами гинкго составляет три месяца, а может достигать шести и более месяцев, экстракт гинкго рекомендовано дополнительно нормировать по уровню предельно допустимого содержания суммы гинголевых кислот (по различным источникам не более 5 мг/кг или не более 10 мг/кг) [7, 17, 18,].

Фармацевтическая компания ЗАО «ВИФИТЕХ» воспроизводит технологию АФС – сухого экстракта листьев гинкго двулопастного и внедряет в ассортимент ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор». Технология заключается в экстракции листьев гинкго ацетоном 60% с последующими фракционированием и селективной очисткой от малополярных веществ, в т.ч. от гинголевых кислот. В результате препараты являются полными аналогами ЛП «МЕМОПЛАНТ, таблетки, 40 мг» («Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG», Германия), «ТАНАКАН®», таблетки, 40 мг», и «ТАНАКАН®», раствор, 40 мг/мл» («Beaufour Ipsen Industrie», Франция), которые зарегистрированы и применяются на территории РФ свыше 20 лет [1, 6].

Цель работы – разработка и валидационная оценка методик стандартизации АФС растительного происхождения – сухого экстракта из листьев гинкго двулопастного и лекарственных препаратов на его основе.

Материалы и методы. Объектами исследования являются образцы АФС «Гинкго двулопастного экстракт сухой», ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор», произведенные компанией ЗАО «ВИФИТЕХ». Методы исследования: СФ-метрия в УФ- и видимой области (спектрофотометр СФ-56, ООО «ЛОМО-СПЕКТР», Россия), ВЭЖХ-хроматография в следующих условиях: хроматограф жидкостный с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа марки Shimadzu Prominence LC-20AD (Япония) с дегазатором DGU-20A3R и УФ-ВИД-детектором Shimadzu SPD-20A; хроматографическая колонка – Zorbax EclipseXDB-C18 размером 4,6 × 250 мм и размером частиц сорбента 5 мкм; подвижная фаза – смесь из ортофосфорной кислоты раствора 0,5 % и ацетонитрила для хроматографии (70:30); длина волны детектирования – 370 нм.

Результаты и обсуждение. Согласно данным литературы, флавоноиды экстракта гинкго представлены гликозидами, производными кверцетина, кемпферола и изорамнетина, а также конденсированными по связи C₈–C₃ бифлавоноидами [15, 19].

Обнаружение флавоноидов в исследуемых объектах осуществляли посредством цианидиновой пробы [16], которая позволяет быстро и надежно идентифицировать их, как в АФС, так и в ЛП. Подтверждением подлинности исследуемых объектов также является наличие характеристических пиков агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина на ВЭЖХ-хроматограмме (рис. 1). Гидролиз флавоногликозидов в ходе пробоподготовки проводили в присутствии хлористоводородной кислоты при нагревании реакционной смеси в течение 2 ч в среде этилового спирта.

На этапе разработки и апробации методики ВЭЖХ-анализа принадлежность пиков на хроматограммах анализируемых веществ подтверждали использованием растворов СО кверцетина, кемпферола и изорамнетина (Sigma Aldrich). Анализ полученных экспериментальных данных показал, что с целью упрощения процедуры стандартизации субстанции и ЛП гинкго методом ВЭЖХ, для выявления на хроматограмме характеристических пиков достаточно использовать только СО кверцетина, обнаружение которого позволяет идентифицировать пики кемпферола (соотношение, рассчитанное как $\frac{t_{\text{уд. вещества}}}{t_{\text{уд. кверцетина}}}$ – около 1,9) и изорамнетина ($\frac{t_{\text{уд. вещества}}}{t_{\text{уд. кверцетина}}}$ – около 2,1).

Фармакопея США (USP) дополнительно предусматривает контроль соотношения площадей пиков флавоноидных агликонов кверцетина и кемпферола, которое в доброкачественном продукте не должно превышать 2,5:1; этот показатель исключает введение в состав продукта более доступных веществ – рутина или кверцетина, с целью увеличения содержания флавоноидной фракции [18].

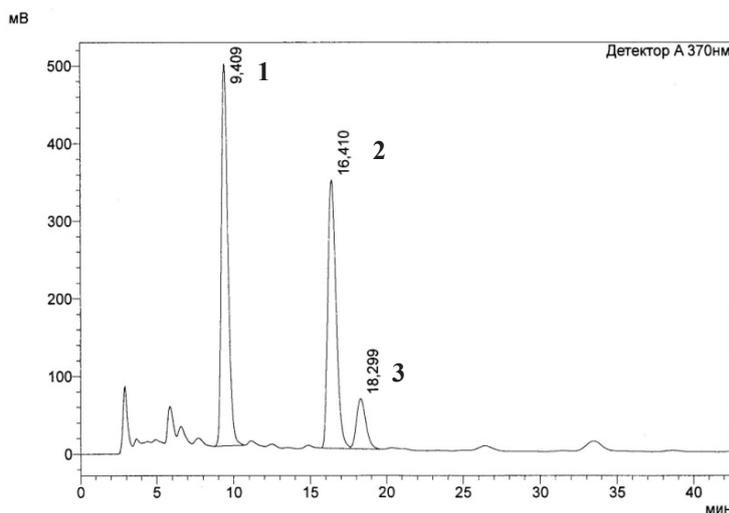


Рисунок 1 – Обнаружение агликонов флавоноидов экстракта гинкго методом ВЭЖХ. Условные обозначения: 1 – пик кверцетина; 2 – пик кемпферола; 3 – пик изорамнетина.

Содержание суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго определяют методами СФ-метрии и ВЭЖХ [20, 13]. Метод ВЭЖХ предусматривает суммирование площадей пиков агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина на хроматограмме гидролизата, полученный результат пересчитывается на сумму флавоноидных гликозидов через площадь пика раствора СО кверцетина и поправочный коэффициент. Методика воспроизводится, позволяет селективно оценивать анализируемый класс веществ, однако зависит от полноты протекания гидролиза флавоногликозидов, трудоемка в исполнении и требует значительных затрат во времени. В условиях промышленного производства дозированных ЛП, в частности, таблеток и раствора, методика ВЭЖХ-анализа может значительно влиять на скорость процессов межоперационного контроля, а именно таблетированной массы, ядер таблеток, промежуточных полупродуктов или растворов; позволяет стандартизировать анализируемый объект только лишь по предельно допустимому нижнему уровню количественного содержания суммы флавоноидов. Преимуществом методики является возможность одновременного определения подлинности и доброкачественности субстанции.

Количественное определение суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго апробировали параллельно по методикам прямой и дифференциальной СФ-метрии. Отличия в подходах реализации методик заключаются в пробоподготовке. В варианте прямой СФ-метрии оптическая плотность измеряется у раствора вещества или суммы веществ в их исходном состоянии, не измененном в ходе какой-либо реакции, и измерение производится относительно растворителя, как правило, бесцветного и прозрачного. В варианте дифференциальной СФ-метрии определение проводится по продуктам химических превращений анализируемого вещества или суммы веществ, измерение проводится относительно раствора, приготовленного аналогично испытуемому, но без добавления реагента, комплексобразователя,

окислителя и др. Применительно к экстракту и ЛП гинкго, в варианте прямой СФ-метрии сумма анализируемых веществ соответствует селективному извлечению – преимущественно фракции флавоноидов, в варианте дифференциальной СФ-метрии – комплексам флавоноидов с катионами алюминия (III), образующимся в слабокислой среде.

УФ-спектры поглощения испытуемых растворов из экстракта гинкго и его ЛП в условиях прямой СФ-метрии имеют т.н. «плечо» или слабо выраженный максимум в области (340 – 375) нм; УФ-спектры поглощения испытуемых растворов в условиях дифференциальной СФ-метрии имеют максимумы в интервале от 405 до 415 нм (табл. 1). В ходе испытаний установлено, что зависимость величин оптической плотности испытуемых растворов от навески экстракта гинкго соответствует валидационному критерию линейности, что позволяет считать оба варианта методики пригодными для стандартизации препаратов гинкго.

