

УДК 543.42.062:543.544.5:615.073:615.322

DOI 10.37279/2413-1725-2021-7-3-316-322

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ В ЛИСТЬЯХ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО (*GINKGO BILOBA* L.)

Самотруева М. А., Ажикова А. К., Сергалиева М. У.

*ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Астрахань, Россия
E-mail: alfia-imacheva@mail.ru*

Реликтовое растение Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) является перспективным сырьем для использования в фитотерапии. Для идентификации содержания флавоноидов в водно-спиртовых экстрактах (при различном соотношении вода:этиловый спирт) листьев Гинкго двулопастного использовали методику количественного определения суммы флавоноидных гликозидов в растительном сырье. В ходе сравнительного анализа суммы флавоноидов, экстрагируемых из листьев Гинкго двулопастного в водно-спиртовых извлечениях с различной концентрацией этилового спирта (40 %, 60 %, 70 % и 80 %-ных растворах) выявлено, что наибольший выход суммы флавоноидов наблюдается при действии экстрагента – 60 %-ного водного раствора этанола. Полученные экспериментальные данные флавоноидного состава свидетельствуют о значительном содержании флавоноидов в листьях Гинкго двулопастного, что определяет широкий спектр физиологической и фармакологической активности растения. Исследованный растительный источник является перспективным сырьем для дальнейших разработок новых эффективных лекарственных форм.

Ключевые слова: Гинкго билоба, экстракт, биологически активные вещества, флавоноиды, билобалиды, гинкголиды, терпены, фармакологическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность лечения заболеваний человека лекарственными растениями свидетельствует об их терапевтической ценности и рациональности применения. Известно, что препараты растительного происхождения занимают особое место и характеризуются уникальным химическим составом, широким спектром действия, эффективностью при пролонгированном применении, отсутствием токсичности и побочных эффектов, доступностью по критериям ресурсообеспечения и возобновляемости. Актуальным остается вопрос фитохимического изучения лекарственного растительного сырья и получения из него комплекса биологически активных веществ для дальнейшего внедрения в фармацевтическую практику.

С этих позиций научный интерес представляет растение Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) как богатейший источник биологически активных соединений, оказывающих полифункциональное влияние на организм [1]. Основная часть биологически активных веществ сосредоточена в листьях. Уникальный химический состав листьев Гинкго определяет широкий спектр его фармакологических и

физиологических свойств [2]. Среди биологически активных веществ Гинкго двулопастного известны биофлавоноиды – кверцетин, изорамнетин, кемпферол, флавоноидные гликозиды – гинкгетин, билобетин, мирицетин, тритерпеновые лактоны гингколид и билобалид, органические кислоты, аминокислоты (тимин, аспарагин), эфирные масла, ароматические соединения, воск, ферменты, макроэлементы (Са, Р, К) и другие. Известно, что в листьях данного растения содержатся флавоноидные гликозиды (флавоноиды) [3], обладающие разными видами физиологической активности, в том числе антиоксидантной, антиатеросклеротической и нейромедиаторной [4–10].

Вместе с тем сведений по количественному содержанию биологически активных соединений в листьях Гинкго двулопастного недостаточно. В связи с этим, научный интерес представляет изучение суммы флавоноидов в экстракте высушенных листьев растения Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.). Целью данной работы явилось количественное определение содержания суммы флавоноидных гликозидов в высушенных листьях Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), произрастающего на территории Краснодарского края.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу эксперимента была положена методика количественного определения суммы флавоноидов в растительном сырье методом дифференциальной спектрофотометрии, основанная на способности флавоноидов образовывать с ионами различных металлов окрашенные комплексы [11]. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофотометре модели ПЭ-5400 В (Россия). Биологически активные соединения из высушенного и измельченного сырья экстрагировали 40 %, 60 %, 70 % и 80 %-ным раствором этилового спирта.

Материалом для настоящего исследования служило сырье (листья) Гинкго двулопастного. Сбор листьев был осуществлен в ранний осенний период 2020 года на территории Краснодарского края. Сырье было высушено воздушно-теневым способом. Потеря массы сырья при высушивании составила 7 %.

