|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Гинкго двулопастного экстракт сухой** **ФС**

**Ginkgo bilobae foliorum еxtractum siccum** **Вводится впервые**

Гинкго двулопастного экстракт сухой, получаемый из листьев многолетнего культивируемого древесного растения гинкго двулопастного - *Ginkgo biloba L.* сем. гинкговых − *Ginkgoaceae* (ФС.2.5.0010.15)экстракцией подходящим растворителем (соотношение сырья к полученному экстракту (40-60 : 1) с последующей очисткой органическими растворителями с содержанием суммы флавоноидных гликозидов не менее 22,0 % и суммы терпеновых лактонов не менее 5,0 %, применяемый для производства лекарственных препаратов.

**Описание**

Аморфный порошок от светло-коричневого до коричневого цвета без характерного запаха.

\*Гигроскопичен, комкуется.

**Подлинность**

1. ***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) рутина.* 0,003 г СО рутина растворяют в 20 мл спирта 95 %. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты.* 0,001 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 20 мл спирта 95 %. Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 0,02 г субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл смеси вода - метанол (2 : 8), обрабатывают в ультразвуковой бане в течение 5 мин и фильтруют через фильтр «белая лента» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной или алюминиевой подложке размером 15 × 15 см наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 2 мм по 5 мкл испытуемого раствора, рядом - раствора СО рутина и раствора СО хлорогеновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей муравьиная кислота безводная - уксусная кислота ледяная - вода - этилацетат (7,5 : 7,5 : 17,5 : 67,5), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, выдерживают при температуре 105 °С в течение 5 мин, горячую опрыскивают дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствором 1 % в спирте 96 %. Пластину высушивают на воздухе в течение 5 мин, затем опрыскивают макрогола 400 раствором спиртовым 5 %, снова высушивают на воздухе в течение 30 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СОрутина должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого цвета.

На хроматограмме раствора СОхлорогеновой кислоты должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией голубого цвета.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться три зоны адсорбции с флуоресценцией желтовато-коричневого или зеленовато-коричневого цвета ниже зоны адсорбции СО рутина; одна или две зоны адсорбции с флуоресценцией зеленого цвета рядом с зоной адсорбции СО хлорогеновой кислоты; выше - зона адсорбции с интенсивной флуоресценцией голубого цвета, и еще выше зона адсорбции с флуоресценцией желто-коричневого цвета; допускается обнаружение других зон адсорбции.

1. ***ВЭЖХ.***

На хроматограмме испытуемого раствора, полученной для количественного определения суммы флавоноидных гликозидов, должны регистрироваться три основных пика с относительными временами удерживания по кверцетину около 1,0 (кверцетин), 1,9 (кемпферол), 2,0 (изорамнетин).

На хроматограмме испытуемого раствора, полученной для количественного определения суммы терпеновых лактонов, должны регистрироваться основные пики, по временам удерживания соответствующие пикам гинкголидов А, В, С и билобалида на хроматограмме раствора СО гинкго экстракта сухого для идентификации пиков.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5,0 %. В соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании**».**

**Тяжелые металлы.** Не более 0,01 %. В соответствии с требованиями ОФС «Экстракты**»**.

**Остаточные органические растворители**. В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители**»**. Содержание гептана не более 3000 ррm, ацетона не более 3000 ррm, этилацетата не более 3000 ррm, метилэтилкетона не более 3000 ррm, этанола не более 5000 ррm.

*Приготовление растворов*.

*Раствор внутреннего стандарта*. 2,0 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартный исходный*. 75 мкл гептана, 100 мкл ацетона, 100 мкл метилэтилкетона, 300 мкл этанола помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Содержание растворителей (*ао)* в 1 мл исходного стандартного раствора в мг: гептан - 0,0513; ацетон - 0,0792; этилацетат - 0,0901; метилэтилкетон - 0,0805; этанол - 0,237.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартный.* 1,0 мл стандартного раствора исходного помещают в виалу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой под кримп.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если для хроматограммы стандартного раствора выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гептана, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика гептана должен быть не более 2,0;

- разрешение между пиками этилацетата и метилэтилкетона должно быть не менее 1,5.