В качестве стандартного образца в обеих методиках использовали СО рутина (Sigma Aldrich), имеющий в условиях анализа максимумы поглощения при длинах волн (362 ± 5) нм и (410 ± 5) нм, соответственно. Растворы СО рутина, как в прямой, так и в дифференциальной СФ-метрии, демонстрируют воспроизводимость величины оптической плотности, это послужило основанием для расчета величин удельного показателя поглощения ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) рутина в условиях анализа (табл. 1). Относительная ошибка определения удельного показателя поглощения не превышает 2%, что позволяет использовать установленные величины в расчетах. Как известно, использование точно установленного показателя позволяет значительно сократить продолжительность анализа, снизить величину и вероятность ошибки определения, а также проводить стандартизацию в условиях отсутствия или нехватки СО рутина, что немаловажно для текущего межоперационного контроля на производстве.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика вариантов количественного определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго методом СФ-метрии

Спектрофотометрия																									
Прямая	Дифференциальная																								
1. УФ-спектры поглощения испытуемых растворов, согласно методикам определения суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго																									
<p>Условные обозначения: 1 – испытуемый раствор СО рутина; 2 – испытуемый раствор из ЛП «ГИНКГО, раствор»; 3 – испытуемый раствор из ЛП «ГИНКГО, таблетки»; 4 – испытуемый раствор из субстанции «Гинкго двулопастного экстракт сухой»</p>																									
2. Зависимость оптической плотности от навески по методикам определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго																									
3. Величины удельного показателя поглощения ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) рутина																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>$X_{\text{ср}}$</th> <th>f</th> <th>P</th> <th>S</th> <th>Δx</th> <th>$\epsilon, \%$</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>311,6</td> <td>5</td> <td>0,95</td> <td>2,1323</td> <td>5,48</td> <td>1,76</td> </tr> </tbody> </table>	$X_{\text{ср}}$	f	P	S	Δx	$\epsilon, \%$	311,6	5	0,95	2,1323	5,48	1,76	<table border="1"> <thead> <tr> <th>$X_{\text{ср}}$</th> <th>f</th> <th>P</th> <th>S</th> <th>Δx</th> <th>$\epsilon, \%$</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>186,0</td> <td>5</td> <td>0,95</td> <td>1,3969</td> <td>3,59</td> <td>1,93</td> </tr> </tbody> </table>	$X_{\text{ср}}$	f	P	S	Δx	$\epsilon, \%$	186,0	5	0,95	1,3969	3,59	1,93
$X_{\text{ср}}$	f	P	S	Δx	$\epsilon, \%$																				
311,6	5	0,95	2,1323	5,48	1,76																				
$X_{\text{ср}}$	f	P	S	Δx	$\epsilon, \%$																				
186,0	5	0,95	1,3969	3,59	1,93																				
4. Методики определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго																									
<i>Приготовление испытуемого раствора А</i>																									
<p>К 0,1 г (точная навеска) субстанции прибавляют 30 мл спирта 50% и перемешивают на магнитной мешалке или шейкере в течение 5 мин. Раствор количественно с помощью спирта 50% переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, затем объем доводят тем же спиртом до метки и перемешивают</p>																									
<i>Приготовление испытуемого раствора Б</i>																									
<p>2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты раствора 1%, доводят спиртом 70% до метки и перемешивают</p>	<p>1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия (III) хлорида спиртового раствора 2%, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, затем доводят объем спиртом 50% до метки и перемешивают</p>																								

Продолжение таблицы 1

Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора Б	
При длине волны 362 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм	При длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм
<i>Раствор сравнения</i>	
Раствор спирта этилового 70 %	Раствор, приготовленный аналогично раствору Б, но без добавления раствора алюминия (III) хлорида 2%
<i>Формула расчета содержания суммы флавоноидов в субстанции в пересчете на рутин и сухое вещество (X) в процентах</i>	
$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{311,6 \cdot a \cdot (100 - W)},$	$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{186 \cdot a \cdot (100 - W)},$
где А – оптическая плотность испытуемого раствора Б; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина в условиях анализа; а – навеска субстанции, г; W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.	

При анализе ЛП, содержащих экстракт гинкго, в методики внесены незначительные изменения на стадии пробоподготовки, касающиеся необходимости коррекции навески и дополнительной фильтрации раствора А. Результаты многочисленных исследований подтвердили возможность применения метода СФ-метрии в двух вариантах для определения суммы флавоноидов, так как во всех испытаниях относительная ошибка определения не превышала 2,0 % (табл. 4).

Аналогично были разработаны методики СФ-метрического определения суммы терпенолактонов и суммы гинкголевых кислот с целью количественной оценки.

Терпенолактоны гинкго представлены сескви- и дитерпеновыми производными. Данная группа БАВ характеризуется отсутствием выраженных полос

поглощения, что явилось обоснованием разработки их количественного определения методом дифференциальной СФ-метрии по реакции с окисляющим реактивом по аналогии с ранее описанной [21]. Пробоподготовка предусматривает селективное выделение из экстракта гинкго терпеноидной фракции неполярным хлорсодержащим органическим растворителем. В качестве стандартного образца использовали билобалид (*Bilobalide from Ginkgo biloba leaves, Sigma Aldrich*), который в присутствии концентрированной серной кислоты образует соединение с выраженным максимумом поглощения при длине волны (292 ± 5) нм. Суммарный УФ-спектр продуктов окисления терпенолактонов экстракта гинкго в условиях анализа показал максимумы поглощения при (267 ± 5) нм и (295 ± 5) нм (рис. 2).

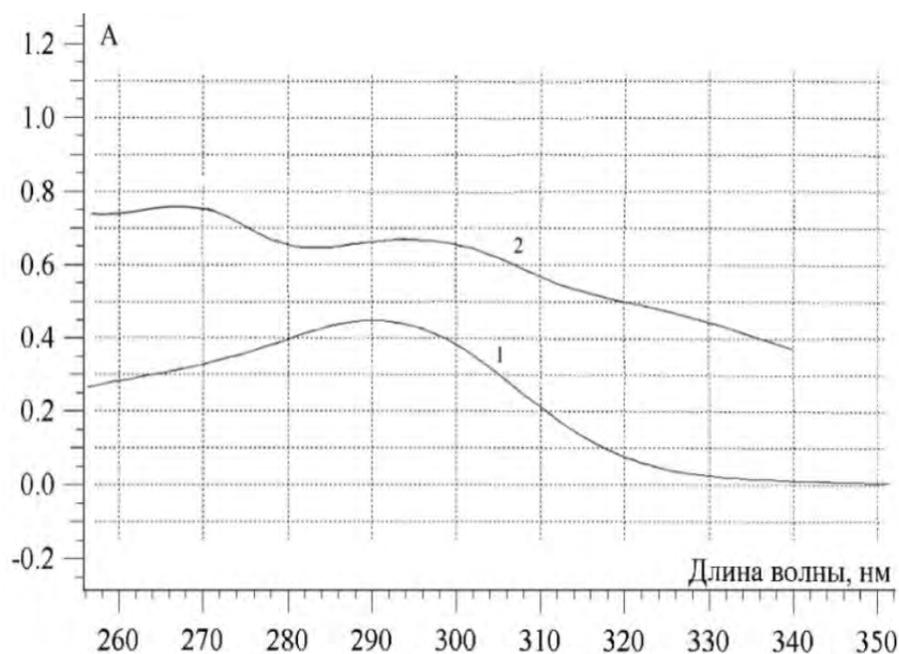


Рисунок 2 – УФ-спектры поглощения продуктов окисления билобалида (1) и суммы терпенолактонов экстракта гинкго (2) серной кислотой концентрированной

Зависимость оптической плотности испытуемых растворов от навески экстракта гинкго имеет линей-

ный характер (рис. 3), что является надежным критерием для применения данного подхода.

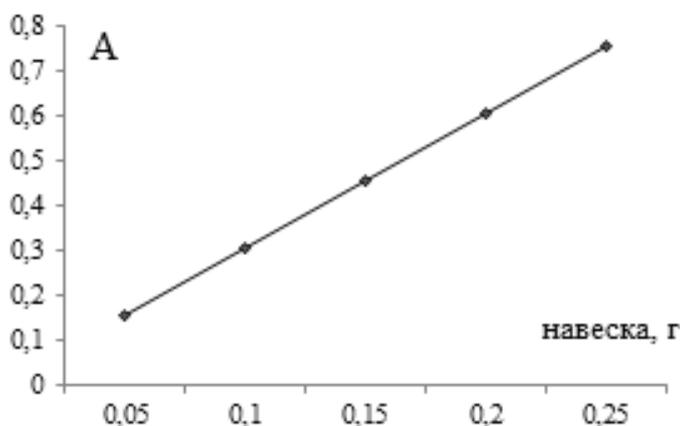


Рисунок 3 – Зависимость оптической плотности испытуемого раствора от навески экстракта гинкго в методике количественного определения суммы терпенолактонов

При разработке методики был рассчитан удельный показатель поглощения ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) билобалида, который в условиях анализа составил 9,8 ($f = 5$; $P = 0,95$). Относительная ошибка определения составила 2,98%, что позволяет использовать рассчитанный показатель в стандартизации экстракта.

Методика определения суммы терпенолактонов в сухом экстракте гинкго методом СФ-метрии представлена в табл. 2. Она была апробирована на образцах сухого экстракта гинкго производства

ЗАО «ВИФИТЕХ». Анализ проводили в шести повторностях, полученные результаты обрабатывали статистическим методом; относительная ошибка определения не превышает 3,0%. Установлено, что содержание суммы терпенолактонов в экстракте гинкго, определяемое СФ-метрическим методом, позволяет нормировать данный показатель на уровне «не менее 6,0%», что соответствует ранее установленным международным требованиям (табл. 4) [18, 20].