Методика исследования. 0,5 г воздушно-высушенного измельченного сырья (размер частиц 1 мм) листьев Гинкго двулопастного помещали в колбу на 100 мл, заливали 15 мл 40 %-ного этанола (C_2H_5OH) и нагревали на водяной бане в течение 30 минут при 80 °С с обратным холодильником. После этого извлечение охлаждали и фильтровали в мерную колбу объемом 50 мл. Опыт повторяли дважды порциями по 15 мл 40 %-ным этиловым спиртом. Полученный объем в мерной колбе доводили до метки добавлением 40 %-ного этилового спирта и тщательно перемешивали. Эту колбу принимали за раствор А.

Затем 5 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 1 мл 2 %-ного спиртового раствора хлорида алюминия ($AlCl_3$), 0,5 мл 5 %-ного раствора уксусной кислоты (CH_3COOH) и доводили до метки этанолом в концентрации 95 %. Через 30 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 400 nm относительно раствора сравнения.

Для приготовления раствора сравнения 5 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл, прибавляли 10 мл 95 %-ного этанола и 0,5 мл 33 %-ной уксусной

кислоты (CH₃COOH). Полученный объем доводили до метки добавлением 95 %-ного спирта этилового и тщательно перемешивали.

Одновременно с этим измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина.

Приготовление раствора стандартного образца рутина. Около 0,05 г (точная навеска) рутина (ФС 42-2508-96) помещали в мерную колбу объемом 100 мл, прибавляли 70 мл спирта этилового 95 %, перемешивали до полного растворения и доводили до метки этим же растворителем (раствор А). Затем 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 0,5 мл 33 % раствора кислоты уксусной и 2 мл 2 % раствора алюминия хлорида и доводили объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки, перемешивали. Через 30 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора при 400 nm относительно раствора Б (1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 0,5 мл 33 % раствора уксусной кислоты и доводили спиртом этиловым 95 % до метки).

Содержание суммы флавоноидных гликозидов определяли по формуле:

$$X = \frac{A_x \times a_{cm} \times 10 \times 100}{A_{cm} \times a_x \times (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора; A_{cm} – оптическая плотность раствора стандартного образца рутина; a_{cm} – масса стандартного образца рутина, г; a_x – масса навески сырья, г; W – влажность, %.

В ходе исследования для установления оптимальных (технологических) условий для количественного определения (количественной идентификации) суммы флавоноидов в сырье Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), была проведена серия экспериментов по экстрагированию воздушно-высушенных, измельченных листьев данного растения этиловым спиртом (водным раствором этилового спирта), как экстрагентом различной концентрации (40 %, 60 %, 70 % и 80 %-ным раствором этанола) по указанной методике.

Измерения оптической плотности растворов растительных экстрактов проводили в широком спектральном диапазоне от 310 до 410 nm для точного определения максимальных значений оптической плотности и, соответственно, содержания флавоноидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения эксперимента были получены следующие результаты. При идентификации флавоноидных гликозидов с применением в качестве экстрагента 40 %-ного раствора этанола наблюдали максимум светопоглощения при длине волны 400 nm. Результаты исследования спектра поглощения суммы флавоноидных гликозидов водно-спиртового извлечения из листьев Гинкго двулопастного с алюминия хлоридом показали, что содержание суммы флавоноидов с концентрацией экстрагента 40 %, в изучаемом растении составило 0,94 % в пересчете на сухой растительный материал.

Экстракция флавоноидов с применением в качестве экстрагента 60 %-ного раствора спирта этилового показала, что максимум поглощения извлечения БАВ был достигнут при длине волны 400 nm. Количественное содержание флавоноидов в водно-спиртовом извлечении (с концентрацией экстрагента 60 %) высушенных листьев Гинкго двулопастный составляет 1,35 % в пересчете на сухой растительный материал.