Около 0,2 г (точная навеска) субстанции помещают в виалу для парофазного анализа вместимостью 20 мл, прибавляют 1,0 мл воды, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и закрывают крышкой под кримп (испытуемый раствор).

Испытуемый и стандартный растворы поочередно хроматографируют на газовом хроматографе, оснащенном плазменно-ионизационным детектором и устройством для парофазного анализа в следующих условиях.

**Хроматографические условия:**

- колонка капиллярная 60 м × 0,53 мм;

- неподвижная фаза - полиэтиленгликоль (толщина пленки 1 мкм);

- газ-носитель: азот для хроматографии;

- скорость газа-носителя 8 мл /мин;

- скорость подачи водорода 30 мл/мин;

- скорость подачи воздуха 300 мл/мин;

- скорость подачи вспомогательного газа 25 мл/мин;

- деление потока 1:10;

- объем вводимых растворов – 250 мкл;

- программирование температуры:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Время****(мин)** | **Температура****(°С)** |
| Колонка | 0-88-3838-53 | 5050→200200 |
| Инжектор |  | 160 |
| Детектор |  | 270 |
| Термостатирование виалы | 30 | 75 |

Порядок выхода растворителей: 1 - гептан, 2 - ацетон, 3 - этилацетат, 4 - метилэтилкетон, 5 - этанол, 6 - ацетонитрил.

Содержание каждого растворителя в субстанции в миллионных долях (Х, ррm) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{ }∙S\_{o}^{'}∙\_{ }a\_{0}∙1000∙P}{S\_{o }∙S^{'}∙a∙100}$$

где, $S\_{ }$ - площадь пика растворителя на хроматограмме испытуемого раствора;

*So*- площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

$S^{'}$ *-* площадь пика растворителя на хроматограмме стандартного раствора;

$S\_{0}^{'}$- площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора;

*а* - навеска субстанции, г;

*ао* - содержание растворителя в 1 мл стандартного раствора исходного, мг;

Р - содержание основного вещества в соответствующем растворителе, взятом для приготовления стандартного раствора исходного, %.

**Гинкголовые кислоты**. Содержание суммы гинкголовых кислот должно быть не более 5 ррm.

*Приготовление растворов*.

*Раствор стандартного образца (СО) гинкголовых кислот.* Около 0,01 г (точная навеска) СО гинкголовых кислот помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 5 мл метанола, перемешивают до полного растворения, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным*.*

*Раствор трифторуксусной кислоты 0,01 %.* 0,1 мл трифторуксусной кислоты растворяют в 500 мл воды для хроматографии в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор трифторуксусной кислоты 0,01 % в ацетонитриле.* 0,1 мл трифторуксусной кислоты растворяют в 500 мл ацетонитрила для хроматографии в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если для хроматограммы раствора СО гинкголовых кислот выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пиков гинкголовых кислот С13, С15 и С17 должен быть от 0,8 до 2,0;

- относительное стандартное отклонение площади пика гинкголовой кислоты С17, рассчитанное из пяти последовательных хроматограмм, должно быть не более 5 %;

- разрешение между пиками гинкголовых кислот С13 и С15 должно быть не менее 1,5.

Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 8 мл метанола и обрабатывают в ультразвуковой бане в течение 15 мин, охлаждают, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают. В случае необходимости центрифугируют раствор при 5000 об/мин в течение 10 мин (испытуемый раствор).

Хроматографируют поочередно испытуемый раствор и раствор СО гинкголовых кислот, получая не менее 3 хроматограмм испытуемого раствора и не менее 5 хроматограмм раствора СО гинкголовых кислот в следующих условиях.