Таблица 2 – Методика количественного определения суммы терпенолактонов в экстракте гинкго

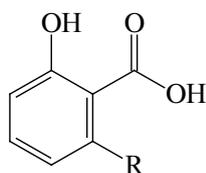
<i>Приготовление испытуемого раствора А</i>
К 0,2 г (точная навеска) субстанции прибавляют 40 мл хлороформа и перемешивают в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре (60-70) °С. Затем смесь фильтруют с 2,0 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки вместимостью 250 мл. Коническую колбу и фильтр количественно промывают хлороформом 2 раза порциями по 15 мл. Хлороформное извлечение упаривают на роторном испарителе под вакуумом при температуре (50-60)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток растворяют в 5 мл хлороформа при слабом нагревании на водяной бане и переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл. Колбу для отгонки количественно промывают тем же растворителем дважды порциями по 2 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят хлороформом до метки и перемешивают
<i>Приготовление испытуемого раствора Б</i>
5,0 мл раствора А помещают в колбу для отгонки вместимостью 50 мл и упаривают на роторном испарителе под вакуумом при температуре (50-60)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток смешивают с 5 мл серной кислоты концентрированной, которые затем переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, колбу ополаскивают 3 мл кислоты, которые присоединяют к основному объему в мерной колбе. Объем раствора доводят до метки серной кислотой концентрированной и перемешивают
Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора Б – При длине волны 295 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм
<i>Раствор сравнения – кислота серная концентрированная</i>
<i>Формула расчета содержания суммы терпенолактонов в субстанции В пересчете на билобалид и сухое вещество (X) в процентах:</i>
$X = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)}$

Продолжение таблицы 2

где	A	—	Оптическая плотность испытуемого раствора Б
	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	—	удельный показатель поглощения билобалида в условиях анализа;
	a	—	навеска субстанции, г;
	W	—	потеря в массе при высушивании субстанции, %.

Важнейшей особенностью экстракта гинкго является возможное присутствие в его составе т.н. гинкголевых кислот, поэтому технология его промышленного производства предусматривает жидкость-жидкостную экстракцию *n*-гептаном или другим подходящим экстрагентом с целью их удаления.

Потенциальное побочное влияние гинкголевых кислот определяет необходимость контроля их остаточного содержания в субстанции с целью обеспечения безопасности ЛП. По свойствам и химической структуре гинкголевые кислоты являются малополярными 6-алкилпроизводными салициловой кислоты (рис. 4).



R = $-\text{C}_{13}\text{H}_{27}$ – гинкголевая кислота GA C 13:0 (6-тридецил-салициловая кислота);
 R = $-\text{C}_{15}\text{H}_{29}$ – гинкголевая кислота GA C 15:1 (анакардиевая кислота;
 6-пентадецил-салициловая кислота);
 R = $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ – гинкголевая кислота GA C 15:0 (6-пентадецил-салициловая кислота);
 R = $-\text{C}_{17}\text{H}_{31}$ – гинкголевая кислота GA C 17:1 (6-гептадецил-салициловая кислота)

Рисунок 4 – Гинкголевые кислоты, идентифицированные в листьях гинкго двулопастного

При разработке методики испытаний были учтены их физико-химические свойства (табл. 3). Экстрагентом анализируемой фракции для обработки навески сухого экстракта гинкго в ходе пробоподготовки был выбран *n*-гептан, который позволяет исключить мешающее влияние как сопутствующих полярных соединений, так и терпенолактонов, которые нерастворимы в данном экстрагенте. В качестве стандартного образца мы использовали 6-тридецил-салициловую кислоту (*Ginkgolic acid* (GA) C 13:0, *Sigma Aldrich*). Раствор GA C 13:0 имеет выраженный максимум по-

глощения при длине волны (311 ± 2) нм, которая была принята нами в качестве аналитической в методике спектрофотометрического определения. Навеска анализируемой субстанции подобрана так, что при наличии остаточного количества суммы гинкголевых кислот более 10 ppm (0,001 %), оптическая плотность испытуемого раствора будет превышать 0,167, а на УФ-спектре будет присутствовать т.н. «плечо» или максимум. В образцах экстракта, прошедших испытания, содержание суммы гинкголевых кислот соответствует установленной норме (рис. 5).

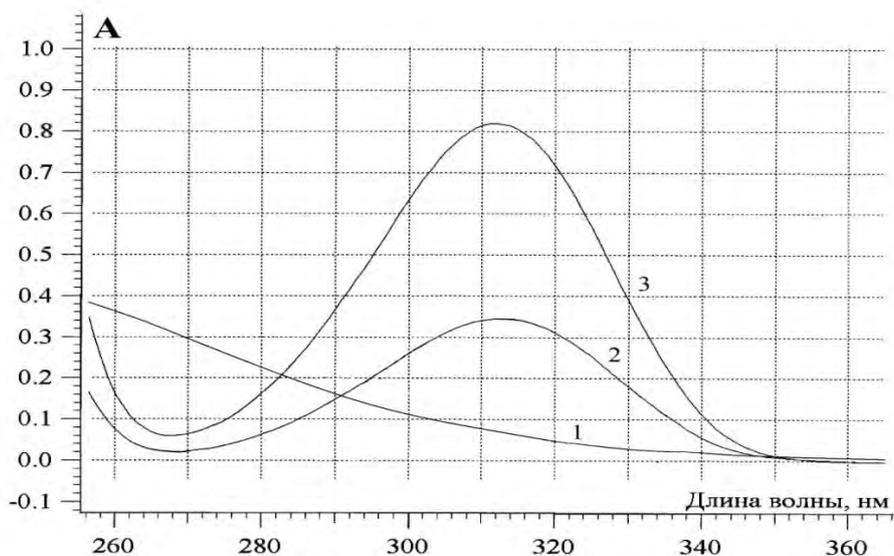


Рисунок 5 – УФ-спектры поглощения испытуемого раствора экстракта гинкго и растворов СО гинкголевой кислоты

Условные обозначения:

- 1 – испытуемый раствор экстракта гинкго;
 2 – раствор СО гинкголевой кислоты GA C 13:0 0,520 мг/мл;
 3 – раствор СО гинкголевой кислоты GA C 13:0 0,208 мг/мл.

Таблица 3 – Методика испытания сухого экстракта гинкго на остаточное содержание суммы гинкголевых кислот

<i>Приготовление испытуемого раствора</i>
15,000 г порошка субстанции, предварительно высушенной в течение 5 ч, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 100 мл <i>n</i> -гептана и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Смесь фильтруют с 2 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки вместимостью 250 мл. Коническую колбу и фильтр промывают 20 мл <i>n</i> -гептана, которые присоединяют к основному раствору. Фильтрат упаривают на роторном испарителе при температуре (75-85)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток смешивают с 5 мл <i>n</i> -гептана, затем количественно с помощью того же растворителя переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят гептаном до метки, перемешивают и фильтруют
<i>Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора –</i> При длине волны 311 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм
Раствор сравнения – <i>n</i> -гептан
Нормирование: Оптическая плотность испытуемого раствора должна быть не более 0,167 (содержание суммы гинкголевых кислот в пересчете на гинкголевую кислоту С 13:0 – не более 0,001%)

Экспериментальные данные, полученные в лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», подтвердили результативность применения метода СФ-метрии для оценки остаточного содержания суммы гинкголевых кислот в субстанции, нормируемых по верхнему пределу. Относительная ошибка проведенных испытаний не превышает 2,0%.

В ходе апробации в условиях фармацевтического производства было установлено, что разработанные методики для показателей подлинность, соотношение кверцетина и кемпферола, испытание на содержание суммы гинкголевых кислот, количественное определение суммы флавоноидов (гинкгофлавоногликозидов) и суммы терпенолактонов включены в НД на субстанцию «Гинкго дву-

лопастного экстракт сухой» (ЗАО «ВИФИТЕХ») и являются обязательными для ее стандартизации. Применительно к лекарственным формам, содержащим стандартизованный экстракт гинкго, в анализе по показателю «Количественное определение», целесообразно ограничиться оценкой содержания суммы флавоноидов, так как этот показатель достаточно информативный, характеризуется точностью, воспроизводимостью и простотой исполнения, что очень важно для межоперационного контроля полупродуктов. Кроме того, на данный показатель значительно меньшее влияние способны оказывать вспомогательные компоненты, входящие в состав ЛП. Результаты апробации методик представлены в табл. 4, 5 и 6.

Таблица 4 – Результаты апробации методик стандартизации субстанции «Гинкго двулопастного экстракт сухой» (ЗАО «ВИФИТЕХ»)

Показатель качества		Результат испытания субстанции	
		Образец 1 (сер. 011216)	Образец 2 (сер. 021216)
Качественная реакция на флавоноиды		Положительная	Положительная
Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина		Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина	
Соотношение кверцетина и кемпферола		1,31	1,22
Содержание суммы флавоноидов, %	Метод прямой СФ-метрии	29,64 ± 0,36 (ε = 1,21%)	28,88 ± 0,54 (ε = 1,87%)
	Метод дифференциальной СФ-метрии	21,78 ± 0,41 (ε = 1,88%)	20,98 ± 0,24 (ε = 1,14%)
Содержание суммы терпенолактонов, %		7,87 ± 0,17 (ε = 2,16 %)	8,03 ± 0,22 (ε = 2,74 %)
Испытание на остаточное содержание суммы гинкголевых кислот, %		Выдерживает испытание	Выдерживает испытание

Таблица 5 – Результаты апробации методик стандартизации таблеток с экстрактом гинкго

Показатель качества		Результат испытания таблеток	
		«ГИНКГО, таблетки» (ЗАО «ВИФИТЕХ»), Россия	«МЕМОПЛАНТ, таблетки, покрытые оболочкой, 40 мг», Германия
Качественная реакция на флавоноиды		Положительная	Положительная
Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина		Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина	
Соотношение кверцетина и кемпферола		0,21	1,3
Содержание суммы флавоноидов, мг/таб.	Метод прямой СФ-метрии	9,84±0,15 (ε=1,56%)	8,6±0,11 (ε=1,34%)
	Метод дифференциальной СФ-метрии	7,33±1,13 (ε=1,76%)	6,84±0,13 (ε=1,85%)