При экстракции суммы флавоноидов с применением в качестве экстрагента 70 %-ного раствора этанола наблюдали максимальную оптическую плотность при длине волны 400 nm. По результатам исследования выявлено, что суммарное содержание флавоноидов в 70 %-ном экстракте листьев Гинкго двулопастного составляет 0,78 % в пересчете на сухой растительный материал.

При идентификации флавоноидных гликозидов с использованием экстрагента – 80 %-ного раствора этанола наблюдался максимум поглощения при длине волны 400 nm. Процентное содержание суммы флавоноидных гликозидов в 80 %-ном водно-этанольном экстракте листьев Гинкго билоба составило 0,91 % в пересчете на сухой растительный материал.

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что наибольший выход экстрактивных извлечений суммы флавоноидных гликозидов из сырья листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) наблюдался в условиях экстрагирования 60 %-ным раствором этилового спирта. Результаты пересчета содержания флавоноидов на сухой растительный материал приведены в таблице 1, откуда видно, что в перерасчете на высушенный растительный материал уровень флавоноидов в 60 %-ном экстрагенте в 1,5 раза выше, чем в 40 % -, 70 %-, 80 %-ных водных растворах этанола.

Таблица 1
Сравнительная характеристика содержания флавоноидов в водно-спиртовых экстрактах листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) при длине волны 400 nm

Концентрация спирта в экстрагенте	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %
40 %	0,340	0,94
60 %	0,486	1,35
70 %	0,279	0,78
80 %	0,328	0,91

Таким образом, растение Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) представляет собой депо ценных биологически активных компонентов, что является основанием для дальнейших исследований по идентификации других биологически активных веществ и последующей оценке их физиологической и фармакологической активности с целью разработки новых фитосредств на его основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе экспериментального исследования выявлены оптимальные условия и параметры экстрагирования флавоноидов из воздушно-высушенного сырья листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.). Проведена сравнительная оценка содержания флавоноидных гликозидов в извлечениях из листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), полученных при разном соотношении вода:этиловый спирт.
2. Установлено, что оптимальной концентрацией экстрагента, обеспечивающей наибольший выход экстрактивных соединений из высушенных листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), является 60 %-ный водно-спиртовой раствор этилового спирта.
3. Анализ результатов количественного определения флавоноидного состава экстрактов воздушно-высушенных листьев Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), произрастающего на территории Краснодарского края, расширяет сырьевую базу отечественных лекарственных растений.
4. Полученные в ходе исследования экспериментальные данные по наличию флавоноидных гликозидов в листьях Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) свидетельствуют о значительном их содержании в данном растении, что определяет широкий спектр физиологической и фармакологической активности растения.

Список литературы

1. Катунина Е. А. Гинкго билоба: итоги полувекового опыта применения. Полиmodalность эффектов гинкго билоба: экспериментальные и клинические исследования / Е. А. Катунина // Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2013. – № 2. – С. 53–57.
2. Литвинец Е. А. Гинкго билоба: фармакологические и лечебные свойства / Е. А. Литвинец, О. Р. Винтонив // Здоровье мужчины. – Профессионал-Ивент (Киев) – 2012. – Т. 1, № 40. – С. 37.
3. Васильев В. Г. Идентификация терпеновых лактонов и флавоногликозидов в препаратах на основе экстракта гинкго билоба и новый способ полуколичественной оценки содержания флавоногликозидов методом спектроскопии ЯМР ¹H / В. Г. Васильев, А. С. Прокопьев, Г. А. Калабин // Химия растительного сырья. – 2016. – № 3. – С. 85–93.
4. Бурчинский С. Г. Препараты Гинкго Билоба: по пути открытий в клинической нейрофармакологии / С. Г. Бурчинский // Международный неврологический журнал. – 2016. – Т. 4, № 82. – С. 83–87.
5. Кузнецова С. М. Применение экстракта гинкго билоба в системе реабилитации больных, перенесших инсульт / С. М. Кузнецова, В. В. Кузнецов, Д. В. Шульженко // Международный неврологический журнал. – 2016. – Т. 5, № 83. – С. 111–114.
6. Пономарев В. В. Эффективность экстракта Гинкго билоба в лечении легкого и умеренного когнитивного снижения сосудистого генеза с позиции доказательной медицины / В. В. Пономарев, Э. В. Барабанова // Медицинские новости. – 2016. – Т. 4, № 259. – С. 18–21.
7. Cui Y. Effect of Ginkgo biloba leaf extract on cerebral cortex amino acid levels in cerebral ischemia model rats / Y. Cui, H. Wu, M. Liu [et al.] // J Tradit Chin Med. – 2018 –Vol. 38, No. 5. – P. 676–684.
8. Eisevand F. The effects of Ginkgo biloba on metabolic syndrome: A review / F. Eisevand, B. M. Razavi, H. Hosseinzadeh // Phytother Res. – 2020. – Vol. 34, No.8. – P.1798–1811. doi: 10.1002/ptr.6646.
9. Hao F. Enhanced Neuroprotective Effects of Combination Therapy with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ginkgo biloba Extract (EGb761) in a Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / F. Hao, A. Li, H. Yu [et al.] // Neuroimmunomodulation. – 2016. – Vol. 23, No. 1. – P. 41–57. doi: 10.1159/000437429.