**Условия хроматографирования**

|  |  |
| --- | --- |
| - колонка | 250 × 4,6 мм  |
| - неподвижная фаза | октилсилилсиликагель для хроматографии, 5 мкм; |
| - подвижная фаза | А. трифторуксусной кислоты раствор 0,01 %; В. трифторуксусной кислоты раствор 0,01 % в ацетонотриле; |
| - скорость потока, мл/мин | 1,0  |
| - температура колонки, °С | 35 |
| - детектор | спектрофотометрический с электронным интегратором; |
| - длина волны, нм | 210  |
| - объем вводимой пробы, мкл | 50 |
| - время хроматографирования | 45 мин |

Содержание гинкголовых кислот в субстанции в миллионных долях (Х, ppm) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{ }∙a\_{o}∙2∙10∙P∙100∙10000}{S\_{O}∙10∙10∙a∙100}= \frac{S\_{ }∙a\_{o}∙P∙2000}{S\_{O}∙a}, $$

$где: S\_{0 }$ - площадь пика гинкголовой кислоты С17 на хроматограмме раствора СО гинкголовых кислот;

*S* - сумма площадей пиков гинкголовых кислот С13, С15 С17 на хроматограмме испытуемого раствора;

*ао* - навеска СО гинкголовых кислот, г;

*а* - навеска субстанции, г;

Р - содержание гинкголовой кислоты С17 в СО гинкголовых кислот, %.

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.**

**Флавоноидные гликозиды.** Содержание суммы флавоноидных гликозидов в пересчете на кверцетин должно быть не менее 22,0 %.

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) кверцетина.* Около 0,005 г (точная навеска) СО кверцетина дигидрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, прибавляют 7,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % и 2,5 мл воды, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор стандартного образца (СО) кемпферола.* Около 0,005 г (точная навеска) СО кемпферола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, прибавляют 7,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % и 2,5 мл воды, доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор стандартного образца (СО) изорамнетина.* Около 0,005 г (точная навеска) СО изорамнетина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, прибавляют 7,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % и 2,5 мл воды доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор стандартных образцов (СО) кверцетина, кемпферола и изорамнетина.* Смешивают по 1,0 мл раствора СО кверцетина, раствора СО кемпферола и раствора СО изорамнетина.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор фосфорной кислоты 0,1%*

1,0 мл фосфорной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды для хроматографии, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если при хроматографировании раствора стандартных образцов (СО) кверцетина, кемпферола и изорамнетина выполняются следующие условия:

- разрешение между пиками кемпферола и изорамнетина должно быть не менее 1,5;

- фактор асимметрии пика кверцетина должен быть не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение (%) пика кверцетина, рассчитанное из пяти последовательных хроматограмм, должно быть не более 3 %.

Около 0,3 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 78 мл смеси спирт 96 % - вода - хлористоводородная кислота концентрированная (50 : 20 : 8) и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов при температуре 80 °С. Полученный гидролизат охлаждают, количественно переносят спиртом 96 % в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» (испытуемый раствор).

Хроматографируют поочередно испытуемый раствор и растворы СО кверцетина, СО кемпферола и СО изорамнетина в ниже приведенных условиях.

Относительные времена удерживания (по кверцетину) для кемпферола и изорамнетина составляют 1,9 и 2,0 соответственно.

**Условия хроматографирования:**

|  |  |
| --- | --- |
| - колонка | 250 × 4,6 мм,  |
| - неподвижная фаза | октадецилсилилсиликагель для хроматографии, 5 мкм; |
| - подвижная фаза | фосфорная кислота раствор 0,1 % - ацетонитрил для хроматографии (70 : 30);  |
| - скорость потока, мл/мин | 1,0  |
| - температураколонки, °С | 30 |
| - детектор | спектрофотометрический  |
| - длина волны, нм | 370  |
| - объем вводимой пробы, мкл | 10 |
| - время хроматогра-фирования | 35 мин |

Содержание суммы флавоноидных гликозидов в пересчете на кверцетин в субстанции (Х) в процентах вычисляют по формуле:

$Х=\frac{S\_{ }∙ a\_{o} ∙ 100 ∙ 2,514 ∙ P ∙ 100}{S\_{o }∙ 25 ∙ a ∙ 100}= \frac{S\_{ }∙ a\_{o} ∙ 10,056 ∙ P }{S\_{o }∙ a}$,

$где S\_{o }$ - площадь пика кверцетина на хроматограмме раствора СО кверцетина;

*S* - сумма площадей пиков кверцетина, кемпферола, изорамнетина на хроматограмме испытуемого раствора;

$a\_{o}$ - навеска СО кверцетина, г;

$a$ - навеска субстанции, г;

Р - содержание основного вещества в СО кверцетина, %;

2,514 - коэффициент пересчёта на флавоноидные гликозиды со средней молекулярной массой 756,7.