Таблица 6 – Результаты апробации методик стандартизации раствора с экстрактом гинкго

Показатель качества		Результат испытания раствора	
		«ГИНКГО, раствор» (ЗАО «ВИФИТЕХ»), Россия	«ТАНАКАН®», раствор для приема внутрь, 40 мг/мл («Beaufour Ipsen Industrie»), Франция
Качественная реакция на флавоноиды		Положительная	Положительная
Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина		Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина	
Соотношение кверцетина и кемпферола		1,31	1,37
Содержание суммы флавоноидов, мг/мл	Метод прямой СФ-метрии	10,07 ± 0,1 (ε = 1,03 %)	9,63 ± 0,11 (ε = 1,17 %)
	Метод дифференциальной СФ-метрии	8,30 ± 0,13 (ε = 1,57 %)	7,81 ± 0,11 (ε = 1,44 %)

Заключение. Предложены методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов, терпенолактонов и гинкголевых кислот, нормируемых при стандартизации АФС растительного происхождения – «Гинкго двулопастного экстракт сухой»; технология которой воспроизведена фармацевтической компанией ЗАО «ВИФИТЕХ» (Россия). Все методики разработаны с учетом физико-химических свойств определяемых классов БАВ, отвечают современным требованиям, адаптированы к условиям промышленного производства и контроля качества. Подтверждена эффективность метода ВЭЖХ для одновременной идентификации и оценки доброкачественности экстракта и препаратов гинкго.

Проведена сравнительная оценка спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в различных вариантах, которые характеризуются точностью и воспроизводимостью в сочетании с простотой исполнения. Методики анализов апробированы в контрольно-аналитической лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», полученные результаты прошли валидационную оценку по основным критериям, которые показали возможность их применения как для межоперационного контроля полупродуктов, так и для стандартизации готовых продуктов, получаемых из листьев гинкго двулопастного – экстракта сухого и ЛП «ГИНКГО, таблетки покрытые оболочкой, 40 мг» и «ГИНКГО, раствор для приема внутрь, 40 мг/мл».

Introduction. Nootropics are a group of drugs that have a specific positive effect on the higher integrative functions of the human brain, mental activity, increase resistance to various damaging factors, reduce neurological deficits and improve cortic-subcortical connections [1, 2]. In a modern range of nootropics drugs, a special place belongs to preparations of plant origin that, when properly applied, are no less effective than synthetic or semi-synthetic analogs, and they are usually side effects are minimized. Among them, preparations based on ginkgo biloba leaf extract (*Extractum foliorum Ginkgo bilobae*), characterized by cerebrovascular activity, are distinguished. The realization of the pharmacological effect of ginkgo drugs occurs through an indirect effect on the nerve cell due to the improvement of cerebral blood flow and microcirculation, antiaggregant and antihypoxic effect [3, 4, 5].

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba L.*) is a gymnosperm relict deciduous tree, which is the only modern representative of the family Ginkgolide (*Ginkgoaceae*). Ginkgo leaves are included in the Russian, European and British pharmacopoeias and serve as raw materials for the production of a number of drugs (Tanakan, Memoplant, Bilobil, Ginkgo-Fort, etc.) and biologically active additives (BAA) for food, which number several dozen names. However, due to various reasons, including the relatively high cost of the final product, the demand for these products remains unrealized [1, 6, 7, 8]. Proceeding from the above, the need to create Russian MP that are not inferior in quality, efficiency and safety to foreign analogues is very relevant. The creation of import-substituting drugs is hampered by such factors as the lack raw materials, lack of standard samples (CS), in a number of cases the complexity of conducting analysis techniques, ect.

For an analysis of extract of ginkgo and its preparations are devoted a number of studies [9, 10, 11, 12, 13]. In most of the techniques proposed earlier, the focus has been on two classes of substances: flavonoidal glycosides, collectively known as “ginkgo flavonglycosides,” “ginkgozides,” “ginkgo flavones” and terpenolactones, which also are grouped under the name ginkgolides, ginkgolactones, “Bilobalides” [14, 15, 16]. In the recent publications, there has been a potential danger of uncontrolled use of the crude ginkgo extract, which is associated with a number of side effects, in particular, allergic reactions and toxic effects on the gastrointestinal tract, which occur due to the presence of the so-called. ginkgolic acids. Due to the fact that the minimum length of therapy with ginkgo drugs is three months, but it could reach six months or more, it is recommended for the extract of ginkgo to be additionally normalized according to the level of the maximum allowed content of ginkgoic acid (according to various sources, not more than 5 mg / kg or not more than 10 mg / kg) [7, 17, 18].

Pharmaceutical company CJSC “VIFITEH” reproduces the APS technology of the dry extract of leaves ginkgo biloba and introduces into the assortment of MP: “GINKGO, coated tablets, 40 mg” and “GINKGO, solution for enteral use, 40 mg / ml.” The technology based

on the extraction of ginkgo leaves with 60% acetone, followed by fractionation and selective purification from low-polar substances, including from ginkgoic acids. As a result, the preparations become full analogues of drugs “MEMOPLANT, tablets coated with a film coating of 40 mg” (“Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG”, Germany), “TANAKAN®, tablets coated with 40 mg”, and “TANACAN®, solution for ingestion of 40 mg / ml” (“Beaufour Ipsen Industrie”, France), which are registered and used in Russian Federation for more than 20 years [1, 6].

The aim – is the development and validation of methods for standardizing of APS – dry extract, and ginkgo biloba preparations.

Materials and methods. The subjects of the study are samples of the APS “Ginkgo biloba dry extract” and MP – “GINKGO, coated tablets, 40 mg” and “GINKGO, solution for the enteral use, 40 mg/ml” of the Company CJSC “VIFITEH”. Research methods: spectrophotometry in the UV and visible range (spectrophotometer SF-56, manufactured by LLC LOMO-SPECTR, Russia); the conditions for the HPLC chromatography: liquid chromatograph with software control and computer analysis of the results of analysis of the brand Shimadzu Prominence C-20AD with degasser DGU-20A3R and UV-detector Shimadzu SPD-20A; a chromatographic column of Zorbax Eclipse XDB-C18 has measurements 4,6 × 250 mm and a sorbent particle size of 5 μm; mobile phase is a mixture of orthophosphoric acid solution of 0,5% and acetonitrile for chromatography (70: 30); The detection wavelength is 370 nm.

Results and discussion. According to literature data, flavonoids of the ginkgo extract are represented by glycosides, derivatives of quercetin, kaempferol and isorhamnetin, and also by condensed through the bond of C₈-C₃ biflavonoids [15, 19]. The detection of flavonoids was carried out by means of a cyanidin test [16], which allows them to be quickly and reliably identified, both in APS and in the medicinal preparations. The confirmation of the authenticity of the investigated ginkgo MP is also occurred through the presence of characteristic peaks of aglycons of quercetin, kaempferol and isorhamnetin on the HPLC chromatogram (fig. 1). Hydrolysis of flavonoglycosides during the sample preparation was carried out in the presence of hydrochloric acid by heating the reaction mixture for 2 hours in the ethanol medium.

At the stage of development and approbation of the technique of HPLC analysis, the peaks of the analyzed substances on the chromatograms were confirmed by the use of CS solutions of quercetin, kaempferol and isorhamnetin (Sigma Aldrich). Analysis of the obtained experimental data has shown that in order to simplify the procedure for standardizing of the ginkgo substance and drug by HPLC, it is sufficient to use only quercetin CS for the detection of the characteristic peaks on the chromatogram, the detection of which allows us to identify the peaks of kaempferol (the ratio calculated as the $\frac{t_{\text{retention substance}}}{t_{\text{retention quercetin}}}$ – about 1,9 and $\frac{t_{\text{retention isorhamnetin/quazzetin}}}{t_{\text{retention quercetin}}}$ – about 2,1).

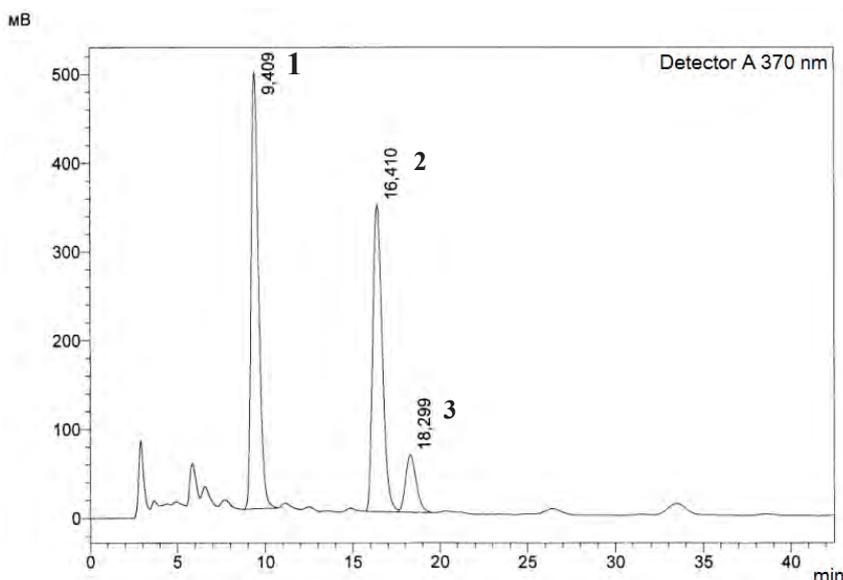


Figure 1 – Detection of aglycons of flavonoids of the extract of Ginkgo by HPLC.
Legend: 1 – peak of Quercetin; 2 – peak of Kaempferol; 3- peak of Isorhamnetin

Moreover, the United States Pharmacopeia (USP) considers the control of the ratio of peak areas of flavonoid aglycons for quercetin and kaempferol, which in a benign product should not exceed 2,5:1; This indicator eliminates the introduction of more available substances into the product composition – rutin or quercetin, in order to increase the content of the flavonoid fraction [18].