10. Ji H. Ginkgo Biloba extract as an adjunctive treatment for ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials / H. Ji, X. Zhou, W. Wei [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – Vol. 99, No. 2. doi: 10.1097/MD.00000000000018568/
11. Корнельзен Д. А. Модификация методики количественного определения суммы флавоноидов в препаратах на основе экстракта Гинкго билоба / Д. А. Корнельзен, А. И. Бондаренко, А. А. Шмыгарева // В сборнике: Вопросы науки и образования: теоретические и практические аспекты. Материалы Международной (заочной) научно-практической конференции, Прага, Чехия, 18 мая 2019 года. Под общей редакцией А. И. Вострецова. – Издательство: Научно-издательский центр "Мир науки" (ИП Вострецов Александр Ильич, Нефтекамск), 2019. – С. 30–36.

DETERMINATION OF FLAVONOID GLYCOSIDES SUM CONTENT IN LEAVES OF *GINKGO BILOBA* L.

Samotrueva M. A., Azhikova A. K., Sergaliev M. U.

*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation
E-mail: alfia-imacheva@mail.ru*

It is known that preparations of plant origin occupy a special place and are characterized by a unique chemical composition, a wide spectrum of action, effectiveness in prolonged use, lack of toxicity and side effects, availability according to the criteria of resource supply and renewable. The issue of the phytochemical study of medicinal vegetal raw materials and the production of a complex of biologically active substances from it for further introduction into pharmaceutical practice remains relevant.

From these positions, the *Ginkgo biloba* L. plant is of scientific interest as the richest source of biologically active compounds that have a polyfunctional effect on the body. The *Ginkgo biloba* L. relict plant is a promising raw material for use in phytotherapy. Most biologically active substances are concentrated in leaves. Unique chemical composition of Ginkgo leaves determines a wide range of its pharmacological and physiological properties. Bioflavonoids are known among biologically active Ginkgo bioflavonoids – quercetin, isoramnetin, kempferol, flavonoid glycosides – ginkgetin, bilobetin, myricetin, triterpene lactones gingcolide and bilobalide, organic acids, amino acids (thymine, asparagine), essential oils. However, information on the quantitative content of biologically active compounds in Ginkgo leaves is not enough. In this regard, it is of scientific interest to study the sum of flavonoids in the extract of dried leaves of the *Ginkgo biloba* L. plant. The purpose of this work was to quantify the content of the sum of flavonoid glycosides in the dried leaves of *Ginkgo biloba* L., which grows in the Krasnodar Territory Russian Federation.

To identify the content of flavonoids in water-alcohol extracts (with a different ratio of water to ethyl alcohol) of *Ginkgo biloba* leaves, a method was used to quantify the sum of flavonoid glycosides in plant raw materials. In the course of the study, in order to establish optimal (technological) conditions for the quantitative determination (quantitative identification) of the sum of flavonoids in the *Ginkgo biloba* L. raw material, a series of experiments were carried out to extract air-dried, ground leaves of this plant with ethyl alcohol (an aqueous solution of ethyl alcohol), as an extractant of various

concentrations.