**Терпеновые лактоны.** Содержание суммы терпеновых лактонов в субстанции должно быть не менее 5,0 %.

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) бензилового спирта.* Около 0,03 г (точная навеска) СО бензилового спирта помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл подвижной фазы, перемешивают до полного растворения, доводят объём раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление растворов

*Раствор стандартного образца (СО) гинкго экстракта* *сухого для идентификации пиков.* Около 0,120 г (точная навеска) СО гинкго экстракта сухого для идентификации пиков помещают в колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл фосфатного буферного раствора рН 5,8, перемешивают и далее поступают аналогично подготовке испытуемого раствора.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Результаты анализа считаются достоверными, если для хроматограммы раствора СО бензилового спирта выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бензилового спирта, должна быть на менее 5000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика бензилового спирта должен быть не более 2,0;

- относительное стандартное отклонение площади пика бензилового спирта, рассчитанное из пяти последовательных хроматограмм, должно быть не более 3 %.

Около 0,120 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл фосфатного буферного раствора рН 5,8; содержимое колбы перемешивают. Полученный раствор наносят на хроматографическую колонку длиной 0,15 м с внутренним диаметром 30 мм, заполненную кизельгуром для хроматографии. Колбу промывают 5 мл фосфатного буфера рН 5,8 два раза, смывы наносят на хромато-

графическую колонку. Оставляют колонку на 15 мин, после чего элюируют 100 мл этилацетата. Элюат выпаривают на роторном испарителе при температуре водяной бани 50 °С досуха. Сухой остаток растворят в 2,5 мл подвижной фазы (испытуемый раствор).

Хроматографируют поочередно испытуемый раствор и раствор СО гинкго экстракта сухого для идентификации пиков при следующих условиях.

**Условия хроматографирования:**

|  |  |
| --- | --- |
| - колонка | 250 × 4,0 мм;  |
| - неподвижная фаза | октадецилсилилсиликагель для хроматографии,5 мкм; |
| - подвижная фаза | тетрагидрофуран - метанол - вода (10:20:75);  |
| - скорость потока, мл/мин | 0,7  |
| - температураколонки, °С | 35 |
| - детектор | рефрактометрический  |
| - объем вводимой пробы, мкл | 50 |
| - время хроматогра-фирования | 40 мин |

Порядок выхода пиков на хроматограмме раствора СО гинкго экстракта сухого для идентификации пиков: гинкголид С, билобалид, гинколид А, гинкголид В.

Содержание каждого терпенового лактона (билобалид, гинкголиды А, В, С) в субстанции в процентах (ХБ(А,В,С)) вычисляют по формуле:

$Х\_{Б(А,В,С)}=\frac{S\_{Б\left(А,В,С\right) }∙ a ∙ 10 ∙ P∙ K∙100}{S\_{о }∙ 100 ∙ a ∙100} $,

$где S\_{о }$ - площадь пика бензилового спирта на хроматограмме раствора СО бензилового спирта;

*S*Б(А,В,С) - площадь пика терпенового лактона (билобалид, гинкголида А, В, С) на хроматограмме испытуемого раствора;

*ао* - навеска СО бензилового спирта, г;

*а* - навеска субстанции, г;

Р - содержание основного вещества в СО бензилового спирта, %;

К - коэффициент пересчёта (1,20 - для билобалида; 1,22 - для гинкголида А; 1,19 - для гинкголида В; 1,27 - для гинкголида С).

Содержание терпеновых лактонов в субстанции в процентах (Х) вычисляют по формуле:

$X=X\_{Б}+X\_{А}+X\_{В}+X\_{С}$, где

*Х*Б - содержание билобалида, %;

*Х*А - содержание гинкголида А, %;

*Х*В - содержание гинкголида В, %;

*Х*С - содержание гинкголида С, %.

**Хранение.** В защищенном от влаги и света месте при температуре от 15 до 25 °С.