The content of the sum of flavonoids in the extract and preparations of ginkgo is determined by spectrophotometry and HPLC methods [13, 20]. The HPLC method calls for the summation of areas of peaks of aglycons of quercetin, kaempferol and isorhamnetin on the chromatogram, the received amount is recalculated to the sum of flavonoid glycosides through the peak area CS quercetin and correction factor. The procedure could be reproduced, and it allows the selective assessment of the analyzed class of substances, but depends on the completeness of the hydrolysis of flavonol glycosides; it is laborious in execution and requires considerable time expenditure. In the industrial production of metered MP, in particular of tablets and solutions, the HPLC analysis can significantly affect the speed of interoperational control, namely the tablet mass, tablet cores, intermediate intermediates or solutions. It allows standardizing the analyzed subject only according to the maximum permissible lower level of the quantitative content of the amount of flavonoids. Despite the shortcomings, the technique has a significant advantage in the ability of simultaneous determination of the authenticity and quality of the substance.

The quantitative determination of the sum of flavonoids in the extract and ginkgo preparations was simultaneously tested by use of the direct and differential spectrophotometry. The difference of these approaches lies in the preparation of samples. In the direct spectrophotometry, the optical density is measured in a solution of a substance or a sum of substances in their original structure that has not been altered during any reaction, and the measurement is made with respect to a solvent, usually colorless and

transparent. In the variant of the differential spectrophotometry, the determination is made on the products of the chemical transformations of the analyzed substance or the sum of the substances, the measurement here is relative to the solution prepared analogously to the test, but without the addition of a reagent, complexion agent, oxidizer, etc. In the first variant of direct spectrophotometry, the sum of the analyzed substances was selected in accordance with the selective extraction that contains mainly a fraction of flavonoids, in the second variant – colored complexes of flavonoids with aluminum chloride.

The spectra of UV absorption of the test solutions from the extract of ginkgo and its dosage forms under direct spectrophotometric conditions have a so-called “shoulder” or weakly expressed maximum in the region (340 – 375) nm; The spectra of UV absorption of test solutions under differential spectrophotometry conditions have peaks in the range from 405 to 415 nm (table 1). During the tests, we found out that the dependence of the optical density values of the test solutions on the sample of the extract of ginkgo corresponds to the validation criterion of linearity, which makes it possible to consider both versions of the techniques to be suitable for standardizing of ginkgo preparations.

As a standard sample, both methods used CS rutin (Sigma Aldrich), which had absorption maxima at the wavelengths (362 ± 5) nm and (410 ± 5) nm, respectively (table 1). Solutions of CS rutin, in both, direct and in differential spectrophotometry, demonstrate the reproducibility of the optical density, which served as the basis for calculating of the values of the specific absorption index ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) rutin under the analysis conditions (table 1). According to the data of table 1, the relative error in determining the specific absorption index for all variants does not exceed 2%, which allows the use of the specified values in the analysis techniques. As it is known, the use of an accurately established indicator allows significantly reducing the duration of the analysis, reducing of

the magnitude and probability of determination error, as well as standardizing in the absence or shortage of CS

rutine, which is important for the current interoperational control in production.

Table 1 – Comparative characteristics of variants quantitative determination the sum of flavonoids in dry Ginkgo extract by SP-metry

Spectrophotometry											
Direct method			Differential method								
1. UV-absorption spectrums of examinees of solutions, according to techniques of determination of the sum of flavonoids in extract and drugs Ginkgo											
<p>Legend: 1 – test solution of Rutine (CRS); 2 – test solution from “GINKGO, solution”; 3 – test solution from “GINKGOtablets”; 4 – test solution from the substance «Ginkgo extract dry»</p>											
2. Dependence of the optical density on the sample by methods of determining the sum of flavonoids Ginkgo extract											
3. The values of the specific absorption index ($A_{1cm}^{1\%}$) rutine											
$X_{cp.}$	f	P	S	Δx	$\varepsilon, \%$	$X_{cp.}$	f	P	S	Δx	$\varepsilon, \%$
311.6	5	0.95	2.1323	5.48	1.76	186.0	5	0.95	1.3969	3.59	1.93
4. Methods for determining the amount sum of flavonoids in Ginkgo extract											
<i>Preparation of test solution A</i>											
To 0.1 g (precise shot) of the substance add 30 ml of ethanol 50% and mix with a magnetic stirrer shaker for 5 minutes. The solution is quantitatively measured with an ethanol of 50% transferred to a 50 ml volumetric flask, then the volume is adjusted to the mark with the same ethanol and mixed											
<i>Preparation of test solution B</i>											
2.0 ml of solution A is placed in a 50 ml volumetric flask, 0.5 ml of acetic acid is added to a solution of 1%, adjusted to 70 with an ethanol, and mixed			1.0 ml of solution A is placed in a 25 ml volumetric flask, 2 ml of aluminum (III) chloride ethanol solution is added 2%, 0.5 ml of acetic acid is diluted with 30%, then the volume is adjusted with ethanol 70% to the mark and mixed								

Table 1 continued

The spectrophotometric conditions of the test solution B	
At a wavelength of 362 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm	At a wavelength of 410 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm
Comparison solution	
Solution of ethanol 70%	A solution prepared similarly to solution B, but without adding solution aluminum(III) chloride 2%
<p>The formula for calculating the content of the amount of flavonoids in the substance In terms of Rutine and dry matter (X) as a percentage:</p> $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{311,6 \cdot a \cdot (100 - W)},$ $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{186 \cdot a \cdot (100 - W)},$	
where	A – optical density of the test solution B;
	$A_{1cm}^{1\%}$ – specific indicator of absorption of Rutine in the conditions of analysis;
	a – a shot of substance, g;
	W – loss in weight drying, %

The most important feature of the extract of ginkgo is the possible presence in its composition of the so-called ginkgolic acids, therefore, the technology of its industrial production provides liquid-liquid extraction with n-heptane or with other suitable extractant for the purpose of their removal. The potential side effect of ginkgoic acids determines the need to monitor their residual content in the substance in order to ensure the safety of MP.

By their properties and chemical structure ginkgoic acids are low-polar 6-alkyl derivatives of salicylic acid (fig. 4).

In the analysis of MP containing ginkgo extract, the minor changes were made to the procedures during the phase of the sample preparation, concerning the need for correction of the sample and additional filtration of solution A. The results of the numerous studies confirmed the possibility of applying the spectrophotometry method in two variations for the quantitative determination of the sum of flavonoids, because in all tests the relative determination error did not exceed 2% (table 4).

Similarly, methods were developed for the spectro-

photometric determination of the sum of terpenolactones and the sum of ginkgoic acids for the purpose of quantitative assessment.

Terpenolactones of ginkgo are represented by sequi- and diterpene derivatives. This group of BAC is characterized by the absence of pronounced absorption bands, which establish the basis for the development of their quantitative determination by differential spectrophotometry by reaction with an oxidizing reagent, in analogy with the previously described [21]. The sample preparation involves the selective isolation from an extract of the ginkgo of the terpenoid fraction by a nonpolar chlorinated organic solvent. Bibobalide (Bilobalide from Ginkgo biloba leaves, Sigma Aldrich) was used as the standard sample, which in the presence of concentrated sulfuric acid forms a compound with a pronounced absorption maximum at a wavelength of (292 ± 5) nm. The total UV spectrum of oxidation products of terpenolactones of the extract of ginkgo under the analysis conditions showed absorption maxima at (267 ± 5) nm and (295 ± 5) nm (fig. 2)

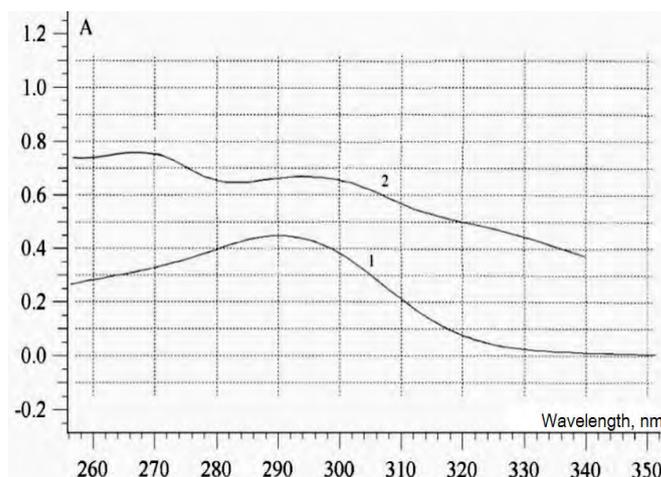


Figure 2 – UV absorption spectra of oxidation products of Bilobalide (1) and the sum of terpenolactones Ginkgo extract (2) with sulfuric acid concentrated

The dependence of the optical density of the test solutions on the sample weight of the extract of ginkgo is linear (fig. 3), which is a reliable criterion for the application of this approach.