In the course of comparative analysis of the sum of flavonoids extracted from Ginkgo biloba leaves in water-alcohol extracts with different concentration of ethyl alcohol (40 %, 60 %, 70 % and 80 % solutions), it was revealed that the highest yield of the sum of flavonoids is observed under the action of extractant – 60 % aqueous ethanol solution. The obtained experimental data of the flavonoid composition indicate a significant content of flavonoids in the leaves of Ginkgo biloba, which determines a wide range of physiological and pharmacological activity of the plant. The studied plant source is a promising raw material for further development of new effective dosage forms.

Ginkgo biloba L. plant is a depot of valuable biologically active components, which is the basis for further studies on the identification of other biologically active substances and the subsequent assessment of their physiological and pharmacological activity with the aim of developing new phytodetic agents based on it.

Keywords: *Ginkgo biloba*, extract, biologically active substances, flavonoids, bilobalides, ginkgolides, terpenes, pharmacological activity.

References

1. Katunina E. A., Ginkgo biloba: the results of a half-century of application experience. Polymodality of Ginkgo biloba effects: experimental and clinical studies, *Neurology and rheumatology. Annex to the journal Consilium Medicum*, **2**, 53 (2013). (in Russ.)
2. Litvinets E. A., Vintoniv O. R., Ginkgo biloba: pharmacological and therapeutic properties, *Health of men*, **1 (40)**, 37 (2012). (in Russ.)
3. Vasil'ev V. G., Prokop'ev A. S., Kalabin G. A., Identification of terpene lactones and flavonoglycosides in Ginkgo biloba extract preparations and a novel method for semi-quantitative evaluation of flavonoglycosides by NMR spectroscopy 1H. *Chemistry of vegetable raw materials*, **3**, 85 (2016). (in Russ.)
4. Burchinskiy S. G., Ginkgo biloba Preparations: Along the Way of Discoveries in Clinical Neuropharmacology. *International Neurological Journal*, **4 (82)**, 83 (2016). (in Russ.)
5. Kuznetsova S. M., Kuznetsov V. V., Shul'zhenko D. V., Application of Ginkgo biloba extract in the system of rehabilitation of patients who have suffered a stroke. *International Neurological Journal*, **5 (83)**, 111(2016). (in Russ.)
6. Ponomarev V. V., Barabanova E. V., Effectiveness of Ginkgo biloba extract in treating mild and moderate cognitive reduction of vascular genesis from the position of evidence-based medicine. *Medical news*, **4 (259)**, 18 (2016). (in Russ.)
7. Cui Y., Wu H., Liu M. [et al.], Effect of Ginkgo biloba leaf extract on cerebral cortex amino acid levels in cerebral ischemia model rats. *J Tradit Chin Med.*, **38 (5)**, 676 (2018).
8. Eisvand F., Razavi B. M., Hosseinzadeh H., The effects of Ginkgo biloba on metabolic syndrome: A review. *Phytother Res.* 2020 Feb 25. doi: 10.1002/ptr.6646.
9. Hao F., Li A., Yu H. [et al.], Enhanced Neuroprotective Effects of Combination Therapy with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ginkgo biloba Extract (EGb761) in a Rat Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, **23 (1)**, 41 (2016).
10. Ji H., Zhou X., Wei W.[et al.], Ginkgo Biloba extract as an adjunctive treatment for ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore)*, **99 (2)**, (2020).
11. Kornel'zen D. A., Bondarenko A. I., Shmygareva A. A. Modification of the procedure for quantifying the sum of flavonoids in preparations based on Ginkgo biloba extract, *In the collection «Issues of science and education: theoretical and practical aspects».* Materials of the International (correspondence) scientific and practical conference. Edited by A.I. Vostretsov. Publishing House: Scientific and Publishing Center "World of Science" (IP Vostretsov Alexander Ilyich, Neftekamsk). (Czech Republic, Prague, 2019), p. 30. (in Russ.)