When developing the technique, the specific absorption index of bilobalide was calculated under the analysis conditions. The results of the statistical method are presented in table. 3.

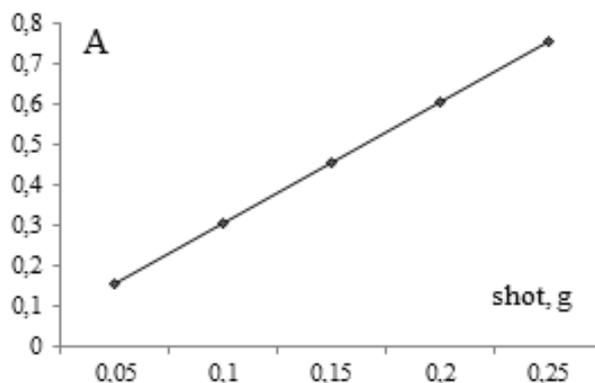


Figure 3 – Dependence of the optical density of the test solution on the sample Ginkgo extract in the quantitative determination of the amount of terpenolactones

As can be seen from the data in Table 3, the relative error of the determination does not exceed 3%, which makes it possible to use the calculated index in the standardization of the extract.

The method of quantitative determination of the sum of terpenolactones in dry ginkgo extract by UV spectrophotometry is presented in table 4. It was tested on samples of dry extract of ginkgo produced by CJSC

«VIFITEH». The assay was performed in six replicates; the results were processed by a statistical method. It was found that the content of the amount of terpenolactones in the extract of ginkgo, determined by the spectrophotometric method, allows to normalize this index at the level of “not less than 6,0%”, since the relative error does not exceed 3,0%, which corresponds to the previously established international requirements (table 6) [18, 20].

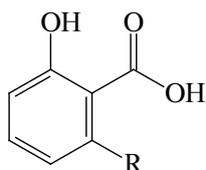
Table 2 – Method for quantitative determination of the amount of terpenolactones in Ginkgo extract

<i>Preparation of test solution A</i>	
To 0.2 g (precise shot) of the substance is added 40 ml of chloroform and stirred for 30 minutes in a water bath under reflux at a temperature of (60-70) ° C. The mixture is then filtered with 2.0 g of sodium sulfate anhydrous into a 250 ml distillation flask. The conical flask and filter are quantitatively washed with chloroform 2 times in 15 ml portions. Chloroform extraction is evaporated on a rotary evaporator under vacuum at a temperature of (50-60) ° C until the organic solvent is completely removed. The residue is dissolved in 5 ml of chloroform under gentle heating in a water bath and transferred to a 10 ml volumetric flask. The distillation flask was quantitatively washed with the same solvent twice in 2 ml portions. The volume of the solution in a volumetric flask is adjusted with chloroform to a mark and mixed	
<i>Preparation of test solution B</i>	
5.0 ml of solution A are placed in a 50 ml flask and are rotary evaporated in vacuum at a temperature of (50-60) ° C until the organic solvent is completely removed. The residue is mixed with 5 ml of sulfuric acid concentrated, which is then transferred to a 10 ml volumetric flask, the flask is rinsed with 3 ml of acid, which is added to the bulk volume in a volumetric flask. The volume of the solution is adjusted to a mark with concentrated sulfuric acid and mixed	
<i>The spectrophotometric conditions of the test solution B –</i> At a wavelength of 295 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm	
<i>Comparison solution – sulfuric acid concentrated</i>	
<i>The formula for calculating the amount of terpenolactone in the substance in terms of Bilobalide and dry matter (X) as a percentage:</i>	
$X = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)}$	
where	A – optical density of the test solution B;
	$A_{1cm}^{1\%}$ – specific indicator of absorption of Bilobalide in the conditions of analysis;
	a – a shot of substance, g;
	W – loss in weight drying, %

The most important feature of the extract of ginkgo is the possible presence in its composition of the so-called ginkgolic acids, therefore, the technology of its industrial production provides liquid-liquid extraction with n-heptane or with other suitable extractant for the purpose of

their removal. The potential side effect of ginkgoic acids determines the need to monitor their residual content in the substance in order to ensure the safety of MP.

By their properties and chemical structure ginkgoic acids are low-polar 6-alkyl derivatives of salicylic acid (fig. 4).



R = -C₁₃H₂₇ -Ginkgolic acid GA C 13:0 (6-tridecylsalicylic acid),
 R = -C₁₅H₂₉ -Ginkgolic acid GA C 15:1 (anicardic acid, 6-pentadecenylsalicylic acid),
 R = -C₁₅H₃₁ -Ginkgolic acid GA C 15:0 (6-pentadecylsalicylic acid),
 R = -C₁₇H₃₁ -Ginkgolic acid GA C 17:1 (6-heptadecenyl salicylic acid)

Figure 4 – Ginkgolic acids identified in leaves of *Ginkgo biloba*

During the development of the test procedure, their physicochemical properties were taken into account (table 3). Extracting agent for the fraction to be analyzed for processing of the sample of dry extract of ginkgo during the sample preparation was *n*-heptane, which eliminates the interfering effect of both the concomitant polar compounds and terpenolactones that are insoluble in this extracting. For a standard sample, we used 6-tridecyl-salicylic acid (*Ginkgolic acid (GA) C 13: 0, Sigma Aldrich*). A solution of GA C 13:0 has a pronounced absorption

maximum at a wavelength (311 ± 2), which we accepted to be analytical in the spectrophotometric determination technique (fig. 5). The sample of the substance to be analyzed is selected so that, if there is a residual amount of ginkgolic acid more than 10 ppm (0.001%), the optical density of the test solution will exceed 0.167, and the UV spectrum will contain a so-called “shoulder” or maximum. In samples of the extract that have been tested, the content of the sum of ginkgolic acids corresponds to the established norm (fig. 5).

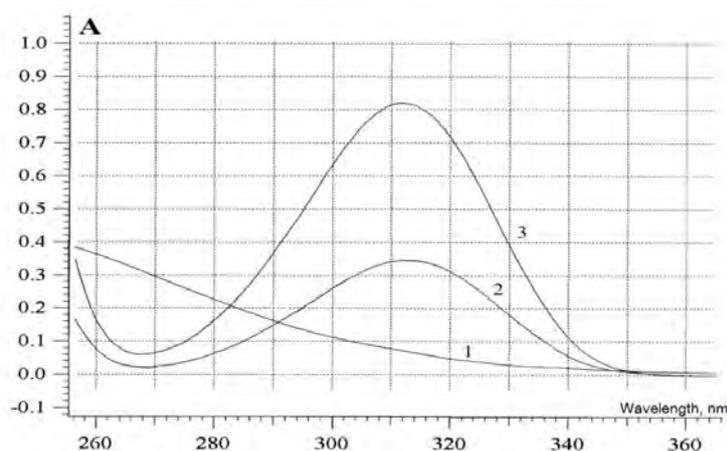


Figure 5 – UV-absorption spectra of the test solution of the extract of *Ginkgo* and solutions of Ginkgolic acid

Legend: 1 – test solution of ginkgo extract; 2 – solution of Ginkgolic acid GA C 13:0 0.520 mg/ml; 3 – solution of Ginkgolic acid GA C 13:0 0.208 mg/ml

Table 3 – Test procedure for dry *Ginkgo* extract for residual content the sum of Ginkgolic acids

Preparation of test solution
15.000 g of a substance powder previously dried for 5 hours is placed in a 250 ml conical flask, about 100 ml of <i>n</i> -heptane is added and mixed on a magnetic stirrer for 30 minutes. The mixture is filtered with 2 g of sodium sulfate anhydrous into a 250 ml distillation flask. The conical flask and filter are washed with 20 ml of <i>n</i> -heptane, which are attached to the basic solution. The filtrate is evaporated on a rotary evaporator at a temperature of (75-85) ° C until the organic solvent is completely removed. The residue is mixed with 5 ml of <i>n</i> -heptane, then quantitatively with the same solvent is transferred to a 10 ml volumetric flask. The volume of the solution in a volumetric flask is made up to <i>n</i> -heptane to the mark, mixed and filtered
The spectrophotometric conditions of the test solution –
At a wavelength of 311 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm
Comparison solution- <i>n</i> -heptane
Regulation:
The optical density of the test solution should not be more than 0.167 (the content of the sum of ginkgolic acid sinterms of Ginkgolic acid C13: 0 – not more than 0.001%)

The experimental data obtained in the laboratory of the CJSC «VIFITEH» confirmed the effectiveness of applying the spectrophotometry method for estimating the

residual content of the sum of ginkgolic acids in a substance normalized to the upper limit. The relative error of the tests performed does not exceed 2,0%.

During the approbation in the conditions of pharmaceutical production, it was found that the developed methods for the indicators of authenticity, the ratio of quercetin and kaempferol, the test for the content of the amount of ginkgoic acids, the quantitative determination of the sum of flavonoids (ginkgoflavonoglucosides) and the sum of terpenolactones were included in the ND on the substance "Ginkgo biloba extract dry" (CJSC «VIFITEH») and are mandatory for its standardization. With regard to dosage forms, containing

standardized extract of ginkgo, it is advisable to limit the content of flavonoids in the analysis according to the indicator "Quantitative determination", since this indicator is sufficiently informative, characterized by accuracy, reproducibility and ease of execution, which is very important for control of intermediates. Additionally, this parameter is significantly less influenced by the auxiliary components which make up the MP. The results of approbation of the methods are presented in table 4, 5, 6.

Table 4 – Results of approbation of techniques for standardization of the substance «Ginkgo bilobae dry extract» (CJSC «VIFITEH»)

Quality index		Result of test of substance	
		Model 1 (ser. 011216)	Model 2 (ser. 021216)
High-quality reaction to flavonoids		Positive	Positive
Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Izorhamnetin		Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding to the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin	
Ratio of Quercetin an Kaempferol		1.31	1.22
The content of the amount sum of flavonoids, %	Direct spectrophotometry	29.64 ± 0.36 (ε = 1.21%)	28.88±0.54 (ε = 1.87%)
	Differential spectrophotometry	21.78 ± 0.41 (ε = 1.88%)	20.98±0.24 (ε = 1.14%)
The content of the amount sum of terpenolactones, %		7.87 ± 0.17 (ε = 2.16 %)	8.03 ± 0.22 (ε = 2.74 %)
The test for the residual content of the sum of Ginkgoic acids, %		With stands the test	With stands the test

Table 5 – Results of approbation of standardization procedures for tablets with Ginkgo extract

Quality index		Result of test of tablets	
		«GINKGO, tablets 40 mg» (CJSC «VIFITEH»), Russia	«MEMOPLANT, tablets 40 mg» («Dr. WillimarSchwabe GmbH & Co. KG»), Germany
High-quality reaction to flavonoids		Positive	Positive
Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Izorhamnetin		Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding to the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin	
Ratio of Quercetin and Kaempferol		0.21	1.3
The content of the amount sum of flavonoids, mg/tab.	Direct spectrophotometry	9.84±0.15 (ε=1.56%)	8.6±0.11 (ε=1.34%)
	Differential spectrophotometry	7.33±1.13 (ε=1.76%)	6.84±0.13 (ε=1.85%)

Table 6 – Results of approbation of standardization techniques for solutions with Ginkgo extract

Quality index		Result of test of solution	
		«GINKGO, solution 40 mg/ml» (CJSC «VIFITEH»), Russia	«TANAKAN®», solution 40 mg/ml» («Beaufour Ipsen Industrie»), France
Ratio of Quercetin and Kaempferol		Positive	Positive
Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin		Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin	
Ratio of Quercetin and Kaempferol		1.31	1.37
The content of the amount sum of flavonoids, mg/ml	Direct SF-metry	10.07 ± 0.1 (ε = 1.03 %)	9.63 ± 0.11 (ε = 1.17 %)
	Differential SF-metry	8.30 ± 0.13 (ε = 1.57 %)	7.81 ± 0.11 (ε = 1.44 %)

Conclusion. The methods of spectrophotometric determination of the total content of sum of flavonoids, terpenolactones and ginkgoic acids, normalized by standardization of a pharmacologically active substance of plant origin – “Ginkgo biloba extract dry”, the technology of which was reproduced by the pharmaceutical company CJSC “VIFITEH” (Russia) are proposed. All methods are designed taking into account the physical and chemical properties of the identified classes of BAC, meet modern requirements, and are adapted to the conditions of industrial production and quality control. The effectiveness of the HPLC method was confirmed for the

simultaneous identification and evaluation of the benignity of Ginkgo extract and preparations. A comparative evaluation of the spectrophotometric determination of the sum of flavonoids was carried out in the different variants, which are characterized by precision and reproducibility combined with ease of execution. The methods were tested in the control and analytical laboratory of the CJSC “VIFITEH”, the results were validated according to the main criteria that showed the possibility of their use for the control between operation of intermediates and for standardization of the substance, “GINKGO, 40 mg coated tablets” and “GINKGO, solution for enteral use, 40 mg/ml”.

Библиографический список

1. Государственный реестр лекарственных средств РФ. URL: grls.rosminzdrav.ru (дата обращения: 04.04.2017).
2. Tan M.S., Yu J.T., Tan C.C., Wanq H.F., Menq X.F., Wanq C., Jiang T., Zhu X.C., Tan L. EFFICACY AND ADVERSE EFFECTS OF GINKGO BILOBA FOR COGNITIVE IMPAIRMENT AND DEMENTIA: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43(2). P. 589-603. DOI: 10.3233/JAD-140837
3. Онбыш Т.Е., Макарова Л.М., Погорелый В.Е. МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ГИНКГО БИЛОБА // *Современные наукоемкие технологии.* 2005. №5. С. 22–25. URL: <https://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=22912> (дата обращения: 04.04.2017).
4. Корчагина Д.В., Куркина А.В., Дубищев А.В., Кочнева О.Н., Гусев Д.О. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО // *Фундаментальные исследования.* 2013. № 10-4. С. 812-815. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32407> (дата обращения: 04.04.2017).
5. Ковров Г.В., Палатов С.Ю., Лебедев М.А., Мачулина А.И. ИНСОМНИЯ И КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ // *Эффективная фармакотерапия.* 2014. № 31. С. 28-33.
6. Куркин В.А., Петрухина И.К. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ИМПОРТОЗАМЕЩАЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ // *Фундаментальные исследования.* 2014. № 11. С. 366-371. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35529> (дата обращения: 04.04.2017).
7. Эллер К.И., Балусова А.С., Комарова Е.Л. ОЦЕНКА ПОДЛИННОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, КАК СЫРЬЯ ДЛЯ БАД GINKGO BILOBA – ГИНКГО БИЛОБА // *Рынок БАД.* 2005. №4. С.29-30.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации: в 3 т. XIII изд. М., 2015. URL: <http://www.femb.ru/feml> (дата обращения: 14.03.2017).
9. Sasakia K., Wada K., Haga M. CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GINKGO BILOBA // *Studies in Natural Products Chemistry.* Vol. 28. Part I. 2003. P. 165-198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2
10. Шкляев С.А., Підпружников Ю.В. Верифікація методики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в лікарському засобі, що містить екстракт Гінкго Білоба // *Управління, економіка та забезпечення якості.* 2012. №. 3. С. 4-8.
11. Sloley B.D., Tawfik S.R., Scherban K.A., Tam Y.K. QUALITY CONTROL ANALYSES FOR GINKGO EXTRACTS REQUIRE ANALYSIS OF INTACT FLAVONOL GLYCOSIDES // *J. Food Drug Anal.* 2003. Vol.11. No. 2. P. 102–107.
12. Дайронас Ж.В., Корочинский А.В., Зилфикаров И.Н. МИКРОСКОПИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО И ТРАВЫ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО В ТАБЛЕТКАХ «ГИНКГОТРОПИЛ» // *Фармация и фармакология.* 2016. Т.4. №1. С. 36-45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36-45

13. Куркина А.В., Калабухова Е.А., Власова Г.И., Демидова Г.А., Авдеева Е.В. ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 4. С. 352. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10016> (дата обращения: 04.04.2017).
14. Beek T.A. CHEMICAL ANALYSIS OF GINKGO BILOBA LEAVES AND EXTRACTS // *Journal of Chromatography*. 2002. Vol. 967. Is.1. P. 21-55. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00172-3
15. Гинкго билоба (*Ginkgo biloba* L.) (Аналитический обзор). URL: <http://www.npkfarm.ru/dlya-spetsialistov/ginkgo-biloba-ginkgo-biloba-l-analiticheskiy-obzor.html> (дата обращения 15.04.2017).
16. Куркина А.В., Загоскина Н.В., Рязанова Т.К. СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ GINKGO BILOBA (*GINKGOACEAE*), КУЛЬТИВИРУЕМОГО В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ // *Растительные ресурсы*. 2013. Т. 49. № 3. С. 410-415.
17. Fuzzati N., Pace R., Villa F. A SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR THE ASSAY OF GINKGOLIC ACIDS IN GINKGO BILOBA EXTRACTS // *Fitoterapia*. 2003. №74. P.247–256. DOI: 10.1016/S0367-326X(03)00040-6
18. United States Pharmacopoeia. 31-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008.
19. Куркин В.А., Буланкин Д.Г., Даева Е.Д., Каденцев В.И. ФЛАВОНОИДЫ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО (*GINKGO BILOBA* L.) // *Химия растительного сырья*. 2012. №2. С. 85-88.
20. European Pharmacopoeia 7.0. 04/2008. P. 1531-1534.
21. Орлова С.Е., Зилфикаров И.Н., Алиев А.М. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИРТОВОГО И УГЛЕКИСЛОТНОГО ЭКСТРАКТОВ ПАЛЬМЫ САБАЛЯ // *Химия растительного сырья*. 2012. №4. С. 137-142.

References

1. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv RF [State register of medicines of the Russian Federation]. URL: grls.rosminzdrav.ru (access data 04.04.2017) (In Russ.)
2. Tan M.S., Yu J.T., Tan C.C., Wanq H.F., Menq X.F., Wanq C., Jiang T., Zhu X.C., Tan L. EFFICACY AND ADVERSE EFFECTS OF GINKGO BILOBA FOR COGNITIVE IMPAIRMENT AND DEMENTIA: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *J. Alzheimers Dis*. 2015. V. 43(2). P. 589-603. DOI: 10.3233/JAD-140837
3. Onbysh T.E., Makarova L.M., Pogorely V.E. MEKHAHIZMY REALIZACII FARMAKOLOGICHESKOJ AKTIVNOSTI EKSTRAKTA GINKGO BILOBA [MECHANISMS FOR THE REALIZATION OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE GINKGO BILOBA EXTRACT]. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii [Modern science-intensive technologies]*. 2005. No 5. P. 22-25. URL: <https://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=22912> (access data: 04.04.2017). (In Russ.)
4. Korchagin D.V., Kurkina A.V., Dubishchev A.V., Kochneva ON, Gusev D.O. IZUCHENIE NEJROTROPNOJ AKTIVNOSTI LEKARSTVENNYH PREPARATOV NA OSNOVE LISTEV GINKGO DVULOPESTNOGO [STUDY OF NEUROTROPIC ACTIVITY OF DRUGS BASED ON GINKGO LEAVES OF BILOBATE]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental research]*. 2013. No. 10-4. P. 812-815. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32407> (access data: 04.04.2017). (In Russ.)
5. Kovrov G.V., Palatov S.Y., Lebedev M.A., Machulina A.I. INSOMNIYA I KOGNITIVNYE NARUSHENIYA [INSOMNIA AND COGNITIVE IMPAIRMENT]. *Effektivnaya farmakoterapiya [Effective pharmacotherapy]*. 2014. No 31. P. 28-33. (In Russ.)
6. Kurkin V.A., Petrukhin I.K. AKTUALNYE ASPEKTY SOZDANIYA IMPORTOZAMESHCHAYUSHCHIH LEKARSTVENNYH RASTITELNYH PREPARATOV [ACTUAL ASPECTS OF THE CREATION OF IMPORT-SUBSTITUTING HERBAL MEDICINES]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental research]*. 2014. No. 11. P. 366-371. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35529> (access data: 04.04.2017) (In Russ.)
7. Eller K.I., Balusova A.S., Komarova E.L. OCENKA PODLINNOSTI RASTITELNYH EKSTRAKTOV KAK SYRYA DLYA BAD GINKGO BILOBA GINKGO BILOBA [EVALUATION OF AUTHENTICITY OF VEGETABLE EXTRACTS, AS RAW MATERIALS FOR BAD. GINKGO BILOBA – GINKGO BILOBA]. *Rynok BAD [Market BAD]*. 2005. No. 4. P.29-30. (In Russ.)
8. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii v 3 t XIII izd [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: 3 vol. XIII ed]. Moskva [Moscow], 2015. URL: <http://www.femb.ru/feml> (access data: 14.03.2017). (In Russ.)
9. Sasakia K., Wada K., Haga M. CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GINKGO BILOBA // *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 28. Part I. 2003. P. 165-198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2
10. Shklyayev S.A., Pidpruzhnikov Y.V. VERIFIKACIYA METODIKI KILKISNOGO VIZNACHENNYA GINKGO-FLAVONOGL KOZIDIV V LIKARSKOMU ZASOBI SHCHO MISTIT EKSTRAKT GINKGO BILOBA [VERIFICATION OF THE METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF GINKGO-FLAVONOGLYCOSIDIV IN A DRUG CONTAINING THE EXTRACT OF GINKGO BILOBA]. *Upravlinnya ekonomika ta zabezpechennyyakosti [Management, Economics and Provision of Liquidity]*. 2012. No. 3. P. 4-8 (In Ukr.)
11. Sloley B.D., Tawfik S.R., Scherban K.A., Tam Y.K. QUALITY CONTROL ANALYSES FOR GINKGO EXTRACTS REQUIRE ANALYSIS OF INTACT FLAVONOL GLYCOSIDES. *J. Food Drug Anal*. 2003. Vol.11. No. 2. P. 102–107.
12. Daironas Zh.V., Korochinsky A.V., Zilfikarov I.N. MICROSCOPY OF THE DIAGNOSTIC ELEMENTS OF THE LEAVES OF GINKGO BILOBATE AND GRASS OF THE MEADOWSWEED IN THE TABLETS “GINKGOTROPIL”. *Pharmacy & Pharmacology*. 2016. Vol. 4. No. 1. P. 36-45.

13. Kurkina A.V., Kalabukhova E.A., Vlasova G.I., Demidova G.A., Avdeev E.V. OBOSNOVANIE NOVYH PODHODOV K STANDARTIZACII LISTEV GINKGO DVULOPASTNOGO S POMOSHCHYU METODA VEZH-KH [SUBSTANTIATION OF NEW APPROACHES TO THE STANDARDIZATION OF GINKGO BILOBATE LEAVES USING THE HPLC METHOD]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2013. No. 4. P. 352. (In Russ.)
14. Beek T.A. CHEMICAL ANALYSIS OF GINKGO BILOBA LEAVES AND EXTRACTS. *Journal of Chromatography*. 2002. Vol. 967. Is.1. P. 21-55. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00172-3
15. Ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.). Analiticheskij obzor [Ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.) (Analytical review)]. URL: <http://www.npkfarm.ru/dlya-spetsialistov/ginkgo-biloba-ginkgo-biloba-l-analiticheskiy-obzor.html> (access data: 15/05/2017). (In Russ.)
16. Kurkina A.V., Zagoskina N.V., Ryanskova T.K. SOSTAV I SODERZHANIE FLAVONOIDOV V LISTYAH GINKGO BILOBA GINKGOACEAE KULTIVIRUEMOGO V RAZLICHNYH REGIONAH ROSSII [COMPOSITION AND CONTENT OF FLAVONOIDS IN THE LEAVES OF GINKGO BILOBA (GINKGOACEAE), CULTIVATED IN VARIOUS REGIONS OF RUSSIA]. *Rastitelnye resursy [Vegetable resources]*. 2013. Vol. 49. No. 3. P. 410-415. (In Russ.)
17. Fuzzati N., Pace R., Villa F. A SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR THE ASSAY OF GINKGOLIC ACIDS IN GINKGO BILOBA EXTRACTS. *Fitoterapia*. 2003. №74. P.247–256. DOI: 10.1016/S0367-326X(03)00040-6
18. United States Pharmacopeia. 31-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008.
19. Kurkin V.A., Bulankin D.G., Daeva E.D., Kadentsev V.I. FLAVONOIDY LISTEV GINKGO DVULOPASTNOGO GINKGO BILOBA L [FLAVONOIDS FROM THE LEAVES OF GINKGO BILOBA (GINKGO BILOBA L.)]. *Himiya rastitelnogo syrya [Chemistry of plant raw materials]*. 2012. No. 2. P. 85-88. (In Russ.)
20. European Pharmacopoeia 7.0 04/2008: 1827. P. 1531-1534
21. Orlova S.E., Zilfikarov I.N., Aliev A.M. SRAVNITELNOE FITOHIMICHESKOE ISSLEDOVANIE SPIRTOVOGO I UGLEKISLOTNOGO EKSTRAKTOV PALMY SABALYA [COMPARATIVE PHYTOCHEMICAL STUDY OF ALCOHOL AND CARBON DIOXIDE EXTRACTS OF THE PALM OF THE CABAL]. *Himiya rastitelnogo syrya [Chemistry of plant raw materials]*. 2012. No. 4. P. 137-142. (In Russ.)

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Авторы:

Марченко Мария Алексеевна – инженер-химик лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: фармакогностическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья, разработка фитопрепаратов. ORCID: orcid.org/0000-0002-0689-2260 E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН. Главный научный сотрудник отдела фитохимии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». Начальник лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: разработка, технология и стандартизация лекарственных растительных препаратов. ORCID: orcid.org/0000-0002-8638-9963 E-mail: dagfarm@mail.ru

Ибрагимов Тимур Алгасанович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры аналитической и фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет». Преподаватель кафедры фармации ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет». Область научных интересов: разработка методов стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. E-mail: aloefarm@mail.ru

Малеев Алексей Геннадиевич – инженер-хроматографист лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: фармакогностическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья, разработка фитопрепаратов, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: alex007_10@mail.ru

Autors:

Marchenko Mariya Alexeevna – chemical engineer of the laboratory of the QCD CJSC “VIFITEH”. Research interests: farmakognosy studying and standardization of medicinal plants, development of medicine from a plant. ORCID: orcid.org/0000-0002-0689-2260 E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru

Zilfikarov Ifrat Nazimovich – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor RAS. Chief researcher at the Department of Phytochemistry FSBSI “All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants”. Chief laboratory QCD of CJSC “VIFITEH”. Research interests: development, technology and standardization of medicinal herbal preparations. ORCID: orcid.org/0000-0002-8638-9963 E-mail: dagfarm@mail.ru

Ibragimov Timur Algasanovich – Candidate of Sciences (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Analytical Chemistry and Pharmaceutical FSBGEI “Dagestan State University.” Teacher of the Department of Pharmacy FGBGEI “Dagestan State Medical University”. Research interests: development of methods for standardization of medicinal plant raw materials and preparations based on it. E-mail: aloefarm@mail.ru

Maleev Aleksey Gennadievich – engineer chromatografist laboratory QCD CJSC “VIFITEH”. Research interests: farmakognosy studying and standardization of medicinal herbs, phytopharmaceuticals development, high performance liquid chromatography. E-mail: alex007_10@mail.ru

Поступила в редакцию: 22.04.2017

Принята к печати : 15.05.2017

Received: 22.04.2017

Accepted for publication: 15.05.2017